



MYCOPLASMA TEST®

Test na bázi dehydratovaného kultivačního média pro kvalitativní stanovení, orientační výpočet a testování citlivosti na antibiotika u UU (*Ureaplasma urealyticum*) a MH (*Mycoplasma hominis*) v lidském urogenitálním traktu.

Ref: 5014

1. Úvod

Mykoplasma je jedním z hlavních patogenů, který způsobuje NGU (nongonococcal urethritis), cervikální, pánevní záněty, orchitidu, epididymitidu atd. a může vést až k neplodnosti mužů a žen¹. Tyto patogeny mohou napadat a ničit urogenitální epiteliální buňky, způsobit zánět během AIDS a jiných sexuálně přenosných onemocnění. Mykoplasma působí i klinická sexuálně přenosná onemocnění (zejména UU a MH). Jejich výskyt má vzestupný trend. Antibiotická rezistence je stále větší problém kvůli zneužívání antibiotik, která významně ohrožují zdraví lidstva². Klíčem k léčbě a prevenci šíření mykoplasmy je včasná a přesná diagnóza. Kultivace mykoplasmy je v současnosti stále považována za spolehlivou diagnostickou metodu.

2. Princip testu

Mycoplasma kit je založen na kultivaci a biochemických reakcích. Kultivační médium je připraveno smícháním lyofilizovaného prášku a rozpouštědla. Po kultivaci mykoplasmy, v případě UU může být urea rozložena ureázou a uvolní se NH_3^{3-} ; u MH dojde k rozložení argininu pomocí arginázy a uvolní se NH_3 . NH_3 zvedne pH v tekutém médiu, výsledky jsou posouzeny podle barevné změny indikátoru. Strip obsahuje 11 antibiotik, každé ve dvou koncentracích, pokud je mykoplasma na antibiotika citlivá, enzymatická aktivita je inhibována, takže nedochází k žádným změnám barvy.

3. Obsah soupravy

1) Strip

20 stripů, každý obsahuje:

- 1 jamku C+ (pozitivní kontrola) s navázaným argininem, ureou a Mycoplasma růstovým aktivátorem.
- 28 jamek, kde:
 UU jamka je potažena lincomycinem
 MH jamka erythrocinem
 UU $\geq 10^4$ jamka je potažena linkomycinem a inhibičním činidlem
 MH $\geq 10^4$ jamka je potažena erythrocinem a inhibičním činidlem
 ve zbylých 25 jamkách je navázáno 11 antibiotik ve dvou koncentracích, kromě PRI (viz tabulka):

zkratka	specifikace	nízká koncentrace (horní jamka) mg/L	vysoká koncentrace (dolní jamka) mg/L
PRI	pristinamycin	2	/
MIN	minocyclin	2	8
JOS	josamycin	2	8
ERY (AZI)	erythromycin (azithromycin)*	8	16
ROX	roxithromycin	1	4
CLI	clindamycin	0,25	0,5
OFL	ofloxacin	1	4
CIP	ciprofloxacin	1	2
CLA	clarithromycin	1	4
TET ^{UU} (DOX)	tetracycline (doxycykline)*	1	2
LEV ^{UU}	levofloxacin	2	4
TET ^{MH} (DOX)	tetracycline (doxycykline)*	4	8
LEV ^{MH}	levofloxacin	1	2

Návod k soupravě: Mycoplasma test®

* mikroorganismy citlivé na tetracyklin jsou také citlivé na doxycyklin (DOX).
mikroorganismy citlivé na erythromycin jsou také citlivé na azithromycin (AZI)

- 1 pipetovací špička

2) Lyofilizovaný prášek

20 lahvíček, každá obsahuje 1,2 ml hovězího bujónu a infuze z hovězího srdce

3) Rozpouštědlo

20 lahvíček, každá obsahuje 4 ml roztoku na rozpuštění lyofilizovaného prášku. Kultivační médium, poté co je smícháno rozpouštědlo s lyofilizovaným práškem, je v souladu s následovným vzorcem:

- Na každých 1000 ml purifikované vody připadá 7,27 g hovězího bujónu, 2,51 g extraktu z droždí, 6,55 g infuze z hovězího srdce, 1,45 g urey, 1,45 g arginin hydrochloridu, 7,9 g směsi soli, 182 ml koňského séra, 0,03 g fenolové červeně, 9,2 ml směsi růstových faktorů a 9,2 ml směsi antibiotik. pH je $6,3 \pm 0,3$.

