

MYCOFAST® Revolution 2

Дијагностика урогениталних микоплазми

Детекција

Квантификација

Идентификација

Тестирање

антибиотске

СРВ 0410_SR-2023-08

Искључиво за ин витро дијагностику и професионалну употребу
Тестови су намењени искључиво за једнократну употребу.



1 - НАМЕНА

MYCOFAST Revolution 2 је дизајниран за детекцију, квантификацију и идентификацију *Ureaplasma Urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) и *Mycoplasma hominis* (M.h.) из различитих клиничких узорка. Тест MYCOFAST Revolution 2 такође испитује и осетљивост U.u. и M.h. на антибиотике према препоруци CLSI (Институту за клиничке и лабораторијске стандарде) (2).

2 - УВОД

Микоплазме, које укључују неколико врста које су до сада пронађене код људи, припадају класи Mollicutes. Разликују се од осталих бактерија одсуством ћелијског зида, стога и природном резистенцијом на лактаме, као и присуством мембране која је богата стеролима, која се ствара атхезијом за еукариотске ћелије. Пошто су микоплазме релативно осетљиве, оне ће расти једино у ацелуларној култури у присуству различитих фактора раста и на оптималној температури од 37°C (4).

Већина хуманих микоплазми су коменсали. Најчешће се јављају врсте издвојене из урогениталног тракта, *U. urealyticum* и *M. hominis*. Врста *U. urealyticum* дели се на два биовара: *U. urealyticum* и *U. parvum* (U.u.).

U.u. и M.h. могу бити патогене. Оне су одговорне за гениталне инфекције код мушараца (не-гонококни уретритис, епидидимитис, простатитис, неплодност); женске гениталне инфекције (бактеријска вагиноза, ендометритис, салпингитис); репродуктивни поремећаји (хориоамниотитис, пост-порођајни ендометритис, превремени порођај, спонтани абортус); неонаталне проблеме (мала тежина на рођењу, респираторне и неуролошке инфекције, бактеријемие, апсцеси); Вангениталне инфекције (септички артритис, реактивни артритис, друге инфекције) (1).

Дијагностика микоплазма инфекција зависи од одређивања патолошког прага, након чега следи пребројавање. Појава резистенције U.u. и M.h. на одређене лекове, захтева тестирање антимикробне осетљивости (5, 6). Тестирање лекови и критеријуми тумачења прилагођени су лечењу инфекција микоплазмом у урогениталном тракту или другим вангениталним системима (2).

3 - ПРИНЦИП

MYCOFAST Revolution 2 је течна метода која се заснива на способности U.u. и M.h. да метаболишу уреу и аргинин понаособ. Раст микоплазми у течном медијуму доводи до промене боје медијума, који садржи индикатор - фенол црвено - од жуто-наранџасте до црвене, што указује на алкализацију медијума услед ослобађања амонијака.

Тако посматран раст микоплазме омогућава:

- бројање на основу брзине хидролизе урее и аргинина, која је пропорционална броју бактерија садржаних у узорку.
- Тестирање осетљивости U.u. и Mh на антибиотике.
- За мешовите узорке (U.u. + Mh), тест омогућава тумачење осетљивости сваке врсте на тестиране антибиотике.

4 - РЕАГЕНСИ

Опис	Број
UMMt: Бочица од 3 mL микоплазма медијума са антибиотцима и конзервансима. pH: 6,0 ± 0,1.	25
MYCOFAST Revolution 2: Тест са 24 поља упакован у алуминијумску врећу са интегрисаним средством.	25
Систем затварања: Заштитни поклопац од прозирне пластике за покривање засејаног теста.	25

MYCOFAST Revolution 2 Тест у сваком од 24 поља садржи дехидрирани микоплазма медијум за култивацију (коњски серум, цистеин екстрахован из квасца, аргинин, уреа, фенол црвено, антибиотике, pH: 6,1 ± 0,1) и састоји се из два одвојена дела.
- део за бројање и тестирање осетљивости на антибиотике U.u. врста (поља означена црном бојом).
- део за бројање и тестирање осетљивости на антибиотике M.h. врста (поља означена црвеном бојом)

