MYCOTEST

Για την ταυτοποίηση των ουρογεννητικών μυκοπλασμάτων
Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum

10 test. Cat no 100081

GR/CA01/GRM5/O/82 CE

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ
Το Mycotest χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των ουρογεννητικών Μυκοπλασμάτων *M. hominis (M.h.)* και *U. urealyticum (U.u.).*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ
Τα μυκοπλάσματα *Mh* και *Uu* είναι μικροί (0,2 – 0,5 μm) πλειομορφικοί μικροοργανισμοί που στερούνται κυτταρικού τοιχώματος, περικλειόμενοι μόνο από κυτταρική μεμβράνη, πλούσια σε στερόλες.
Λόγω της ελλείψεως κυτταρικού τοιχώματος, το σχήμα τους δεν είναι σταθερό και δεν χρωματίζονται με Gram χρώση. Για τον ίδιο λόγο, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δεν είναι δραστικά εναντίον τους.

Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα και έχουν μεγάλες τροφικές απαιτήσεις. Για να γίνει σωστή διάγνωση, απαιτείται ειδική φροντίδα στα δείγματα όπως, σωστή λήψη, μεταφορά και συντήρηση με ειδικό υλικό για μυκοπλάσματα (M. U-A Broth 080096) και διάγνωση με θρεπτικά υλικά εμπλουτισμένα με τα απαραίτητα συστατικά.

Τα *Mh* και *Uu* σε ορισμένες κατηγορίες υγιών ανδρών και γυναικών συμβιούν και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του κατώτερου ουρογεννητικού συστήματος. Ο αποικισμός αυτός ποικίλει και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως την ηλικία, τη φυλή, την ορμονική κατάσταση, τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων και είναι μεγαλύτερος στις γυναίκες, ιδιαίτερα στην εγκυμοσύνη.

ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΑ
ΑΝΔΡΕΣ: 1) Ουρηθρίτιδα (NCNGU) (μη χλαμυδιακή, μη γονοκκοκική). 2) Προστατίτιδα.
3) Επιδιδυμίτιδα. 4) Υπογονιμότητα (Μορφολογικές και λειτουργικές διαταραχές σπερμ/ρίων).
ΓΥΝΑΙΚΕΣ: 1) Κολπίτιδα, τραχηλίτιδα, βαρθολινίτιδα, σύνδρομο ουρήθρας. 2) Επιλόχειος πυρετός.
3) Φλεγμονή της πυέλου (PID). 4) Συμμετοχή σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την αναπαραγωγή όπως: καθ' έξιν αποβολές, θνησιγενή προωρότητα, χοριοαμνίτιδα, γέννηση νεογνών με χαμηλό βάρος.
ΝΕΟΓΝΙΚΗ – ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ: 1) Βακτηριαιμία. 2) Σηψαιμία. 3) Λοιμώξεις αναπνευστικού και νευρικού συστήματος. 4) Βρογχοπνευμονική δυσπλασία, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα..
Ο αποικισμός των νεογνών συμβαίνει είτε κατά την ενδομήτρια ζωή, είτε από επαφή με τα μυκοπλάσματα του κόλπου κατά τον τοκετό. Η συχνότητα αποικισμού σε νεογνά φθάνει το 50% και είναι ιδιαίτερα υψηλή σε νεογνά χαμηλού βάρους γέννησης, όταν ο κόλπος των μητέρων παρουσιάζει υψηλό αποικισμό μυκοπλασμάτων.

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ
Αρθρίτιδα (σηπτική σε άτομα με υπογαμασφαιριναιμία, SARA), περιτονίτιδα, επίδραση στο ουροποιητικό σύστημα (ουρολοίμωξη, πυελονεφρίτιδα, σχηματισμός λίθων).

ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ MYCOTEST

1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ
Το Mycotest διατηρείται στους 2 έως 8 ºC για 3 μήνες από την ημέρα παραγωγής.
Επίσης διατηρείται στους -18 έως -25 ºC για 5 μήνες από την ημέρα παραγωγής.

2. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ
- Το Mycotest είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό αντιδραστήριο και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου.
- Κατά τη χρήση του φοράμε γάντια.
- Λόγω της ύπαρξης πέντε αντιβιοτικών στη σύνθεση του, σε περίπτωση επαφής με το δέρμα πλένουμε αμέσως με άφθονο νερό και σαπούνι.
- Ο χειρισμός των δειγμάτων με το Mycotest να γίνεται μέσα σε Laminar air flow Class II.
- Μετά την ημερομηνία λήξεως το Mycotest είναι ακατάλληλο για χρήση.
- Εάν για οποιονδήποτε λόγο (ράγισμα, αποσφράγιση) το αντιδραστήριο έχει περάσει εξωτερικά μην το χρησιμοποιήσετε.
- Τα θετικά δείγματα πρέπει να καταστρέφονται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής που προβλέπονται για τη διαχείριση μολυσματικών δειγμάτων.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το Mycotest είναι ένα κιτ δύο σωληναρίων με υγρό υλικό έτοιμο προς χρήση.
Το Σωληνάριο με την ένδειξη **Mh** ταυτοποιεί το *Mycoplasma hominis* και το σωληνάριο με την ένδειξη **Uu** το *Ureaplasma urealyticum*.
Η ταυτοποίηση βασίζεται στην ιδιότητα των *M h* και *U u* να διασπούν την αργινίνη και την ουρία αντίστοιχα. Με τη διάσπαση τους το pH του υλικού γίνεται αλκαλικό και το χρώμα του αλλάζει από πορτοκαλί σε κόκκινο.
Το παθολογικό αποτέλεσμα με συγκέντρωση ≥ 10^4 CFU/ml φαίνεται σε 24 ώρες.
Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός υπολογίζεται, με βάση την ποσότητα της αργινίνης και της ουρίας.
Η προσθήκη πέντε αντιβιοτικών θωρακίζει τους ζωμούς με υψηλή ανασταλτικότητα έναντι βακτηρίων και μυκήτων που θα μπορούσαν κατά την ανάπτυξή τους να μας δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑ ΛΙΤΡΟ (Απιονισμένου νερού)

Arginine Test Broth *(Mh)*
Mycoplasma broth base 700ml. Horse Serum 200ml. Yeast extract 100ml. Nutrient supplement 10ml. Arginine 10ml. Phenol Red 0,05g. Antibiotic mixture 10ml.
Τελικό pH 6.0 στους 25 ºC
Urease Test Broth *(Uu)*
Mycoplasma broth base 700ml. Horse Serum 200ml. Yeast extract 100ml. Nutrient supplements 10ml. Urea 2,5ml. Phenol Red 0,05g. Antibiotic mixture 10ml.
Τελικό ph 6,0 στους 25 ºC

5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Προσοχή το δείγμα πρέπει να συλλέγεται πριν από οποιαδήποτε θεραπεία. Η διαδικασία συλλογής πρέπει να γίνεται με σωστό και σταθερό τρόπο ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση του δείγματος από άλλους μικροοργανισμούς. Η μεταφορά του πρέπει να γίνεται με ειδικό υλικό για μυκοπλάσματα (M. U-A 2ml Κωδ. 080096) μέσα σε 24 ώρες και να συντηρείται με παγοκύστες σε χαμηλή θερμοκρασία. Εάν η λήψη γίνει στο εργαστήριο, κάντε τον εμβολιασμό όσο το δυνατόν συντομότερα. Εάν ο εμβολιασμός γίνει στο M. U-A το δείγμα μπορεί να διατηρηθεί σταθερό για 8 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, 24 ώρες στους 2 – 8 ºC και 15 μέρες στους –20 ºC.

Κολπικό – τραχηλικό δείγμα

Με τη χρήση κολποδιαστολέα και με ένα βαμβακοφόρο στειλεό αφαιρούμε τη βλέννη από τον έξω κόλπο. Με δεύτερο στειλεό λαμβάνουμε το δείγμα από τον ενδοτράχηλο. Προσοχή, πρέπει να συλλέγονται κύτταρα, διότι σε αυτά βρίσκονται προσκολλημένα τα μυκοπλάσματα.

