

Dijagnostika urogenitalnih mikoplazmi

MYCOFAST Screening Revolution

Detekcija i diferencijacija
50 testova (REF 00063)

COMPLEMENT MYCOFAST Revolution ATB+

Brojanje, identifikacija i testiranje osetljivosti
25 testova (REF 00073)

UMMt Revolution

50 testova (REF 00061)

CPB 0396-4-SR-2018-03

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



1 – CILJ

Kit MYCOFAST Screening *Revolution* (REF 00063) omogućava detekciju i diferencijaciju *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) i *Mycoplasma hominis* (M.h.) iz različitih kliničkih uzoraka. Mora se koristiti zajedno s medijumima UMMt *Revolution*. (REF 00061).

U slučaju pozitivnog skrininga, analiza se može kompletirati pomoću testa COMPLEMENT MYCOFAST *Revolution* ATB+ (REF 00073) koji omogućavaju kvantifikaciju i identifikaciju U.u. i / ili M.h. kao i testiranje antimikrobne osetljivosti prema preporukama CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2).

2 – UVOD

Mikoplazme, kojih do danas ima nekoliko vrsta zabeleženih kod ljudi, pripadaju klasi Mollicutes. One se razlikuju od drugih bakterija na mnoge načine, uključujući nedostatak zida koji im daje prirodnu rezistenciju na β laktame i membranu bogatu sterolom iz membrana eukariotskih ćelija za koje se vezuju. Mikoplazme su relativno krhki organizmi, koji se umnožavaju u acelularnom medijumu samo u prisutnosti brojnih faktora rasta i na optimalnoj temperaturi od 37 °C (4).

Većina humanih mikoplazmi su komensali. Najčešće se nalaze izolovane vrste iz urogenitalnog trakta, *U. urealyticum* i *M. hominis*. Vrsta *U. urealyticum* podeljena je na dva biovara: *U. urealyticum* i *U. parvum* (U.u.).

U.u. ili M.h. mogu biti patogene. Oni su odgovorni za muške genitalne infekcije (negonokokni uretritis, epididimitis, prostatitis, neplodnost); ginekološke infekcije (bakterijska vaginoza, endometritis, salpingitis); reproduktivne poremećaje (horioamnionitis, post-partalni endometritis, prevremeni porođaj, spontani pobačaj); neonatalne probleme (mala težina na rođenju, respiratorne infekcije, neurološke infekcije, bakteremija, apsces); ekstragenitalne infekcije (septički artritis, reaktivni artritis, druge infekcije) (1).

Dijagnoza infekcija mikoplazmom zavisi od određivanja patološkog praga i samim tim i broja. Pojava rezistencije U.u. i M.h. na određene lekove zahteva testiranje antimikrobne osetljivosti (5, 6). Testirani antibiotici i kriterijumi interpretacije adaptirani su za lečenje infekcija mikoplazmom u urogenitalnom traktu ili van genitalnog sistema. (2).

3 – PRINCIP

Tehnika MYCOFAST Screening *Revolution* je metoda koja se koristi u tečnom medijumu, a zasniva se na sposobnosti U.u. i M.h. da metabolišu ureu i arginina ponaosob.

Rast mikoplazmi u tečnom medijumu dovodi do promene boje medijuma koji sadrži indikator – fenol crveno – od žuto-narandžaste do crvene, čime se dokazuje alkalizacija medijuma zbog oslobađanja amonijaka.

Tako posmatran rast mikoplazmi omogućava:

– detekciju i diferencijaciju; u slučaju pozitivnog nalaza:

–kvantifikaciju koja se zasniva na brzini hidrolize supstrata koji je proporcionalan broju bakterija sadržanih u uzorku.

– identifikaciju koja se zasniva na osetljivosti ili neosetljivosti patogena u odnosu na tri antibiotika.

– testiranje osetljivosti kliničkih izolata U.u. i M.h. na antibiotike.

