



PROTOCOLO Mycoplasma



**Warning: Document only for Training use.
Does not replace the User Manual.**

PIONEERING DIAGNOSTICS

KB version 3.2

● 15 especies de *Mycoplasma*:

- *Acholeplasma laidlawii*
- *Mycoplasma arginini*
- *Mycoplasma bovigenitalium*
- *Mycoplasma bovis*
- *Mycoplasma fermentans*
- *Mycoplasma gallisepticum*
- *Mycoplasma genitalium*
- *Mycoplasma hominis* *
- *Mycoplasma hyopneumoniae*
- *Mycoplasma hyorhinis*
- *Mycoplasma meleagridis*
- *Mycoplasma orale*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Mycoplasma putrefaciens*
- *Mycoplasma salivarium*

* (previamente en VITEK® MS KB 3.0 & 3.1)

● *Ureaplasma urealyticum* : próximamente en la siguiente versión

Reactivos y consumibles necesarios:

- **Solución salina estéril = Solución acuosa estéril de NaCl al 0,45 %**
- Tubos cónicos de 1,5 mL
- Micropipeta para 500 μ L y 1 mL

Equipamiento

- Microcentrífuga capaz de alcanzar de 14 000 G a 20 000 G apta para tubos cónicos de 1,5 mL

REQUISITOS DE CULTIVO, CEPA QC

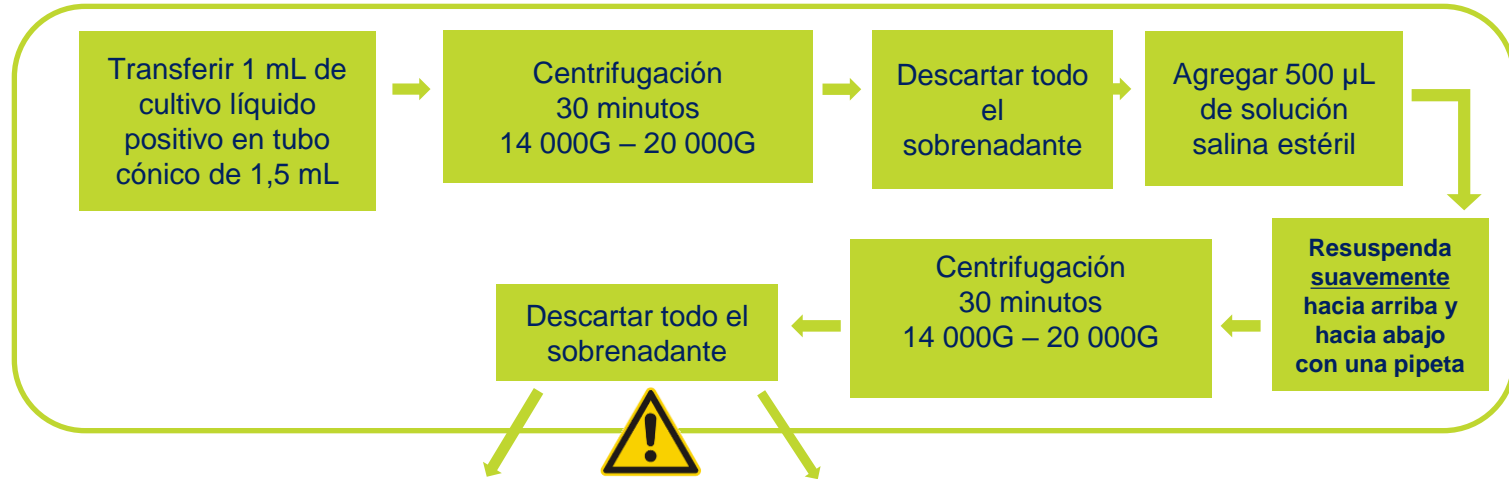
- Requisitos de cultivo: 2 – 7 días
- Cepa QC : *Mycoplasma hominis* ATCC® 23014™
- Lista de medios de cultivo validados:
 - HIPlus base
 - Spiroplasma base
- El caldo Urea-Arginine LYO 2 bioMérieux (ref. 42 508) aún no se ha validado porque el número de espectros y especies probados se considera demasiado bajo para validar este medio de cultivo a pesar de las identificaciones correctas obtenidas durante la verificación de I+D.
- Si el cliente desea utilizarlo, está obligado a hacer su propia validación

3 ETAPAS :

- Creación de Pellet
- Re-suspensión del pellet : **2 POSIBILIDADES**
- Depósito de la preparación de muestra

