

Dijagnostika urogenitalnih mikoplazmi MYCOFAST Screening *RevolutioN*

Detekcija i diferencijacija
50 testova (REF 00063)

COMPLEMENT MYCOFAST *RevolutioN* 2

Brojanje, identifikacija i testiranje osetljivosti

25 testova (REF 00082)

UMMt AMIES *RevolutioN*

50 testova (REF 00083)

CPB 0396-3-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 otkrivanje i diferencijaciju *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) i *Mycoplasma hominis* (M.h.) iz različitih kliničkih uzoraka uzetih u povoljnom transportnom medijumu ili univerzalnom transportnom medijumu, virusa, klamidije, mikoplazme i ureaplazme. Koristi se zajedno sa medijumima UMMt AMIES *RevolutioN* kit (REF 00083).

U slučaju pozitivnog pregleda analiza se može završiti pomoću COMPLEMENT MYCOFAST *RevolutioN* 2 kit (REF 00082) koji omogućava brojanje i identifikaciju U.u. i / ili M.h. i ispitivanje osetljivosti na antibiotike prema preporukama CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2).

2 – UVOD

Mikoplazme, kojih do danas ima nekoliko vrsta zabeleženih kod ljudi, pripadaju klasi mollicata. One 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 ćelija za koje se vežu. 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 ljudskih mikoplazmi su jednostavni 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 da se ponašaju kao pravi patogeni. Oni su odgovorni za muške genitalne infekcije (negonokokni uretritis, epididimitis, prostatitis, neplodnost); ginekološke infekcije (bakterijska vaginoza, endometritis, salpingitis); reproduktivne poremećaje (chorioamnionitis, postpartum endometritis, preuranentnost, spontani pobačaj); neonatalne napade (niska težina rođenja, respiratorne infekcije, neurološke infekcije, bakteremija, apsces); ekstragenitalne infekcije (septički artritis, reaktivni artritis, druge lokalizacije) (1).

Dijagnoza infekcija mikoplazmom zavisi od određivanja patološkog praga i samim tim i broja. Pojava rezistencije U.u. i M.h. na određene molekule dovodi do ispitivanja osetljivosti na antibiotike (5, 6). Testirani antibiotici i kriterijumi interpretacije prikladni su za lečenje infekcija mikoplazmom u urogenitalnom traktu ili drugim ekstragenitalnim mestima (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 metabolizuju uree i arginina. Rast mikoplazmi u tečnom medijumu je vizualizovan promenom boje indikatora – fenol crvena – od žuto-narandžaste do crvene, što upućuje na alkalizaciju medijuma zbog oslobađanja amonijaka. Rast tako vizualizovane mikoplazme omogućava:

- detekciju i diferencijaciju; u slučaju pozitivnosti:
- broj koji se zasniva na brzini hidrolize supstrata koji je proporcionalan količini klica sadržanih u uzorku.
- proučavanje osetljivosti kliničkih izolata U.u. i M.h. na antibiotike.

4 – REAGENSI

Opis	Količina		
	Ref 00083	Ref 00082	Ref 00063
UMMt AMIES Bocu od 2.6 mL bujona mikoplazma s antibioticima i konzervansom. pH: 6,0 ± 0,1	50		
MYCOFAST SCREENING <i>RevolutioN</i> : 10-jažica lomljivog ekrana za pet ispitivanja, pojedinačno pakovana u aluminijskoj kesici s integrisanim sušačem			10
Tags: ploča od pet lomljivih etiketa			10
S.Mh Mh aktivator rasta (4.5 mL)			1
MYCOFAST <i>RevolutioN</i> 2: 24-jažice galerija za 1 test, pakovan u aluminijskoj kesici s interisanim sušačem		25	
Sistem zatvaranja: providni plastični poklopac za galeriju MYCOFAST <i>RevolutioN</i>		25	

Komplet MYCOFAST Screening *RevolutioN*

Komplet se sastoji od pet serija sa po dve jažice: jedna jažica sadržaja *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) koja sadrži linkomicin i ureu i jedna jažica sadržaja *Mycoplasma hominis* (M.h.) koja sadrži eri-tromicin i arginin.