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24						
	DOX		LVX		MXF		CLI		TET							
	4	8	1	2	0.25	0.5	0.25	0.5	4	8						
14	MYCOFAST® Revolution 2										2	DOX	13			
1											1		12			
	Uu		Uu		2		4		8		16		1		2	
	10 ⁴		≥10 ⁵		LVX		MXF		ERY		TET					
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11						

Дијагностички део U.u. врсте (црне):

Поља 1/2/3: Идентификација и бројање U.u. на 10³, 10⁴ и ≥ 10⁵ UCC/mL (пуфер и линкомицин, инхибира раст M.h.).

Поља 4/5: испитивање осетљивости U.u. на левофлоксацин (LVX) 2 / 4 µg/mL

Поља 6/7: испитивање осетљивости U.u. на моксифлоксацин (MXF) 2 / 4 µg/mL

Поља 8/9: испитивање осетљивости U.u. на Erythromycin (ERY) 8 / 16 µg/mL

Поља 10/11: испитивање осетљивости U.u. на тетрациклин (TET) 1-2 µg/mL

Поља 12/13: испитивање осетљивости U.u. на доксициклин (DOX) 1-2 µg/mL

Бушотине 4 до 13 садрже уреу, (специфични супстрат врсте U.u.) и линкомицин, (инхибитор раста M.h.).

Део намењен дијагнози врсте M.h. (у црвеној боји):

Поље 14: Идентификација и бројање Mh за вредности ≥ 10⁴ UCC/mL (пуферски раствор и еритромицин који инхибирају раст U.u.)

Поља 15/16: испитивање осетљивости M.h. на доксициклин (DOX) 4-8 µg/mL

Поља 17/18: испитивање осетљивости M.h. на левофлоксацин (LVX) 1-2 µg/mL

Поља 19/20: испитивање осетљивости M.h. на моксифлоксацин (MXF) 0,25-0,5 µg/mL

Поља 21/22: испитивање осетљивости M.h. на клиндамицин (CLI) 0,25-0,5 µg/mL

Поља 23/24: испитивање осетљивости M.h. тетрациклин (TET) 4-8 µg/mL

Бушотине 15 до 24 садрже Аргинин (специфични супстрат врсте M.h.) и Еритромицин (инхибитор раста U.u.).

5 - МЕРЕ ПРЕДОСТРОЖНОСТИ

Реагенси су искључиво намењени за ин витро дијагностику и њима смеју руковати само овлашћена лица.

Узорци и инокулисани реагенси су потенцијално заразни и зато се са њима мора поступати уз уобичајене мере предострожности у складу са хигијенским прописима и директивама државе у којој се користе.

Реагенси који садрже сировине животињског порекла морају бити третирани мером предострожности које су на снази.

Не користити реагенсе након истека рока употребе.

Не користити оштећене или непрописно складиштене реагенсе.

Позитиван резултат методом MYCOFAST подразумева колонизацију урогениталног микоплазмом, али се не може користити самостално за успостављање клиничке дијагнозе. Дијагнозу мора успоставити лекар у складу са биолошким резултатима и клиничким знацима.

6 - ПРИКУПЉАЊЕ И ОБРАДА УЗОРАКА

6.1 Узорковање

Цервико-вагинални узорци

Користити искључиво дакронски или рајонски брис или цито-четкицу. Цервикс пажљиво обрисати помоћу бриса, да би се уклонио секрет, пре узорковања, помоћу новог бриса. Како микоплазме снажно адхерирају за мукозне ћелије, мукозни слој треба добро остругати у циљу добијања богатог узорка.

Уретрални узорци

Очистити канал, а затим узорковати помоћу бриса или стругањем..

Сперма, урин

Узорковати сперму или први јутарњи урин у стерилну епрувету или бочицу.

