



# PROTOCOLO Mycobacteria/Nocardia/Streptomyces



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

PIONEERING DIAGNOSTICS

# ESPECIES DE MYCOBACTERIA EN KB V3.2

- 50 especies
- Validado en medio sólido y líquido (incluidos los medios NTM Elite Agar, NTM para micobacterias no tuberculosas)
- Espectros en KB obtenidos desde:
  - Medio de Cultivo sólido
    - Lowenstein Jensen
    - Coletsos
    - Middlebrook 7H10 & 7H11
  - Botellas
    - BacTAlert MP
    - MGIT
    - Versatrek
- Protocolos de preparación descritos en el Manual del usuario del kit VITEK® MS MYCOBACTERIA/NOCARDIA



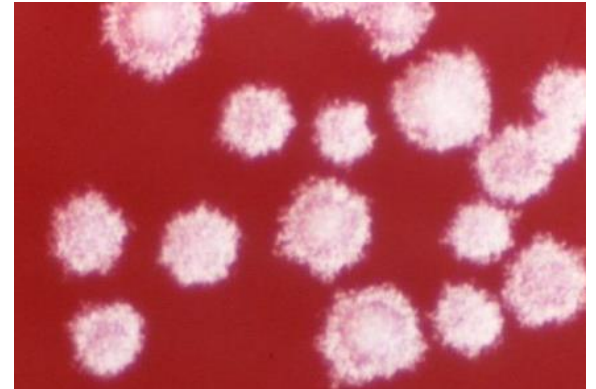
NTM Elite agar



# ESPECIES DE NOCARDIA EN KB V3.2



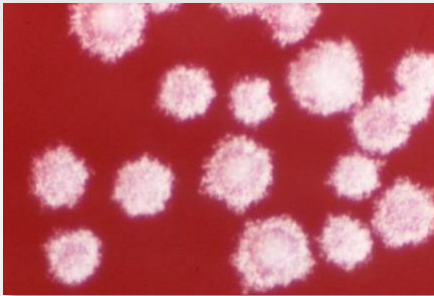
- 17 especies
- Protocolo para colonias incrustadas en agar
- Protocolo colonias no incrustada en agar



- 2 especies
- Protocolo para colonias incrustadas en agar
- Para los pasos de inactivación y extracción: mismo protocolo que las micobacterias



# REACTIVOS Y ACCESORIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIA, NOCARDIA Y STREPTOMYCES



# REACTIVOS Y ACCESORIOS PARA CULTIVOS SÓLIDOS DE MYCOBACTERIA/NOCARDIA 1/3



## ● VITEK® MS MYCOBACTERIA/NOCARDIA KIT - Ref 415659

O:

- Microtubos incoloros de fondo redondo de 2 mL
- Microtubos de 1,5 mL con aprox. 200  $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,5 mm
- Etanol al 70 % (grado HPLC o ACS)
- Ácido fórmico 70% (grado HPLC o ACS)
- Acetonitrilo (grado HPLC o ACS)
  
- Microcentrífuga capaz de 10000 a 14000g
- Adaptador GENIE 2 Vortex + Mobio (ref. 270677) o batidor de perlas
- Cabina de bioseguridad
- Micropipeta y tips
- Vórtex (velocidad máxima)
- Ansa de 1  $\mu$ l



# REACTIVOS Y ACCESORIOS PARA CULTIVOS SÓLIDOS DE MYCOBACTERIA/NOCARDIA 2/3



- VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA kit IVD – Ref. 415659
- Vida útil: 1 año
- El kit permite realizar alrededor de 100 pruebas
- Diseñado para realizar la identificación de especies de micobacterias (y Nocardia) en el sistema VITEK® MS a partir de cultivos para aplicaciones clínicas e industriales.



