

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	Esame culturale tampone uretrale per ricerca di gonococco, micoplasmi e germi comuni	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

6.1. Sinonimi

Tampone uretrale per la ricerca di gonococco, tampone uretrale per la ricerca dei micoplasmi urogenitali, tampone uretrale per la ricerca di germi comuni.

6.2. Principio del Test

Semina di un tampone uretrale per la coltura e l'isolamento di patogeni potenzialmente o francamente responsabili di affezioni dell'apparato urogenitale maschile in corso di uretriti, balanopostiti, prostatiti e le orco- epididimiti.

6.3. Significato clinico

Le infezioni a trasmissione sessuale STD sono una tra le dieci priorità di salute pubblica all'inizio del XXI secolo secondo l'OMS. In queste infezioni la eziologia batterica non è sempre dimostrata.

L'uretra maschile rappresenta il termine del tratto urogenitale e normalmente è il passaggio dell'urina e del liquido seminale composto come si sa da secrezioni provenienti dai testicoli, epididimo, vasi deferenti, vescicole seminali, prostata, e le ghiandole bulbouretrali e para uretrali. La mucosa della porzione terminale dell'uretra è di tipo transizionale. La colonizzazione è possibile già dalla nascita. Molti fenomeni contrastano questo fenomeno, cioè la cheratinizzazione e la produzione di muco sulla superficie esterna. Da parte dei batteri i fattori predisponenti sono l'aderenza, interazione microbica. Da parte dell'organismo la fagocitosi, l'immunità cellulare e umorale. Il processo di aderenza dei batteri (molto studiato nel caso del gonococco), inizia con stimoli chemiotattici, che conducono i batteri a legarsi all'epitelio tissutale. A questo punto, i batteri possono trovare un ambiente adatto all'espressione di fattori di virulenza, che aumentano il loro attacco alla superficie. Se questa aderenza non induce una infiammazione locale, si instaura una flora normale o autoctona che può avere un ruolo nel proteggere l'uretra contro i patogeni urogenitali.

Le uretriti si dividono in :

- 1) uretriti gonococciche
- 2) uretriti non gonococciche o NGU

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Agenti di NGU uretrite non gonococcica sono la *Chlamidia trachomatis* e i micoplasmi. Fra i micoplasmi *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*. *Neisseria gonorrhoeae* è la più famosa causa di uretrite batterica. *Trichomonas vaginalis* è da ricercare soprattutto quando la sintomatologia è persistente e c'è stato isolamento nella partner, comunque risulta raramente causa di uretriti maschili. Nel caso di orchite epididimite (infezione ascendente) i patogeni più frequenti sono *Chlamidia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* sotto i 35 anni, al di sopra di tale età sono chiamati in causa i comuni patogeni responsabili di infezione del tratto urinario.

6.4. Campione

La idonea raccolta del materiale dalla sede dove si pensa sia localizzata la infezione è presupposto fondamentale per una corretta diagnosi. Inoltre il clinico dovrebbe formulare un preciso sospetto diagnostico e permettere al microbiologo di guidare le indagini nel modo più idoneo. Il tipo di secrezione uretrale può essere:

- 1) secrezione purulenta
- 2) secrezione viscoso-filamentosa.

La sintomatologia può essere: dolore alla minzione, sensazione di bruciore. Può non esserci affatto alcuna secrezione.

Il tampone uretrale potrebbe essere utile nella ricerca della eziologia di una orchite-epididimite. È indicato se c'è stato isolamento di patogeni responsabili di STD (malattie a trasmissione sessuale) nel partner. I pazienti devono essere istruiti su alcune norme da rispettare e in particolare:

- astenersi dai rapporti sessuali nelle 24 ore precedenti l'esame,
- aver cessato qualsiasi trattamento chemio antibiotico da almeno una settimana,
- non avere urinato nelle ultime 3 ore.

Nel caso non sia evidente una secrezione è importante eseguire il tampone al mattino prima della minzione. Si procede premendo alla base del pene per cercare di raccogliere eventuale secrezione purulenta. Se non c'è evidente secrezione, l'esterno della uretra va lavata con sapone Betadine e quindi con acqua, quindi si procede a inserire il tamponcino. Il tamponcino è di piccolo calibro in Nylon o Dacron.



Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Si introduce il tamponcino per circa 2 cm all'interno del canale uretrale , ruotandolo per circa 2- 10 secondi. Devono essere utilizzati tamponi diversi per ciascun tipo di esame, eseguendo il prelievo nel seguente ordine: 1) esame microscopico , 2) ricerca di *Chlamidia trachomatis* , 3) ricerca di Micoplasmi urogenitali, 4) esami colturali. Ricordiamo che i batteri sono attaccati alla mucosa e il tampone deve toccare la mucosa uretrale. Cio' provoca un leggero dolore .Informare il paziente che puo' sentire dolore. Il paziente si deve mettere supino. Il pene va tenuto dal medico che fa il tampone. Dopo il prelievo persiste un senso di dolore alla minzione nelle successive 24 ore.

6.5. Modalità di conservazione e trasporto

Per la ricerca di *Chlamydia trachomatis* i campioni devono essere raccolti con i sistemi messi a disposizione con le diverse metodiche e conservati seguendo le istruzioni corrispondenti. Per la raccolta di *Mycoplasma /Ureaplasma* il tampone con il materiale raccolto va stemperato al piu' presto nell'apposita provettina contenente il terreno liquido di trasporto del kit IST Mycoplasma® Biomerieux , conservata a temperatura ambiente per 8 ore o a 2-8 °C per 36 ore.

Per l'esame colturale di batteri aerobi e miceti il tampone uretrale , introdotto nell'apposito terreno di trasporto , deve essere inviato al laboratorio o conservato a temperatura ambiente fino a un massimo di 24 ore.

Per la coltura di *Neisseria gonorrhoeae* è consigliabile usare il Go slide® BBL come terreno di crescita e di trasporto. Il lato 1 è un terreno selettivo per gonococco l'Agar cioccolato Tayer Martin .Il Go slide® BBL va incubato immediatamente .In alternativa il tampone deve essere inviato al piu' presto al settore di batteriologia in apposito terreno di trasporto privo di glicerofosfato.

I piu' comuni mezzi di trasporto sono presenti nei tamponi sterili a base di Dacron.

Il Dacron è un fibra sintetica con minore attività inibente, per la maggior parte dei microorganismi, rispetto ad altri materiali (p.es. cotone o alginato di calcio =calgi) esso è alla base per esempio dei tamponi Cultiplast®.

Tampone Cultiplast® con mezzo di trasporto:

colore	Mezzo di trasporto
Blu	Amies
Verde	Stuart
Nero	Amies con carbone
Rosso	Stuart con carbone

I terreni di trasporto piu' diffusi sono il terreno di Stuart e il terreno di Amies, classico o addizionato con carbone attivo, sebbene questo ultimo terreno sia indispensabile solo per la ricerca di microorganismi particolarmente delicati, quali il gonococco e i batteri patogeni intestinali. Sono terreni semisolidi non nutritivi .La presenza di sodio tioglicolato, abbassa il potenziale redox del mezzo , permettendo una migliore conservazione dei batteri anaerobi. Il glicerofosfato del terreno di Stuart , utilizzato dai coliformi come fonte di energia per la crescita,

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

è sostituito nel terreno di Amies da una soluzione salina tamponata: in questo modo si evita la sovracrescita dei contaminanti banali soprattutto nei campioni dove si ricerca il gonococco. Nel terreno di Amies i gonococchi sopravvivono per 12 ore a temperatura ambiente. Una volta seminato, il terreno deve essere incubato a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5% per 48 h.

Per la ricerca di *Trichomonas vaginalis* il tampone con l'essudato raccolto deve essere stemperato al più presto nell'apposito terreno di coltura/trasporto, preriscaldato a 37°C per 15 minuti, che deve essere inviato prontamente in laboratorio, una semplice alternativa è la soluzione fisiologica sterile. La lettura della sospensione va fatta entro mezz'ora dalla raccolta.

6.6. Strumentazione

Non applicabile

6.7. Metodologia

Esame microscopico:

Il vetrino per l'esame microscopico va fatto facendo ruotare il tampone e lasciando asciugare il materiale all'aria. Il vetrino può essere conservato a temperatura ambiente fino al momento della consegna in laboratorio. È consigliabile effettuare dunque il vetrino al momento del prelievo. Il vetrino sottoposto a colorazione di Gram va osservato a x40 e x100. La presenza di leucociti, miceti e batteri, distinti su basi morfologiche e tintoriale al Gram, deve essere rilevato in modo semiquantitativo (+, ++, +++).

L'osservazione dei tipici diplococchi Gram negativi intracellulari è fortemente indicativo per gonorrea; tutti i casi presunti vanno confermati dalla coltura.

Il *Trichomonas vaginalis* va ricercato a fresco qualora non fosse possibile l'esame colturale. Il secreto va posto in una provetta contenente 1 mL di soluzione fisiologica mantenuta a 37°C. Il vetrino va osservato al più presto prima che sia inibita la motilità flagellare che, unitamente alla morfologia, rappresenta una delle caratteristiche specifiche di identificazione.

