

# Raport

Privind metodele clasice perfecționate și pregătite pentru screening: macrodiluție, microdiluție, difuziune în jurul discurilor,

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

## Colectiv de redacție:

Coordonator: Cristina T. Romeo

Membri: Emil Tîrziu, Muselin Florin, Cristina Dumitrescu, Iancu Ionica, Degi Ianos, Emeric-IoanToth și Ioan Hutu.

Data finalizării: 30 iunie 2018.

## Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Research Laboratory Complex "Horia Cernescu"* - financed by project *"A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance"*, in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

## Contents

1. Introducere .....	4
2. Determinarea sensibilității la unele substanțe antimicrobiene a speciilor <i>Escherichia coli</i> și <i>Staphylococcus aureus</i> prin metoda macrodiluțiilor .....	6
1.1. Metoda macrodiluției în tub .....	6
1.1.1. Pregătirea și depozitarea agenților antimicrobieni diluanți .....	6
1.1.2. Prepararea inoculului și inocularea .....	7
1.2. Metoda microdiluției în bulion .....	8
1.1.3. Pregătirea și stocarea agenților antimicrobieni diluanți .....	8
1.1.4. Prepararea inoculului și inocularea .....	9
1.1.5. Numărul de colonii al suspensiei de inocul.....	9
1.1.6. Incubarea .....	10
1.3. Determinarea sensibilității la unele substanțe antimicrobiene a speciilor <i>escherichia coli</i> și <i>staphylococcus aureus</i> prin metoda microdiluțiilor .....	10
1.4. Prepararea inoculului pentru testele de diluție .....	11
1.1.7. Standardul de turbiditate pentru prepararea inoculului.....	11
1.1.8. Standardizarea inoculului bacterian pentru testele de diluție .....	12
1.1.9. Bulionul de inoculare .....	12
1.1.10. Incubarea .....	12
1.1.11. Interpretarea rezultatelor .....	12
1.5. Determinarea sensibilității la unele substanțe antimicrobiene a speciilor <i>Escherichia coli</i> și <i>Staphylococcus aureus</i> prin metoda difuzimetrică.....	13
1.1.12. Principiul metodei.....	14
1.1.13. Materiale necesare .....	15
1.1.14. Selectarea substanțelor antimicrobiene.....	16
1.1.15. Microcomprimate utilizate în testarea sensibilității tulpinilor bacteriene prin metoda difuzimetrică.....	17
1.1.16. Agarul Mueller-Hinton .....	18
1.1.17. Scala McFarland .....	18
1.1.18. Tulpinile bacteriene martor.....	19
1.1.19. Modul de lucru .....	20
1.1.20. Prepararea inoculului .....	24

1.1.21. Inocularea plăcilor .....	24
1.1.22. Aplicarea microcomprimatelor .....	25
1.6. Determinarea sensibilității la unele substanțe antimicrobiene a speciilor <i>Escherichia coli</i> și <i>Staphylococcus aureus</i> cu ajutorul echipamentului Vitek 2 (Biomérieux, Franța) .....	28
1.1.23. Tupini bacteriene utilizate .....	28
1.1.24. Substanțe antimicrobiene utilizate.....	28
1.1.25. Pregătirea probelor .....	29
1.1.26. Inocularea .....	30
1.1.27. Sigilarea cardurilor .....	31
1.1.28. Medii utilizate în testare.....	32
1.1.29. Prepararea agenților antimicrobieni .....	33
1.1.30. Prepararea inoculului .....	35

## 1. Introducere

Rezistența microorganismelor patogene la acțiunea antibioticelor a devenit o problemă la nivel mondial, atât în medicina umană cât și în medicina veterinară având consecințe grave asupra tratamentului bolilor infecțioase.

Utilizarea abuzivă a antibioticelor, în medicina umană sau veterinară, precum și în agricultură, contribuie la apariția acestui fenomen, ducând în timp la creșterea alarmantă a numărului de bacterii rezistente la antibiotice ce provoacă fie infecții comunitare, fie nosocomiale [Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Rizvi S.M.D., Kamal M.A., 2015- *Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment*, Saudi Journal of Biological Sciences, 22,90-101].

