Mycotest ST

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το Mycotest ST χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ευαισθησίας των *M. Hominis (Mh)* και *U. urealyticum (Uu)* σε τέσσερα αντιβιοτικά (LINCOMYCIN, ROXITHROMYCIN, DOXYCYCLINE, OFLOXACIN).
Με την παράλληλη χρήση του Mycotest και του Mycotest Agar μας δίνεται η δυνατότητα ταυτοποίησης και αριθμητικής εκτίμησης. Τα τρία προϊόντα ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα ενιαίο κιτ για την πλήρη διάγνωση των *Mh* και *Uu*.

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) 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 BROTH	20
PHENOL RED	75mg
L-CYSTINE	120mg
HORSE SERUM	200ml
POLYENRICHMENT SUPLEMENT	10ml
L-ARGININE	10
UREA	5
FRESH YEAST EXTRACT (15%)	50ml
PENICILLINE -G	100.000U
AMPHOTERICIN-B	0.5mg
Lincomycin	4mg
Roxithromycin	4mg
Doxycycline	8mg
Ofloxacin	4mg

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

ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ

Mycoplasma Broth: BD
Horse Serum: E&O (Scotland)
Yeast extract: Lab M

ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ

Το Mycotest ST φυλάσσεται στους –18 έως –20 ºC μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο κουτί, για κάθε θερμοκρασία ξεχωριστά. Εάν ξεπαγώσετε το κιτ και δεν το χρησιμοποιήσετε, διατηρήστε το στους 2 – 6 ºC μέχρι το μισό της ημερομηνίας λήξεως που αναγράφεται στη βάση του.

2. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Το Mycotest ST 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 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 ST να γίνεται μέσα σε Laminar air flow Class II.
- Μετά την ημερομηνία λήξεως το Mycotest ST 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 ST είναι ένα κιτ τεσσάρων σωληναρίων με υγρό υλικό έτοιμο προς χρήση.

Το Σωληνάριο με την ένδειξη **LI** χρησιμοποιείται για τη δοκιμή ευαισθησίας των *Mh* & *Uu* στη Lincomycin με συγκέντρωση 4μg/ml.
Το Σωληνάριο με την ένδειξη **RO** χρησιμοποιείται για τη δοκιμή ευαισθησίας των *Mh* & *Uu* στη Roxithromycin με συγκέντρωση 4μg/ml.
Το Σωληνάριο με την ένδειξη **DO** χρησιμοποιείται για τη δοκιμή ευαισθησίας των *Mh* & *Uu* στην Doxycycline με συγκέντρωση 8μg/ml.
Το Σωληνάριο με την ένδειξη **OF** χρησιμοποιείται για τη δοκιμή ευαισθησίας των *Mh* & *Uu* στην Ofloxacin με συγκέντρωση 4μg/ml.
Η ευαισθησία προσδιορίζεται από την αλλαγή η μη, του χρώματος του υλικού από κίτρινο σε κόκκινο.
Τα μυκοπλάσματα (*Mh* & *Uu)* που παρουσιάζουν ευαισθησία σε κάποια αντιβιοτικά δεν αναπτύσσονται και δεν αλλάζει το χρώμα του υλικού.
Τα ανθεκτικά μυκοπλάσματα (*Mh* & *Uu)* που παρουσιάζουν αντοχή σε κάποια αντιβιοτικά αναπτύσσονται και διασπούν την αργινίνη ή την ουρία αντίστοιχα, το pH του υλικού γίνεται αλκαλικό και το χρώμα του αλλάζει από κίτρινο σε κόκκινο.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑ ΛΙΤΡΟ (Απιονισμένου νερού)
Mycotest ST
Mycoplasma broth base 700ml. Horse Serum 200ml. Yeast extract 100ml. Nutrient supplement 10ml. Arginine 10ml. Urea 2,5ml. Phenol Red 0,05g. Antibiotic mixture 10ml Lincomycin 4mg. Roxithromycin 4mg. Doxycycline 8mg. Ofloxacin 4mg.
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) 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 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες στους 2 – 8 ^{o}C και για δέκα μέρες στους –15 έως –20 ^{o}C .

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 (MYC. 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.
<u>Ούρα</u>
Συλλέγουμε τα πρώτα πρωινά ούρα σε αποστειρωμένο ουροσυλέκτη.

