

Dijagnostika urogenitalnih mikoplazmi

MYCOFAST Screening *RevolutioN*

Detekcija i diferencijacija
50 testova (REF 00063)

COMPLEMENT MYCOFAST *RevolutioN* ATB+

Prebrojavanje, identifikacija i ispitivanje osjetljivosti
25 testova (REF 00073)

UMMt *RevolutioN*

50 testova (REF 00061)

CPB 0396-4-HR-2018-03

Samo za dijagnostiku *in vitro*, isključivo za profesionalnu uporabu
Testovi su samo za jednokratnu uporabu.



1 – CILJ

Kit MYCOFAST Screening *RevolutioN* (REF 00063) omogućuje detekciju i diferencijaciju *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) i *Mycoplasma hominis* (M.h.) iz različitih kliničkih uzoraka. Mora se koristiti zajedno s medijima UMMt *RevolutioN* kompleta (REF 00061). U slučaju pozitivnog pregleda, analiza se može završiti galerijama kompleta SUPPLEMENT MYCOFAST *RevolutioN* ATB+ (REF 00073) koji omogućuju prebrojavanje i identifikaciju U.u. i / ili M.h. kao i test antibiotske osjetljivosti prema preporukama CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2).

2 – UVOD

Mycoplasmas, koji imaju nekoliko vrsta zabilježenih do danas u ljudi, pripadaju klasi mollicata. Oni se razlikuju od drugih bakterija na mnoge načine, uključujući nedostatak zida koji im daje prirodnu otpornost na β laktaciju i membranu bogatu sterolom iz membrana eukariotskih stanica na koje se vežu. Mikoplazmi su relativno brzi organizmi, koji se umnožavaju u acelularnom mediju samo u prisutnosti brojnih čimbenika rasta i na optimalnoj temperaturi od 37 °C (4).

Većina ljudskih mikoplazmi su jednostavni komensali. Najčešće se nalaze izolirane vrste iz urogenitalnog trakta, *U. urealyticum* i *M. hominis*. Vrsta *U. urealyticum* podijeljena je na dva biovara: *U. urealyticum* i *U. parvum* (U.u.). U.u. ili M.h. se mogu ponašati kao pravi patogeni. Oni su odgovorni za muške genitalne infekcije (ne-gonokokni uretritis, epididimitis, prostatitis, neplodnost); ginekološka infekcija (bakterijska vaginoza, endometritis, salpingitis); reproduktivni poremećaji (chorioamnionitis, postpartum endometritis, preuranentnost, spontani pobačaj); neonatalni napađi (niska težina rođenja, respiratorne infekcije, neurološke infekcije, bakteremija, apsces); ekstragenitalne infekcije (septički artritis, reaktivni artritis, druge lokalizacije) (1).

Dijagnoza infekcija mikoplazmom ovisi o određivanju patološkog praga i stoga i broja. Pojava rezistencije U.u. i M.h. na određene molekule vodi do ispitivanja osjetljivosti na antibiotike (5, 6). Testirani antibiotici i kriteriji interpretacije prikladni su za liječenje infekcija mikoplazmom u urogenitalnom traktu ili drugim ekstragenitalnim mjestima (2).

3 - NAČELO

Tehnika MYCOFAST Screening *RevolutioN* je metoda koja se koristi u tekućem mediju, a temelji se na sposobnosti U.u. i M.h. za metaboliziranje odnosno uree i arginina. Rast mikoplazmi u tekućem mediju je vizualiziran promjenom boje indikatora -fenol crvena - od žuto-narančaste do crvene, čime se prikazuje alkalizacija medija uslijed oslobađanja amonijaka. Rast tako vizualizirane mikoplazme omogućuje:
- detekciju i diferencijaciju; u slučaju pozitivnosti;
- broj koji se temelji na brzini hidrolize supstrata koji je proporcionalan količini klica sadržanih u uzorku.

- identifikaciju koja se temelji na osjetljivosti ili neosjetljivosti klica u odnosu na tri antibiotika.

- proučavanje osjetljivosti kliničkih izolata U.u. i M.h. na antibiotike.

