

82

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Био-Рад Лаборатории»

Бобровник Е. В.

2009 г.



Инструкция по применению изделия медицинского назначения

«Реагенты диагностические in vitro для микробиологических исследований»

Диски для определения чувствительности к антибактериальным и антимикотическим препаратам



1. Сфера применения

Определение чувствительности к антибактериальным и антимикотическим препаратам диско-диффузионным методом.

2. Принцип

Принцип диско-диффузионного метода основан на феномене ингибиции антибиотиками или амикотиками поверхностного, видимого роста микроорганизмов на плотной (агаровой) питательной среде. Градиент концентрации антибиотика в питательной среде создается в результате его диффузии из носителя (бумажного диска). Диск с антибиотиком помещается на поверхность питательной среды немедленно после посева (инокуляция) культуры исследуемого микроорганизма. При этом практически одновременно начинаются два процесса: диффузия из диска и рост микроорганизмов на поверхности среды. С практической точки зрения важно то, что от диска в периферии происходит движение «фронта» концентрации антибиотика. Равной его МПК в отношении исследуемого микроорганизма.

3. Упаковка

1. 4 картриджа по 50 дисков.
2. 1 картридж по 50 дисков

4. Состав

Диски с антибактериальными или амикотическими препаратами: сорбирующая бумага, импрегнированная антибактериологическим или амикотическим препаратом. Диаметр диска 6,35. На каждый диск нанесена аббревиатура, состоящая из 1.2 или 3 букв, одинакового цвета для каждой группы антибиотиков.

5. Хранение

Диски, хранящиеся в картридже и контейнере при температуре 2-8°C, в отсутствие

контаминации, стабильны до даты указанной на упаковке. Указанный срок годности применим только для дисков, хранящихся в интактном картридже по рекомендациям производителя. Дата истечения срока годности и номер лота указаны на каждой упаковке (картридже и контейнере).

6. Методика

1. Инокулировать поверхность агара чистой культурой (концентрированной суспензией для обеспечения сливного роста).
2. Разместить диски с соответствующими антибиотиками по поверхности агара, выдерживая расстояние 15 мм от края чашки и не менее 30 мм между дисками. Для нанесения дисков использовать пинцет или диспенсер.
3. Для обеспечения хорошей постоянной диффузии антибиотика плотно прижать каждый диск к поверхности агара.

Инкубировать при 37°C от 18 до 24ч.

4. После окончания инкубации учесть и интерпретировать результаты в соответствии с рекомендациями МУК 4.2. 1890 – 04 или NCCLS.

Соблюдать рекомендации по хранению биологических образцов.

7. Контроль качества производителя

Все производимые реагенты изготавливаются в соответствие с системой качества компании «Био-Рад», начиная с приема сырья и до продажи продукта. Любой лот поступает на рынок только после прохождения строгой процедуры контроля на предмет соответствия определенным критериям. Вся информация относительно продукта и его контроля хранится в компании «Био-Рад».

IVD

1. Клиническое значение

Набор S.I.R. MYCOPLASMA предназначен для определения чувствительности урогенитальных микоплазм *Ureaplasma* spp. (*Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*) и *Mycoplasma hominis* (Mh) к антибиотикам. Однако, на практике трудно достичь отдельной идентификации *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*.

Чувствительность определяется на панели из 8 активных против этих микроорганизмов антибиотиков, которые обычно используются при лечении половых инфекций.

Проведение определения чувствительности к антибиотикам чрезвычайно существенно при выборе правильной тактики лечения, так как за последнее время появились штаммы микоплазм, резистентные чаще всего к тетрациклинам и макролидам (которые являются антибиотиками первого выбора) [10,11].

Стандартизация инокулята обеспечивает хорошее совпадение результатов этого метода и референс-метода [9].

2. Принцип метода

S.I.R. MYCOPLASMA - это набор для определения чувствительности к антибиотикам в жидкой среде. Шесть антибиотиков представлены двумя концентрациями (доксикалин, азитромицин, тетрацилин, джозамицин, эритромицин, офлоксацин) и два антибиотика - одной концентрацией (клиндамицин, пристиномицин).

Тест основан на ингибции метаболизма микоплазм. Пророст микоплазм можно визуализировать через продукты их метаболизма. *Uu* гидролизует мочевину в растворе *U9*, а *Mh* гидролизует аргинин в аргининовом растворе. При этом выделяются ионы аммония, которые защелачивают среду, меняя цвет индикатора pH (фенолового красного) с желтого на красный.

Если микроорганизм чувствителен к антибиотику, добавленному в раствор, его метаболизм ингибируется, и цвет раствора остается желтым (или оранжево-желтым).

Если микроорганизм резистентен к антибиотику, наблюдается пророст, и цвет среды изменяется на красный.

3. Состав набора

Набор S.I.R. MYCOPLASMA состоит из

- 1) 10 S.I.R. микроплат (на них наклеена схема расположения 16 лунок, позволяющая идентифицировать антибиотики).
- 2) 10 листов липкой пленки.
- 3) 1 коробки и буклета с инструкцией.

4. Хранение

При хранении при температуре + 2-8 оС Микоплазму СИР можно использовать до даты, указанной на упаковке.

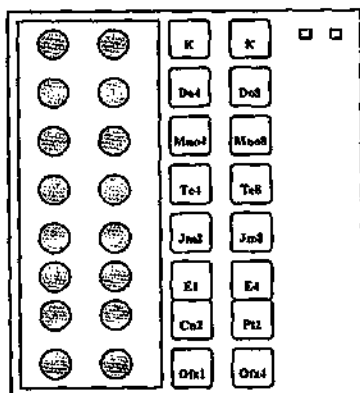
5. Необходимые материалы, не вошедшие в состав набора

- Раствор U9, код 62762
(10 ампул лиофилизированной среды U9 по 2 мл в ампуле)
- Аргининовый раствор, код 62763
(10 ампул лиофилизированной среды с аргинином по 2 мл в ампуле)
- Набор MYCOPLASMA DUO (на 20 проб - код 62740)
- Стерильная дистиллированная вода
- Пипетки на 2 мл, 200 мкл, 100 мкл и 20 мкл.
- Инкубатор на 37° С
- Контейнер для инаktivации биологических отходов

6. Методика

а) Описание микроплаты S.I.R.