4 – REAGENSI

Opis	Količina		
	Ref 00061	Ref 00073	Ref 00063
UMMt: Bočicu od 3 ml mikoplazma med.sa antibioticima i rastvorom konzervansa. pH: 6,0 ± 0,1	50		
MYCOFAST SCREENING <i>Revolution</i> : Deljivi test od 10 polja za pet testiranja, pojedinačno pakovan u aluminijskoj kesici sa integrisanim desikantom.			10
Etikete: pet deljivih etiketa			10
S.Mh M.h. aktivator rasta (4.5 mL)			1
MYCOFAST <i>Revolution</i> ATB+ Test od 24 polja za jedno testiranje, pakovan u aluminijskoj kesici s integrisanim desikantom.		25	
Sistem zatvaranja: providni plastični poklopac za MYCOFAST <i>Revolution</i> test		25	

MYCOFAST Screening *Revolution* Test

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

MYCOFAST *Revolution* ATB+ test

MYCOFAST *Revolution* ATB + test, u svakom od, 24 polja, sadrži dehidrirani medijuma za rast mikoplazme (konjski serum, ekstrakt kvasca, cistein, arginin, urea, fenol crveni, antibiotici, pH: 6.1 ± 0.1) i 11 antibiotika u koncentraciji od 1 do 4:

Polja 1/2: Kvantifikacija U.u. između 10³ i ≥ 10⁴ CCU/mL (pufer i linkomicin inhibiraju rast M.h.)

Polje 3: Kvantifikacija Mh ≥10⁴ CCU/mL

Polja 4/5/6: Procena osetljivosti U.u. na levofloksacin (LVX) na 1/2/4 µg/mL

Polja 7/8/9/10: Procena osetljivosti U.u. na moksifloksacin (MXF) pri 0,25 / 0,5 / 2 / 4 µg/mL

Polja 11/12/13/14: Procena osetljivosti mikoplazme na tetraciklin (TET) na 1/2/4/8 µg/mL

Polja 15/16: Procena osetljivosti eritromicin mikoplazme (ERY) na 8/16 µg/mL (crveno)

Polja 17/18: Procena osetljivosti mikoplazme na klindamicin (CLI) 0.25 / 0.5 µg/mL (u plavom)

Polje 19: Procena osetljivosti mikoplazmi na telitromicin (TEL) pri 4 µg/mL

Polje 20: Procena osetljivosti mikoplazmi na Roxithromycin (ROX) kod 2 µg/mL

Polje 21: Procena osetljivosti mikoplazmi na minociklin (MIN) pri 2 µg/mL

Polje 22: Procena osetljivosti mikoplazmi na ofloxacilin (OFX) pri 1 µg/mL

Polje 23: Procena osetljivosti mikoplazmi na Josamicin (JOS) na 2 µg/mL

Polje 24: Procena osetljivosti mikoplazmi na Prištinamicina (PRI) na 2 µg/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	2	MYCOFAST® <i>Revolution</i> ATB+									1	OFX	22
23	JOS	2										2	MIN	21
		Uu	Uu	Mh	1	2	4	0.25	0.5	2	4			
		10 ³	≥10 ⁴	≥10 ⁴	LVX			MXF						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

5 – MERE PREDOSTROŽNOSTI

Reagensi u ovom testu namenjeni su isključivo za *in vitro* dijagnostičku upotrebu i moraju biti obrađeni od strane ovlašćenih osoba.

Uzorci pacijenata i inokulisani reagensi potencijalno su infektivni, njima se mora postupati s uobičajenim merama opreza u skladu s pravilima higijene i propisima koji su na snazi u zemlji upotrebe za ovu vrstu proizvoda.

S reagensima koji sadrže sirovine životinjskog porekla treba rukovati s uobičajenim merama opreza.

Ne koristiti reagense nakon isteka roka važenja.

