

	<p style="text-align: center;">INSTRUCTIVO PARAMETRIZADO</p>	<p>VERSION: 3</p> <p>CODIGO: IT-MI-190</p>
<p>Procesamiento de cultivo de micobacterias utilizando método automatizado en medio líquido Bact/Alert MP en combinación con medio solido Lowestein Jensen</p>		<p>FECHA: 22/Ene/2025</p>

1. Objeto

Describir el procesamiento a seguir para realizar el pretratamiento e inoculación de las muestras para cultivo de micobacterias en medio sólido y líquido

2. Alcance

Aplica para todos los bacteriólogos y/o microbiólogos del área de microbiología de la sede centro

3. Importancia clínica

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa crónica producida por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, con diversas manifestaciones clínicas y amplia distribución mundial, es un importante problema de salud pública y se ubica como la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas en todo el mundo, después del HIV.

Las micobacterias son bacilos aerobios, no formadores de esporas, no móviles, acidorresistentes, que tienen índices de crecimiento entre lentos y muy lentos; los tiempos de generación de las especies varían de 2 a > 20 horas dependiendo de la especie, presentando tiempos de crecimiento en los medios tradicionales de cultivo de micobacterias entre 2 a 8 semanas. Las recomendaciones del CDC y la OMS sugieren que, para el cultivo principal, se utilice un medio de cultivo líquido junto con un medio sólido.

Uso selectivo del cultivo:

En el momento de diagnóstico cultivar todas las muestras de pacientes sintomáticos, con signos clínicos y/o radiografía u otras imágenes compatibles con tuberculosis y alguna de las siguientes características:

- . Baciloscopia negativa de 3 muestras respiratorias
- . Localización extrapulmonar de la enfermedad
- . Niños, inmunosuprimidos, particularmente HIV positivos
- . Baciloscopia positiva en lavado gástrico, lavado bronquial o hisopados
- . Antecedentes de tratamiento antituberculoso, especialmente si se registró abandono o fracaso

Durante el control de tratamiento cultivar muestras de:

- . Casos de tuberculosis crónicos o con baciloscopia positiva en el control del segundo mes de quimioterapia o en un control posterior
- . Casos diagnosticados con baciloscopia negativa y que convierten a positiva su baciloscopia durante el tratamiento.

4. Principio de la prueba

El método automatizado en medio líquido BACT/ALERT® MP en combinación con el medio solido Lowestein Jensen proporcionan resultados con mayor sensibilidad para la detección de diferentes especies de Micobacterias, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*.

El sistema de detección de micobacteria BACT/ALERT® en medio líquido (BACT/ALERT® MP), proporciona un método de detección microbiana y un medio de cultivo con condiciones nutricionales y ambientales adecuadas para recuperar especies de micobacterias comúnmente aisladas a partir de muestras de pacientes diferentes a la sangre. El sistema cuenta con un kit de suplemento antimicrobiano BACT/ALERT® MP utilizado para reducir la incidencia de contaminación por bacterias que puedan sobrevivir al proceso de digestión/descontaminación, y un suplemento nutritivo para la recuperación de las micobacterias presentes en las muestras.

Los frascos inoculados se cargan en el equipo BACT/ALERT 3D®, donde se incuban y controlan continuamente para estudiar la presencia de micobacterias que crecerán en la botella. El sistema BACT/ALERT 3D utiliza un sensor colorimétrico y la luz reflejada para controlar la presencia y la producción de dióxido de carbono (CO₂) disuelto en el medio de cultivo. Si hay microorganismos en la muestra, se producirá dióxido de carbono a medida que estos metabolizan los sustratos presentes en el medio de cultivo. Cuando el crecimiento de los microorganismos emite CO₂, el color del sensor permeable a gas instalado en el fondo de cada frasco de cultivo cambia a verde más claro o amarillo. El color más claro es resultado de un aumento de las unidades de reflectancia monitorizadas por el sistema. El instrumento monitoriza y registra la reflectancia del frasco cada 10 minutos. En el momento de la detección, las unidades formadoras de colonias (UFC) aproximadas por mL son 10⁶-10⁷.