# REACTIVOS Y ACCESORIOS PARA CULTIVOS SÓLIDOS DE MYCOBACTERIA/NOCARDIA 3/3



## ● VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA kit IVD – Ref. 415659

Componente	Cantidad
Viales con perlas de vidrio	100
Tubos Eppendorf (2 mL)	100
70% Etanol	2 frascos
70% Ácido Fórmico	4 microtubos
Acetonitrilo	4 microtubos





# REACTIVOS Y ACCESORIOS PARA MICOBACTERIAS DE CULTIVOS LÍQUIDOS



- VITEK® MS MYCOBACTERIUM/NOCARDIA KIT / VITEK® MS LIQUID MYCO SUPPLEMENTAL KIT - Ref. 421564

Componente	Cantidad
Tubos Eppendor (5 mL)	2 x 50 / 100
Almohadillas absorbentes	1 x 250 / 250



Tubos Eppendorf de 5mL



Almohadillas

Para ser utilizado como **complemento** del VITEK® MS MYCOBACTERIA/NOCARDIA KIT - Ref 415659

- Vida útil: 1 año

# REACTIVOS Y ACCESORIOS PARA STREPTOMYCES



## Reactivos y consumibles necesarios:

- Microtubos incoloros de fondo redondo de 2 mL
- Microtubos de 1,5 ml con aprox. 200  $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,5 mm
- Etanol al 70 % (grado HPLC o ACS)
- Ácido fórmico 70% (grado HPLC o ACS)
- Acetonitrilo (grado HPLC o ACS)



## Equipamiento:

- Microcentrífuga capaz de 10000 a 14000G
- Adaptador GENIE 2 Vortex + Mobio (ref. 270677) o batidor de perlas
- Micropipeta y tips
- Vórtex (velocidad máxima)
- Ansa de 1  $\mu$ l o Cytobrush para Streptomyces “incrustado en agar”



# PROTOCOLO MYCOBACTERIA

# PROTOCOLO MYCOBACTERIA

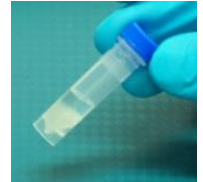
## Inactivación

**SOLIDO:**  
Lowenstein-Jensen, 7H10,  
7H11 y Coletsos, NTM  
Elite Agar



Transferir 1 µl de ansa llena de cultivo a un microtubo de 1,5 ml que contenga aprox.200 uL de perlas de vidrio de 0,5 mm y 500 µl de etanol al 70 %

Transfiera la suspensión a un microtubo de 1,5 ml que contenga aprox. 200 ul perlas de vidrio de 0,5 mm



Vortex a la botella durante 5-10 seg. Transfiera 3 mL a un tubo Eppendorf de 5 ml

Centrifugar 10 min a 3.000 g

Decantar el medio y secar el tubo

Resuspender el sedimento con 500 µl de etanol al 70 %.

Para manipular en cabina de seguridad P3



**BacT/ALERT® MP**  
**MGIT® 960**  
**VERSATREK® Myco**

## Extracción

Resuspender completamente el sedimento con 10 µl de ácido fórmico al 70 %.. Vortex para una homogeneización completa

Añadir 10 µl de acetonitrilo y volver a vortexear

Centrifugar 2 min\*  
10000 – 14000 g

Depositar inmediatamente 1µl del sobrenadante en los pocillos. Dejar secar completamente y depositar 1µl de la matriz CHCA. Dejar secar

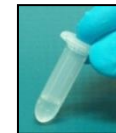


**Después del paso de inactivación, la parte de extracción puede manejarse fuera del gabinete de seguridad**

Descartar todo el sobrenadante

Centrifugar 2 min\*  
10000 – 14000 g

Vórtex y transferir en un microtubo vacío de fondo redondo de 2 ml.



Vortex  
15 min



o Batidor  
5 min

Incubar verticalmente a temperatura ambiente durante 10 min.

