UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"
DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E CHIRURGIA
Cattedra di Microbiologia Clinica, Direttore :Prof. Cartesio Favalli

RELAZIONE TECNICA

"Valutazione di un sistema rapido di Microbiologia per la ricerca di microrganismi patogeni correlabili con infezioni sessualmente trasmissibili in campioni umani"

Scopo:

Lo scopo del progetto è stato quello di confrontare i risultati ottenuti, utilizzando un sistema (AnyplexTM II STI-7 Detection (V1.1) basato sulla ricerca del DNA di agenti patogeni correlabili con infezioni sessualmente trasmissibili, con un sistema colturale classico su piastra.Il MYCO WELL D-One. (in seguito denominato "SISTEMA") Quest'ultimo fonda il suo funzionamento sulla reazione colorimetrica prodotta a seguito della crescita dei microrganismi in questione. E permette l'identificazione presuntiva di:

- *M.hominis,*
- *U. urealyticum/parvum,*
- *Mycoplasma spp.*
- *Candida albicans,*
- *Candida spp.*
- *Gardenerella vaginalis,*
- *Trichomonas vaginalis.*

Campioni:
La valutazione è stata condotta su un totale di 100 campioni sia negativi che positivi. In particolare, campioni positivi per uno o più patogeni già identificati con i sistemi molecolari.
I Campioni utilizzati erano: tamponi vaginali, cervicali, uretrali, liquido seminale.

Metodi:

Il "SISTEMA" è stato utilizzato nel modo seguente: 150 microlitri del terreno di trasporto (e-Swab liquid Amies Preservation Medium. COPAN 490CE A) sono stati utilizzati nella fiala per diluizioni a corredo del kit, mentre 150 microlitri della diluizione sono stati usati per la semina nei pozzetti (come previsto dal protocollo del produttore).

Per stabilire la quantità di terreno AMIES COPAN nella fiala di soluzione salina somministrata nel sistema, è stato realizzato uno studio preliminare , utilizzando diversi volumi di terreno di trasporto (300/200/150/100 e 50 µl) e osservando le reazioni ottenute nel "SISTEMA"
Le prove hanno messo messo in evidenza che il volume di 150 µL, era quello in cui si osservavano i migliori risultati in termine di confronto con i dati del sistema molecolare, in accordo anche alle indicazioni di incubazione e tempi di risposta forniti dalla metodica del "SISTEMA"
Le piastre del sistema sono state preparate tra le 24 e le 48 ore dopo il test molecolare.
In questo lasso di tempo i campioni sono stati conservati in frigo e riportati a t.a. prima dell'esecuzione del test.
Le piastre sono state quindi processate come da istruzioni coprendo i pozzetti (da 1 a 25 e 32) con olio di vasellina e incubate a 37 °C per 24 - 48 ore.

Valutazione:
Le prove effettuate su 100 campioni positivi e negativi all'indagine molecolare per:
Mycoplasma hominis
Mycoplasma genitalium
Gardnerella vaginalis
Candida albicans
Trichomonas vaginalis

Come da indicazioni del costruttore, Il "SISTEMA", permette l'identificazione presuntiva di *M. hominis*, secondo la classica reazione dell'Idrolisi dell'Arginina.
Fermo restante che la distinzione tra le specie di *Ureaplasma spp (Ureaplasma Urealyticum* e *Ureaplasma Parvum*) può essere ottenuta solo con tecniche molecolari, Il "SISTEMA" consente la crescita di entrambi (questo di fatto si evince dal confronto con il metodo molecolare , in quanto i pozzetti corrispondenti hanno dato risultato positivo sia quando il campione in esame era positivo al test molecolare per *Ureaplasma Urealyticum* sia quando era positivo per *Ureaplasma Parvum*).
La loro rivelazione si basa sulla classica attività biochimica nei confronti dell'urea presente nei pozzetti di identificazione del "SISTEMA".

Il "SISTEMA" inoltre contiene un pozzetto denominato:*Mycoplasma spp* che permette la crescita di Micoplasmi fermentatori del glucosio, tra i quali si trovano varie specie: *M. penetrans, M. fermentans, M. genitalium.*

Risultati:
Le piastre sono state lette a 24 ore ed a 48 ore dalla semina, prendendo come riferimento per la positività (come descritto in metodica) solo il viraggio al ROSSO nei settori della piastra dedicati a *M.hominis* e *Ureaplasma urealyticum/parvum*

La lettura è stata fatta non conoscendo il risultato del test molecolare.
Mostrano una sostanziale sovrapponibilità dei dati ottenuti con il metodo molecolare rispetto al metodo in prova.
Non si sono verificati, almeno nel corso del test effettuato, casi di falsi negativi.
La correlazione tra la positività di *Candida Albicans* e l'identificazione della piastra è stata del 100%, nonostante per la conferma di questo agente si debba realizzare un'osservazione microscopica, così come per Trichomonas vaginale, che è stato indicato correttamente nel kit.
In calce gli allegati dei risultati, eventuali piccole discrepanze andrebbero valutate in rapporto alla vitalita' dei patogeni presenti nei campioni. Il test molecolare e' piu' sensibile ma non discrimina tra microorganismi vitali e non.

