

SEROLOGY

Detección cuantitativa de los anticuerpos contra el *Ureaplasma urealyticum* y el *Mycoplasma hominis*

14 tests (REF 00014)

120 tests (REF 00097)



ES-2010-09

1 - FINALIDAD

El estuche SEROLOGY permite la detección cuantitativa de los anticuerpos dirigidos contra los principales micoplasmas urogenitales, el *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) y el *Mycoplasma hominis* (M.h.), a partir del suero. Un estuche permite realizar 14 tests o 120 tests.

2- INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas son gérmenes frágiles desprovistos de pared, exigentes en factores de crecimiento, dotados de un fuerte poder de adherencia y muy a menudo presentes en estado comensal. De las especies aisladas a partir del tracto urogenital, el *Ureaplasma urealyticum* y el *Mycoplasma hominis* son los que se encuentran más a menudo. El U.u. y el M.h. se transmiten por vía sexual y pueden comportarse como verdaderos patógenos. A causa del carácter poco inmunógeno de los micoplasmas, la serología no sustituye el diagnóstico directo a partir de la toma de muestras. La serología de los micoplasmas urogenitales se utiliza principalmente para diagnosticar infecciones genitales profundas, tales como la salpingitis o la prostatitis. La técnica de la inhibición del metabolismo utilizando reactivos liofilizados y cepas de referencia es la técnica más apropiada (1) para los laboratorios no especializados.

3 - PRINCIPIO

La detección cuantitativa de los anticuerpos contra el U.u y/o el M.h. se lleva a cabo mediante la técnica de inhibición metabólica (2). La reacción tiene lugar en los pocillos de una batería que contiene lincomicina en el lado del *U. urealyticum*, y eritromicina en el lado del *M. hominis*. En los ocho primeros pocillos situados a cada lado de la batería se añade medio de cultivo UMM que contiene un indicador de pH y que ha sido anteriormente sembrado por una cantidad determinada de cepas U.u. y M.h. El suero a testear es agregado a los distintos pocillos de la galería por diluciones en cascada. Los anticuerpos eventualmente presentes inhiben la multiplicación de los micoplasmas, y el color del medio en ese caso es amarillo. En cambio, en ausencia de anticuerpos los micoplasmas se multiplican, degradan la urea y/o la arginina presentes en el medio, lo que provoca que el color del medio vire al rojo-anaranjado a fucsia. Para cada serie de tests U.u. y M.h. se realiza un control de crecimiento (pocillo 1, llamado T) para verificar la viabilidad de las cepas U.u y el buen funcionamiento del test.

4 - REACTIVOS

<i>Descripción</i>	<i>Cantidad</i>		
	#00014	#00097	
UMMt: Frasco de 2 mL de medio de base de los micoplasmas en forma líquida	14	120	
UMMlyo: Frasco de medio de crecimiento de los micoplasmas en forma liofilizada (+ 2 mL UMMt)	14	120	
U.u/M.h: Frasco que contiene cepas liofilizadas <i>U. urealyticum</i> y <i>M. hominis</i> .	14	120	
SEROLOGY: Galería de 20 pocillos envasados individualmente en bolsa de aluminio.	14	120	

Control positivo: Frasco que contiene una solución liofilizada de título conocido para control de los reactivos

Medio reconstituido (UMMt + UMMlyo) - Composición

Caldo de micoplasmas 20 g/L, Suero de caballo 200 mL, Extracto de levadura 5,8 g/L, Cisteína 0,3 g/L, Arginina 9 g/L, Urea 3,6 g/L, Rojo de fenol 0,04 g/L, Antibióticos10 mL. pH : 6.1 ± 0.1

Cepas U.u / M.h

Cepas de referencia liofilizadas : *U. urealyticum* serotipo 8 y *M. hominis* cepa PG 21.

Galería SEROLOGY (§9.1)

Hilera del *U.u.*: Serie de los 8 primeros pocillos que contienen lincomicina, inhibidor específico del *M.h.*

Hilera del *M.h.*: Serie de los 8 primeros pocillos que contienen eritromicina, inhibidor específico del *U.u.*

Control positivo

Medio para micoplasmas con una mezcla de antibióticos específicos.

SEROLOGY

Detección cuantitativa de anticorpos anti-*Ureaplasma urealyticum* e anti-*Mycoplasma hominis*

14 tests (REF 00014)

120 tests (REF 00097)



PT-2010-09

1 - FINALIDADE

O kit SEROLOGY permite a deteção quantitativa de anticorpos dirigidos contra os principais micoplasmas urogenitais, *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) e *Mycoplasma hominis* (M.h.), a partir do soro. Um kit permite efectuar 14 testes ou 120 testes.

