

MYCOPLASMA CONTROL

Kmeny *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*

pro kontrolu kvality

12 testů (kat.č. 00900)

verze: CPB0390_EN-2013-02

1 – ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Souprava MYCOPLASMA CONTROL obsahuje kmeny *Ureaplasma urealyticum* (U.u) a kmeny *Mycoplasma hominis* (M.h.) a byla vytvořena pro kontrolu kvality metod s tekutým médiem pro *in vitro* diagnostiku urogenitálních mykoplazmat. (§8).

2 – ÚVOD

Kontrola kvality analytických metod je důležitá pro udržení správné laboratorní praxe. Kontrola kvality v mikrobiologických laboratořích vyžaduje použití známých kmenů. Tyto mikroorganismy jsou často lyofilizovány kvůli prodloužení jejich životnosti. Detekce urogenitálních mykoplazmat v klinických vzorcích je rutinní laboratorní test. Hlavní druhy izolované z urogenitálního traktu jsou *Ureaplasma urealyticum* (U.u) a *Mycoplasma hominis* (M.h.). Tyto bakterie jsou přítomné jako komenzální organismy, ale mohou být patogenní.

3 - PRINCIP

Mykoplazmata jsou křehké bakterie postrádající buněčnou stěnu a vyžadují růstové faktory. Lyofilizované kmeny U.u a M.h. jsou produkovány z obohaceného mykoplazma bujónu, který obsahuje pomocné látky pro ochranu mikroorganismů během procesu lyofilizace.

4 - REAGENCE

MYCOPLASMA U.u: 6 lahvíček obsahujících lyofilizovaný kmen *U. urealyticum*.
MYCOPLASMA M.h.: 6 lahvíček obsahujících lyofilizovaný kmen *M. hominis*. Každá lahvíčka obsahuje lyofilizované kultivační médium (základ mykoplazma bujónu, hříběcí sérum, manitol a antibiotika). Kmeny U.u a M.h. byly izolovány z klinických vzorků a charakterizovány dle standardních metod (§10).

5 – BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Reagencie jsou určeny pouze pro použití *in vitro* a musí s nimi manipulovat pouze školený personál.

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.

MYCOPLASMA M.h. lahvíčky obsahují skupinu 2 bakterií (*M. hominis*) a musí s nimi být zacházeno s opatrností. **Riziko kontaminace biologickým agens.**

Nepoužívejte reagencie po datu expirace.

Nepoužívejte reagencie, které jsou poškozené, nebo které byly před použitím špatně uchovávány.

Po otevření soupravy z lednice vyndejte pouze požadované reagencie. Kmeny U.u a M.h. jsou citlivé na teplo a ke změnám teplot.

6 – PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ REAGENCIÍ

Kmeny uchovávány při 2 až 8 °C v původním obalu jsou stabilní do data expirace uvedeného na soupravě.

Lahvička U.u. a M.h. kmenů se musí před použitím rekonstituovat (§8)

Regenerované kmeny by se měli ihned použít nebo uchovávat maximálně po dobu 24 hodin při 2-8 °C. Nezamrazovat.

7 - POTŘEBNÝ ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

- sterilní pipety
- sterilní destilovaná voda
- nádoba na kontaminovaný odpad

8 - METODA

Nechte reagencie před použitím vytemperovat na pokojovou teplotu (18 až 25 °C) Rekonstituujte obsah lahvíčky U.u nebo M.h. s 1 ml sterilní destilované vody (bakteriální suspenze).

8.1 MYCOFAST Evolution 2/MYCOFAST US

Regenerujte UMMLyo (+ 2 ml UMMt) médium s UMMt (2 ml) médiem. Inokulujte toto regenerované médium definovaným množstvím bakteriální suspenze (U.u nebo M.h.) s použitím ředění uvedeného na štítku soupravy MYCOPLASMA CONTROL. Inokulujte vaničku MYCOFAST Evolution 2 (nebo MYCOFAST US) následovně:

- 100 µl inokulovaného UMM média do každé z 10 jamek
- 50 µl S.Mh do jamek 9 a 10 (nebo 6 a 7 u MYCOFAST US)

- 2 kapky minerálního oleje do každé z 10 jamek

Inkubujte vaničku při 37 °C +/- 1 °C po dobu 24 hodin a interpretujte porovnáním s očekávanými výsledky:

	10 ³	10 ⁴	≥10 ⁵	DOX	ROX	OFX	L	SXT	E	≥10 ⁴
U.u kmen	+	+	+	-	-	-/+	+	+	-	-
M.h kmen	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+

U metody MYCOFAST Screening xp postupujte dle návodu popsaného v § 8.1, inokulaci vaničky MYCOFAST Evolution 2 po konzervaci inokulovaného média po 24 hodin při 2-8 °C.