Ουρηθρικό δείγμα

Καθαρίζουμε την ουρήθρα και τη γύρω περιοχή χωρίς τη χρήση αντισηπτικού. Μετά συλλέξτε το δείγμα με περιστροφή του στειλεού στον ουρηθρικό βλεννογόνο. Το δείγμα πρέπει να συλλέγεται μετά από δύο έως τρεις ώρες από την τελευταία ενούρηση.

Σπέρμα – Πύον σαλπιγγίτιδας – Γαστρικό έκκριμα

Συλλέγουμε το σπέρμα και το πύον σαλπιγγίτιδας μέσα σε αποστειρωμένο ουροσυλέκτη.
Το γαστρικό έκκριμα συλλέγεται από τον καθετήρα του νεογνού μέσα σε αποστειρωμένο σωληνάριο. Γίνεται αραίωση 1:10 σε ζωμό μυκοπλάσματος (M. U-A Broth). Προσοχή ποτέ μην ρίξετε το σπέρμα χωρίς αραίωση στο MycoTest διότι το αλκαλικό του pH αλλάζει το χρώμα του υλικού από κίτρινο σε ροζ.

Ούρα

Συλλέγουμε τα πρώτα πρωινά ούρα σε αποστειρωμένο ουροσυλέκτη. Γίνεται φυγοκέντρηση 15ml ούρων στις 2000 rpm για 5 λεπτά. Αδειάζουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε περίπου 0,5ml ούρων αναδεύουμε καλά και ρίχνουμε 200μl στο σωληνάριο M. U-A.

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ MYCOTEST

Α. ΜΕΔΟΔΟΣ: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
ΑΜΕΣΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ MYCOTEST ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΣΤΕΙΛΕΟ (ΚΟΛΠΙΚΟ, ΟΥΡΗΘΡΙΚΟ)

- Φέρουμε το Mycotest σε θερμοκρασία δωματίου. Βγάζουμε το πώμα και το ακουμπάμε ανεστραμμένο σε καθαρό μέρος.
- Εμβαπτίζουμε το στειλεό με ήπιες περιστροφές, πρώτα στο σωληνάριο ουρίας *(Uu)* και έπειτα στο σωληνάριο αργινίνης *(Mh)* για τρία δεύτερα σε κάθε σωληνάριο.
- Κλείνουμε το καπάκι και επωάζουμε στους 36 – 37 ºC για 24 – 48 ώρες σε αερόβιες συνθήκες.

Β. ΜΕΔΟΔΟΣ: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ: ΚΟΛΠΙΚΟ, ΟΥΡΗΘΡΙΚΟ, ΣΠΕΡΜΑ, ΟΥΡΑ κτλ.
Για να δουλέψουμε τη Β. μέθοδο θα χρειαστούμε το M. U-A Broth 2ml. Κωδικός 080096.

- Εμβολιάζουμε το δείγμα το συντομότερο δυνατόν, στο σωληνάριο **M. U-A**.
- Όταν το δείγμα είναι από στειλεό εμβαπτίζουμε με περιστροφές και στη συνέχεια πετάμε το στειλεό.

- Όταν το δείγμα είναι υγρό (ούρα, σπέρμα) ρίχνουμε 200μl στο **M U-A** και ανακατεύουμε σε βόλτερ.

*Τα ούρα πρέπει να φυγοκεντρούνται. (Συλλέγουμε τα πρώτα πρωινά ούρα σε αποστειρωμένο ουροσυλέκτη**.** Γίνεται φυγοκέντριση 15ml ούρων στις 2000 rpm για 5 λεπτά. Ρίχνουμε 200μl από το ίζημα στο σωληνάριο M. U-A).*

- Από το εμβολισμένο M U-A ρίχνουμε 100μl σε κάθε σωληνάριο του MYCOTEST.
- Κλείνουμε τα σωληνάρια και επωάζουμε στους 36 - 37 °C σε αερόβιες συνθήκες για 24 – 72 ώρες.