4) Minerální olej

1 lahvíčka obsahující 28 ml tekutého parafinu.

5) Návod k použití

6) 20 formulářů na výsledky

4. **Potřebný materiál, který není součástí kitu**

- 1) Vatový nebo polyesterový sterilní tampón, STUART tampón nebo UTM tampón na odběr vzorku.
- 2) Bakteriologický inkubátor (36 °C, 37 °C, 38 °C).
- 3) UTM médium (univerzální transportní médium) může být použito na transport vzorku.

5. **Bezpečnostní opatření**

- 1) Pouze pro profesionální použití
- 2) Postupujte pečlivě podle návodu k použití. Spolehlivost výsledků testu nemusí být zaručena, pokud nebudete postupovat přesně podle návodu.
- 3) Podívejte se na bezpečnostní listy a na označení přípravků, abyste věděli o možném chemickém riziku, které může být přítomno v tomto testu.
- 4) Při práci se vzorky a reagensy používejte rukavice. Po provedení testu si umyjte ruce.
- 5) Test neprovádějte v nevhodných podmínkách, např. v okolním vzduchu obsažená silná kyselina, silná zásada nebo těkavý plyn apod.
- 6) Růst mykoplasmy v bujónu by neměl tvořit zákal. V tomto testu byla použita unikátní metoda k účinné inhibici růstu nežádoucích bakterií. Pokud se kultivační médium někdy zakalí a zčervená, neznačí to pozitivní výsledek.
- 7) Jestliže se po přidání média s přídatkem vzorků do všech jamek na citlivost evidentně změní barva ve všech jamkách stripu, tzn. výrazně ztmavne nebo se změní na světle červenou, může to být neobjektivní vzhledem k zásaditosti vzorků od pacientů s patologickými stavy. V tomto případě je doporučeno znovu otestovat sekreční vzorky od těchto pacientů.
- 8) Považujte vzorky, lahvíčky s reagensy a stripy na testování jako potenciálně infekční materiál a zacházejte s nimi v souladu se správnou laboratorní praxí.
- 9) Nepoužívejte reagensy po uplynutí expirace
- 10) Nemíchejte nebo nepoužívejte komponenty z kitů s odlišnou šarží.
- 11) Nepoužívejte lahvíčky se zakaleným obsahem.
- 12) Nepoužívejte poškozené stripy: deformované jamky, otevřený sáček s vysoušedlem, při nepodařeném roztržení hliníkového obalu.
- 13) Uvedené údaje týkající se výkonnosti testu byly získány pomocí postupu uvedeného v tomto příbalovém letáku. Jakákoliv změna nebo úprava postupu může ovlivnit výsledek.
- 14) Vzhledem k tomu, že mykoplasmy mají vysokou afinitu k membráně buněk sliznice, je důležité

Návod k soupravě: Mycoplasma test®

důkladně oškrábat sliznici tak, aby se podařilo shromáždit co nejvíce buněk.

- 15) Vzorky odebírejte před zavedením jakékoliv antibiotické léčby.
- 16) Musí být použita standardizovaná metoda k zabránění kontaminace jinými mikroorganismy.
- 17) Vzorek nelze považovat za negativní před 24 hod. inkubací.
- 18) Je-li nízký titr vzorku, nemusí dojít ke změně barvy v jamkách stripu nebo může být barevná změna v rozporu.
- 19) Výpočet z testů provedených na proužku může posloužit jako vodítko o titru. Přesný titr může být určen na agaru.
- 20) Antibiotika jsou testována na vzorku. Při nízkých titrech, se může skutečná citlivost kmene lišit od výsledku na stripu.
- 21) Výsledek, který je záporný na nejnižší koncentraci antibiotika, a pozitivní na nejvyšší koncentraci je nesmyslný. V tomto případě proveďte test znovu.

6. Skladování

- 1) Uchovávejte všechny komponenty v rozmezí 2 – 8 °C.
- 2) Nicméně kit lze přepravovat a skladovat při teplotě v rozmezí -10 až 37 °C během 7 dnů, aniž by došlo ke změně životnosti a kvality výrobku.
- 3) Zpracujte strip do 8 hodin od jeho rozbalení
- 4) Po smíchání rozpouštědla s lyofilizovaným práškem použijte kultivační médium do 72 hodin.
- 5) Inokulované médium zpracujte během 8 hodin při 18 – 28 °C nebo do 48 hodin při 2 – 8 °C.
- 6) Minerální olej po otevření může být použit do vyznačeného data expirace.