5. Protocolo para la preparación de la solución de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NAOH).

Materiales

- . Citrato trisódico (Na₃C₆H₅O₇*2H₂O).
- . Hidróxido de sodio NaOH.
- . Agua estéril y/o desionizada.
- . Frasco ámbar con capacidad de 1000 mL.

Instrumentos

- . Balanza.
- . Autoclave.

Procesamiento

Reactivo	Concentración	Volumen		
Hidróxido de sodio (NaOH)	4 %	1gr	4 gr	10gr
Citrato trisódico (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	2.94%	39mL	156mL	390mL
Agua destilada estéril	-	11mL	44mL	110mL
Volumen total		50mL	200mL	500mL

- . Agregar al frasco ámbar agua estéril según el volumen de preparación deseada
- . Agitar la solución de forma manual.
- . Esterilizar la solución durante 15 minutos en autoclave.
- . Guardar a temperatura ambiente.

6. Protocolo para la preparación del suplemento antimicrobiano

Materiales

- . Kit de suplemento (nutritivo y antimicrobiano) BACT/ALERT® MP
- . Jeringa estériles y nuevas.
- . Pañitos se isopropanoles estériles.

Equipos

- . Cabina de flujo laminar
- . Vortex

Procesamiento

- Limpiar la cabina de flujo laminar con hipoclorito al 2.5%
- Posteriormente limpiar la cabina de flujo laminar con agua estéril y por último con alcohol al 70%
- Ingresa los reactivos a la cabina e iniciar la preparación de estos
- Limpiar con el paño de isopropanol las parte gris superior de la tapa de cada frasco antes de inocular
- Agregar liofilizado 10 mL de la solución NS y agregarlo al frasco de AS.
- Marcar ambos frascos con la fecha de apertura.
- Hacer vortex
- Guardar en refrigeración



NOTAS:

- El antimicrobiano dura 1 semana desde que se prepara.
- El restante del NS dura un mes desde su apertura.

7. Procesamiento del cultivo para micobacterias

Tipo de muestras

- . Muestras estériles (líquido cefalorraquídeo, líquido articular, líquido pleural, biopsias, tejidos estériles)
- . Muestras no estériles (lavado bronquial, lavado broncoalveolar, esputo, aspirado traqueal, orina, jugo gástrico, tejidos no estériles).

Materiales

- . Botella BACT/ALERT® MP
- . Agar Lowenstein Jensen.
- . Jeringas estériles
- . Micropipeta y puntas estériles de 1000 uL
- . Tubos cónico de 50mL

Reactivos

- . Kit de suplemento (nutritivo y antimicrobiano) BACT/ALERT® MP

Nota: Ver protocolo de preparación del antimicrobiano.

- . Buffer fosfatado pH 6.8 estéril
- . Solución NALC-NaOH estéril al 4%

Nota: Ver protocolo de preparación de la solución.

- . N-Acetil-L-cisteína

Equipos

- . Cabina de flujo laminar
- . Centrífuga
- . Vortex
- . Balanza analítica

Nota:

* Se debe realizar esterilización del Buffer fosfato pH 6.8 y del descontaminante, se debe realizar el fin de semana y/o a necesidad.

*Debe ubicar el letreo en la puerta de ingreso al área de microbiología, donde haga la advertencia que se esta procesando micobacterias.

*Debe utilizar la mascarilla N95.

*Debe utilizar doble guante durante todo el procesamiento, y en caso tal de que se rompan los guantes, cambiarlos de manera inmediata, donde primero debe lavarse las manos con agua y jabón, y luego ponerse los nuevos guantes.

*Antes de comenzar cualquier procesamiento de muestras para micobacterias, sean estériles o no, se debe de realizar una limpieza de la cabina con hipoclorito al 2.5%, luego con agua estéril para retirar el exceso de hipoclorito, y por ultimo y con alcohol al 70%. Una vez realizada la limpieza, previo al procesamiento de muestras, inocular en el medio líquido BACT/ALERT® MP el suplemento nutritivo (NS) o el antimicrobiano (AS) según sea el caso, para evitar contaminaciones durante el proceso. Recordar que el procesamiento de muestras se debe de hacer en el siguiente orden:

1. Muestras estériles.
2. Muestras para realizar descontaminación.
3. Muestras con BK o PCR positivo.

Procesamiento para preparación y descontaminación de muestras no estériles utilizando el método N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH).