2 - INTRODUÇÃO

Os micoplasmas são microorganismos frágeis desprovidos de parede celular, exigentes em requisitos de fatores de crescimento, com um forte poder de adesão e muito frequentemente presentes como organismos comensais. Espécies isoladas a partir do tracto urogenital, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* são as mais frequentemente observadas. U.u. ou M.h. são transmitidos por via sexual e podem comportar-se como verdadeiros agentes patogénicos. Devido à ausência de imunogenicidade dos micoplasmas, a serologia não substitui o diagnóstico directo a partir de amostras de doentes. A serologia dos micoplasmas urogenitais é efectuada essencialmente para diagnosticar uma infecção genital profunda, como salpingite ou prostatite. A técnica de inibição do metabolismo que utiliza reagentes liofilizados e estirpes de referência é a técnica mais apropriada (1) para utilização em laboratórios não especializados.

3 - PRINCÍPIO

A deteção quantitativa de anticorpos anti-U.u e/ou anti M.h. é efectuada por técnica de inibição metabólica (2). A reacção processa-se nos poços de uma galeria contendo lincomicina, do lado *U. urealyticum*, e do lado *M. hominis*, eritromicina. Os oito primeiros poços, de cada lado da galeria, são inoculados com um meio de cultura UMM contendo um indicador de pH e previamente inoculado com uma quantidade determinada de estirpes U.u e M.h. O soro a testar é adicionado nos diferentes poços da galeria, por diluições em cascata. Os anticorpos eventualmente presentes inibem a multiplicação de micoplasmas, apresentando-se então o meio de cor amarela. Inversamente, na ausência de anticorpos, os micoplasmas multiplicam-se, degradam a ureia e/ou a arginina presentes no meio, o que provoca uma alteração de cor do meio para vermelho alaranjado a fúcsia. Para cada série de testes U.u e M.h é efectuado um controlo de crescimento (poço 1, identificado como T), para verificar a viabilidade das estirpes U.u e o funcionamento correcto do teste.

4 - REAGENTES

<i>Descrição</i>	<i>Quantidade</i>		
	#00014	#00097	
UMMt : Frasco de 2 mL de meio base para micoplasmas, sob forma líquida	14	120	
UMMlyo : Frasco de meio de crescimento para micoplasmas, sob forma liofilizada (+ 2 mL UMMt)	14	120	
U.u/M.h : Frasco contendo estirpes liofilizadas <i>U. urealyticum</i> e <i>M. hominis</i>	14	120	
SEROLOGY : Galería de 20 poços individualmente acondicionados em saqueta de alumínio.	14	120	
Controlo positivo : Frasco contendo uma solução liofilizada de título conhecido, para controlo dos reagentes	1	5	

Meio reconstituido (UMMt+UMMlyo) – Composição

Caldo de Micoplasmas 20 g/L, Soro de potro 200 mL, Extracto de leveduras 5,8 g/L, Cisteína 0,3 g/L, Arginina 9 g/L, Ureia 3,6 g/L, Vermelho de fenol 0,04 g/L, Antibióticos 10 mL. pH : 6.1 ± 0.1

Estirpes U.u / M.h

Estirpes de referência liofilizadas: *U. urealyticum* serotipo 8 e *M. hominis* estirpe PG 21.

Galería SEROLOGY (§9.1)

- Lado *U.u.* : Série de 8 primeiros poços contendo lincomicina, inibidor específico de *M. hominis*.
- Lado *M.h.* : Série de 8 primeiros poços contendo eritromicina, inibidor específico de *U. urealyticum*.

Controlo positivo

Meio para micoplasmas contendo uma mistura de antibióticos específicos.

5 - PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- Os reagentes deste kit destinam-se exclusivamente ao diagnóstico *in vitro* e devem ser manipulados por técnicos devidamente habilitados para o efeito.
- As amostras e os reagentes inoculados são potencialmente infecciosos, pelo que devem ser manipulados com as precauções habituais, em cumprimento das normas de higiene e da regulamentação em vigor no país onde este produto é utilizado.