7. Vzorek

- 1) Muži: vzorky odebírat ze středního proudu moči (objem = 500 µl) pomocí jednorázové odběrovky nebo ze sekretu močové trubice (konkrétně sekretu prostaty nebo semene, objem = 50 µl) pomocí sterilního tampónu.
- 2) Ženy: vzorky odebírat z cervikální nebo vaginální sekrece pomocí sterilního tampónu.
- 3) Jestliže je použito UTM médium, do kultivačního média je potřeba objem 400 µl z UTM média.

8. Stabilita vzorku

- 1) Je-li vzorek určen k inokulaci do kultivačního média, inokulujte do 4 hodin. Ve zvláštních případech lze uchovávat vzorky při teplotě 2 - 8 °C a inokulovat do 24 hodin.
- 2) Je-li vzorek inokulován do ředícího roztoku (inokulovaný ředící roztok může být použit jako transportní médium), uchovávejte ho během 24 hodin při pokojové teplotě (18 - 25 °C), při delším skladování, by měl být uložen při teplotě 2 - 8 °C max. 48 hodin.
- 3) Je-li vzorek inokulován do kultivačního média, uchovávejte ho během 4 hodin při pokojové teplotě (18 - 25 °C), při delším skladování, by měl být uložen při teplotě 2 – 8 °C max. do 24 hodin.
- 4) Jestliže je vzorek odebrán a transportován pomocí tampónu v UTM (Univerzální transportní médium), skladujte UTM s tampónem při pokojové teplotě (18 – 25 °C) do 24 hodin nebo při teplotě 2 - 8 °C do 48 hodin.

9. Pracovní postup

Před použitím nechte reagentie vytemperovat na teplotu místnosti (18 – 25 °C).

Zregulujte inkubátor na 37 °C.

1. Přidejte rozpouštědlo kompletně k lyofilizovanému prášku. Protřepejte na vortexu, aby došlo k úplnému rozpuštění.
2. Inokulujte vzorek (400 µl vzorku z UTM výtěrovky u žen, tampón u žen, 500 µl moče nebo 50 µl sekretů uretry u mužů) do připraveného kultivačního média. Zavíčkujte a třepáním zcela rozmíchejte.
3. Přidejte 100 µl naočkovaného média do všech jamek na stripu. Jemně protřepte, aby došlo k rozpuštění navázaných materiálů.
4. Přidejte 1 kapku minerálního oleje do všech jamek.
5. Strip zakryjte a inkubujte při 36 – 38 °C 24 hodin.

10. Výsledky měření

Na jeden test použijte jeden výsledkový formulář.

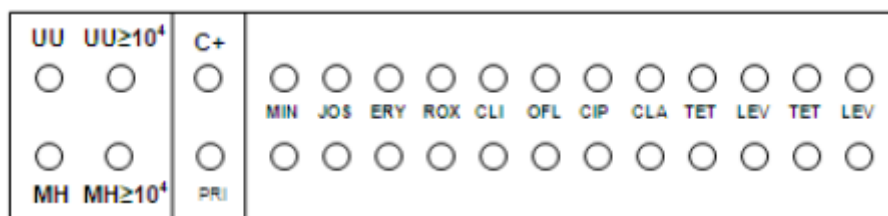
Odečtěte změny barvy na stripu.

C+ jamka: Barva se změnila na červenou – značí růst mykoplasmat; vzorek je pozitivní. Pokud nedojde ke změně barvy, vzorek je negativní.

Další jamky: Pokud se barva mění z oranžové na červenou nebo broskvovou, značí to růst mykoplasmy. Pokud se barva nezmění, mohl by být vzorek považován za negativní nebo citlivý na antibiotika. Zřídka se medium po 24 hod. kultivace zbarví světle červeně (nedojde k evidentní změně barvy). V tomto případě se doporučuje prodloužit dobu kultivace o dalších 12 - 24 hodin. (Vzhledem k tomu, že pacient může být infikován mykoplasmou nedávno nebo je v období rekonvalescence nebo prodělává antibiotickou léčbu, je možné že existuje jen velmi malé množství mykoplasmy ve vzorku nebo je mykoplasma inhibována antibiotiky. Z těchto důvodů není změna barvy výrazná.)