1. Calcular la cantidad de N-acetil-L-cisteína para agregar según la cantidad de muestras y mililitros que se contienen de cada una de ellas:

Nota: Cada muestra debe tener un volumen mínimo de 5mL, en caso de que la muestra sea de un volumen inferior se debe aforar con Buffer fosfatado pH 6.8 estéril a 5mL.

Cantidad de N-acetil-L-cisteína (mg)	Volumen de NaOH al 4% (mL)	Volumen de muestra (mL)
25mg	5mL	5mL
50mg	10mL	10mL
75mg	15mL	15mL
100mg	20mL	20mL
125mg	25mL	25mL
150mg	30mL	30mL
175mg	35mL	35mL
200mg	40mL	40mL
225mg	45mL	45mL
250mg	50mL	50mL

2. Agregar en un tubo cónico de 50 mL (previamente esterilizados) 5mL de muestra (se acepta como volumen inicial de muestra mínimo 1mL y máximo 5 mL, si es necesario aforar con Buffer fosfatado pH 6.8 estéril hasta los 5 mL) e igual volumen de la solución de NALC-NaOH + N-acetil-L-cisteína, preparada previamente.

NOTAS:

1. si la muestra es tejido, esta debe triturar en mortero con 2 mL de Buffer fosfato pH 6.8 estéril, y con jeringa estéril tomar la parte líquida del mortero y continuar con el procedimiento descrito.
2. En caso de tener muestras superiores a 5 mL, se debe concentrar centrifugando a 3205 rpm por 15 minutos, descartar el sobrenadante por inmersión y resuspender con 2 mL de Buffer fosfato pH 6.8 estéril
3. Realizar vortex a 3000 rpm de la siguiente:
 - 3.1. Poner el cronometro por hasta 15 minutos, e iniciar el primer vortex a la muestra por 15 segundos, luego reposar por 5 segundos
 - 3.2. Segundo vortex a la muestra por 15 segundos, luego reposar por 5 segundos.
 - 3.3. Tercer vortex a la muestra por 15 segundos, luego reposar hasta finalizar los 15 minutos.
4. Una vez terminado los 15 minutos aforar hasta 50mL con el buffer fosfatado fosfato pH 6.8 estéril y realizar vortex nuevamente hasta que quede todo bien mezclado.
5. Ubicar los tubos cónicos en los porta tubos de la centrifuga cerrándolos bien y centrifugar por 15 minutos a 3205 rpm (3000 g) a una temperatura entre 4°C -10°C.
6. Sacar los porta tubos de la centrifuga y sacar los tubos cónicos, ubicándolos en la gradilla dentro la cámara de flujo laminar, dejarlos reposar por 5 minutos, para evitar esparcimiento de vapores y/o gotas.
7. Descartar el sobrenadante por inmersión de manera total.

8. Resuspender la muestra en 2 mL de Buffer fosfato pH 6.8 estéril.
9. Agregar con jeringa estéril 0,5 mL de la muestra resuspendida a la botella, previamente inoculada con el suplemento.
10. Agregar con jeringa estéril 0,2 mL de la muestra resuspendida al medio sólido Lowenstein Jensen.
11. Ingresar la botella al BACT/ALERT 3D® y hacer el registro de esta en el sistema de seguimiento (REAL) y en el archivo de registro de muestras contaminadas.
12. Incubar el agar Lowenstein Jensen a 37 °C durante 24-48 horas inclinándolo levemente de manera horizontal y con la tapa ligeramente desajustada para permitir el intercambio de gases y la absorción de la siembra; a las 48 horas de incubación ajustar la tapa del medio.

Nota: Incubar por 42 días la botella y el medio sólido. En caso tal si el medio líquido sale contaminado, este se debe descontaminar nuevamente y se inicia el conteo nuevamente, pero, si nuevamente se contaminada le medio líquido, se deja incubando por 56 días el medio sólido.

