



## 9.2 Incubación de la galería

Incubar la galería a 37 °C ± 1 °C durante 24 horas.

Para el recuento de U.u. y M.h. lea los resultados en 24 horas. La incubación de la galería puede extenderse hasta 48 horas solo en el caso de muestras líquidas negativas en un plazo de 24 horas.

## 10 - LECTURA E INTERPRETACIÓN

### 10.1 Validación

Verificar que todos los pocillos están limpios. Un pocillo turbio indica contaminación bacteriana.

En este caso empezar otra vez la prueba.

### 10.2 Lectura e Interpretación

La lectura de los resultados consiste en identificar las coloraciones obtenidas en los diferentes pocillos de las galerías. El crecimiento de los micoplasmas urogenitales en los pocillos se traduce por una alcalinización del medio que cambia al rojo. En ausencia de crecimiento de micoplasmas urogenitales, el medio permanece amarillo. Una coloración anaranjada debe ser considerada como un test positivo (tasa límite).

En el caso de que una lectura de resultado en 48 horas de muestra líquida tenga una prueba negativa en 24 horas, haga solamente la presencia de micoplasma detectado sin recuento.

Para la interpretación de los resultados vea la hoja de resultados.

#### 10.2.1 Recuento (pocillos 1, 2, 3 y 14)

Marcar los pocillos que hayan cambiado a rojo e interpretar:

1	tasa U.u. de 10 <sup>3</sup> UCC/mL
1 y 2	tasa U.u. de 10 <sup>4</sup> UCC/mL
1, 2 y 3	tasa U.u. ≥ 10 <sup>5</sup> UCC/mL
14	tasa M.h. ≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL

El papel patológico de micoplasmas en infecciones urogenitales está sujeto a la interpretación de acuerdo con las recomendaciones específicas (1,3,7). Las tasas patológicas que se utilizan habitualmente para *U. urealyticum* son:

≥ 10<sup>4</sup>UCC/mL para una muestra uretral, ≥ 10<sup>3</sup>UCC/mL para un primer chorro de orina o esperma (aunque una nueva recomendación menciona un umbral ≥ 10<sup>4</sup>UCC/mL para al esperma [7]). Para *M. hominis* su presencia en una proporción ≥ 10<sup>4</sup>UCC/mL en una muestra cérvico-vaginal es anómala (1,3).

#### 10.2.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos (pozos 4 a 13 y después 15 a 24)

El cambio en el medio en los pozos que contienen un antibiótico refleja la capacidad de la cepa para desarrollarse en presencia de la concentración probada del antibiótico. El color amarillo del medio demuestra la incapacidad de la cepa de desarrollarse en presencia de la concentración testeada del antibiótico. Las cepas se clasifican como sensibles o resistentes a los antibióticos según los siguientes criterios de interpretación definidos por la CLSI (2):

**Tabla de criterios de interpretación para los CMI (µg/mL):**

Clase	Antibiótico	U.u.		M.h.		Comentarios
		S	R	S	R	
Quinolonas	Levofloxacina	≤2	≥4	≤1	≥2	
	Moxifloxacina	≤2	≥4	≤0,25	≥0,5	
Lincosamidas	Clindamicina			≤0,25	≥0,5	
Tetraciclina	Tetraciclina	≤1	≥2	≤4	≥8	
	Doxiciclina	≤1	≥2	≤4	≥8	
Macrólidos	Eritromicina	≤8	≥16			Las cepas sensibles a la eritromicina también lo son a la azitromicina.

Ayuda con la interpretación :

### Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos para U.u.

Antibiótico	LVX			MXF			ERY			TET			DOX		
	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Concentración (µg/mL)	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
Perfiles	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int\*= interpretación

### Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos para M.h.

Antibiótico	LVX			MXF			CLI			TET			DOX		
	1	2	int*	0,25	0,5	int*	0,25	0,5	int*	4	8	int*	4	8	int*
Concentración (µg/mL)	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
Perfiles	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int\*= interpretación

La cepa es sensible cuando su crecimiento es inhibido en ambas concentraciones críticas del antibiótico. La cepa se considera Resistente cuando su crecimiento se inhibe en la concentración crítica alta del antibiótico y no se inhibe en la concentración crítica baja, o cuando su crecimiento no se inhibe en las dos concentraciones críticas del antibiótico.