Ne koristiti oštećene ili nepravilno skladištene reagense.

Pozitivan rezultat testiranja pomoću MYCOFAST *Revolution* ATB + ukazuje na kolonizaciju urogenitalnim mikoplazma, ali se ne može koristiti sam za kliničku dijagnozu.

To mora da uradi lekar na osnovu bioloških rezultata i kliničkih znakova.

6 – SAKUPLJANJE I OBRADA UZORAKA

6.1 Sakupljanje uzoraka

Cervikalno-vaginalni uzorci

Koristite samo Dacron briseve, briseve od veštačke svile ili četkicu za uzimanje citološkog uzorka. Uzmite uzorak nakon što ste prethodno pažljivo uklonili sekret sa spoljne strane cerviksa koristeći se prvim brisom. Mikoplazme snažno prijanjaju za mukozne ćelije, zbog toga je neophodno temeljno ostrugati sluznicu kako bi se dobio sto bolji uzorak.

Uretralni uzorci: Očistiti kanal a zatim uzorkovati pomoću brisa ili struganjem ćelija

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

6.2 Transport u medijumu UMMt

Uzimanje brisa: Ubaciti bris u bočicu sa UMMt medijumom

Tečni uzorci: Inokulisati bočicu sa UMMt medijumom sa 300 µL homogenizovane tečnosti.

6.3 Skladištenje medijuma UMMt

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

Za skladištenje tokom 3 dana pri temperaturi od -20 °C, prethodno dodati dve kapi stabilizatora „MYCOPLASMA Stabilizer“.

7. PRIPREMA I SKLADIŠTENJE REAGENSA

Reagensi skladišteni na temperaturi od 2 do 8 °C u izvornom stanju su stabilni do datuma isteka roka trajanja naznačenog na pakovanju.

Ako ste koristili samo jedan red testova (U.u.) (M.h.) ili dva, tri ili četiri reda, neupotrebljeni ostatak MYCOFAST Screening *Revolution*, hermetički zatvoren u aluminijskoj kesici, može se čuvati četiri sedmice na temperaturi od 2 do 8 °C.

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

Medijum UMMt može da bude privremeno (3 meseca) skladišten na sobnoj temperaturi, ali ima bolju stabilnost na temperaturi od 2 do 8 °C.

Nemojte zamrzavati reagense iz kompleta.

8 NEOPHODAN MATERIJAL KOJI NIJE OBEZBEĐEN

Pribor za uzimanje uzoraka, (brisevi, četkice za uzimanje citoloških uzoraka, sterilne bočice za sakupljanje tečnih uzoraka), pipete i nastavci. MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064); inkubator na 37 ± 1 °C Kontejner za kontaminirani otpad i mineralno ulje

9 - METODA

Ostaviti reagense na sobnoj temperaturi 20 do 30 minuta.

9.1 SCREENING – MYCOFAST Screening RevolutioN test

- Pripremite onoliko testova koliko uzoraka želite da testirate.
- Ako je potrebno, odvojite jedan ili više redova (U.u.)/(M.h.) pridržavajući se oznaka na kompletu.

9.1.1 Inokulacija u UMMt RevolutioN medijum

Inokulaciju medijuma UMMT izvršiti uz pomoć brisa ili dodavanjem 300 µL tečnih uzorka (§ 6.2). Dobro promešajte.

9.1.2 Inokulacija bunarčića U.u./M.h.

- Pipetirati prema sledećem redosledu:
- Polje (Uu): 100 µL inokulisanog medijuma UMMT.
- Polje (Mh): 100 µL inokulisanog medijuma UMMT.
- 50 µL M.h. suplementa

– Dodajte dve kapi mineralnog ulja u oba bunarčića.

– Na bunarčiće stavite etikete i identifikujte uzorak.

– **Višak sadržaja iz bočice s inokulisanim medijem UMMTt** čuvajte na temperaturi od 2 do 8 °C kako biste u slučaju pozitivnog rezultata mogli da nastavite s analizom.