Φυλάμε το εμβολιασμένο M. U-A στην κατάψυξη (–20 ºC) μέχρι να ολοκληρωθεί η εξέταση.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ Α. ΜΕΘΟΔΟΥ

- Κάνουμε διαδοχικούς ελέγχους στις 24 και 48 ώρες.
- Αλλαγή του χρώματος από πορτοκαλί σε κόκκινο μετά από 24 ώρες σε ένα από τα δύο σωληνάρια, υποδηλώνει την παρουσία και ανάπτυξη *Mh* ή *Uu* αντίστοιχα σε παθολογικό αριθμό συγκέντρωσης, περίπου >10^3 CCU/ml.
- Μικρή αλλαγή του χρώματος μετά από 24 ώρες υποδηλώνει ασθενώς θετικό δείγμα με αριθμό συγκέντρωσης ≤10^3 CCU/ml. Αυτή η συγκέντρωση μπορεί να χαρακτηριστεί σαν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας για ορισμένες κατηγορίες ανθρώπων (βλέπε εισαγωγή). Σε άλλες κατηγορίες όπως μικρή ηλικία, το MycoTest αξιολογείται σαν θετικό. Και στις δύο περιπτώσεις επωάζουμε για 24 ώρες ακόμα. Στο δεύτερο εικοσιτετράωρο το σωληνάριο συνήθως γίνεται θετικό (κόκκινο).
- Καμία αλλαγή του χρώματος υποδηλώνει απουσία για *Mh* και *Uu* στο δείγμα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΓΚΥΩΝ ΣΥΝΙΣΤΑΤΑΙ Η ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ MYCOTEST AGAR Ή ΤΟΥ MYCOPLASMA AGAR A7 ΔΙΟΤΙ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΝΑ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΜΕ ΜΕ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ. (1 – 2 ΑΠΟΙΚΙΕΣ 10^3 CFU/ml)

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ Β. ΜΕΘΟΔΟΥ

- Κάνουμε διαδοχικούς ελέγχους σε 24, 48 και 72 ώρες.
- Αλλαγή του χρώματος από πορτοκαλί σε κόκκινο μετά από 24 ώρες, στο ένα ή και στα δύο σωληνάρια, υποδηλώνει την παρουσία και ανάπτυξη *Mh* ή *Uu* σε παθολογικό αριθμό συγκέντρωσης (≥10^4 CCU/ml).
- Μικρή αλλαγή του χρώματος σε ροζ, υποδηλώνει μικρότερο αριθμό συγκέντρωσης (≤10^3 CCU/ml) για *Mh* ή *Uu.* Αυτή η συγκέντρωση μπορεί να χαρακτηριστεί σαν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας για ορισμένες κατηγορίες ανθρώπων (βλέπε εισαγωγή). Σε άλλες κατηγορίες όπως μικρή ηλικία, το MycoTest αξιολογείται σαν θετικό. Και στις δύο περιπτώσεις επωάζουμε για 24 ώρες ακόμα. Στο δεύτερο εικοσιτετράωρο το σωληνάριο συνήθως γίνεται θετικό (κόκκινο).
- Καμία αλλαγή του χρώματος μετά από 72 ώρες επώασης υποδηλώνει απουσία για *Mh* και *Uu* στο δείγμα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ΓΙΑ ΤΑ ΥΓΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΥΝΙΣΤΑΤΑΙ Η ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ MYCOTEST AGAR Ή ΤΟΥ MYCOPLASMA AGAR A7 ΔΙΟΤΙ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΝΑ ΚΑΘΟΡΙΖΕΤΑΙ Η ΑΚΡΙΒΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ

7. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Όπως αναφέραμε και πιο πάνω το Mycotest περιέχει τέσσερα αντιβιοτικά και ένα αντιμυκιτισιακό, για την αναστολή κυρίως των βακτηρίων που διασπούν την ουρία ή την αργινίνη. Όμως εάν η αριθμός τους είναι >10^6 CFU/ml τότε μπορεί να αναπτυχθούν και να προκαλέσουν αλλαγή στο χρώμα του υλικού. Συνήθως με έντονη θολερότητα.
- Μερικά δείγματα έχουν αλκαλικό pH (≥8 σπέρμα) και μπορεί να προκαλέσουν αλλαγή του χρώματος αμέσως μετά τον εμβολιασμό.
- Εάν το δείγμα δεν έχει συντηρηθεί σωστά μπορεί να δώσει λανθασμένο αποτέλεσμα. Γι' αυτό ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν υποδηλώνει πάντα την απουσία λοίμωξης.
- Mycotest που δεν έχουν συντηρηθεί σωστά ή έχουν λήξει δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν.

9. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο ποιοτικός έλεγχος γίνεται με πρότυπα στελέχη *Mycoplasma hominis (NCTC 10111) και Ureaplasma urealyticum (NCTC 10177)* σε δύο συγκεντρώσεις 10^3 και 10^4 CCU/ml, με την παράλληλη χρήση Mycotest Agar.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

MYCOTEST ™ - GR/CA01/GRM5/O/14 CE

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Σωληνάρια 2X1,2ml	100081	10 τεμάχια	2 έως 8 °C	3 μήνες

Παράγεται στην Ελλάδα από την εταιρεία Bioprepare σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής οδηγίας 98/79/ΕΚ. ΦΕΚ Β2198/2-10-2009. Κωδικός κατά EDMA 14 02 02 07. Κωδικός GMDN: 17019. Η εταιρεία Bioprepare έχει πιστοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα EN ISO 9001:2008 / ΔΥ8δ/1348/2004.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γ.Β. Χριστάκης Ν.Ι. Λεγάκης: Γυναικολογικές και Μαιευτικές Λοιμώξεις. Κεφ.9 Σελ. 173. Μυκοπλάσματα.

Αντωνιάδης Α. Αντωνιάδης Γρ. Λεγάκης Ν. Τσελέντης Ι.: Ιατρική Μικροβιολογία. Σελ. 177. Μυκοπλάσματα.

Αντιγόνη Αρσένη: Κλινική Μικροβιολογία. Κεφάλαιο 27ο Μυκοπλάσματα. Σελ. 722-740.

Λοιμώξεις από μυκοπλάσματα. Νεότερα Δεδομένα.: Ημερίδα Ιασώ (5ος 2005). Π.Ι. Βασιλοπουλος (Επ. καθ. Μαιευτ. – Γυν.) Δ. Στεφανίδης (Επ. καθηγ. Μικροβιολογίας, διευθ. Κεντρικών εργαστηρίων Ιασώ). Δ.Σ. Φαναριώτης (Δρ. Ιατρ. Παν. Αθηνών).

Mycoplasmas of Humans: A. Blanchard and Cecile M. Bebear. Chapte 25. In Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas Ed. By Rarin and Herman N. 2002

David Greenwood. Richard Slack. John Peutherer: 42 Mycoplasmas. Page 381 – 391.

Bebear, C. Et B. De Barbeyrac. 1994. Les mycoplasmes, p. 1443-1463. Dans J. Freney, F. Renaud, W. Hansen et C. Bollet(ed)., Manual bacteriologi clinique vol.3, 2 edition. Elsevier, Paris.

Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ & ΣΙΑ Ε.Ε.

Παραγωγή Μικροβιολογικών Αντιδραστηρίων

Ποταμού 5 ΒΙΟ ΠΑ ΚΕΡΑΤΕΑΣ - ΑΤΤΙΚΗ Τ.Θ. 4893 - ΤΚ 19001

Τηλ.: 2299 0 66113 Φαξ: 2299 0 66112. E-mail: bioprep1@otenet.gr www.bioprepare.gr