(tiempo de inactivación)

\* 2 min mínimo

# PROTOCOLO PASO A PASO MICOBACTERIAS MUESTRA SÓLIDA 1/8



## MYCOBACTERIA



Microtubo de 1,5 ml que contiene aprox. 200 uL de perlas de vidrio de 0,5 mm y 500 µl de etanol al 70 %

1 µl ansa llena



Lowenstein-Jensen, Coletsos, NTM Elite agar

Para manipular en cabina de seguridad P3

- Este paso debe realizarse bajo cabina de seguridad.
- Recoja un ansa de 1 µL llena de cultivo
- Medio validado: LJ, Coletsos, Middlebrook 7H10 y 7H11, NTM Elite Agar

# PROTOCOLO PASO A PASO MICOBACTERIAS

## MUESTRA LÍQUIDA 1/8



### *Inactivación*



BacT/ALERT® MP  
MGIT® 960  
VERSATREK® Myco

Vortex a la botella durante 5-10 seg. Transfiera 3 mL a un tubo Eppendorf de 5 ml



Para manipular en cabina de seguridad P3

- **Procesar la botella entre 24-72 hs posteriores a positivización**
- **Vortex durante un mínimo de cinco segundos para resuspender el crecimiento y romper los grumos haciendo una mezcla homogénea de cultivo**
  - Cuando analice botellas BacT/ALERT® MP, use una aguja de 18 G o más grande para la aspiración de la muestra.
  - Después de retirar la alícuota inicial, coloque la botella o el tubo positivo a +35 ° C/+37 ° C en una incubadora para realizar más pruebas, si es necesario.

# PROTOCOLO PASO A PASO MICOBACTERIAS MUESTRA LÍQUIDA 1/8



## *Inactivación*



BacT/ALERT® MP  
MGIT® 960  
VERSATREK® Myco

Vortex a la botella durante 5-10 seg. Transfiera 3 mL a un tubo Eppendorf de 5 ml

Centrifugar 10 min a 3.000 g

Para manipular en cabina de seguridad P3



- Centrifugar la muestra durante 10 minutos a 3000 g con una centrífuga de cubeta basculante con un adaptador de 15 ml para crear un sedimento.

Asegúrese de que la tapa del tubo de 5 ml esté bien cerrada

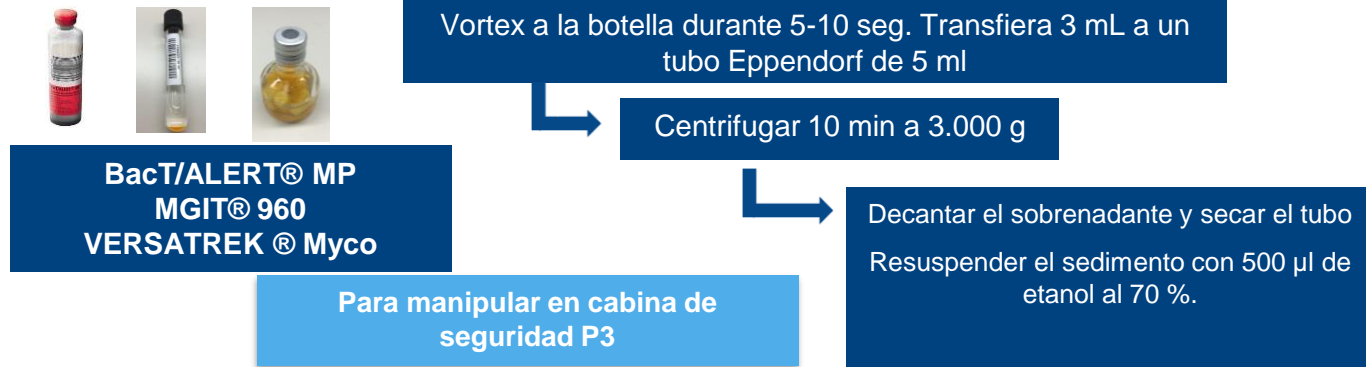


- El pellet se ubicará en el fondo del tubo.

# PROTOCOLO PASO A PASO MICOBACTERIAS MUESTRA LÍQUIDA 1/8



## *Inactivación*



- **Decantación/secado:** al decantar el sobrenadante del tubo de 5 ml, asegúrese de secarlo completamente con la almohadilla absorbente de seguridad provista.



