

	Јавна здравствена установа болница „Свети Врачи“Бијељина Српске војске 53			МИ-10-014
Доказивање присуства <i>Mycoplasma hominis</i>, <i>Ureaplasma urealyticum</i> и <i>Ureaplasma parvum</i> у урогениталном тракту тестом «<i>Mycoplasma ist</i>» 3 - Biomérieux				
Страна 1 од 8	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	2	2023-01-24	др Санда Лазих руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Доказивање присуства *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum* у уrogenиталном тракту тестом «*Mycoplasma ist*» 3 - Biomérieux.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Ова метода омогућава семиквантитативно испитивање узорака за дијагностику уrogenиталних инфекција узрокованих *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* и *Mycoplasma hominis*. Омогућава детекцију, идентификацију, квантификацију и испитивање осјетљивости на антибиотике. Тест садржи транспортни медијум, бујон и стрип са 25 купула. Бујон пружа оптималне услове за раст наведених врста. Стрип омогућава детекцију / идентификацију, квантификацију и испитивање осјетљивости на антибиотике. У подлози се налази индикатор фенол - црвено, тако да се промјена рН одржава промјеном боје медијума из жуте у црвену. Подлога садржи три антибиотика и антимицотик који обезбјеђују селективност.

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

Карактеристике «*Mycoplasma ist*» 3 је процијеђен у три клиничке лабораторије у Француској, Уједињеном Краљевству и Србији. 516 клиничких узорака (брисеви вагине / цервикса (n=230, 44,6%), брисеви уретре (n=56, 10,9%), сперма (n=88, 17,1%) и мушки урин (n=142, 27,5%) је укључено у ово испитивање. Статус композитног узорка је дефинисан на основу А7 агара (Biomérieux, Реф. 43003) и резултата ланчане реакције полимеразе (ПЦР). Употреба А7 агара је такође омогућила да се процијени густина узорка. Антимикробна осјетљивост изолата је била затим тестирано коришћењем CLSI-M43А усаглашеног Broth microdilution-а. Из ове популације, 312 узорака је имало негативан статус, а 204 (укључујући 78 (38,2%) вјештачких узорака) је имало позитиван статус, укључујући 22 мијешана узорка.

Детекција и идентификација:

Резултати идентификације «*Mycoplasma ist*» 3 су упоређени са статусима комплементарног узорка. Позитивна и негативна усаглашеност [95% интервал повјерења] је била следећа:

Табела 1:

	Позитивна	Негативна
Ниво узорка (може садржати <i>Ureaplasma spp</i> и <i>Mycoplasma spp</i>)	97,5%	99,7%
<i>Ureaplasma spp.</i>	98,5%	99,7%
<i>Mycoplasma hominis</i>	92,6%	99,0%

Напомена:

- Током клиничких испитивања, 4 узорка намјерно су контаминирана са *Ureaplasma spp.* отпорном на еритромицин, и показали су пораст у купулама за идентификацију, енумерацију и клиндамицин *Mycoplasma hominis*.

Болница Бијељина	Страна 2 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-014
		2	2023-01-24	

Током клиничких испитивања, 22 узорка контаминирани са оба *Ureaplasma spp.* и *Mycoplasma hominis*. «*Mycoplasma ist*» 3 омогућио је детекцију обје врсте у 18 узорка и дјелимичну детекцију, *Ureaplasma spp.* само, за 4 преостала узорка.

Квантификација:

Резултати квантификације «*Mycoplasma ist*» 3 су упоређени са резултатима добијеним коришћењем А7 агара, за узорке са позитивним подударним врстама са А7 агаром (гранична вриједност је 10^4 CFU / ml за обје методе). Анализирано је 117 узорка који садрже *Ureaplasma spp.*, 86 са *Mycoplasma hominis* и 17 мијешаних узорка. Квантификација «*Mycoplasma ist*» 3 тестом се слагала са резултатима добијених А7 агаром, у оквиру $\pm 10^1$ CFU/ml.

Табела 2:

	Тачно подударање	Подударање оквиру $\pm 10^1$ CFU / ml.
Мијешани узорци (може садржати <i>Ureaplasma spp</i> и <i>Mycoplasma spp</i>)	86,0 %	997,8 %
<i>Ureaplasma spp.</i>	86,3 %	100 %
<i>Mycoplasma hominis</i>	83,7%	94,2 %

Напомена:

Купула за пребројавање *Uspp* $\geq 10^3$ CFU / ml је релевантна за узорке урина мушкараца. Међу 19 урина тестираних током испитивања са позитивним статусом на *Ureaplasma spp.*, сви су имали густину $\geq 10^3$ CFU /ml коришћењем А7 агара.