De asemenea, rezistența multiplă la substanțele antimicrobiene, în cadrul serotipurilor de *E. coli*, poate prezenta variații între diferite zone geografice dependent de modul de utilizare a substanțelor antimicrobiene în procesul de creștere a animalelor [Fonseca, L.E., Mykytczuk, L.O., Asensi, D.M., Reis, F.M.E., Ferraz, R.L., Paula, L.F., Ng, L.K., Rodrigues, P.D. (2006) - Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil, *Journal of Clinical Microbiology*, 2767-2772. Mueen Aslam, M., Sylvia Checkley, Avery, B., Chalmers, G., Valerie Bohaychuk, Gensler, G., Reid-Smith, R., Boerlin, P. (2012) - Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Food Microbiology*, 32(1), 110-117.].

Un interes deosebit se acordă infecțiilor determinate de germeni cu o rezistență multiplă la acțiunea antibioticelor, dintre aceștia literatura de specialitate menționând speciile de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* metilino-rezistenți, *Streptococcus pneumoniae* penicilino-rezistent și *Enterococcus faecalis* vancomicino-rezistent [Alekhun, M.N., Levy, S.B., 2007- *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*, *Cell* 128, 1037-1050].

Date recente confirmă că tulpinile bacteriene, aparținând familiei *Enterobacteriaceae*, sunt microorganisme sensibile la antibiotice (cloramfenicol, tetraciline, neomicină, gentamicină, amoxicilină, colimicină, cefalosporine) și chimioterapice (nitrofuran, sulfametazină, fluoroquinolonă). De menționat însă, că utilizarea incorectă a acestora creează cu ușurință tulpini cu rezistență multiplă [Ivana, Simona, Bogdan, A.T., Țogoe, I., Câmpeanu, Gh., Enache, T., Băraităreanu, S., Ipate Iudith, Popescu, A. (2011) -

Microbiologia alimentelor, vol. II, Patogeni alimentary, Editura Asclepius, București. **Moga-Mânzat, R. (2001)** - Boli infecțioase ale animalelor – bacterioze. Ed. Brumar, Timișoara.].

Ulterior, tulpinile rezistente, pot fi transferate de la animale la om prin intermediul consumului de carne și preparate din carne și pot provoca infecții mai severe decât tulpinile sensibile datorită prezenței factorilor de virulență pe aceleași elemente genetice mobile [Verma, J.K., Greene, K.D., Ovitt, J., Barrett, T.J., Medalla, F., Angulo, F.J. (2005) - Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks, 1984–2002, Emerging Infectious Diseases, 11, 943-946.; Weill, F.X., Guesnier, F., Guibert, V., Timinouni, M., Demartin, M., Polomack, L., Grimont, P.A.D. (2006) - Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 - 2003), J. Clin. Microbiol., 44, 700 - 708].

Importanța testării sensibilității antimicrobiene, rezidă din faptul că aceste determinări trebuie făcute cu respectarea condițiilor de acuratețe și rigurozitate, de către laboratoare specializate, capabile să furnizeze rezultate corecte și reproductibile, ceea ce nu este posibil decât dacă aceste laboratoare sunt integrate într-un sistem de asigurare a calității.

Pentru testarea sensibilității antimicrobiene a tulpinilor bacteriene, aparținând celor două genuri (*Escherichia* și *Staphylococcus*), *in vitro*, metodele clasice folosite includ tehnica difuzimetrică și benzile cu gradient de antibiotic, macrodiluția și microdiluția, precum și, dintre metodele moderne determinarea sensibilității cu ajutorul echipamentului **Vitek 2** (BioMérieux, Franța).

Premergător efectuării determinărilor pentru testarea antibioretistenței tulpinilor bacteriene luate în studiu este necesară identificarea și clasificarea microorganismelor, un proces complex, care se poate realiza prin două categorii de metode:

- metode clasice, care presupun utilizarea cheilor taxonomice de identificare a germenilor, se găsesc prezentate în manuale de specialitate cum sunt *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pentru bacterii, și determinatoarele lui *Lodder*, 1974, *Kreger van Rij*, 1984 sau *Barnett*, 1990, pentru fungi;

- metode moderne, care utilizează sisteme multitest de identificarea diferitelor grupe de microorganisme, metode care au la bază cheile biochimice de identificare.

Cele mai utilizate sisteme multitest de identificare rapidă sunt: sistemul Enterotube II pentru enterobacterii, sistemul Oxi/Ferm Tube pentru bacteriile Gram-negative și oxidazo-pozitive, sistemul API pentru bacterii, fungi și stafilococi - API 20E, API 20C, API Staph-Ident System.