Procesamiento de muestras estériles (líquido pleural, cefalorraquídeo, sinovial)

. Muestras normalmente estériles con volumen menor a 1 mL:

1. Una vez se adiciona el suplemento a todas las botellas, agregar con una jeringa estéril 0,5 mL de la muestra sin centrifugar. Incubar la botella en el equipo BACT/ALERT®.
2. Agregar con una jeringa estéril 0,2 mL de la muestra sin centrifugar en el agar Lowenstein Jensen.
3. Incubar el agar Lowenstein Jensen a 37 °C durante 24-48 horas inclinándolo levemente de manera horizontal y con la tapa ligeramente desajustada para permitir el intercambio de gases y la absorción de la siembra; a las 48 horas de incubación ajustar la tapa del medio.

Nota: Incubar por 42 días la botella y el medio sólido. En caso tal si el medio líquido sale contaminado, este se debe descontaminar nuevamente y se inicia el conteo nuevamente, pero, si nuevamente se contaminada le medio líquido, se deja incubando por 56 días el medio sólido.

. Muestras normalmente estériles con volumen mayor a 1 mL:

1. Inocular con el suplemento a todas las botellas.
2. Pasar la totalidad de la muestras a los tubos cónicos y ubicar los tubos cónicos en los porta tubos de la centrifuga cerrándolos bien, centrifugar la totalidad de la muestra por 15 minutos a 3205 rpm (3000 g). Si se utilizan tubos falcón de 50 mL conteniendo más de 15 mL de muestra, prolongar la centrifugación hasta los 30 minutos.
3. Sacar los porta tubos de la centrifuga y sacar los tubos cónicos sin resuspender el sedimento, ubicándolos en la gradilla dentro la cámara de flujo laminar, dejarlos reposar por 5 minutos, para evitar esparcimiento de vapores y/o gotas.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento. Si es necesario, agregar 1mL de Buffer fosfato pH 6.8 estéril para disolverlo en volumen suficiente para inocular los tubos
5. Adicionar con una jeringa estéril 0,5 mL del sedimento de la muestra. Incubar la botella en el equipo BACT/ALERT® por 42 días.
6. Agregar con una jeringa estéril 0,2 mL del sedimento de la muestra en el agar Lowenstein Jensen, y tapar el tubo aflojando ligeramente el cierre de la tapa para permitir intercambio de gases y la absorción de la siembra por 24-48 horas.

Nota: Incubar por 42 días la botella y el medio sólido. En caso tal si el medio líquido sale contaminado, este se debe descontaminar nuevamente y se inicia el conteo nuevamente, pero, si nuevamente se contaminada le medio líquido, se deja incubando por 56 días el medio sólido.

Procesamiento de muestras de tejido tomadas por biopsia:

1. Inocular todos los medios líquidos con el suplemento.
2. Trasvasar la muestra suavemente a un mortero estéril con la ayuda de unas pinzas estériles sin realizar salpicaduras.
3. Agregar 2 ml de Buffer fosfato pH 6.8 estéril dentro del mortero
4. Macerar el tejido hasta disgregarse y homogeneizarlo
5. Si el tejido es normalmente estéril y ha sido tomado con asepsia, inocule 0,5 mL de del material macerado en una botella BACT/ALERT® MP.
6. Agregar con una jeringa estéril 0,2 mL del líquido del macerado de la muestra en el agar Lowenstein Jensen, y tapar el tubo aflojando ligeramente el cierre de la tapa para permitir intercambio de gases y la absorción de la siembra.
7. Si el tejido contiene contaminantes, recoger con una pipeta todo el material macerado y proceder a realizar proceso de descontaminación mediante el método de N-acetil-L- cisteína + la solución de NALC-NaOH descrito inicialmente.