Esame colturale di batteri e lieviti:

La indagine colturale del tampone uretrale è indirizzata alla ricerca di:

- lieviti
- microrganismi aerobi
- Neisseria gonorrhoeae*
- Gardnerella vaginalis*
- Micoplasmata urogenitali

Eventuali microrganismi osservati al Gram vanno considerati solo in presenza di leucociti PMN e associati a sintomatologia (*Haemophilus spp.*, *Streptococcus spp.*).

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

I batteri considerati come contaminanti esterni dei 3 segmenti uretra esterna , fossa navicolare e uretra peniena sono essenzialmente Gram positivi :

- Staphylococcus coagulase-negative species
- group viridans alpha-hemolytic streptococchi
- Corynebacterium species
- Enterococcus species

I microorganismi anaerobi non vanno ricercati di routine.

Esame colturale dei germi comuni con il metodo quantitativo:

Dopo la raccolta , ogni tampone puo' essere trasferito in una provetta contenente 3 mL di soluzione sterile PBS (pH 7.2) oppure 3 mL di brodo cuore-cervello .La provetta è agitata per 1 minuto in un vortex (500 rpm) , il tampone eliminato .100 uL di soluzione è trasferito in una piastra di Agar sangue 5% di montone e un altro 100 uL della stessa soluzione in una piastra di Agar Mac Conkey , quindi Agar Gardnerella e Agar cioccolato (o meglio si usa il Go slide BBL lato 1 e lato 2).L'inoculo deve essere diffuso omogeneamente sulla superficie intera del mezzo, e le piastre incubate a 36.5°C per 24-48 ore. Dato che abbiamo usato 3 mL di PBS o brodo cuore-cervello e abbiamo inoculato 100 uL (0.01mL) per ogni piastra di Agar , il numero di ogni tipo di colonie cresciute va moltiplicato x300 e rappresenta il numero totale di ogni batterio trovato.Si procede subito ad allestire una colorazione di Gram .

Esame colturale di micoplasmi:

Per l'esame colturale dei micoplasmi urogenitali si usa il kit IST Mycoplasma ® della Biomerieux. Il kit associa un brodo di coltura selettivo a una galleria che comprende 16 cupole. Il brodo selettivo contiene gli elementi necessari alla crescita (peptoni, estratto di lievito, siero di cavallo, fattori di crescita).La presenza di substrati specifici (urea per *U. urealyticum* e arginina per *M. hominis*) e di un indicatore (rosso fenolo) permette, in caso di coltura positiva , di visualizzare un cambiamento di colore del brodo legato a un aumento del pH. Gli agenti selettivi contrastano la crescita dei batteri contaminanti e lieviti. La galleria permette di ottenere contemporaneamente l'identificazione, l'indicazione di un titolo e lo studio della sensibilità a 6 molecole di antibiotici.

6.8. Reagenti Utilizzati

6.8.1 Reagenti, concentrazioni

Per l'esame colturale dell'essudato uretrale di routine si usano i seguenti terreni:

AGAR SANGUE CNA 5% SANGUE DI MONTONE :

Si usa come base il Muller Hinton o la base Columbia a cui si aggiunge il 5% di sangue defibrinato di montone (preferibilmente).Ha un colore rosso caratteristico. La sua abbondante

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

base nutritiva offre condizioni ottimali di crescita .Il valore di pH di 6.8 è specialmente favorevole alla conservazione degli eritrociti e per la formazione di aloni di emolisi ben chiari.

AGAR MacCONKEY:

Agar selettivo per l'isolamento degli enterobatteri , dal nome del suo inventore MacConkey (1905). I sali biliari e il cristal violetto inibiscono la flora Gram (+).Il lattosio, assieme all'indicatore di pH rosso neutro, serve per evidenziare la fermentazione di questo zucchero.

Composizione : petone di carne , peptone di caseina, NaCl, lattosio, miscela di sali biliari, rosso neutro, cristal violetto, agar.

Interpretazione: Colonie lattosio (-) sono incolore e le colonie lattosio (+) sono rosse, con un alone torbido, dovuto all'abbassamento di pH e precipitazione dei sali biliari.

AGAR SABOURAUD:

Questo terreno è impiegato per l'isolamento dei lieviti .Gli antibiotici aggiunti ,generalmente CAF cloramfenicolo 5% e gentamicina 10% , servono il primo per aumentare la selettività del terreno verso le specie che possono essere resistenti alla Gentamicina (streptococchi, Proteus), il secondo inibisce la maggior parte dei batteri Gram + e Gram (-).La selettività del terreno è inoltre dovuta al suo pH acido (5.5) che inibisce parzialmente la crescita dei batteri, tranne quelli acidofili.