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

Test inkubirajte 24 sata na temperaturi od 37 ± 1 °C. Inokulacija testa može se produžiti do 48 sati samo u slučaju tečnih uzoraka koji su negativni nakon 24 sata.

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

- Proverite da li je sadržaj 2 bunarčića (U.u.) (M.h.) bistar. Zamućeni sadržaj bunarčića označava bakterijsku kontaminaciju. U tom slučaju ponovite test.
- Posmatrajti promenu boje u poljima U.u. i M.h:
- Polja U.u. su narandžasta ili crvena: prisutnost *Ureaplasme urealyticum*
- Polja M.h. su narandžasta ili crvena: prisutnost *Mycoplasme hominis*
- Polja U.u./M.h. su žuta: odsustvo mikoplazmi

U slučaju pozitivnog rezultata, nastaviti postupak dijagnostike pomoću MYCOFAST RevolutioN ATB +testa.

9.2 KVANTIFIKACIJA, IDENTIFIKACIJA I ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI

9.2.1 Inokulacija MYCOFAST RevolutioN ATB + testa

Uklonite adhezivnu foliju povlačenjem jezika i dodati u polja svakog reda sledeće::

- Polje 1–24 100 µL inokulisanog UMMt medijuma
- Polje 1–24 2 kapi mineralnog ulja

Pokrivi test poklopcem „closing system“.

Obeleži uzorak.

Čuvati preostali UMMt medijum na temperaturi od 2 do 8 °C najmanje 48 sati, kako bi se omogućila eventualna provera.

9.2.2 Inkubacija testa

Inkubirati test na temperaturi od 37 ± 1 °C tokom 24 sata. Za kvantifikaciju U.u. i M.h, očitajte rezultate nakon 24 sata. Inkubacija testa može se produžiti do 48 sati samo u slučaju negativnih rezultata tečnih uzoraka u roku od 24 sata.

9.2.3 Očitavanje i interpretacija

Proveriti da li je sadržaj svih polja iz testa bistar. Zamućeni sadržaj polja označava bakterijsku kontaminaciju. U tom slučaju ponovite analizu. Rast urogenitalnih mikoplazmi u poljima rezultuje alkalizacijom medijuma koji postaje crven. U odsutnosti rasta urogenitalnih mikoplazmi, medijum ostaje žut.

Narandžastu boju treba smatrati pozitivnim rezultatom (granična vrednost). Za interpretaciju testa, v. tabelu rezultata.

Kvantifikacija (polja 1, 2 i 3)

Identifikovati polja koja su se obojila u narandžasto ili crveno i interpretirajte na sledeći način:

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

Patološka uloga mikoplazmi u urogenitalnim infekcijama je predmet tumačenja prema specifičnim preporukama (1,3,7). Patološke vrednosti koje se obično koriste kod *U. urealyticum* su sledeće: ≥10⁴ CCU/mL za uretralni ili endotrahealni uzorak, ≥10³ CCU/mL za prvi mlaz urina ili spermu (iako nova lokalna preporuka spominje prag od ≥10⁴ CCU/mL za spermu (7)). Što se tiče *M. hominis*, njena prisutnost u koncentraciji ≥10⁴ CCU/mL u cervikovaginalnom uzorku se smatra patološkom (1, 3).

Testiranje osetljivosti (polja 4 do 24)

Promena boje medijuma u crvenu u poljima koji sadrže antibiotike ukazuje na prisustvo bakterijskog rasta i samim tim na rezistenciju na antibiotike u koncentraciji koja se testira. Žuta boja medijuma ukazuje na odsustvo bakterijskog rasta i samim tim na osetljivost na antibiotike u koncentraciji koja se testira. Sojevi su okarakterisani kao senzitivni ili rezistentni na antibiotike prema sledećim kriterijumima interpretacije na način kako ih definiše CLSI (2).

