

A7 AGAR

Cultura, enumeración e identificación de micoplasmas urogenitales.

8 pruebas (ref. 00090)

CP 0257-ES-2019-09

Para uso en diagnóstico in vitro, sólo para uso profesional
Pruebas de un solo uso.



I - FINALIDAD

La gelosa A7 permite el cultivo, el recuento indicativo y la identificación morfológica del *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) / *Ureaplasma parvum* y del *Mycoplasma hominis* (M.h.) a partir de muestras endocervicales, uretrales, urinarias, en esperma, en líquidos gástricos y en otras muestras que pueden revelar la presencia de micoplasmas urogenitales.

2 - INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas urogenitales *U. urealyticum* y *M. hominis* tienen un poder patógeno reconocido (3). Pueden estar presentes en estado de comensales al nivel de las vías genitales inferiores. Por lo tanto es útil realizar una apreciación cuantitativa. El *U. urealyticum* es responsable de la infección genital masculina. El *M. hominis* prolifera en el curso de una vaginosis y puede extenderse hasta las vías genitales superiores. Los micoplasmas urogenitales también son responsables de infecciones extra genitales.

3 - PRINCIPIO

Los micoplasmas son organismos relativamente frágiles, que sólo se multiplican en presencia de numerosos factores de crecimiento. Son anaerobios facultativos, exigentes en esteroides. Como fuente de energía utilizan el metabolismo de los azúcares o de la arginina (*Mycoplasma hominis*) o de la urea (*Ureaplasma urealyticum*)

La gelosa A7 es un medio de Shepard modificado (4). Contiene suero, peptonas, extracto de levadura y una mezcla vitamínica. Está desprovisto de azúcar y guarda la urea y la arginina como fuentes de energía. Se ha transformado en selectiva por la adición de antibióticos y de antifúngicos con el fin de inhibir el desarrollo de las bacterias Gram positivo y Gram negativo, y las levaduras. La presencia de sulfato de manganeso da a las colonias del *Ureaplasma urealyticum* una coloración negra en presencia de urea (4). En medio gelosado, las colonias de micoplasmas son pequeñas y para buscarlas hay que utilizar un microscopio óptico.

Para la búsqueda de micoplasmas conviene utilizar medios líquidos y medios sólidos (3). La gelosa A7 puede asociarse a los métodos líquidos MYCOSCREEN o MYCOFAST.

4 - REACTIVOS

Envases : 8 Gelosas

Descripción

A7 AGAR: Gelosa de 55mm lista para usar y envasada individualmente en una bolsa de celofán.

Composición de la gelosa

Caldo de micoplasmas (25 g/L), extracto de levadura (9,4 g/L), suero de caballo (15%), urea (1,15 g/L), arginina (0,4 g/L), cloruro de calcio (0,3 g/L), sulfato de manganeso (0,1 g/L), suplemento vitamínico, mezcla de antibióticos y de antifúngico, y agar (14 g/L).

5 - PRECAUCIONES DE EMPLEO

- Las gelosas de este estuche están destinadas únicamente a un uso in vitro, y deben ser manipuladas por personas habilitadas
- Las muestras y las gelosas sembradas son potencialmente infecciosas; deben ser manipuladas con las precauciones de uso respetando las reglas de higiene y la reglamentación en vigor para este tipo de productos en el país de utilización.
- Las gelosas contienen materias primas de origen animal y deben ser manipuladas con las precauciones de uso correspondientes.
- No utilice las gelosas de este estuche pasada la fecha de caducidad, o si están contaminadas o mal conservadas.

6 - RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

6.1 Recogida de las muestras

- **hisopos endocervicales / vaginales**: use solo un hisopo de Dacron® o rayón o un citobrush (si usa UMMt de 2 mL o 3 mL), o use el hisopo suministrado con su media de transporte amigable o universal para virus, clamidia, micoplasma y ureaplasma (si usa un UMMt AMIGOS 2.6mL).

Recoger la muestra después de eliminar cuidadosamente las secreciones del exocervix con un primer hisopo. Como los micoplasmas tienen una fuerte afinidad por las células de las mucosas a las cuales se adhieren, es esencial raspar bien la mucosa para obtener un buen rendimiento (1).
Muestras uretrales: Limpiar el meato y recoger la muestra con un hisopo o por raspado de las células.

Esperma, orinas y otro líquidos: Recoger el esperma o el primer chorro de orina o de otra muestra líquida en un frasco estéril.

6.2 Transporte de las muestras

UMMt 2 o 3 mL

Inocular un vial de medio UMMt con la muestra de hisopo o, si se usa una muestra de líquido, transferir 200 µL o 300 µL de la muestra líquida en 2 ml o 3 ml de UMMt. Una vez sembrado, el medio UMMt puede ser conservado a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 20 horas, o a 2-8 °C durante 56 horas.

Para una conservación durante 3 días a -20°C, añadir previamente 2 gotas de «MYCOPLASMA stabilizer»

AMIES media o medio universal para virus, clamidias, micoplasmas y ureaplasmas.

Consulte las instrucciones de funcionamiento del fabricante.

UMMt AMIES media

Descargue 300 µL del medio de transporte AMIES o medio universal para virus, clamidias, micoplasmas y ureaplasma sembrados en un vial de medio AMIES

Una vez inoculado, el medio UMMt AMIES (2.6ml) se puede almacenar a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 20 horas, o a 2-8 °C durante 56 horas.

Para el almacenamiento durante 3 días a -20 °C, agregue 2 gotas de "MYCOPLASMA Stabilizer" de antemano.

7 - PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Las gelosas vienen listas para usar; conservadas en su embalaje original permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

No exponer la gelosa a fuertes variaciones de temperatura.