Comparativ cu metodele clasice, utilizarea sistemelor multitest de identificare prezintă o serie de avantaje, dintre care amintim:

- obținerea rezultatelor într-un timp foarte scurt, în unele cazuri chiar într-un interval de cinci ore;
- uniformitatea rezultatelor;
- precizia/siguranța rezultatelor;
- simplitatea tehnicilor de lucru;
- un consum minim de materiale și medii de cultură.

## 2. Determinarea sensibilității la unele substanțe antimicrobiene a speciilor *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* prin metoda macrodiluțiilor

Această metodă înlocuiește metoda diluțiilor în agar și se folosește la testarea clostridiilor cu creștere invazivă. Principiul metodei se bazează pe următoarele etape:

Se diluează antibioticele în volume de 2,5 ml bulion *Brucella* suplimentat cu 1μg vitamina KI/ml, 5 μg hemina/ ml și 1 mg NaHCO<sub>3</sub>/ml. Diluțiile se utilizează în interval de trei ore de la preparare, dar pot fi conservate la -70°C, în tuburi închise ermetic, timp de șase luni.

Se diluează 1:200, în bulion de testare, inoculul etalonat la densitatea standardului 0,5 McFarland și se însămânțează câte 2,5 ml /tub. Se asigură astfel un inocul final de aproximativ 2,5X10<sup>5</sup> UFC/ml.

### 1.1. Metoda macrodiluției în tub

#### 1.1.1. Pregătirea și depozitarea agenților antimicrobieni diluanți

Pentru efectuarea testului se folosesc tuburi sterile de 13 × 100 mm. Dacă tuburile se vor reutiliza trebuie să ne asigurăm că ele se pot congela.

Se închid tuburile cu capace cu șuruburi late, capace de plastic sau cu închidere metalică sau dopuri din bumbac. Se utilizează un tub de control al creșterii, care conține bulion, fără agent antimicrobian, pentru fiecare organism testat.

Se prepară volumetric diluțiile finale duble ale agentului antimicrobian în bulion conform care oferă o procedură convenabilă și fiabilă pentru prepararea diluțiilor. Pentru test este necesar un volum final minim de 1 ml din fiecare diluție.

Se utilizează o pipetă pentru măsurarea diluanților și apoi se adaugă soluția antimicrobiană stoc la primul tub. Pentru fiecare etapă de diluare ulterioară, utilizați o nouă pipetă. Deoarece există o diluție de 1:2 a medicamentelor, atunci când se adaugă volumul final de inocul, diluțiile antimicrobiene sunt adesea preparate la dublu, pentru a ajunge la concentrația finală dorită.

Folosiți tuburile în ziua preparării sau plasați-le imediat într-un congelator la  $\leq -20^{\circ}$  C (de preferință la  $\leq -60^{\circ}$  C) până când este necesar. Deși agenții antimicrobieni din tuburile înghețate rămân de obicei stabili pentru de câteva luni, anumiți agenți (de exemplu, acidul clavulanic și imipenemul) sunt mai labile decât altele și ar trebui depozitat la  $\leq -60^{\circ}$  C. Nu depozitați tuburile într-un congelator cu auto-dezgheț. Soluțiile antimicrobiene dezghețate nu trebuie refăcute; ciclurile repetate de îngheț-dezghețare accelerează degradarea unor agenți antimicrobieni, în special beta-lactamici.

### 1.1.2. Prepararea inoculului și inocularea

1. Pregătiți un inocul standard utilizând fie suspensia directă a coloniilor, fie metoda de creștere clasică.

2. În mod optim, în 15 minute de la preparare, se diluează suspensia de inoculat ajustată în bulion după aceea inoculare, fiecare tub conține aproximativ  $5 \times 10^5$  UFC / ml. Acest lucru poate fi realizat prin diluarea suspensiei 0,5 McFarland 1: 150, rezultând un tub conținând aproximativ  $1 \times 10^6$  UFC / ml.

Următoarea diluție 1: 2 din etapa 3 aduce inoculul final la  $5 \times 10^5$  UFC / ml.

În 15 minute după ce inoculul a fost standardizat așa cum este descris mai sus, adăugați 1 ml din la fiecare tub conținând 1 ml de agent antimicrobian în seria de diluție (și a tubului de control pozitiv conținând numai bulion) și se amestecă. Aceasta are ca rezultat o diluție de 1: 2 din fiecare concentrația antimicrobiană și o diluție 1: 2 a inoculului. Este recomandabil să se facă o puritate, verificarea suspensiei de inoculare prin subcultură a unei părți alicote pe o placă agar neselectivă pentru incubarea simultană.