**Retire la almohadilla absorbente sin tocarla con guantes.**

**Después de agregar 500 µl de etanol al 70 %, resuspender el sedimento hasta que se complete la homogeneización pipeteando hacia arriba y hacia abajo.**





# PROTOCOLO PASO A PASO MICOBACTERIAS MUESTRA LÍQUIDA 1/8



## Inactivación



BacT/ALERT® MP  
MGIT® 960  
VERSATREK® Myco

Vortex a la botella durante 5-10 seg. Transfiera 3 mL a un tubo Eppendorf de 5 ml

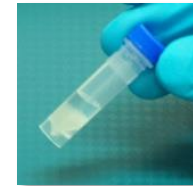
Centrifugar 10 min a 3.000 g

Decantar el sobrenadante y secar el tubo  
Resuspender el sedimento con 500 µl de etanol al 70 %.

Para manipular en cabina de seguridad P3

Transfiera la suspensión a un microtubo de 1,5 ml que contenga aprox. 200 uL perlas de vidrio de 0,5 mm

- Transfiera toda la suspensión al tubo de perlas de vidrio.



# PROTOCOLO PASO A PASO 2/8



Vortex  
15 min

o Batidor  
5 min



Incubar verticalmente a temperatura ambiente durante 10 min.  
(tiempo de inactivación)

- **Coloque los microtubos en el adaptador Mobio para equilibrarlo y coloque las tapas en el centro.**
- **Usar a velocidad máxima**
- **Después del tiempo de agitación, transfiera los microtubos verticalmente en una bandeja durante 10 minutos a temperatura ambiente.**

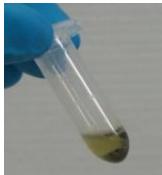
Vórtex y transferir en un microtubo vacío de fondo redondo de 2 ml.



- **Uno por uno, córtex a máx. velocidad e inmediatamente transfiera la suspensión a un tubo vacío de fondo redondo de 2 ml usando una pipeta y evitando la transferencia de perlas de vidrio**

# PROTOCOLO PASO A PASO 4/8

**4.**  
**Centrifugación**  
**2 min**  
**10 000 g**

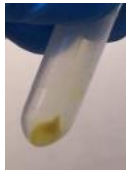


- La centrifugación requiere una microcentrífuga.
- Pellet podría ser no visible.
- Coloque siempre los tubos de la misma manera en la centrífuga para saber dónde se encuentra el sedimento (parte inferior del tubo, posición superior).



# PROTOCOLO PASO A PASO 5/8

Descarte todo el sobrenadante



- Pipetear en el lado opuesto del sedimento
- Pipetear lentamente evitando perturbar el sedimento
- Retire todo el etanol. Puede interferir con la extracción y diluir el ácido fórmico

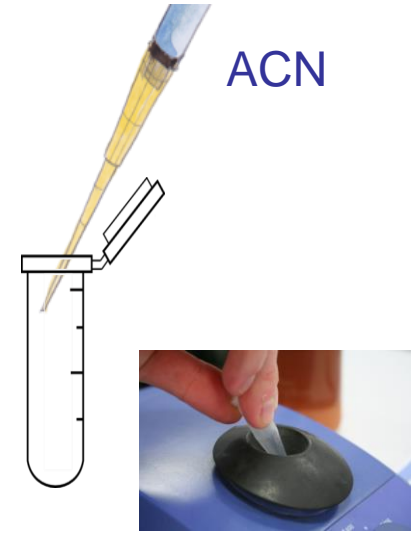
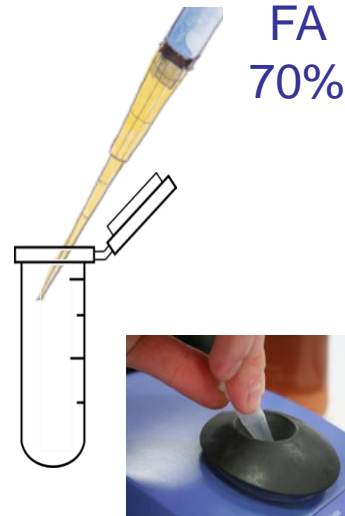
# PROTOCOLO PASO A PASO 6/8

Resuspender completamente el sedimento con 10  $\mu$ l de ácido fórmico al 70 %.

