

MYCOPLASMA U-A BROTH (M. U-A)

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το Mycoplasma U-A Broth (M. U-A) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, τη συντήρηση και μεταφορά των ουρογεννητικών μυκοπλασμάτων, *Mycoplasma hominis*(Mh) & *Ureaplasma urealyticum*(Uu). Το M. U-A δεν μπορεί από μόνο του να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό μέσο. Γι' αυτό πρέπει πάντα να συνοδεύεται από ένα ταυτοποιητικό μέσο για Μυκόπλασμα (Mycotest Cat. No 100081, Mycoplasma A7 agar Cat no 050080 ή Mycotest Agar Cat. No 100331).

Τα μυκοπλάσματα είναι οι μικρότεροι προκαρυωτικοί οργανισμοί οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν εξωκυττάρια σε θρεπτικά υλικά. Στερούνται τελείως κυτταρικού τοιχώματος. Σ' αυτήν την ιδιότητά τους οφείλουν την ιδιαίτερη πλαστικότητά τους (πολυμορφισμός), την αντοχή τους στα β-λακταμικά αντιβιοτικά καθώς και άλλα βιολογικά τους χαρακτηριστικά. Περιβάλλονται από τρίστοιβη κυτταροπλασματική μεμβράνη και το σχήμα τους ποικίλει από σφαιρικό, ωοειδές, μέχρι νηματοειδές με εκβλαστήσεις. Η πρωτεϊνοσύνθεσή τους εμποδίζεται από αντιβιοτικά, όπως τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες, ερυθρομυκίνη και χλωραμφαινικόλη. Περιέχουν DNA και RNA. Το DNA αποτελεί το 1,5 – 4% του βάρους τους. Το εξαιρετικά μικρό αυτό μέγεθος του γενώματος περιορίζει τη βιοσυνθετική τους ικανότητα, βοηθά στην ερμηνεία των πολύπλοκων θρεπτικών τους απαιτήσεων για καλλιέργεια και συνεπάγεται την σαπροφυτική ή παρασιτική ύπαρξη για τα περισσότερα είδη.

Τα μυκοπλάσματα του γεννητικού συστήματος *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* *Mycoplasma fermentans* & *Mycoplasma genitalium* αποτελούν τα πιο συχνά απομονούμενα Mollicutes από λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος. Κλινικές διαστάσεις αυτών των λοιμώξεων είναι υψίστης σημασίας για την ανθρώπινη υγεία.

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
MYCOPLASMA BROTH	20
PHENOL RED	75mg
L-CYSTINE	120mg
HORSE SERUM	100ml
POLYENRICHMENT SUPPLEMENT	10ml
L-ARGININE	10
UREA	5
FRESH YEAST EXTRACT (15%)	50ml
PENICILLINE -G	100.000U
AMPHOTERICIN-B	0.5mg

Εμφάνιση: Πορτοκαλί διαυγές
Τελικό pH 6,0 ± 0.1.

ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ

Mycoplasma Broth: BD
Horse Serum: E&O Laboratories
Yeast extract: Lab M

ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ

Το M. U-A φυλάσσεται στους 2 – 6 °C και στους –15 έως – 20 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο κουτί, για κάθε θερμοκρασία ξεχωριστά.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Το M. U-A είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό αντιδραστήριο και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου.
- Κατά τη χρήση του φοράμε γάντια.
- Λόγο της ύπαρξης τεσσάρων αντιβιοτικών στη σύνθεσή του, σε περίπτωση επαφής με το δέρμα πλένουμε αμέσως με άφθονο νερό και σαπούνι.
- Ο χειρισμός των δειγμάτων με το M. U-A πρέπει να γίνεται μέσα σε Laminar flow Class II.
- Μετά την ημερομηνία λήξεως το M. U-A είναι ακατάλληλο για χρήση.
- Εάν για οποιοδήποτε 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.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το M. U-A χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, μεταφορά και συντήρηση των Μυκοπλασμάτων, *M. hominis*(Mh) & *U. urealyticum*(Uu).

Είναι ένας θρεπτικός ζωμός 2ml, διαυγής, χρώματος πορτοκαλί, σε γυάλινο σωληνάριο με βιδωτό μεταλλικό πώμα. Είναι εμπλουτισμένος με όλα τα απαραίτητα στοιχεία που χρειάζεται το Μυκόπλασμα για τον πολλαπλασιασμό και συντήρηση του. Περιέχει μια θρεπτική βάση με πεπτόνη καζείνης, εκχύλισμα καρδιακού ιστού από βοοειδή, εκχύλισμα κρέατος και εκχύλισμα μαγιάς. Επίσης εμπλουτίζεται με ορό αλόγου και φρέσκο εκχύλισμα μαγιάς απαραίτητα στοιχεία για τον μεταβολισμό των Μυκοπλασμάτων. Τέλος περιέχει ουρία, αργινίνη, ερυθρό της φαινόλης, L-Cysteine, NaCl, τρία αντιβιοτικά και ένα αντιμυκητιασικό.

Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με την αλλαγή του χρώματος του υλικού από πορτοκαλή σε κόκκινο Το αποτέλεσμα της μεθόδου φαίνεται σε 24 έως 72 ώρες.

Η ουρία είναι πηγή ενέργειας για το *Uu* το οποίο την υδρολύει σε αμμωνία και CO₂, το pH του υλικού γίνεται αλκαλικό και ο δείκτης ερυθρό της φαινόλης από κίτρινος, γίνεται κόκκινος.

Η αργινίνη είναι πηγή ενέργειας για το *Mh* το οποίο την αποκαρβοξυλιώνει, το pH του υλικού γίνεται αλκαλικό και το χρώμα του λόγω του δείκτη ερυθρό της φαινόλης, από κίτρινο γίνεται κόκκινο.

Ο ζωμός παρουσιάζει μόλις υποσημεινόμενη θολερότητα στην περίπτωση ανάπτυξης του *M.h*, ενώ η ανάπτυξη του *U.u* δεν προκαλεί θολερότητα στον ζωμό.

Η συντήρηση των μυκοπλασμάτων επιτυγχάνεται χάρη στα απαραίτητα συστατικά του ζωμού, την οσμωτική ισορροπία, και το ιδανικό pH. Τα μυκοπλάσματα χρησιμοποιούν το περιβάλλον του ζωμού για να συντηρηθούν χωρίς να πολλαπλασιάζονται αφού για τον μεταβολισμό τους χρειάζονται απαραίτητα θερμοκρασία 35 – 37 °C.

Διατηρούνται σε σταθερό αριθμό για 8 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (22 – 27 °C), 24 ώρες στο ψυγείο (2 – 8 °C) και 15 μέρες στην κατάψυξη (-15 έως – 20 °C).

Τα μίγμα αντιβιοτικών αναστέλλει την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων βακτηρίων.

ΛΗΨΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

1. Κολπικό: Λαμβάνεται με σπειλέο. (Χρησιμοποιούμε κολποδιαστολέα).

2. Τραχηλικό: Αφαιρούμε τη βλέννη από το τράχηλο με βαμβακοφόρο σπειλέο. Με δεύτερο σπειλέο λαμβάνουμε το δείγμα από τον ενδοτράχηλο. Προσοχή, πρέπει να συλλέγονται κύτταρα, διότι σε αυτά βρίσκονται προσκολλημένα τα μυκοπλάσματα.

3. Ουρηθρικό: Το δείγμα λαμβάνεται με περιστροφή του σπειλέου στον ουρηθρικό βλεννογόνο.

4. Σπέρμα - Πύον σαλπινγτιδας: Συλλέγουμε το δείγμα σε αποστειρωμένο φιαλίδιο.

5. 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 πολύ καλά μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.

6. Γαστρικό έκκριμα: Συλλέγουμε το γαστρικό έκκριμα από το νεογνό σε στείρες συνθήκες σε αποστειρωμένο φιαλίδιο.

ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΖΩΜΟΥ

- Φέρουμε το ζωμό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ανοίγουμε το καπάκι του σωληναρίου και το τοποθετούμε με προσοχή ανεστραμμένο στον πάγκο.
- Για δείγματα από σπειλέο, εμβαπτίζουμε με περιστροφικές κινήσεις.
- Για υγρά δείγματα, προσθέτουμε 200μl από το δείγμα στο M. U-A.
- Κλείνουμε το καπάκι και επωάζουμε στους 35 – 37 °C για 24 - 72 ώρες σε αερόβιες συνθήκες.

ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΟ MYCOPLASMA AGAR A7 (Cat no 050080) ή MYCOTEST AGAR (Cat no 100331)

- Τοποθετούμε το τρυβλίο στον επωαστικό μέχρι να στεγνώσει η επιφάνεια του
- Ρίχνουμε 10μl από τον εμβολιασμένο ζωμό στην επιφάνεια του τρυβλίου.
- Τοποθετούμε ανεστραμμένο το τρυβλίο στον επωαστικό (35 - 37 °C) και επωάζουμε σε αερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες (5 – 10%) για 24 – 72 ώρες.