Komplet MYCOFAST *RevolutioN* 2

Komplet sadrži medijum rasta u 24 jažice, i to u dehidriranom obliku (farigealni serum, ekstrakt kvasca, cistein, arginin, urea, fenol crveni, antibiotici, pH 6,1 ± 0,1) i uključuje dva odvojena dela:

- deo namenjen za prebrojavanje i procenu osetljivosti na antibiotike za vrstu U.u. (jažice napisane crnom bojom na etiketi).
- deo namenjen za brojanje i procenu osetljivosti na antibiotike za vrstu M.h. (jažice napisane crvenom bojom na etiketi).

Deo za dijagnostiku vrste U.u. (crno):

Jažice 1/2/3: Identifikacija i brojanje U.u. za nivoe 10³, 10⁴ i ≥10⁵ CCU/ml (puferisani rastvor i inhibicija rasta linomicina M.h.).

Jažice 4/5: Procena osetljivosti U.u. na levofloksacin (LVX) pri koncentraciji 2/4 µg/mL

Jažice 6/7: Procena osetljivosti U.u. na moksifloksacin (MXF) pri koncentraciji 2/4 µg/mL

Jažice 8/9: Procena osetljivosti U.u. na eritromicin (ERY) pri koncentraciji 8/16 µg/mL

Jažice 10/11: Procena osetljivosti U.u. na tetraciklin (TET) 1-2 µg/mL

Jažice 12/13: Procena osetljivosti U.u. u doksiciklin (DOX) 1-2 µg/mL

		DOX		LVX		MXF		CLI		TET	
		4	8	1	2	0.25	0.5	0.25	0.5	4	8
14	Mh >10 ⁴										
	Uu >10 ³										
1											
MYCOFAST® <i>RevolutioN</i> 2											
	Uu 10 ⁴			2	4	2	4	8	16	1	2
	Uu ≥10 ⁵										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Deo za dijagnozu vrste M.h. (obojeno crveno):

Jažica 14: Identifikacija i brojanje M.h. za nivoe ≥10⁴ CCU/mL

Jažice 15/16: Procena osetljivosti M.h. na doksiciklin (DOX) 4-8 µg/mL

Jažice 17/18: Procena osetljivosti M.h. na levofloksacin (LVX) 1-2 µg/mL

Jažice 19/20: Procena osetljivosti M.h. na moksifloksacin (MXF) 0,25-0,5 µg/mL

Jažice 21/22: Procena osetljivosti M.h. na klindamicin (CLI) 0,25-0,5 µg/mL

Jažice 23/24: Procena osetljivosti M.h. na tetraciklin (TET) 4-8 µg/mL

5 – MERE OPREZA TOKOM UPOTREBE

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

Uzorkovani uzorci i reagensi potencijalno su zarazni, mora se 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.

Pre upotrebe ne koristite oštećene ili nepravilno uskladištene reagense.

pozitivan rezultat s galerijom MYCOFAST *RevolutioN* 2 reflektuje kolonizaciju urogenitalnom mikoplazijom, ali se ne može upotrebiti sama za kliničku dijagnozu.

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

6 – PRIKUPLJANJE I OBRADA UZORAKA

6.1 Prikupljanje 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 izlučevine s vanjske strane cerviksa koristeći se prvim brisom. Mikoplazme poseduju visoki afinitet za mukozne stanice na koje prijanjaju, stoga je potrebno temeljno ostrugati sluznicu kako bi postupak bio efikasan.

Uretralni uzorci:

Koristite samo štapić s transporterom.

Očistite meso i sakupljajte ga zapljuskivanjem ili struganjem ćelija.

6.2 Transport uzoraka

Prevoz u povoljnom okruženju ili u univerzalnom okruženju za viruse, klamidiju, mikoplazmu i ureaplazmu:

Pogledajte uputstvo za upotrebu proizvođača

Prevoz u medijumu AMIES-a:

Uzmite 300 µL inokulisanog transportnog medijuma u bočicu UMMt AMIES medijuma.

6.3 Čuvanje uzoraka

Čuvanje u medijumu AMIES ili u univerzalnom medijumu za virus, klamidiju, mikoplazmu i ureaplazmu

Pogledajte uputstvo za upotrebu

Čuvanje u medijumu UMMt AMIES

Nakon inokulacije, medijum UMMt AMIES može se čuvati na sobnoj temperaturi (18-25°C) 20 sati, ili na temperaturi od 2 do 8°C tokom 56 sati. Za čuvanje 3 dana na temperaturi od -20°C, prethodno dodajte 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 navedenog na etiketama.