Procesamiento de muestras tomadas por hisopado

1. Inocular los medios líquidos con el suplemento.
2. Agregar de 2 a 3 mL de agua destilada en tubo de centrifugación y sumergir todo el hisopo de la muestra.
3. Agitar en vortex y dejar el hisopo durante 15 minutos para permitir que se desprenda la mayor cantidad posible de material.
4. Retirar el hisopo escurriendo el algodón contra la pared del tubo
5. Realizar la descontaminación con el método de N-acetil-L-cisteína + solución de NALC-NaOH descrito inicialmente.
6. Continuar con el procesamiento de la muestra con el protocolo anteriormente descrito.

8. Lectura y seguimiento del cultivo para micobacterias

Medio sólido:

- . Revisar el medio sólido a los 24-48 horas después de sembrados y ajustar la tapa del medio e incubar por 42 días a 37 °C protegido de la luz.
- . Realizar lectura semanal hasta el día 42 de incubación, tener en cuenta realizar informe preliminar a los 28 días e informe final a los 42 días.
- . Realizar coloración de Gram y Ziehl Neelsen a los cultivos sólidos con crecimiento de colonias compatibles con micobacterias o a los medios sospechosamente contaminados.
- . A los cultivos contaminados que se detecten BAAR proceder a descontaminar el cultivo para intentar aislar el bacilo.

. Realizar la identificación de la micobacteria utilizando la prueba rápida de TB AgMTB64, específica para *M. tuberculosis*, en caso de no lograr identificarlo, remitir el cultivo positivo a la CIB.

. El medio líquido que pite como contaminado, se debe realizar la descontaminación lo mas pronto posible, en caso tal que no se pueda llegar a descontaminar se debe hacer el seguimiento del medio solido hasta los 56 días. De igual manera los medios ya descontaminados que vuelvan a pitar como contaminados, se debe ya hacer el seguimiento del medio solido hasta los 56 días.

Registrar	si se observa	
Contaminado	Todos los tubos inoculados con la muestra contaminados	
negativo	Sin desarrollo luego de la inspección de la octava semana de incubación	
el número de colonias exacto.	entre 1 y 19 colonias en el total de medios sembrados	
+	20 a 100 colonias	
++	Más de 100 colonias	(colonias separadas)
+++	Colonias incontables	(colonias confluentes)

Cultivo con colonias sospechosas de Micobacterias

Cultivo en Löwenstein-Jensen

1. Micobacteria ambiental cromógena
2. Micobacteria ambiental de rápido desarrollo
3. Micobacteria ambiental de lento desarrollo
4. *Mycobacterium tuberculosis*

Esquema de diferenciación de <i>M. tuberculosis</i> de las micobacterias ambientales		
	<i>M. tuberculosis</i>	Micobacterias ambientales
Velocidad de desarrollo	lenta (a partir de la tercera semana luego de inoculada una muestra en medio a base de huevos)	lenta o rápida
Aspecto macroscópico de la colonia	rugosa no pigmentada	lisa pueden tener pigmentación
Aspecto microscópico	bacilos dispuestos en "cuerdas"	bacilos muy largos y filamentosos o cortos, cocoides, mayormente desagregados
Niacina	positiva	negativa
Catalasa a 68 °C	negativa	positiva
Reducción de nitrato	positiva	positiva/negativa

Medio líquido:

- . Si el sistema Bact/Alert 3D detecta que la botella esta positiva, retírela del equipo.
- . A todas las botellas positivas se les debe realizar coloración de Gram y Ziehl Neelsen

Nota: Se debe tomar 0.5mL, de la botella con jeringa estéril y pasarlo a un tubo eppendorf, y centrifugar por 5 minutos a 1600 rpmi, se debe sacar el sobrenadante la mayor cantidad posible y con lo poco que queda resuspender la muestras con en porta objetos realizar GRAM

y Ziehl Neelsen

- . En caso de observar BAAR en la coloración de Ziehl Neelsen, realizar prueba rápida de TB AgMTB64, específica para M. tuberculosis, en caso de ser positiva repórtelo inmediatamente al médico y al laboratorio departamental.
- . En caso de coloración de Ziehl Neelsen negativo y Gram negativo, incubar la botella a 37°C y repetir este procedimiento a las 48 horas, para aumentar la probabilidad de recuperación de BAAR, en caso de que no se observen gérmenes, realizar un repique de la botella en medio sólido Lowenstein Jensen e incubar a 37°C hasta completar los 56 días.
- . En caso de coloración de Ziehl Neelsen negativo y tinción de Gram positiva para bacterias aerobias, NO subcultive la botella, ya que está indicando contaminación bacteriana.
- . Cuando el sistema Bact/Alert 3D indique que el frasco este negativo a los 42 días, retírelo del equipo, registre su seguimiento como negativo, descarte la botella y a su vez finalizar el medio sólido inicial.