На микроплате есть 16 лунок, расположенных в 2 ряда по 8 лунок, в которых в сухом виде содержатся различные антибиотики. При добавлении стандартизированного инокулята они растворяются в питательной среде. Концентрации антибиотиков подобраны так, чтобы профиль чувствительности штамма определялся для каждого антибиотика следующим образом: Чувствительный, Умеренно чувствительный или Резистентный (Sensitive, Intermediate or Resistant).



Контроль пророста без антибиотиков

- Доксициклин (4 мг/л и 8 мг/л)
- Азитромицин (2 мг/л и 4 мг/л)
- Тетрациклин (4 мг/л и 8 мг/л)
- Джозамицин (2 мг/л и 8 мг/л)
- Эритромицин (1 мг/л и 4 мг/л)
- Клиндамицин (2 мг/л) и Пристинамицин (2 мг/л)
- Офлоксацин (1 мг/л и 4 мг/л)

б) Панель антибиотиков.

Выбор антибиотиков основан на терапевтических рекомендациях для лечения

неонатальных и урогенитальных инфекций. В настоящее время не существует официально утвержденных пограничных подавляющих концентраций для урогенитальных микоплазм. Используемые в панели концентрации выбраны на основании научных публикаций и рекомендаций медицинских сообществ. Концентрации азитромицина определены на основании исследований клинических изолятов.

Тетрациклины: доксициклин и тетрациклин (4 мг/л и 8 мг/л).

МПК для циклинов остаются неизменны в момента открытия резистентности к ним. В популяции отмечается низкий уровень устойчивости. Частота встречаемости резистентности зависит от штамма и региона.

Макролиды: азитромицин (2 мг/л и 4 мг/л), джозамицин (2 мг/л и 8 мг/л) и эритромицин (1 мг/л и 4 мг/л).

Штаммы микоплазмы природно устойчивы к эритромицину и азитромицину. Чувствительность к джозамицину сохраняется. Поэтому результаты необходимо расценивать как косвенный признак точности видовой идентификации. В остальных случаях устойчивость к данной группе антибиотиков остается очень низкой.

- Оба активны в отношении Uu, но резистентность к ним встречается в небольшом проценте случаев (особенно к эритромицину).
- Только йозамицин активен по отношению к Mh..

Линкозамиды: клиндамицин (2 мг/л)

Уреаплазма природно устойчива к этому антибиотику.

Стрептограмин: пристиномицин (2 мг/л)

Чрезвычайно активен в отношении обоих видов урогенитальных микоплазм.

Хинолоны: офлоксацин (1 мг/л и 4 мг/л)

Активны как в отношении Uu, так и в отношении Mh. Частота устойчивых штаммов плохо изучена, для уреаплазмы составляет порядка 1 %.

в) Постановка антибиотикограммы

1) Стандартизация инокулюма

При постановке антибиотикограммы инокулюм должен содержать 10^3 - 10^5 ЦОЕ/мл. Для этого необходимо предварительное культивирование клинического материала в планшете Микоплазма ДУО. Предварительное культивирование позволяет увеличить концентрацию до 10^6 - 10^7 ЦОЕ/мл. Разведение этой культуры в растворе У9 или аргининовом позволяет достичь необходимой концентрации.

Содержимое лунки X в планшете Микоплазма ДУО обеспечивает стандартизованный инокулюм для M.hominis через 24 и 48 ч культивирования, а для U.spp. через 24 ч

- Для M.hominis

Растворить содержимое ампулы с аргининовым раствором в 2 мл дистиллированной воды и внести туда 20 мкл содержимого лунки X.

- Для *Ureaplasma spp.*

Через 24 ч: Растворить содержимое ампулы с раствором У9 в 2 мл дистиллированной воды и внести туда 20 мкл содержимого лунки Х.

Через 48 ч: Растворить содержимое ампулы с раствором У9 в 2 мл дистиллированной воды и внести туда 200 мкл транспортной среды с внесенным образцом. Внесения материала из лунки Х через 48 ч культивирования не применяется в виду риска аутолиза микроорганизма.

2) Внесение стандартизированного инокулята в S.I.R. микроплату.

В каждую из 16 лунок S.I.R. микроплаты вносится по 100 мкл инокулята.

Микропланшет заклеить адгезивной пленкой и инкубировать при 37 °С в течение 24-48 часов.

г) Пробы, содержащие Uu И Mh.

Если в образце пациента обнаружены как Uu, так и Mh, следует проводить исследование чувствительности на двух микропланшетах S.I.R.. В одну из них вносится инокулят из прекультуры, разведенной в растворе У9 (для штаммов Uu), а в другую - инокулят из прекультуры, разведенной в аргининовом растворе (для штаммов Mh).

7. Считывание результатов и интерпретация

Чувствительность и резистентность штамма к антибиотикам считываются и интерпретируются только в том случае, если в лунке Контроля роста (Тс) цвет среды изменился с желтого на красный.

На практике, микропланшет считывают два раза - через 24 часа и через 48 часов, в последнем случае в целях определения слабо выраженной резистентности к циклинам или в случае сомнительных результатов через 24 ч.

- Наличие 2 желтых лунок означает отсутствие пророста и чувствительный штамм.
- Наличие 2 красных лунок означает пророст в присутствии данного антибиотика и резистентный штамм.
- Если 1 лунка с низкой концентрацией антибиотика красная, а 1 лунка с высокой концентрацией антибиотика желтая, это означает умеренно чувствительный штамм.

Например:

Jm2 -	Jm8 -	желтая/желтая S	Чувствительный штамм (Sensitive strain)
Te4 +	Te8 -	красная/желтая I	Промежуточно чувствительный штамм (Intermediate)
Mn4 +	Mn8 +	красная/красная R	Резистентный штамм (Resistant strain)

Для антибиотиков клиндамицина и пристинамицина, которые представлены только одной концентрацией, возможны только 2 результата: **чувствительный** штамм или **резистентный** штамм. В случае появления оранжевого окрашивания окончательное считывание производить через 48 ч.