Ako ste koristili samo jedan set jažica (U.u.)/(M.h.) ili dva, tri ili četiri seta, neupotrebljeni ostatak kompleta MYCOFAST Screening *RevolutioN*, hermetički zatvoreni u aluminijskoj kesici može se čuvati četiri sedmice na temperaturi od 2-8°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 – POTREBNI MATERIJALI KOJI SE NE ISPORUČUJU ZAJEDNO S KOMPLETOM

Oprema za uzorkovanje (štapići s njegovim medijumom za transport ili univerzalni medijum za virus klamidije, mikoplazme i ureaplazme)
 Stabilizator MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064)
 Pipete i konusni spremnici za kontaminirani otpad Mineralno ulje
 Sušač je kalibriran na temperaturu od 37 ± 1°C

9 - OPERATIVNI POSTUPAK

Ostaviti reagense na sobnoj temperaturi 20 do 30 minuta.

9.1 PRACENJE - Komplet MYCOFAST Screening RevolutioN

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

9.1.1 Inokulacija medijuma UMMt AMIES RevolutioN

Ako je transport izvršen u mediju UMMt AMIES inokuliranom s 300µL medijuma Amies ili univerzalnim medijumom za virus, klamidiju, mikoplazmu i ureaplazmu; **nakon toga odmah pređite na fazu 9.1.2.**

Ako je prevoz uzorka izvršen u njegovom medijumu AMIES ili u univerzalnom medijumu za virus, klamidiju, mikoplazmu i ureaplazmu; nakon toga stavite 300 µL ovog transportnog medijuma u bočicu UMMt AMIES.

9.1.2 Inokulacija jažica U.u./M.h.

- Dozirajte prema sledećem redosledu:

Jažica (U.u.) : 100 µL inokuliranog medijuma UMMt AMIES.
 Jažica (M.h.) : 100 µL inokuliranog medijuma UMMt AMIES.
 50 µL suplementa M.h.

- Dodajte dve kapi mineralnog ulja u obe jažice.

- Na jažice stavite etikete i identifikujte uzorak. - **Višak sadržaja iz bočice inokuliranog medijuma UMMt AMIES** čuvajte na temperaturi od 2 do 8°C da biste u slučaju pozitivnog rezultata mogli da nastavite s analizom.

9.1.3 Inkubacija 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 u sklopu od 24 sata.

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

- Proverite da li je sadržaj 2 jažice (U.u.) (M.h.) bistar. Zamućeni sadržaj jažice označava bakterijsku kontaminaciju. U tom slučaju ponovite test.
 - Posmatrajte promenu boje u jažicama U.u. i M.h.:
 Jažica U.u. je narandžasta ili crvena: Prisustvo *Ureaplasme urealyticum*
 Jažica M.h. je narandžasta ili crvena: Prisustvo *Mycoplasme hominis*
 Jažica U.u. / M.h. je žuta: Odsutnost mikoplazmi

U slučaju pozitivnog rezultata, nastavite postupak dijagnostike pomoću kompleta MYCOFAST RevolutioN 2

9.2 BROJANJE, IDENTIFIKACIJA I ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI

9.2.1 Inokulacija kompleta MYCOFAST RevolutioN 2

Uklonite samolepljivu traku tako što ćete povući jezičak i dozirajte u jažice prema ledećem rasporedu:

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

Pokrijte komplet uključivanjem poklopca „closing system“.

Identifikujte uzorak.

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

9.2.2 Inkubacija kolekcije

Inkubirajte kolekciju na temperaturi od 37±1°C tokom 24 sata.

Za brojanje U.u. i M.h, očitajte rezultate nakon 24 sata. Inkubacija kompleta može se produžiti do 48 sati samo u slučaju negativnih tečnih uzoraka u roku od 24 sata.

9.2.3 Očitavanje i interpretacija

Proverite da li je sadržaj svih jažica iz kompleta bistar. Zamućeni sadržaj jažice označava bakterijsku kontaminaciju. U tom slučaju ponovite analizu. Rast urogenitalnih mikoplazmi u jažicama rezultira alkalizacijom medijuma koji postaje crven. U odsutnosti rasta urogenitalnih mikoplazmi, medijum ostaje žut. Narandžastu boju treba smatrati pozitivnim rezultatom (granična stopa). Za interpretaciju testa, v. tabelu rezultata.

