

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
---------------------------------------	---	-----------

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO

ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS

Elaborado por	Revisado por	Aprobado por
Dr. José Gutiérrez Fernández Director Técnico de Unidad	Dr. José María Navarro Marí Director del Laboratorio	Dr. José María Navarro Marí Director del Laboratorio

EDICIÓN: 01	FECHA DE APROBACIÓN: 01/06//16	Página 1 de 16
-------------	--------------------------------	----------------

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
--	------------------------------------	-----------

ÍNDICE

1. Exudados Vaginales y Exocervicales.....	3
1.1. Generalidades.	
1.2. Cultivo.	
1.3. Estudio de Hibridación de ADN.	
1.4. Estudio de ADN de <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Trichomonas</i> , <i>C. trachomatis</i> , Mycoplasmas y Ureaplasmas.	
2. Exudados Vulvares.....	8
3. Exudados Endocervicales.....	8
4. Exudados Uretrales y Periuretrales (mujeres)	8
5. Semen.....	9
6. Exudados de Úlceras Genitales.....	10
7. Exudado Balano-Prepucial.....	10
8. Exudados rectales (en proctitis).....	11
9. Investigación de Micoplasmas Genitales.....	11
10. Antibióticos a ensayar.....	14
11. Bibliografía.....	15
12. Control de Ediciones.....	16

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
------------------------------------	------------------------------------	-----------

1. Exudados Vaginales y Exocervicales

1.1. Generalidades.

Agentes Patógenos

- Frecuentes: Levaduras, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*
- Raros:
 - Bacilos gramnegativos (sobre todo *Escherichia coli*) y *Streptococcus pyogenes* y *Haemophilus*, sobre todo en niñas menores de 16 años.
 - Bacilos gramnegativos (sobre todo *E. coli*), *Streptococcus* del grupo B y Micoplasmas, en mujeres con rotura prematura de membranas (RPM).
 - Neiserias y *Chlamydia* (en el contexto de una cervicitis, pero la Exudado vaginal no es la muestra adecuada).
 - VHS, Papilomavirus.

Procedimiento

De manera habitual sólo se estudia *Candida* spp., *G. vaginalis* y *T. vaginalis* mediante hibridación (AFFIRM VP8, Becton Dickinson) a lo que se añade cultivo (ver protocolo en 1.3. Cultivo):

1- En ≤ 16 años o procedentes de Pediatría.

2- En petición de Gonococo/*C. trachomatis*/Micoplasmas.

N. gonorrhoeae/*C. trachomatis*/Micoplasmas se estudia sólo por petición expresa o en sujetos de ≤ 16 años (el exudado vaginal no es una muestra adecuada).

Cultivo de Candida, para identificación y fungigrama, sólo por petición expresa en “Candidiasis Recidivante o Recurrente”.

Otros estudios solo se realizan por petición expresa y tras consultar con el Facultativo de Microbiología.

Toma de muestra, conservación y transporte

Ver Guía del Laboratorio de Microbiología.

Criterios de Aceptación/Rechazo de muestras

Ver el PNT Procedimiento general / Recepción de muestras del Laboratorio de Microbiología.

1.2. Estudio de Hibridación de ADN (ver imágenes)

PREPARACION DE MUESTRAS

Fase 1

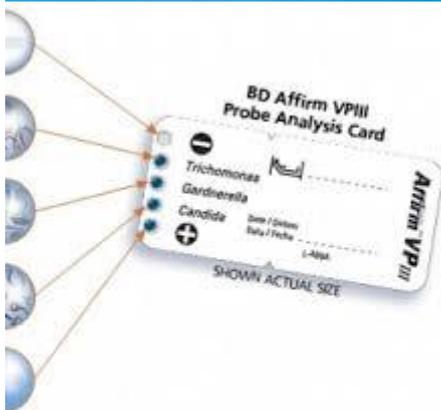
ENCENDER EL BLOQUE DE LISIS 1/2 HORA ANTES DE EMPEZAR A PREPARAR LAS MUESTRAS
 DEJAR QUE ALCANCE LA TEMPERATURA 85°
 LA LUZ NARANJA SERA ENTONCES INTERMITENTE