Suggerimenti e Considerazioni
La lettura della piastra deve essere eseguita entro le 24/48 ore, poichè la crescita classica delle specie più comuni di *U. urealyticum/M. hominis* avviene proprio in questo lasso di tempo, probabilmente la bassa concentrazione dell'agente patogeno presente nel campione, può variare il tempo di crescita.
Il pozzetto di M. spp. deve essere osservato in un periodo di tempo maggiore di 3 giorni. (fino a5gg.)
Sebbene il costruttore dichiari che il solo risultato positivo sia il viraggio al ROSSO (GIALLO per il solo *Mycoplasma spp*) restano da chiarire nel senso di "interpretare" i casi nei quali il viraggio dell'indicatore non sia avvenuto completamente, ad esempio i viraggi ad un arancione intenso potrebbero portare ad interpretazioni non corrette.
Sarebbe utile, che il kit fosse corredato di una scala colorimetrica indicante il grado di viraggio sufficiente o necessario per definire il positivo.
Il sistema fornisce fiale di soluzione fisiologica per la diluizione del campione, vista la difficoltà che questo comporta, sia nell'introduzione del tampone, quando si parte da tale prelievo, sia per la difficoltà nell'introdurre il puntale quando si usa il sistema e-swab, si consiglia l'uso di provette con tappo a vite da riempire con fisiologica.
Il Test va considerato come test screening applicabile in quei laboratori dove non è disponibile una tecnologia più complessa e costosa. e/o per basse routine.

Poiché il presente studio è stato un lavoro preliminare di maneggiabilità del sistema e del suo funzionamento, si raccomanda di:

- Realizzare uno studio di comparazione mediante la raccolta di campioni in parallelo per la validazione del sistema.
- I campioni selezionati per l'inoculazione della piastra devono essere contemporaneamente inoculati nei terreni di coltura convenzionali per l'identificazione dei Micoplasmi urogenitali, mediante metodi tradizionali
- Incubare la piastra fino a 6 giorni. Un cambio di colore dopo il 3 o il 4 giorno, può essere indice di presenza di un agente appartenente al gruppo dei micoplasmi fermentatori.
- *Realizzare la tecnica della PCR e la coltura cellulare del contenuto dei pozzetti M.spp che risultano positivi.*
- *Realizzare la coltura in terreni convenzionali per escludere eventuali contaminazioni di altri microrganismi presenti nel campione.*

No.	I : *M.hominis/Mycoplasmaspp.*				II: *U. urealyticum/parvum*			III: *G.vaginalis/T. vaginalis/C.albicans*			
	M.h PCR	M.h MWELL	*M.genitalium* PCR	M.spp MWELL	U.u PCR	U.pv PCR	Uu/Upv MWELL	G.v PCR	G. v MWELL	T.v PCR	T. v MWELL
1.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
2.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	ND	NEG	NEG	NEG
3.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
4.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG
5.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
6.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
7.	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
8.	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	POS
9.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
10.	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
11.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
12.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	ND	POS	NEG	NEG
13.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
14.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
15.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
16.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
17.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
18.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
19.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
20.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	POS
21.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
22.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
23.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
24.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
25.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
26.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
27.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
28.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS
29.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
30.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
31.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
32.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
33.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
34.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
35.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
36.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
37.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
38.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
39.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
40.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
41.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
42.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
43.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
44.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
45.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
46.	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
47.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
48.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
49.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG
50.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
51.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
52.	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
53.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	ND	POS	NEG	NEG
54.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
55.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG

56.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
57.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
58.	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
59.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG
60.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
61.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
62.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
63.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
64.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
65.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	ND	POS	NEG	NEG
66.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
67.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
68.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
69.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
70.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
71.	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
72.	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
73.	POS	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG
74.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
75.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
76.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	ND	POS	NEG	NEG
77.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
78.	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG
79.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
80.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
81.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
82.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	POS	NEG	NEG
83.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
84.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
85.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
86.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
87.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
88.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	ND	POS	NEG	NEG
89.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	ND	NEG	NEG	NEG
90.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG
91.	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG
92.	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
93.	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
94.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
95.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS
96.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
97.	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
98.	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
99.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
100.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
101.	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
102.	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
103.	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
104.	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
105.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
106.	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS
107.	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
108.	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
109.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
110.	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG

Risultati per sola *Candida albicans*

Partenza 0,5 McF di candida albicans		risultato a 24ore	risultato a 48 ore
9000000	cellule per inoculo	positivo pozzetto verde	
6750000	cellule per inoculo	positivo primo pozz. verde ++ - secondo pozzetto fucsia	pos verde secondo pozzetto fucsia
4500000	cellule per inoculo	positivo primo pozz verde + - secondo pozzetto fucsia	pos verde secondo pozzetto fucsia
3375000	cellule per inoculo	neg	pos verde secondo pozzetto fucsia
2250000	cellule per inoculo	neg	pos verde secondo pozzetto fucsia
1687500	cellule per inoculo	neg	pos verde secondo pozzetto fucsia
450000	cellule per inoculo	neg	pos verde secondo pozzetto fucsia
225000	cellule per inoculo	neg	pos verde secondo pozzetto fucsia

Prof. Cantesio Favalli
Ordinario di Microbiologia Clinica
Universita' degli studi di Roma " Tor Vergata"