Numération (puits 1, 2, 3 et 14)

Identifikujte jažice koje su postale crvene i interpretirajte sledeće:

1 koncentracija U.u. od 10³ CCU/mL
 1 i 2 koncentracija U.u. od 10⁴ CCU/mL
 1, 2 i 3 koncentracija U.u. ≥ 10⁵ CCU/mL
 14 koncentracija M.h. ≥ 10⁴ CCU/mL

Patološka obeležja mikoplazmi u urogenitalnim infekcijama podložno je interpretaciji prema specifičnim preporukama (1,3,7). Patološke stope obično odabrane za *U. urealyticum* su: ≥10⁴ CCU/mL za uretralni uzorak, ≥10³ CCU/mL za prvi mlaz urina ili spermu (iako nova lokalna preporuka spominje prag od ≥10⁴ CCU/mL za spermu (7)). Za *M. hominis*, prisutnost u koncentraciji od ≥10⁴ CCU/mL u cervikovaginalnom uzorku je abnormalna (1, 3).

Ispitivanje osetljivosti na antibiotike (jažice 4 do 13, jažice 15 do 24)

Promena boje medijuma u jažicama koje sadrže antibiotike odražava sposobnost soja bakterije da raste u prisutnosti testirane koncentracije antibiotika. Žuta boja medijuma ukazuje na nesposobnost razvijanja soja u prisutnosti testirane koncentracije antibiotika. Sojevi su kvalifikovani kao osetljivi ili otporni na antibiotike prema sledećim kriterijumima interpretacije na način kako ih definiše CLSI (2):

Kriterijumi interpretacije za MIK izraženo u µg/mL:

Klasa	Antibiotik	U.u.		M.h.		Komentari
		S	R	S	R	
Kinoloni	Levofloksacin	≤2	≥4	≤1	≥2	
	Moksifloksacin	≤2	≥4	≤0,25	≥0,5	
Linkozamidi	Klindamicin			≤0,25	≥0,5	
Tetraciklini	Tetraciklin	≤1	≥2	≤4	≥8	
	Doksiciklin	≤1	≥2	≤4	≥8	
Makrolide	Eritromicin	≤8	≥16			Sojevi osetljivi na i eritromicin biće takođe osetljivi na azitromicin

Pomoć pri interpretaciji:

Test osetljivosti U.u.

Antibiotik	LVX			MXF			ERY			TET			DOX		
	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Koncentracija (µg/mL)	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Uzorci	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int* = interpretacija

Test osetljivosti M.h.

Antibiotik	LVX			MX F			CLI			TET			DOX		
	1	2	int*	0,25	0,5	int*	0,25	0,5	int*	4	8	int*	4	8	int*
Koncentracija (µg/mL)	1	2	int*	0,25	0,5	int*	0,25	0,5	int*	4	8	int*	4	8	int*
Uzorci	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int* = interpretacija

Soj se smatra osetljivim kada je njegov rast sprečen u dve kritične koncentracije antibiotika. Soj se smatra otpornim kada je njegov rast sprečen u visoko kritičnoj koncentraciji antibiotika i nije sprečen u nisko kritičnoj koncentraciji, ili kada njegov rast nije sprečen u dve kritične koncentracije antibiotika.

M. hominis je prirodno otporna na makrolide s 14 i 15 ugljikohidrata, uključujući eritromicin.

U nekim populacijama stopa otpornosti na tetraciklin može dostići vrednost 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 prevalenca nije poznata.

10 - POSEBNI SLUČAJEVI

Zbog vrlo visokih nivoa koncentracije u U.u. i M.h, sve jažice koje sadrže klicu postaju crvene. Zbog toga se preporučuje razređivanje uzorka radi dobijanja tačnijeg rezultata. U tom slučaju postupite na sledeći način:

Inokulirajte novu bočicu UMMt AMIES zapremine 2,6 mL s 300µL izvornog medijuma UMMt AMIES pohranjenog na temperaturi od 2 do 8°C (§ 9.1). Inokulirajte novu kolekciju novog inokulisanog medijuma UMMt AMIES.