EDICIÓN: 01	FECHA DE APROBACIÓN: 01/06/2016	Página 3 de 16
-------------	---------------------------------	----------------

*Fase 2***PREPARACION DE LA MUESTRA**

- Añadir 12 gotas (0,4 ml) de solución de lisis al tubo de muestra
 - Poner la torunda en el tubo, mezclar bien y exprimirla. Dejar la torunda en el tubo
 - Cerrar herméticamente el tubo con el tapón
 - Incubarlo 10 minutos en el bloque de lisis
 - Retirarlo del bloque de lisis
 - Añadir 12 gotas de solución tampón, cerrar el tubo y agitar 10 veces. Exprimir la torunda y desecharla
 - Poner la punta con filtro al tubo
 - Dejar los tubos en la gradilla a temperatura ambiente
- Las muestras procesadas pueden mantenerse 24 horas a temperatura ambiente

PROCESO AUTOMATICO DE DETECCIÓN según las indicaciones del kit

**INFORMES DE LOS RESULTADOS:**

Se informan los resultados de la hibridación para *Candida*, *Gardnerella* y *Trichomonas*. Si esta ha sido positiva se siembra en el medio para *Trichomonas*.

Se incluye siempre el comentario:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
------------------------------------	------------------------------------	-----------

“Este estudio incluye hibridación de *Candida* sp, *Trichomonas vaginalis* y *Gardnerella vaginalis*. Para otros estudios contactar con Microbiología” (código: AAF).

“No se investiga Gonococo salvo petición expresa. La muestra adecuada es endocervical” (código: VAG).

1.3. Cultivo.

Realizar siempre el cultivo el día que se recibe la muestra de acuerdo con el PROTOCOLO DE ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS

Examen de los cultivos

Las placas se incuban 48 horas. Se investigará especialmente el crecimiento de *S. pyogenes* y *Haemophilus* sp., en los medios inespecíficos. En los específicos se buscará cada agente en cuestión. Para la identificación y antibiograma se siguen los protocolos según metodología actualizada. Para *N. gonorrhoeae* se describe en los estudios endocervicales. Informar la identificación del agente y su antibiograma siguiendo los criterios habituales.

1.4. Estudio del ADN de *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *Trichomonas* / *Micoplasmas* / *Ureaplasmas*.

A continuación se describe el procedimiento del sistema BD Max aportado por el fabricante. Se describe el método para *Trichomonas*, *Clamidia* y *Neiseria*. Para *Micoplasmas* y *Ureaplasmas* es semejante salvo el empleo de los tubos de extracción, que son diferentes a los anteriores y no se calientan, así como los equipos específicos de PCR.

Funcionamiento en el bloque térmico de precalentamiento BD Pre-warm Heater

NOTA

Consultar las instrucciones detalladas sobre el funcionamiento del BD Pre-warm Heater en el manual de usuario del BD Pre-warm Heater.

1. Si no está encendido, encender el sistema BD MAX™ (instrumento y ordenador “All In One”).
2. Iniciar una sesión de usuario introduciendo el nombre de usuario y la contraseña.
3. Crear una lista de trabajo con las muestras a procesar en la pantalla “Serie→Lista de trabajo”. Si no ha sido registrado previamente, registrar el lote del kit de la prueba BD MAX™ CT/GC en la pantalla “Serie→Inventario de kits”.
 - a) En el campo “Test”, seleccionar “BD MAX CT GC”.
 - b) En el campo “Número de lote”, seleccionar el número de lote del kit BD MAX™ CT/GC a utilizar.
 - c) En el campo “Tubo de muestra”, introducir el código de barras del tubo de tampón de muestras BD MAX™ UVE mediante la utilización del lector de códigos de barras.
 - d) En el campo “Nº de acceso”, introducir el número de la muestra. Si se utiliza el lector de códigos de barras, la muestra se añadirá automáticamente a la lista de trabajo. Si se utiliza el teclado, presionar “enter” para agregar la muestra a la lista de trabajo.
 - e) Repetir los pasos c y d para cada muestra.
 - f) En la columna “Programar” de la lista de trabajo recién creada, seleccionar los tubos de tampón de muestras BD MAX™ UVE que van a ser procesadas con el bloque térmico de precalentamiento BD Pre-warm Heater. El estatus de la columna “Precalentamiento” cambiará de “Incompleto” a “Programado”.
4. Agitar ligeramente los tubos de tampón de muestras BD MAX™ UVE con la ayuda de un vórtex.
5. Tomar la gradilla del bloque térmico de precalentamiento BD Pre-warm Heater, abrir la tapa y colocar los tubos de tampón de muestras.
6. Colocar la gradilla con los tubos de tampón de muestras en el bloque térmico de precalentamiento BD Pre-warm Heater y cerrar la tapa.
7. En la pantalla “Serie→Lista de trabajo”, hacer clic en el icono “Iniciar precalentamiento”.
8. En la pantalla “Estatus” se mostrará el tiempo de precalentamiento restante.
9. Una vez finalizado el precalentamiento, el estatus de la columna “Precalentamiento” de la lista de trabajo habrá cambiado de “Programado” a “Completo”.