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

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΣΤΟ MYC. U-A BROTH

- Αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε κόκκινο στο σωληνάριο, υποδηλώνει παθολογική συγκέντρωση στο δείγμα (>10³ CCU/ml) για *Mycoplasma hominis* ή *Ureaplasma urealyticum*.
- Μικρή αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε ροζ, υποδηλώνει ασθενώς θετικό δείγμα (≤10³ CCU/ml). Εδώ εξετάζουμε τις εξής περιπτώσεις: α) Είναι πιθανών το δείγμα να έφτασε στο εργαστήριο όχι καλά συντηρημένο (μεταφορά χωρίς ειδικό υλικό για μυκοπλάσματα, όπως Stuart ή amies όπου το pH τους είναι απαγορευτικό για

τα μυκοπλάσματα, αλλά και τα θρεπτικά συστατικά τους δεν επαρκούν για τη συντήρησή τους). Γι' αυτό παρατείνουμε την επώαση του ζωμού για άλλο ένα εικοσιτετράωρο. Εάν το χρώμα παραμένει ροζ, και παράλληλα στο τρυβλίο δεν έχουμε καμία ανάπτυξη, ζητάμε επανάληψη της εξέτασης. β) Για δείγματα κατά φύση στείρα, όπως σπέρμα, ούρα κ.α., στα οποία αξιολογούμε και τις μικρότερες συγκεντρώσεις *μυκοπλάσμάτων*, επωάζουμε για 24 ώρες ακόμα. Εάν το χρώμα παραμένει ροζ το δείγμα χαρακτηρίζεται σαν ασθενώς θετικό (≤10³ CCU/ml).

- Καμία αλλαγή του χρώματος και καμία ανάπτυξη στο τρυβλίο A7, υποδηλώνει αρνητικό αποτέλεσμα για *μυκοπλάσματα*.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΣΤΟ A7 AGAR (ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ - ΑΡΙΘΜΗΣΗ)

- *Mycoplasma hominis*: Αποικίες διαμέτρου 100-200μm. Στρογγυλές, με κοκκώδη επιφάνεια και σκούρα κεντρική θηλή (σαν αυγό μάτι).
- *Ureaplasma urealyticum*: Αποικίες πολύ μικρές, διαμέτρου 15 – 25 μm. Συμπαγείς με σκούρο καφέ χρώμα (σαν αχινός).
- Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται με την μέτρηση των αποικιών πάνω στο τρυβλίο, ανά οπτικό πεδίο (x10 μεγέθυνση) και εκφράζεται σε CFU (Colony Forming Units).

Αποικίες ανά οπτικό πεδίο (Μέσος όρος απ' όλη την επιφάνεια)	Τίτλος στελέχους
1 έως 2	≥ 10 ³ CFU/ml
2 έως 5	≥ 10 ⁴ CFU/ml
5 έως 15	≥ 10 ⁵ CFU/ml
15 και άνω	≥ 10 ⁶ CFU/ml

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Μικρόβιο	NCTC	Χρώμα ζωμού
<i>Mycoplasma hominis</i> 10 ⁴ CCU/ml	10111	Κόκκινο ελαφρός θολερό. Αναπτύσσεται σε 24 – 36 ώρες.
<i>Ureaplasma urealyticum</i> 10 ⁴ CCU/ml	10177	Κόκκινο Αναπτύσσεται σε 24 ώρες.



ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Όπως αναφέραμε και πιο πάνω το M. U-A περιλαμβάνει τρία αντιβιοτικά και ένα αντιμυκητιασικό για την αναστολή κυρίως των βακτηρίων που διασπούν την ουρία ή την αργινίνη. Όμως εάν η αριθμός τους είναι >10⁶ CCU/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 καλά μπορεί να δώσει λανθασμένο αποτέλεσμα.. Γι' αυτό ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν υποδηλώνει πάντα την απουσία λοίμωξης.
- Εάν το M. U-A Broth δεν έχει συντηρηθεί σωστά ή έχει λήξει, δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

MYCOPLASMA U-A BROTH (M. U-A) - GR/CA01/GRM5/O/82 **CE**

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Σωληνάκια 2ml	080096	10 τεμάχια	- 20 °C	5 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 01 04 01. 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 27° Μυκοπλάσματα. Σελ. 722-740.

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

Bebear C., De Barbeyrac B., Bernet C., Renaudin H., (1989) Ann. Biol. Clin., 47, 415 – 420.

Bebear C. (1988) Pathologie Biologie, 36, 496-499

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.