

MYCOTEST™

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

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

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 (MYC. U-A Broth) και διάγνωση με θρεπτικά υλικά εμπλουτισμένα με τα απαραίτητα συστατικά.

Τα *Mh* και *Uu* σε ορισμένες κατηγορίες υγιών ανδρών και γυναικών συμβιώνει 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' ἑξιν αποβολές, θνησιγενή προωρότητα, χοριασμίτιδα, γέννηση νεογνών με χαμηλό βάρος.

ΝΕΟΓΝΙΚΗ – ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ: 1) Βακτηριαμία. 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 μυκοπλάσμάτων.

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ

Αρθρίτιδα (σηπτική σε άτομα με υπογασσφαίριναίμια, SARA), περιτονίτιδα, επίδραση στο ουροποιητικό σύστημα (ουρολοίμωξη, πυελονεφρίτιδα, σχηματισμός λίθων).

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
MYCOPLASMA BROTH	20
PHENOL RED	75mg
L-CYSTINE	120mg
HORSE SERUM	200ml
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

1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ

Το Mycotest διατηρείται στους –18 έως –20 °C για 5 μήνες από την ημέρα παραγωγής.

Εάν ξεπαγώσετε κάποια σωληνάκια μπορείτε να τα συντηρήσετε στους 2 – 8 °C για 45 ημέρες.

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 πλύνουμε 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 *Mh* και *Uu* 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 $\geq 10^4$ 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 ζυμούς με υψηλή ανασταλτικότητα έναντι βακτηρίων και μυκήτων που θα μπορούσαν κατά την ανάπτυξή τους να μας δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

4. 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 °C και 15 μέρες στους –20 °C.

Κολπικό – τραχηλικό δείγμα

Με τη χρήση κολποδιαστολέα και με ένα βαμβακοφόρο στειλέο αφαιρούμε τη βλέννη από τον έξω κόλπο. Με δεύτερο στειλέο 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 συλλέγεται το δείγμα με περιστροφή του στειλέου στον ουρηθρικό βλεννογόνο. Το δείγμα πρέπει να συλλέγεται μετά από δύο έως τρεις ώρες από την τελευταία ενούρηση.

Σπέρμα – Πύον σαλπγγίτιδας – Γαστρικό έκκρημα

Συλλέγουμε το σπέρμα και το πύον σαλπγγίτιδας μέσα σε αποστειρωμένο ουροσουλέκτη

Το γαστρικό έκκρημα συλλέγεται από τον καθετήρα του νεογνού μέσα σε αποστειρωμένο σωληνάριο.

Γίνεται αραιώση 1:10 σε ζωμό μυκοπλάσματος (MYC. U-A Broth). Προσοχή ποτέ μην ρίξετε το σπέρμα χωρίς αραιώση στο MycoTest διότι το αλκαλικό του pH αλλάζει το χρώμα του υλικού από κίτρινο σε ροζ.

Ούρα

Συλλέγουμε τα πρώτα πρωινά ούρα σε αποστειρωμένο ουροσουλέκτη. 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.

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ MYCOTEST

A. ΜΕΘΟΔΟΣ: 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 στειλέο 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 °C για 24 – 48 ώρες σε αερόβιες συνθήκες.

B. ΜΕΘΟΔΟΣ: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ: ΚΟΛΠΙΚΟ, ΟΥΡΗΘΡΙΚΟ, ΣΠΕΡΜΑ, ΟΥΡΑ κτλ.

Για να δουλέψουμε τη B. 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 στειλέο εμβαπτίζουμε με περιστροφές και στη συνέχεια πετάμε το στειλέο.
- 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 ουροσουλέκτη. Γίνεται φυγοκέντρηση 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 °C) μέχρι να ολοκληρωθεί η εξέταση.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ A. 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 >10³ CCU/ml.
- Μικρή αλλαγή του χρώματος μετά από 24 ώρες υποδηλώνει ασθενώς θετικό δείγμα με αριθμό συγκέντρωσης ≤10³ 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 10³ CFU/ml)

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ B. 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 ($\geq 10^4$ CCU/ml).

- Μικρή αλλαγή του χρώματος σε ροζ, υποδηλώνει μικρότερο αριθμό συγκέντρωσης ($\leq 10^3$ 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

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

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



U. urealyticum (+)

8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Όπως αναφέραμε και πιο πάνω το Mycotest περιλαμβάνει τέσσερα αντιβιοτικά και ένα αντιμυκητιασικό, 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.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

MYCOTEST™ - GR/CA01/GRM5/O/82 CE

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Σωληνάκια 2Χ1,2ml	100081	10 τεμάχια	- 18 /- 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^ο Μυκοπλάσματα. Σελ. 722-740.
Λοιμώξεις από μυκοπλάσματα. Νεότερα Δεδομένα.: Ημερίδα Ιασώ (5^{ος} 2005). Π.Ι. Βασιλοπούλος (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 bacteriologie clinique vol.3, 2 edition. Elsevier, Paris.