8. Пророст других микроорганизмов.

Если цвет раствора изменился на красный, но одновременно при этом среда помутнела, это означает, что произошел пророст других, отличных от микоплазм, микроорганизмов (так как сами по себе микоплазмы не дают замутнения раствора).

1. Клиническое значение

В течение последних лет наблюдается увеличение количества грибковых инфекций, что связано с увеличением количества пациентов со сниженным иммунитетом. В основном снижение иммунитета происходит в связи с использованием агрессивной противоопухолевой химиотерапии, интенсивным, подавляющим иммунитет, лечением при пересадке органов, с применением антибиотиков широкого спектра. Увеличивается количество патогенных видов и устойчивых изолятов. В сложившихся условиях тест *in vitro* на определение чувствительности дрожжей к антигрибковым препаратам может быть полезен. Фунгитест, созданный на основе референсного метода, прост в выполнении и интерпретации и позволяет в стандартизированных условиях определять чувствительность дрожжей к антигрибковым препаратам.

2. Принцип

Фунгитест основан на определении роста дрожжей в присутствии 6 антигрибковых препаратов в 2 различных концентрациях, в модифицированной RPMI 1640 буферной среде, с цветовым индикатором. Оценка роста основана на восстановлении цветового индикатора, который изменяет цвет среды с голубого на розовый. Когда рост подавляется антигрибковыми препаратами, среда остается голубой. Этот тест, представляет собой микропанель с 16 лунками, состоит из:

- 2 лунок контроля роста
- 12 лунок, содержащих лиофилизированные антигрибковые препараты (6 антигрибковых агентов в 2 разных концентрациях)
- 2 лунки отрицательного контроля.

Пограничные значения были выбраны на основании определения МПК в методике, аналогичной Фунгитесту. Это подготовительное исследование проводилось в 2 компетентных лабораториях: Лаборатории микологии Института Пастера в Париже и Иммунологической Лабораторией фармацевтического факультета в Монтепельлиер. Были отобраны 193 штамма, встречающихся в рутинной практике, включая стойкие

штаммы. В этом исследовании было протестировано 8 растворов 6 антигрибковых препаратов, и было получено распределение результатов МПК. Основываясь на графиках распределения и на последних данных литературы, для каждого антигрибкового препарата было выбрано 2 концентрации. Поскольку в настоящее время отсутствуют международные рекомендации, определяющие МПК, выбранные пограничные значения являются компромиссными и могут быть изменены в будущем.

3. Состав набора

Фунгитест включает:

- Микропланшеты: 10 индивидуально упакованных 16-луночных микропланшетов (схема микропланшета указана на маркировке).
- 10 липких лент
- Суспензионная среда: 10 флаконов, содержащих 3 мл готовой к применению среды в суспензии. Каждый микропланшет в комплекте с липкой лентой и влагопоглотителем запечатан в алюминиевую фольгу.

Схема микропанели

T+	T+
5FC2	5FC32
AB2	AB8
MCZ0,5	MCZ8
KET0,5	KET4
ITR0,5	ITR4
FLU8	FLU64
T -	T -

T+ Положительный контроль

5 FC 5- фторцитозин (2-32 мкг/мл)

AB амфотерицин В (2-8 мкг/мл)

MCZ миконазол (0.5-8 мкг/мл)

KET кетоконазол (0.5-4 мкг/мл)

ITR итраконазол (0.5-4 мкг/мл)

FLU флюконазол (8-64 мкг/мл)

T- Отрицательный контроль

4. Хранение

Реагенты хранятся при +2 - 8°C и сохраняют свои качества до истечения срока годности, указанного на упаковке.

5. Необходимые материалы, невошедшие в комплект

- Стерильная дистиллированная вода
- 20 мкл и 100 мкл микропипетки
- Стерильные колбы
- Контроль мутности 1 по МакФарланду. Кат. № 56499
- Инкубатор при 37°C и 32°C.

6. Методика

а. Приготовление суспензии

С помощью пилетки взять 2 одинаковых колонии из чистой свежей культуры, полученной на среде Сабуро с добавлением или без антибиотиков, и размешать в 3 мл стерильной дистиллированной воды. Эта суспензия является первым откалиброванным инокулюмом с мутностью, соответствующей 1 по МакФарланду и содержащая 3×10^6 дрожжей/мл.

Используя дозатор, внести 100 мкл этого инокулюма в 1.9 мл стерильной дистиллированной воды

Внести 20 мкл полученного раствора в содержащуюся в наборе суспензионную среду.

Концентрация инокулюма равна 1×10^3 дрожжей/мл.

б. Инокуляция микропланшетов

С помощью откалиброванной пипетки внести по 100 мкл суспензии по всем лункам микропланшета.

Накрыть липкой лентой.

в. Инкубирование

Инкубировать при 32°C в течение 72 часов для *Cryptococcus neoformans*

При 37°C в течение 48 часов для других дрожжей.

г. Считывание и интерпретация результатов

Считывать результаты только в случае, когда лунки положительного контроля (Т+) розовые.

Наблюдать за изменениями цвета в лунках, содержащих антигрибковые препараты, по сравнению с лунками отрицательного контроля (синий).

Интерпретировать в соответствии с цветом 2 лунок для каждого антигрибкового агента:

Синий-Синий = нет роста: штамм чувствительный к антигрибковому препарату.

Розовый-Синий = слабый рост: промежуточный штамм

Розовый – Розовый = рост: штамм нечувствителен к антигрибковому препарату.

Подготовка инокулюма



24-48 ч культура
на среде Сабуро и т.п.

