

Feb 09, 2020

MICRO-DILUCIÓN EN PLACA PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN 50 uL V.3

Germán Alberto Téllez Ramírez¹, Lily Johanna Toro¹, Juliana Franco Castrillon², Diana Carolina Henao¹, Jhon Carlos Castaño Osorio², Grupo de Inmunología Molecular GYMOL. Universidad del Quindío²

¹Centro de Investigaciones Biomédicas, ²Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quindío - Colombia

1 Works for me dx.doi.org/10.17504/protocols.io.8xmhxk6



Grupo De Inmunología Molecular GYMOL. Universidad Del Quindio
Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quind...



ABSTRACT

Este método es basado en el método clásico de micro-dilución en placa de NCLSS (National Committee of Laboratory Safety and Standards (NCLSS) como fue publicado en Amsterdam, D. 1996. Susceptibility testing of Antimicrobials in liquid media. In 'Antibiotics in Laboratory Medicine', Lorian, V., ed. Fourth Edition, pp.52-111. Williams and Wilkins, Baltimore.

Modificado con respecto a la lectura de la placa utilizando un indicador metabólico para incrementar la sensibilidad de la prueba respecto al crecimiento de las bacterias.

La realizacion de este protocolo fue posible gracias al apoyo del departamento administrativo de ciencia tecnología e innovacion, Colciencias a traves del proyecto 111356933173 convocatoria569-2012.

Este protocolo fue estandarizado con el desarrollo del proyecto de grado "OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO EN MICROVOLÚMENES" de la estudiante Juliana Franco para optar por el titulo de Biologa.

THIS PROTOCOL ACCOMPANIES THE FOLLOWING PUBLICATION

- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem. 2000 Sep; 267(17):5421-6. Technical Bulletin. CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Promega. INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS G8080, G8081 AND G8082.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. 2007. Nat Protoc. 2008;3(2):163-75. doi: 10.1038/nprot.2007.521.
-

GUIDELINES

El siguiente procedimiento consta del crecimiento de las bacterias, preparacion de la muestra, dilucion de las bacterias, incubacion lectura y analisis.

Tiempo estimado 3 días contando la descongelación de las bacterias.

La lectura se puede realizar por turbidez, Absorbancia libre o con resazurin; o fluorescencia de resorufin.

MATERIALS

NAME	CATALOG #	VENDOR
resazurin	189900050	Acros Organics
96-well microtiter plates polypropilene	650201	greiner bio-one
Mueller Hinton	02-136	scharlau

SAFETY WARNINGS

Maneje todas las normas de bioseguridad microbiológica dependiendo de la muestra y la bacteria a utilizar (cepas de referencia, aislados

clínicos, patogénicos).

BEFORE STARTING

Medio de cultivo Muller Hinton líquido (15mL por placa aprox)

Medio de cultivo Mueller Hinton Agar (1 plato por bacteria a evaluar)

Resazurin 440 µM (10X): tome 0.011g de resazurin y lleve a 100mL en agua destilada, mezcle en frasco ámbar, filtre por 0.22µm y guarde oculto de la luz 4°C. (absorbancia máxima resazurin=603nm; absorbancia máxima resorufin=570nm) (excitación 579/Emisión 584)

Antibiótico como control positivo. (Antibiótico antimicótico de cultivo celular 100X= penicilina 10000 unidades/ml streptomycin 10000unidades /mL)

Muestras péptido a evaluar para compuestos puros generalmente se trabajan desde concentraciones finales de 100 µg/mL.

Preparación de las bacterias

- 1 Tome las bacterias a evaluar del banco de células y siga el protocolo de descongelación (siembre en placas de medio selectivo e incube a 37°C por 12-24 horas)

Inocule una de las colonias de las bacterias a evaluar en tubos conicos de 15ml con de 2-5ml de caldo de cultivo Muller Hinton y lleve a 37°C en agitación a 180 rpm deje crecer por 5-8 horas aprox.