Kriterijumi za tumačenje MIC (µg/mL) (kriterijumi na način kako ih definiše CLSI):

Soj bakterije se smatraje **osetljivim** kada je njegov rast sprečen u prisustvu jedne ili dve kritične koncentracije antibiotika.

Soj se smatra **rezistentnim** ako je prisutan:

- 1) rast soja u testiranoj koncentraciji antibiotika .
- 2) rast u okvirima niske koncentracije ili u obe koncentracije antibiotika za testirani antibiotik u dve 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 osetljivi na tetraciklin će takođe biti osetljivi na doksiciklin
	minociklin	≤2	>2	≤2	>2	
makrolide	eritromicin*	≤8	≥16	/	/	Sojevi bakterija osetljivi na eritromicin će takođe biti osetljivi 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	

(* kriterijumi interpretacije na način kako ih definiše CLSI)

M. hominis prirodno je rezistentna na makrolide sa 14 i 15 ugljenikovih atoma, uključujući eritromicin i roksitromicin, ali je osetljiva na makrolide sa 16 ugljenikovih atoma kao što je josamicin.

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

U nekim populacijama stopa rezistencije na tetraciklin može da dostigne vrednost od 45% za U.u. i 39,6% za M.h. (2). Opisana je rezistencija na hinolone (U.u. i M.h.) (5, 6) i klindamicin (M.h.), ali učestalost nije poznata. Pomoć pri tumačenju:

Test osetljivosti 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*
CONC* (µg/mL)	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	S
Uzorci	+	-	-	S	+	-	-	-	S	+	-	-	-	R	+	-	R
	+	+	-	R	+	+	-	-	S	+	+	-	-	R	+	+	R
	+	+	+	R	+	+	+	-	R	+	+	+	-	R	/	/	/
	/	/	/	/	+	+	+	+	R	+	+	+	+	R	/	/	/

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

Test osetljivosti U.u.

ATB*	TEL	ROX	MIN	OFX	JOS	PRI
	4	int*	2	int*	2	int*
CONC* (µg/mL)	4	int*	2	int*	2	int*
Uzorci	-	S	-	S	-	S
	+	/	+	R	+	R

Test osetljivosti M.h.

ATB*	LVX				MXF				TET				CLI				
CONC* (µg/mL)	1	2	4	int*	0,25	0,5	2	4	int*	1	2	4	8	int*	0,25	0,5	int*
Uzorci	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	S
	+	-	-	R	+	-	-	-	R	+	-	-	-	S	+	-	R
	+	+	-	R	+	+	-	-	R	+	+	-	-	S	+	+	R
	+	+	+	R	+	+	+	-	R	+	+	+	-	R	/	/	/
	/	/	/	/	+	+	+	+	R	+	+	+	+	R	/	/	/

Test osetljivosti M.h.

ATB*	TEL		ROX		MIN		OFX		JOS		PRI	
CONC* (µg/mL)	4	int*	2	int*	2	int*	1	int*	2	int*	2	int*
Uzorci	-	S	prirodna otpornost		-	S	-	S	-	S	-	S
	+	/	+	R	+	R	+	R	+	R	+	R

10 – POSEBNI SLUČAJEVI

Zbog vrlo visoke koncentracije U.u. i M.h, sva polja testa se boje crveno. Stoga se preporučuje razređivanje uzorka radi dobijanja tačnijeg rezultata. U tom slučaju postupite na sledeći način:

Inokulirajte novu bočicu UMMt zapremine 3 mL sa 300 µL originalnog

UMMt medijuma skladištenog na temperaturi od 2 do 8 °C (§ 9.1).

Inokulirajte novi test pomoću novog inokulisnog medijuma UMMt.

