

Dijagnostika urogenitalnih mikoplazmi

MYCOFAST Screening Revolution

Skrining i diferencijacija

50 testova (Kat. br. 00063)

COMPLEMENT MYCOFAST Revolution

Kvantifikacija, identifikacija i test osetljivosti

25 testova (Kat. br. 00062)

UMMt Revolution

50 testova (Kat. br. 00061)

CPB 0396-SR-2015-12

Isključivo za *in vitro*, dijagnostiku, isključivo za profesionalnu upotrebu



1 –UPOTREBA

MYCOFAST Screening Revolution (Kat.br. 00063) omogućava detekciju i diferencijaciju *Ureaplasma urealyticum* i *Ureaplasma parvum* (U.u.) i *Mycoplasma hominis* (M.h.) kod različitih kliničkih uzoraka. Koristi se zajedno sa tečnim medijumom iz kita UMMt Revolution (Kat. br. 00061).

Ukoliko je rezultat pozitivan, analiza može da se kompletira testom iz kita COMPLEMENT MYCOFAST Revolution (Kat.br. 00062), koji omogućava očitavanje i identifikaciju U.u. i/ ili M.h., kao i testiranje antimikrobne osetljivosti na antibiotike po preporuci CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2).

2 - UVOD

Mikoplazme, čijih je nekoliko vrsta do sada identifikovano kod čoveka, pripadaju grupi Mollicutes. Razlikuju se od drugih bakterija na mnogo načina, između ostalog po tome što nemaju ćelijski zid, i povećanom prirodnom otpornošću na β-laktame, kao i prisustvom membrane bogate sterolom, koju dobijaju tokom adhezije sa eukariotskim ćelijama). Mikoplazme su relativno krhki organizmi, i množe se samo u acelularnim kulturama u prisustvu brojnih faktora rasta i pri optimalnoj temperaturi od 37 °C (4).

Većina mikoplazmi detektovanih kod čoveka su komensalni organizmi. Najčešće se javljaju vrste izlovene iz urogenitalnog trakta, *U. urealyticum* i *M. hominis*. Vrsta *U. urealyticum* se deli u dve podvrste: *U. urealyticum* i *U. parvum* (U.u.).

U u. ili M.h. mogu da se ponašaju kao pravi patogeni. Izazivaju genitalne infekcije kod muškaraca (ne-gonokokni uretritis, epididimitis, prostatitis, neplodnost); ginekološke infekcije (bakterijska vaginoza, endometritis, salpingitis); reproduktivne poremećaje (horioamnionitis, postporodajni endometritis, nedonoščad, spontani pobačaj); neonatalne probleme (mala težina na rođenju, respiratorne infekcije, neurološke infekcije, bakteriemijske, apscije); ekstragenitalne infekcije (septički artritis, reaktivni artritis, i druge infekcije) (1).

Dijagnoza mikoplazmalnih infekcija zavisi od utvrđivanja patogenosti odnosno od broja bakterija. Zbog otpornosti U.u. i M.h. na određene lekove mora da se radi test osetljivosti na antibiotike (5, 6). Ispitani antibiotici i kriterijumi tumačenja su prilagođeni za lečenje mikoplazmalnih infekcija urogenitalnog trakta ali i van genitalnog sistema (2).

3 - PRINCIP

MYCOFAST Screening Revolution je tečna metoda koja se zasnova na sposobnosti U.u. i M.h. da metabolišu ureu i arginin ponaosob. Rast mikoplazmi u tečnom medijumu dovodi do promene boje medijuma, koji sadrži indikator fenol-crveno, iz žuto-narandžaste u crvenu (fenol crveno), uz oslobađanje amonijaka što menja pH medijuma u alkalni . Ovakvo posmatran rast mikoplazmi omogućava:

- detekciju i diferencijaciju; zatim u slučaju pozitivnog rezultata:

- kvantifikaciju mikoplazmi na osnovu stope hidrolize uree i arginina, koja je proporcionalna broju bakterija sadržanih u uzorku.

- Identifikaciju zasnovanu na osetljivosti ili rezistenciji na tri antibiotika.

- studiju o osetljivosti U.u. i M.h. na antibiotike.

