



MYCOSCREEN PLUS

Detekce a rozlišení urogenitálních mykoplazmat

16 testů (kat.č. 00024)

32 testů (kat.č. 00025)

verze: GB-2006-09



1 – ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

MYCOSCREEN Plus byl vytvořen pro detekci a rozlišení *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) a *Mycoplasma hominis* (M.h.) v klinických vzorcích. MYCOSCREEN PLUS se musí používat ve spojení s A7 Agarovou miskou pro určení počtu a mikroskopickou identifikaci U.u. a M.h. Každá souprava obsahuje 16 nebo 32 testů.

2 – ÚVOD

Mykoplazmata jsou nejmenší a nejjednodušší prokaryota schopná sebe reprodukce (0.15 až 0.25 μm) (1). 15 lidských druhů nalezených do současnosti patří všechny do třídy Mollicutes (odvozeno od: cutis mollis, měkká kůže). Liší se od ostatních bakterií tím, že jim chybí buněčná stěna a zvýšením přirozené rezistence k β-laktámům, stejně jako přítomností membrány bohaté na steroly získané díky jejich adhezii k eukaryotickým buňkám. Protože mykoplazmata jsou relativně křehká, mohou růst pouze v nebudoucí kultuře v přítomnosti různých růstových faktorů a při konstantní teplotě 35-37°C.

Většina humánních mykoplazmat jsou komenzálové. Z 9 druhů izolovaných z urogenitálního traktu jsou *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* nejčastěji se vyskytující. U.u. a M.h. jsou sexuální přenosné a mohou být patogenní. U novorozenců se může objevit respirační infekce nebo meningitida jako výsledek kontaminace z genitálního traktu při narození (3). Infekce způsobené U.u. a M.h. u dospělých jsou popsány v tabulce uvedené níže:

	<i>U.urealyticum</i>	<i>M. hominis</i>
Negonokoková uretritida	++++	-
Urethro-prostatitis	++	-
Epididymitis	+++	-
Močové kameny	++	-
Pyelonefritis	-	++++
Pánevní zánět	-	+++
Poporodní horečka/potrat	++	++++
Chorioamnionitis	++	-

MYCOSCREEN PLUS je metoda umožňující diferenciální diagnostiku mezi komenzálními bakteriemi ($\leq 10^3$ CCU*/ml) a bakteriemi, které mohou být zodpovědné za infekční nebo super infekční procesy ($\geq 10^4$ CCU/ml). *Colour Change Unit.

MYCOSCREEN PLUS je třeba spojovat s konvenční diagnostikou založenou na A7 Agarových miskách, (modifikované Shepard medium) (5).

3 - PRINCIP

MYCOSCREEN PLUS je 24-hodinová metoda založená na schopnosti U.u. a M.h. metabolizovat močovinu a arginin, respektive. Výsledkem růstu mykoplazmat v tekutém médiu je změna zbarvení indikátoru ze žlutého na fuchsiově růžovou. Tato barevná změna je způsobena uvolněním amoniaku, čímž se alkalizuje pH média.

MYCOSCREEN PLUS je provádět v dělitelné mikrotitrační destičce umožňující testovat 4 vzorky. Každá destička je složena ze 4 řad po 2 jamkách: jamka *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) obsahující linkomycin a *Mycoplasma hominis* (M.h.) jamky obsahující erythromycin.

4 – REAGENCIE

Popis	množství	
	00024	00025
MYCOCREEN PLUS vanička : dělitelná destička se 4 řadami po 2 jamkách (U.u./M.h.)	4	8
U.M.M.t.: lahvička s mykoplasma transportním médiem (2 ml)	16	32
U.M.M.lyo: lahvička s lyofilizovaným růstovým faktorem (+ 2 ml UMMt)	16	32
S. Mh.: lahvička s 4.5 ml <i>Mycoplasma hominis</i> růstovým aktivátorem	1	1

UMMt médium – složení v g/l destilované vody:

Mycoplasma bujón.....	20
Antibiotika.....	10 ml
pH : 6.0 ± 0.2	
Rekonstituované médium (UMMt+UMMlyo) - složení v g/l destilované vody:	
Mycoplasma bujón.....	20
Hřiběcí sérum.....	200 ml
Kvasničný extrakt.....	5,8
Cystein.....	0,3
Arginin.....	9
Urea.....	3,6
Fenolová červeň.....	0,04
Antibiotika.....	10 ml
pH : 6.1 ± 0.1.	