Користећи «*Mycoplasma ist*» 3, 17 узорка је такође имало густину $\geq 10^3$ CFU / ml. Два преостала узорка су имала густину од 10^3 CFU / ml користећи А7 агар и $<10^3$ CFU / ml користећи «*Mycoplasma ist*» 3. Имајте на уму да тумачење А7 агара не дозвољава резултат $<10^3$ CFU / ml док раст може бити промјенљив за узорке са густином $\leq 10^2$ CFU / ml.

Тест осјетљивости на антибиотике (АБГ):

Интерпретативне категорије добијене са «*Mycoplasma ist*» 3 су упоређене са МИС добијеним коришћењем CLSI-M43A Broth microdilution референтне методе и сродних интерпретативних граничних вриједности које имају исте статусе узорка. Перформансе АБГ су сажете у сљедећој табели (СА: усаглашеност, МЕ: значајна грешка, VME: Веома значајна грешка, R: Отпоран, S: Осјетљив):

Табела 3:

	Статус изолата			Индекс перформансе		
	Total	# S	# R	CA (%)	ME (%)	VME (#)
<i>Ureaplasma spp.</i>						
Levofloxacin	124	120	4	96.0% (119/124)	4.2% (5/120)	0
Moxifloxacin	124	123	1	98.4% (122/124)	1.6% (2/123)	0
Tetracycline	124	120	4	97.6% (121/124)	1.7% (2/120)	1

Болница Бијељина	Страна 3 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-014
		2	2023-01-24	

Erythromycin	124	120	4	99.2% (123/124)	0.8% (1/120)	0
Telithromycin	125	122	3*	99.2% (124/125)	0.8% (1/122)	0
Сви антибиотици заједно	621	605	16	98.1% (609/621)	1.8% (11/605)	1
<i>Mycoplasma hominis</i>	Total	# S	# R	CA (%)	ME (%)	VME (#)
Levofloxacin	84	82	2	98.8% (83/84)	1.2% (1/82)	0
Moxifloxacin	84	81	3	97.6% (82/84)	1.2% (1/81)	1
Tetracycline	84	65	19	97.6% (82/84)	1.5% (1/65)	1
Clindamycin	84	84	0	100.0% (84/84)	0.0% (0/84)	Није примјењиво
Сви антибиотици заједно	336	312	24	98.5% (331/336)	1.0% (3/312)	2
Сви антибиотици и изолати заједно	957	917	40	98.2% (940/957)	1.5% (14/917)	3

*Нису публиковане граничне вриједности за телитромицин, те су ова 3 соја резистентна на телитромицин.

Напомена:

За *Ureaplasma spp.*: Међу 12 грешака регистрованих током испитивања, 8 од 11 значајних грешака и 1 веома значајна грешка потичу од изолат са MIC вриједностима у оквиру ± 1 двоструке вриједности MIC - а који су дефинисани CLSI граничним вриједностима, док не постоји категорија интермедијерно осјетљив за те антибиотике. Преостале значајне грешке су евидентирани код:

- еритромицина, за изолат коме је MIC 0,5 μ g/l,
- моксифлоксацин, за изолат коме је MIC 0,5 μ g/l,
- телитромицин, за изолат коме је MIC 0,125 μ g/l.

За *Mycoplasma hominis*: Међу 5 грешака регистрованих током испитивања, 1 од 3 значајне грешке и 2 веома значајне грешке потичу од изолат са MIC вриједностима у оквиру ± 1 двоструке вриједности MIC - а који су дефинисани CLSI граничним вриједностима, док не постоји категорија интермедијерно осјетљив за те антибиотике. Преостале 2 значајне грешке су евидентирани код:

- левофлоксацин, за изолат коме је MIC 0,5 μ g/l,
- тетрациклин, за изолат коме је MIC 0,5 μ g/l.

4. ВРСТА УЗОРКА

Цервикални и уретрални брис, први млаз урина мушкараца, ејакулат.

Болница Бијељина	Страна 4 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-014
		2	2023-01-24	

Узорак узети прије увођења антибиотске терапије.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

У складу са упутством УП-10-135: *Узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику.*

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

У складу са упутством УП-10-135: *Узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику.*

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Паковање « Mycoplasma ist 3 » садржи:

- 25 бочица са 3,1 mL транспортним медијем (P1),
- 25 бочица са 1 mL лиофилизованог медијума (P2),
- 25 стрипова са удубљењима у које се инокулишу узорци за идентификацију и тест осјетљивости на антибиотике,
- 25 поклопаца за стрип.