8 - MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Equipos de muestreo (hisopo de Dacron, citocompás, medio de transporte Amies o media universal para virus, clamidias, micoplasmas y ureaplasmas, frasco estéril para la recolección de muestras líquidas), Pipetas
- MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064)
- Media UMMt (REF 00835; 00061; 00083) para muestras con hisopo o transporte Friend o medio universal para virus, clamidia, micoplasma y ureaplasma
- Estufa calibrada a 35-37 °C, Dispositivo para anaerobiosis, Microscopio óptico (objetivo x10), Recipiente para residuos contaminados

9 - PROCEDIMIENTO

9.1 Inoculación

- Recogida de la muestra con hisopo: Descargar el hisopo en un medio UMMt. Colocar en el centro de la gelosa 3 gotas de unos 30 µL (o un total de 100 µL) de medio sembrado y homogeneizado.

- **Muestra de hisopo** asociada con su medio de transporte AMIES o medio universal para virus, clamidia, *micoplasma* y *ureaplasma*: homogeneice el vial de transporte y transfiera 300 µL a un medio UMMt AMIES. En el centro del agar, coloque 3 gotas de aproximadamente 30 µL (o un depósito de 100 µL) de medio AMM UMMT inoculado y homogeneizado.

- **Recogida de muestras líquidas**: Homogeneizar la muestra y colocar directamente en el centro de la gelosa 3 gotas de unos 30 µL (o un total de 100 µL). Si la muestra debe ser transportada, **inocular un medio UMMt 2 ml con 200 µL de líquido, o UMMt 3 ml con 300 µL de líquido (§6.2).**

9.2 Incubación de la gelosa

Deje secar la gelosa unos 30 minutos a temperatura ambiente.

Incubar la gelosa a 35-37 °C durante 48 horas en anaerobiosis.

10 - LECTURA E INTERPRETACIÓN

Buscar las colonias mediante el microscopio (objetivo x10), caja boca abajo.

10.1 Identificación morfológica

Ureaplasma urealyticum: Aspecto de precipitados pardo-negruzcos (en forma de "erizo", de tamaño variable). Las colonias son de tamaño pequeño.

Mycoplasma hominis: Aspecto de "huevo en el plato". Las colonias son más grandes que las colonias de *U. urealyticum*.

10.2 Recuento

Realizar el recuento sobre caja boca abajo en el microscopio, objetivo x 10, según el promedio del número de colonias en 10 campos microscópicos:

- Menos de 1 colonia / campo: <10³ UFC /mL
- 1 a 5 colonias / campo: alrededor de 10⁴ UFC /mL
- 5 a 10 colonias / campo: alrededor de 10⁵ UFC /mL
- 10 a 20 colonias / campo: alrededor de 10⁶ UFC /mL
- 20 colonias / campo: > 10⁶ CFU /mL

UFC : Unidades Formadoras de Colonias

11 - CONTROL DE CALIDAD

Quality control can be carried out from a lyophilized reference strain (*Ureaplasma urealyticum* El control de calidad puede realizarse a partir de una cepa de colección liofilizada (*Ureaplasma urealyticum* ATCC 27618) y calibrada a 10⁴ UFC/mL. Sembrar una gelosa A7 y proceder como se indica en estas instrucciones (§9 et §10).

Resultado esperado: Presencia de 1 a 5 colonias en forma de erizo (*U. urealyticum*).

12 - CAUSAS DE ERRORES

- Muestreo con hisopos o medios de transporte inadecuados.
- Sembrado directo a partir del hisopo.
- Incubación en aerobiosis.
- No respetar la temperatura de incubación.

13 - LÍMITES DEL MÉTODO

- Muestra poco cargada de micoplasmas (<10³ UFC/mL).
- Método sólido en gelosa A7 para asociar con un método líquido.
- Como en cualquier método de búsqueda de gérmenes, el resultado del test depende de la calidad de la muestra recogida. Un test negativo no significa necesariamente una ausencia de infección.

14 - PERFORMANCES

Las performances del cultivo en gelosa A7 de IM han sido evaluadas en relación con el método líquido MYCOFAST (2). El estudio se llevó a cabo en un centro hospitalario sobre 544 muestras clínicas (266 espermas, 155 muestras endocervicales, 82 placentas, 19 muestras uretrales y 22 muestras diversas). Para 475 muestras (88%), de las cuales 140 fueron positivas y 335 negativas, los resultados fueron concordantes. Los resultados fueron discordantes en 69 muestras, de las cuales 8 resultaron positivas solamente con la gelosa A7 (1,5%), 48 resultaron positivas solamente con el método MYCOFAST (8,8%) y 13 estaban contaminadas (2,4%). Algunas cepas de micoplasmas provenientes de muestras contaminadas pudieron ser detectadas con la gelosa A7.

15 - ELIMINACIÓN DE LOS DESECHOS

Los desechos deben ser eliminados respetando las reglas de higiene y la reglamentación vigente para este tipo de reactivos en el país de su utilización.

16 - BIBLIOGRAFÍA

BOUCAUD-MAITRE Y. et THOINET S. 1993. Analyse des prélèvements en bactériologie médicale - 2^{ème} partie : prélèvements génitaux. Feuil. Biol., 34: 21-24.

BRES P., J.P. CASALTA, M. DRANCOURT, G. PAPIEROK, D. RAOULT. 1991. Comparison of mycofast test kit and conventional culture methods for the isolation of Genital Mycoplasma and *Ureaplasma* species A.S.M. 91th General Meeting - Poster : G-14.

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

SHEPARD, M.C. and LUNCEFORD C.D. 1976. Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. J. Clin. Microbiol. 3: 613-625.

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

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

