

ARBEITSANLEITUNG

(Auszug aus der Anleitung des Herstellers)

Identifizierung und Resistenzbestimmung urogenitaler Mykoplasmen

Testkit mit 20 Einzeltests. Wachstumstechnik im Flüssigmedium zum Nachweis, zur Identifikation und Resistenzbestimmung (gegen 9 Antibiotika) urogenitaler Mykoplasmen. Zeitdauer: 24-48 Stunden.

Testprinzip

Der Test dient der kulturellen Identifizierung, Differenzierung und Keimzahlbestimmung von Mykoplasmen aus Nativmaterial durch Wachstum in Nöpfchen mit unterschiedlichem Antibiotika-Zusatz: Nöpfchen mit Lincomycin erlauben nur das Wachstum von *Ureaplasma urealyticum* (*U.u.*). Nöpfchen mit Erythromycin erlauben nur das Wachstum von *Mycoplasma hominis* (*M.h.*). Die Auswertung des Tests erfolgt nach 24-48 Stunden durch Farbumschlag des Mediums von gelb nach rot.

Komponenten des Testkits

20 Flaschen Transportmedium (T-Broth; jeweils 2 ml)
10 Packungen mit RT Twin-Teststreifen (enthalten 2 Teststreifen mit jeweils 12 Nöpfchen, abbrechbar;
NEU: lyophilisiertes für *M.h.* und *U.u.* jeweils optimiertes Medium in den Nöpfchen der Teststreifen)
2 Flaschen mit 6,5 ml Paraffinöl, 20 Pipettenspitzen, 20 Tupfer, Packungsbeilagen mit Arbeitsanleitung.
Ständer für Fläschchen und Teststreifen (Bestell-Nr. MD1002568) können zusätzlich bestellt werden.

Probenmaterial zur Mykoplasmandiagnostik (s. auch Packungsbeilage des Herstellers)

Urethral-Abstriche	Ejakulat - 200 µl (4-6 Tropfen, kein Überstand)
Zervikal-Abstriche	Urin (Blasen-Urin) - 200 µl (4-6 Tropfen, nicht zentrifugieren)
Vaginal-Abstriche	Ausfluss-Sekret - 200 µl (4-6 Tropfen)
Eiterhaltige Abstriche	Endometrium-Biopsien

Beachten Sie bitte: Mykoplasmen haften bevorzugt an Oberflächen und Zellen. Untersuchungsmaterial sollte daher so viel zelluläres Material wie möglich enthalten!

Testdurchführung

T-Broth = Transportmedium, MycoView® RT-Teststreifen

1. Vor Testbeginn alle Komponenten Raumtemperatur erreichen lassen.
2. **Inokulation der Keimprobe:** Abstrichmaterial rasch in die Flasche mit Transportmedium überführen. Den verwendeten Tupfer an der inneren Glaswand auspressen.
 - Bei Flüssigkeiten 200 µl (4-6 Tropfen), bei Gewebsbiopsien das Biopsat verwenden.
 - Bei Proben aus Transportgefäßen etwa 500 µl Flüssigkeit in das Wachstumsmedium pipettieren.
3. Flasche mit inokuliertem Transportmedium verschließen, sanft schütteln. Flasche mit Patientendaten beschriften und kühl lagern. Test entweder sofort oder - z.B. bei Versand oder Wochenende - spätestens nach 48-72 Stunden weiterführen.
4. **Zur Testdurchführung** Reagenzien Raumtemperatur erreichen lassen. Teststreifen aus der Packung nehmen; pro Patienten einen Teststreifen entnehmen (abbrechen) und mit Patientendaten kennzeichnen. Nicht benötigten Teststreifen in die Packung mit dem Trocknungsmittel zurücklegen, verschließen und im Testkit im Kühlschrank aufbewahren. Transportmedium insbesondere nach Aufbewahrung sehr gut mischen! Evtl. Vortex-Schüttler verwenden. Haftung der Mykoplasmen an der Glasoberfläche berücksichtigen!
5. Abdeckfolie bei „open“ bis zum Ende des Teststreifens abziehen, aber nicht entfernen. Jeweils 100 µl (2-3 Tropfen) Testmedium in die 12 Nöpfchen eintropfen. Nöpfchen mit jeweils 1-2 Tropfen Paraffinöl überschichten. Teststreifen mit der anheftenden Folie fest verschließen, in den Ständer platzieren und im Brutschrank bei 36 ± 1°C für 24 Stunden inkubieren.
6. Patienten-Transportmedium (etwa 1.5 ml) bis zum Untersuchungsergebnis bei +2/+4°C aufbewahren.