Паковање « Mycoplasma ist 3 » не садржи:

микропипета аутоматска, инкубатор, вортех, фрижидер, аутоклав, минерално уље.

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Анализу спроводити у уобичајеним микроклиматским условима у лабораторији, 20-24°C, у складу са УП-10-023: *Употреба средстава личне заштите у Служби за микробиологију са паразитологијом* и УП-10-142: *Мјере заштите на раду у Служби за микробиологију са паразитологијом.*

Стрипове и бочице чувати на температури фрижидера 2 - 8 °C до момента употребе. Кит садржи компоненте животињског поријекла, за које не постоји тотална гаранција о одсуству трансмисивних болести. Зато их сматрати потенцијално инфективним и руковати са њима у том смислу. Све узорке, микробиолошке културе и инокулисане продукте сматрати потенцијално инфективним и тако их третирају сав материјал у контакту са узорком и узорак након завршетка анализе аутоклавирати.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

За добијање најбољих резултата са овим китом, важно је безусловно поштовати сљедеће:

- преbacити тачно 3ml инокулисаног P1 раствора у P2,
- инокулисати тачно 55µL у сваки бунарчић са аутоматском микропипетом,
- додати тачно 2 капи минералног уља у сваки бунарчић,
- поштовати услове инкубације.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

1. Темперирај на собној температури P1 бочицу, 15-30 минута;
2. Након узорковања:
 - инокулисати брис у P1 бочицу (интезивно ротирајући у подлози и оциједити о зид боце прије извлачења),
 - 200µL течног узорка (ејакулат, урин) инокулисати у P1 бочицу,
 - уколико је мање од 200µL течног узорка, али $\geq 100 \mu\text{L}$, раствори P2 бочицу са P1 раствором (чиме добијамо Уреа аргинин ЛУО 2 бујон). Добијени бујон додај узорку (за 100 µL узорка

Болница Бијељина	Страна 5 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-014
		2	2023-01-24	

треба 2 000 μL бујона; за 150 μL узорка треба 2500 μL бујона), преосталу количину бујона одбацити из P2 бочице па у њу вратити узорак са бујоном. Даље настави од корака 5.

3. Обезбиједити поштовање услова транспорта и чувања узорка:

Температура	18-25°C	2-8°C
Максимално вријеме чувања инокулисаног P1 раствора	20 часова	72 часа

Непоштовање ових услова може дати лажне резултате.

4. Након мијешања, пребаци 3mL инокулисаног P1 раствора у P2 бочицу - то је Уреа аргинин ЛУО 2 бујон;

5. Вортесовати да се обезбиједи комплетно растварање лиофилизата.

Инокулација стрипа:

1. Темперирај на собној температури стрип 15-30 минута;
2. Извади стрип из кесице, баци дисекант;
3. Напиши број протокола узорка на издужени дио стрипа (не на поклопац!);
4. Одмах инокулиши по 55 μL садржаја Уреа аргинин ЛУО 2 бујона (P1+P2) у сваку од 25 тест купула / бунарчића у стрипу;
5. Додај 2 капи монералног уља у сваки бунарчић;
6. Стави поклопац, обезбиједи хоризонталан положај стрипа како не би дошло до изливања уља;
7. Инкубирај стрип и Уреа аргинин ЛУО 2 бујон (P1+P2), 24 – 48 часова на $36\pm 2^\circ\text{C}$, у аеробним условима.

Напомена:

- користити само компоненте из истог кита,
- не користити реагенсе који су оштећени, истеклог рока или замућеног садржаја,
- све компоненте кита морају бити темперирани на собној температури прије употребе.

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Стрипови и медији пролазе систематичне контроле квалитета код произвођача. За контролу квалитета у лабораторији користити:

1. *Ureaplasma parvum*, ATCC 27815.
2. *Ureaplasma urealyticum*, ATCC 33175.
3. *Mycoplasma hominis*, ATCC 23114.

Контролу радити према упутству произвођача. Препоручена учесталост је за сваки нови лот или уколико постоји проблем са резултатима, чувањем кита и сл.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА, БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Проучавана је интерференција неколико супстанци са тестом MICOPLASMA IST 3. Супстанце су биле из ендогених и егзогених извора: једињења унесена током лијечења пацијената, загађивачи који су ненамјерно унијети током прикупљања узорака и метаболити произведени у патолошким стањима.

Болница Бијељина	Страна 7 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-014
		2	2023-01-24	

а) За *Ureaplasma* spp., резултат ABG + - профила треба тумачити као отпоран (R) за све антибиотике осим за тетрациклин у TET купули који треба тумачити као осјетљив (S).