2 колонии



3 мл стерильной дистиллированной воды
1 по МакФарланду (3×10^6 КОЕ/мл)

100 мкл



1,9 мл стерильной дистиллированной воды

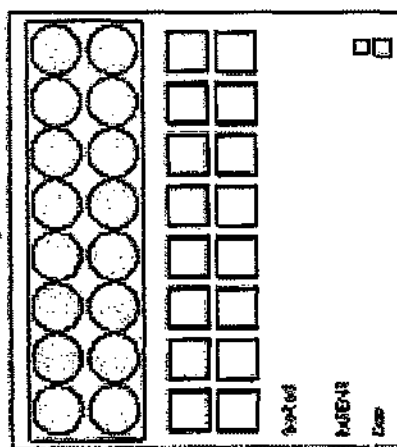
Инокуляция

20 мкл



3 мл суспензионной среды
(10^5 КОЕ/мл)

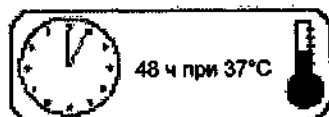
100 мкл/лунку



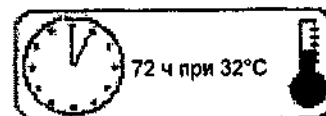
Микропанель Фунгитест

+	+	Положительный контроль
2	32	5- фторцитозин
2	8	амфотерицин В
0,5	8	миконазол
0,5	4	кетоназол
0,5	4	итраконазол
8	64	флюконазол
-	-	Отрицательный контроль

Инкубация



48 ч при 37°C

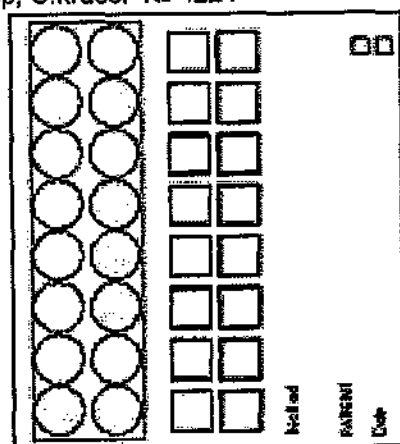


72 ч при 32°C

(Cryptococcus)

Считывание и интерпретация

Например, C.krusei № 4221



Интерпретация

+	+	Положительный контроль
-	-	Чувствительный к 5-фторцитозину
-	-	Чувствительны к амфотерицину В
+	-	Промежуточно чувствительный к миконазолу
+	-	Промежуточно чувствительный к кетоназолу
+	-	Промежуточно чувствительный к итраконазолу
+	+	Резистентны к флюконазолу
-	-	Отрицательный контроль

7. Предупреждения по использованию

Не использовать реагенты после истечения срока годности.

Рекомендации по гигиене и безопасности

Штаммы и инокулированные реагенты являются инфекционными; при обращении с ними следует соблюдать необходимые меры предосторожности. Использованные штаммы и реагенты следует утилизировать в соответствии с правилами, касающимися этого типа продукта.

8. Контроль качества

Качество Фунгитеста[®] контролировали с помощью следующих штаммов:

Штаммы	Результат культивирования в течение 48 ч при 37°C							
	T+	5FC	AB	MCZ	KET	ITRA	FLU	T
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	Pink	S	S/I	S	S	S	S	Blue
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Pink	I	S/I	I	S/I	S/I	I	Blue
<i>C. albicans</i> CIP 884.65	Pink	S	S/I	S	S	S	S	Blue
<i>C. glabrata</i> SDP A35	Pink	S	S	S/I	I	I/R	I/R	Blue
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Pink	S	S	S/I	S	S	S	Blue
<i>C. neoformans</i> SDP B53*	Pink	S/I	S	S/I	S/I	S/I	I/R	Blue

* Инкубация в течение 72ч при 32°C

9. Контроль качества производителя

Все производимые реагенты изготавливаются в соответствие с системой качества компании «Био-Рад», начиная с приема сырья и до продажи продукта. Любой лот поступает на рынок только после прохождения строгой процедуры контроля на предмет соответствия определенным критериям. Вся информация относительно продукта и его контроля хранится в компании «Био-Рад».

10. Список литературы

Смотрите французскую версию

Микоплазма Дуо 62740

20 ТЕСТОВ

Микоплазма Дуо раствор для транспортировки и хранения микоплазм

62739 40 пробирок

НАБОР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ТИТРОВАНИЯ ГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ

I. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.

Микоплазмы - это микроорганизмы-комменсалы, заселяющие слизистую оболочку урогенитального тракта, которые при некоторых обстоятельствах могут, чрезмерно размножаясь, вызывать ряд патологий.

• Ureaplasma urealyticum:

У мужчин уреоплазма может вызывать уретриты (вторая по важности этиология при негонококковых уретритах). Иногда может вызывать простатиты и эпидидимиты [12].

У беременных женщин *U. urealyticum* может приводить к хориоамниониту [13] и преждевременному разрыву плодных оболочек, что приводит к возникновению неонатальной инфекции. Также уреоплазма может вызывать различные нарушения репродуктивной функции.

• Mycoplasma hominis

Микоплазма может быть причиной эндометритов и сальпингитов [12] и обнаруживается при неспецифических вагинитах [8].

Обе урогенитальные микоплазмы могут быть причиной:

- неонатальных инфекций (менингитов, респираторных инфекций, септицемии [9, 10, 12, 13];
- послеродовой септицемии [6, 12];
- артритов.

Так как эти организмы могут быть обычными комменсалами или обладать патогенностью, исследование посевов от взрослых больных обязательно должно носить количественный характер [1, 2, 11]. Поэтому при назначении терапии следует учитывать титр микоплазм и клиническую картину заболевания.

Набор MYCOPLASMA DUO позволяет:

- Культивировать, идентифицировать и дифференциально титровать урогенитальные микоплазмы. Метод с упрощенной интерпретацией позволяет получить точные результаты в течение 24-48 часов.
- Культивировать пробу больного и подготовить стандартизированный инокулят для определения чувствительности к антибиотикам.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА.

Идентификация и титрование урогенитальных микоплазм основаны на специфических метаболических свойствах каждого микроорганизма, которые гидролизуют:

Ureaplasma urealyticum (UU) - мочевины,

Mycoplasma hominis (MH) - аргинин.

При этом образуется ион аммония, и происходит защелачивание среды. Вследствие этого изменяется цвет (с желтого на красный) индикатора кислотности (pH) среды, что позволяет визуализировать реакцию. Таким образом, при желтой окраске содержимого лунок микоплазмы отсутствуют, при красной окраске - микоплазмы присутствуют в пробе.