8.2 MYCOFAST Evolution 3

Regenerujte UMMLyo (+ 3 ml UMMt) médium s UMMt (3 ml) médiem. Inokulujte toto regenerované médium definovaným množstvím bakteriální suspenze (U.u nebo M.h.) s použitím ředění uvedeného na štítku soupravy MYCOPLASMA CONTROL. Inokulujte vaničku MYCOFAST Evolution 3 následovně:

- 100 µl inokulovaného UMM média do každé z 20 jamek

- 50 µl S.Mh do jamek 6 a 7

- 2 kapky minerálního oleje do každé z 20 jamek

Inkubujte vaničku při 37 °C +/- 1 °C po dobu 24 hodin a interpretujte porovnáním s očekávanými výsledky:

	10 ³	10 ⁴	≥10 ⁵	L	SXT	E	≥10 ⁴
U.u kmen	+	+	+	+	+	-	-
M.h kmen	-	-	-	-	+	+	+
	DOX	PT	ROX	AZM	JM	CIP	OFX
U.u kmen	S	S	S	S	S/I	R	I
M.h kmen	S	S	R	R	S	S	S

U metody MYCOFAST Screening Evolution 3 postupujte dle návodu popsaného v §8.2 inokulaci vaničky MYCOFAST Evolution 3 po konzervaci inokulovaného média po 24 hodin při 2-8 °C.

8.3 MYCOFAST Revolution

Inokulujte UMMt (3 ml) médium definovaným množstvím bakteriální suspenze (U.u nebo M.h.) s použitím ředění uvedeného na štítku soupravy MYCOPLASMA CONTROL. Inokulujte vaničku MYCOFAST Revolution následovně:

- 100 µl inokulovaného UMMt média do každé z 20 jamek

- 50 µl S.Mh. do jamek 6 a 7

- 2 kapky minerálního oleje do každé z 20 jamek

Inkubujte vaničku při 37 °C +/- 1 °C po dobu 24 hodin a interpretujte porovnáním s očekávanými výsledky:

	10 ³	10 ⁴	≥10 ⁵	L	SXT	E	≥10 ⁴
Kmen U.u	+	+	+	+	+	-	-
Kmen M.h	-	-	-	-	+	+	+
	LVX	MXF	E	CM	TE		
Kmen U.u	S/R	S	S	+	R		
Kmen M.h	S	S	+	S	S		

8.4 MYCOFAST Screening Revolution

Inokulujte UMMt (3 ml) médium definovaným množstvím bakteriální suspenze (U.u nebo M.h.) s použitím ředění uvedeného na štítku soupravy MYCOPLASMA CONTROL. Inokulujte vaničku MYCOFAST Revolution následovně:

- 100 µl inokulovaného UMMt média do každé z U.u nebo M.h. jamek

- 50 µl S.Mh do jamky M.h

- 2 kapky minerálního oleje do každé z U.u nebo M.h. jamek

Inkubujte vaničku při 37 °C +/- 1 °C po dobu 24 hodin a interpretujte porovnáním s očekávanými výsledky:

	U.u.	M.h.
Kmen U.u.	+	-
Kmen M.h.	-	+

Pokračujte s diagnostikou s COMPLEMENT MYCOFAST Revolution inokulaci vaničky MYCOFAST Revolution jak je popsáno v § 8.3 se zbytkem inokulovaného média uchovávaného 24 hodin při 2-8 °C během screeningu.