Vodite računa o odnosu razređivanja (1:10) za tumačenje rezultata. Ako je potrebno, na agaru A7 potvrdite prisutnost mikoplazmi ponovnom izolacijom iz originalnog medijuma UMMt skladištenog na temperaturi od 2 do 8 °C (§ 9.1).

Neujednačena temperatura inkubacije ili <36 °C (često otvaranje inkubatora, heterogenost temperature u inkubatoru...) može da uspori kinetiku rasta mikoplazmi.

11 – KONTROLA KVALITETA

Kontrola kvaliteta se može izvršiti pomoću liofilizovanih sojeva *U. urealyticum* ili *M. Hominis* sa testom MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900, ili iz liofilizovanog referentnog soja (*U. urealyticum* ATCC 27815 ili *M. hominis* ATCC 23114) prethodno kalibrisanog na 10⁴⁻⁵ CCU/mL.

Inokulisati MYCOFAST *RevolutioN* ATB + test i testirati na način kako je opisano u ovom uputstvu (§ 9.2)

Očekivani rezultati u nastavku (ATCC):

MYCOFAST *RevolutioN* ATB+

	U.u. 10 ³	U.u. ≥10 ⁴	M.h. ≥10 ⁴	LVX	MXF	TET	ERY
Soj U.u. ATCC 27815	+	+	-	S	S	S/R	S
Soj M.h. ATCC 23114	-	-	+	S/R	S	S	R

	CLI	TEL	ROX	MIN	OFX	JOS	PRI
Soj U.u. ATCC 27815	R	S	S/R	S	S/R	S	S
Soj M.h. ATCC 23114	S	S/R	R	S	S	S	S

12 – OGRANIČENJA METODE

12.1 – Skrining:

MYCOFAST Screening *RevolutioN* test ima limit osetljivosti ≤10³ CCU/mL i ne dozvoljava kvantifikaciju. Kvantifikacija pomoću testa MYCOFAST *RevolutioN* ATB + može biti negativan nakon pozitivnog skrininga.

12.2 - Kvantifikacija, identifikacija i testiranje osetljivosti

Neke bakterije koje su prisutne u količini >10⁶⁻⁷ CFU/mL i poseduju enzim ureazu mogu da uzrokuju promenu boje svih polja iz testa. Njihova prisutnost može se potvrditi ponovnom izolacijom na čokoladnom agaru iz originalnog medijuma UMMt skladištenog na temperaturi od 2 do 8 °C (§ 9.1).

pH vrednost osnovnog uzorka (pH > 7) može promeniti boju medijuma. U tom slučaju razredite uzorak (1:10) u drugom medijumu UMMt i tumačite rezultat uzimajući u obzir razređivanje.

pH vrednost kiselog uzorka (pH ≤5,5) može da uspori promenu boje.

Uzorak koji sadrži krv može da izazove promenu boje polja iz testa MYCOFAST *RevolutioN* ATB +, što se tumači kao pozitivan rezultat. U tom slučaju razredite uzorak (1:10) u drugom UMMt medijumu i tumačite ga uzimajući u obzir razređivanje. Uzorak s niskim nivoima mikoplazmi (<10³ CCU/mL) može da izazove slučajnu promenu boje različitih polja iz testa. Kao i kod svake metode detekcije mikroba, kvalitet uzorka uslovljava rezultat testa. Stoga negativni rezultat ne ukazuje na sigurno odsustvo infekcije.

13 – PERFORMANSE

13.1 Skrining i diferencijacija

MYCOFAST Screening *RevolutioN* test

U komparativnoj studiji testirani su klinički uzorci vaginalnih briseva (n=40; 2 vrste U.u. i M.h.).

Rezultati dobijeni pomoću kompleta MYCOFAST Screening *RevolutioN* upoređeni su s metodom mikrodilucionog prebrojavanja. Kod skrininga dve vrste U.u. i M.h. poklapanje je 97,5%.

