MYCOPLASMA AGAR – A7

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το MYCOPLASMA AGAR A7 χρησιμοποιείται για την εργαστηριακή διάγνωση των ουρογεννητικών μυκοπλασμάτων *M. hominis (Mh), U. urealyticum (Uu) και M. Fermentans (Mf)*. Αυτό επιτυγχάνεται με την εκλεκτική καλλιέργεια, την μικροσκοπική ταυτοποίηση και την αριθμητική εκτίμηση.

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 (MYCOPLASMA U-A BROTH 2ml Cat no 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).

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
Mycoplasma agar base	42g
Horse Serum	200ml
Yeast extract	5g
MnSO4	0,1g
Polyenrichment supplement	10ml
L-Cysteine	0,1g
Penicillig - G	600.000 U
Amphotericin - B	6 mg
Polymyxin - B	50 mg

Εμφάνιση: Μπεζ σκούρο διαυγές
Τελικό pH 6,4 ± 0.1.

ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ

Mycoplasma Agar Base (PPLO Agar): BD
Horse Serum: E&O Laboratories
Yeast extract: Lab M

ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ

Το A7 άγαρ φυλάσσεται στους 6 – 8 ºC και διατηρείται για δύο μήνες. Προσοχή θερμοκρασία κάτω των 2 ºC αλλοιώνει τη σύνθεση του υλικού.

2. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Ο χειρισμός των δειγμάτων με το A7 άγαρ να γίνεται πάντα με γάντια και μέσα σε Laminar flow Class II, για να αποφεύγονται επιμολύνσεις κυρίως από σαπροφυτικούς μύκητες.
- Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα πλένουμε αμέσως με άφθονο νερό και σαπούνι.
- Εάν το τρυβλίο είναι ραγισμένο ή το σακουλάκι τρύπιο, μην το χρησιμοποιήσετε.
- Το πάχος του άγαρ πρέπει να είναι 4 - 5 mm και το υλικό διαυγές.
- Μετά την ημερομηνία λήξεως το A7 άγαρ είναι ακατάλληλο για χρήση.
- Το A7 άγαρ είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό αντιδραστήριο και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου.
- Τα θετικά δείγματα πρέπει να καταστρέφονται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής που προβλέπονται για τη διαχείριση μολυσματικών δειγμάτων.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το A7 Agar χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια, απομόνωση, ταυτοποίηση και αριθμητική εκτίμηση των Μυκοπλασμάτων *M. hominis,U. urealyticum και M. fermentans..*
Το A7 Agar συνδυάζει μια πολλή πλούσια σε θρεπτικά συστατικά βάση και υψηλή ανασταλτικότητα στα ανεπιθύμητα βακτήρια και μύκητες.

Η πλήρης ανάπτυξη των μυκοπλασμάτων επιτυγχάνεται σε 48 ώρες εκτός από περιπτώσεις εξασθενισμένων στελεχών που χρειάζονται και τρίτο εικοσιτετράωρο.

Το A7 Agar μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με το Mycotest, για μια ολοκληρωμένη διάγνωση η οποία θα μας οδηγήσει στο επόμενο βήμα που είναι ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (Mycotest ST).

Οι πεπτόνες, ο ορός αλόγου, το εκχύλισμα μαγιάς, η ουρία και τα θρεπτικά εμπλουτιστικά, παρέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για τον πολλαπλασιασμό των *M h, Mf* και *U u*.
Το pH του υλικού παραμένει πάντα στο 6,4 που είναι ιδανικό για τον πολλαπλασιασμό των μυκοπλασμάτων.
Το MnSO4 οξειδώνεται κατά την ανάπτυξη του *Uu* με αποτέλεσμα οι αποικίες του να αποκτούν ένα καφέ - μαύρο χρώμα.
Ένα μίγμα δύο αντιβιοτικών και ενός αντιμυκητισιακού αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσοτέρων βακτηρίων και των στελεχών *Candida.*
Έτσι επιτυγχάνουμε την απομόνωση των *Mh, Uu* &*.Mf.*
Η ταυτοποίηση επιτυγχάνεται με τον έλεγχο του τρυβλίου στο μικροσκόπιο (x10 μεγέθυνση) όπου τα μυκοπλάσματα έχουν χαρακτηριστικές διαφορές. *Mh* αποικίες σαν αυγό μάτι. *Mf* αποικίες σαν αυγό μάτι με φυσαλιδώδη περιφέρεια. *Uu* αποικίες καφέ – μαύρες σαν αχινός ή σαν κουβάρι.

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, Cat no 080096) μέσα σε 24 ώρες και να συντηρείται με παγοκύστες σε χαμηλή θερμοκρασία. Εάν η λήψη γίνει στο εργαστήριο, κάντε τον εμβολιασμό στο M. U-A όσο το δυνατόν συντομότερα. Το εμβολιασμένο δείγμα μπορεί να διατηρηθεί σταθερό για 8 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, για 24 ώρες στους 2 – 8 ºC και για 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.
Ρίχνουμε 200μl στο σωληνάριο M. U-A.
<u>Ούρα</u>
Συλλέγουμε τα πρώτα πρωινά ούρα σε αποστειρωμένο ουροσυλέκτη**.** Γίνεται φυγοκέντρηση 15ml ούρων στις 2000 rpm για 5 λεπτά. Ρίχνουμε 200μl από το ίζημα στο σωληνάριο M. U-A.

