

PROCOLO REMA (Resazurin Microtiter Assay)

Staphylococcus aureus

PREPARACIÓN DEL INOCULO

Después del crecimiento bacteriano en medio sólido específico, realizar una suspensión en solución fisiológica (4 a 5 colonias) comparada a la escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

De la escala 0,5 de MacFarland, realizar una dilución de 1:100 en medio líquido de BHI (Brain Heart Infusion) - ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL).

PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Drogas Padrones

Pesar y calcular a través de la fórmula especificada por el Manual del NCCLS su potencia, donde la solución madre será de 10.000 µg/mL.

$$\text{Volumen} = \frac{\text{Peso Real} \text{ (Potencia)}}{\text{Concentración Deseada}}$$

(Concentración Deseada)

Compuestos

Pesar y diluir los compuestos en solvente específico (DMSO, H₂O...) hasta alcanzar la concentración madre de 10.000 µg/mL.

PREPARACIÓN DEL ENSAYO

1° Paso – En las columnas 1 y 12 de una microplaca estéril de 96 orificios depositar 200 µL de agua destilada estéril, para evitar la deshidratación del medio de cultura en el ensayo durante la incubación en la estufa.

2° Paso – Depositar 100 µL del medio de cultura en todos los pozos de la placa (menos en las columnas que contienen agua).

Depositar 50 µL del medio de cultura en la fila A en las columnas de 2 a 10, con la finalidad de controlar la contaminación del compuesto analizado.

Depositar 100 µL del medio de cultura en la columna 11 de E a H con la finalidad de controlar la esterilidad (C -) del medio de cultura.

3° Paso – Depositar 100 µL del compuesto en la concentración inicial predeterminada* en la fila B de cada columna y 50 µL en la fileira A de cada columna.

4° Paso - Realizar diluciones seriadas de estos compuestos en la propia microplaca, a partir de la fila B siguiendo hasta la fila H y despreciando los 100 µL finales de la última dilución de manera a obtener concentraciones variables de los compuestos de: 2500; 1250; 625; 312,5; 156,3; 78,13 y 31µg/mL.

5° Paso – Depositar 100 µL del Inoculo pre preparado en todos los orificios con excepciones para: Columnas 1 y 12; fila A de 2 a 10 y columna 11 de E a H. No olvidar de depositar en el C+.

6° Paso - Sellar la microplaca con parafilm e incubar a 37°C por 24 horas.

7° Paso- Después de la incubación, adicionar 30 µL de la resazurina 0.01% diluida en agua estéril e incubar a 37°C por 6 horas, después, realizar la lectura visual.

Interpretación de los resultados

La MIC fue definida como la menor concentración del compuesto capaz de inhibir la multiplicación de 90% de las células de *BACTERIA*

Exemplo:

