

# A7 AGAR

## Cultuur, telling en identificatie van urogenitale mycoplasma's 8 testen (REF 00090).

CP 0257-DU-2019-09

Alleen voor diagnostisch gebruik *in vitro*, alleen voor professioneel gebruik.

Tests voor eenmalig gebruik.



### 1 - DOEL

A7 agar maakt de teelt, de indicatieve telling en de morfologische identificatie mogelijk van *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) en van *Mycoplasma hominis* (M.h.) uit endocervicale, urethrale, urinaire monsters, spermamonsters en monsters van maagvloeistoffen en andere monsters waarin urogenitale mycoplasma's kunnen worden aangetroffen.

### 2 - BELANG

Urogenitale mycoplasma's, *U. urealyticum* en *M. hominis*, hebben een erkende pathogene kracht (3). Zij kunnen in de commensale toestand aanwezig zijn op het niveau van het lagere genitale gebied. Een kwantitatieve beoordeling is daarom nuttig. *U. urealyticum* is verantwoordelijk voor mannelijke genitale infecties. *M. hominis* vermeerdert zich tijdens vaginose en kan zich uitstrekken tot het bovenste genitale gebied. Urogenitale mycoplasma veroorzaakt ook extragenitale infecties.

### 3 - PRINCIPE

Mycoplasma's zijn relatief kwetsbare organismen die zich alleen vermenigvuldigen in aanwezigheid van tal van groeifactoren. Het zijn anaërobe facultatieve organismen en ze zijn veeleisend in steroïden. Zij gebruiken als energiebron het metabolisme van suikers of arginine (*Mycoplasma hominis*) of ureum (*Ureaplasma urealyticum*). A7-agar is een gemodificeerd Shepard-middel (4). Het bevat serum, peptonen, gistextract en een vitaminedoosje. Het is suikervrij en bevat als energiebron ureum en arginine. Het wordt selectief gemaakt door toevoeging van antibiotica en antivirale middelen om de ontwikkeling van Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën en gisten te remmen. De aanwezigheid van mangaansulfaat geeft kolonies van *Ureaplasma urealyticum* een zwarte kleur bij aanwezigheid van ureum (4). Op agarmedia zijn mycoplasma kolonies klein en moeten ze worden opgespoord onder een optische microscoop. Voor het onderzoek naar mycoplasma moeten vloeibare en vaste middelen worden gebruikt (3). A7-agar kan gecombineerd worden met MYCOSCREEN- of MYCOFAST-vloeistofmethoden.

### 4 - REAGENTIA

**Verpakking:** 8 agars

**Beschrijving**

**A7 AGAR:** 55 mm agar klaar voor gebruik en afzonderlijk verpakt in een cellofaan zakje.

### Samenstelling van de agar

Mycoplasma-bouillon (25 g/L), gistextract (9,4 g/L), veulenserum (15%), ureum (1,15 g/L), arginine (0,4 g/L), calciumchloride (0,3 g/L), mangaansulfaat (0,1 g/L), vitaminedoosje, mengsel van antibiotica en antifungalen en agar (14 g/L).

### 5 - VOORZORGEN BIJ GEBRUIK

De agars in deze kit zijn alleen bedoeld voor gebruik *in vitro* en moeten worden gehanteerd door geautoriseerde personen. De testen zijn voor eenmalig gebruik.

- Geïnoculeerde monsters en agars zijn potentieel besmettelijk en moeten worden gehanteerd
- met de gebruikelijke voorzorgsmaatregelen en met inachtneming van de in het land van gebruik geldende hygiënevoorschriften voor dit type product.
- De agars bevatten grondstoffen van dierlijke oorsprong en moeten voorzichtig worden gehanteerd.
- Gebruik geen agars uit deze kit na de vervaldatum en gebruik geen verontreinigde of verkeerd opgeslagen agars.

### 6 - VERZAMELING EN TRANSPORT VAN DE MONSTERS

#### 6.1 Verzameling van monsters

**Endocervicale / vaginale monsters:** gebruik alleen een Dacron® of rayon wattenstaafje of cytoborst (bij gebruik van een 2 mL of 3 mL UMMT), of gebruik de swab voorzien van zijn vriendelijke of universele transportmedia voor virussen, chlamydiae, mycoplasma en ureaplasma (bij gebruik van een UMMT AMIES 2,6 mL).