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟ A7 AGAR

Για την καλλιέργεια εκτός του A7 άγαρ θα χρειαστούμε το M. U-A (Cat no 080096).

- Τοποθετούμε το A7 AGAR στον επωαστικό κλίβανο μισή ώρα περίπου, για να στεγνώσει η επιφάνεια του.
- Σε ένα σωληνάριο M. U-A εμβολιάζουμε το δείγμα. Εάν το δείγμα είναι από στειλεό εμβαπτίζουμε στο υλικό με ήπιες περιστροφικές κινήσεις. Εάν το δείγμα είναι υγρό ρίχνουμε 200μl και αναδεύουμε το τελικό εναιώρημα.
- Από το εμβολιασμένο M. U-A ρίχνουμε 10 - 20μl στην επιφάνεια του A7 AGAR.
- Επιστρώνουμε τη σταγόνα σε όλη την επιφάνεια του άγαρ με οριζόντιες περιστροφικές κινήσεις του τρυβλίου.
- Βιδώνουμε το πώμα του M. U-A και τυλίγουμε με παραφίλμ το A7 AGAR.
- Επωάζουμε στους 36 - 37 °C σε αερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες για 24 – 72 ώρες.

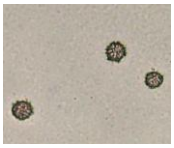
7. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

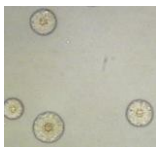
- Ελέγξτε τα τρυβλία μετά από 36 – 48 ώρες επώασης, παρατηρώντας την επιφάνεια του άγαρ στο μικροσκόπιο (x10 αντικειμενικός).
- *Mycoplasma hominis*: Αποικίες διαμέτρου 100-200μm. Στρογγυλές, με κοκκώδη επιφάνεια και σκούρα κεντρική θηλή (σαν αυγό μάτι).
- *Ureaplasma urealyticum*: Αποικίες πολύ μικρές διαμέτρου15 – 25 μm. Συμπαγείς με σκούρο καφέ χρώμα (σαν αχινός).
- *Mycoplasma fermentans:* Αποικίες στρογγυλές με φυσαλιδώδη επιφάνεια και σκούρα κεντρική θηλή (σαν αυγό μάτι). Έχουν διάμετρο 100 – 400μm. Αναπτύσσεται σε 4 – 5 μέρες.
- Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται με την μέτρηση των αποικιών πάνω στο τρυβλίο, ανά οπτικό πεδίο (x10 αντικειμενικός) και εκφράζεται σε CFU (Colony Forming Units).
- Στο M. U-A εάν έχει αναπτυχθεί *Mh* ή *Uu,* το χρώμα του υλικού γίνεται κόκκινο. Το *Mh* προκαλεί μικρή θολερότητα στο υλικό. Το *M. fermentans* διασπά την αργινίνη πολύ αργά και αλλάζει το χρώμα στο υλικό από πορτοκαλί σε κόκκινο μετά από 6 έως 8 μέρες
-

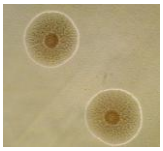
Αποικίες ανά οπτικό πεδίο (Μέσος όρος απ' όλη την επιφάνεια)	**Τίτλος στελέχους**
1 έως 2	≥ 10^3 CFU/ml
2 έως 5	≥ 10^4 CFU/ml
5 έως 15	≥ 10^5 CFU/ml
15 και άνω	≥ 10^6 CFU/ml

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Μικρόβιο	NCTC	Χαρακτηριστικά αποικιών
Mycoplasma hominis	*10111*	Αποικίες στρογγυλές με κοκκώδη επιφάνεια και σκούρα κεντρική θηλή (σαν αυγό μάτι). Έχουν διάμετρο 100 – 200μm. Αναπτύσσεται σε 24 – 48 ώρες.
Ureaplasma urealyticum	*10177*	Αποικίες συμπαγείς με σκούρο καφέ χρώμα (σαν αχινός ή σαν κουβάρι). Έχουν διάμετρο 50 – 100μm. Αναπτύσσεται σε 24 – 48 ώρες.
Mycoplasma fermentans	*10117*	Αποικίες στρογγυλές με φυσαλιδώδη επιφάνεια και σκούρα κεντρική θηλή (σαν αυγό μάτι). Έχουν διάμετρο 100 – 400μm. Αναπτύσσεται σε 4 – 5 μέρες.


U. urealyticum


M. hominis


M. fermentans

8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Υπάρχει πιθανότητα, να μην παρατηρούνται αποικίες μυκοπλάσματων στο A7 Agar, ενώ έχουμε θετικό αποτέλεσμα στο M. U-A. Αυτό συμβαίνει σε περιπτώσεις όπως:

- Κακή μεταφορά και συντήρηση του δείγματος.
- Δείγματα ασθενών πού κάνουν αντιμικροβιακή θεραπεία.
- Δείγμα μολυσμένο με οριακό αριθμό μυκοπλασμάτων.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

MYCOPLASMA AGAR A7 - GR/CA01/GRM5/O/74 CE

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Τρυβλίο 6cm	050080	10 τεμάχια	6 – 12 °C	2 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.

Mackie McCartney, Medical Microbiology, Thirteenth edition. New York, 1984.

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.