Подготовка инокулята для теста определения чувствительности к антибиотикам

В лунке X содержится вещество, подавляющее рост грибов, и смесь антибиотиков, позволяющая селективно обогатить пробу, которая через 24 часа инкубации используется при приготовлении стандартизированного инокулята (от 10^3 до 10^5 ЕИЦ/мл) (ЕИЦ - единица изменения цвета) для определения чувствительности к антибиотикам.

III. СОСТАВ НАБОРА.

В состав набора MYCOPLASMA DUO входит:

- 1) 20 микроплат (с рисунком-наклейкой и подписями, которые позволяют определить лунки для идентификации микроорганизмов);
- 2) 20 флаконов, в каждом из которых содержится 2 мл раствора для транспортировки и хранения, предназначенной для сбора и транспортировки проб;
- 3) 1 флакон-раскапыватель с 15 мл разводящего буфера;
- 4) 40 пластиковых микропипеток (для каждой пробы необходимо 2 пипетки);
- 5) 20 липких листков;
- 6) буклет-инструкция;

Каждая микроплата упакована в индивидуальный пакет из фольги, в который положен осушитель.

ВСЕ РЕАГЕНТЫ ГОТОВЫ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ И ПРЕДНАЗНАЧЕНЫ ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.

IV - ХРАНЕНИЕ - СРОК ГОДНОСТИ.

При хранении при температуре от +2°C до +8°C набор MYCOPLASMA DUO имеет срок годности 1 год (считая с даты изготовления).

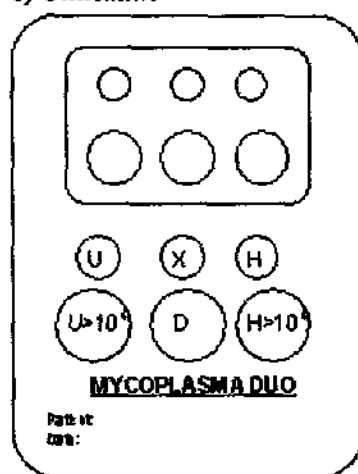
Все компоненты набора, которые хранятся при температуре от +2°C до +8°C, годны до срока, указанного на упаковке набора.

V - НЕОБХОДИМЫЕ ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Инкубатор на 37°C
- Контейнер для биологической инактивации отходов

VI - МИКРОПЛАНШЕТ

1) Описание



На каждой микроплате есть 6 лунок, в которых содержится:

- дегидратированные субстраты для идентификации
- ростовой фактор для микоплазм, обеспечивающий оптимальную чувствительность набора
- антибиотики, угнетающие рост сопутствующей полиморфной флоры и обеспечивающие оптимальную чувствительность набора.

- U и $U \geq 10^4$: идентификация и титрование UU (содержит мочевины)
H и $H \geq 10^4$: идентификация и титрование MH (содержит аргинин)
D: лунка для разведения
X: лунка для селективного обогащения микоплазмами: приготовление образца для определения чувствительности к антибиотикам.

Идентификация: основана на специфическом гидролизе мочевины и аргинина видами микоплазм, присутствующими в пробе. Наличие гидролиза определяется по изменению цвета лунки, содержащей соответствующий субстрат. Среда не должна быть мутной.

- Если покраснела лунка U: в пробе присутствует UU
- Если покраснела лунка H: в пробе присутствует MH
- Если покраснели лунки U и H: в пробе присутствуют и UU, и MH.

Произведенную идентификацию можно подтвердить подсчетом колоний микоплазм, высеванных на агар А7 (код 62761 для микоплазм).

Титрование: основано на принципе разведения в жидкой среде. Проба последовательно разводится в транспортной среде, в лунке D (разведение 10^{-1}) и, наконец, в лунках $U \geq 10^4$ и $H \geq 10^4$ (разведение 10^{-2}). Таким образом может быть определен титр микоплазм.

Этот титр соответствует лунке, цвет которой изменился на красный через 24-48 часов инкубации; в каждой покрасневшей лунке содержится как минимум одна ЕИЦ (единица изменения цвета) - см. рисунки по интерпретации результатов.

Титр микоплазм выражается в количестве ЕИЦ/мл пробы. Данный набор позволяет определить титры порядка 10^3 - 10^4 /мл, которые уже считаются патогенными [7]. Так, *Ureaplasma urealyticum* считается этиотропным фактором уретрита у мужчин при обнаружении титра 10^3 /мл при обнаружении в моче и титра 10^4 - в соскобах из уретры у мужчин. *Mycoplasma hominis* считается патогенной при обнаружении в титре 10^4 /мл в соскобах со стенки влагалища и эндоцервикального канала у женщин.

VII. ЗАБОР ПРОБ.

Отбор

Микоплазмы крайне чувствительны к неблагоприятным условиям окружающей среды, особенно к высыханию и нагреву. Образцы инокулировать в раствор для транспортировки непосредственно после отбора.

Микоплазмы являются пристеночными паразитами, поэтому при использовании тампонов энергично обрабатывать слизистую с целью получения максимального количества клеток. Предпочтительно использовать кальцио-альгинатные, дакроновые или полиэфирные тампоны с алюминиевым или пластиковым стержнем. Избегать использования ватных тампонов на деревянном стержне, поскольку они оказывают ингибирующий эффект.

Для обнаружения урогенитальных микоплазм у мужчин материал предпочтительно забирать тампоном из уретры (моча не рекомендуется). Для женщин допускается использовать материал из цервикального канала, влагалища и мочу. Образцы мочи предпочтительно забирать катетером или иглой путем надлобковой

пункции. Избегать отбора образцов, контаминированных смазками или антисептиками, используемыми в гинекологической практике.

Уретра у мужчин

Поскольку при мочеиспускании часть клеток уретры вымывается, инструктировать пациентов не мочиться в течение 6 ч перед процедурой отбора материала.

Ввести тампон на 2-4 см в уретру.

Умеренно надавливая, провернуть тампон в уретре.