🕒 **12:00:00** incuba bacterias

🕒 **05:00:00** crecimiento inóculo

Preparación de la muestra

- 2 Diluya el péptido a una concentración 10 veces más alta con respecto a la concentración máxima a evaluar (solución stock del péptido).

Realice diluciones seriadas de la solución stock del péptido en agua estéril o medio de cultivo, según corresponda a las diluciones del péptido que se quieren evaluar.

Adicione 5 µL de cada una de las diluciones del péptido en cada uno de los pozos correspondientes (columnas 1-10).

Adicione 50 µL de medio Mueller Hinton a la columna 11 como control de medio y 45 µL a las filas D y G como control de esterilidad del compuesto.

🕒 **00:40:00** por placa

Dilución de las bacterias

- 3 Tome las bacterias crecidas en el paso 1 y diluya o deje crecer hasta alcanzar una concentración aproximada de 3-6 por 10 a la 8 UFC, lo cual corresponde a una densidad óptica (O.D) de 0,2 a 0,4 a una longitud de onda de 600 nm en celda de 1 cm ó a una O.D de 0,1 a 570 nm en 100 µL en placa de ELISA de 96 pozos.
Tome las bacterias del paso anterior y diluya 1:1000 en medio líquido Muller Hinton para llevar a una concentración de 3-5 por 10 a la 5 UFC (solución de trabajo de bacterias)

Adicione 45 µL de la solución de trabajo de bacterias a todos los pozos de la placa de microtitulación menos fila D, H y columna 11 como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1

µg/ml		250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	C-	C+
Replicas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Replica 1 de cada tratamiento	A												
Replica 2 de cada tratamiento	B												
Replica 3 de cada tratamiento	C												
Ctrl esterilidad péptidos	D												
Replica 1 de cada tratamiento	E												
Replica 2 de cada tratamiento	F												
Replica 3 de cada tratamiento	G												
Ctrl esterilidad péptidos													

Deje incubar por 12-16 horas (crítico: no más de 16 horas) a 37°C sin agitación.

🕒 **00:30:00** adicionar bacterias

🕒 **13:00:00** incubación placa

Análisis

- 4 Para leer por turbidimetria lea la absorbancia a 570nm

- 5 Para leer por Absorbancia con resazurina: adicione 5 μL de solución de resazurina a 440 μM para una concentración final de 44 μM en cada pozo

Incube por 2 horas a 37°C

Lea las placas en espectrofotómetro a 570 y 603nm

Realizar delta: por cada pozo reste la absorbancia de 570nm menos 603 nm

Delta = A570nm-A603nm

A partir del grupo de datos del delta calcula:

Blancos: calcula la mediana del grupo de blancos C- (medio de cultivo).

Blanco = Mediana (11A:11C)

Reste el blanco a los valores del delta de cada pozo

A partir del grupo de datos del delta menos el blanco calcula:

Creminiento de bacterias: calcula la mediana del grupo de crecimiento de bacterias C+.

ControlBacterias= Mediana(12A:12C)

A partir de estos valores calcula el porcentaje de crecimiento de cada pozo haciendo una relacion directa.

%Crecimiento= (X/Control de bacterias)*100

X= Valor de delta menos el blanco de cada pozo.

- 6 Para leer por Fluorescencia

Adicione resazurina a concentración final de 44 μM .

Deje incubar por 90 minutos

Lea la placa ext/emisión 579/584 (filtros ext 565/10; em 600/40)

Tome los valores de fluorescencia y calcula:

Blancos: calcula la mediana del grupo de blancos C- (medio de cultivo).

Blanco = Mediana (11A:11C)

Resta el valor del blanco a todos lo pozos.

Crecimiento de bacterias: calcula la mediana del grupo de crecimiento de bacterias C+.

ControlBacterias= Mediana(12A:12C)

A partir de estos valores calcula el porcentaje de crecimiento de cada pozo haciendo una relacion directa.