6.2 Транспорт у UMMt медијуму

Узорци бриса: Убацити брис у бочицу са 3 mL UMMt медијума.

Тежни узорци: Инокулисати бочицу са 3 mL UMMt медијума са 300 µL хомогенизоване течности.

6.3 Складиштење у UMMt медијуму

Инокулисани UMMt медијум се може чувати на собној температури (18-25° C) 20 сати или 56 сати на температури 2-8° C. За чување у трајању од три дана на -20° C, претходно додати 2 капи „MYCOPLASMA Stabilizer“.

7 - ПРИПРЕМА И ЧУВАЊЕ РЕАГЕНАСА

Сви реагенси су спремни за употребу. Реагенси се могу чувати на 2-8° C у њиховом оригиналном паковању до датума истека рока који је назначен на паковању.

UMMt-медијум се привремено може чувати на собној температури (3 месеца), али је стабилнији на 2-8° C.

8 - НЕОПХОДАН МАТЕРИЈАЛ КОЈИ НИЈЕ ОБЕЗБЕЂЕН

Прибор за узорковање (брисеви, цито-четкице, стерилне посуде за узимање течних узорка), пипете и наставци.

MYCOPLASMA Stabilizer (кат.бр. 00064) ако је потребно чување узорка у UMMt 3 дана на -20° C; инкубатор на 37 ± 1° C; контејнер за контаминирани отпад и минерално уље

9 - МЕТОДА

Темперирати реагенсе на собну температуру (20-30 минута).

9.1 Инокулација теста

Уклонити адхезивни филм повлачењем траке и додати у поља сваког реда следеће:

Поља 1-24 100 µL инокулисаног UMMt-Медијума
Поља 1-24 2 капи минералног уља

Покрити тест поклопцем. Обележити узорак.

Чувајте преостали UMMt-медијум на температури од 2-8° C најмање 48 сати како би се евентуално могла извршити провера.

9.2 Инкубација теста

Инкубирати тест на 37 ± 1 °C током 24 сата.

За пребројавање U.u. и M.h. читати резултате након 24 сата. Инкубација може бити продужена до 48 сати једино у случају течних узорка који су негативни након 24 сата.

10 - ЧИТАЊЕ И ТУМАЧЕЊЕ

10.1 Валидација

Проверити да ли су сва поља у реду бистра. Замућења у пољу указују на бактеријску контаминацију. У овом случају поновити тестирање.

10.2 Читање и интерпретација

Резултати се читају на основу боје добијене у различитим пољима. Раст урогениталних микоплазми је индикуван када медијум добије црвену боју (алкално). Ако нема раста урогениталних микоплазми медијум остаје жуте боје.

Наранџасту боју треба сматрати позитивним тестом (гранична вредност). Ако се резултат чита након 48 сати за течне узорке са негативним тестом након 24 сата, открива се само присуство микоплазме, без пребројавања. За тумачење резултата погледати табелу за резултате.

10.2.1 Бројање (поља 1, 2, 3 и 14)

Поља која су се обојила у црвено се идентификују и тумаче на следећи начин:

1	U.u. вредност од 10^3 CCU/mL
1 и 2	U.u. вредност од 10^4 CCU/mL
1, 2 и 3	U.u. вредности $\geq 10^5$ CCU/mL
1-4	M.h. вредност $\geq 10^4$ CCU/mL

Патолошка улога микоплазми у урогениталним инфекцијама тумачи се према одређеним препорукама (1,3,7). Уобичајене забележене патолошке вредности *U. urealyticum* су:

$\geq 10^4$ UCC/mL за уретрални или ендотрахеални узорак, $\geq 10^3$ UCC/mL за први јутарњи узорак урина или сперме (мада се у новој локалној препоруци помиње граница од $\geq 10^4$ UCC/ml за сперму(7)). Присуство *M. hominis* у вредности од $\geq 10^4$ UCC/mL у цервиковагиналном узорку је патолошко (1, 3).