*M. hominis* es naturalmente resistente a los macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, incluyendo la eritromicina. En algunas poblaciones la tasa de resistencia a la tetraciclina puede alcanzar el 45 % para U.u. y el 39,6 % para M.h. (2). Se ha descrito resistencia a las quinolonas (U.u. y M.h.) (5, 6) y a la clindamicina (M.h.), pero se desconoce la prevalencia.

### 11 - CASOS PARTICULARES

Para tasas muy altas en U.u. o M.h., hay un cambio a rojo de todos los pozos afectados por el germen. En este caso, se recomienda diluir la muestra para obtener un resultado más preciso. Proceda como se indica a continuación: Sembrar una nueva frasco de 3 mL de UMMt con 300 µL del medio original de UMMt almacenado a 2-8 °C (sección 9.1).

Sembrar una nueva galería con la ayudas del nuevo medio UMMt obtenido. Hay que tener en cuenta la dilución (1:10) para interpretar el recuento. Confirmar si es necesario en agar A7 la presencia de micoplasmas volviendo a aislar, a partir del medio UMMt de origen conservado a 2-8 °C (apartado 9.1).

Una temperatura de incubación no constante o <36°C (frecuente apertura y heterogeneidad de la temperatura de la incubadora) pueden retrasar la cinética de crecimiento de los micoplasmas.

### 12 - CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad puede realizarse a partir de las cepas *U. urealyticum* o *M. hominis* del estuche MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) o a partir de una cepa de recogida liofilizada (*U. urealyticum* ATCC 27815 o *M. hominis* ATCC 23114) calibrada previamente a 10<sup>4-5</sup>UCC/mL. Sembrar la galería MYCOFAST RevolutionN 2 y continuar la prueba como se indica en este prospecto (apartados 9 y 10).

Resultados esperados a continuación (ATCC):

### MYCOFAST RevolutionN 2

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

NI\* (No interpretable)

### 13 - LÍMITES DEL MÉTODO

Algunas bacterias, presentes en cantidad >10<sup>6-7</sup> UFC/mL y que poseen una ureasa, pueden hacer virar todos los pocillos de la galería. Su presencia puede verificarse volviendo a aislar con agar de chocolate el medio original de UMMt almacenado a 2-8 °C (sección 9.1).

Un pH de muestra básica (pH > 8) puede hacer reaccionar el medio. En este caso, diluya la muestra (1:10) en otro medio UMMt e interprete teniendo en cuenta la dilución. Un pH de muestra ácida (pH ≤ 5) puede ralentizar la aparición del cambio de color.

Una muestra que contenga sangre puede causar que los pocillos de la galería MYCOFAST RevolutionN 2 cambien de color, interpretados como resultados positivos. En ese caso, diluir la muestra (1:10) en otro medio UMMt y realizar la interpretación teniendo en cuenta la dilución. Una muestra con una carga débil de micoplasmas (<10<sup>3</sup> UCC/mL) puede provocar una reacción aleatoria en distintos pocillos de la galería. Al igual que con cualquier otro método de búsqueda de gérmenes, la calidad de la muestra condiciona el resultado de la prueba. Por lo tanto, una prueba negativa no indica forzosamente una ausencia de infección.

## 14 – RESULTADOS

### 14.1 Identificación – Recuento

Porcentaje de la concordancia global	U.u.	M.h.	U.u./M.h.
Cepas aisladas (tasa ≤ 10 <sup>3</sup> UCC/mL) (consultar el apartado 14.1.1)	97,4	NA*	NA*
Cepas aisladas (tasa ≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL) (consultar el apartado 14.1.1)	93,4	93,4	93,4
Muestras clínicas vaginales (consultar el apartado 14.1.2)	100	100	100
Muestras clínicas líquidas - orina (consultar el apartado 14.1.2)	93,2	96,6	94,9

NA\* (No aplicable)

#### 14.1.1 En cepas aisladas

Se realizó un estudio comparativo utilizando 21 cepas aisladas (ATCC y cepas de colección) probadas por separado (U.u. o M.h.) a varias concentraciones (76 pruebas en total). Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos mediante un método de recuento por microdilución.

Para una interpretación con un umbral patológico establecido en 10<sup>3</sup> UCC/mL; la concordancia global para U.u. es del 97,4 % (se registraron 2 falsos positivos para tasas de 10<sup>2</sup> UCC/mL usando el método de recuento por microdilución).