4 – REAGENSI

Opis	Količina		
	Ref 00061	Ref 00073	Ref 00063
UMMt Bocu od 3 mL bujona mikoplazma s antibioticima i konzervansom. pH: 6,0 ± 0,1	50		
MYCOFAST SCREENING <i>RevolutioN</i> : 10-jažica lomljivog zaslona za 5 ispitivanja, pojedinačno pakirana u aluminijsku vrećicu s integriranim sušilicom			10
Tags : ploča od 5 lomljivih naljepnica			10
S.Mh M.h. aktivator rasta (4.5 mL)			1
MYCOFAST <i>RevolutioN</i> ATB+ : 24-well galerija za 1 test, pakiran u aluminijsku vrećicu s integriranim sušilicom		25	
Zatvarajući sustav : prozirni plastični pokrov za galeriju MYCOFAST <i>RevolutioN</i>		25	

Komplet MYCOFAST Screening *RevolutioN*

Komplet se sastoji od 5 serija sa po 2 jažice : jedna jažica sadržava *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) koja sadrži linkomicin i ureu i jedna jažica sadržava *Mycoplasma hominis* (M.h.) koja sadrži eritromicin i arginin.

Komplet MYCOFAST *RevolutioN* ATB+

MYCOFAST *RevolutioN* ATB+ galerija sadrži, u dehidriranom obliku, 24 jažica medija za rast mikoplazme (ždrijelni serum, ekstrakt kvasca, cistein, arginin, urea, fenol crveni, antibiotici, pH: 6.1 ± 0.1) i 11 antibiotici od 1 do 4 koncentracije:

Jažice 1/2: Broj U.u. za razinu od 10^3 i $> 10^4$ CCU/mL (puferirana otopina i inhibicija rasta linomicina M.h.) (u plavom)

Jažica 3: Mh računanje za brzinu $\geq 10^4$ CCU/mL (crveno)

Jažice 4/5/6: Procjena osjetljivosti mikoplazama na levofloksacin (LVX) na 1/2/4 μ g / mL

Jažice 7/8/9/10: Procjena osjetljivosti mikoplazme na moksifloksacin (MXF) pri 0,25 / 0,5 / 2 / 4 μ g / mL

Jažice 11/12/13/14: Procjena osjetljivosti mikoplazme na tetraciklin (TET) na 1/2/4/8 μ g / mL

Jažice 15/16: Procjena osjetljivosti eritromicin mikoplazme (ERY) na 8/16 μ g / mL (crveno)

Jažice 17/18: Procjena osjetljivosti mikoplazme na klindamicin (CLI) 0.25 / 0.5 μ g / mL (u plavom)

Jažica 19: Procjena osjetljivosti mikoplazme na telitromicin (TEL) pri 4 μ g / mL

Jažica 20: Procjena osjetljivosti mikoplazme na Roxithromycin (ROX) kod 2 μ g / mL

Jažica 21: Procjena osjetljivosti mikoplazme na minociklin (MIN) pri 2 μ g / mL

Jažica 22: Procjena osjetljivosti mikoplazama na ofloxacin (OFX) pri 1 μ g / mL

Jažica 23: Procjena osjetljivosti mikoplazma na Josamicin (JOS) na 2 μ g / mL

Jažica 24: Procjena osjetljivosti Prištinamicina Mycoplasma (PRI) pri 2 μ g / mL

		20	19	18	17	16	15	14	13	12	11			
		ROX	TEL	CLI		ERY		TET						
		2	4	0.5	0.25	16	8	8	4	2	1			
24	PRI	MYCOFAST® <i>RevolutioN</i> ATB+										1	OFX	22
23	JOS	MYCOFAST® <i>RevolutioN</i> ATB+										2	MIN	21
		Uu	Uu	Mh	1	2	4	0.25	0.5	2	4			
		10^3	$\geq 10^4$	$\geq 10^4$	LVX			MXF						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

5 - MJERE OPREZA PRI UPORABI

Reagensi u ovom kompletu namijenjeni su isključivo *in vitro* dijagnostičkoj upotrebi i moraju biti obrađeni od strane ovlaštenih osoba.

Uzorkovani uzorci i reagensi potencijalno su zarazni, moraju se postupati uobičajenim mjerama opreza u skladu s pravilima higijene i propisima kojima su na snazi u zemlji uporabe za ovu vrstu proizvoda.

Reagensi koji sadrže sirovine životinjskog podrijetla trebaju se rukovati uobičajenim mjerama opreza.

Nemojte koristiti reagente nakon isteka roka valjanosti.

Prije upotrebe nemojte koristiti oštećene ili loše pohranjene reagente. Pozitivan rezultat s galerijom MYCOFAST *RevolutioN* ATB + odražava kolonizaciju urogenitalnih mikoplazma, no ne može se koristiti sama za kliničku dijagnozu.

To mora učiniti liječnik na temelju bioloških rezultata i kliničkih znakova.

