

# MYCOFAST<sup>®</sup> Revolution

## Diagnóstico de Micoplasmas urogenitales

Detección  
Recuento  
Identificación  
Sensibilidad a antibióticos

25 tests (REF 00060)

CPA 0394\_ES-2012-01



### 1 - FINALIDAD

El estuche MYCOFAST *Revolution* permite la detección, el recuento y la identificación del *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) y de *Mycoplasma hominis* (M.h.) a partir de distintas muestras clínicas. El estuche MYCOFAST *Revolution* permite, además, la detección de la sensibilidad de U.u. y de M.h. a los antibióticos, de conformidad con las recomendaciones del CLSI (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, por sus siglas en inglés)(2).

### 2 - INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas, de los que hay más de 15 especies censadas en el hombre en la actualidad, pertenecen a la clase de los mollicutes. Se diferencian de otras bacterias en numerosos aspectos, entre ellos la falta de pared, que les confiere una resistencia natural a los betalactámicos, así como una membrana rica en esteroides procedente de membranas de las células eucariotas sobre las que se fijan. Los micoplasmas son organismos relativamente frágiles, que se multiplican en un medio acelular solamente en presencia de muchos factores de crecimiento y a una temperatura óptima de 37°C (4).

La mayor parte de los micoplasmas humanos son simples comensales. Las especies más comunes son las aisladas a partir del tracto urogenital, *U. urealyticum* y *M. hominis*. La especie *U. urealyticum* se divide en dos biovariedades: *U. urealyticum* y *U. parvum* (U.u.).

U.u. o M.h. pueden comportarse como verdaderos patógenos. Son responsables de infecciones genitales masculinas (uretritis no gonocócicas, epididimitis, prostatitis, infertilidad); infección ginecológica (vaginosis bacteriana, endometritis, salpingitis); trastornos de la reproducción (corioamnionitis, endometritis postparto, nacimientos prematuros, aborto espontáneo); problemas neonatales (poco peso al nacer, infecciones respiratorias, neurológicas, bacteriemias, absceso); infecciones extragenitales (artritis sépticas, artritis de reacción, otras localizaciones) (1).

El diagnóstico de las infecciones por micoplasmas depende de la determinación de un umbral patológico y, por lo tanto, de un recuento.

La aparición de resistencia de U.u. y M.h. a determinadas moléculas conduce a realizar una prueba de sensibilidad a los antibióticos (5, 6). Los antibióticos probados y los criterios de interpretación se adaptan al tratamiento de las infecciones por micoplasmas a nivel del tracto urogenital y en otros lugares extra genitales.

### 3 - PRINCIPIO

MYCOFAST *Revolution* es un método en medio líquido basado en la aptitud de U.u. y de M.h. para metabolizar la urea y la arginina, respectivamente. El crecimiento de micoplasmas en medio líquido se visualiza mediante el cambio de un indicador de color – el rojo de fenol – del amarillo anaranjado al rojo, lo que indica la alcalinización del medio debido a la liberación de amoníaco.

El crecimiento de micoplasmas así visualizado permite:

- el recuento basado en la velocidad de la hidrólisis de los sustratos, proporcional a la cantidad de gérmenes contenidos en la muestra;
- la identificación basada en la sensibilidad o no del germen frente a tres antibióticos;
- el estudio de la sensibilidad de U.u. y M.h. a los antibióticos.