Vodite računa o odnosu razređivanja (1:10) za interpretaciju brojanja. Ako je potrebno, na agaru A7 potvrdite prisutnost mikoplazmi ponovnim izolovanjem iz izvornog medijuma UMMt AMIES pohranjenog na temperaturi od 2 do 8°C (§ 9.1). Neravnomerna temperatura inkubacije ili <36°C (često otvaranje grijalice, heterogenost temperature u grijalici...) može da uspori kinetiku rasta mikoplazmi.

11 - KONTROLA KVALITETA

Le contrôle qualité peut être réalisé à partir des souches d'*U. urealyticum* et de *Mycoplasma hominis* du coffret MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) ou à partir d'une souche de collection lyophilisée (*U. urealyticum* ATCC 27815 ou *M. hominis* ATCC 23114) préalablement cali-brée à 10⁴⁻⁵ CCU/mL.

Pracjenje: Inokulirajte dve jažice iz jedne kolekcije MYCOFAST Screening RevolutioN i nastavite s testom na način kako je opisano u ovom uputstvu (§ 9.1).

Očekivani rezultati za soj: U.u. (+) i M.h. (-) ;

Brojanje, identifikacija i ispitivanje osetljivosti: Inokulirajte kolekciju MYCOFAST RevolutioN 2 i nastavite sa testiranjem na način kako je opisano u ovom uputstvu (§ 9.2).

Očekivani rezultati u nastavku (ATCC):

MYCOFAST RevolutioN 2

	U.u.		M.h.		LVX	MXF	ERY	TET	DOX	CLI
	10 ³	10 ⁴	≥10 ⁵	≥10 ⁴						
Soj U.u. ATCC 27815	+	+	+/-	NI	S	S	S	S/R	S	NI
Soj M.h. ATCC 23114.	NI	NI	NI	+	S/R	S	NI	S	S	S

NI :Nije moguće interpretirati

12 - OGRANIČENJA METODE

12.1 - Skringing:

Komplete MYCOFAST Screening *RevolutioN* ima prag osetljivosti $\leq 10^3$ CCU/mL i ne dozvoljava brojanje. Broj dobijen u kompletu MYCOFAST *RevolutioN* 2 može da bude negativan nakon pozitivnog rezultata.

12.2 - Brojanje, identifikacija i ispitivanje osetljivosti

Neke bakterije koje su prisutne u količini $>10^{6-7}$ CFU/mL i poseduju enzim ureazu mogu da uzrokuju promenu boje svih jažica iz kompleta. Njihova prisutnost može se potvrditi ponovnim izolovanjem na čokoladnom agaru iz originalnog medijuma UMMt AMIES skladištenog na temperaturi od 2 do 8°C (§ 9.2). pH vrednost osnovnog uzorka (pH>8) može promeniti boju medijuma. U tom slučaju razredite uzorak (1:10) u drugom medijumu UMMt AMIES i interpretirajte ga uzimajući u obzir razređivanje.

pH vrednost kiselog uzorka (pH \leq 5) može da uspori promenu boje.

Uzorak koji sadrži krv može da prouzrokuje promenu boje jažica iz kompleta MYCOFAST *RevolutioN* 2, što se interpretira kao pozitivni rezultati. U tom slučaju razredite uzorak (1:10) u drugom medijumu UMMt AMIES i interpretirajte ga uzimajući u obzir razređivanje. Uzorak s niskim nivoima mikoplazmi ($<10^3$ CCU/mL) može da prouzrokuje slučajnu promenu boje različitih jažica iz kompleta. Kao i kod svake metode istraživanja klica, kvaliteta uzorka uslovljava rezultat testa. Zbog toga negativni rezultat ne ukazuje nužno na odsutnost infekcije.

13 – PERFORMANSE

13.1 Skringing i diferencijacija- Identifikacija i brojanje

Komplet MYCOFAST Screening *RevolutioN*

Komparativna studija sprovedena je iz kliničkih vaginalnih uzoraka (n=87 za 2 vrste U.u. i M.h.) na suvim brisevima u njihovom transportnom medijumu (Transwab i VCM - Medical Wire i Eswab - Copan). Rezultati dobijeni pomoću kompleta MYCOFAST Screening *RevolutioN* upoređeni su s metodom brojanja u tečnom mikro-rastvoru. Komplet MYCOFAST Screening *RevolutioN*:

- Kod skringinga dve vrste U.u. i M.h. poklapanje je 97,7%.