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ Mycotest ST
Για να είναι δυνατή η χρήση του Mycotest ST χρειαζόμαστε τα εξής:
α) MYCOPLASMA U-A BROTH (Cat no 080096).
β) MYCOTEST (Cat no 100081).
γ) MYCOTEST AGAR (Cat no 100331).

ΜΕΔΟΔΟΣ Α: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

- 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 ή πέντε σταγόνες με αποστειρωμένη πιπέτα και αναδεύουμε το τελικό εναιώρημα.
- Ενώνουμε ένα MYCOTEST με ένα MYCOTEST AGAR. Ρίχνουμε 100μl σε κάθε σωληνάριο του MYCOTEST και μία σταγόνα **10μl** στο MYCOTEST AGAR απλώνοντάς τη σε όλη την επιφάνεια του άγαρ με περιστροφικές κινήσεις.
- Φυλάμε το M. U-A στην κατάψυξη (–15 έως –20 ºC) μέχρι να ολοκληρωθεί η εξέταση.
- Επωάζουμε στους 36 – 37 ºC για 48 ώρες σε αερόβιες συνθήκες.
- Ελέγχουμε το κιτ στο δεύτερο 24ώρο. Εάν έχει αναπτυχθεί *Mh* ή *Uu* ή και τα δύο μαζί το χρώμα του υλικού στο MYCOTEST γίνεται κόκκινο. Στη συνέχεια ελέγχουμε το MYCOTEST AGAR στο μικροσκόπιο (x10 μεγέθυνση) για να υπολογίσουμε τον ακριβή αριθμό των αποικιών, αλλά και να κάνουμε μια δεύτερη ταυτοποίηση (*Mh* αποικίες σαν αυγό μάτι, *Uu* αποικίες καφέ – μαύρες σαν κουβάρι). Συνήθως όταν το MYCOTEST βγαίνει θετικό στο πρώτο 24ωρο, το MYCOTEST AGAR έχει 2 – 5 αποικίες ανά οπτικό πεδίο δηλαδή παθολογική συγκέντρωση (≥ 10^4 CFU/ml).
- Με θετικό MYCOTEST και 2 – 5 αποικίες (≥ 10^4 CFU/ml) στο MYCOTEST AGAR συνεχίζουμε με αντιβιόγραμμα.
- Όταν στο πρώτο 24ωρο το χρώμα στο υλικό του MYCOTEST έχει αλλάξει λίγο (ανοιχτό ροζ), στο MYCOTEST AGAR (δεύτερο 24ώρο) θα μετρήσουμε 1 – 2 αποικίες δηλαδή συγκέντρωση ≥ 10^3 CFU/ml (Colony Forming Units). Σ' αυτή την περίπτωση αποφασίζουμε για αντιβιόγραμμα ανάλογα με το δείγμα. Όταν το δείγμα είναι κολπικό – τραχηλικό από σεξουαλικά ενεργές γυναίκες ειδικά σε περίοδο εγκυμοσύνης, χαρακτηρίζεται σαν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας και δεν κάνουμε αντιβιόγραμμα, προτείνοντας παράλληλα να γίνει

παρακολούθηση του ασθενούς. Τα υπόλοιπα δείγματα αξιολογούνται και συνεχίζουμε με αντιβιόγραμμα παρατείνοντας παράλληλα την επώαση για άλλο ένα εικοσιτετράωρο.

- Όταν μετά από τρία 24ωρα δεν έχουμε αλλαγή στο χρώμα του υλικού ούτε αποικίες στην επιφάνεια του άγαρ, το δείγμα είναι αρνητικό.

ΜΕΘΟΔΟΣ Β. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ LINCOMYCIN (LI) – ROXITHRIMYCIN (RO) – DOXYCYCLINE (DO) – OFLOXACIN (OF).

- Φέρουμε το κιτ σε θερμοκρασία δωματίου. Ανοίγουμε τα δύο πώματα και τα ακουμπάμε ανεστραμμένα σε καθαρό μέρος.
- Από το εμβολιασμένο σωληνάριο M. U-A που είχαμε φυλάξει, ρίχνουμε από 100μl σε κάθε σωληνάριο του Mycotest ST.
- Κλείνουμε τα σωληνάρια του Mycotest ST και επωάζουμε στους 36 – 37 ºC για 24 – 48 ώρες σε αερόβιες συνθήκες.
- Στα δείγματα με συγκέντρωση ≥ 10^4 CFU/ml επωάζουμε για 24 ώρες. Ενώ στα ασθενώς θετικά δείγματα (≥ 10^3 CFU/ml) επωάζουμε για 48 ώρες.
- ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΑΡΙΘΜΟ ΑΠΟΙΚΙΩΝ 10 ΚΑΙ ΑΝΩ (≥ 10^5 CFU/ml) ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΟΥΜΕ ΤΙΣ ΑΝΑΛΟΓΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΩΣΤΕ ΝΑ ΕΧΟΥΜΕ ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ≥10^4 CCU/ml.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ Β. ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ευαισθησία των *Mh* και *Uu* είναι ανάλογη με τον αριθμό τους ανά ml εναιωρήματος (CCU / ml)

Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στα σωληνάρια ανταποκρίνονται στον έλεγχο ευαισθησίας μυκοπλασμάτων με αριθμό ≥10^4 CCU/ml (2 – 5 αποικίες ανά οπτικό πεδίο). Για μεγαλύτερο αριθμό μυκοπλασμάτων πρέπει να γίνεται η ανάλογή αραίωση διαφορετικά θα παρατηρήσουμε ψευδός θετικές αντοχές στα αντιβιοτικά. Η παρουσία του MYCOTEST AGAR στο κιτ, μας βοηθάει να υπολογίσουμε με ακρίβεια τον αριθμό των μυκοπλασμάτων.

Σε 24 ώρες επώασης το Mycotest ST με συγκέντρωση ≥10^4 CCU/ml μας δίνει το εξής αποτέλεσμα:

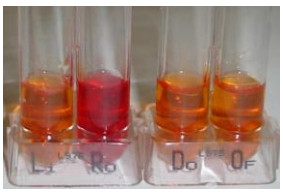
- Το *Ureaplasma urealyticum (Uu)* παρουσιάζει αντοχή στη **LI** 4μg/ml. Με την ανάπτυξη του το υλικό στο σωληνάριο γίνεται κόκκινο. Στα αντιβιοτικά **RO** 4μg/ml, **DO** 8μg/ml και **OF** 4μg/ml παρουσιάζει ευαισθησία και δεν αναπτύσσεται. Το χρώμα του υλικού στα σωληνάρια αυτά παραμένει κίτρινο.
- Το *Mycoplasma hominis (Mh)* παρουσιάζει αντοχή στη **RO** 4μg/ml. Με την ανάπτυξη του το υλικό στο σωληνάριο γίνεται κόκκινο. Στα αντιβιοτικά **LI** 4μg/ml, **DO** 8μg/ml και **OF** 4μg/ml είναι ευαίσθητο και δεν αναπτύσσεται. Το χρώμα του υλικού στα σωληνάρια παραμένει κίτρινο.

Σε συγκεντρώσεις ≥ 10^3 CFU/ml, η αλλαγή του χρώματος στα σωληνάρια που παρουσιάζουν αντοχή τα μυκοπλάσματα μπορεί να μην είναι έντονη. Σ' αυτή την περίπτωση παρατείνουμε την επώαση για 24 ώρες. Εάν η αλλαγή του χρώματος παραμείνει ίδια, δίνουμε κανονική αντοχή λαμβάνοντας υπόψη τον αρχικό μικρό αριθμό των μυκοπλασμάτων

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (Δεν αναπτύσσονται. Κίτρινο υλικό)	**ΑΝΤΟΧΗ** (Αναπτύσσονται. Κόκκινο υλικό)
U. urealyticum	Roxithromycin Doxycycline Ofloxacin	Lincomycim
M. hominis	Lincomycin Doxycycline Ofloxacin	Roxithromycin

U. urealyticum (+)



M. hominis(+)

8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Πιθανή ασυμφωνία μεταξύ κιτ ταυτοποίησης (θετικό αποτέλεσμα) και κιτ αντιβιογράματος (μη αναμενόμενα αποτελέσματα) συνήθως οφείλεται σε εξασθενισμένα μυκοπλάσματα τα οποία δεν επέζησαν μέχρι την ημέρα του αντιβιογράμματος.
- Εάν το δείγμα δεν έχει συντηρηθεί σωστά μπορεί να δώσει λανθασμένο αποτέλεσμα.. Γι' αυτό ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν υποδηλώνει πάντα την απουσία λοίμωξης.
- Mycotest ST που δεν έχουν συντηρηθεί σωστά ή έχουν λήξει δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

MYCOTEST ST - GR/CA01/GRM5/O/82 CE

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Σωληνάρια 4X1,2ml	100332	10 τεμάχια	–18 έως –20 ºC	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

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.