### 4 – REACTIVOS

Descripción	Cantidad
UMMt: Frasco de 3 mL de medio de micoplasmas con antibióticos y agente conservador. pH: 6,0 ± 0,1.	25
MYCOFAST <i>Revolution</i> : Galería de 20 pocillos envasada en un sobre de aluminio con desecante integrado.	25
S. Mh.: Frasco de 4,5 mL de activador de crecimiento de <i>M. hominis</i> .	2
Closing system: Tapa de protección de la galería con el cultivo, en plástico transparente.	25

La galería MYCOFAST *Revolution* contiene en los 20 pocillos el medio de crecimiento de los micoplasmas en forma deshidratada (suero de caballo, extracto de levaduras, cisteína, arginina, urea, rojo de fenol, antibióticos, pH: 6,1 ± 0,1) e incluye 4 partes diferenciadas:

- pocillos 1-3 Recuento de U.u. para proporciones de  $10^3$  a  $\geq 10^5$  UCC/mL (solución tamponada y lincomicina inhibidora del crecimiento de M.h.).
- pocillos 4-6 Identificación de U.u. y M.h. por su perfil de resistencia o de sensibilidad a: lincomicina (L), trimetropim-sulfametoxazol (SXT) y eritromicina (E).
- pocillos 7 Recuento de Mh para proporciones  $\geq 10^4$  UCC/ mL (solución tamponada y eritromicina inhibidora del crecimiento de U.u.).
- pocillos 8-20 Evaluación de la sensibilidad de Uu y Mh a los antibióticos: levofloxacin (LVX) 1-2-4 µg/mL, moxifloxacina (MXF) 0,25-2 µg/mL, eritromicina (E) 8-16 µg/mL, clindamicina (CM) 0,25-0,5 µg/mL, tetraciclina (TE) 1-2-4-8 µg/mL.

### 5 - PRECAUCIONES DE EMPLEO

- Los reactivos de este estuche deben utilizarse únicamente para el diagnóstico *in vitro* y deben ser manipulados por personas autorizadas para ello.
- Las muestras y los reactivos sembrados son potencialmente infecciosos; deben manipularse con precaución, respetando las reglas de higiene y la reglamentación en vigor en el país de utilización de este tipo de producto.
- Los reactivos que contienen materias primas de origen animal deben manipularse de acuerdo con las precauciones de uso.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.
- No utilice los reactivos deteriorados o mal conservados antes de usar.
- Un resultado positivo con el método MYCOFAST indica una colonización de los micoplasmas urogenitales, pero no puede servir por sí mismo para realizar un diagnóstico clínico. El diagnóstico debe ser realizado por un médico en función de los resultados biológicos y de la sintomatología clínica.

### 6 - RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

#### 6.1 Recogida de las muestras

##### Muestras endocervicales/vaginales

Utilizar únicamente un hisopo de Dacron o de rayón, o un citocepillo. Realizar la toma de la muestra tras eliminar bien las secreciones del exocérvix mediante un primer hisopo.

Los micoplasmas tienen una gran afinidad por las células de las mucosas a las que se adhieren, por lo tanto, es esencial raspar bien la mucosa para obtener un buen resultado.

##### Muestras uretrales

Limpiar el meato y recoger las muestras con el hisopo o por raspado de las células.

##### Esperma, orinas

Recoger el esperma o el primer chorro de orina en un frasco estéril.

##### Líquidos gástricos

Recoger el líquido gástrico de los recién nacidos por aspiración, con un catéter, y depositarlo en un frasco estéril.

#### 6.2 Transporte en medio UMMt

Muestras en hisopo: Descargar el hisopo en un frasco con medio UMMt.

Muestras líquidas: Sembrar un frasco con medio UMMt con 300 µL de líquido homogeneizado.

### 6.3 Conservación en medio UMMt

Una vez sembrado, el medio UMMt puede conservarse 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".

### 7 - PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Todos los reactivos están listos para usar. Los reactivos conservados a 2-8 °C en su estado original se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche.
- El medio UMMt puede conservarse temporalmente a temperatura ambiente, pero presenta mejor estabilidad a 2-8 °C.
- El suplemento S.Mh se mantiene estable durante 3 meses después de abrirlo.
- Los reactivos del estuche no deben congelarse.

### 8 - MATERIAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO

- Material para muestras (hisopos, citocepillos, frascos estériles para recoger muestras líquidas)
- MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064)
- Pipetas y conos.
- Recipiente para residuos contaminados.
- Vaselina líquida estéril.
- Estufa calibrada a 37 °C ± 1°C.