5 - PRECAUCIONES DE EMPLEO

- Los reactivos de este estuche están destinados únicamente a un uso *in vitro*, y deben ser manipulados por personas habilitadas.
- Las muestras y los reactivos sembrados son potencialmente infecciosos; deben ser manipulados con las precauciones de uso respetando las reglas de higiene y la reglamentación en vigor para este tipo de productos en el país de utilización.
- Los medios UMMt y UMMlyo y el control positivo contienen materias primas de origen animal y deben ser manipulados con las precauciones de uso correspondientes.
- Los frascos U.u / M.h contienen bacterias de grupo 2 (*M. hominis*) y deben ser manipulados con las precauciones de uso correspondientes. Existe el riesgo de contaminación por un agente biológico.
- No utilizar los reactivos pasada la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos dañados o mal conservados antes de su uso.
- Una vez abierto el estuche, sacar del refrigerador solamente los reactivos necesarios. Las cepas U.u /M.h son sensibles al calor y a las variaciones de temperatura.
- Un resultado positivo con el método SEROLOGY no sirve por sí mismo para realizar un diagnóstico clínico. El diagnóstico debe ser realizado por el médico en función de los resultados biológicos y de los síntomas clínicos.

6 - RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- Tomar la muestra de sangre en un tubo seco.

- Centrifugar 10 minutos a x 2500 g.

- Recoger el suero

El suero puede ser conservado 3 horas a 2-8 °C, o ser congelado a -20 °C. Las muestras de un mismo enfermo tomadas con un intervalo de 15 días deben ser tratadas simultáneamente.

7 - PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Los reactivos conservados a 2-8 °C en su estado original permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche.
- Los medios UMMlyo (+ 2 mL UMMt) deben ser regenerados por los medios UMMt (2 mL)
- El frasco de cepas U.u y M.h debe ser reconstituido con 1mL de agua destilada estéril. Homogeneizar bien revolviendo suavemente. No conservar después de la utilización.
- El frasco del control positivo debe ser reconstituido con 1mL de agua destilada estéril. Homogeneizar. No conservar el frasco.

8 - MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas estériles
- Agua destilada estéril
- Aceite de parafina
- Estufa calibrada a 37 °C
- Recipiente para residuos contaminados

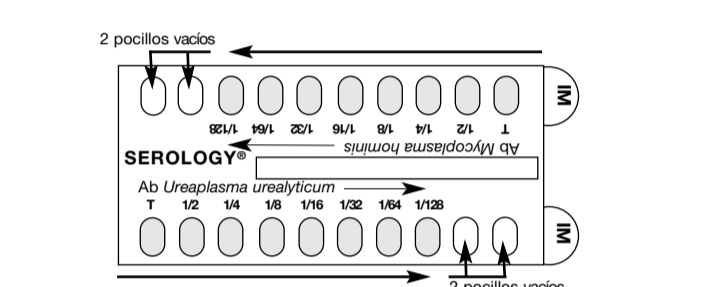
9 - PROCEDIMIENTO

Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente (18-25 °C)

9.1. Preparación y distribución de la suspensión

- Inocular el medio UMMlyo regenerado con 400 µL de la suspensión de gérmenes (Cepas U.u / M.h).

-Identificar cada galería, retirar la película adhesiva. Dispensar 100 µL de reactivo así preparado en cada uno de los 8 primeros pocillos de la serie U.u y de los 8 primeros pocillos de la serie M.h. No hay que rellenar los dos últimos pocillos vacíos a cada lado.



9.2. Distribución del suero (o del control positivo)

- Introducir 100 µL de suero en el segundo pocillo de una de las dos series de pocillos. Volver a tomar 100 µL de líquido del pocillo 2, agregarlos al pocillo 3 y continuar las diluciones en cascada hasta el pocillo 8 (1/128). Descartar los últimos 100 µL .

- Repetir la misma operación con la segunda serie de pocillos.

- Durante la primera utilización del estuche sembrar una galería SEROLOGY reemplazando en las dos series de pocillos el suero a testear por el control positivo.

- Distribuir 2 gotas de aceite de parafina en cada pocillo de la galería.

- Volver a cubrir la galería con la película adhesiva.

9.3. Incubación de la galería

- Incubar la galería SEROLOGY a 37 °C durante **24 horas** (48 horas de ser necesario (§10.1)).

- Para el control positivo de los reactivos, incubar la galería solamente 24 horas.

10 - LECTURA E INTERPRETACIÓN

10.1. Validación

Verificar que el contenido de los pocillos sea límpido.