Composizione:Peptocomplex, Glucosio, agar.

Interpretazione:colonie bianche , cremose , ben evidenti già dopo incubazione overnight appartengono a Candida spp.

Altri terreni specifici:

AGAR GARDNERELLA

Ha una base Columbia con l'aggiunta di 10% di sangue defibrinato sterile umano e l'aggiunta del supplemento antibiotato costituito da gentamicina solfato, acido nalidixico e amfotericina B.*G. vaginalis* si presenta come colonie piccole , beta emolitiche, con uno stretto alone di emolisi solo con l'aggiunta del sangue umano, quando coltivate per 48 ore in atmosfera di CO₂ al 5%.

GO SLIDE ® BBL (trasporto e coltura)

Lato 1 :Agar cioccolato con agenti selettivi:Proteose-peptone: 15.0 gr,Amido di mais : 1.0 gr.,Fosfato dipotassico: 4.0 gr,Diidrofostato potassico: 1.0 gr.,Cloruro di sodio:5.0 gr,Emoglobina:10.0 gr,Integratore IsoVitaleX :10.0 ml,Agenti selettivi:12.0 ml,Pimaricina:0.48 gr.,Agar: 13.5 gr,H₂O:1 L.

Lato 2:Agar cioccolato: Proteose-peptone: 15.0 gr,Amido di mais : 1.0 gr.,Fosfato dipotassico: 4.0 gr,Diidrofostato potassico: 1.0 gr.,Cloruro di sodio:5.0 gr,Emoglobina:10.0 gr,Integratore IsoVitaleX :10.0 ml,Agar: 13.5 gr,H₂O:1 L.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

*** AGAR THAYER MARTIN (BASE):**

Mezzo destinato all'isolamento di *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* a partire da materiale clinico. Il mezzo è superiore ad altri mezzi di coltura destinati allo stesso scopo, quanto alla resa di crescita dei patogeni e inibizione di *Neisserie* saprofite e altri batteri. E' pertanto adeguato, soprattutto per materiali molto contaminati dalla flora concomitante (secrezioni vaginali, uretrali, tamponi faringei).

PRINCIPIO DI AZIONE: Con l'aggiunta di diversi antibiotici, così' come dei fattori stimolanti la crescita che completano il substrato basale, con o senza aggiunta di sangue, si ottiene, di regola, l'inibizione totale della crescita della flora concomitante onde le *Neisserie* patogene crescono senza ostacolo.

COMPOSIZIONE: (g/l): Proteose-peptone: 15.0 gr, Amido di mais : 1.0 gr, Fosfato dipotassico: 4.0 gr, Diidrofosfato potassico: 1.0 gr, Cloruro di sodio: 5.0 gr, Emoglobina: 10.0 gr, Integratore IsoVitaleX : 10.0 ml, Agenti selettivi: 12.0 ml, Pimaricina: 0.48 gr, Agar: 13.5 gr, H₂O: 1 L.

PREPARAZIONE: Dissolvere 39 g/l e sterilizzare in autoclave (15 min/121 °C). Quando si raggiunge la temperatura di circa 50°C, incorporare una boccetta di supplemento I e una altra di supplemento II per circa 200 mL di mezzo base. Mettere in piastre Petri o preparare tubi a becco di clarino pH=7,0-7,4. Quando si prepara questo mezzo in una base di Agar cioccolato, il procedimento è il seguente : quando si raggiungono gli 80°C , aggiungere 50 mL di sangue defibrinato al mezzo basale e mantenere questa temperatura , agitando frequentemente fino a che il mezzo diventa di aspetto "cioccolato". Quindi raffreddare fino a circa 50°C e incorporare i due supplementi I e II.

-Supplemento I: Mistura liofilizzata, sterile, di 3 antibiotici: Vancomicina, Colistina, Trimetoprim nelle concentrazioni 0,6 , 1,5, e 1,0 mg per ogni boccetta. Questa miscela è ricostituita con 2mL di acqua distillata sterile.

-Supplemento II: Miscela liofilizzata, sterile, di sostanze attive, chimicamente definite, che favoriscono la crescita dei germi esigenti. Viene ricostituito con 2mL di acqua distillata sterile.

COMPOSIZIONE (mg/boccetta): tiamina(0,006); Adenina (2); L-glutamina (20); L-cistina (2,2); Acido 4-amino benzoico (0,026); L-cisteina (51,8); Cloridrato di guanina (0,06); Vitamina B12 (0,02); Carboxilase (0,2); Nicotinamide-adenina-dinucleotide NAD (0,5) e Nitrato ferrico (0,04).

I terreni di coltura usati sono riassunti nella tabella:

Terreno	Ricerca	Atmosfera di incubazione	T °C	Tempo
Sabouraud dextrose agar + gentamicina + CAF	Lieviti	aerobia	37°C	24-48 h
Columbia 5% sangue di montone	Germi comuni aerobi	5% CO ₂	37°C	24 h

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Columbia 10 % sangue umano + gentamicina solfato + acido nalidixico + amfotericina B	Gardnerella Vaginalis	5% CO ₂	37°C	48 h
Agar Cioccolato Tayer Martin (*)	Neisseria gonorrhoeae .	5% CO ₂	37°C	48 h

(+) Presente nel Goslide

Mycoplasma IST ® Biomerieux 25 tests:

Liquido R1:

Contiene gli elementi nutritivi stabili (peptone, sali).E' usato anche come mezzo di trasporto, contiene gli agenti selettivi contro la flora contaminante.

Liofilizzato R2:

brodo liofilizzato che contiene l'insieme degli elementi fragili (estratto di lievito,siero di cavallo,urea, arginina,PoliViteX,antibiotici).Va ricostituito con 3 ml esatti di liquido R1.

Brodo urea-arginina formula in g/l di acqua distillata:

biomiotone 8, bio.trypticase 8, estratto di lievito 4, cloruro di sodio 3.5, cloridrato di arginina 5, cloridrato di cisteina 0.1, urea 0.5, rosso fenolo 0.05, PoliViteX 10 ml, siero di cavallo 100 ml, miscela di antibiotici 10 ml, pH 6.3.

6.8.3 Magazzino e stabilità dei reagenti

Se preparati in laboratorio , i mezzi di coltura devono essere tenuti in frigorifero (4-8 °C) , avvolti in buste di plastica per evitare la rapida disidratazione.. In questo modo, i terreni preparati in laboratorio hanno una validità di 14 giorni.

6.9. Procedimento dettagliato

Per la coltura di *Trichomonas vaginalis*:

L'esame colturale rimane il "gold standard" per sensibilità e specificità. L'essudato, raccolto con tampone sterile, deve essere seminato immediatamente dopo il prelievo, in 5 ml di terreno specifico, CPLM *Trichomonas* broth , preriscaldato a 37°C.L'incubazione va effettuata a 37°C per 5 giorni con una osservazione microscopica a fresco giornaliera a partire dal secondo giorno.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Per la coltura di *Neisseria gonorrhoeae*:

Incubare per 24-48 ore .Su Agar Tayer Martin (Lato 1 del Goslido BBL) cresce formando colonie piccole, traslucide, di colore grigio-bianco , citocromo ossidasi positive.Poiché esistono rari ceppi che sono sensibili alla vancomicina del Lato 1 è importante valutare la crescita anche sulla lastrina del Lato 2 La colorazione di Gram dimostra caratteristici diplococchi Gram negativi.Il gonococco in piastra di agar cioccolato puo' dare 4 tipi di colonie diverse come morfologia che vanno da T1=>T4 , da piccolissime a piu' grandi, da convesse a leggermente appiattite , da lucide a opache da lisce a rugose. Si crede pertanto erroneamente a una coltura mista anche quando abbiamo un campione puro. Queste variazioni di fase avvengono anche con la colonia medesima sub culturata .Questa variazione coincide con una produzione variabile dei pili.La maggiore parte dei ceppi di gonococco sono piliati e danno origine a colonie del tipo T1/T2 cioè piccole e lucide.I gonococchi hanno una affinità con le cellule mucosecarnenti non ciliate dell'uretra.Dato che c'è una forte reazione immunocellulare da parte dei neutrofili, vuol dire che il batterio ha raggiunto la membrana basale e ha invaso la zona sottoepiteliale. Sono necessari test identificativi di conferma .Quando si coltiva su piastre di Agar cioccolato poliViteX oltre alla incubazione in CO2 bisogna assicurare una certa umidità mettendo dentro la busta dell'acqua ovvero della carta bibula imbevuta di acqua. Non si semina mai il tampone in brodo coltura perché il gonococco non cresce in nessun tipo di brodo .I gonococchi sono molto fragili , una volta cresciuti vanno in autolisi nel giro di 2-3 giorni e quindi vanno sub-culturati molto spesso.