Оставить тампон на 1-2 секунды и осторожно извлечь.

Поместить тампон в раствор для транспортировки.

Цервикальный материал

Стерильным тампоном удалить излишки слизи и экссудат из цервикального канала (они влияют на воспроизводимость теста). Поместить тампон в контейнер для биоотходов.

Ввести тампон на глубину 1-1,5 см в цервикальный канал. Проворачивать с умеренным давлением в течение 5-10 секунд.

Извлечь тампон, избегая контакта со стенками влагалища (на качество теста могут влиять спермициды, кремы и т.д.)

Поместить тампон в раствор для транспортировки.

Материал влагалища

Методика аналогична отбору материала из цервикального канала.

Моча

Образцы мочи транспортировать в лабораторию в течение 2 ч после отбора. В охлажденном состоянии образцы хранить не более 24 ч. В раствор для транспортировки вносить 0,2 мл, после чего хранить как другие образцы (48 ч при комнатной температуре, 72 ч при +2-8°C).

При использовании первой порции мочи:

Гомогенизировать образец

Инокулировать 0,2 мл мочи в 2 мл транспортной среды

Внести в микропланшет в соответствии с инструкцией

При болезненном мочеиспускании:

Центрифугировать и удалить супернатант.

Ресуспендировать осадок в 0,2 мл физиологического раствора (в случае очень мутной мочи – 0,5 мл)

Инокулировать 0,2 мл мочи в 2 мл транспортной среды

Внести в микропланшет в соответствии с инструкцией

Если тип мочи определить затруднительно, использовать методику для болезненного мочеиспускания.

Образцы из глаза

Оттянуть вниз нижнее веко и обнажить конъюнктиву.

Осторожно удалить экссудат и гной стерильным тампоном. Удалить тампон в контейнер для биоотходов.

Используя маленький тампон, смоченный физраствором, осторожно провернуть его, плотно прикасаясь к поверхности нижнего века. Процедуру выполнять осторожно, чтобы не повредить конъюнктиву.

Поместить тампон в раствор для транспортировки.

Экюлят и резе надосадов культуры крови, цереброспинальная жидкость, внутрисуставная жидкость, бронхиальный аспират у новорожденных.

Внести 0,2 мл пробы в 2 мл транспортной среды.

Транспортировка.

Образцы транспортировать при комнатной температуре в течение более чем 48 часов. При +2 -8°C - до 72 ч. Для транспортировки или хранения более длительный период времени замораживать образцы при температуре -70°C. Специальный состав транспортного раствора при -70°C предотвращает гибель патогенов. Хранение при -20°C даже непродолжительный период времени приводит к гибели микроорганизма. Замороженные образцы транспортировать в лабораторию на сухом льде. Для тестирования быстро разморозить образцы на водяной бане при 37°C.

VIII. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Посев на микропласты

1) Разводящий буфер

Используя флакон-раскапыватель, внести по 4 капли (200 мкл) разводящего буфера в каждую из трех нижних лунок микропласты: U $\geq 10^4$, D и H $\geq 10^4$.

2) Внесение проб

Используя микропипетки из набора, внести инокулированный пробой транспортный раствор:

- по 4 капли (100 мкл) в каждую из верхних лунок микропласты: U, X и H;

- еще 1 каплю (25 мкл) в лунку D.

Примечание: в этот момент можно произвести посев на агар A7 для микоплазм (код 62761) нанесением 1-3 капель на поверхность питательной среды. Затем агар инкубируется 24-48 часов при 37 °C в CO2 инкубаторе при 10% концентрации CO2 (MEDPAK CO2; код 50116).

3) Разведение в 10^{-2} раз

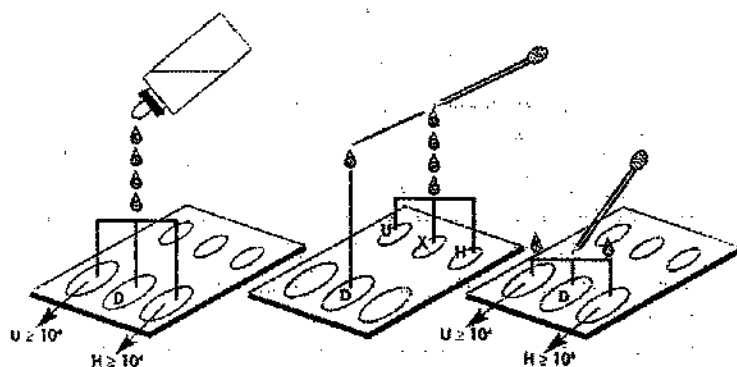
Используя вторую микропипетку (использование второй микропипетки крайне существенно при разведении, так как микоплазмы могут прилипнуть к пластиковой поверхности первой пипетки), тщательно перемешать содержимое лунки D (пипетировать содержимое 3 раза), набрать жидкость в пипетку и перенести 1 каплю (25 мкл) в лунку $U \geq 10^4$ и 1 каплю (25 мкл) в лунку $H \geq 10^4$.

Инкубация

- заклеить микроплату липкой пленкой;
- инкубировать микроплату в течение 24 часов при 37 °С, затем при необходимости (см. раздел IX) продолжить инкубацию до 48 часов.