EDICIÓN: 01	FECHA DE APROBACIÓN:01/06/2016	Página 5 de 16
-------------	--------------------------------	----------------

10. Antes de continuar con el funcionamiento en el sistema BD MAX™, extraer los tubos de tampón de muestras BD MAX™ UVE de la gradilla.
11. Retirar el tapón a rosca del tubo de tampón de muestras BD MAX™ UVE y sustituir por un tapón con septo:
 - Torundas
 - a) Desenroscar el tapón del tubo de tampón de muestras BD MAX™ UVE y presionar suavemente la torunda contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de fluido.
Si la torunda no es capturada de forma apropiada por el tapón, retirar cuidadosamente la torunda utilizando métodos estériles para evitar contaminaciones.
 - b) Retirar la torunda junto con el tapón a rosca y desechar.
 - c) Volver a cerrar el tubo con un tapón con septo.
 - Orina
 - a) Desenroscar el tapón del tubo de tampón de muestras BD AMX™ UVE, retirar y desechar.
 - b) Volver a cerrar el tubo con un tapón con septo.

NOTAS:

Si ocurre algún percance durante el paso de precalentamiento, en la pantalla "Estatus" se mostrará el mensaje "Fallo/Enfriando". En este caso es necesario repetir el paso de precalentamiento para las muestras afectadas.

La prueba BD MAX™ CT/GC solo puede realizarse tras un paso de precalentamiento satisfactorio. No es necesario volver a precalentar las muestras que han completado satisfactoriamente el paso de precalentamiento, aún en el caso de que fuera necesario volver a analizarlas.

Una vez sometidos a la etapa de precalentamiento, los tubos de tampón de muestra BD MAX™ UVE pueden almacenarse 5 días de forma adicional si se conservan entre 2 – 30 °C. En este caso, es necesario atemperar los tubos de tampón de muestra BD MAX™ UVE y agitarlos ligeramente en vórtex antes de procesarlos en el sistema BD MAX™.

NOTAS

No es necesario agitar los tubos de tampón de muestra BD MAX™ UVE si estos van a ser procesados inmediatamente en el sistema BD MAX™.

Por cada tubo de tampón de muestras BD MAX™ UVE previamente preparado se requieren 1 tubo de master mix, 1 tubo con reactivos de extracción y 1 tira de reactivos.

Retirar el número necesario de reactivos requeridos y volver a guardar el kit.

Bolsas abiertas de master mix y de reactivo de extracción: retirar el exceso de aire del interior de la bolsa y cerrar con el cierre rápido. Una vez abierta la bolsa, los reactivos deben utilizarse en un plazo de 7 días (2 – 25 °C).

Consultar las instrucciones detalladas sobre el funcionamiento del sistema BD MAX™ en la sección "Operación" del manual de usuario del sistema BD MAX™.

1. Tomar una gradilla BD MAX™ y, por cada muestra, colocar una tira de reactivos.
2. Por cada tira de reactivos, colocar en la posición correspondiente el tubo de master mix (film verde) y el tubo de reactivos de extracción (film blanco).