Leer las series de pocillos solamente cuando los testigos (pocillos T) de control de crecimiento sean positivos :

U.u: Viraje del amarillo al rojo a fucsia.

M.h: Viraje del amarillo al rojo-anaranjado a fucsia.

El tiempo de incubación de las dos cepas es independiente, depende del viraje del medio en el pocillo T de cada serie.

10.2. Lectura

La presencia de anticuerpos se traduce por una ausencia de viraje del medio. En ausencia de anticuerpos el medio se vuelve rojo-anaranjado o fucsia. La tasa de anticuerpos corresponde a la más fuerte dilución inhibida (último pocillo amarillo)

10.3. Interpretación.

La interpretación debe realizarse a partir de dos muestras tomadas con un intervalo de15 días y testeadas simultáneamente. Sólo si la variación en la tasa de anticuerpos entre estas dos muestras es igual o superior a 2 diluciones significa que existe una infección evolutiva.

11 - CONTROL DE CALIDAD

11.1. Control positivo de los reactivos

El control del buen funcionamiento de los reactivos debe realizarse ni bien se recibe el estuche utilizando el frasco de control positivo en lugar de un suero. La lectura se realiza después de una incubación de 24 horas. El título esperado para las dos series de la galería está especificado en la etiqueta.

Importante : El título del control positivo del estuche, escrito en la etiqueta, puede tener una variación de una dilución.

11.2. Testigo positivo del test

El crecimiento de la cepa en el primer pocillo (T) de cada serie U.u y M.h valida el test (§10.1).

12 - LÍMITES DEL MÉTODO

● Los enfermos de los que se extraen las muestras no deben estar bajo tratamiento con antibióticos. La presencia de antibióticos en el suero puede inhibir la multiplicación de los micoplasmas y causar tasas falsamente altas.

● La interpretación debe realizarse a partir de dos muestras tomadas con un intervalo de15 días y testeadas simultáneamente.

● La serología de los micoplasmas en ningún caso debe sustituir el cultivo para dar prueba de una infección o de un desequilibrio de la flora.

13 - CAUSAS DE ERRORES

● Mala conservación del suero.

● Mala conservación de los reactivos del estuche, en especial de las cepas U.u/M.h.

● Temperatura de incubación inferior a 35 °C o superior a 37 °C.

● Lectura de los resultados antes del viraje del pocillo T de testigo de crecimiento en la hilera del U.u y/o del M.h.

14 - PERFORMANCES

Se realizó un estudio comparativo con el reactivo SEROLOGY y el reactivo MYCOKIT SERO de PBS ORGENICS a partir de 100 sueros humanos testeados en forma rutinaria (64 sueros negativos en anticuerpos contra el U.u y M.h, 28 sueros positivos en anticuerpos contra el U.u y M.h, 6 sueros positivos en anticuerpos contra el U.u y negativos en anticuerpos contra el M.h, y 2 sueros negativos en anticuerpos contra el U.u y positivos en anticuerpos contra el M.h.). Los dos métodos utilizan el mismo principio de inhibición del metabolismo. La lectura de la galería SEROLOGY fue realizada después de 48 horas de incubación:

- Para la detección de los anticuerpos contra el U.u la sensibilidad es de 88,2% y la especificidad de 100%.

Los 4 falsos negativos correspondieron a sueros positivos con diluciones de 1/2 y 1/4.

- Para la detección de los anticuerpos contra el M.h la sensibilidad es de 96,6% y la especificidad de 98,5%.

- Para determinar la titulación, los resultados del estudio mostraron un 92,5% de concordancia cualquiera sea la diferencia en el título, y 97,5% de concordancia para un título con una dilución de diferencia.

15 - ELIMINACIÓN DE LOS DESECHOS

Los desechos deben ser eliminados respetando las reglas de higiene y la reglamentación vigente para este tipo de reactivos en el país de su utilización.

16 - BIBLIOGRAFÍA

1. ESCARGUEL C. et G. PAPIEROK. 1988. La sérologie des mycoplasmes uro-génitaux, Spectra Biologie, **88**, 39-42.

2. LIN J.S. and KASS E.H. 1974. Serological reactions of *Mycoplasma hominis*: difference among mycoplasmacidal metabolic inhibition and growth agglutination tests, Infect. Immunity, **10**, 535-540.

3. TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans **MANDELL G. L. , BENNET J. E. and DOLIN R.** (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., **vol. 2**, Churchill Livingstone, New York.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19, allée d'Athènes

83870 SIGNES - FRANCE

Tél. : 04 94 88 55 00

Fax : 04 94 88 55 22

10.2. Leitura da galeria

A presença de anticorpos é determinada pela ausência de alteração da cor do meio. Na ausência de anticorpos, o meio passa a vermelho alaranjado ou a fúcsia.

O título de anticorpos corresponde à primeira diluição que for inibida (último poço amarelo).

10.3. Interpretação

A interpretação deve ser efectuada a partir de duas amostras recolhidas com 15 dias de intervalo e testadas em simultâneo. Apenas uma variação no título de anticorpos entre as duas amostras, superior ou igual a 2 diluições é indicadora de uma infecção em progressão.

11 - CONTROLO DE QUALIDADE

11.1. Controlo positivo dos reagentes

O controlo de funcionamento correcto dos reagentes deve ser feito aquando da recepção do kit, utilizando o frasco de controlo positivo em lugar do soro. A leitura faz-se após uma incubação de 24 horas. O título esperado para as duas séries da galeria está especificado na etiqueta.

Nota: O título do controlo positivo do kit, indicado na etiqueta, pode variar por uma diluição.

11.2. Controlo positivo do teste

O crescimento da estirpe no primeiro poço (T) de cada série U.u e M.h valida o teste (§10.1).

12 - LIMITES DO MÉTODO

● Os doentes nos quais se efectua a colheita não deverão encontrar-se sob tratamento antibiótico. A presença de antibióticos no soro pode inibir a multiplicação de micoplasmas e dar origem a níveis falsamente elevados.

● A interpretação deve ser efectuada a partir de duas amostras recolhidas com 15 dias de intervalo e analisadas em simultâneo.

● A serologia dos micoplasmas não deve, em caso algum, substituir-se à cultura dos microorganismos para comprovação de uma infecção ou de um desequilíbrio da flora microbiana.

13 - CAUSAS DE ERRO

● Deficiente conservação do soro.

● Deficiente conservação dos reagentes do kit, em particular das estirpes U.u/M.h.

● Temperatura de incubação inferior a 35 °C ou superior a 37 °C.

● Leitura dos resultados antes da alteração de cor do poço T de controlo de crescimento, na galeria do U.u e/ou M.h.

14 - DESEMPENHO

Foi realizado um estudo comparativo com o reagente SEROLOGY e o reagente MYCOKIT SERO da PBS Organics em 100 amostras de soros humanos analisados em rotina (64 soros negativos para anticorpos anti-U.u. e anti-M.h., 28 soros positivos para anticorpos anti-U.u. e anti-M.h., 6 soros positivos para anticorpos anti-U.u. e negativos para anticorpos anti-M.h. e 2 soros negativos para anticorpos anti-U.u. e positivos para anticorpos anti-M.h. Os dois métodos utilizam o mesmo princípio de inibição metabólica. A leitura da galeria SEROLOGY foi realizada após 48 horas de incubação:

- Para a deteção de anticorpos anti-U.u., a sensibilidade foi de 88,2% e a especificidade de 100%.

Os 4 falsos negativos correspondiam a uma amostra de soro positiva com diluições de 1/2 e 1/4.
- Para a deteção de anticorpos anti-M.h., a sensibilidade foi de 96,6% e a especificidade de 98,5%.

- Para a determinação do título de anticorpos, os resultados do estudo demonstraram 92,5% de concordância, qualquer que fosse a magnitude da diferença no título e 97,5% de concordância para títulos distantes em uma diluição.

15 - ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS

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

16 - BIBLIOGRAFIA

1. ESCARGUEL C. et G. PAPIEROK. 1988. La sérologie des mycoplasmes uro-génitaux, Spectra Biologie, **88**, 39-42.

2. LIN J.S. and KASS E.H. 1974. Serological reactions of *Mycoplasma hominis*: difference among mycoplasmacidal metabolic inhibition and growth agglutination tests, Infect. Immunity, **10**, 535-540.

3. TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans **MANDELL G. L. , BENNET J. E. and DOLIN R.** (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., **vol. 2**, Churchill Livingstone, New York.

9.2. Distribuição do soro a testar (ou do controlo positivo)

- Depositar 100 µL de soro num segundo poço de uma das duas séries de poços. Inicie uma diluição em série com 100 µL de líquido do poço 2, que adiciona ao poço 3 e assim sucessivamente até ao poço 8 (1/128). Rejeitar os 100 µL excedentários no