10.2.2 Тест осетљивости на (поља од 4 до 13, а затим 15 до 24)

Промена боје медијума у црвену у пољима која садрже антибиотике, указује на присуство бактеријског раста и самим тим на резистенцију на антибиотике у концентрацији која се тестира. Жута боја медијума указује на одсуство бактеријског раста и самим тим на осетљивост на антибиотике у концентрацији која се тестира. Сојеви су окарактерисани као осетљиви или резистентни на антибиотике према следећим критеријумима тумачења које је дефинисао CLSI (2) за левофлоксацин, моксифлоксацин, клиндамицин, тетрациклин, еритромицин и телитромицин.

Табела са критеријумима MIC ($\mu\text{g/mL}$):

Класа	Антибиотик	U.u.		M.h.		Напомене
		S	R	S	R	
Хинолони	Левифлоксацин	≤ 2	≥ 4	≤ 1	≥ 2	
	Моксифлоксацин	≤ 2	≥ 4	$\leq 0,25$	$\geq 0,5$	
Линкозамиди	Клиндамицин			$\leq 0,25$	$\geq 0,5$	
Тетрациклини	Тетрациклин	≤ 1	≥ 2	≤ 4	≥ 8	
	Доксициклин	≤ 1	≥ 2	≤ 4	≥ 8	
Макролиди	Еритромицин	≤ 8	≥ 16			Сојеви који су осетљиви на еритромицин такође су осетљиви на азитромицин.

Помоћ при интерпретацији:

Тестирање осетљивости за U.u.

Антибиотик	LVX			MXF			ERY			TET			DOX		
	2	4	инт*	2	4	инт*	8	16	инт*	1	2	инт*	1	2	инт*
Профил	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

инт* = интерпретација

Тестирање осетљивости за M.h.

Антибиотик	LVX			MXF			CLI			TET			DOX		
	1	2	инт*	0,25	0,5	инт*	0,25	0,5	инт*	4	8	инт*	4	8	инт*
Профил	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

инт* = интерпретација

Сој се сматра осетљивим када је његов раст инхибиран у обе критичне концентрације антибиотика. Сој се сматра резистентним, ако му је раст инхибиран вишом критичном концентрацијом антибиотика, али не и нижом критичном концентрацијом, или када му раст није инхибиран вишом и нижом критичном концентрацијом антибиотика. Сојеви *M. hominis* су природно резистентни на макролиде (14 и 15 атома угљеника), укључујући еритромицин. У неким популацијама резистенција на тетрациклин може достићи 45% за U.u. и 39,6% за M.h. (2). Резистенција према хинолонима (U.u. и M.h.) (5, 6) и клиндамицину је описана, али стопа није позната.

11 - ПОСЕБНИ СЛУЧАЈЕВИ

Ако су вредности U.u. или M.h. врло високе, сва поља у тесту се боје црвено. Тада се препоручује разблаживање узорка ради тачнијег резултата. У овом случају, поступати на следећи начин: Инокулисати нову бочицу 3ml UMMt-a са 300 μL оригиналног UMMt медија који је чуван на 2-8 °C (§ 9.1).

Инокулисати нови тест са овим новим инокулисаним UMMt-медијумом.

При тумачењу бројања мора се узети у обзир разблажење (1:10). Ако је потребно, потврдите присуство микоплазми на A7 агару поновним изоловањем са оригиналног UMMt-медија складаштог на 2-8 °C (§ 9.1).

Нестабилна температура инкубације или <36 °C (често отварање инкубатора, хетерогеност температуре у грејној комори ...) могу успорити кинетику раста микоплазми.