Test immer nach 24 Stunden auswerten. Eine Farbänderung des Mediums in den Nöpfchen von gelb nach rot bedeutet Wachstum (Metabolismus) von Mykoplasmen = positiver Befund. Das Medium in den 12 Nöpfchen muss klar sein; Eintrübungen weisen auf das Wachstum von Hefen oder starke bakterielle Kontaminationen hin. Je nach Eintrübung ist eine Wiederholung des Tests mit dem aufbewahrten Patienten-Testmedium erforderlich. Auswertung des Teststreifens wie folgt:

1. Prüfen Sie zuerst die Wachstumskontrolle (Nöpfchen 1), bevor Sie den Teststreifen auswerten. Liegt keine Farbänderung von gelb nach rot vor, ist der Test negativ.
2. Identifizierung von **U.u.** nach einer Inkubation von 24 Stunden:
Nöpfchen 2 und 4 sind positiv, wenn **U.u.** einen hohen Titer von $\geq 10^4$ CCU/ml im Untersuchungsmaterial aufweist. Ist nur Nöpfchen 4 positiv, liegt **U.u.** in einem niedrigeren Titer ($< 10^4$ CCU/ml) vor.
3. Identifizierung von **M.h.** nach einer Inkubation von 24 bis 48 Stunden:
Nöpfchen 3 und 5 sind positiv, wenn **M.h.** einen hohen Titer von $\geq 10^4$ CCU/ml im Untersuchungsmaterial aufweist. Ist nur Nöpfchen 5 positiv, liegt **M.h.** in einem niedrigeren Titer ($< 10^4$ CCU/ml) vor.
4. Bleibt das Medium in einem der Nöpfchen für die Resistenzbestimmung (Antibiogramm, Nöpfchen 4-12) gelb, wird das Wachstum der Mykoplasmen-Spezies durch das vorliegende Antibiotikum in der gegebenen Konzentration inhibiert (= sensitive Reaktion)
5. Bei einem Farbwechsel in einem der Nöpfchen 4-12 von gelb nach rot besteht Resistenz der Mykoplasmen- Spezies gegen das vorliegende Antibiotikum in der gegebenen Konzentration (= resistente Reaktion).

Auf dem Teststreifen vorgegebene Antibiotika-Abkürzungen (s. auch Packungsbeilage des Herstellers):

Lincomycin (L 8 µg/ml)	Erythromycin (E 4 µg/ml)	Roxithromycin (ROX 4 µg/ml)
Azithromycin (AZM 4 µg/ml)	Josamycin (JM 4 µg/ml)	Minocyclin (MNO 8 µg/ml)
Doxycyclin (DO 8 µg/ml)	Ofloxacin (OFX 4 µg/ml)	Ciprofloxacin (CIP 2 µg/ml)

Ergänzende Hinweise:

Mykoplasmentiter in einem Bereich von 10^3 - 10^4 CCU/ml gelten als pathogene Titer.

Bei einer Urethritis findet sich ein Titer von 10^3 CCU/ml für **U.u.** im männlichen Urin; in urethralem Untersuchungsmaterial beträgt der Titer dann 10^4 CCU/ml für **U.u.** in männlichen Proben bzw. 10^4 CCU/ml für **U.u.** oder **M.h.** in endozervikalen oder vaginalen Proben.

Zur genaueren Identifizierung von **M.h.** kann der Teststreifen bis zu 48 Stunden inkubiert werden, bis eine Farbänderung nach rot (selten pink) erfolgt ist. Keimzahlgröße: CCU = Colour Changing Unit.

Anmerkung

Mykoplasmen finden sich oft als harmlose Kommensalen im Urogenitalbereich. Ihre Fähigkeit zur Entwicklung pathogener Eigenschaften mit weitergehender Besiedlung innerer Organe (Prostata, Uterus, Tuben) erfordert eine Überwachung des Mykoplasmen-Titers bei Infektionsverdacht. Ein positiver Befund wird innerhalb von 24-48 Stunden durch Rotfärbung des Mediums in den Nöpfchen angezeigt. Eine spätere Rotfärbung (z.B. nach 72 Stunden) ist für Urogenitalproben nicht mehr signifikant, kann aber für anderes Probenmaterial, das nicht urethraler, vaginaler oder zervikaler Herkunft ist, als potentiell klinisch relevanter / pathogener Befund interpretiert werden.

Wichtige Hinweise (s. auch Packungsbeilage des Herstellers):

Testverfahren zur professionellen Anwendung. Nur zur Diagnostik *in vitro*! Testkit im Kühlschrank bei +2/+4°C lagern. Verwendbar bis zum angegebenen Datum. Vor Gebrauch Arbeitsanleitung sorgfältig lesen! Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit potentiell infektiösem Probenmaterial beachten!

Wochenende/Feiertage: Patienten-Testmedium kann bei +2/+8°C für 48-72 Stunden aufbewahrt werden. Der resultierende Titerabfall ist zu vernachlässigen. Auswertung evtl. zeitlich um 2-6 Stunden verlängern.

Alle Bestandteile des Kits und das zur Testdurchführung verwendete Material sind eigenverantwortlich und sachgerecht zu entsorgen! Beachten Sie bitte bestehende Vorschriften!