## 1.2. Metoda microdiluției în bulion

Această metodă se numește "microdiluție" deoarece implică utilizarea unor volume mici de bulion distribuite plăci sterile de microdiluție din plastic care au godeuri cu fundul rotund sau conice. Fiecare godeu ar trebui să conțină 0,1 ml de bulion.

### 1.1.3. Pregătirea și stocarea agenților antimicrobieni diluanți

1. Pentru a pregăti plăcile de microdiluție, se fac diluții intermediare duble volumetrice ale agentului antimicrobian, în bulion sau apă sterilă. Pentru soluțiile antimicrobiene intermediare ( $10 \times$ ), se diluează soluția concentrată din stocul antimicrobian, sau prin diluții seriate duble. Utilizați o pipetă pentru măsurarea tuturor diluanților și apoi adăugați soluția antimicrobiană stocată la primul tub. Pentru fiecare etapă de diluare ulterioară, utilizați o nouă pipetă.

Distribuiți soluțiile antimicrobiene / bulion în plăcile de microdiluție din plastic.

2. Schema de diluare

3. Metoda cea mai convenabilă de preparare a plăcilor de microdiluție este utilizarea unui dispozitiv de distribuire a diluțiilor antimicrobiene efectuate în cel puțin 10 ml de bulion. Dispozitivul de distribuție furnizează apoi 0.1 ( $\pm 0,02$ ) ml în fiecare dintre cele 96 de godeuri ale unei plăci standard.

4. Dacă inoculul este adăugat prin pipetare așa cum este descris în secțiunea de preparare a soluției antimicrobiene la concentrația dublă se umplu godeurile cu 0,05 ml în loc de 0,1 ml.

Fiecare placă trebuie să includă un godeu de control al creșterii și un godeu de sterilitate (neinoculat).

5. Etanșați plăcile în pungi de plastic și plasați imediat într-un congelator la  $\leq -20^\circ \text{C}$  (de preferință la  $\leq -60^\circ \text{C}$ ) până când este necesar. Deși agenții antimicrobieni din plăcile înghețate rămân, de obicei, stabili pentru de câteva luni, anumiți agenți (de exemplu, acidul clavulanic, imipenemul) sunt mai labili decât ceilalți și ar trebui să se depoziteze la  $\leq -60^\circ \text{C}$ . Nu depozitați plăcile într-un congelator cu auto-dezgheț. Soluțiile antimicrobiene dezghețate nu trebuie refăcute; ciclurile repetate de îngheț-dezgheț accelerează degradarea unor agenți antimicrobieni, în special beta-lactamici.

#### **1.1.4. Prepararea inoculului și inocularea**

1. Pregătiți un inocul standard utilizând fie suspensia directă a coloniilor, fie metoda de creștere clasică.

2. În mod optim, în 15 minute de la preparare, se diluează suspensia de inoculat ajustată în apă, soluție salină, sau bulion astfel, după inoculare, fiecare godeu conține aproximativ  $5 \times 10^5$  CFU / ml (interval de 2 până la  $8 \times 10^5$  UFC / ml). Procedura de diluare pentru obținerea acestui inocul final variază în funcție de metoda din livrarea inoculului la godeurile individuale și trebuie calculată pentru fiecare situație. Pentru testele de microdiluție, volumul exact al inoculului livrat în godeuri trebuie să fie cunoscut pentru a face calculul. De exemplu, dacă volumul bulionului din godeu este de 0,1 ml și volumul de inocul este 0,01 ml, apoi suspensia de 0,5 McFarland ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) trebuie diluat 1:20 pentru a se obține  $5 \times 10^6$  CFU/ml. Când 0,01 ml din această suspensie este inoculată în bulion, testul final concentrația de bacterii este de aproximativ  $5 \times 10^5$  CFU/ml (sau  $5 \times 10^4$  FU/godeu în metoda de microdiluție).