Суспензионная среда

Замочите тампон в суспензионной среде



Посев

Инокулированная суспензионная среда

4 капли
200 мкл

Дилуэнт
1 капля
25 мкл

4 капли
100 мкл

1 капля 25 мкл

Инкубация

При 37 °С от 24 до 48 ч

IX. ПОЛУЧЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Считывание результатов

- Первые результаты считывают через 24 часа инкубации. При этом при наличии положительной реакции в лунке с высоким титром ($\geq 10^4$ ЕИЦ/мл) получают окончательный результат.
- Второй раз считывают результаты через 48 часов в следующих случаях:
 - если нужно подтвердить отрицательный результат;
 - определить присутствие микоплазм в низких титрах ($< 10^4$ ЕИЦ/мл);
 - определить штаммы, присутствующие в высоком титре ($\geq 10^4$ ЕИЦ/мл), но характеризующиеся медленным метаболизмом

Интерпретация результатов

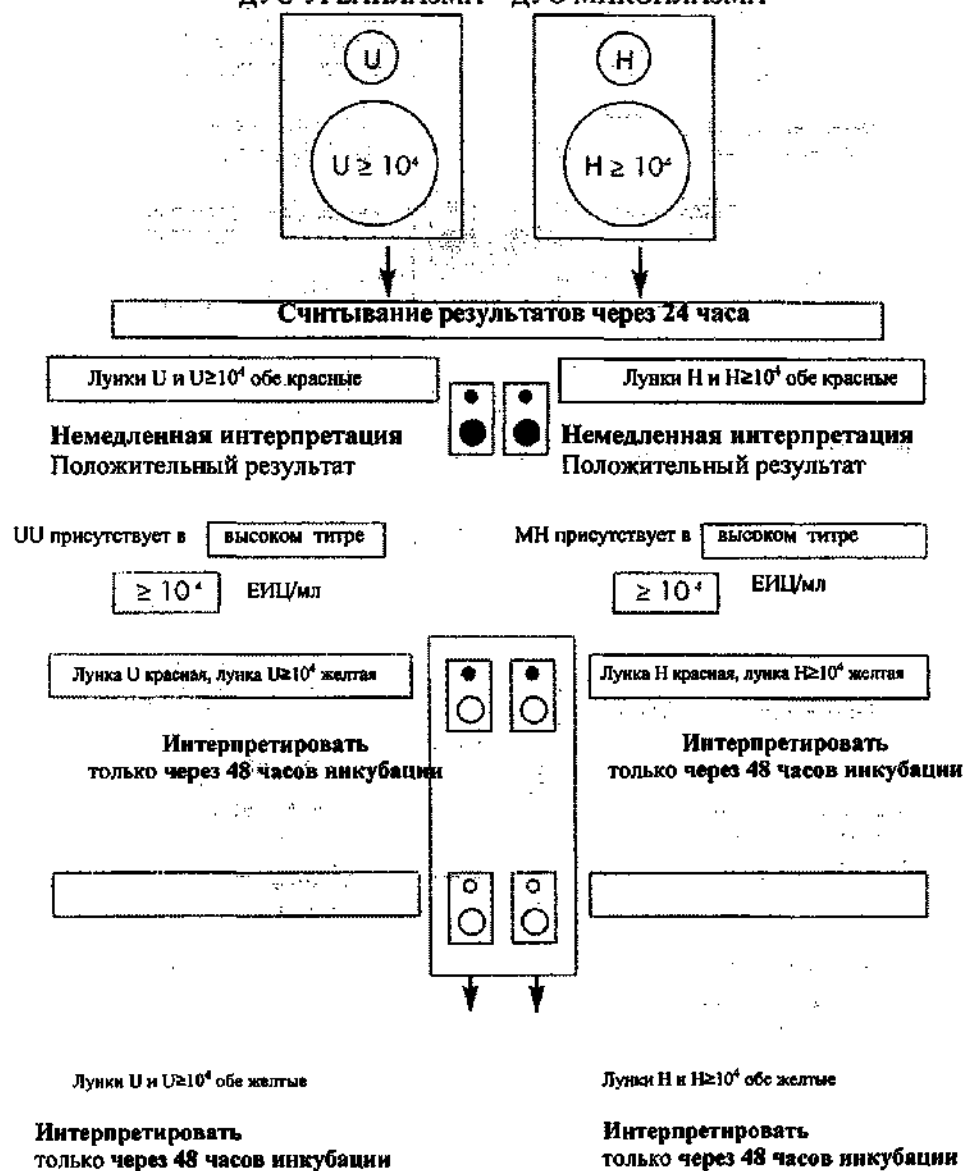
- красная лунка (лунки) U: наличие UU. H: наличие МН.
- желтая лунка (лунки) U: отсутствие UU. H: отсутствие МН.

Алгоритмы считывания и интерпретации результатов одинаковы для обоих видов микоплазм.

Для оценки уреоплазмы считывайте лунки U и $U \geq 10^4$, а для микоплазмы лунки H и $H \geq 10^4$.

Тест МИКОПЛАЗМА ДУО позволяет отдельно титровать два вида микоплазм, которые могут одновременно присутствовать в пробе.

ДУО УРЕАПЛАЗМА ДУО МИКОПЛАЗМА



Продолжить инкубацию еще на 24 часа,
Результат можно интерпретировать только через 48 часов инкубации