8.6. MYCOPLASMA IS2

Postupujte dle protokolu popsaného výrobcem. Naředte bakteriální suspenzi (U.u nebo M.h.) kultivačním médiem s použitím ředění uvedeného na štítku MYCOPLASMA CONTROL. Po inkubaci 24 hodin při 37 °C +/- 1 °C, interpretujte test porovnáním s očekávanými výsledky, viz níže:

	Uu	Mh	Uu ≥10 ⁴	Mh ≥10 ⁴	DOT	J	OFL
U.u. kmen	+	-	+	-	S	S/I	I/R
M.h. kmen	-	+	-	+	S	S	S
	E	TET	CIP	AZM	CLA	PRI	
U.u. kmen	S/I	S	R	S/I	S	S	
M.h. kmen	R	S	S	R	R	S	

8.7. MYCOPLASMA DUO

Postupujte dle protokolu popsaného výrobcem. Naředte bakteriální suspenzi (U.u nebo M.h.) kultivačním médiem s použitím ředění uvedeného na štítku MYCOPLASMA CONTROL. Po inkubaci 24 hodin při 37 °C +/- 1 °C, (48 hodin pokud je to pro M.h. nezbytné) interpretujte test porovnáním s očekávanými výsledky, viz níže:

	Inkubace 24 h při 37 °C				Inkubace 48 h při 37 °C			
	Uu	Uu ≥10 ⁴	Mh	Mh ≥10 ⁴	Uu	Uu ≥10 ⁴	Mh	Mh ≥10 ⁴
U.u kmen	+	+	-	-	+	+	-	-
M.h kmen	-	-	+	-/+	-	-	+	+

8.8. SIR MYCOPLASMA

Postupujte dle protokolu popsaného výrobcem a po inkubaci 24 hodin při 37 °C +/- 1 °C interpretujte test porovnáním s očekávanými výsledky, viz níže:

	OFX	CM	PT	E	JM	AZM	TE	DO
U.u kmen	I/R	S/R	S	S/I	S/I	S	S	S
M.h kmen	S	S	S	R	S	R	S	S

9 - LIMITY / PŘÍČINY CHYB

- V případě nestálé teploty inkubace nebo < 36 °C (časté otevírání inkubátoru, heterogenita teploty v inkubátoru...) může inkubace pokračovat další 2 až 4 hodiny.
- Špatná konzervace kmenů během přepravy nebo uchování.
- Nerespektování návodu.
- Používání prošlých vaniček nebo médií.

10 – CHARAKTERISTIKA PROVEDENÍ

10-1 Identifikace/čistota : U.u a M.h. byly identifikovány na miskách s agarem A7 a na U9 médium pro U.u a Hayflick médium pro M.h. Neexistuje zkřížená kontaminace mezi kmeny U.u a M.h. Kromě toho neexistuje bakteriální ani plísňová kontaminace na miskách s Columbia nebo Sabouraud agarem.

10-2 Určení množství : U.u a M.h. byly spočítány v tekutém médiu s použitím referenční metody (U9 médium pro U.u a Shepard médium pro M.h.). Aktuální výsledky získané v různých testech souhlasí s očekávanými výsledky.

10-3 Testování antimikrobiální citlivosti : Výsledky testování antimikrobiální citlivosti získané s U.u a M.h. na různých vaničkách souhlasí s minimálními inhibičními koncentracemi (MIC) v tekutých médiích.

10-4 Opakovatelnost a reprodukčnost : Studie provedené se dvěma různými šaržemi U.u a M.h. u kontroly MYCOFAST Evolution 3, ukázali 100% opakovatelnost a 100 % reprodukovatelnost v rámci šarže a mezi jednotlivými šaržemi. Studie provedené na testování 10 různých šarží testu MYCOFAST Evolution 2, MYCOFAST Evolution 3. UMMLyo (2 ml) a UMMLyo (3 ml) médiích ukázali, že je zde homogenita mezi výsledky se kmeny U.u. a M.h.

11 – LIKVIDACE ODPADU

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

12 - LITERATURA

Document Cofrac Lab GTA 06. Révision 00 - Juillet 2005. Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale. § 10.3.1. Contrôle de Qualité en Bactériologie. Ridgway, G.L., Bébear, C., Bébear, C. M. et al. 2001. Antimicrobial susceptibility test-ing of intracellular and cell-associated pathogens. EUCAST Discussion Document E. Dis 6.1.

Waites, K.B., C.M. Bébear, J.A. Robertson, D.F. Talkington, and G.E. Kenny. 2001. Cumitech 34, Laboratory Diagnosis of mycoplasmal infections. Coordinating ed., F.S. Nolte. American Society for Microbiology, Washington, D.C.