4 - REAGENSI

Opis	Količina		
	#00061	#00062	#00063
UMMt: Bočica od 3 ml mikoplazmalnog medijuma s antibioticima i konzervansom. pH: 6,0 ± 0,1.	50	-	-
MYCOFAST SCREENING Revolution: Deljivi test od 10 polja za 5 testova, pojedinačno upakovanih u aluminijumsku kesicu sa integrisanim sredstvom za sušenje	-	-	10
Nalepnice: List sa 5 samolepljivih nalepnica	-	-	10
S. Mh.: Aktivator rasta M.h. (4,5 mL)	-	2	1
MYCOFAST Revolution: Test od 20 polja za 1 test, upakovanih u aluminijumsku kesicu sa integrisanim sredstvom za sušenje	-	25	-
Sistem za zatvaranje: Providni plastični poklopac za MYCOFAST Revolution test	-	25	-

Test MYCOFAST Screening Revolution

Test se sastoji od 5 redova sa po dva polja: *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) koji sadrži linkomicin i ureu i polje *Mycoplasma hominis* (M.h.) koji sadrži eritromicin i arginin.

Test MYCOFAST Revolution

Test sa 20 polja u kojima se nalazi dehidrirani medijum sa faktorima rasta (konjski serum, ekstrakt kvasca, cistein, arginin, urea, fenolno crvena, antibiotici, pH: 6,1 ± 0,1) i sadrži 4 različita segmenta:

Polje 1-3 Količina U.u. s koncentracijom od 10³ do ≥10⁵ CCU/ml

(puferovani rastvor i linkomicin koji inhibira rast M.h.).

Polje 4-6 Antibiotik: Identifikacija U.u. i M.h. u odnosu na njihovu otpornost ili osetljivost na: Linkomicin (L), Trimetoprim-Sulfamethoxazol (SXT) i Erythromycin (E).

Polje 7 Očitavanje broja M.h. pri koncentraciji ≥10⁴ CCU/ml (puferovani rastvor i eritromicin koji inhibira rast U.u.).

Polje 8-20 Test osetljivosti U.u. i M.h. na antibiotike
Levofloxacin (LVX) 1-2-4 µg/mL, Moxifloxacin (MXF) 0,25-2 µg/mL, Erythromycin (E) 8-16 µg/mL, Clindamycin 0,25-0,5 µg/mL, Tetraciklin (TE) 1-2-4-8 µg/mL.

5- MERE PREDOSTROŽNOSTI

• Reagensi iz ovog kompleta, namenjeni su samo u dijagnostičke svrhe *in vitro* i s njima moraju da rukuju samo ovlašćena lica.

• Uzorci i inokulisani reagensi su potencijalno zarazni, te je prilikom manipulacije neophodno pridržavati se principa predostrožnosti, higijenskih pravila i propisa koji su na snazi u zemlji korišćenja ovog tipa proizvoda.

• Reagensi sadrže sirovine životinjskog porekla i sa njima se mora postupati u skladu sa principima bezbednog rukovanja.

• Ne koristiti reagense nakon isteka roka trajanja.

• Ne koristiti reagense koji su pre upotrebe bili oštećeni ili loše skladišteni.

• Pozitivan rezultat dobijen pomoću MYCOFAST Revolution metode ukazuje na kolonizaciju urogenitalnih mikoplazmi, ali sam rezultat nije dovoljan za uspostavljanje kliničke dijagnoze. Dijagnozu mora da uspostavi lekar na osnovu bioloških rezultata i kliničke slike.

6 - SAKUPLJANJE I OBRADA UZORAKA

6.1. Sakupljanje uzoraka

Cervikovaginalni brisevi: Koristiti isključivo Dacron ili rajon bris ili cito-četkicu za sakupljanje uzoraka. Cerviks pažljivo obrisati pomoću brisa, da bi se uklonio sekret, pre uzorkovanja pomoću novog brisa. S obzirom na to da mikoplazme čvrsto adheriraju za mukozne ćelije, neophodno je mukozni sloj dobro ostrugati da bi se dobio bogat uzorak.

Uretralni brisevi: Očistiti kanal i uzorkovati brisom ili struganjem.

Sperma, urin: Sakupiti spermu ili prvi jutarnji urin u sterilnu epruvetu ili bočicu.

Gastročne tečnosti: Ukloniti gastrični sekret novorođenčeta aspiracijom kateterom i prebaciti u sterilne bočice.

6.2 Transport u UMMt medijumu

Sakupljanje uzoraka putem brisa: Uroniti bris u bočicu sa 3 ml UMMt medijuma.

Tečni uzorci: Inokulisati bočicu sa 3ml UMMt medijuma sa 300 ml homogenizovane tečnosti.

6.3 Čuvanje u UMMt medijumu

Nakon inokulacije, UMMt medijum može da se čuva na sobnoj temperaturi (18-25 °C) u trajanju od 20 sati ili na temperaturi 2-8 °C u trajanju od 56 sati. Za čuvanje u trajanju od 3 dana na -20 °C, prvo dodati dve kapi "MYCOPLASMA Stabilizer".

7 - PRIPREMA I SKLADIŠTENJE REAGENASA

• Reagensi skladišteni na 2-8 °C u prvobitnom stanju su stabilni do isteka roka važenja označenog na nalepnicama.