3. Colocar el tubo de tampón de muestras BD MAX™ UVE en la posición correspondiente dentro de la gradilla BD MAX™.



Si se dispone de una tarjeta de PCR BD MAX™ utilizada previamente, se puede utilizar el "Asistente de serie" disponible en la pantalla "Serie→Lista de trabajo" para determinar las posiciones libres en la tarjeta y colocar las muestras en la gradilla BD MAX™ atendiendo a estas posiciones disponibles.

Funcionamiento en el sistema BD MAX™

4. Desbloquear la puerta del instrumento BD MAX™ haciendo clic en el icono "Desbloquear puerta" y abrir la puerta.
5. Colocar la tarjeta de PCR BD MAX™ en el lector correspondiente del sistema BD MAX™.



6. Colocar la gradilla BD MAX™ en la posición correspondiente.
7. Cerrar las puertas del instrumento y presionar el icono "Iniciar". El software ofrece la posibilidad de darle un nombre a la serie. Si no es necesario, presionar el icono "Aceptar" para que comience la serie.
8. Al finalizar la serie, los tubos de tampón de muestra BD MAX™ UVE utilizados pueden almacenarse un máximo de 5 días a 2 - 8 °C.

Interpretación de resultados

NOTAS

Consultar las instrucciones detalladas para la obtención de resultados en la sección "Operación" del manual de usuario del sistema BD MAX™.

Una vez finalizada la serie, los resultados se pueden consultar en la pantalla "Resultados". La interpretación de los resultados se realiza según el siguiente esquema:

Resultado	Interpretación
CT POS	ADN de <i>Chlamydia trachomatis</i> detectado
CT NEG	ADN de <i>Chlamydia trachomatis</i> no detectado
CT UNR	No resuelto - muestra inhibidora o fallo de los reactivos; no ha habido amplificación del control de procesamiento de muestra
GC POS	ADN de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> detectado
GC NEG	ADN de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> no detectado
GC UNR	No resuelto - muestra inhibidora o fallo de los reactivos; no ha habido amplificación del control de procesamiento de muestra
IND	Indeterminado debido a un fallo del sistema BD MAX™
INC	Serie incompleta

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
------------------------------------	------------------------------------	-----------

2. Exudados Vulvares

Agentes Patógenos: Los mismos que en las Exudados vaginales. Frecuentemente proceden de pediatría y embarazadas.

Proceder como con los estudios vaginales de personas ≤ 16 años.

3. Exudados Endocervicales

Agentes Patógenos: Para estudios de ITS

- Frecuentes: Gonococo, *Chlamydia*,
- Menos frecuentes: Virus del herpes simple, Papilomavirus.
- Raros: *T. vaginalis*, Candida, Ureaplasma.

Petición/Procedimiento:

Si “Cultivo habitual”: Investigar gonococo

Toma de muestra, conservación y transporte

Consultar Guía del Laboratorio de Microbiología.

Criterios de aceptación/rechazo de muestras. Consultar PNT sobre Procedimiento general / Recepción de muestras del Laboratorio de Microbiología.

Procesamiento

Seguir las indicaciones del PROTOCOLO DE ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Estudio microscópico: no recomendado.

Investigación de patógenos: Las placas se incuban 48 h. La identificación de gonococo se hace mediante la prueba de la citocromo oxidasa positiva, diplococos gram-negativos, MALDI-TOF y Vitek 2 NH.

Antibiograma

Ver el protocolo en 10. Antibióticos a ensayar.

Informe de Resultados

Cultivo negativo: No desarrollo de microorganismos a las 48h.

Si microbiota saprófita: Desarrollo de microbiota regional.

Si se aísla gonococo: Desarrollo de *N. gonorrhoeae* y antibiograma.

4. Exudados uretrales y periuretrales (mujeres)

Agentes Patógenos: Para estudios de ITS o no.

- Frecuentes: Gonococo, *Chlamydia* y Bacilos GramNegativos (enterobacterias, *Pseudomonas*) en pacientes con factores predisponentes.
- Menos frecuentes: *U. urealyticum* var. 2 y *Trichomonas*.
- Infecuentes: Virus del herpes simple, Papilomavirus, *Haemophilus*, *M. catarrhalis*, *G. vaginalis* y *N. meningitidis*.

