



Preparación de *Mycobacterium* a partir de un medio líquido

1. Analice los frascos positivos de BACT/ALERT® MP, BACTEC™ MGIT™ 960 o VERSATREK® Myco entre 24-72 horas tras el resultado positivo determinado por el instrumento de detección.

Nota: Si se retiran los frascos o los tubos del instrumento para realizar otras pruebas, continúe incubándolos a +35 °C/+37 °C en una estufa bacteriológica hasta que se hayan incubado durante 24-72 horas tras el resultado positivo.

2. Entre 24-72 horas tras el resultado positivo, mezcle el frasco o el tubo en un mezclador tipo vórtex durante 5 a 10 segundos.
3. Transfiera inmediatamente de forma aséptica 3 mL de muestra al tubo de centrifugación de 5 mL. Al analizar los frascos BACT/ALERT® MP, use una aguja del calibre 18 G o superior para la aspiración de la muestra.

Nota: Una vez retirada la alícuota inicial, coloque el frasco o tubo positivo en una estufa bacteriológica a +35 °C/+37 °C para análisis adicional, si es necesario.

4. Utilice una centrífuga basculante con un adaptador de 15 mL para centrifugar el tubo de micro-centrifugación de 5 mL a 3000 g durante 10 minutos para obtener un sedimento.
5. Decante los medios en un recipiente para residuos y seque totalmente con una almohadilla absorbente con parte trasera de plástico.
6. Añada 500 μ L de etanol al 70 % a un tubo de micro-centrifugación de 5 mL y utilice una pipeta para mezclar con cuidado arriba y abajo a fin de volver a suspender el sedimento.
7. Transfiera la suspensión a un tubo que contenga bolas de vidrio.
8. Utilice un mezclador tipo vórtex con adaptador para descomponer las células durante 15 minutos o un homogeneizador tipo molino de bolas durante 5 minutos (velocidad máxima).

Nota: Al trabajar con *Mycobacterium* de BSL-3, se recomienda colocar el mezclador tipo vórtex con adaptador u homogeneizador tipo molino de bolas dentro de la cabina de seguridad biológica.

Si la descomposición mecánica se realiza fuera de la cabina de seguridad biológica, precinte la parte superior del tubo con parafilm o equivalente para evitar que se formen aerosoles o que se derrame.

9. Retire el tubo del mezclador o del homogeneizador tipo molino de bolas e incúbelo a temperatura ambiente durante 10 minutos para completar la inactivación.

IMPORTANTE: Mantenga el tubo en posición vertical.

Nota: Los siguientes pasos se pueden realizar fuera de la cabina de seguridad biológica de nivel 3.

10. Mezcle el contenido con un mezclador tipo vórtex durante 5 a 10 segundos.
11. Transfiera inmediatamente la suspensión a un tubo vacío de fondo redondo de 2 mL con una pipeta. Evite transferir las bolas de vidrio.
12. Deseche la punta de la pipeta.

Nota: Antes de los pasos de centrifugación, tome nota de la posición del sedimento esperado. Esto puede ser útil en el caso de un sedimento pequeño.

13. Centrifugue la muestra a 14 000 g durante 2 minutos para crear un sedimento.
14. aspire con cuidado y deseche todo el sobrenadante con una pipeta con cuidado de eliminar todo el líquido visible sin alterar el sedimento.

Nota: Si queda líquido que no se puede eliminar con la pipeta, la muestra se puede secar al aire para permitir la evaporación del etanol.

15. Añada 10 μ L de ácido fórmico al 70 % a un tubo de 2 mL con el fondo redondo y vuelva a suspender con cuidado el sedimento.

Nota: Si el sedimento no es visible, lave los lados del tubo con ácido fórmico al 70 % para garantizar que se vuelve a suspender.

16. Mezcle con un mezclador tipo vórtex durante 5 a 10 segundos.
17. Añada 10 μ L de acetonitrilo al 100 %.
18. Mezcle con un mezclador tipo vórtex durante 5 a 10 segundos.
19. Centrifugue la muestra a 14 000 g durante 2 minutos para crear un sedimento.

IMPORTANTE: Si está trabajando dentro de una cabina de seguridad biológica, asegúrese de sustituir la tela absorbente forrada de plástico utilizada previamente por una nueva empapada en desinfectante tuberculicida.

20. Deposite el microorganismo de control *E. coli* ATCC® 8739™ y la matriz VITEK® MS-CHCA sobre el pocillo de calibración antes de dispensar las muestras.
21. Para cada muestra, transfiera inmediatamente 1 μ L del sobrenadante del paso 19
22. sobre los pocillos designados del portaobjetos.
23. Deje que todos los pocillos se sequen por completo.

Nota: Si los pocillos no están completamente secos antes de añadir la matriz VITEK® MS-CHCA, es posible que no se consiga la cristalización óptima de las muestras y esto podría interferir con los resultados (ausencia de identificación).

24. Agregue 1 μ L de la matriz VITEK® MS-CHCA a cada pocillo del portaobjetos usando

una pipeta.

25. Deseche la punta de la pipeta.
26. Deje que todos los pocillos se sequen por completo.
27. Procese el portaobjetos VITEK® MS-DS en el instrumento.