Identificazione:

L'identificazione corretta del ceppo è importante anche ai fini medico legali.Già a livello di esame microscopico previa colorazione di Gram del campione si puo' fare diagnosi di uretrite acuta gonococcica. Quando si stempera il materiale sul vetrino con il tampone esso va applicato mediante rollamento. Cioè va applicato rotolando il tampone solo in un verso senza andare avanti e dietro, senza fare delle strisciate parallele. Questo per conservare meglio la morfologia dei neutrofili .Andiamo a cercare i diplococchi dentro il citoplasma dei PMN. Vi possiamo trovare anche decine di diplococchi. Nelle infezioni croniche se ne trovano di piu' all'esterno dei PMN.

Usare per prima cosa il test della citocromo ossidasi oltre alla colorazione di Gram delle colonie sospette. Per la identificazione biochimica si usa il pannello rapido HNID della Dade Behring alle 4 ore dopo aver fatto una sospensione con " inoculum broth ". Ricordiamo che *Neisseria (G) onorrhoeae* attacca solo il glucosio mentre *Neisseria (M)eningitidis* attacca il glucosio e il maltosio per via ossidativa. Il test della produzione di beta lattamasi si fa con dischetti di nitrocefina .Si tratta di dischetti imbevuti di una cefalosporina cromogena che la eventuale beta lattamasi scinde e il cromogeno rileva il suo colore.

L'antibiogramma si esegue con il pannello Microstrep della Dade Behring .La resistenza agli antibiotici della *N. gonorrhoeae* è definito dai criteri raccomandati dal NCCLS

Penicillina , MIC >= 2.0 mg/L

Tetracicline , MIC >= 2.0 mg/L

Spectinomicina , MIC >=1.0 mg/L

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Ciprofloxacin , MIC $\geq$ 1.0 mg/L

La resistenza a cefixime e ceftriaxone non è stata documentata

Ceftriaxone , MIC $\geq$ 0.5 mg/L

Cefixime, MIC $\geq$ 0.5 mg/L

Per la coltura dei lieviti:

Si consiglia la semina del tampone su Sabouraud ossia un pre arricchimento in brodo Sabouraud .Si deve identificare a livello di specie almeno la *Candida albicans* con il metodo “germ-tube test” o di filamentazione:

- 1) alcune colonie (5-6) cresciute su Sabouraud Agar vengono stemperate in una provetta contenente 1 ml di siero ,
- 2) dopo incubazione per 4 ore a 37°C si procede all’osservazione microscopica :la presenza di “germ-tube” (piccoli filamenti protendenti dalla superficie delle blastospore) consente la definizione di specie di *C. albicans*,
- 3) Per la identificazione delle altre specie abbiamo a disposizione il pannello Yeast della Dade Behring.

L’antimicogramma (kit ATB FUNGUS ® della Biomerieux) viene effettuato solo eccezionalmente se si è in presenza di infezioni ricorrenti particolarmente difficili da eradicare.

Per la coltura dei Micoplasmi:

- 1) mettere il tampone o il prelievo liquido (200 µL) nel liquido R1
- 2) trasportare il liquido R1 inseminato nel laboratorio rispettando questi tempi di attesa in funzione della temperatura:

temperatura	18-25 °C	2-8 °C
Durata della conservazione	5 ore	48 ore

- 3)trasferire 3 ml di liquido R1 inseminato in un flacone di brodo urea-arginina R2.
- 4)assicurare la dissoluzione completa del liofilizzato mediante agitazione al vortex
- 5)ripartire il brodo urea-arginina ricostituita nelle 16 cupole della galleria in ragione di 55 µL per cupola
- 6) aggiungere alla fine 2 gocce di olio di paraffina sterile in ogni cupola.
- 7) mettere il coperchio sopra le gallerie

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

8) incubare a 35-37°C la galleria e il resto del brodo urea arginina per 24-48 ore.

Interpretazione delle colture di screening e antibiogramma dei Micoplasmi urogenitali:

LETTURA del flacone

	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
Intenso cambiamento di colore	Rosso- arancio Urea (+)	Rosso arginina (+)

In genere *U. urealyticum* determina un viraggio del colore già alle 24 ore , salvo in caso di titoli deboli, il contrario per *M. hominis* che vira alle 48 ore.

