

SEROLOGY

Kvantitativní detekce protilátek proti *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*

14 testů (REF 00014)
120 testů (REF 00097)

CZ-2010-09_CPB 0033



1 - POUŽITÍ

Serologický set umožňuje kvantitativní detekci protilátek proti hlavním urogenitálním mycoplasmatickým druhům, *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) a *Mycoplasma hominis* (M.h.). Každý set obsahuje 14 nebo 120 testů.

2 - ÚVOD

Mycoplasmata jsou fragilní mikrobi s chybějící buněčnou stěnou. Nejčastěji jsou přítomni jako komensální organismi. Jsou závislé na růstových faktorech s vysokou kapacitou adherence. Druhy izolované z urogenitálního traktu, *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis* se vyskytují nejčastěji. U.u. a M.h. jsou sexuální přenosné a mohou být přirozenými patogeny.

Vzhledem k nedostatku imunogenicity, serologická diagnostika mycoplasmat nenahrazuje přímou diagnostiku ze vzorků materiálů od pacienta. Serologické testy na urogenitální mycoplasmata jsou speciálně užívány k diagnostice hlubokých genitálních infekcí jako jsou salpingitidy nebo prostatitidy.

Technika metabolické inhibice užívající lyofilizované reagencie a referenční kmeny je nejvhodnější technikou pro použití v běžných laboratořích (1).

3 - PRINCIP METODY

Kvantitativní detekce anti-U.u. a/nebo anti-M.h. protilátek je založena na technice metabolické inhibice (2). Reakce probíhá v jamkách destiček, jamky v řadách určených k diagnostice *U. urealyticum* obsahují lincomycin a v řadách určených k diagnostice *M. hominis* erythromycin. Prvních 8 jamek na každé straně destičky je naplněno UMM živnou půdou obsahující pH indikátor a předem naočkováno známým množstvím U.u. a M.h.

Testované sérum je na destičce postupně zředováno. Přítomnost protilátek v séru způsobuje inhibici multiplikace mycoplasmat, což je doprovázeno žlutým zabarvením média. V případě nepřítomnosti protilátek se mycoplasmata množí, degradují ureu a/nebo arginin přítomný v médiu, což způsobuje oranžové, červené nebo fuchsiové zabarvení média.

Pro každou řadu U.u. a M.h. testů je přítomna růstová kontrola (jamka 1, označená T). Takto je zabezpečena verifikace životnosti U.u. a M.h. kmenů, a správnost funkce testu.

4 - REAGENCIE

Popis

UMMt: Lahvička 2 mL základního tekutého mycoplasmatového média

UMMlyo: Lahvička lyophilizovaného mycoplasmatového růstového média

(+ 2 mL UMMt)

U.u./M.h.: Lahvička obsahující lyophilizované *U. urealyticum* a *M. hominis* kmeny

SEROLOGICKÁ destička: 20-jamková destička zvlášť zabalená v

aluminiovém obalu

Positivní kontrola I: Lahvička obsahující lyophilizovaný roztok o známém titru pro verifikaci reagentů

Rekonstituované medium (UMMt + UMMlyo) - Složení

Mycoplasma bujón 20 g/L, Hřibecí serum 200 mL, Kvasnicový extract 5,8 g/L, Cystine 0,3 g/L, Arginin 9 g/L, Urea 3,6 g/L, Phenolová červená 0,04 g/L, Antibiotika 10 mL. pH: 6.1 ± 0.1

U.u. / M.h. kmeny

Lyophilizované referenční kmeny: *U. urealyticum* serotyp 8 a *M. hominis* PG 21 kmen.

SEROLOGICKÁ destička (§9.1)

- *U. urealyticum* řada: Serie prvních 8 jamek obsahujících *M. hominis* specifický lincomycinový inhibitor.

- *M. hominis* řada: Serie prvních 8 jamek obsahujících *U. urealyticum* specifický erythromycinový inhibitor.

Positivní kontrola

Mycoplasmatové medium se směsí specifických antibiotik

5 - UPOZORNĚNÍ

● Reagencie v setu jsou určena pro *in vitro* užití a musí být používána pouze odpovědnými osobami.