%Crecimiento= (X/Control de bacterias)*100

X= Valor fluorescencia menos el blanco

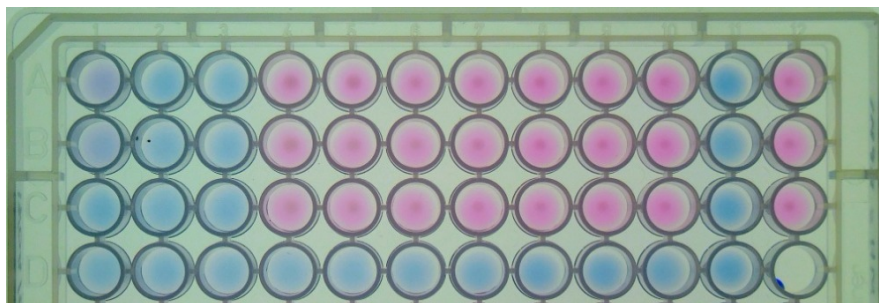


Fig 1. Microdilución en placa de 96 pozos después de 2 horas de incubación con la resazurina. Columnas 1A-1C a 10A-10C (molecula a evaluar, desde la concentración más alta (100ug/mL) hasta (0,19ug/mL). Columnas 11A-11C (control de esterilidad del medio), columnas 12A-12C (control de viabilidad bacteriana). fila D1-D12 (control de esterilidad de la molecula evaluada)



Microdilución

CBM

- 8 Para calcular la concentración bactericida mínima (C.B.M)
Tome 10 µL de hasta 3 concentraciones por triplicado sin crecimiento viable y siembre en platos de agar mueller Hinton.
Incube por 18 a 24 h a 37°C y cuente las colonias
La C.B.M es considerada como la concentración más baja que previene la formación de colonias residuales (fig 2)

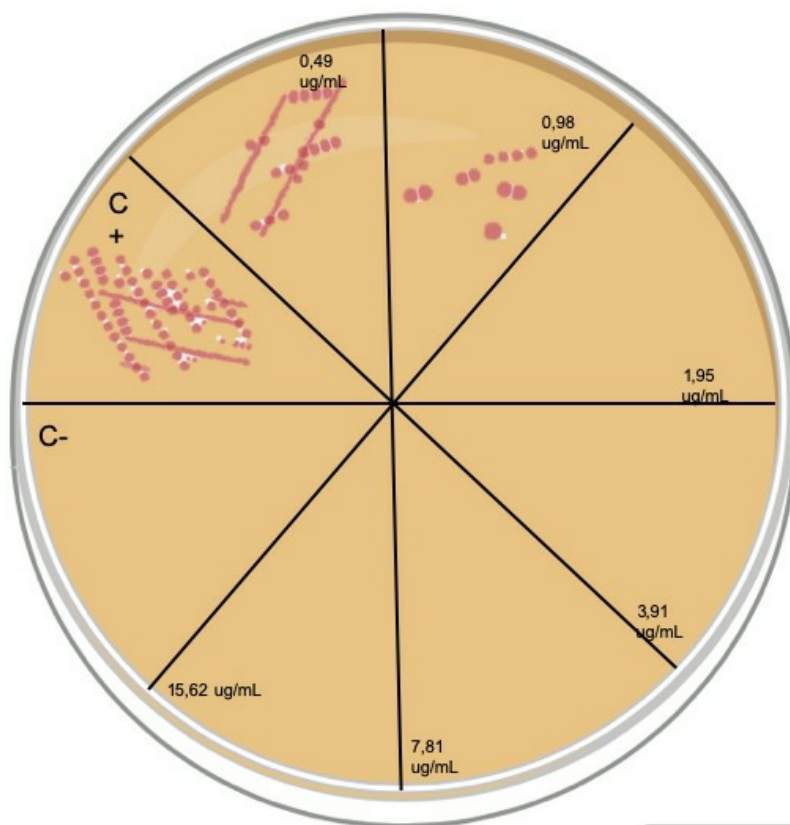


Figura 2. Caja de petri con agar Muller Hinton, en donde la concentración bactericina mínima (CMB) es 1,95 ug/mL.



This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited