

A7 AGAR

Cultura, enumeração e identificação de micoplasmas urogenitais

8 testes (REF 00090)

CP 0257-PT-2019-09

Apenas para diagnóstico *in vitro*, apenas para uso profissional.
Os testes são apenas para uso único.



I - FINALIDADE

A gelose A7 permite efectuar a cultura, a contagem indicativa e a identificação morfológica de *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) / *Ureaplasma parvum* e de *Mycoplasma hominis* (M.h.) a partir de amostras endocervicais, uretrais, urinárias, espermas, líquidos gástricos e outros tipos de amostras susceptíveis de revelarem micoplasmas urogenitais.

2 - INTERESSE

Os micoplasmas urogenitais, *U. urealyticum* e *M. hominis*, apresentam um poder patogénico reconhecido (3). Podem encontrar-se em estado comensal, ao nível das vias genitais baixas. Uma avaliação quantitativa torna-se, por isso, útil. *U. urealyticum* é responsável pela infecção genital masculina. *M. hominis* prolifera na vaginose e pode estender-se às vias genitais altas. Os micoplasmas urogenitais são igualmente responsáveis por infecções extra-genitais.

3 - PRINCÍPIO

Os micoplasmas são organismos relativamente frágeis que se multiplicam apenas em presença de numerosos factores de crescimento. Anaeróbios facultativos, são exigentes em esteróis. Como fonte de energia, utilizam o metabolismo dos açúcares ou da arginina (*Mycoplasma hominis*) ou da ureia (*Ureaplasma urealyticum*).

A gelose A7 é um meio de Shepard modificado (4). Contém soro, peptonas, extracto de levedura e uma mistura vitamínica. É desprovido de açúcar e contém ureia e arginina como fontes de energia. Torna-se selectivo por adição de antibióticos e de antifúngicos, para inibir o desenvolvimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas e leveduras. A presença de sulfato de manganês confere às colónias de *Ureaplasma urealyticum* uma coloração preta em presença de ureia (4). Em meio de gelose, as colónias de micoplasmas são pequenas e devem ser detectadas ao microscópio óptico.

Para a detecção de micoplasmas é conveniente utilizar meios líquidos e meios sólidos (3). A gelose A7 pode estar associada aos métodos líquidos MYCOSCREEN ou MYCOFAST.

4 - REAGENTES

Acondicionamento: 8 Geloses

Descrição

A7 AGAR: Gelose de 55 mm pronta a utilizar e embalada individualmente em bolsa de celofane.

Composição da gelose

Meio de micoplasmas (25 g/L), extracto de leveduras (9.4 g/L), soro de potro (15%), ureia (1.15 g/L), arginina (0.4 g/L), cloreto de cálcio (0.3 g/L), sulfato de manganês (0.1 g/L), suplemento vitamínico, mistura de antibióticos e antifúngico e agar (14 g/L).

5 - PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- As geloses deste dispositivo são exclusivamente destinadas a utilização *in vitro* e devem ser manipuladas por técnicos devidamente habilitados para o efeito
- As amostras e as geloses inoculadas são potencialmente infecciosas, pelo que devem ser manipuladas com as precauções habituais, respeitando as regras de higiene e a regulamentação em vigor para este tipo de produto, no país onde ele é utilizado.
- As geloses contêm matérias primas de origem animal e devem ser manipuladas com as precauções habituais.
- Não utilizar as geloses deste dispositivo após o vencimento do prazo de validade, ou se estas se apresentarem contaminadas ou em mau estado de conservação.

6 - RECOLHA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

6.1 Recolha das amostras

- **Amostras Endocervicais / Vaginais:** Use somente Dacron® ou swab ou cytobrush (se estiver usando um UMMt de 2 mL ou 3 mL), ou use o swab fornecido com seu meio de transporte amigável ou universal para vírus, clamídia, micoplasma e ureaplasma (se usar um UMMt AMIES 2.6ml).

Efectuar a colheita após cuidadosa eliminação das secreções do exocolo com um primeiro escovilhão. Dado que os micoplasmas apresentam forte afinidade para as células das mucosas às quais aderem, é essencial raspar bem a mucosa para obter uma boa quantidade (1).

Colheitas uretrais: Limpar o meato e recolher as células por esfregaço ou raspagem.

Esperma, urina, outros líquidos: Recolher o esperma ou o primeiro jacto de urina ou outra amostra líquida, num frasco esterilizado.

6.2 Transporte das amostras

UMMt 2 ou 3 mL

Inocule um frasco de meio UMMt com a amostra de zaragatoa ou, se estiver usando uma amostra líquida, transfira 200 µL ou 300 µL da amostra líquida em 2 mL ou 3 mL de UMMt. Uma vez inoculado, o meio UMMt pode ser conservado à temperatura ambiente (18-25 °C) durante 20 horas ou, a 2-8 °C, durante 56 horas. Para conservação de 3 dias a -20 °C adicionar previamente 2 gotas de « MYCOPLASMA stabilizer »

AMIES médios ou meio universal para vírus, clamídia, micoplasma e ureaplasma

Consulte as instruções de operação do fabricante

UMMt AMIES médios

Descarregar 300 µL do meio de transporte AMIES ou meio universal para vírus, clamídia, micoplasma e ureaplasma semeados em um frasco de meio AMIES

Uma vez inoculado, o meio UMMt AMIES (2,6 mL)

pode ser armazenado à temperatura ambiente (18-25 °C) por 20 horas, ou a 2-8 °C por 56 horas.

Para armazenamento por 3 dias a -20 °C, adicione 2 gotas de "MYCOPLASMA Stabilizer" antecipadamente.