Poznámky: Patologická prahová hodnota obvykle uváděná pro *U.urealyticum* nebo *M. hominis* je $\geq 10^4$ CCU (Jednotky změny barvy)/ml pro uretrální nebo endocervikální vzorek, $<10^4$ CCU/ml pro vzorek z proudu moče nebo spermatu.

Příklady výsledků:



Bez Mycoplasma infekce	Infekce <i>Ureaplasma urealyticum</i> PRI - citlivý (C) MIN – středně rezistentní (S)
Infekce <i>Ureaplasma urealyticum</i> je větší, než 10^4 CCU/ml. PRI - citlivý (C) MIN – rezistentní (R)	Infekce <i>Mycoplasma hominis</i> je větší, než 10^4 CCU/ml. PRI - rezistentní (R) MIN – citlivý (C)

<p>Infekce <i>Mycoplasma hominis</i> a <i>Ureaplasma urealyticum</i></p> <p>PRI - citlivý (C) MIN – citlivý (C)</p>	<p>Infekce <i>Mycoplasma hominis</i> a <i>Ureaplasma urealyticum</i> je větší, než 10^4 CCU/ml.</p> <p>PRI - rezistentní (R) MIN – citlivý (C)</p>
	<p>Citlivý (C): pravděpodobnost terapeutického úspěchu je přijatelná. V případě léčby obvyklou dávkou můžeme očekávat terapeutický efekt.</p> <p>Středně rezistentní (S): terapeutický úspěch je nepředvídatelný.</p> <p>Rezistentní (R): silná pravděpodobnost selhání léčby. Nemůžeme očekávat, že při léčbě bude terapeutický efekt.</p>
<p>Neplatný</p>	

11. Kontrolní postup

Doporučenou kontrolou tohoto testu je nákup jednotlivých referenčních kmenů (UU (ATCC ® 27813) a MH (ATCC ® 15488)). Kulturu ATCC ® 27813 v kultivačním médiu inkubujte, dokud kultivační médium nezmění barvu na světle červenou a pak udělejte subkulturou v jiné lahvičce kultivačního média a inkubujte, dokud kultivační médium nezmění barvu na světle červenou. Provedte 1000násobné ředění tohoto kultivačního média se sterilním fyziologickým roztokem a poté přidejte 100 µl do nové lahvičky kultivačního média. Touto konečnou kulturou očkujte strip. Výsledek je platný, pokud barva C +, UU, $UU \geq 10^4$, CLI (nízká a vysoká koncentrace), OFL (nízká koncentrace) a CIP (nízká a vysoká koncentrace) jamek se změní z oranžové na červenou nebo broskvovou. Test ATCC ® 15488 se provede podle stejného postupu jako výše. Výsledek je platný, pokud barva C +, MH, $MH \geq 10^4$, ERY (nízká i vysoká koncentrace), AZI (nízká a vysoká koncentrace), THI (nízká koncentrace), CLA (nízká a vysoká koncentrace) a ROX (nízká a vysoká koncentrace) jamek se změní z oranžové na červenou nebo broskvovou.

Každá laboratoř si stanoví vlastní plánování kontrol.

12. Limitace testu

1. Tento test je určen jako pomocný prostředek pro klinickou diagnózu. Provedte tento test ve spojení s klinickým vyšetřením, anamnézou pacienta a jinými výsledky testů.
2. Velmi malý počet alkalických vzorků může způsobit přímé zčervenání kultivačního média, protože tento test je založen na kultivaci a biochemické reakci a výsledné zvýšení pH vede ke změně barvy kultivačního média.
3. Protože klinické zneužívání antibiotik vede ke vzniku malého počtu rezistentních kmenů, může být získán velmi malý počet falešně pozitivních výsledků navzdory přijetí různých antibiotik v bujónu k potlačení irelevantních bakterií. Proto doporučujeme, pokud je to možné, potvrzení pozitivních vzorků na Mycoplasma agaru.