Para una interpretación con un umbral patológico establecido en 10<sup>4</sup> UCC/mL; la concordancia global para U.u. es 93,4 % (se registraron 5 falsos positivos para tasas de 10<sup>3</sup> UCC/mL usando el método de recuento por microdilución). La concordancia global para M.h. es del 93,4 % (encontramos 5 falsos positivos, 4 para 10<sup>3</sup> UCC/mL y uno para 10<sup>2</sup> UCC/mL en el método de recuento por microdilución).

La concordancia global U.u. + M.h. es del 93,4 %.

#### 14.1.2 En muestras clínicas

Se realizó un estudio comparativo inicial en muestras clínicas vaginales (n=23) tomadas en hisopos secos. Los resultados obtenidos con MYCOFAST RevolutioN 2 se comparan con un método de recuento por microdilución.

La concordancia global para U.u. y M.h. es del 100 %.

Un segundo estudio comparativo se llevó a cabo utilizando muestras clínicas de orina (n=88).

Los resultados obtenidos con MYCOFAST RevolutioN 2 se comparan con los obtenidos con el método habitual de laboratorio.

La concordancia global para U.u. es del 93,2 % (enumeramos 1 falso negativo para una tasa de 10<sup>4</sup> UCC/mL en el método de recuento por microdilución y 5 falsos positivos para tasas de 10<sup>2</sup> UCC/mL en el recuento por microdilución).

La concordancia global para M.h. es del 96,6 % (enumeramos 3 falsos positivos para tasas de 10<sup>2</sup> – 10<sup>3</sup> UCC/mL en el recuento por microdilución).

La concordancia global para U.u. y M.h. es del 94,9 %.

#### 14.2 Ensayos sobre la sensibilidad a los antibióticos

El estudio comparativo se ha realizado en un laboratorio nacional de referencia entre el método de determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en medio líquido y el método MYCOFAST RevolutioN 2

Las cepas probadas (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* y 16 *M. hominis*) son cepas de referencia, cepas clínicas silvestres o cepas que han desarrollado resistencia. Cada cepa se prueba a diluciones de 10<sup>3</sup> – 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> UCC/mL en el UMMt 3 mL. Para las tasas 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> UCC/mL, los resultados se leyeron e interpretaron después de 24 horas de incubación.

Para 10<sup>3</sup> UCC/mL, los resultados se leyeron e interpretaron después de 48 horas de incubación si la prueba era negativa en 24 horas.

Los resultados de ambos métodos se interpretan como sensibles (S) o resistentes (R) según las recomendaciones del CLSI.

La concordancia global para *U. urealyticum*/*U. parvum* es del 95,5 % La concordancia global para *M. hominis* es del 100 %.

Concordancia	<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 <sub>a</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DMM	1 <sub>b</sub>	2 <sub>c</sub>	0	1 <sub>d</sub>	0	0	0	0	0	0

DM: Discordancia mayor, DTM: Discordancia muy mayor

a: 1 discordancia obtenida a 10<sup>3</sup> UCC/mL (CMI de referencia 0,5 µg/mL), 4 discordancias obtenidas a 10<sup>5</sup> UCC/mL (CMI de referencia 0,5 - 1 y 8 µg/mL).

b: 1 discordancia obtenida a 10<sup>5</sup> UCC/mL (CMI de referencia 8 µg/mL).

c: 1 discordancia obtenida a 10<sup>3</sup> UCC/mL (CMI de referencia 8 µg/mL);

1 discordancia obtenida a 10<sup>5</sup> UCC/mL (CMI de referencia 2 µg/mL).

d: 1 discordancia obtenida a 10<sup>5</sup> UCC/mL (CMI de referencia 4 µg/mL).

#### 15 - ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

Los residuos deben eliminarse de conformidad con las normas de higiene y la reglamentación en vigor en materia de este tipo de reactivos en el país de uso.

#### 16 – BIBLIOGRAFÍA

1 - BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires. N.º 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.º 19.

3 - PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N.º 329, 34-36.

4 - TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans Mandell G. 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., Brenda Katz and Robert L. Schelonka. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N.º 4 -757-789.

6 - Waites KEN B, Donna M. Crabb, and Lynn B. Duuy. 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, 3776–3778.5

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

MYCOFAST® es una marca registrada de ELITech MICROBIO

Los cambios desde la revisión anterior, están resaltados en gris.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19 allée d'Athènes

83870 SIGNES

FRANCE

Tel : 33 (0)4 94 88 55 00

Fax : 33 (0)4 94 32 82 61

www.elitechgroup.com