б) За *Mycoplasma hominis*, резултат ABG + - профила треба тумачити као отпоран (R) за све антибиотике осим клиндамицина у CLI купули који треба тумачити као осјетљив (S).

Према SLCI M43 - А смјерницама (2), организми осјетљиви на тетрациклин такође ће бити осјетљиви на доксициклин, а организми осјетљиви на еритромицин такође ће бити осјетљиви на азитромицин.

Напомена 1:

Идентификација / квантификација и тестирање осетљивости на антимицробне лијекове могу се тумачити у различито вријеме за дату врсту.

Напомена 2:

Резултати су неразумљиви, тј немогуће их је интерпретирати ако:

- Нижа енумерациона купула је негативна, а виша енумерациона купула је позитивна (на примјер $\square 10^4$ је негативна, а $\square 10^6$ је позитивна).
- Контрола раста (0) је негативна и неке купуле за идентификацију и набрајање су насумично позитивне.
- Контрола раста (0) је позитивна и неке друге купуле су насумично позитивне.
- Резултат је негативан при најнижој концентрацији антибиотика, а позитиван при највећој. У овом случају, тест треба поновити.

Напомена 3:

Ако је титар низак, промјена боје се може примјетити само у бочици уреа - аргинин ЛИО 2, а не у контроли раста на траци (титар узорка је пренизак да би произвео промјену боје). Тест не треба тумачити.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Собзиром на то да су гениталне микоплазне чести колонизатори гениталног тракта, значајна квантификација (клинички значај има присуство $\geq 10^4$ CFU / CCU у узорку). Налаз је неопходно тумачити у складу са клиничком сликом и осталим налазима пацијента.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Није примјењиво.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Није примјењиво.

17. АЛАРМАНТНЕ / КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Није примјењиво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

С обзиром на то да су гениталне микоплазне чести колонизатори гениталног тракта, значајна квантификација (клинички значај има присуство $\geq 10^4$ CFU - CCU у узорку). Налаз је неопходно тумачити у складу са клиничком сликом и осталим налазима пацијента.

Болница Бијељина	Страна 8 од 8	Издање:	Важи од:	МИ-10-014
		2	2023-01-24	

Као и код свих података о тестирању осетљивости на антибиотике, резултати «Mycoplasma ist» 3 су само ин витро вриједности и могу пружити индикацију потенцијалне осетљивости организма ин vivo. Избор лијека је на клиничару који, поред резултата овог теста, треба узети у обзир историју болести пацијента, фармакокинетику и фармакодинамику лијека као и клиничко искуство у лијечењу таквих инфекција. Такође се мора узети у обзир доза и режим дозирања антибиотика.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

- узорак се не може сматрати негативним прије 48 сати инкубације,
- ако је титар узорка низак (позитивна уреа - аргинин лио 2 бујон), купуле стрипа можда неће промијенити боју или промјена боје може бити дискретна,
- одређивање броја изоловани бактерија обављено овим тестом само даје индикацију титра. Тачан титар треба одредити на основу метода културе коришћењем специфичних агара (clsi m43),
- неки Ureaplasma spp. сојеви који су високо отпорни на еритромицин ($\text{mic} \geq 128 \mu\text{g/ml}$) такође могу расти у Mycoplasma hominis дијелу траке, што доводи до тумачења присуства соја Mycoplasma hominis отпорног на клиндамицин. Пошто је овај образац мало вјероватан, врсте присутне у узорку треба потврдити коришћењем алтернативне методе.
- Неки сојеви Mycoplasma hominis који су отпорни на линкомицин ($\text{MIC} \geq 8 \mu\text{g/l}$) такође могу расти у ureaplasma spp дијелу траке, што доводи до тумачења присуства Ureaplasma spp резистентне на клиндамицин, пошто је овај образац мало вјероватан, врсте присутне у узорку треба потврдити коришћењем алтернативне методе.
- Употреба једињења која садрже доле наведене активне састојке може имати инхибиторни ефекат на резултате добијене са micoplasma ist 3 тестом: кондом (латекс), гел за подмазивање (алое вера, витамин е), титанијум оксид, бисакодил, додеклонијум бромид, ескулозид сесквихидрат, еноксолон, бензокаин и промистриен.
- Присуство људске крви у клиничким узорцима могло би да утиче на резултате јер људске крвне ћелије могу да маскирају боју и отежају читавање промјене боје. Међутим, током развоја производа, нису примјећени лажни резултати узроковани присуством људске крви.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Упутство за кориштење теста «Mycoplasma ist 3», Biomérieux, France.