

**DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD
BACTERIANA A ANTIBIOTICOS POR EL METODO DE
DIFUSION EN AGAR**

1. Material:

Cepas bacterianas: *Escherichia coli* sensibles (IC204) y resistentes (IC188) a ampicilina, criopreservadas en stock a -80°C
Solución de Ampicilina (10 mg/mL en H₂O estéril) y diluciones de la misma
Discos de papel de filtro para antibiograma
Medios de cultivo: Luria Broth (LB) y Luria Agar (LA)
Placas de Petri de plástico de 12 cm vertidas con agar LA
Agar blando
Tampón PBS estéril
Tubos de cristal estériles
Estufa de cultivo a 37°C

2. Procedimiento:

1. Iniciar un cultivo de día inoculando 100 μL de suspensión bacteriana stock en 5 mL de medio LB.
2. Incubar 2 horas a 37°C .
3. Fundir el agar blando en el horno de microondas.
4. Mantener el agar fundido a 45°C hasta su utilización.
5. Mezclar 100 μL de cultivo de día con 3 mL de agar blando.
6. Esparcir la mezcla en dos placas de LA por cepa y dejar que solidifique.
7. Preparar los discos de ampicilina añadiendo 10 μL de las correspondientes diluciones de la solución madre.
8. Disponer los discos en las placas sembradas.
9. Incubar en estufa 12 horas a 37°C .
10. Medir el diámetro de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

**DETERMINACION POR CITOMETRIA DE FLUJO DE LA
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DE
ANTIBIOTICOS**

1. Material:

Cepas bacterianas: *Escherichia coli* sensibles (IC204) y resistentes (IC188) a ampicilina, criopreservadas en stock a -80°C

Antibióticos: Ampicilina (1 mg/mL en H₂O estéril)

Medios de cultivo: Luria Broth (LB)

Fluorocromos: Yoduro de Propidio (1 mg/mL en H₂O estéril)

Tampón PBS estéril

Tubos de polipropileno de 12x75 mm

Citómetro de flujo EPICS XL

2. Procedimiento:

1. Iniciar un cultivo de noche inoculando 100 μL de suspensión bacteriana stock en 5 mL de medio LB.
2. Incubar 12 horas a 37°C .
3. Iniciar un cultivo en fase exponencial inoculando 100 μL de cultivo de noche en 5 mL de medio LB.
4. Incubar a 37°C hasta obtener una D.O.600 aproximada de 0.3.
5. Alicuotar el cultivo en fracciones de 500 μL .
6. Añadir ampicilina para un intervalo de concentraciones finales de 5-40 $\mu\text{g/mL}$.
7. Incubar 1 hora a 37°C .
8. Centrifugar 5 minutos a 4.000 rpm.
9. Resuspender en 500 μL de tampón PBS.
10. Añadir 5 μL de solución de yoduro de propidio.
11. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Analizar en el citómetro de flujo, siguiendo el protocolo indicado.