7 - PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES

As geloses são fornecidas prontas a utilizar; quando conservadas na embalagem de origem mantêm-se estáveis até ao termo do prazo de validade indicado na bolsa.

Não submeter a gelose a fortes alterações de temperatura.

8 - MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Equipamento de amostragem (cotonet Dacron, cytobrush, meio de transporte AMIES ou meio universal para vírus, clamídia, micoplasma e ureaplasma, frasco estéril para a coleta de amostras líquidas), pipetas
- MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064)
- UMMt médios (REF 00835; 00061; 00083) para amostras de swab ou transporte AMIES ou meio universal para vírus, clamídia, micoplasma e ureaplasma
- Estufa calibrada a 35-37 °C, Dispositivo para anaerobiose, Microscópio óptico (objectiva x10), Recipiente para resíduos contaminados

9 - PROCEDIMENTO

9.1 Inoculação

- **Recolha em escovilhão:** Descarregar o escovilhão em meio UMMt. No centro da gelose, depositar 3 gotas de aproximadamente 30 µL (ou um depósito de 100 µL) de meio inoculado e homogeneizado.

- Amostra de esfregaço associada ao seu meio de transporte AMIES ou meio universal para vírus, clamídia, micoplasma e ureaplasma: Homogeneize o frasco de transporte e transfira 300 µL para um meio UMMt AMIES. No centro do ágar, coloque 3 gotas de aproximadamente 30 µL (ou um depósito de 100 µL) do meio UMMT AMIES inoculado e homogeneizado.

- **Liquid samples:** Amostra líquida: Homogeneizar a amostra e depositar directamente no centro da gelose 3 gotas de aproximadamente 30 µL (ou um depósito de 100 µL). Para transporte de amostras, inocule um meio UMMt 2 mL com 200 µL de líquido ou UMMt 3 mL com 300 µL de líquido (§6.2)

9.2 Incubação da gelose

Deixar secar a gelose cerca de 30 minutos à temperatura ambiente.

Incubar a gelose a 35-37 °C durante 48 horas em anaerobiose.

10 - LEITURA E INTERPRETAÇÃO

As colónias devem ser detectadas ao microscópio (objectiva x10), placa invertida.

10.1 Identificação morfológica

Ureaplasma urealyticum: Aspecto de precipitados castanho escuros ("em ouriço" de tamanho variável). As colónias são de tamanho reduzido.

Mycoplasma hominis: Aspecto "em ovo estrelado". As colónias são maiores do que as de *U. urealyticum*.

10.2 Contagem

Efectuar a contagem em placa invertida ao microscópio, objectiva x10, de acordo com a média de número de colónias em 10 campos microscópicos: Menos de 1 colónia/campo: <10³ UFC/mL

1 a 5 colónias/campo: cerca de 10⁴ UFC /mL

5 a 10 colónias/campo: cerca de 10⁵ UFC /mL

10 a 20 colónias/campo: cerca de 10⁶ UFC /mL

> 20 colónias/campo: > 10⁶ CFU /mL

UFC: Unidade de Formação de Colónias

11 - CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade pode ser efectuado a partir de uma estirpe de amostra liofilizada (*Ureaplasma urealyticum* ATCC 27618) e calibrada a 10⁴ UFC/mL. Inocular uma gelose A7 e proceder como indicado neste folheto informativo (§9 e §10).

Resultado esperado: Presença de 1 a 5 colónias em forma de ouriço (*U.urealyticum*).

12 - CAUSAS DE ERRO

- Amostragem com cotonetes ou meios de transporte inadequados.
- Inoculação directa a partir do escovilhão.
- Incubação em aerobiose.
- Inobservância da temperatura de incubação.

13 - LIMITES DO MÉTODO

- Amostra com quantidade insuficiente de micoplasmas (<10³ UFC/mL).
- Método sólido em gelose A7 a associar com um método líquido.
- Tal como para qualquer método de detecção de germes, a qualidade da amostra condiciona o resultado do teste. Assim, um teste negativo não traduz necessariamente uma ausência de infecção.

14 - DESEMPENHOS

Os desempenhos da cultura em gelose A7 de IM foram avaliados com relação ao método líquido MYCOFAST (2). O estudo foi realizado num centro hospitalar, em 544 amostras clínicas (266 espermas, 155 amostras endocervicais, 82 placentas, 19 amostras uretrais e 22 amostras diversas). Para 475 amostras (88%), das quais 140 positivas e 335 negativas, os resultados eram concordantes. As discordâncias reportaram-se a 69 amostras, das quais 8 eram positivas apenas com a gelose A7 (1,5%), 48 eram positivas apenas com o método MYCOFAST (8,8%) e 13 estavam contaminadas (2,4%). Com a gelose A7 foi possível detectar algumas estirpes de micoplasmas provenientes de amostras contaminadas.

15 - ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS

Os resíduos devem ser eliminados em cumprimento das regras de higiene e da regulamentação em vigor para este tipo de reagentes, no país onde são utilizados.

16 - BIBLIOGRAFIA

BOUCAUD-MAITRE Y. et THOINET S. 1993. Analyse des prélèvements en bactériologie médicale - 2^{ème} partie : prélèvements génitiaux. Feuil. Biol., 34: 21-24.

BRES P., J.P. CASALTA, M. DRANCOURT, G. PAPIEROK, D. RAOULT. 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.

PEREYRE S., BEBEAR M.C. et BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires, Supplément au N°329 : 34-36.

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.

As alterações em relação à versão anterior são destacadas em cinzento.

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

