

**ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ**

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

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

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 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 γονοκοκκική). 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) 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 υπογαμασφαιριναιμία, SARA), περιτονίτιδα, επίδραση στο ουροποιητικό σύστημα (ουρολοίμωξη, πυελονεφρίτιδα, σχηματισμός λίθων).

**ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Το A7 Agar χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια, απομόνωση, ταυτοποίηση και αριθμητική εκτίμηση των *Μυκοπλάσμάτων 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 μυκοπλάσμάτων επιτυγχάνεται σε 48 ώρες εκτός από περιπτώσεις εξασθενημένων 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 πεπτιδολυτικές, ο ορός αλόγου, το εκχύλισμα μαγιάς, η ουρία και τα θρεπτικά εμπλουτιστικά, παρέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για τον πολλαπλασιασμό των *Mh, Mf* και *Uu*.

Το pH του υλικού παραμένει πάντα στο 6,4 που είναι ιδανικό για τον πολλαπλασιασμό των *Μυκοπλάσμάτων*.

Το MnSO<sub>4</sub> οξειδώνεται κατά την ανάπτυξη του *Uu* με αποτέλεσμα οι αποικίες του να αποκτούν ένα καφέ - μαύρο χρώμα.

Ένα μίγμα δύο αντιβιοτικών και ενός αντιμυκητιασικού αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων 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 αχνός ή σαν κουβάρι.

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
Mycoplasma agar base	42g
Horse Serum	200ml
Yeast extract	5g
MnSO <sub>4</sub>	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 στους 25 °C.

## ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Το A7 άγαρ είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό αντιδραστήριο και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου. Το υλικό αυτό περιέχει πεπτόνες και εκχυλίσματα ζωικής προέλευσης. Τα πιστοποιητικά για την προέλευση και την υγιεινομική κατάσταση των ζώων δεν εγγυούνται πλήρως την απουσία μεταδιδόμενων παθογόνων παραγόντων. Γι' αυτό συνιστάται αυτά τα υλικά να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά και με τήρηση των συνήθων μέτρων ασφαλείας (να μη λαμβάνονται από την πεπτική ή την αναπνευστική οδό).

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.

Τα θετικά δείγματα πρέπει να καταστρέφονται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής που προβλέπονται για τη διαχείριση μολυσματικών δειγμάτων.

## ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ

Τα τρυβλία πρέπει να φυλάσσονται στους 2 – 8 °C μέσα στη συσκευασία τους μέχρι τη στιγμή της χρήσης τους.

Παρατεταμένη φύλαξη σε θερμοκρασία κάτω των 2 °C δημιουργεί αρκετή υγρασία μέσα στο υλικό με κίνδυνο επιμόλυνσης. Η κατάψυξη ακόμα και στιγμιαία, καταστρέφει το υλικό. Επίσης αποφεύγεται την υπερβολική θέρμανση.

Τα τρυβλία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Εάν ανοίξετε την αεροστεγή συσκευασία του τρυβλίου κατά λάθος, μπορείτε να το φυλάξετε στο ψυγείο για 5 – 7 μέρες αφού το σφραγίσετε με παραφίλμ ή με σακουλάκι.

Για την μεταφορά οι μελέτες σταθερότητας μας έδειξαν ότι τα τρυβλία μπορούν να παραμείνουν στους 18 - 25 °C για 4 ημέρες ή στους 25 - 40 °C για 48 ώρες, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του προϊόντος.

## ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

### 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 °C και για 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 ενδοτραχήλο. 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 σαλπινγίτιδας – Γαστρικό έκκριμα

Συλλέγουμε το σπέρμα και το πύον σαλπινγίτιδας μέσα σε αποστειρωμένο ουροσυλέκτη.

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

Ρίχνουμε 200μl στο σωληνάριο M. U-A.

### Ούρα

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.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ 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 στειλέο 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.
- Επώαζουμε στους 36 - 37 °C σε αερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες για 24 – 72 ώρες.

## ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

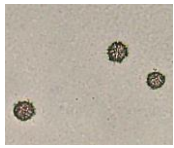
- Ελέγξτε τα τρυβλία μετά από 36 – 48 ώρες επώασης, παρατηρώντας την επιφάνεια του άγαρ στο μικροσκόπιο (x10 αντικειμενικός).
- *Mycoplasma hominis*: Αποικίες διαμέτρου 100-200μm. Στρογγυλές, με κοκκώδη επιφάνεια και σκούρα κεντρική θηλή (σαν αυγό μάτι).
- *Ureaplasma urealyticum*: Αποικίες πολύ μικρές διαμέτρου 15 – 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

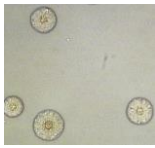
Αποικίες ανά οπτικό πεδίο (Μέσος όρος απ' όλη την επιφάνεια)	Τίτλος στελέχους CFU: Colony Forming Units
1 αποικία	< 10 <sup>3</sup> CFU/ml
2 έως 5 αποικίες	10 <sup>4</sup> CFU/ml
7 έως 10 αποικίες	10 <sup>5</sup> CFU/ml
12 έως 20 αποικίες	10 <sup>6</sup> CFU/ml
>20 αποικίες	>10 <sup>6</sup> CFU/ml

#### ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

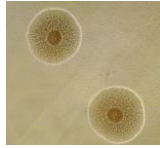
Μικρόβιο	Χαρακτηριστικά αποικιών
<i>Mycoplasma hominis</i> NCTC 10111	Αποικίες στρογγυλές με κοκκώδη επιφάνεια και σκούρα κεντρική θηλή (σαν αυγό μάτι). Έχουν διάμετρο 100 – 200μm. Αναπτύσσεται σε 24 – 48 ώρες.
<i>Ureaplasma urealyticum</i> NCTC10177	Αποικίες συμπαγείς με σκούρο καφέ χρώμα (σαν αχινός ή σαν κουβάρι). Έχουν διάμετρο 50 – 100μm. Αναπτύσσεται σε 36 – 48 ώρες.
<i>Mycoplasma fermentans</i> NCTC 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*

#### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το *Ureaplasma parvum* παρουσιάζει τα ίδια χαρακτηριστικά με το *Ureaplasma urealyticum* κατά την ανάπτυξη του στο άγαρ.

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

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

#### ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Τα υλικά που δεν παρουσιάζουν καμία ανάπτυξη μπορεί να θεωρηθούν ως μη επικίνδυνα απόβλητα και να απορρίπτονται ανάλογα.

Τα υλικά που παρουσιάζουν ανάπτυξη αποικιών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις οδηγίες για μολυσματικά ή δυνητικούς μολυσματικά απόβλητα.

Το εργαστήριο είναι υπεύθυνο για τη σωστή διαχείριση των μολυσματικών αποβλήτων σύμφωνα με τη φύση και το βαθμό επικινδυνότητάς τους και πρέπει να τα διαχειρίζεται και να τα απορρίπτει (ή να αναθέτει τη διαχείριση και απόρριψή τους) σύμφωνα με τους εκάστοτε ισχύοντες κανονισμούς.

#### ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

MYCOPLASMA AGAR A7 - CE

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Τρυβλίο 6cm	050080	10 τεμάχια	2 – 8 °C	2,5 μήνες

Παράγεται στην Ελλάδα από την εταιρεία Bioprepare σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/746.

ΒΑΣΙΚΟ UDI-DI: 5212037714020207WU. EDMA: (14 02 02 07) Mycoplasma / Ureaplasma - (incl. combined ID-AST).

Η εταιρεία Bioprepare έχει πιστοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα: EN ISO 9001:2015 / ΕΛΟΤ EN ISO 13485:2016 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 Ασένη: Κλινική Μικροβιολογία. Κεφάλαιο 27° Μυκοπλάσματα. Σελ. 722-740

Mackie Mcartney, 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 bacteriologie clinique vol.3, 2 edition. Elsevier, Paris.

#### ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ IN VITRO



Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ & ΣΙΑ Ε.Ε.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Ποταμού 5 ΒΙΟ ΠΑ ΚΕΡΑΤΕΑΣ - ΑΤΤΙΚΗ ΤΚ 19001

Τ.Θ. 4893 - Τηλ.: 2299 0 66113 Φαξ: 2299 0 66112.

E-mail: [bioprep1@otenet.gr](mailto:bioprep1@otenet.gr) [www.bioprepare.gr](http://www.bioprepare.gr)