Lettura delle cupole:

INTERPRETAZIONE:

	N° della cupola	POSITIVO	NEGATIVO	INTERPRETAZIONE
Identificazione	1 0 2 Uu 3 Mh	Rosso	Giallo	Uu o Mh Uu Mh
Conta delle colonie	4 Uu $\geq 10^4$ 5 Mh $\geq 10^4$	Rosso	Giallo	Uu $\geq 10^4$ UTC Mh $\geq 10^4$ UTC
Antibiogramma	6 DOX 4 7 DOX 8 8 JOS 2 9 JOS 8 10 OFL 1 11 OFL 4 12 ERY 1 13 ERY 4 14 TET 4 15 TET 8	Rosso	Giallo	I ceppi saranno: (-) (-) sensibile (+) (-) intermedio (+) (+) resistente
	16 PRI 2	Rosso	Giallo	(-) sensibile (+) resistente

Uu = *Ureaplasma urealyticum* /// Mh = *Mycoplasma hominis* /// UTC = unità cambianti colore

DOX = Doxyciclina // TET = Tetraciclina // JOS = Josamicina // OFL = Ofloxacin // ERY = Eritromicina // PRI = Pristinamicina

Nel caso di *U. urealyticum* i criteri di positività ritenuti in corso di NGU sono di 10^4 UCC/ml e di 10^3 UCC/ml per il primo getto di urina.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Poiché il pH del mezzo è acido cio' determina una minore attività della eritromicina rispetto agli altri macrolidi , pertanto è frequente che il test sia intermedio per l'eritromicina .

Il prelievo negativo va dato dopo almeno 48 ore di incubazione e preferibilmente alle 72 ore.

La conta batterica in UCC unità cambianti colore /ml è basata sul principio per cui la velocità di idrolisi dell'urea o dell'arginina è proporzionale alla quantità di microrganismi contenuti nel campione.

Mycoplasma fermentans : questa specie è raramente trovata e determina un viraggio al giallo-limone (fermentazione del glucosio) .Questo viraggio è visibile solo dopo 72 ore di incubazione , nei flaconi e non nelle cupole.

Come "gold standard "si devono seminare 3 (tre) gocce di brodo che ha virato sul terreno solido Agar A7 che verrà incubato a 37°C per 48-72 ore in microaerofilia o anaerobiosi. Osservare le colonie caratteristiche a uovo fritto (M.H.) o a riccio (U.U) allo stereo microscopio o al microscopio ottico normale a x10.

6.10. Calibrazione della metodologia

Non applicabile

6.11. Controllo di qualità interno

Settimanalmente sono inoculati campioni batterici con profili fenotipici conosciuti per verificare l'efficacia dei mezzi di coltura utilizzati. Questi ceppi fanno parte del C.Q. interno Culti-Loops della Oxoid .

6.12. Criteri per la validazione dei risultati

Supervisione tecnica del responsabile del settore

6.13. Interpretazione e Valori di Riferimento

Non sviluppo di Neisseria gonorrhoeae, Non sviluppo di micoplasmi uro genitali, non sviluppo di flora batterica o miceti significativa.

6.14. Linearità

Non applicabile

6.15. Limite di rilevazione

Non applicabile

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

6.16. Applicazione clinica

6.17. Limitazione del metodo

Pazienti che hanno ricevuto terapia antibiotica nella settimana precedente l'esame, pazienti che non hanno sospeso l'attività sessuale nella settimana precedente, pazienti che non hanno avuto un intervallo di almeno 3 ore tra la ultima minzione e la raccolta del campione. Tampone impropriamente raccolto, cioè privo di un adeguato numero di cellule rappresentative dell'urotelio transizionale medio (cellule "a fiamma"), terreni non idonei perché disidratati, temperatura di incubazione differente da 35-37°C, eccesso di tempo fra la raccolta del tampone e l'arrivo in laboratorio, tampone non conservato in terreno di trasporto o se conservato è pervenuto in laboratorio dopo 12 ore.

6.18. Biosicurezza

Vedi POP sulla Bio sicurezza

6.19. Referenze bibliografiche

1: McKee KT Jr, Jenkins PR, Garner R, Jenkins RA, Nannis ED, Hoffman IF, Schmitz JL, Cohen MS.

Features of urethritis in a cohort of male soldiers. Clin Infect Dis. 2000 Apr;30(4):736-41. PMID: 10770737

2: [No authors listed] National guideline for the management of gonorrhoea in adults. Clinical Effectiveness Group (Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases). Sex Transm Infect. 1999 Aug;75 Suppl 1:S13-5. No abstract available. PMID: 10616374

3: Janier M, Lassau F, Casin I, Grillot P, Scieux C, Zavaro A, Chastang C, Bianchi A, Morel P. Male urethritis with and without discharge: a clinical and microbiological study. Sex Transm Dis. 1995 Jul-Aug;22(4):244-52. PMID: 7482108

5: Pillay DG, Hoosen AA, Vezi B, Moodley C. Diagnosis of Trichomonas vaginalis in male urethritis. Trop Geogr Med. 1994;46(1):44-5. PMID: 7513101