6 - PRIKUPLJANJE I OBRADA UZORAKA

6.1 Prikupljanje uzoraka

Cervikalno-vaginalni uzorci

Koristite samo Dacron briseve, briseve od umjetne svile ili četkicu za uzimanje citološkog uzorka. Uzmite uzorak nakon što ste prethodno pažljivo uklonili izlučevine s vanjske strane cerviksa koristeći se prvim brisom. Mikoplazme posjeduju visoki afinitet za mukozne stanice na koje prijanjaju, stoga je potrebno temeljito ostrugati sluznicu kako bi postupak bio učinkovit.

Uretralni uzorci: Očistite otvor i skupljajte ih zapljuskivanjem ili struganjem stanica

Sperma, urin: Récolter le sperme ou le premier jet d'urine dans un stérilne bočicu.

6.2 Transport u mediju UMMt

Uzimanje brisa: Izvadite bris iz bočice medija UMMt.

Tekući uzorci: Inokulirajte bočicu medija UMMt s 300 μ L homogenizirane tekućine.

6.3 Skladištenje medija UMMt

Po izvršenju inokulaciji, medij UMMt može se čuvati na sobnoj temperaturi (18-25 °C) 20 sati ili na temperaturi 2-8 °C tijekom 56 sati.

Za skladištenje tijekom 3 dana pri temperaturi od -20 °C, prethodno dodajte 2 kapi stabilizatora "MYCOPLASMA Stabilizer".

7. PRIPREMA I SKLADIŠTENJE REAGENSA

Reagensi pohranjeni na temperaturi od 2-8 °C u izvornom stanju su stabilni do datuma isteka roka trajanja navedenog na naljepnicama.

Ako ste koristili samo jedan set ježica (U.u.) (M.h.) ili dva, tri ili četiri seta, neupotrebljeni ostatak kompleta MYCOFAST Screening *RevolutioN*, hermetički zatvoren u aluminijskoj vrećici, može se čuvati 4 tjedna na temperaturi od 2-8 °C.

Suplement M.h. je stabilan 3 mjeseca nakon otvaranja.

Medij UMMt može biti privremeno (3 mjeseca) pohranjen na sobnoj temperaturi, ali ima bolju stabilnost na temperaturi od 2-8 °C. Nemojte zamrzavati reagense iz kompleta.

8 - POTREBNI MATERIJALI KOJI SE NE ISPORUČUJU ZAJEDNO S KOMPLETOM

Oprema za uzimanje uzoraka (štipači, četkice za uzimanje citoloških uzoraka, sterilne bočice za sakupljanje tekućih uzoraka), pipete i prijenosne tuljce s MYCOPLASMA stabilizatorom (REF 00064); grijalica kalibrirana na 37 ± 1 °C Spremnika za kontaminirani otpad i mineralno ulje

9 - OPERATIVNI POSTUPAK

Ostaviti reagense na sobnoj temperaturi 20 do 30 minuta.

9.1 DIJAGNOSTIKA - Komplet MYCOFAST Screening Revolution

- Pripremite onoliko setova jažica koliko je uzoraka koje želite testirati.
- Ako je potrebno, odvojite jedan ili više setova jažica (U.u.)/(M.h.) pridržavajući se oznaka na kompletu.

9.1.1 Inokulacija medija UMMt Revolution

Inokulaciju medija UMMt izvršite pomoću vatiranog štipača ili dodajte ga u 300 µL tekućih uzoraka (§ 6.2). Dobro promiješajte.

9.1.2 Inokulacija jažica U.u./M.h.

- Dozirajte prema sljedećem redoslijedu:
Jažica (Uu): 100 µL inokuliranog medija UMMt.
Jažica (Mh): 100 µL inokuliranog medija UMMt.
50 µL medija dodatka M.h.

- Dodajte dvije kapi mineralnog ulja u obje jažice.
- Na jažice stavite etikete i identifikirajte uzorak.

- **Višak sadržaja iz bočice s inokuliranim medijem UMMt čuvajte na temperaturi od 2-8 °C kako biste u slučaju pozitivnog rezultata mogli nastaviti sanalizom.**

9.1.3 Inokulacija jažica U.u./M.h.

Jažice iz kompleta inkubirajte 24 sata na temperaturi od 37 ± 1 °C. Inkubacija kompleta može se produžiti do 48 sati samo u slučaju negativnih testova unutar 24 sata.

