



Preparación de *Mycobacterium* y *Nocardia* a partir de un medio sólido

1. Para cada microorganismo que se va a analizar, transfiera 500 μ L de etanol al 70 % a un tubo de micro-centrifugación de 2 mL que contenga aproximadamente 200 μ L de bolas de vidrio de 0,5 mm.
2. Para el *Mycobacterium*, utilice un asa de siembra de 1 μ L para recoger y transferir un asa llena del organismo de la prueba a un tubo y tápelo herméticamente.
Para *Nocardia*, utilice un asa de 1 μ L (contenido de un asa) o un cepillo de citología curvado (en el caso de una cepa incrustada) para recoger y transferir con cuidado el material del medio al tubo, y tápelo cerrándolo bien.
3. 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*.

4. 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.

5. Mezcle durante 5 a 10 segundos con un mezclador tipo vórtex y transfiera inmediatamente la suspensión a un tubo de fondo redondo de 2 mL con una pipeta. Evite transferir las bolas de vidrio. 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.

6. Centrifugue la muestra entre 10 000 y 14 000 g durante 2 minutos para crear un sedimento.
7. Elimine todo el sobrenadante con ayuda de una pipeta.

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.

8. Añada 10 μ L de ácido fórmico al 70 % al sedimento. Vuelva a suspender mediante aspiración/dispensación con una pipeta hasta que el sedimento se disperse uniformemente o directamente con un mezclador tipo vórtex.
9. Añada 10 μ L de acetonitrilo al 100 % y mézclelo utilizando un mezclador tipo vórtex.

10. Centrifugue entre 10 000 y 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.

11. 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 de proteínas.
12. Para cada muestra, transfiera inmediatamente 1 μ L del sobrenadante sobre el pocillo designado del portaobjetos.
13. 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 del instrumento (ausencia de identificación).

14. Agregue 1 μ L de la matriz VITEK® MS-CHCA a cada pocillo del portaobjetos usando una pipeta.
15. Deseche la punta de la pipeta.
16. Deje que todos los pocillos se sequen por completo.
17. Procese el portaobjetos VITEK® MS-DS en el instrumento.