Petición/Procedimientos

Si “Cultivo habitual”: Investigar Gonococo, *Trichomonas*, clamidia y micoplasmas (en diferentes secciones).

EDICIÓN: 01	FECHA DE APROBACIÓN:01/06/2016	Página 8 de 16
-------------	--------------------------------	----------------

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
------------------------------------	------------------------------------	-----------

Toma de muestra, conservación y transporte

Consultar Guía del Laboratorio de Microbiología.

Criterios de aceptación/rechazo de muestras. Consultar PNT sobre Procedimiento general / Recepción de muestras del Laboratorio de Microbiología.

Procesamiento

Seguir las indicaciones del PROTOCOLO DE ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Investigación de patógenos: Las placas se incuban 48 h. Ver crecimiento de gonococo y otros posibles agentes etiológicos de uretritis. La identificación de gonococo se hace mediante la prueba de la citocromo-oxidasa positiva, diplococos gram-negativos, MALDI-TOF y Vitek 2 NH.

Otros microorganismos: Seguir sistemas actualizados de detección (*Trichomonas* visualización a los 3 días) e identificación habitual.

Antibiograma

Ver protocolo en 10. Antibióticos a ensayar.

Informe de Resultados

Cultivo negativo: No desarrollo de microorganismos habituales a las 48h.

Si microbiota comensal: Desarrollo de microbiota epitelial o regional.

Si se aísla gonococo: Desarrollo de *N. gonorrhoeae* y antibiograma.

Si se aísla *Trichomonas*: Desarrollo de *Trichomonas*.

Otros posibles patógenos: Desarrollo escaso, moderado, abundante de ... y antibiograma.

5. Semen

Agentes Patógenos

N. gonorrhoeae, *Ch. trachomatis*, Micoplasmas

Agentes piógenos oportunistas: Enterococos, Estreptococos Hemolíticos, *S.aureus* y bacilos gramnegativos.

Estudios de bacteriospermia: Recuentos de aislados $\geq 10^3$ UFC/ml.

Estudios de prostatitis crónica: Incrementos en 10 veces de los recuentos de orina de micción limpia o aparición de un nuevo agente en el semen.

Petición/Procedimiento

Si "Cultivo habitual": Investigación de Gonococo y bacterias piógenas.

Toma de muestra, conservación y transporte

Consultar Guía del Laboratorio de Microbiología.

Criterios de aceptación/rechazo de muestras. Consultar PNT sobre Procedimiento general / Recepción de muestras del Laboratorio de Microbiología.

Procesamiento

Seguir las indicaciones del PROTOCOLO DE ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Investigación de patógenos: Los medios se incuban 48 h. Ver crecimiento de gonococo y otros posibles agentes etiológicos de epididimitis. La

EDICIÓN: 01	FECHA DE APROBACIÓN:01/06/2016	Página 9 de 16
-------------	--------------------------------	----------------

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
------------------------------------	------------------------------------	-----------

identificación de gonococo se hace mediante la prueba de la citocromo oxidasa positiva, diplococos gram-negativos, MALDI-TOF y Vitek 2 NH. Otros microorganismos: Seguir sistema actualizado de identificación habitual.

Antibiograma

Ver protocolo 10. Antibióticos a ensayar.

Informe de Resultados

Cultivo negativo: No desarrollo de microorganismos habituales a las 48h.

Microbiota saprofita: Desarrollo de flora epitelial, fecal,...

Si se aísla gonococo: Desarrollo de... .

Para otras bacterias posibles patógenas en recuento ≥ 1000 UFC/ML:

Informar identificación, recuento (desarrollo escaso, moderado, abundante de...) y antibiograma.

6. Exudados de úlceras genitales

Agentes Patógenos

Gonococo, VHS, *T. pallidum*, *H. ducreyi*, *Ch. trachomatis*, *K. granulomatis*, bacterias piógenas y hongos.

Petición/Procedimiento

Si "Cultivo habitual": Investigación de gonococos, bacterias piógenas y *Candida*.

Si "Agentes Etiológicos de difícil crecimiento": Consultar facultativo.

Toma de muestra conservación y transporte

Ver guía del servicio de Microbiología

Criterios de aceptación/Rechazo de muestras

Ver PNT Procedimiento general/ Recepción de muestras del Laboratorio de Microbiología.

