



## Preparación de *Streptomyces*

1. Prepare reactivos frescos como se describe a continuación. Estas mezclas de disolventes deben prepararse el día de su uso. Las cantidades siguientes son suficientes para aproximadamente 1000 extracciones para ácido fórmico y 20 para etanol, por lo que la fórmula se debe reducir como corresponda.

### Para preparar ácido fórmico al 70 %:

a. Mezcle:

- 3 mL de medio de suspensión o agua desionizada estéril
- 7 mL de ácido fórmico (100 % calidad HPLC)

b. Homogeneice.

### Para preparar etanol al 70 %:

a. Mezcle:

- 3 mL de medio de suspensión o agua desionizada estéril
- 7 mL de etanol (100 % calidad HPLC)

b. Homogeneice.

Acetonitrilo (100 %): El acetonitrilo (calidad HPLC) se debe usar puro.

2. Para cada muestra que se vaya a analizar, transfiera 500  $\mu$  L de etanol al 70 % a un tubo de fondo redondo de microcentrifugación de 2 mL que contenga aproximadamente 200  $\mu$  L de bolas de vidrio de 0,5 mm.
3. Utilice un asa de 1  $\mu$  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.
4. Utilice un mezclador tipo vórtex con adaptador para descomponer las células durante 15 minutos o un homogeneizador tipo agitador de bolas durante 5 minutos (velocidad máxima).
5. Retire el tubo del mezclador o del homogeneizador tipo molino de bolas e incúbelo a temperatura ambiente durante 10 minutos para completar la inactivación. **Mantenga el tubo en posición vertical.**
6. 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.

7. Centrifugue la muestra entre 10 000 y 14 000 g durante 2 minutos para crear un sedimento.
8. 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.

9. Añada 10  $\mu$  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.
10. Añada 10  $\mu$  L de acetonitrilo al 100 % y mézclelo utilizando un mezclador tipo vórtex.
11. Centrifugue entre 10 000 y 14 000 g durante 2 minutos para crear un sedimento.
12. Deposite el microorganismo de control *E. coli* ATCC® 8739™ y la matriz VITEK® MS-CHCA sobre el pocillo de calibración antes de dispensar la preparación de la muestra.
13. Para cada microorganismo que se va a analizar, transfiera inmediatamente 1  $\mu$  L del sobrenadante sobre los pocillos designados del portaobjetos de VITEK® MS-DS.
14. 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).

15. Añada 1  $\mu$  L de matriz VITEK® MS-CHCA en cada pocillo del portaobjetos de VITEK® MS-DS utilizando una pipeta, sustituyendo la punta de la pipeta cada vez que añada matriz.
16. Deje que todos los pocillos se sequen por completo.
17. Procese el portaobjetos VITEK® MS-DS en el instrumento.