

PROTOCOLO PARA DETERMINAR RESISTENCIA A ANTIBACTERIANOS

P. Olmos y J. Campanini-Salinas

ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

METODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO DE CULTIVO

I. MATERIALES

Equipos

1. Incubador
2. Cámara de bioseguridad
3. Balanza analítica
4. Vórtex
5. Micropipeta p1000, p200, p10
6. Micropipeta multicanal p200 (8 canales)

Materiales

1. Microplacas de 96 pocillos con fondo redondo
2. Guantes desechables
3. Gradillas para tubos
4. Tómulas estériles
5. Puntas con filtro de 1000 μ L, 200 μ L y 10 μ L
6. Vaso precipitado para desechos
7. Lápiz marcador indeleble
8. Parafilm
9. Tubos de vidrio
10. Tubos plásticos de 1,5 o 2 mL
11. Tubos centrifuga de 15 mL
12. Asa de plástico 1 μ L

Reactivos

1. Medio de cultivo Mueller Hinton
2. Antibiótico a ensayar (Gentamicina, Ciprofloxacino, Amoxicilina)
3. Agua Destilada Estéril
4. Alcohol 70°

PROTOCOLO PARA DETERMINAR RESISTENCIA A ANTIBACTERIANOS

P. Olmos y J. Campanini-Salinas

II. PROCEDIMIENTO

1. Preparar las soluciones de antibacterianos a ensayar, para eso se debe determinar la primera concentración a ensayar. Esta concentración debe estar basada en los puntos de corte indicados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para la cepa a ensayar.
2. Determinada la concentración inicial, se debe masar el antibacteriano, y calcular el volumen a diluir. **IMPORTANTE:** CONSIDERAR LA POTENCIA DEL ANTIBACTERIANO.
3. Cargar todo los pocillos de las microplacas a ensayar con 100 uL de caldo de cultivo Mueller Hinton.
4. Cargar la primera columna de la microplaca con 100 uL del antibacteriano a ensayar (preparado en el punto 2).
5. Tomar con la micropipeta multicanal (8) 100 uL de la primera columna y llevarlos a la segunda columna homogenizando. Este paso se repite hasta la columna 10 aquí se toman 100 uL y se descartan (la columna 10 será la última concentración a ensayar).
6. Una vez preparadas todas las diluciones en la microplaca de 96 pocillos se procede a preparar una suspensión de la cepa a ensayar.
7. Preparar una solución que tenga una turbidez de 0.5 unidades en la escala McFarland. Para esto, mediante asa estéril, se seleccionan algunas colonias desde un cultivo puro de la cepa a ensayar y se traspasan a un tubo de vidrio cargado con agua estéril, luego agitar en un vortex, ahora con ayuda de un patrón de 0.5 McFarland comparamos visualmente la turbidez que esperamos.
8. Desde la suspensión de bacterias obtenida, se deben cargar 10 uL de esta en todos los pocillos, excepto en la columna 12 (que será utilizada como control negativo). La columna 11, que no contiene antimicrobiano será utilizada como control positivo.
9. Las microplacas inoculadas se incuban a 35°C por 18 a 24 horas.
10. Se leen los resultados identificando la mínima concentración inhibitoria.