Procesamiento

Seguir PROTOCOLO DE ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Examen de las placas: Habitualmente 48 horas. Examinar de acuerdo a la posible etiología. Identificación y antibiograma normalizado.

Examen de tinción de Gram: recuento cualitativo de leucocitos (+ a ++++) y presencia de microorganismos.

7. Exudado Balano-Prepucial

Agentes Patógenos

Candida, estreptococo del Grupo B, *Gardnerella*

Petición/Procedimiento

Si "Cultivo habitual": Investigación de gonococo y *Candida*.

Toma de muestra conservación y transporte

Ver Guía del servicio de Microbiología

Criterios de aceptación/Rechazo de muestras

Ver PNT Procedimiento General/ Recepción de muestras del Laboratorio de Microbiología.

EDICIÓN: 01	FECHA DE APROBACIÓN:01/06/2016	Página 10 de 16
-------------	--------------------------------	-----------------

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
------------------------------------	------------------------------------	-----------

Procesamiento

Seguir el PROTOCOLO DE ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Examen de las placas: Habitualmente 48 horas. Examinar de acuerdo a la posible etiología.

Identificación y antibiograma normalizado.

8. Exudados rectales (proctitis)

Agentes Patógenos: Para estudios de ITS o no.

- Frecuentes: Gonococo, *Chlamydia* y VHS.
- Menos frecuentes: *T. pallidum*, *Papillomavirus* y citomegalovirus.
- Raro: *H. ducreyi*, Micoplasmas
- Si es Procto-Colitis: *Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*. Ver PNT de coprocultivos.

Petición/Procedimiento

Si “Cultivo habitual”: Investigación de gonococo.

Toma de muestra conservación y transporte

Ver Guía del servicio de Microbiología

Criterios de aceptación/Rechazo de muestras

Ver PNT Procedimiento General/ Recepción de muestras del Laboratorio de Microbiología.

Procesamiento

Seguir el PROTOCOLO DE ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Examen de las placas: Habitualmente 48 horas. Examinar de acuerdo a la posible etiología. Identificación y antibiograma normalizado.

9. Investigación de Micoplasmas Genitales

Mycoplasma hominis

Ureaplasma sp.

Se investigan *habitualmente* en:

Muestras de infecciones urogenitales como

- Semen
- Exudados uretrales
- Exudados vaginales.
- Orinas de prostatitis

Muestras de infecciones neonatales como:

- Líquidos amnióticos
- Placentas
- Muestras respiratorias de Neonatos

Muestras de infecciones en inmunodeprimidos

Exudados de heridas etc....

EDICIÓN: 01	FECHA DE APROBACIÓN:01/06/2016	Página 11 de 16
-------------	--------------------------------	-----------------

MEDIOS DE CULTIVO

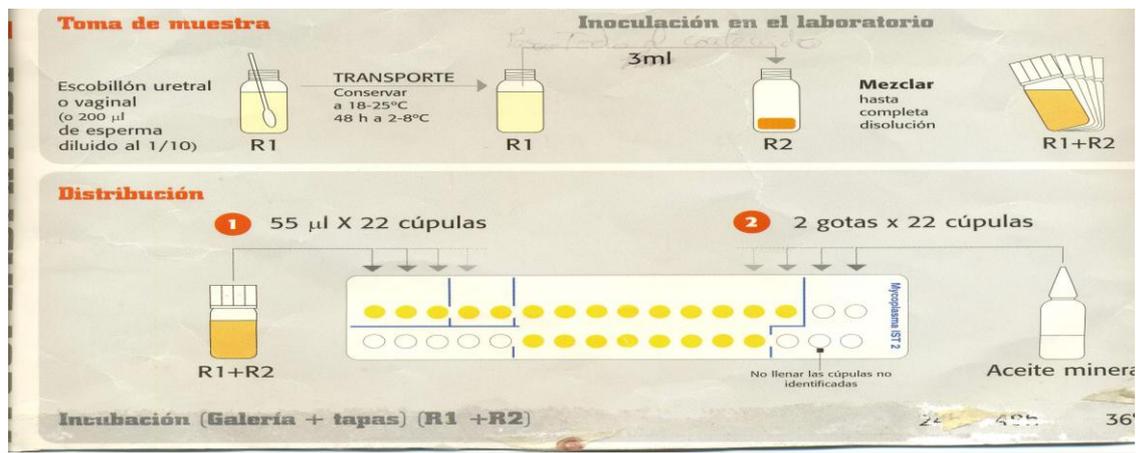
- A7 Mycoplasma gelosa (Biomerieux)
- Caldo Urea- Arginina LYO (Biomerieux): R1 (caldo) y R2 (lío­filizado)
- Galería de micoplasma genitales (lleva las galerías y los caldos R1 y R2)