Naveli smo 2 lažna negativna rezultata U.u. za koncentraciju od 10^3 CCU/mL tokom rutinske laboratorijske metode, znajući da se ta koncentracija smatra infra-patološkom za vaginalne uzorke. Za U.u. i M.h. ukupno poklapanje za supra-patološke koncentracije iznosi 100%.

- Za diferencijaciju, svi testirani uzorci su omogućili ispravnu identifikaciju U.u. i M.h. u jažicama iz kompleta MYCOFAST Screening *RevolutioN*.

13.2 Identifikacija, brojanje

Direktna metoda kompleta MYCOFAST *RevolutioN* 2

% ukupnog poklapanja		U.u.	M.h.	U.u./M.h.
Izolovani sojevi (koncentracija $\leq 10^3$ CCU/mL) (v. § 14.1.1 i napomenu 1)	čitanje za 24 sata	88,9	NA*	NA*
	čitanje prema § 9.3	86,7	NA*	NA*
Izolovani sojevi (koncentracija $\geq 10^4$ CCU/mL) (v. § 14.1.1)	čitanje za 24 sata	91	96,4	93,7
	čitanje prema § 9.3	82,1	92,5	87,3
Vaginalni klinički uzorci (v. § 14.1.2)	čitanje prema § 9.3	88,2	100	94

NA *: nije primenljivo

13.2.1 - Na izolovanim sojevima

Komparativna studija sprovedena je na 26 izolovanih sojeva (sojevi ATCC i sojevi iz kolekcije) koji su testirani odvojeno (U.u. ili M.h.) na 3 reference za transportni medijum (Sigma Transwab i Sigma VCM iz Medical Wire i ESwab Collection Kit iz BD) u nekoliko koncentracija (ukupno 279 testova). Dobijeni rezultati se upoređuju s onima dobijenim metodom brojanja u tečnom mikro-rastvoru.

Za interpretaciju s fiksnim patološkim pragom od 10^3 CCU/mL i očitavanjem rezultata nakon 24 sata; ukupno poklapanje za U.u. je 88,9% (imamo 14 lažnih pozitivnih rezultata: 13 za koncentraciju od 10^2 CCU/mL i za koncentraciju nižu

od 10^2 CCU/mL i 17 lažnih negativnih rezultata: 11 za koncentraciju od 10^3 CCU/mL – 5 za koncentraciju od 10^4 CCU/mL i jedan za koncentraciju od 10^5 CCU/mL za metodu brojanja u mikro-rastvoru). Za interpretaciju s fiksnim patološkim pragom koncentracije 10^4 CCU/mL i očitavanjem rezultata nakon 24 sata; ukupno poklapanje za U.u. je 91% (imamo 18 lažnih pozitivnih rezultata: za koncentraciju od 10^2 do 10^3 CCU/mL i 7 lažnih negativnih rezultata: za koncentraciju od 10^4 do 10^5 CCU/mL u metodi brojanja u mikro-rastvoru).

Ukupno poklapanje za M.h. je 96,4% za čitanje rezultata nakon 24 sata (imamo jedan lažni pozitivni rezultat za koncentraciju 10^3 CCU/mL i 9 lažnih negativnih rezultata za koncentraciju 10^4 CCU/mL kod metode brojanja u mikro-rastvoru).

Ukupna podudarnost U.u. + M.h. sa čitanjem rezultata nakon 24 sata je 93,7%.

Za interpretaciju s fiksnim patološkim pragom 10^3 CCU/mL i očitavanjem rezultata prema protokolu opisanom u uputstvu (§ 9.2); ukupno poklapanje za U.u. je 86,7% (imamo 35 lažnih pozitivnih rezultata: 34 za koncentraciju 10^2 CCU/mL i jedan za koncentraciju nižu od 10^2 CCU/mL i 2 lažna negativna rezultata: za koncentraciju 10^3 CCU/mL kod metode brojanja u mikro-rastvoru).