### 9 - PROCEDIMIENTO

**Poner los reactivos a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos.**

#### 9.1 Siembra de la galería

● Retirar la película adhesiva tirando de las 2 lengüetas y distribuir sucesivamente en los pocillos:

pocillos 1-20	100 µL de medio UMMt regenerado
pocillos 6-7	50 µL de suplemento S.Mh
pocillos 1-20	2 gotas de la vaselina estéril

- Tapar la galería mediante el "sistema de cierre" de la tapa.
- Identificar la muestra.

**Conservar el excedente del frasco UMMt a 2-8 °C durante 48 horas** como mínimo para permitir una eventual verificación (véase el apartado 11).

#### 9.2 Incubación de la galería

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

Para el recuento de los U.u. y M.h, leer los resultados en 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 vira 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).

##### 10.2.1 Identificación (pocillos 4, 5 y 6)

La identificación se realiza en función de la reacción específica de los pocillos 4, 5 y 6:

	4 (L)	5 (SXT)	6 (E)
<i>U. urealyticum</i>	rojo	rojo	amarillo
<i>M. hominis</i>	amarillo	rojo	rojo

##### 10.2.2 Recuento (pocillos 1, 2, 3 y 7)

Marcar los pocillos que hayan cambiado a rojo e interpretar:

1	tasa U.u. $10^3$ UCC/mL
1 y 2	tasa U.u. $10^4$ UCC/mL
1, 2 y 3	tasa U.u. $\geq 10^5$ UCC/mL
7	tasa M.h. $\geq 10^4$ UCC/mL

Las proporciones patológicas indicadas habitualmente para *U. urealyticum* son:  $\geq 10^4$  UCC/mL para una muestra uretral o una muestra endotraqueal,  $\geq 10^3$  UCC/mL para un primer chorro de orina o el esperma. Para *M. hominis*, su presencia en una proporción  $\geq 10^4$  UCC/mL en una muestra cérvico-vaginal es anómala (1, 3).

### 10.2.3 Test de sensibilidad a los antibióticos (pocillos 8 a 20)

La reacción del medio en los pocillos que contienen antibiótico indica 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 consideran sensibles o resistentes frente a los antibióticos según los criterios de interpretación siguientes, definidos por el CLSI (2):

#### Criterios de interpretación de los CMI en µg/ml

Clase	Antibiótico	U.u		M.h		Observaciones
		S	R	S	R	
Quinolonas	Levofloxacin	≤ 2	≥ 4	≤ 1	≥ 2	
	Moxifloxacin	≤ 2	≥ 4	≤ 0.25	≥ 0.5	
Macrólidos	Eritromicina	≤ 8	≥ 16			Las cepas sensibles a la eritromicina son sensibles a la azitromicina
Lincosamidas	Clindamicina			≤ 0.25	≥ 0.5	
Tetraciclinas	Tetraciclina	≤ 1	≥ 2	≤ 4	≥ 8	Las cepas sensibles a la tetraciclina son sensibles a la doxiciclina

- La cepa se considera **Sensible** cuando su crecimiento es inhibido con dos 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.
- Para la moxifloxacin solo se hace la prueba de U.u. y M.h. con la concentración crítica baja.
- En determinadas poblaciones, el nivel de resistencia a la tetraciclina puede llegar al 45% para los U.u. y al 39,6% para los M.h (2). Se han descrito resistencias 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 niveles muy elevados en U.u o M.h, hay una reacción al rojo en todos los pocillos de la galería. En ese caso, se recomienda realizar una dilución de la muestra para obtener un resultado más preciso. En este caso, proceder de la siguiente manera:

- Sembrar un nuevo frasco UMMt con 300 µL del medio UMMt original conservado a 2-8 °C (ver § 9.1). Comprobar la ausencia de viraje al sacarlo del refrigerador.
- Sembrar una nueva galería con el medio 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).