Para composición ver prospecto adjunto en el envase de los medios comerciales.

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA:

Las Muestras de semen, exudados vaginales y uretrales se sembrarán sólo en la Galería. El resto de las muestras se sembrarán también en una placa de A7.

Para la Galería: Se podrán recibir muestras en escobillón o en tubo estéril. Ver esquema.



Incubar a 37°C la galería y lo que sobre del R1+R2. Leer a las 24 y 48 horas

Para las placas:

- a) Del R1 coger 3 gotas con Pipeta Pasteur (20 µl cada una) y ponerlas sobre la placa de A7 separadas y sin extender. Dejar la placa secar 5 minutos a T^a ambiente.
- b) Incubar a 35°C, en estufa de CO₂ o en olla con vela durante 72 horas.

** Las muestras líquidas en tubo estéril también se pueden sembrar directamente sobre la placa (3 gotas separadas con pipeta Pasteur (20 µl) sobre la placa).

LECTURA DE LOS MEDIOS

Lectura de la galería: según protocolo de la casa comercial que se indica a continuación

LECTURA E INTERPRETACION

Urea-Arginina LYO 2 (Mycoplasma R1 + Mycoplasma R2) :

- Observar el color del caldo Urea-Arginina LYO 2 después de 24 horas y 48 horas de incubación.

	Negativo	Positivo (<i>Ureaplasma</i> spp. y/o <i>M. hominis</i>)
Color del caldo	Amarillo	Naranja a Rojo Uu : caldo transparente (puede aparecer una ligera opalescencia debida al escobillón) Mh :caldo ligeramente opalescente

NB: un caldo turbio es una prueba ininterpretable

Galería Mycoplasma IST 2 :

- La lectura de cúpulas debe ser realizada :
- a **24 horas** únicamente para la cúpula n°4 (Uu $\geq 10^4$).
- a **24 y 48 horas** para las otras cúpulas.
- Anotar los resultados de lectura de la galería en la hoja de resultados que está al final de la ficha técnica.

Cúpula	Identificación			Recuento		Pruebas de sensibilidad (mg/l)															
	0 (Control)	Uu	Mh	Uu $\geq 10^4$	Mh $\geq 10^4$	DOT	JOS	OFL	ERY	TET	CIP	AZI	CLA	PRI							
						4	8	2	8	1	4	1	4	4	8	1	2	0,12	4	1	4
Lectura positiva	Naranja a Rojo			Rojo		Naranja a Rojo											Naranja a Rojo				
Lectura negativa	Amarillo *			Amarillo a Naranja		Amarillo											Amarillo				
Interpretación de la positividad	Presencia de : Uu y/o Mh			Uu $\geq 10^4$ UFC/ muestra.	Mh $\geq 10^4$ UFC/ muestra.	La cepa es : -- Sensible (S) + - Intermedia (I) ++ Resistente (R)											La cepa es : - Sensible (S) + Resistente (R)				

* Si la lectura del control es (-), no leer las otras cúpulas

En caso de títulos bajos, el viraje puede tener lugar solo en el frasco y no en la cúpula control de la galería (el título de la muestra es muy débil para permitir el viraje).

Lectura de las placas: se observarán con microscopio óptico con objetivo de 10x.