5 – BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Reagencie jsou určeny pouze pro použití *in vitro* a musí s nimi manipulovat pouze školený personál.
- Vzorky od pacientů a inokulované reagencie jsou potenciálně infekční, musí se s nimi zacházet opatrně v souladu s hygienickými pravidly a aktuálními předpisy pro daný typ produktu a zemi jeho použití.
- Reagencie obsahují surový materiál živočišného původu a musí se s nimi zacházet s opatrností.
- Nepoužívejte reagencie po datu expirace.
- Nepoužívejte reagencie, které jsou poškozené, nebo které byly před použitím špatně uchovávány.
- Pozitivní výsledek u metody MYCOSCREEN PLUS indikuje kolonizaci urogenitálními mykoplazmaty, ale nemůže být sám o sobě použit pro klinickou diagnózu. Tu lze stanovit pouze lékařem a je založena na biologických výsledcích a klinických známkách.

6 – SBĚR VZORKŮ

6.1 Sběr vzorků

Endocervikální a vaginální odběr vzorku

Pro odběr vzorků používejte pouze tampon Dacron nebo z umělého hedvábí. Cervix je třeba opatrně tamponem otřít kvůli odstranění sekretů a to před odběrem vzorku novým tamponem. Protože mykoplazmata silně adherují ke slizničním buňkám, je třeba slizniční stěnu silně otřít tak, abyste získali bohatý vzorek (2).

Odběr vzorku z uretry

Očistěte močovou a ořetě nebo seškrábněte oblast, abyste získali buňky. **Sperma, moč**
Do sterilní zkumavky nebo lahvičky odeberte sperma nebo první moč.

Gastrický sekret

Odeberte žaludeční sekret novorozence odsátím katetrem a přenesením do sterilní lahvičky.

6.2 Transport v UMMt médiu

Vzorky na tamponu: Umístěte tampon do lahvičky s UMMt médiem.

Tekuté vzorky: Inokulujte lahvičku UMMt média s 200 μl homogenizované tekutiny.

Inokulované UMMt médium lze uchovávat 8 hodin při pokojové teplotě (18-25°C) nebo 6 hodin při 2-8°C.

7 – PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ REAGENCIÍ

- Všechny reagencie jsou připraveny k použití. Lahvičky se uchovávají při 2-8 °C, v jejich originálním obalu do data expirace uvedeného na obalu.
- Pokud použijete jednu řadu jamek (U.u.)(M.h.) nebo dvě nebo tři řady, zbývající jamky na destičce MYCOSCREEN PLUS lze uchovávat v původní hliníkové fólii, hermeticky uzavřené, až 3 týdny při 2-8 °C.
- Mh suplement je stabilní po 3 měsíce od otevření

8 – POŽADOVANÝ, ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

- Odběr vzorku (tampony, cytologické kartáčky, sterilní nádoby na tekuté vzorky)
- Pipety a špičky (100 μl)
- Odpadní kontejner na kontaminovaný odpad
- Parafinový olej
- Inkubátor na teplotu 37 °C ± 1 °C
- A7 Agar (kat.č. 00079) nebo (kat.č. 00090)

9 – METODA

9.1 Příprava reagensí

- Připravte si stejný počet řad s jamkami, jako máte vzorků k testování.
- Pokud je to nezbytné, oddělte jednu nebo několik řad jamek (U.u.)(M.h.) s pomocí zářezů.
- Označte každý test

9.2 Inokulace UMM média

- Naočkejte UMMt médium tamponem nebo 200 μl tekutého vzorku (paragraf 6.2).
- Přeneste veškeré UMMt médium do UMMlyo lahvičky. Nezahazujte prázdnou UMMt lahvičku.
- Dobře promíchejte.

9.3- Inokulace jamek vaničky

- Rozdělte následovně:

(U.u.) jamka:	100 μl inokulovaného UMMlyo
(M.h.) jamka:	100 μl inokulovaného UMMlyo 50 μl Mh suplementu

- Přidejte dvě kapky parafinového oleje do každé z jamek.
- Nasajte 500 μl naočkovaného UMMlyo média a přeneste jej do prázdné UMMt lahvičky.
- Uchovejte přebývající inokulované UMMlyo v původní lahvičce při 2-8 °C tak, aby se v případě pozitivního screeningu/detekce mohla provést kultivace na A7 agaru (paragraf kapitola 11).
- Poznámka: Některé kmeny *M. hominis* vykazují slabou enzymatickou aktivitu. Přidáním kapky Mh suplementu umožníte vizualizaci barevné změny během 24 hodin u kmenů v koncentraci $\geq 10^4$ CCU/ml.