Voer het uitstrijkje uit na een zorgvuldige verwijdering van afscheidingen van de ectocervix met een eerste wattenstaafje. Aangezien mycoplasma's een sterke affiniteit hebben met de slijmvliezen waaraan ze zich hechten, is het essentieel om het slijmvlies goed te schrapen om een goede opbrengst te verkrijgen (1).

**Urethrale monsters:** reinig de meatus en neem een uitstrijkje af of schraap de cellen.

**Sperma, urine, andere vloeistoffen:** verzamel het sperma of de eerste urinestroom of een ander vloeibaar monster in een steriele flacon.

#### 6.2 Transport van monsters

##### UMMT 2 of 3 ml

Inoculeer een flacon UMMT-medium met het wattenstaafje of breng, indien een vloeibaar monster wordt gebruikt, 200 µL of 300 µL van het vloeibare monster over in 2 ml of 3 ml UMMT. Eenmaal geïnoculeerd kan de UMMT-omgeving gedurende 20 uur bij kamertemperatuur (18-25 °C) of gedurende 56 uur bij 2-8 °C worden geconserveerd. Voor een conservering gedurende 3 dagen bij -20 °C dient u vooraf 2 druppels "MYCOPLASMA Stabilizer" toe te voegen.

**AMIES Medium of universeel medium voor virussen, chlamydiae, mycoplasma en ureaplasma**

Raadpleeg de gebruiksaanwijzing van de fabrikant

##### AMIES Medium UMMT

Maak 300 µL van het transportmedium AMIES of universeel medium voor virussen, chlamydiae, mycoplasma en ureaplasma uit in een flacon met medium UMMT AMIES

Eenmaal geïnoculeerd, het UMMT AMIES-medium (2,6 mL) kan worden bewaard bij kamertemperatuur (18-25 °C) gedurende 20 uur, of bij 2-8 °C gedurende 56 uur.

Voor opslag gedurende 3 dagen bij -20 °C, 2 druppels "MYCOPLASMA Stabilisator" vooraf toevoegen.

### 7 - BEREIDING EN CONSERVERING VAN REAGENTIA

De agars zijn klaar voor gebruik; als ze worden bewaard in de originele verpakking zijn ze stabiel tot de vervaldatum aangegeven op het zakje.

Stel agar niet bloot aan grote temperatuurschommelingen.

### 8 - BENODIGD, MAAR NIET MEEGELEVERD MATERIAAL

- Bemonsteringsapparatuur (Dacron-wattenstaafje, cytoborst, AMIES-transportmedium of universeel medium voor virussen, chlamydiae, mycoplasma en ureumplasma, steriele fles voor het verzamelen van vloeistofmonsters), pipetten
- MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064)
- UMMT-media (REF 00835; 00061; 00083) voor swab- of transportstalen Vriend of universeel medium voor virussen, chlamydia, mycoplasma en ureaplasma
- Broedstof gekalibreerd op 35-37 °C, Apparaat voor anaërobie, Optische microscoop (lens x10), Container voor verontreinigd afval

### 9 - WERKWIJZE

#### 9.1 Inoculatie

**- Monsters van het uitstrijkje:** ent een flesje UMMT-medium in met het staafje en meng goed. Plaats 3 druppels, elk van ongeveer 30 µL (of een enkele overdracht van 100 µL) van het geplateerde UMMT-medium direct in het midden van een agarplaat.

**- Swab-monsters geassocieerd met hun AMIES-transportmedium of universeel transportmedium voor virussen, chlamydia, mycoplasma en ureaplasma:** het transportflesje homogeniseren en 300 µL overbrengen naar een UMMT AMIES-medium. Plaats 3 druppels, elk van ongeveer 30 µL (of een enkele overdracht van 100 µL) geënt en gehomogeniseerd UMMT AMIES-medium direct in het midden van een agarplaat.

**- Vloeistofmonsters:** meng het monster en plaats 3 druppels, elk van ongeveer 30 µL (of een enkele overdracht van 100 µL) rechtstreeks in het midden van een agarplaat. Als het monster moet worden getransporteerd, ent een flacon van 2 ml UMMT-medium met 200 µL van het vloeibare monster, of een flacon van 3 ml UMMT met 300 µL vloeistof (§6.2).

#### 9.2 Incubatie van de agar

Laat agar ongeveer 30 minuten drogen op kamertemperatuur. Incubeer agar bij 35-37 °C gedurende 48 uur anaëroob.

### 10 - AFLEZING EN INTERPRETATIE

De kolonies moeten onder een microscoop (lens x10) worden onderzocht, met het doosje omgedraaid.