9.1.4 Očitavanje i interpretacija jažica U.u./M.h.

- Provjerite je li sadržaj 2 jažice (U.u.) (M.h.) bistar. Zamućeni sadržaj jažice označava bakterijsku kontaminaciju. U tom slučaju ponovite test.
- Promatrajte promjenu boje u jažicama U.u. i M.h.:
jažica U.u. je narančasta ili crvena: prisutnost *Ureaplasma urealyticum*
jažica M.h. je narančasta ili crvena: prisutnost *Mycoplasma hominis*
jažica U.u. je žuta: odsutnost mikoplazmi

U slučaju pozitivnog rezultata, nastavite postupak dijagnostike pomoću kompleta MYCOFAST Revolution ATB +

9.2 PREBROJAVANJE, IDENTIFIKACIJA I ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI

9.2.1 Inokulacija kompleta MYCOFAST Revolution ATB +

Uklonite samoljepljivu foliju povlačenjem jezičca i raspodijelite jažice prema sljedećem redoslijedu:

jažice 1-24 100 µL inokuliranog medija UMMt
jažice 1-24 2 kapi mineralnog ulja

Pokrijte komplet uključivanjem poklopca "closing system".
Identificirajte uzorak.

Pohranite višak sadržaja iz bočice UMMt na temperaturi od 2-8 °C na najmanje 48 sati kako bi se omogućila eventualna provjera.

9.2.2 Inkubacija zbirke

Inkubirajte zbirku na temperaturi od 37 ± 1 °C tijekom 24 sata. Za prebrojavanje U.u. i M.h., pročitajte rezultate nakon 24 sata. Inkubacija kompleta može se produžiti do 48 sati samo u slučaju negativnih rezultata tekućih uzoraka unutar 24 sata.

9.2.3 Očitavanje i interpretacija

Provjerite je li sadržaj svih jažica iz kompleta bistar. Zamućeni sadržaj jažice označava bakterijsku kontaminaciju. U tom slučaju ponovite analizu. Rast urogenitalnih mikoplazmi u jažicama rezultira alkalizacijom medija koji postaje crven. U odsutnosti rasta urogenitalnih mikoplazmi, medij ostaje žut. Narančastu boju treba smatrati pozitivnim rezultatom (granična stopa). Za interpretaciju testa, pogledajte tablicu rezultata.

Pobrojavanje (jažice 1, 2 i 3)

Identificirajte jažice koje su se obojile crveno i interpretirajte sljedeće:

- 1 koncentracija Uu od 10³ CCU/mL
- 1 i 2 koncentracija Uu ≥ 10⁴ CCU/mL
- 3 koncentracija Mh ≥ 10⁴ CCU/mL

Patološka obilježja mikoplazmi u urogenitalnim infekcijama podložna je interpretaciji prema specifičnim preporukama (1,3,7). Patološke koncentracije obično uočene kod *U. urealyticum* su sljedeće: ≥10⁴ CCU/mL za uretralni bris, ≥10³ CCU/mL za prvi mlaz urina ili sperm (iako nova lokalna preporuka spominje prag od ≥10⁴ CCU/mL za sperm (7)). Što se tiče *M. hominis*, njezina prisutnost u koncentraciji ≥10⁴ CCU/mL u cervikovaginalnom uzorku se smatra abnormalnom (1, 3).

Ispitivanje osjetljivosti (jažice 4 do 24)

Promjena boje medija u jažicama koje sadrže antibiotike odražava sposobnost soja bakterije da raste u prisutnosti testirane koncentracije antibiotika. Žuta boja medija ukazuje na nesposobnost razvijanja soja u prisutnosti testirane koncentracije antibiotika. Sojevi su kvalificirani kao osjetljivi ili otporni na antibiotike prema sljedećim kriterijima interpretacije na način kako ih definira CLSI (2).

Kriteriji interpretacije za MIC izraženo u µg/mL (kriteriji na način kako ih definira CLSI):

Soj bakterije se smatra **osjetljivim** kada je njegov rast spriječen pri kritičnim vrijednostima koncentracije ili u dvije koncentracije antibiotika kritičnih vrijednosti.

Soj bakterije se smatra **otpornim** ako:

- 1 / se stopa rasta soja za testirani antibiotik zadržava u okvirima jedne koncentracije.
- 2 / se stopa rasta zadržava u okvirima niske koncentracije ili u obje koncentracije antibiotika za testirani antibiotik u dvije koncentracije.

Klasa	Antibiotik	U.u.		M.h.		Komentari
		S	R	S	R	
Kinoloni	Levofloksacin*	≤2	≥4	≤1	≥2	
	Moksifloksacin*	≤2	≥4	≤0,25	≥0,5	
	Ofloksacin	≤1	>1	≤1	>1	
linkozamidi	Klindamicin*	/	/	≤0,25	≥0,5	U.u. je prirodno otporna na klindamicin

tetraciklini	tetraciklin*	≤1	≥2	≤4	≥8	Sojevi bakterija osjetljivi na tetraciklin će također biti osjetljivi na doksiciklin
	minociklin	≤2	>2	≤2	>2	
makrolide	eritromicin*	≤8	≥16	/	/	Sojevi bakterija osjetljivi na eritromicin će također biti osjetljivi na azitromicin. M.h. je prirodno otporna na eritromicin
	roksitromicin	≤2	>2	/	/	M.h. je prirodno otporna na roksitromicin
	josamicin	≤2	>2	≤2	>2	
ketolide	telitromicin*	≤4	-	≤4	≥8	
streptogramin	pristinamicin	≤2	>2	≤2	>2	