12 - КОНТРОЛА КВАЛИТЕТА

Контрола квалитета може се обавити помоћу лиофилизованих сојева *U. urealyticum* или *M. hominis* производа MYCOPLASMA CONTROL Kits (Кат.бр. 00900) или из лиофилизованог референтног соја (*U. urealyticum* ATCC 27815 или *M. hominis* ATCC 23114, који су претходно калибрисани на 10^{4-5} UCC/ml Инокулисати MYCOFAST Revolution 2 тест и тестирати на начин који је описан у овом упутству. (§9 и 10)

Очекивани резултати (ATCC):

MYCOFAST Revolution 2

	U.u. 10^3	U.u. 10^4	U.u. $\geq 10^5$	M.h. $\geq 10^4$	LVX	MXF	ERY	TET	DOX	CLI
U.u.-coj ATCC 27815	+	+	+/-	-	S	S	S	S/R	S	НИ*
M.h.-coj ATCC 23114	-	-	-	+	S/R	S	НИ*	S	S	S

НИ* (Не може се тумачити)

13 - ОГРАНИЧЕЊА МЕТОДЕ

Неке бактерије, које су присутне у количини $>10^{6-7}$ CFU/mL и садрже уреазу могу да доведу до промене боје свих поља. Присуство ових бактерија се може потврдити изолацијом из оригиналног UMMt медијума који је чуван на 2-8 °C (§ 9.1), на чоколадном агару.

Узорак са алкалним pH ($\text{pH} \geq 8$) може довести до промене боје UMMt медијума. У овом случају, разблажити узорак (1:10) у другом UMMt-медијуму и тумачити резултате узимајући у обзир фактор разблажења. Кисели узорак са pH-вредношћу ($\text{pH} \leq 5$) може успорити промену боје. Узорак који садржи крв може довести до промене боје у пољима MYCOFAST Revolution 2 теста, и може се тумачити као позитиван резултат. У овом случају, разблажити узорак (1:10) у другом UMMt-медију и тумачити резултат узимајући у обзир фактор разблажења.

Узорак са ниском концентрацијом микоплазми ($<10^3$ UCC/mL) може довести до насумичне промене боје у различитим пољима теста. Као и код било које друге методе испитивања микроба, квалитет узорка може да утиче на резултат теста. Негативан тест стога не може обавезно указати на одсуство инфекције.

14 – ПЕРФОРМАНСЕ

14.1 Идентификација - квантификација

% укупне подударности	U.u.	M.h.	U.u./M.h
Иzolовани сојеви (вредности $\leq 10^3$ UCC/mL) (види § 14.1.1)	97,4	NA*	NA*
Иzolовани сојеви (вредности $\geq 10^4$ UCC/mL) (види § 14.1.1)	93,4	93,4	93,4
Вагинални клинички узорци (видети § 14.1.2)	100	100	100
Течни клинички узорци - урин (видети § 14.1.2)	93,2	96,6	94,9

NA* Није применљиво

14.1.1 Изоловани сојеви

У компаративној студији тестиран је 21 изоловани сој (ATCC сојеви и сакупљени сојеви) одвојено (U.u. или M.h.) у неколико концентрација (укупно 76 тестова).

Добијени резултати су поређени са резултатима који су добијени методом микродилуционог пребројавања.

За тумачење са патолошким прагом постављеним на 10^3 CCU/mL, општи проценат поклапања за U.u. је 97,4% (имамо 2 лажно позитивна резултата за вредности 10^2 CCU/mL са методом микродилуционог пребројавања).

За тумачење са патолошким прагом постављеним на 10^4 CCU/mL, општи проценат поклапања за U.u. је 93,4% (имамо 5 лажно позитивних резултата на 10^3 UCC/mL са методом микродилуционог пребројавања). Општи проценат поклапања за M.h. је 93,4% (идентификовали смо 5 лажно позитивних резултата, 4 за вредност од 10^3 CCU/mL и 1 за вредност 10^2 CCU/mL са методом микродилуционог пребројавања).

Општи проценат поклапања U.u. и M.h. износи 93,4%.

14.1.2 Клинички узорци

Почетна компаративна студија изведена је употребом вагиналних клиничких узорака (n = 23) на сувим брисевима. Резултати добијени употребом MYCOFAST *RevolutioN2* су поређени са методом микродилуционог пребројавања.