#### 10.1 Morfologische identificatie

**Ureaplasma urealyticum:** aanwezigheid van zwartbruin bezinsel ("in zee-egels" van variabele grootte). De kolonies zijn klein.

**Mycoplasma hominis:** uiterlijk van een "ei op het bord". De kolonies zijn groter dan de kolonies van *U. urealyticum*.

#### 10.2 Telling

Voer de telling uit op het doosje omgedraaid naar de microscoopplens x10, en volgens het gemiddelde aantal kolonies in 10 microscopische velden:

- Minder dan 1 kolonie/veld: <10<sup>3</sup> UFC/ml
  - 1 tot 5 kolonies/veld: ongeveer 10<sup>4</sup> UFC/ml
  - 5 tot 10 kolonies/veld: ongeveer 10<sup>5</sup> UFC/ml
  - 10 tot 20 kolonies/veld: ongeveer 10<sup>6</sup> UFC/ml
  - > 20 kolonies/veld: > 10<sup>6</sup> UFC/ml
- UFC (kolonievormende eenheden)

### 11 - KWALITEITSCONTROLE

De kwaliteit kan worden gecontroleerd met behulp van een gelyofiliseerde collectorstam (*Ureaplasma urealyticum* ATCC 27618) die gekalibreerd is op 10<sup>4</sup> UFC/ml. Inoculeer een A7 agar en ga te werk zoals beschreven in deze bijsluiters (§9 en §10). Verwacht resultaat: 1 tot 5 kolonies in de vorm van een zee-egel (*U. urealyticum*).

### 12 - OORZAKEN VAN FOUTEN

- Bemonstering met swabs of ongeschikte transportmedia.
- Monsterneming met niet aanbevolen swab tests.
- Rechtstreekse inoculatie vanaf de swab test.
- Aërobe incubatie.
- Niet gerespecteerde incubatietemperatuur.
- 

### 13 - BEPERKINGEN VAN DE METHODE

- Monsterneming lichtjes beladen met mycoplasma's (<10<sup>3</sup> UFC/ml)
- Vaste A7-agarmethode te combineren met een vloeibare methode.
- Zoals bij elke kiemonderzoeksmethode hangt de kwaliteit van het monster af van het resultaat van de test. Een negatieve test wijst dus niet noodzakelijk op een afwezigheid van infectie.

### 14 - PRESTATIES

De prestaties van de teelt in IM A7 agar werden geëvalueerd aan de hand van de vloeibare MYCOFAST-methode (2). Het onderzoek werd uitgevoerd in een ziekenhuiscentrum op 544 klinische monsters (266 spermamonsters, 155 endocervicale monsters, 82 placenta's, 19 urethrale monsters en 22 diverse monsters). Voor 475 monsters (88%), waarvan 140 positieve en 335 negatieve, waren de resultaten consistent. De discrepanties betroffen 69 monsters, waarvan er 8 alleen positief waren met A7 agar (1,5%), 48 alleen positief met MYCOFAST (8,8%) en 13 besmet (2,4%). Sommige stammen van mycoplasma's van besmette monsters werden ontdekt met A7 agar.

### 15 - AFVALVERWIJDERING

Afval dient te worden afgevoerd in overeenstemming met de in het land van gebruik voor dit type reagentia geldende hygiënevoorschriften en wetgeving.

### 16 - BIBLIOGRAFIE

1. BOUCAUD-MAITRE Y. en THOINET S. 1993. Analyse des prélèvements en bactériologie médicale - 2<sup>ème</sup> partie: prélèvements génitaux. Feuil. Biol., **34**: 21-24.
2. BRES P., J.P. CASALTA, M. DRANCOURT, G. PAPIEROK, D. RAULT. 1991. Comparison of mycofast test kit and conventional culture methods for the isolation of Genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* species A.S.M. 91th General Meeting - Poster: G-14.
3. PEREYRE S., BEBEAR M.C. et BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Tijdschrift Française des Laboratoires, aanvulling op N°329: 34-36.
4. SHEPARD, M.C. and LUNCEFORD C.D. 1976. Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. J. Clin. Microbiol. **3**: 613-625.

De wijzigingen ten opzichte van de vorige versie zijn grijs gemarkeerd.

**ELITech MICROBIO**

Parc d'activités du Plateau

allée d'Athènes

83870 SIGNES

FRANCE

☎: 33 (0)4 94 88 55 00

Fax: 33 (0)4 94 32 82 61

http://www.elitechgroup.com