9.4-Inkubace

Inkubujte vaničku s jamkami a UMMt lahvičku při 37 ° ± 1 °C po dobu 24 hodin, potom odečítejte výsledky. Pro vyčíslení počtu odečtete destičku během 24 hodin. Prodloužená inkubace na 48 hodin se používá u množství nižšího než 10^4 CCU/ml nebo u kmenů se slabou enzymatickou aktivitou, kterým je tím umožněna vizualizace reakce.

10 - ODEČTÁNÍ A INTERPRETACE

10.1 Validace

Zkontrolujte, že obě jamky v řadě jsou čiré. Zákal značí bakteriální kontaminaci. V tom případě opakujte analýzu.

10.2 Odečet a interpretace

Růst urogenitálních mykoplazmat je indikován alkalizací média, která změní barvu média ze žlutého na červené (zásadité). Médium zůstane žluté, když se neobjeví žádný růst mykoplazmat.

Oranžová barva by se měla brát jako pozitivní test.

10.2.1 Odečet během 24 hodin

Červené zbarvení u jamky U.u:

Vysoká pravděpodobnost, že je ve vzorku přítomna *Ureaplasma urealyticum* v suprapatologické míře ($\geq 10^4$ CCU/ml).

Červené zbarvení u jamky M.h:

Vysoká pravděpodobnost, že je ve vzorku přítomno *Mycoplasma hominis* v suprapatologické míře ($\geq 10^4$ CCU/ml).

Červené zbarvení u jamky U.u a M.h.:

Vysoká pravděpodobnost, že je ve vzorku přítomna *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* v suprapatologické míře ($\geq 10^4$ CCU/ml).

Poznámka: Velmi vysoké koncentrace Uu nebo Mh mohou způsobit změnu zbarvení v obou jamkách.

Žlutá barva v jamkách U.u a M.h a červená barva v lahvičce UMMt

Přítomnost mykoplazmat v míře $< 10^4$ CCU/ml.

V takovém případě naočkovajte A7 agar (par. 12) zvláště u vzorků jiných než endocervikálních nebo uretrálních (par. 13).

Žlutá barva v jamkách U.u a M.h a žlutá barva v lahvičce UMMt

Nepřítomnost mykoplazmat, nebo přítomnost mykoplazmat v množství $< 10^3$ CCU/ml.

Znovu inkubujte destičku i lahvičku.

10.2.2 Odečet během 48 hodin

Žlutá barva v jamkách U.u a M.h a červená barva v lahvičce UMMt

Pravděpodobná přítomnost mykoplazmat ve vzorku v míře $< 10^2$ CCU/ml.

Žlutá barva v jamkách U.u a M.h a žlutá barva v lahvičce UMMt

Nepřítomnost mykoplazmat.

11- KONTROLA KVALITY

Kontrolu kvality lze provést z lyofilizovaného kontrolního kmene (*U. urealyticum* ATCC 27618) Přípravte předběžnou kultivaci po inokulaci 100 μ l regenerovaného kmene v lahvičce s rekonstituovaným UMM médiem (UMMt+UMMlyo):

Inkubujte při 37°C \pm 1°C po dobu 6 hodin.

Inokulujte nový UMM bujón rekonstituovaný 200 μ l homogenizované předběžné kultivace.

Inokulujte dvě jamky vaničky MYCOSCREEN PLUS a proveďte test tak, jak je popsáno v návodu (paragraf 9 a 10).

Očekávané výsledky:

U.u.	M.h
+	-

Poznámka: V případě lyofilizovaného kmene s nízkou ureázovou aktivitou lze inkubaci prodloužit až na 18-24 hodin. Bujón by měl být inokulován 20 μ l předběžné kultivace.

12 – KULTIVACE NA A7 AGAROVÉ PLOTNĚ

Pokud je screening pozitivní, vezměte naočkované UMMLy médium uchovávané při 2-8 ° C a inokulujte A7 agarovou misku 100 μ l homogenizované suspenze.

Inkubujte při 37°C \pm 1° C za anaerobních podmínek po dobu 48 hodin.

12.1 Morfologická identifikace

Ureaplasma urealyticum: Objeví se hnědo-černý precipitát (různé velikosti, „tvar mořského ježka“). Kolonie jsou malé.

Mycoplasma hominis: Vzhled „sázeného vejce“. Kolonie jsou větší než u *U. urealyticum*.