(* kriteriji interpretacije na način kako ih definira CLSI)

M. hominis prirodno je otporna na makrolide sa 14 i 15 ugljikovih atoma, uključujući eritromicin i roksitromicin, ali je osjetljiva na makrolide sa 16 ugljikovih atoma poput josamicina.

U. urealyticum je prirodno otporna na linkozamide (klindamicin).

U nekim populacijama stopa otpornosti na tetraciklin može doseći vrijednost od 45% za U.u. i 39,6% za M.h. (2). Opisana je otpornost na kinolone (U.u. i M.h.) (5, 6) i klindamicin (M.h.), ali prevalencija nije poznata.

Pomoć pri interpretaciji:

Test osjetljivosti U.u.

ATB*	LVX				MXF				TET				ERY				
	1	2	4	int*	0,25	0,5	2	4	int*	1	2	4	8	int*	8	16	int*
Uzorci	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	S
	+	-	-	S	+	-	-	-	S	+	-	-	-	R	+	-	R
	+	+	-	R	+	+	-	-	S	+	+	-	-	R	+	+	R
	+	+	+	R	+	+	+	-	R	+	+	+	-	R	/	/	/
	/	/	/	/	+	+	+	+	R	+	+	+	+	R	/	/	/

* ATB = antibiotici, * CONC = koncentracija, * INT = interpretacije

Test osjetljivosti M.h.

ATB*	TEL		ROX		MIN		OFX		JOS		PRI	
	4	int*	2	int*	2	int*	1	int*	2	int*	2	int*
Uzorci	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
	+	/	+	R	+	R	+	R	+	R	+	R

a: Nepodudamost dobivena kod koncentracije 10⁴ CCU/mL (referentni MIC za 4 µg/ml)

b : 1 Nepodudamost dobivena kod koncentracije 10³ CCU/mL (referentni MIC za 2 µg/mL), podudamost kod koncentracije 10⁴ CCU/mL (referentni MIC za 1 µg/mL), 1 nepodudamost kod koncentracije 10⁵ CCU/mL (referentni MIC za 1 µg/mL), 1 nepodudamost pri koncentraciji 10⁵ CCU/mL (referentni MIC za µg/mL)

c : 1 Nepodudamost dobivena kod koncentracije 10³ CCU/mL (referentni MIC za 2 µg/mL), 1 nepodudamost kod koncentracije 10⁴ CCU/mL (referentni MIC za 2 µg/mL), 1 nepodudamost kod koncentracije 10⁵ CCU/mL (referentni MIC za 4 µg/mL)¹

podudar- nost	<i>Mycoplasma hominis</i> (n=27)								
	TET	MIN	MXF	LVX	OFX	JOS	PRI	TEL	CLI
	26	26	27	27	26	27	27	14	27
DM	0	0	0	0	0	0	0	13	0
DTM	1 _a	1 _b	0	0	1 _c	0	0	0	0

a: Nepodudamost dobivena kod koncentracije 10⁴ CCU/mL (referentni MIC > 32 µg/mL)

b : Nepodudamost dobivena kod koncentracije 10⁵ CCU/mL (referentni MIC za 4 µg/mL)

c : Nepodudamost dobivena kod koncentracije 10⁵ CCU/mL (referentni MIC za 2 µg/mL)

14 - ODLAGANJE OTPADA

Otpad se mora zbrinuti u skladu s higijenskim propisima i propisima koji su na snazi za ovu vrstu reagensa u zemlji u kojoj se oni koriste.

15 - BIBLIOGRAFIJA

1 - **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.** Budući da 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 MAN-DELLG. L. , BENNET J.E. and DOLIN R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.

5 - **WAITES KEN B. , BRENDAKATZ AND ROBERT L. SCHELONKA. 2005.** Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N°4 -757-789.

6 - **WAITES KEN B, DONNAM. CRABB, and LYNN B. DUFFY. 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.

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

Promjene u odnosu na prethodnu verziju su označene sivom bojom.

ELITEch MICROBIO

Parc d'activités du Plateau
allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE

☎ : 33 (0)4 94 88 55 00

Fax: 33 (0)4 94 32 82 61

<http://www.elitechgroup.com>