• Kada koristite samo jedan red polja (U.u.) (M.h.) ili dva, tri, četiri reda polja, ostatak testa MYCOFAST Screening Revolution može da se odloži i do 4 nedelje, na temperaturi od 2-8 °C u svom originalnom pakovanju i hermetički zatvoren.

• S. Mh dodatak je stabilan 3 meseca nakon otvaranja.

• UMMt medijum može da se privremeno čuva na sobnoj temperaturi, ali ima bolju stabilnost na 2-8 °C.

• Ne zamrzavati reagense koji se nalaze u okviru pakovanja.

8 - NEOPHODNA OPREMA KOJA NIJE DEO PAKOVANJA

• Materijal za sakupljanje uzoraka (brisevi, cito-četkice za struganje, sterilne bočice za sakupljanje tečnih uzoraka), pipete i nastavci.

• MYCOPLASMA Stabilizer (Kat. br. 00064)

• Inkubator kalibrisan na 37 ± 1 °C

• Kontejner za kontaminirani otpad

• Mineralno ulje

9 - PROCEDURA

Ostavite reagense da dostignu sobnu temperaturu 20 do 30 minuta.

9.1 SKRINING – MYCOFAST Screening Revolution Test

- Pripremite onoliko redova sa poljima koliko imate uzoraka za testiranje.

- Ako je potrebno, odvojite jednu ili više redova sa poljima (U.u.) / (M.h.) kako je označeno na testu.

9.1.1. Inokulacija medijuma UMMt Revolution

Zasejani UMMt medijum brisom ili pomoću 300 µl tečnog uzorka (tačka 6.2). Dobro promešati.

9.1.2 Inokulisanje u U.u./M.h.polja

- Sukcesivno rasporediti:

Polje : (U.u.): 100 µL zasejanog UMMt medijuma.

Polje (M.h.) : 100 µL zasejanog UMMt medijuma.

50 µL dodatka S.Mh.

- Po 2 kapi mineralnog ulja u svako polje.

- Prekriti polja sa samolepljivim nalepnicama i označiti uzorak.

- **Višak zasejanog UMMt medijuma čuvati** na 2-8 °C da bi se nastavila analiza ukoliko bi rezultati detekcije bili pozitivni.

9.1.3 Inkubacija U.u. / M.h.polja

Inkubirati polja 24 sata na temperaturi od 37 ± 1 °C. Inkubacija može da se produži na 48 sati samo ako su tečni uzorci posle 24 h negativni.

9.1.4 Očitavanje i tumačenje U.u. / M.h. polja

- Proveriti da li su polja (U.u.) (M.h.) bistra. Zamućena polja ukazuju na bakterijsku kontaminaciju. U tom slučaju, ponoviti test.

- Pratiti promenu boje u poljima U.u. i M.h.:

Polje : U.u. narandžasta ili crvena: Prisustvo *Ureaplasma urealyticum*

Polje : M.h. narandžasta ili crvena: Prisustvo *Mycoplasma hominis*

Polje U.u. / M.h. žuto: Odsustvo mikoplazmi

Ako je rezultat skrininga pozitivan, nastaviti sa dijagnostikom pomoću MYCOFAST Revolution testa

9.2. OČITAVANJE, IDENTIFIKACIJA I TEST OSETLJIVOSTI

9.2.1 Inokulacija MYCOFAST Revolution

• Odstraniti lepljivu foliju tako što ćete povući dva jezička a onda postepeno u polja dodavati:

Polja: 1-20 100 µL inokulisatog UMMt medijuma

Polja: 6-7 50 µL dodatka S.Mh

Polja: 1-20 2 kapi mineralnog ulja

• Zatvoriti poklopac tako da klikne.

• Označiti uzorak.

Čuvati višak UMMt medijuma na 2-8 °C najmanje 48 sati radi moguće provere.

9.2.2 Inkubacija testa

Test inkubirati na temperaturi 37 ± 1 °C u trajanju od 24 sata.

Za očitavanje U.u. i M.h. očitati rezultate po isteku 24 sata. Inkubacija testa može da se produži na 48 sati samo ako su tečni uzorci bili negativni po isteku 24 sata.

9.2.3 Očitavanje i tumačenje

Prekontrolisati da li su sva polja bistra. Zamućen bunarčić ukazuje na bakterijsku kontaminaciju. U takvom slučaju ponoviti analizu.

Razvoj urogenitalne mikoplazme u poljima prouzrokuje alkalizaciju medijuma i on pocrveni. Ukoliko razvoj urogenitalnih mikoplazmi izostane, medijum ostaje žut.