12.2 Určení počtu

Určení počtu se provede s miskou otočenou dnem vzhůru s pomocí optického mikroskopu (objektiv 10x). Zaznamená se počet kolonií v zorném poli.:

- méně než 1 kolonie/pole: $\leq 10^3$ CFU/ml

- 1 až 5 kolonií/pole: přibližně 10^4 CFU /ml

- 5 až 10 kolonií/pole: přibližně 10^5 CFU /ml

- 10 až 20 kolonií/pole: přibližně 10^6 CFU /ml

- > 20 kolonií/pole: $> 10^6$ CFU /ml

CFU: Colony Forming Units

13- SPECIFICKÉ PŘÍPADY

U spermatu, moči, vzorků chirurgické salpingitidy, hemokultivace, kontroly kvality buněčných kultur, atd. , je důležité stanovení koncentrace přítomných mykoplazmat. Upřednostňuje se naočkování A7 agaru s inokulovaným UMMlyo médiem bez čekání na výsledky screeningu.

Koncentrace obvykle stanovená pro *U. urealyticum* v prvním proudu moči, spermatu nebo v endotracheálních vzorcích je 10^3 CCU/ml (4).

14 – LIMITACE METODY

• Přítomnost *Ureaplasma urealyticum* nebo *Mycoplasma hominis* ve velmi vysokých koncentracích může způsobit změnu zbarvení média v obou jamkách.

• Některé bakterie, které jsou přítomné v množství $\geq 10^{6-7}$ CFU/ml a obsahují ureázu mohou způsobit změnu barvy v obou jamkách.

• Zásadité pH vzorku (pH ≥ 8) může způsobit změnu barvy UMM média.

• Jako u všech detekčních bakteriálních metod, může kvalita vzorku ovlivnit výsledek testu. Negativní test proto nezbytně neznamená nepřítomnost infekce.

15 – CHARAKTERISTIKA PŘÍPADŮ

Studie provedená na 334 klinických vzorcích (224 endocervikálních vzorků, 25 uretrálních vzorků, 75 vzorků spermatu, 5 vzorků moči a 5 různých vzorků), ze kterých 99 vzorků bylo pozitivních, dala následující výsledky porovnané s metodou MYCOFAST *Evolution 2*, pro množství 10^4 CCU/ml.

Detekce - 24 hodin

	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. hominis</i>
Citlivost	92.7%	100%
Specifičnost	98.8%	99.3%
PPV	95.5%	91.6%
NPV	98.1%	100%

Detekce - 48 hodin

	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. hominis</i>
Citlivost	98.8%	95.7%
Specifičnost	98.7%	98.2%
PPV	96.6%	90%
NPV	99.5%	99.2%

S vaničkou MYCOSCREEN *PLUS* bylo detekováno 75,2 % kmenů *U.urealyticum* a 48,2% kmenů *M. hominis* po 24 hodinách inkubace. U prahové hodnoty pro detekci 10^4 CCU/ml byly výsledky stejné jako u vaničky testu MYCOFAST *Evolution 2*.

Rozlišení U.u a M.h

Globální shoda pro rozlišení během 24 hodin mezi *U. urealyticum* a *M. hominis*, porovnaná s metodou MYCOFAST *Evolution 2* je 96.5%.

16- LIKVIDACE ODPADU

Odpad likvidujte dle hygienických pravidel a aktuálních směrnic pro daný typ produktu a zemi použití.

17- LITERATURA

1. BEBEAR C., DE BARBEYRAC B. 1994. Les mycoplasmes, p. 1443-1463. Dans FRENEY J., RENAUD F., HANSEN W., BOLLET C. (éd.). "Manuel de bactériologie clinique", 2ème éd., vol.3, Elsevier, Paris .

2. BOUCAUD-MAITRE Y. et THOINET S. 1993. Analyse des prélèvements en bactériologie médicale - 2ème partie : prélèvements génitaux. Feuil. Biol., 34 : 21-24.

3. GRATTARD F., SOLEIHAC B., DE BARBEYRAC B., BEBEAR C., SEFFERT P. and POZZETTO B. 1995. Epidemiologic and molecular investigations of genital mycoplasmas from women and neonates at delivery. Pediatr. Infect. Dis. J., 14 : 853-858.

4. PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N°329, 34-36.

5. SHEPARD, M.C. and LUNCEFORD C.D.1976. Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. J. Clin. Microbiol. 3: 613-625.

6. TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans MANDELL G. L., BENNET J. E. and DOLIN R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES (FRANCE)
Tel: 33 (0)4 94 88 55 00
Fax: 33 (0)4 94 88 55 22
<http://www.elitechgroup.com>

