



**Mise en oeuvre
du BioFilm Ring Test®**



BFC-NOT-002 Version 3

TECHNOLOGIE

La technologie BioFilm Ring Test®, base des applications Antibiofilmogramme®, Enzyme Ring Test®, Affinity Ring Test®, s'appuie sur la mesure du déplacement de microbilles superparamagnétiques dans un puits de microplaque sous l'action d'un champ magnétique généré par un aimant placé sous le centre du puits.

L'atténuation, totale ou partielle, du mouvement de ces microbilles est le reflet d'un phénomène correspondant à la formation d'un biofilm bactérien ayant piégé les microbilles lors de sa formation, modification de viscosité du milieu, complexes macromoléculaires ou cellulaires constituant des obstacles ...

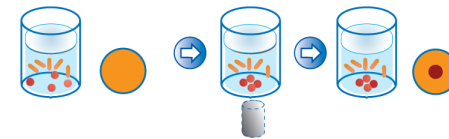


Fig.1: Pas de biofilm → les particules sont mobiles = Spot



Fig.2: Biofilm en développement → diminution du nombre de particules mobiles = Anneau

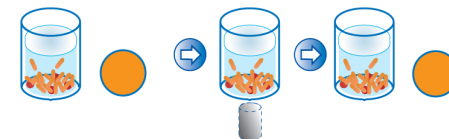


Fig.3: Biofilm couvrant toute la surface du puits → particules immobilisées = Absence de Spot

MISE EN ŒUVRE DU BIOFILM RING TEST®

1-MATERIEL NECESSAIRE

- Kit BioFilm Ring Test® (5 microplaques, 1,2 mL TONER 4 ou 6, 3 flacons 60 mL BioFilMedium Brain Heart Infusion (BHI), 60 mL Liquide de Contraste (LIC)).
- Boîtes de Pétri contenant du BHI agar
- Oese
- Tube stérile ≥2mL pour la préparation de la Suspension Mère Standard (SMS)
- Cuves de spectrophotomètre (plastique jetable, 1 ou 2mL)
- Spectrophotomètre 600nm
- Tube ou pot stérile de volume suffisant pour préparer la Suspension Bactérienne Initiale (SBI) (20mL pour une microplaque)

Il est fortement conseillé de manipuler sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM)

2-PROTOCOLE

- Repiquer les souches à tester sur boîte de Pétri en BHI, et incubé à température optimale de croissance.

A. PREPARATION DE LA PRE-CULTURE

Il est conseillé de repiquer une seconde fois la souche afin de bien l'adapter au milieu BHI.

- A partir de chaque boîte de Pétri, réaliser un repiquage et incubé à température optimale de croissance pendant 24h (pour la majorité des souches).

ATTENTION : L'utilisation d'un autre BHI que celui fourni dans le kit peut conduire à des résultats différents.

B. PREPARATION DE LA CULTURE ET LANCEMENT DU BIOFILM RING TEST®

- Après 24h d'incubation, prélever au moins 6 colonies à l'aide d'une oese et les resuspendre dans 2mL de BHI dans un tube stérile : ceci constitue la Suspension Mère Standard (SMS).
- Lire la DO initiale (DOI) à 600nm et calculer le volume de SMS à diluer pour préparer la Suspension Bactérienne Initiale (SBI, ramenée à l'équivalent d'une DO standard 1/250 à 600nm).
- Préparer un volume suffisant de BiofilMedium BHI (du kit ; à raison de 200µL par puits) contenant le TONER à raison de 1% (v/v). Par exemple pour 16 puits => 40µL dans 4mL, ou pour 96 puits =>200µL dans 20mL;
- Réaliser les dilutions avec la solution de BHI+Toner, utiliser le volume restant pour les puits témoins

Calcul du volume SMS à ajouter pour 4 mL SBI final:

$4 \times [(1/ DOI) / 250] * 1000$ soit ___ µL dans 4mL de BHI+Toner

Calcul du volume SMS à ajouter pour 20 mL SBI final:

$20 \times [(1/ DO_{600} \text{ initiale})/250] * 1000$ soit ___µL dans 20mL de BHI+Toner

- Ensemencer les microplaques à raison de 200µL de SBI par puits.

- Incuber le temps désiré (pour une souche bactérienne de comportement biofilm inconnu, il est conseillé d'établir une cinétique de formation de biofilm, sur des microplaques différentes, sur des temps de l'ordre de 2 ; 4 ; 6 ; 8h).
- NOTE : pour des levures (type Candida sp.), partir d'une SBI ramenée à l'équivalent d'une DO standard 1/50 à 600nm. Une incubation de 6h, en bouillon glucosé, est recommandée.

C. INCUBATION ET LECTURE

Au(x) temps défini(s) pour la lecture, sortir la microplaque de l'étuve. Ajouter doucement 120µL de Liquide de Contraste à la surface de chaque puits (pour ne pas perturber la culture bactérienne).

- Vérifier que le logiciel BFCE3 soit lancé et que le scanner soit prêt (lumière verte en façade).
- Poser la microplaque sur le Bloc porte aimants (Bloc Test) pendant 1 min.
- Procéder à l'acquisition de l'image avec le logiciel (voir manuel BFCE3).

Nous contacter...

BIOFILM CONTROL SAS

Rue Emile Duclaux
Biopôle Clermont Limagne
63360 SAINT BEAUZIRE

Tél: 04 73 33 39 80

Mail: contact@biofilmcontrol.com

Website: www.biofilmcontrol.com