Las colonias son muy características:

- *M. hominis*: colonias con aspecto de huevo frito de 100 a 300 μm .
- *U. urealyticum*: colonias negras con aspecto de erizo de 10 a 50 μm .
-

En la placa primaria se podrá realizar también recuento con objetivo 10x:

Si <1 colonia por campo informar 10^3 UFC

Si 1-5 colonias por campo informar 10^4 UFC

Si 5-15 colonias por campo informar 10^5 UFC

Si >15 colonias por campo informar 10^6 UFC

En muestras estériles (LCR, orinas de punción etc...) puede haber poca cantidad de micoplasmas y puede darse el caso de que la galería y la placa de cultivo primaria sean negativos y el líquido R1+R2 sea positivo. En este caso se hará un subcultivo a una placa de A-7 y en la lectura no se hará recuento. En este caso de placas primarias negativas y placas de subcultivo positivas informar como $<10^3$ UFC.

10. Antibióticos a ensayar

		<i>Enterobacterias</i> Nº3	<i>Pseudomonas</i> Y BG/NF Nº4	<i>Stenotrophomonas</i> Y <i>Burkholderia</i> Nº4	<i>Enterococcus</i> P32	<i>Streptococcus</i> B- <i>hemolíticos</i> (en MH-Sangre o AS/CO ₂)	<i>Staphylococcus</i> P31	<i>Listeria</i>	<i>Haemophilus</i> (en HTM o Chocolate/CO ₂)	<i>Salmonella</i> y <i>Aeromonas</i>	<i>Neisseria</i> (en MH-Sangre o AS/CO ₂)
Asistencia primaria	Ampicilina Amoxiclavulánico Cefalotina Cefuroxima Gentamicina Tobramicina Ciprofloxacina	Gentamicina Tobramicina Ciprofloxacina	Levofloxacino SXT	Ampicilina	Penicilina Eritromicina Clindamicina	Cloxacilina Levofloxacina Gentamicina Eritromicina Clindamicina SXT	Ampicilina Amoxiclavulánico Levofloxacina Azitromicina SXT	Ciprofloxacina Tetra Peniciliga G Ciprofloxacino Azitro			
Hospital	Ampicilina Amoxiclavulánico Pipertazobactan Cefazolina Cefuroxima Cefotaxima Cefepime Gentamicina Tobramicina Amikacina Imipenem Ertapenem Ciprofloxacina	Pipertazobactan Cefazidima Cefepime Gentamicina Tobramicina Amikacina Imipenem Meropenem Ciprofloxacina	Levofloxacina SXT Cefazidima Meropenem	Ampicilina Vancomicina Teicoplanina Linezolid Daptomicina SinegriaGenta SinegriaErtrepDaptomicina	Penicilina Eritromicina Clindamicina Cefotaxima Vancomicina Linezolid Daptomicina	Cloxacilina Levofloxacina Gentamicina Eritromicina Clindamicina SXT Vancomicina Teicoplanina Daptomicina Linezolid	Ampicilina Amoxiclavulánico Levofloxacina Azitromicina SXT Cefotaxima	Ciprofloxacina Tetra Peniciliga G Ciprofloxacino Cefotaxima Gentamicina**			

* añadir en *A. baumannii*; ** añadir en *Aeromonas*

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
------------------------------------	------------------------------------	-----------

9. BIBLIOGRAFÍA

Clinical Microbiology Procedures Handbook, Volumes 1-3 (3rd Edition) - Knovel. (n.d.). Retrieved August 14, 2015, from <http://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpCMPHVE03>

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES GUÍA DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA. EDICIÓN VI. (n.d.). Retrieved August 14, 2015, from http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/microbiologia_-_servicio/ficheros/vi_guia_servicio_microbiologia_hvn.pdf

Versalovic, J., Jorgensen, J. H., Funke, G., Warnock, D. W., Landry, M. L., & Carroll, K. C. (Eds.). (2011). *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition*. American Society of Microbiology. doi:10.1128/9781555816728

EDICIÓN: 01	FECHA DE APROBACIÓN:01/06/2016	Página 15 de 16
-------------	--------------------------------	-----------------

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. CHUG	ESTUDIO DE AGENTES GENITOPATÓGENOS	PNT-GP-01
---------------------------------------	------------------------------------	-----------

11. Control de ediciones

Nº Edic/Fecha	Descripción de modificaciones
Nº 01 01/06/2016	Creación