Za interpretaciju s fiksnim patološkim pragom od 10^4 CCU/mL i očitavanjem rezultata prema protokolu opisanom u uputstvu (§ 9.2); ukupno poklapanje za U.u. je 82,1% (imamo 49 lažnih pozitivnih rezultata: za koncentraciju 10^2 - 10^3 CCU/mL i 1 lažni negativni rezultat: za koncentraciju 10^4 CCU/mL kod metode brojanja u mikro-rastvoru en méthode de numération en micro dilution).

Ukupno poklapanje za M.h. je 92,5% za čitanje rezultata prema protokolu opisanom u uputstvu (§ 9.2) (imamo 21 lažni pozitivni rezultat za koncentraciju 10^2 – 10^3 CCU/mL kod metode brojanja u mikro-rastvoru).

Ukupna podudarnost U.u. + M.h. s očitavanjem rezultata prema protokolu u uputstvu (§ 9.3) je 87,3%.

13.2.2 - Na kliničkim uzorcima

Komparativna studija sprovedena je iz kliničkih vaginalnih uzoraka (n=59) na suvim brisevima u njihovom transportnom medijumu (Sigma Transwab et Sigma VCM iz Medical Wire i ESwab Collection Kit iz BD).

Rezultati dobijeni pomoću kompleta MYCOFAST *RevolutioN* 2 AMIES upoređeni su s metodom brojanja u tečnom mikro-rastvoru.

Ukupno poklapanje za U.u. iznosi 88,2% (imamo 3 lažna negativna rezultata za koncentracije 10^4 – 10^5 – 10^6 CCU/mL i 4 lažna pozitivna rezultata za koncentracije $<10^2$ – 10^2 i 10^3 CCU/mL kod metode brojanja u mikro-rastvoru).

Ukupno poklapanje za M.h. iznosi 100%.

Ukupno poklapanje U.u. i M.h. iznosi 94%.

13.3 Testovi osetljivosti

U nacionalnoj referentnoj laboratoriji sprovedena je usporedna studija metode za određivanje minimalnih inhibicijskih koncentracija (MIK) u tečnom medijumu i metode MYCOFAST *RevolutioN* 2. Testirani sojevi (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* i 16 *M. hominis*) su referentni sojevi, klinički sojevi divljeg tipa ili sojevi koji su stekli otpornost. Svaki soj se testira u rastvorima koncentracije 10^3 – 10^4 i 10^5 CCU/mL u 3 mL UMMt.

Za koncentracije 10^4 i 10^5 CCU/mL, rezultati su očitani i interpretirani nakon 24h inkubacije.

Kod koncentracija od 10^3 UCC/ml, rezultati su očitani i interpretirani nakon 48 sati inkubacije, ako je test bio negativan nakon 24 sata.

U skladu s preporukama CLSI, rezultati dobijeni primenom obe metode interpretirani su kao osetljivi (S) ili otporni (R).

Ukupno poklapanje za *U. urealyticum/U. parvum* je 95,5% Ukupno poklapanje za *M. hominis* je 100%

poklapanje	<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

DTM: Veoma veliko nepoklapanje

a: Odstupanje dobijeno pri koncentraciji 10^3 CCU/mL (referentni MIK od 0,5 µg/mL), Četiri odstupanja dobijena pri koncentraciji 10^5 CCU/mL (referentni MIK od 0,5 do 1 i 8 µg/mL).

b: Jedno odstupanje dobijeno pri koncentraciji od 10^5 CCU/mL (referentni MIK od 8 µg/mL).

c: jedno odstupanje dobijeno pri koncentraciji od 10^3 CCU/mL (referentni MIK od 8 µg/mL).

Jedno odstupanje dobijeno pri koncentraciji 10^5 CCU/mL (referentni MIK od 2 µg/mL)

d: jedno odstupanje dobijeno pri koncentraciji od 10^5 CCU/mL (referentni MIK od 4 µg/mL).

14 – ODLAGANJE OTPADA

Otpad mora biti zbrinut u skladu s higijenskim pravilima i propisima koji su na snazi za ovu vrstu reagensa u zemlji upotrebe.

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. 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 MAN-DELLG.L., BENNETJ.E. and DOLIN 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
FRANCUSKA

☎: 33 (0)4 94 88 55 00

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

<http://www.elitechgroup.com>