Општи проценат поклапања за U.у. и M.h. износи 100%.

Извршена је друга упоредна студија са клиничким узорцима урина (n = 88). Резултати добијени употребом MYCOFAST *RevolutioN 2* су поређени са методом микродилуционог пребројавања.

Општи проценат поклапања за U.у. је 93,2% (добили смо 1 лажно негативан за вредност од 10⁴ CCU/mL и 5 лажно позитивних за вредности од 10² CCU/mL са методом микродилуционог пребројавања).

Општи проценат поклапања за M.h. је 96,6% (идентификовали смо 3 лажно позитивна резултата за вредност од 10²-10³ CCU/mL, са методом микродилуционог пребројавања).

Општи проценат поклапања за U.у. и M.h. износи 94,9%.

14.2 Тестирање осетљивости на антибиотике

Изведена је компаративна студија у националној референтној лабораторији између методе за одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC) у течном медијуму и методе MYCOFAST *RevolutioN 2*. Тестирани сојеви (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* и 16 *M. hominis*) су референтни сојеви, дивљи клинички сојеви или сојеви који су развили резистенцију. Сваки сој се тестира у разблажењима од 10³ – 10⁴ и 10⁵ CCU/mL у UMMt 3 mL.

За вредности 10⁴ и 10⁵ CCU/mL резултати су очитани и протумачени након 24 сата инкубације.

За вредности 10³ CCU/mL, резултати су очитани након 48 сати инкубације и протумачени ако је тест био негативан у року од 24 сата.

Резултати обе методе тумаче се као осетљив (S) или резистентан (R) у складу са CLSI-препорукама.

Општи проценат поклапања за *U. urealyticum/U. parvum* износи 95,5 %.

Општи проценат поклапања за *M. hominis* је 100 %.

Подударност	<i>Ureaplasma urealyticum / parvum</i> (n=40)					<i>Mycoplasma hominis</i> (n=28)				
	TET	DOX	MXF	LVX	ERY	TET	DOX	MXF	LVX	CLI
	34	38	40	39	40	28	28	28	28	28
DM	5 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DTM	1 ^b	2 ^c	0	1 ^d	0	0	0	0	0	0

DM: велико неподударње, DTM: веома велико неподударње

^a Неподударње при 10³ CCU/mL (референтна вредност - MIC 0,5 µg/mL), 4 неподударња на 10⁵ CCU/mL (референтна вредност - MIC 0,5-1 и 8 µg/mL).

^b 1 неподударње на 10⁵ CCU/mL (референтна вредност - MIC 8 µg/mL).

^c 1 неподударње на 10³ CCU/mL (референтна вредност - MIC 8 µg/mL); .1 неподударње на 10⁵ CCU/mL (референтна вредност - MIC 2 µg/mL)

^d 1 неподударње при 10⁵ CCU/mL (референтна вредност - MIC 4 µg/mL).

15 УКЛАЊАЊЕ ОТПАДА

Одлагање отпада мора се извршити у складу са хигијенским прописима који важе за ову врсту реагенаса у земљи употребе.

16 - ЛИТЕРАТУРА

1 - BEBEAR C., BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires. N°391, 63-69.

2 - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guideline. CLSI Document M43-A. Vol.31 - N°19.

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

4 - TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain *Mycoplasma*) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans Mandell G.L., Bennett J. E. and Dolin R. (ed.), principles and practices of infectious diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.

5 - WAITES Ken B., Brenda Katz and Robert L. Schelonka. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N°4 -757-789.

6 - Waites KEN B, Donna M. Crabb, and Lynn B. Duuy. 2008. Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC- 159a and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol. 52, No. 10, 3776–3778.5

7 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5ème édition)

MYCOFAST® је регистровани заштитни знак ELITech MICROBIO

Промене из претходне верзије су означене сивом бојом.

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE

Tel : 33 (0)4 94 88 55 00
Fax : 33 (0)4 94 32 82 61
www.elitechgroup.com