13. Výkonnost a charakteristiky testu

1. Výkonnost a kmeny

Kultivační médium: 12 čistých kmenů mykoplasmat naočkovaných ve 2 ředěních, stejně jako 3 směsné kultury UU a MH ve dvou ředěních bylo pozitivních bez ohledu na ředění. Dále bylo odebráno a inokulováno 100 µl vzorku - 19 interferentních kmenů z urogenitálních vzorků

Návod k soupravě: Mycoplasma test[®]

v 0,5 McFarlandu. Výsledky byly negativní.

Strip: 3 čisté kmeny mykoplasmat naočkovaných ve 2 ředěních, stejně jako 6 směsných kultur UU a MH ve dvou ředěních bylo na stripu správně identifikováno.

12 čistých kmenů mykoplasmat bylo kultivováno v kultivačním médiu, dokud se barva nezměnila na světle červenou a poté byly naředěny na 10^4 CCU/ml a testovány. Odpovídající jamky UU $\geq 10^4$ nebo MH $\geq 10^4$ zčervenaly.

3 čisté kmeny UU ve 2 ředěních bylo 6x testováno.

Změna barvy na červenou nastala:

CLI jamky (nízká i vysoká koncentrace) 6x

CIP jamka (nízká koncentrace) 3x

CIP jamky (nízká i vysoká koncentrace) 3x

TET^{UU} jamka (nízká i vysoká koncentrace) 4x

OFL jamka (nízká koncentrace) 3x

OFL jamky (nízká i vysoká koncentrace) 1x

MIN jamka (nízká koncentrace) 1x

MIN jamky (nízká i vysoká koncentrace) 3x

Barva jamek PRI, ERY, ROX, JOS, CLA, LEV^{UU} (nízká i vysoká koncentrace) zůstala oranžová během 6-ti testů.

3 čisté kmeny MH ve dvou ředěních byly 6x testovány.

Barva jamek ERY, CLA a ROX (nízká i vysoká koncentrace) se změnila na červenou;

OFL jamky (nízká i vysoká koncentrace) zčervenaly 4x

LEV^{MH} jamky (nízká i vysoká koncentrace) 4x

CIP jamka (nízká koncentrace) 1x

CIP jamky (nízká i vysoká koncentrace) 3x

Barva jamek MIN, PRI, JOS, CLI a TET^{MH} zůstala oranžová během všech šesti testů.

2. Korelace správného měření

Byla provedena studie, kdy byly vzorky testovány pomocí tohoto testu a dvou jiných certifikovaných testů (CE). Pokud dva ze tří testů daly pozitivní výsledek, byl vzorek brán jako pozitivní. V jiném případě byl považován za negativní. To bylo bráno jako amplifikovaný zlatý standard. Srovnání tohoto testu a amplifikovaného zlatého standardu je uvedeno níže.

		amplifikovaný zlatý standard		celkem
		pozitivní	negativní	
Mycoplasma test	pozitivní	48	2	50
	negativní	0	89	89
	celkem	48	91	139

χ^2 metoda, $P > 0,05$, mezi těmito dvěma metodami nebyl zřejmý rozdíl

14. Literatura

1. Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, et al. Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. Hum. Reprod. 1998;13(10):2756-2761
2. Rylander M, Hallander HO. In vitro comparison of the activity of doxycycline, tetracycline, erythromycin and a new macrolide, CP 62993, against Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum. Scand J Infect Dis Suppl. 1988;53:12-17.
3. Murray P. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2007.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) . 2011 Methods For Antimicrobial Susceptibility Testing For Human Mycoplasmas; Approved Guideline.CLSI Document M43-A.Vol. 31-N§19.

15. Kontakty

Výrobce:

ALL.DIAG

10, rue Ettore Bugatti – BP6

67038 Strasbourg Cedex 2

tel: 03 88 78 80 88, fax: 03 88 78 76 78

www.alldiag.com; info@alldiag.com

Distributor:

LABOSERV s.r.o.










Hudcova 78 b, 612 00 Brno

Tel: +420 541 243 113

Fax: +420 541 243 114

email: laboserv@laboserv.cz

<http://www.laboserv.cz>

Použité symboly					
	Pozor, čtěte návod		Testy v soupravě		Výrobce
	Použití pouze <i>in vitro</i>		Datum expirace		Pouze na 1 použití
	8°C Skladujte mezi 2 - 8 °C		Číslo šarže		Katalogové číslo