

Procedurę walidowano dla dwóch przedstawicieli bakterii Gramm-ujemnych:

1. *Escherichia coli* ATTC 25922
2. *Salmonella enterica ser. Typhimurium* ATTC 14028

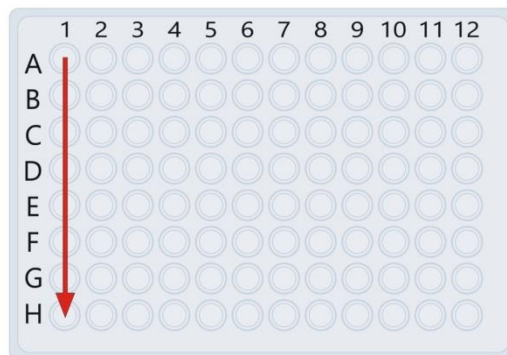
Metoda oparta jest na seryjnym mikrorozcieńczaniu związków chemicznych o znanym stężeniu w podłożu Muller-Hinton i wyznaczeniu minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii Gramm-ujemnych (MIC90/MIC50).

Na płytce 96-dołkowej z rozpipetowanym podłożem Mueller-Hinton (100µl) wykonywany jest szereg rozcieńczeń badanych związków w postępie geometrycznym. Następnie, do tak przygotowanych szeregów, nanoszona jest zawiesina bakteryjna (100µl) o określonej stałej McFarlanda - 0,5. Po inkubacji płytki w temperaturze 37°C (18 godzin), do każdej studzienki dodawana jest resazuryrna (20µl). Po kolejnej inkubacji (24 godziny, 37°C) wykonywany jest odczyt absorbancji przy określonej długości fali.

Opisana wyżej procedura została w pełni zautomatyzowana i może być wykonywana w kilku wariantach. Przebieg procedury opisany jest poniżej:

Procedura wariant I (analiza 3 związków badanych dla 1 szczepu):

Opisana poniżej procedura zakłada pipetowanie płytki 96 kolumnami:



Z probówki typu falcon (50 ml) rozpipetować na płytkę 96 dołkową po 100 µl podłoża wzrostowego do kolumn od B1-H1 do B9-H9 oraz do kolumny A12-H12.

Z probówek typu eppendorf (1,5 ml) dodać po 200 µl badanych związków chemicznych: do dołków A1-A3 (I związek), A4- A6 (II związek), A7-A9 (III związek).

Dodatkowo do dołków B12, C12, D12 dodajemy po 100 µl badanych związków (I, II, III związek odpowiednio do B12, C12, D12 jako kontrola czystości)

Seryjne rozcieńczenia w kolumnach A1-H1 do A3-H3 (związek I):

Z dołków A1-A3 przenieść po 100 µl związku odpowiednio do dołków B1-B3, wymieszać przez trzykrotne wciąganie i wypuszczanie płynu, zmienić typy, pobrać 100 µl płynu z dołków B1-B3 i przenieść odpowiednio do dołków C1-C3, znowu wymieszać przez trzykrotne wciąganie i

wypuszczanie płynu, zmienić tip i powtarzać procedurę seryjnych rozcieńczeń aż do dołków H1-H3, gdzie po wymieszaniu usunąć 100 µl płynu.

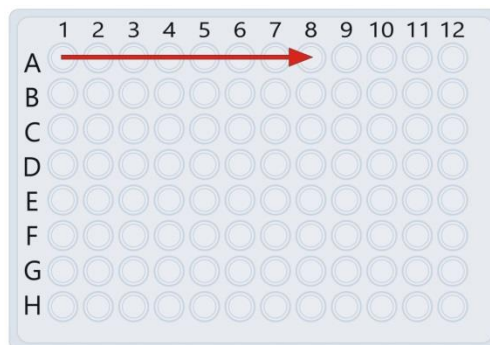
Procedurę seryjnych rozcieńczeń powtarzamy dla kolumn A4-H4 do A6-H6 (II związek) oraz A7-H7 do A9-H9 (III związek).

Do każdej z kolumn od A1-H1 do A9-H9 oraz do dołka H12 dodajemy po 100 µl zawiesiny bakteryjnej o odpowiedniej stałej McFarlanda - 0,5.

Płytkę umieszczamy w inkubatorze z wytrząsaniem (37°C) na 18 h. Następnie płytkę wyjmujemy z inkubatora i do każdego dołka, do kolumn od A1-H1 do A9-H9 oraz do dołków A12, B12, C12, D12, H12 dodajemy po 20 µl resazuryny. Płytkę umieszczamy w inkubatorze z wytrząsaniem i po 24 godzinach wykonujemy odczyt absorbancji przy określonej długości fali.

Procedura wariant II (analiza 7 związków badanych dla 1 szczepu):

Opisana poniżej procedura zakłada pipetowanie płytki 96 rzędami:



Z próbki typu falcon (50 ml) rozpipetować po 100 µl podłoża wzrostowego do dołków w rzędach płytki 96 dołkowej od A2-A12 do H2-H12, ponadto do studzienki H2 dodać dodatkowe 100 µl (kontrola testu).

Z próbki typu eppendorf (1,5 ml) dodać po 200 µl badanego związku chemicznego do dołka A1 (I związek), B1 (II zw.), C1 (III zw.) ...aż do G1 (VII zw.).

Dodatkowo do dołków H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9 dodajemy po 100 µl badanych związków (I, II, III - VII związek odpowiednio A1, B1, C1, ...G1)

Z dołka A1 przenieść 100 µl związku do dołka A2, wymieszać przez trzykrotne wciąganie i wypuszczanie płynu, zmienić tip, pobrać 100 µl płynu z dołka A2 i przenieść do dołka A3, znowu wymieszać przez trzykrotne wciąganie i wypuszczanie płynu, zmienić tip i powtarzać procedurę aż do dołka A12, po wymieszaniu usunąć 100 µl.

Procedurę powtarzamy dla rzędu B-G.

Do każdego dołka w rzędach A1-12, B1-12 do G1-12 oraz do dołka H12 dodajemy po 100 µl zawiesiny bakteryjnej – stała McFarlanda 0,5.

Płytkę umieszczamy w inkubatorze z wytrząsaniem (37°C) na 18 h. Następnie płytkę wyjmujemy z inkubatora i do każdego dołka z wyjątkiem H1 dodajemy po 20 µl resazuryny. Płytkę umieszczamy w inkubatorze z wytrząsaniem i po 24 godzinach wykonujemy odczyt absorbancji przy określonej długości fali.

Procedura wariant III:

Badane związki chemiczne, które poddawane będą analizie, znajdować się będą na analogicznej płytce 96 dołkowej, tak więc nanoszenie ich odbywa się na zasadzie 1 do 1 czyli A1 do A1, B2 do B2 itd... za wyjątkiem dołków G12 i H12, które są kontrolami testu.

Z probówki typu falcon (50 ml) rozpipetować po 100 µl podłoża wzrostowego do wszystkich dołków 96 dołkowej płytki.

Z płytki 96 dołkowej zawierającej bibliotekę związków chemicznych przenieść odpowiednio po 5 µl badanych związków do całej płytki z wyjątkiem dołków G12 i H12.

Do każdego dołka dodajemy po 100 µl zawiesiny bakteryjnej z wyjątkiem H12

Płytkę umieszczamy w inkubatorze z wytrząsaniem (37°C przez 18 h). Następnie płytkę wyjmujemy z inkubatora i do każdego dołka dodajemy po 20 µl resazuryny. Płytkę umieszczamy w inkubatorze z wytrząsaniem i po 24 godzinach wykonujemy odczyt absorbancji przy określonej długości fali.