Nota: Recuerde que debe hacer el registro en el sistema de REAL, de los procesos que le realizase al medio solido y/o líquido.

Plantilla de resultado:

Cultivos negativos

Microbiología Especial

Mycobacterium tuberculosis CULTIVO

Tipo de muestra:	Espudo
Tiempo de incubación:	42 días
Aislamiento:	No se obtuvo crecimiento de micobacterias
Técnica:	Muestra procesada con método automatizado en medio líquido (Bact/alert MP) en combinación con medio solido (Lowenstein Jensen)
Nota:	Informe final

Cultivos positivos a partir del medio líquido

Microbiología Especial

Mycobacterium tuberculosis CULTIVO

Tipo de muestra:	Espudo
Tiempo de incubación:	42 días
Aislamiento:	No se obtuvo crecimiento de micobacterias
Técnica:	Muestra procesada con método automatizado en medio líquido (Bact/alert MP) en combinación con medio solido (Lowenstein Jensen)
Nota:	Informe final

Cultivos positivos a partir del medio solido

Mycobacterium tuberculosis CULTIVO

Tipo de muestra:	Espudo
Tiempo de incubación:	3 semanas
Numero de colonias obtenidas en medio solido:	+
Aislamiento:	Se obtuvo crecimiento de Mycobacterium tuberculosis complex
Técnica:	Muestra procesada con método automatizado en medio líquido (Bact/alert MP) en combinación con medio solido (Lowenstein Jensen)
Nota:	Aislamiento obtenido a partir del medio solido (Lowenstein Jensen)
Nota 1:	Identificación realizada por Inmunocromatografía para la detección del Antígeno MPT64 del Complejo Mycobacterium tuberculosis
Nota 2:	Informe final

NOTA: Recuerde que el número de colonias también se puede reportar: 1-9 colonias, +, ++ ó +++.

Esto depende de lo que observé en el cultivo sólido.

9. Referencias o Bibliografía

- . Organización Panamericana de la Salud. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis: Normas y guía técnica. Parte II. Cultivo. OPS, 2008.
- . Inserto del fabricante: BACT/ALERT® MP Reagent System, Bioré.

Si este documento se encuentra impreso no se garantiza su vigencia, por lo tanto es copia NO CONTROLADA, la versión actual se encuentra en Isolución

VERSION	FECHA	RAZON DE LA ACTUALIZACION
00	14/Ene/2022	Se revisa y no se modifica
00	03/Ene/2023	Se revisa y no se modifica.
00	03/Feb/2024	Se revisa y no se modifica.
01	08/Mar/2024	Se modifica materiales, procesamiento, lectura y seguimiento del cultivo de micobacterias.
02	25/Sep/2024	Se modifica el procesamiento. Se adicionan equipos biomédicos. Se elimina seguimiento del medio solido.

		Se adiciona el reporte de los cultivos negativos y positivos
03	23/Ene/2025	Se modifica preparación del reactivo para la decontaminación y el procesamiento.



ELABORO	REVISO	APROBO
Nombre: Yulime Andrea Monsalve Martinez Cargo: Dirección de Calidad Fecha: 22/Ene/2025	Nombre: Katherin Vanessa Contreras Ramírez Cargo: Bacteriólogo(a) de Microbiología Centro Fecha: 22/Ene/2025 Nombre: Aleyda Montañó Céspedes Cargo: Bacteriólogo(a) de Microbiología Centro Fecha: 22/Ene/2025	Nombre: Carlos Gonzalo Robledo Restrepo Cargo: Director General Fecha: 23/Ene/2025

COPIA CONTROLADA