Kod U.u. za koncentraciju od 10³ CCU/mL, 1 uzorak koji je bio pozitivan sa metodom mikrodilucionog prebrojavanja, dao je negativan rezultat sa metodom MYCOFAST Screening *RevolutioN*. Međutim, važno je napomenuti da koncentracija od 10³CCU/ml, odgovara infra-patološkom pragu, koji je uobičajeno naznačen za U.u.. Za U.u. i M.h. ukupno poklapanje je 100% kod supra-patoloških koncentracija.

Za diferencijaciju, svi testirani uzorci omogućili su ispravnu identifikaciju U.u. ili M.h.u poljima iz testa MYCOFAST Screening *RevolutioN*.

13.2 - Identifikacija i kvantifikacija

MYCOFAST *RevolutioN* ATB+ test

% ukupnog poklapanja	U.u.	M.h.	U.u./M.h.
Izolovani sojevi (koncentracija ≤ 10 ³ CCU/mL) (v. § 14.1.1)	97,7	NA	NA
Izolovani sojevi (koncentracija ≥ 10 ⁴ CCU/mL) (v. § 14.1.1)	96,5	98,9	97,8
Vaginalni klinički uzorci	100	95,7	97,8
Tečni klinički uzorci: urin	96,6	97,7	97,1

NA: nije primenjivo

Komparativna studija sprovedena je iz 21 izolovanog soja (sojevi ATCC i sakupljeni sojevi) koji su testirani odvojeno (U.u. ili M.h.) u nekoliko koncentracija (ukupno 85 testova).

Dobijeni rezultati se upoređuju s onima dobijenim metodom mikrodilucionog prebrojavanja.

Za tumačenje s patološkim pragom postavljenim na 10³ CCU/mL; ukupno poklapanje za U.u. iznosi 97,7% (imamo 2 lažno pozitivna rezultata za koncentraciju od 10³ CCU/mL kod primene metode mikrodilucionog prebrojavanja). Za tumačenje sa patološkim pragom postavljenim na 10⁴ CCU/mL; ukupno poklapanje za U.u. iznosi 96,5% (imamo 3 lažno pozitivna rezultata za 10³ CCU/mL kod primene metode mikrodilucionog prebrojavanja). Ukupno poklapanje za M.h. iznosi 98,9% (imamo 1 lažno pozitivan rezultat za koncentraciju od 10³ CCU/mL kod primene metode mikrodilucionog prebrojavanja).

Ukupno poklapanje U.u. i M.h. iznosi 97,8%.

Početna komparativna studija sprovedena je pomoću vaginalnih kliničkih uzoraka (n=23) sa svim brisevima. Rezultati dobijeni pomoću MYCOFAST *RevolutioN* ATB+testa, upoređeni su s metodom mikrodilucionog prebrojavanja.

Ukupno poklapanje za U.u. je 100%, a za M.h. ukupno poklapanje iznosi 95,7% (imali smo lažni pozitivan rezultat za koncentraciju od 10² CCU/mL kod primene metode mikrodilucionog prebrojavanja).

Druga komparativna studija sprovedena je na kliničkim uzorcima urina (n=88).

Rezultati su očitani i tumačeni nakon 48 sati inkubacije, ako je test bio negativan nakon 24 sata. Ustanovljeno je prisustvo samo mikoplazme bez kvantifikacije, kao što je preporučeno u slučaju tečnih uzoraka.

Rezultati dobijeni pomoću MYCOFAST *RevolutioN* ATB + su upoređeni s onima dobijenim metodom mikrodilucionog prebrojavanja.

Ukupno poklapanje za U.u. iznosi 96,6% (uočen je 1 lažno negativni rezultat za koncentraciju od 10⁴ CCU/mL kod primene metode mikrodilucionog prebrojavanja, i 2 lažno pozitivna rezultata za koncentraciju od 10² CCU/mL kod primene metode mikrodilucionog prebrojavanja).