● Vzorky a naočkováná činidla jsou potencionálně infekční a musí s nimi být zacházeno s opatrností s ohledem na hygienické předpisy a regulační opatření platná pro tento typ produktů v zemi užití.

● UMMt a UMMlyo media, stejně jako pozitivní kontroly obsahují materiál živočišného

původu a musí s nimi být zacházeno s opatrností.

● U.u./M.h. lahvičky obsahují skupinu 2 bakterií (*M. hominis*) a musí být s nimi zacházeno s opatrností. Existuje riziko kontaminace biologickými agens.

● Nepoužívat reagencie po datu expirace.

● Nepoužívat reagencie poškozené nebo špatně uskladněné.

● Po otevření kitu odeberáme jen potřebné množství reagentů, ostatní okamžitě uložíme zpět do chladničky. U.u./M.h. kmeny jsou senzitivní na teplo a rozdíly v teplotě.

● Pozitivní výsledek testu by neměl být podkladem ke stanovení diagnózy bez korelace s anamnesou a klinickým nálezem.

6 - VZORKY (ODBĚR A PŘÍPRAVA)

- Krevní vzorky umístíme do rovné centrifugační kyvety.

- Centrifugujeme 10 min při x 2500 .

- Odebereme sérum

Sérum může být skladováno po 3 hodiny při 2 až 8 °C nebo zmrazené při -20 °C.

Vzorky stejného pacienta odebrané v průběhu 15 dnů musí být testovány simultánně.

7 - PŘÍPRAVA A PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ

● Reagencie skladované při 2 až 8 °C v originálním balení jsou stabilní do data expirace uvedeného na kitu.

● UMMlyo (+ 2 mL UMMt) media regenerujeme UMMt médiem (2 mL).

● Lahvičky U.u. a M.h. kmenů rekonstituujeme s 1 ml sterilní destilované vody. Promícháváme jemně převrácením lahvičky. Po použití nekonzervujeme.

● Pozitivní kontroly rekonstituujeme s 1 mL sterilní destilované vody. Dobře promícháme Po použití nekonzervujeme.

8 - POTŘEBNÝ, ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

● Sterilní pipety

● Sterilní destilovaná voda

● Parafinový olej

● Inkubátor kalibrovaný na 37 °C

● Kontejner pro kontaminovaný odpad.

9 - METODA

Reagencie před použitím necháme ohřát na laboratorní teplotu (18 až 25 °C).

9.1. Příprava a distribuce suspenze

- Naočkujte regenerované UMMlyo medium s 400 µL mikrobiální suspenze (U.u./M.h. kmeny.)

- Označte každou destičku, zvedněte adhezivní folii, pak přidejte 100 µL připraveného činidla do všech 8 jamek U.u. řady a M.h. řady. Poslední 2 jamky každé řady (prázdné jamky) nemusí být naplněny.

9.2. Distribuce testovaného séra (nebo pozitivních kontrol)

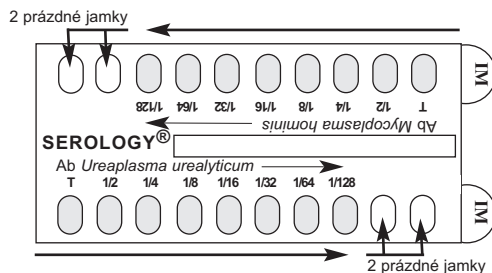
- Přidejte 100 µL séra do druhé jamky jedné ze dvou řad jamek. Postupně odeberte 100 µL tekutiny z jamky 2 a naočkujte do jamky 3 a pokračujte stejným způsobem až po jamku 8 (1/128). Z jamky 8 odstraňte nadbytečných 100 µL.

- Opakujte stejný postup u druhé řady jamek.

- Před použitím kitu k testování vyšetřovaného séra, naočkujte jamky dvou řad destičky pozitivní kontrolou.

- Přidejte 2 kapky parafinového oleje do každé jamky destičky.

- Zakryjte destičku adhezivní folií.



9.3. Inkubace destiček

- Inkubujte destičku 24 hodin. (48 hodin je-li nutné (§10.1)) při 37 °C.

- Destička s pozitivní kontrolou se inkubuje pouze 24 hodin.