### 12 - CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad puede realizarse a partir de la cepa *U. urealyticum* del estuche MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) o a partir de una cepa de recogida liofilizada (*U. urealyticum* ATCC 33175) calibrada previamente a 10<sup>4-5</sup> UCC/mL. Sembrar la galería MYCOFAST *RevolutioN* y continuar la prueba como se indica en este prospecto (apartados 9 y 10). Los resultados esperados se indican a continuación (ATCC 33175):

Uu	Uu	Uu	L	SXT	E	Mh	LVX	LVX	LVX
+	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-	-
MXF	MXF	E	E	CM	CM	TE	TE	TE	TE
+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-

### 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 comprobarse volviendo a aislar en agar chocolate a partir del medio UMMt de origen conservado a 2-8 °C (apartado 9.1).
- Un pH de muestra básica (pH ≥ 8) puede hacer reaccionar el medio. En ese caso, diluir la muestra (1:10) en otro medio UMMt y realizar la interpretación teniendo en cuenta la disolución.

- 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.
- Si fuera necesario, alargar la incubación de la galería hasta las 48 horas para comprobar las cepas de baja actividad enzimática.
- 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 Cepas aisladas

##### 14.1.1 Identificación - Recuento

Un estudio comparativo realizado con 9 cepas aisladas (cepas ATCC y cepas de recogida), analizadas por separado (U.u o M.h) con dos concentraciones o de forma mixta (U.u/M.h). Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos con otro método en medio líquido.

- Para la identificación (n=21) la concordancia es del 100%.
- Para el recuento de U.u (n = 11) 10 pruebas son concordantes y 1 prueba indica un recuento de 10<sup>3</sup> UCC/mL con MYCOFAST *RevolutioN* y ≥10<sup>4</sup> UCC/mL con el método comparativo (≤ 10<sup>3</sup> UCC/mL con A7 AGAR).
- En lo que respecta al recuento de M.h (n = 10), 6 pruebas son concordantes y 4 pruebas indican un recuento ≥10<sup>4</sup> UCC/mL con MYCOFAST *RevolutioN* y <10<sup>4</sup> UCC/mL con el método comparativo (10<sup>4</sup> UCC/mL con A7 AGAR).

##### 14.1.2 Test de 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*. Las cepas analizadas (5 *U. urealyticum*, 10 *U. parvum* y 10 *M. hominis*) son cepas de referencia, cepas clínicas salvajes o cepas que han adquirido resistencia. Cada cepa se prueba con diluciones de 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> UCC/mL. Los resultados de los dos métodos se interpretan como Sensible (S) o Resistente (R) de acuerdo con las recomendaciones del CLSI M43-A.

La concordancia global para *U. urealyticum* es del 96,7 % (173/180).

La concordancia global para *M. hominis* es del 99,2% (119/120).

	<i>U.urealyticum/parvum</i> (n = 45)				<i>M. hominis</i> (n = 30)			
	LVX	MXF	E	TE	LVX	MXF	CM	TE
Concordancia	43	42	45	44	30	30	29	30
DM	2	3	0	0	0	0	0	0
DMM	0	0	0	1*	0	0	1**	0

Concordancia: S/S o R/R

DM: Discordancia Mayor (R/S)

DMM: Discordancia Muy Mayor (S/R)

\*: Discordancia obtenida con 10<sup>4</sup> UCC/mL, con una dilución aproximada (CMI de referencia a 2 µg/mL)

\*\* : Discordancia obtenida con 10<sup>5</sup> UCC/mL con una dilución aproximada (CMI de referencia con 0,5 µg/mL)

#### 14.2 Cepas clínicas

Se realizó un estudio comparativo con muestras clínicas dobles, de las cuales 179 eran muestras positivas (U.u y/o M.h) detectadas como mínimo por uno de los dos métodos. Los resultados obtenidos con MYCOFAST *RevolutioN* se comparan con los obtenidos con el método utilizado habitualmente en el laboratorio de evaluación.