Ukupno poklapanje za M.h. iznosi 97,7% (identifikovali smo 2 lažno pozitivna rezultata za koncentraciju od 10² CCU/mL pomoću rutinske laboratorijske metode).

Ukupno poklapanje U.u. i M.h. iznosi 97,1%.

13.3 – Ispitivanje osetljivosti

U nacionalnoj referentnoj laboratoriji sprovedena je komparativna studija između metode za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u tečnom medijumu i metode MYCOFAST *RevolutioN* ATB +.

Testirani sojevi (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* i 16 *M. hominis*) su referentni sojevi, klinički sojevi divljeg tipa ili sojevi koji su stekli rezistenciju. Svaki se soj testira u razblaženju koncentracije 10³ – 10⁴ i 10⁵ CCU/mL. U skladu s preporukama CLSI, rezultati dobijeni primenom obe metode tumačeni su kao osetljiv (S) ili rezistentan (R).

Za koncentracije 10⁴ i 10⁵ CCU/mL, rezultati su očitani i tumačeni nakon 24 sata inkubacije.

Kod koncentracija od 10³ CCU/mL, rezultati su očitani i tumačeni nakon 48 sati inkubacije, ako je test bio negativan nakon 24 sata.

Ukupno poklapanje za *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* je: 93,8% (394/420).

Ukupno poklapanje za *Mycoplasma hominis* kod koncentracija 10⁴ – 10⁵ CCU/mL je: 93,4% (227/243).

poklapanje	<i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>parvum</i> (n=42)									
	TET	MIN	MXF	LVX	OFX	ERY	JOS	PRI	TEL	ROX
	39	38	37	40	34	41	42	42	42	39
DM	3	4	4	2	4	1	0	0	0	0
DTM	0	0	1 ^a	0	4 ^b	0	0	0	0	3 ^c

DM: značajno nepoklapanje, DTM: Veoma visoko nepoklapanje

- a: 1 Nepoklapanje dobijeno kod koncentracije 10^4 CCU/mL (referentni MIC za 4 $\mu\text{g/mL}$)
- b : 1 Nepoklapanje dobijeno kod koncentracije 10^3 CCU/mL (referentni MIC za 2 $\mu\text{g/mL}$), poklapanje kod koncentracije 10^4 CCU/mL (referentni MIC za 1 $\mu\text{g/mL}$), 1 nepoklapanje kod koncentracije 10^5 CCU/mL (referentni MIC za 1 $\mu\text{g/mL}$), 1 nepoklapanje pri koncentraciji 10^5 CCU/mL (referentni MIC za $\mu\text{g/mL}$)
- c : 1 Nepoklapanje dobijeno kod koncentracije 10^3 CCU/mL (referentni MIC za 2 $\mu\text{g/mL}$), 1 nepoklapanje kod koncentracije 10^4 CCU/mL (referentni MIC za 2 $\mu\text{g/mL}$), 1 nepoklapanje kod koncentracije 10^5 CCU/mL (referentni MIC za 4 $\mu\text{g/mL}$)¹

poklapanje	<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: Nepoklapanje dobijeno kod koncentracije 10^4 CCU/mL (referentni MIC > 32 $\mu\text{g/mL}$)
- b : Nepoklapanje dobijeno kod koncentracije 10^5 CCU/mL (referentni MIC za 4 $\mu\text{g/mL}$)
- c : Nepoklapanje dobijeno kod koncentracije 10^5 CCU/mL (referentni MIC za 2 $\mu\text{g/mL}$)

14 – UKLANJANJE OTPADA

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

15 – LITERATURA

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. 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 MANDELLG. L. , BENNETJ.E. andDOLIN R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.

5 - WAITES KEN B. , BRENDKATZ 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)

Promene u odnosu na prethodnu verziju su označene sivom bojom.

ELITech MICROBIO

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

FRANCE

Tel.: 33 (0)4 94 88 55 00

Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61

<http://www.elitechgroup.com>