Vórtex para una homogeneización completa

Añadir 10  $\mu$ l de acetonitrilo

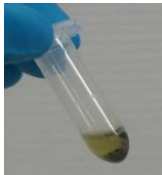
Vórtex para una homogeneización completa



- Si el usuario no utiliza el VITEK®MS MYCOBACTERIA/NOCARDIA KIT - Ref 415659, el ácido fórmico al 70 % debe prepararse todos los días por razones de estabilidad.
- Respetar el orden de los solventes (FA debe actuar primero para la eficiencia del acetonitrilo).
- Añadir FA en el sedimento bacteriano
- Después de la adición de 10  $\mu$ l de ácido fórmico, resuspender el precipitado hasta la completa homogeneización
- Luego agregue 10  $\mu$ l de acetonitrilo y córtex

# PROTOCOLO PASO A PASO 7/8

**7.**  
**Centrifugación**  
**2 min**  
**10 000 g**

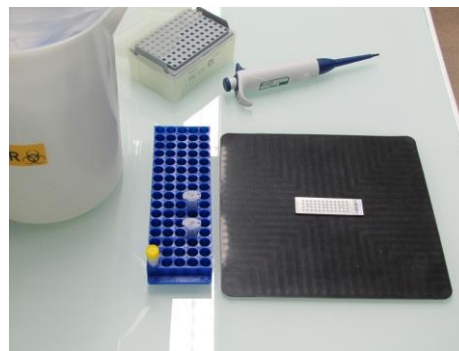


- La centrifugación requiere una microcentrífuga.
- Pellet podría no ser visible.
- Coloque siempre los tubos de la misma manera en la centrífuga para saber dónde se encuentra el sedimento (parte inferior del tubo, posición superior).



# PROTOCOLO PASO A PASO 8/8

Deposite inmediatamente 1  $\mu$ l de sobrenadante en el(los) pocillo(s)  
Dejar secar por completo  
Añadir 1  $\mu$ l de matriz CHCA  
Deje secar



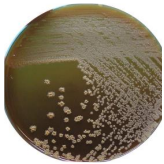
- Depositar el sobrenadante inmediatamente.
- Se recomienda depósito duplicado en caso de un problema de adquisición
- No perturbar el pellet.
- Realice la adquisición dentro de las 72 horas
- Solo para protocolos Sólidos: una vez obtenido el sobrenadante, se recomienda depositarlo el mismo día de la extracción o almacenarlo entre  $-19^{\circ}$  C y  $-31^{\circ}$  C hasta 14 días (2 ciclos de congelación y descongelación como máximo).
- Si el depósito no se realiza de inmediato, coloque el sobrenadante en un tubo de fondo redondo vacío nuevo y centrifugue nuevamente los extractos antes de usarlos.
- Dejar secar (no forzar el secado)





# **PROTOCOLO NOCARDIA INCRUSTADA EN AGAR**

## NOCARDIA



## *Inactivación*



Microtubo de 1,5 ml que contiene aprox. 200 uL de perlas de vidrio de 0,5 mm y 500 µl de etanol al 70 %

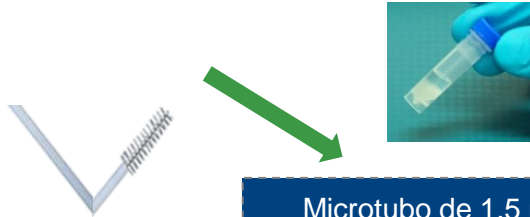
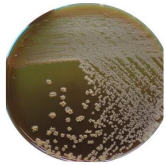


- Tome el cepillo a 90° para facilitar la recolección.
- Recoja el material con cuidado teniendo cuidado de no recoger el agar.

# PROTOCOLO PASO A PASO 2/8 A 8/8

- Continúe con los pasos de inactivación y extracción de la misma manera que los protocolos de micobacterias

**NOCARDIA**



Microtubo de 1,5 ml que contiene aprox. 200 uL de perlas de vidrio de 0,5 mm y 500 µl de etanol al 70 %

## Extracción

Resuspender completamente el sedimento con 10 µl de ácido fórmico al 70 %.. Vortex para una homogeneización completa  
 Añadir 10 µl de acetonitrilo y volver a vortexear

Centrifugar 2 min\*  
 10000 – 14000 g

Depositar inmediatamente 1µl del sobrenadante en los pocillos. Dejar secar completamente y depositar 1µl de la matriz CHCA. Dejar secar

Descartar todo el sobrenadante

Después del paso de inactivación, la parte de extracción puede manejarse fuera del gabinete de seguridad

Centrifugar 2 min\*  
 10000 – 14000 g

Vórtex y transferir en un microtubo vacío de fondo redondo de 2 ml.

Vortex 15 min o Batidor 5 min

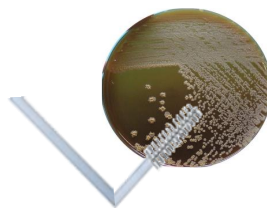
Incubar verticalmente a temperatura ambiente durante 10 min.  
 (tiempo de inactivación)

\* 2 min mínimo

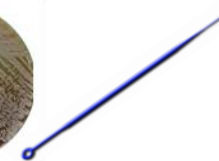
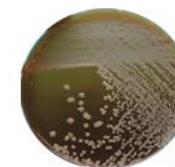


# PROTOCOLO DE STREPTOMYCES

## *Inactivación*



Transfiera 1  $\mu$ l de ansa completa o recoja las colonias con un cepillo citológico curvo (en caso de una cepa incrustada) a un microtubo de 1,5 ml con aprox. 200  $\mu$ L perlas de vidrio de 0,5 mm y 500  $\mu$ l de etanol al 70 %



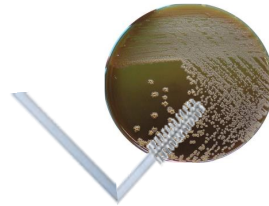
Microtubo de 1,5 ml con 200  $\mu$ L aprox. perlas de vidrio de 0,5 mm y 500  $\mu$ l de etanol al 70 %

- **El etanol al 70 % debe prepararse todos los días por motivos de estabilidad.**
- **En caso de cepa no incrustada en agar: Recoja un ansa completa de 1  $\mu$ l**
- **En caso de una cepa incrustada en agar:**
  - Usar un citocepillo
  - Use el citocepillo a 90° para facilitar la recolección.
  - Recoja suavemente el material con cuidado de no recoger el agar

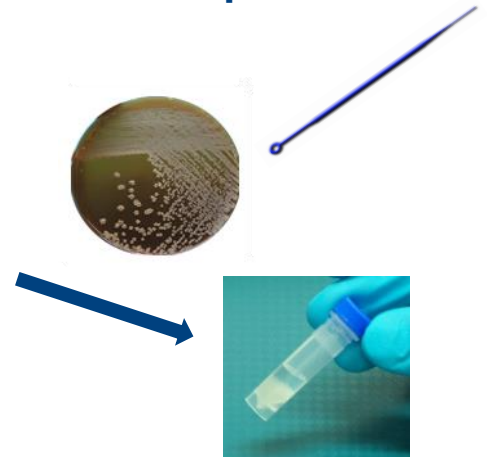
# PROTOCOLO PASO A PASO 2/8 A 8/8

- Continúe con los pasos de inactivación y extracción de la misma manera que los protocolos de micobacterias

## Inactivación



Transfiera 1 µl de ansa completa o recoja las colonias con un cepillo citológico curvo (en caso de una cepa incrustada) a un microtubo de 1,5 ml con aprox. 200 uL perlas de vidrio de 0,5 mm y 500 µl de etanol al 70 %



## Extracción





PIONEERING DIAGNOSTICS