10 - VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE

10.1. Validace

Ověřte zda obsah jamek je čistý.

Nevyhodnocujte destičku, jestliže růstové kontroly (T jamky) jsou pozitivní :

U.u.: Barevná změna ze žluté na červenou ev. barvu fuchsii,

M.h.: Barevná změna ze žluté na oranžovo- červenou nebo barvu fuchsii.

Inkubační doby těchto dvou kmenů jsou nezávislé a závisí na barevné změně media v T jamkách každé řady.

10.2. Vyhodnocení destičky

Přítomnost protilátek je dána absencí barevné změny media. Při nepřítomnosti protilátek se barva media zbarví do oranžovo-červená nebo do barvy fuchsii. Nejsilnější inhibiční ředění (poslední žlutá jamka) reprezentuje titer protilátek.

10.3. Interpretace

Interpretace musí být založena na vyšetření dvou vzorků odebraných v intervalu 15 dnů testovaných simultánně. Pouze rozdíl v titru protilátek těchto vzorků větší nebo rovno 2 ředěním je indikátorem progresivní infekce.

11 - KONTROLA KVALITY

11.1. Reagent pozitivní kontroly

Verifikace reagentů kitu je prováděna použitím pozitivního kontrolního vzorku místo testovaného séra. Vyhodnocení vzorku se provádí po inkubaci 24 hodin. Očekávaný titer pro obě dvě řady destičky je specifikován na štítku.

Pozor : Titr pozitivní kontroly specifikovaný na štítku, se může měnit podle ředění.

11.2. Test pozitivní kontroly

Růst kmenů v první jamce (T) každé U.u. a M.h. řad ověřuje test. (§10.1).

12 - LIMITY METODY

● Pacient, jehož vzorky jsou vyšetřovány, nesmí být léčen antibiotiky. Antibiotika v séru mohou inhibovat množení mycoplasmat a vést ke klamně vysokým hodnotám.

● Interpretace musí být založena na vyšetřování dvou vzorků odebraných v intervalu 15 dnů a vyšetřovaných simultánně.

● Serologické vyšetřování mycoplasmat nesmí být za žádných okolností náhradou kultivace mikroorganismů k potvrzení infekce nebo nerovnováhy v mikrobiální flóře.

13 - PŘÍČINY CHYB

● Špatné uchovávání séra.

● Špatné uchovávání reagentů kitu, zvláště U.u./M.h. kmenů.

● Inkubační teplota nižší než 35 °C nebo vyšší než 37 °C.

● Vyhodnocení výsledků na U.u. nebo M.h. není možné provést dříve než růstová indikátorová jamka T změní barvu.

14 - ZHODNOCENÍ

Komparativní studie provedená se SEROLOGY reagenty a MYCOKIT SERO reagenty PBS ORGENICS u 100 rutinně testovaných lidských sér (64 vzorků sér negativních na anti-U.u. a anti-M.h. protilátky, 28 vzorků sér pozitivních na anti-U.u. a anti-M.h. protilátky, 6 vzorků sér pozitivních na anti-U.u. protilátky a negativních na anti-M.h. protilátky, a 2 vzorky sér negativních na anti-U.u. protilátky a pozitivních na anti-M.h. protilátky). Obě metody jsou založeny na stejném principu metabolické inhibice. Vyhodnocení SEROLOGY destiček bylo provedeno po inkubaci 48 hodin.

- Pro detekci anti-U.u. protilátek, je senzitivita 88.2% a specifita 100%. 4 falešně negativní výsledky korespondují se sérovými vzorky pozitivními při ředění 1/2 a 1/4.

- Pro detekci anti-M.h. protilátek je senzitivita 96.6% a specifita 98.5%.

- Pro determinaci titru protilátek výsledky studií prokazují shodu 92.5%, bez ohledu na velikost rozdílu v titru, a shodu 97.5% pro titry v jednom ředění.

15 - NAKLÁDÁNÍ S ODPADY

Nepoužité reagencie a odpady musí být likvidovány v souladu s hygienickými předpisy platnými pro tento druh materiálu.

16 - LITERATURA

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

2. LIN J.S. and KASS E.H. 1974. Serological reactions of *Mycoplasma hominis*: difference among mycoplasmae 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