6: Korting HC, Kollmann M. [Diagnosis and therapy of gonorrhea]. Dtsch Med Wochenschr. 1993 Jul 23;118(29-30):1079-82. Review. German. No abstract available. PMID: 8330510

7: Horner PJ, Coker RJ, Turner A, Shafi MS, Murphy SM. Gonorrhoea: signs, symptoms and serogroups. Int J STD AIDS. 1992 Nov-Dec;3(6):430-3. PMID: 1286119

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

8: Benavides MI, Moncada X, Rodriguez B, Castillo C. [Gonococcal urethritis in men: clinical experience in 1978-1988]. Rev Med Chil. 1992 Oct;120(10):1140-3. Spanish. PMID: 1341776

9: Portilla I, Lutz B, Montalvo M, Mogabgab WJ. Oral cefixime versus intramuscular ceftriaxone in patients with uncomplicated gonococcal infections. Sex Transm Dis. 1992 Mar-Apr;19(2):94-8.PMID: 1534422

10: Joyner JL, Douglas JM Jr, Ragsdale S, Foster M, Judson FN. Comparative prevalence of infection with *Trichomonas vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases clinic. Sex Transm Dis. 2000 Apr;27(4):236-40.PMID: 10782747

11: Pai A, Kulkarni MG, Koppikar GV. Antibiotics sensitivity pattern of *N. gonorrhoeae* with special emphasis on norfloxacin and ciprofloxacin. J Assoc Physicians India. 1999 Aug;47(8):795-7.PMID: 10778625

12: Tanaka M, Nakayama H, Haraoka M, Saika T. Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and high prevalence of ciprofloxacin-resistant isolates in Japan, 1993 to 1998. J Clin Microbiol. 2000 Feb;38(2):521-5.PMID: 10655338

13: Kam KM, Lo KK, Chong LY, Au WF, Wong PY, Cheung MM. Correlation between in vitro quinolone susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* and outcome of treatment of gonococcal urethritis with single-dose ofloxacin. Clin Infect Dis. 1999 May;28(5):1165-6. No abstract available.PMID: 10452657

14: Vila J, Olmos L, Ballesteros J, Vazquez JA, Gimenez MJ, Marco F, Aguilar L. Development of in-vivo resistance after quinolone treatment of gonococcal urethritis. J Antimicrob Chemother. 1997 Jun;39(6):841. No abstract available.PMID: 9222062

15: Deguchi T, Saito I, Tanaka M, Sato K, Deguchi K, Yasuda M, Nakano M, Nishino Y, Kanematsu E, Ozeki S, Kawada Y. Fluoroquinolone treatment failure in gonorrhea. Emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* strain with enhanced resistance to fluoroquinolones. Sex Transm Dis. 1997 May;24(5):247-50.PMID: 9153731

16: Gall H, Beckert H, Meier-Ewert H, Tummers U, Pust RA, Peter RU. [Pathogen spectrum of urethritis in the man]. Hautarzt. 1999 Mar;50(3):186-93. German.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

PMID: 10231688

17: Schwartz MA, Hooton TM. Etiology of nongonococcal nonchlamydial urethritis. Dermatol Clin. 1998 Oct;16(4):727-33, xi. Review. PMID: 9891672

18: Koch A, Bilina A, Teodorowicz L, Stary A. Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in patients with sexually transmitted diseases. Wien Klin Wochenschr. 1997 Aug 8;109(14-15):584-9. PMID: 9286064

19: Pozzoli R. et al . Linee-guida per le indagini diagnostiche microbiologiche nello studio delle infezioni del tratto urogenitale maschile. Gruppo di studio Malattie sessualmente trasmesse non AIDS (GLAMST) Microbiologia medica Volume 15, numero 3-2000.

4: Taylor-Robinson D, Furr PM. Genital mycoplasma infections. Wien Klin Wochenschr. 1997 Aug 8;109(14-15):578-83. Review. PMID: 9286063 [PubMed - indexed for MEDLINE]

5: Savio ML, Caruso A, Allegri R, Fallacara F, Pollara CP, Foresti I, Comberti E, Gargiulo F, Dima F, Cadeo GP, Turano A. Detection of Mycoplasma genitalium from urethral swabs of human immunodeficiency virus-infected patients. New Microbiol. 1996 Jul;19(3):203-9. PMID: 8841035 [PubMed - indexed for MEDLINE]

8: Balmelli T, Stamm J, Dolina-Giudici M, Peduzzi R, Piffaretti-Yanez A, Balerna M. Bacteroides ureolyticus in men consulting for infertility. Andrologia. 1994 Jan-Feb;26(1):35-8. PMID: 8185059

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.