##### 14.2.1 Identificación

**Muestras positivas para U.u:** Las cepas U.u detectadas con el método comparativo han sido identificadas con MYCOFAST *RevolutioN*, excepto en 2 muestras. 5 muestras negativas con el método comparativo han resultado positivas con MYCOFAST *RevolutioN*.

**Muestras positivas para M.h:** Las 4 cepas M.h detectadas con el método comparativo han sido identificadas con MYCOFAST *RevolutioN*.

**Muestras positivas para U.u y M.h:** Las muestras positivas para U.u y M.h con el método comparativo han resultado positivas para U.u y M.h con MYCOFAST *RevolutioN*, excepto 5 muestras. 11 muestras positivas para U.u y 2 muestras negativas con el método comparativo han resultado positivas para U.u y M.h con MYCOFAST *RevolutioN*.

	n = 179	MYCOFAST	MÉTODO
		<i>RevolutioN</i>	COMPARATIVO
U.u (n = 118)	111	U.u	U.u
	5	U.u	Ausencia
	2	Ausencia	U.u
M.h (n = 4)	4	M.h	M.h
U.u/M.h (n = 57)	39	U.u/M.h	U.u/M.h
	11	U.u/M.h	U.u
	2	U.u/M.h	Ausencia
	4	U.u	U.u/M.h
	1	M.h	U.u/M.h

##### 14.2.2 Recuento

Los resultados del recuento de las cepas U.u (n = 175) y de las cepas M.h (n = 61) obtenidos con el método comparativo y/o con MYCOFAST *RevolutioN* se indican en las dos tablas siguientes:

U.u (n=175)	MYCOFAST <i>RevolutioN</i>	MÉTODO COMPARATIVO	M.h (n=61)	MYCOFAST <i>RevolutioN</i>	MÉTODO COMPARATIVO
147	≥ 10 <sup>5</sup> UCC/mL	≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL			
2	≥ 10 <sup>5</sup> UCC/mL	< 10 <sup>4</sup> UCC/mL	10	≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL	≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL
5	≥ 10 <sup>5</sup> UCC/mL	Ausencia	34	≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL	< 10 <sup>4</sup> UCC/mL
9	10 <sup>4</sup> UCC/mL	≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL	13	≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL	Ausencia
1	10 <sup>4</sup> UCC/mL	Ausencia	4	Ausencia	< 10 <sup>4</sup> UCC/mL
5	10 <sup>3</sup> UCC/mL	≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL			
1	10 <sup>3</sup> UCC/mL	< 10 <sup>4</sup> UCC/mL			
1	10 <sup>3</sup> UCC/mL	Ausencia			
2	Ausencia	≥ 10 <sup>4</sup> UCC/mL			
1	Ausencia	< 10 <sup>4</sup> UCC/mL			
1	< 10 <sup>3</sup> UCC/mL	< 10 <sup>4</sup> UCC/mL			

Entre las 165 muestras positivas para U.u con los dos métodos, 158 muestras presentan un recuento idéntico. Entre las 44 muestras positivas para M.h con los dos métodos, 10 muestras presentan un recuento idéntico y 34 muestras presentan un recuento con un nivel patológico con el método MYCOFAST *RevolutioN* y un nivel infrapatológico con el método comparativo.

### 15 - ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

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

### 16 - BIBLIOGRAFIA

- 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 Mandell G. L., Bennett J. E. and Dolin R. (ed.). Principles and practices of infectious diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.
  - 5 - WAITES KEN B, BRENDAN KATZ and ROBERT L. SCHELONKA. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 - N°4 - 757-789.
  - 6 - WAITES KEN B, DONNA M. 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.
- MYCOFAST® es una marca registrada de ELITech MICROBIO



**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 88 55 22  
 http://www.elitechgroup.com