Считывание результатов через 48 часов

Лунки U и $U \geq 10^4$ обе красные

Интерпретация:
Положительный результат

UU присутствует в
высоком титре

$\geq 10^4$

Лунки H и $H \geq 10^4$ обе красные

Интерпретация:
Положительный результат

МН присутствует в
высоком титре

$\geq 10^4$

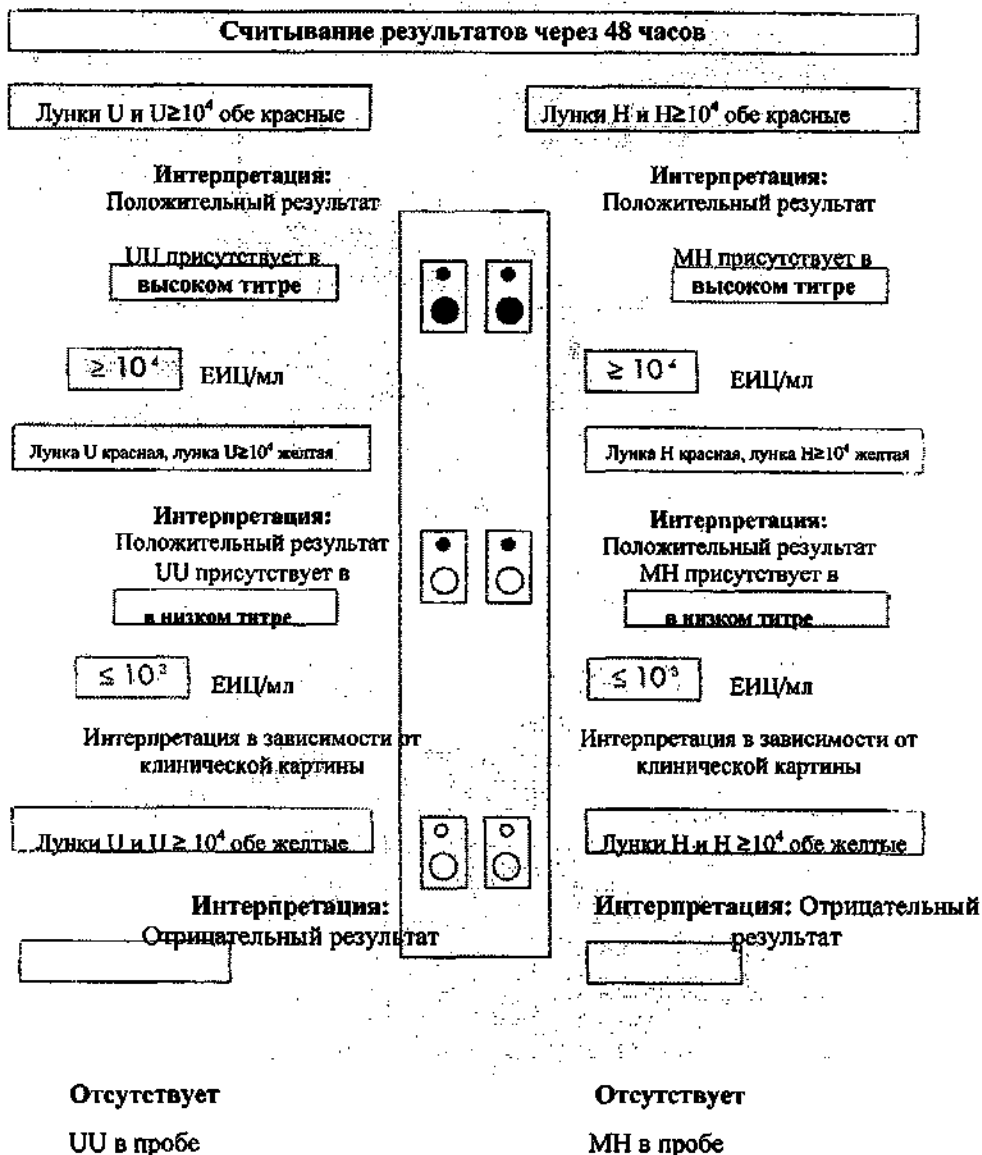
Лунки U и U $\geq 10^4$ обе желтые

Лунки H и H $\geq 10^4$ обе желтые

Интерпретировать
только через 48 часов инкубации

Интерпретировать
только через 48 часов инкубации

Продолжить инкубацию еще на 24 часа,
Результат можно интерпретировать только через 48 часов инкубации



Набор MYCOPLASMA DUO позволяет дифференцированно определить титр 2 видов микоплазм, которые могут присутствовать в пробе одновременно.

С помощью набора MYCOPLASMA DUO пробы могут быть отнесены к следующим группам:

- Отрицательные;
- Положительные в отношении UU: изменение цвета наблюдается только в U лунках;
- Положительные в отношении MH: изменение цвета наблюдается только в H лунках;
- Положительные как в отношении UU, так и в отношении MH: изменение цвета в лунках U и H указывает на то, что оба вида присутствуют в пробе одновременно. Следует определять титр для каждого вида отдельно.

Примечание:

- Замутнение среды указывает на пророст других бактерий (такое случается редко из-за селективных антибиотиков, присутствующих в среде). В этом случае результаты интерпретируются с учетом посева на агар A7.

Для чего нужна лунка X

Результаты с лунки X не считаются и не интерпретируются. Она предназначена для селективного роста и обогащения среды микоплазмами для приготовления стандартизированного инокулята для теста определения чувствительности к антибиотикам (SIR MYCOPLASMA ® код 62780):

Содержимое лунки X разводится 1/100:

- с использованием питательной среды U9 (код 62753) для UU;
- с использованием питательной среды с аргинином (код 62756 или 62758) для MH;

Это делается переносом 20 мкл содержимого лунки в 2 мл питательной среды с мочевиной или аргинином (в зависимости от вида микоплазмы).

В каждую лунку панели SIR MYCOPLASMA вносится по 100 мкл такого 1/100 разведения.

Характеристики и контроль качества

Процедура контроля качества описана ниже.

Специфичность теста Микоплазма Дуо проверяли с использованием *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* и *Sacharomyces cerevisiae*, в концентрации 104 - 105 в 100 мкл транспортной среды. Тест на стерильность и специфичность транспортной среды выполняли на *Staphylococcus aureus* и *Mycoplasma*.

Штаммы	Контроль активности	Концентрация
<i>Ureaplasma urealyticum</i> ref UU 80	Удовлетворительная идентификация, определение титра и обогащение	
<i>Mycoplasma hominis</i> ref MH 31	Удовлетворительная идентификация, определение титра и обогащение	
Контроль ингибирования в микропланшете		
<i>Enterococcus faecalis</i> CIP 76117	Ингибирование	104 - 105 КОЕ/мл
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	Ингибирование	104 - 105 КОЕ/мл
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (внутренний)	Ингибирование	104 - 105 КОЕ/мл
<i>Candida albicans</i> (внутренний)	Ингибирование	1104 - 105 КОЕ/мл
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (внутренний)	Ингибирование	104 - 105 КОЕ/мл
<i>Proteus vulgaris</i> (внутренний)	Ингибирование	104 - 105 КОЕ/мл
Контроль ингибирования среды		
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 52148	Ингибирование	104 - 105 КОЕ/мл

Ограничение теста

Концентрация антибиотиков в тесте Микоплазма Дуо предназначена для ингибирования роста бактерий в максимальной концентрации 10⁵ КОЕ/мл.

Если бактерии присутствуют в пробе в большей концентрации, они могут давать положительную реакцию. В таком случае использовать обычные бактериологические методы. 5

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 20 листов
Генеральный директор
ООО «Био-Рад Лаборатории»

/Е.В. Бобр