PROTOCOLO DE MICOPLASMA 2/2

CREACION DE PELLET



RESUSPENSIÓN PELLET

1er CASO : PELLET VISIBLE

Añadir de 5 a 10 µL Solución salina estéril



2do CASO : PELLET NO VISIBLE

Añadir 3 µL Matriz CHCA



DEPÓSITO DE LA PREPARACIÓN DE MUESTRA

Depositar 1 µl de preparación final

Secar completamente

Añadir 1 µl de matriz CHCA

Secar completamente



Depositar 1,5 µl de preparación final

Secar completamente

No es necesario agregar la matriz CHCA



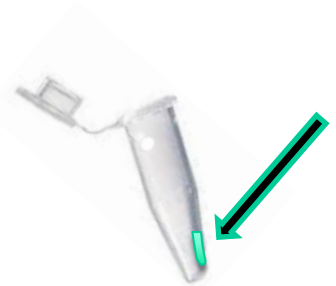
CREACIÓN DE PELLET: CONSEJOS DE CENTRIFUGACIÓN



- 2 Centrifugaciones de 30 min => al menos 1 hora para el paso de creación de Pellet



centrifugación
30 minutos
14 000G a 20 000G



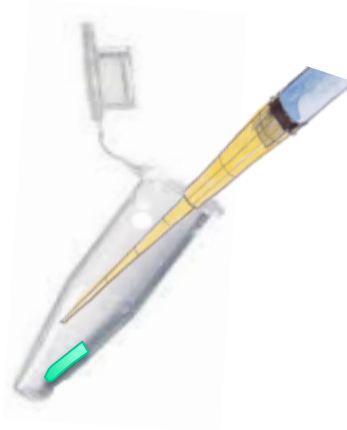
- La centrifugación requiere una microcentrífuga
- El pellet puede ser **VISIBLE** o **NO VISIBLE**
- Coloque siempre los tubos de la misma manera en la centrífuga para saber dónde se encuentra el sedimento (parte inferior del tubo, posición superior)

CREACIÓN DE PELLETS : CONSEJOS DE DESCARTE DE SOBRENADANTE



- Desechar el sobrenadante debe hacerse dos veces, después de cada centrifugación.

Descartar todo el
sobrenadante con
una pipeta



- Pipetear en el lado opuesto del sedimento
- Pipetear lentamente evitando perturbar el sedimento
- Retire todo el líquido

CREACIÓN DE PELLET: ADICIONAR SOLUCION SALINA

Agregar 500
 μL de solución
salina estéril

Mezcle suavemente
hacia arriba y hacia
abajo con una
pipeta



- **Agregar solución salina estéril**: Permite tener un mantenimiento eficiente de Mycoplasma (ya que este tipo de organismo es muy frágil y no tiene pared celular)
- Use una pipeta para mezclar suavemente hacia arriba y hacia abajo para volver a resuspender el sedimento

RESUSPENSION DEL PELLET

- Resuspensión de pellet: 2 casos





● PELLETT VISIBLE:

- El volumen de solución salina estéril depende del tamaño del pellet
- Tiene que ser apreciado por el usuario de forma subjetiva
- Agregue 5 µL (para gránulos pequeños) a 10 µL (para gránulos grandes)
- Mezcle suavemente hacia arriba y hacia abajo con una pipeta para no dañar los organismos.
- La suspensión **no se puede almacenar**, se debe manipular **de inmediato**.

Descartar todo el sobrenadante

2do CASO : PELLET NO VISIBLE

Añadir 3 μ L
Matriz CHCA



● PELLET NO VISIBLE:

- Agregue 3 μ L de Matriz CHCA
- Mezcle suavemente hacia arriba y hacia abajo con una pipeta para no dañar los organismos.
- La suspensión **no se puede almacenar**, se debe manipular **de inmediato**.

DEPÓSITO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA



DEPÓSITO DE LA PREPARACIÓN DE MUESTRA

Depositar 1 μ l de preparación final

Secar completamente

Añadir 1 μ l de matriz CHCA

Secar completamente



Depositar 1,5 μ l de preparación final

Secar completamente

No es necesario agregar la matriz CHCA



- La preparación del portaobjetos debe probarse dentro de las 72 horas para ambos casos
- Si el sedimento no es visible y el instrumento VITEK® MS da un resultado No ID, es posible que el crecimiento haya sido insuficiente.
- En este caso, vuelva a incubar el caldo de cultivo y vuelva a analizar la muestra de Mycoplasma siguiendo el mismo protocolo nuevamente.

- **Este tipo de protocolo de identificación requiere experticia para manipular este tipo de microorganismos**
- **Todos los pasos de mezcla con pipeta deben realizarse con sumo cuidado para preservar la integridad del Mycoplasma.**



PIONEERING DIAGNOSTICS