3. În 15 minute după ce inoculul a fost standardizat așa cum este descris mai sus, inoculați fiecare godeu a unei plăci de microdiluție utilizând un dispozitiv de inoculare care oferă un volum care nu depășește 10% din volumul în godeu (de exemplu,  $\leq 10$   $\mu$ l de inocul în 0,1 ml soluție de agent antimicrobian). Invers, dacă se utilizează o pipetă de 0,05 ml, rezultă o diluție 1: 2 a conținutului fiecărui godeu (conținând 0,05 ml), ca și în cazul procedurii de macrodiluție.

4. Este recomandabil să se efectueze o verificare a purității suspensiei de inocul prin subcultură a unei alicote într-o placă de agar neselectivă pentru incubare simultană.

#### **1.1.5. Numărul de colonii al suspensiei de inocul**

Laboratoarele sunt încurajate să efectueze numărul de colonii pe suspensiile de inoculat cel puțin trimestrial, asigurați-vă că, concentrația finală de inocul obținută în mod obișnuit se apropie de aproximativ  $5 \times 10^5$  UFC / ml pentru E. coli ATCC® 25922. Faceți acest lucru prin îndepărtarea unui alicot de 0,01 ml din godeul sau tubul de control al creșterii, imediat după inoculare și diluare în 10 ml de soluție salină (diluție 1: 1000). După amestecare, îndepărtați a o alicotă de 0,1 ml și se întinde pe suprafața unui mediu de agar adecvat. După incubare, prezența aproximativ 50 de colonii indică o densitate a inoculului de  $5 \times 10^5$  UFC / ml.

### 1.1.6. Incubarea

1. Incubați tuburile de macrodiluție sau plăcile de microdiluție inoculate la  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  timp de 16 până la 20 de ore într-o în termen de 15 minute de la data adăugării inoculului. Pentru a menține aceeași temperatură de incubare pentru toate culturile, nu lucrați mai mult de patru plăci de microdiluție.

2. Pentru a preveni uscarea, sigilați fiecare placă într-o pungă de plastic, cu bandă din plastic sau cu un capac din plastic care se fixează bine

**Înainte** de incubare.

3. Timpii de incubare pot diferi pentru organismele fastidioase sau pentru unele organisme problematice cu dificultăți de detectare a rezistenței [Clinical and Laboratory Standards Institute, West Valley Road, Suite 2500 Wayne, PA 19087 USA; <https://www.researchgate.net/file>.

PostFileLoader.html?id=56466b465f7f71946b8b45f2&assetKey=AS:295464181223441@1447455558839].

### 1.3. Determinarea sensibilității la unele substanțe antimicrobiene a speciilor *escherichia coli* și *staphylococcus aureus* prin metoda microdiluțiilor

Această metodă este numită metoda microdiluțiilor deoarece implică folosirea unor cantități mici de bulion. Se folosesc plăcuțe sterile cu godeuri rotunjite sau în formă de v, fiecare conținând 0,05 până la 0,1 ml de bulion. Antibioticele pot fi diluate.

Plăcuțele pentru microdiluții pot fi obținute în laborator, sau pot fi cumpărate fiind gata pentru a putea fi utilizate. Dacă sunt pregătite în laborator, se poate folosi un sistem care umple automat godeurile. În aceste sisteme, mediul necesar și agenții antimicrobieni sunt obținuți în cantități mai mari, iar un distribuitor umple automat fiecare godeu cu volumul dorit.

Există două tipuri de plăcuțe pe piață. În una dintre ele mediul și agentul antimicrobian sunt distribuite în godeuri și înghețate apoi fiind livrate cumpărătorului. Cumpărătorul le depozitează în stare înghețată (preferabil  $-70^\circ\text{C}$ ) și le utilizează când este nevoie.

Celălalt tip de plăcuțe conține agenți antimicrobieni uscați în godeuri. Agenții sunt readuși în soluție prin adăugarea diluantului și a microorganismelor separat sau împreună în fiecare godeu. Diluția antimicrobiană este astfel realizată încât fiecare concentrație să se regăsească în cel puțin 10 ml bulion cu ajutorul unui distribuitor, godeurile plăcuțelor de microdiluție sunt umplute cu 0,1 ( $\pm 0,02$ ) ml.

Dacă inoculul este adăugat cu pipeta soluția cu agentul antimicrobian este preparată în doză dublă, iar godeurile sunt umplute cu 0,05 ml în loc de 0,1 ml.

#### 1.4. Prepararea inoculului pentru testele de diluție

##### 1.1.7. Standardul de turbiditate pentru prepararea inoculului

Pentru a standardiza densitatea inoculului pentru un test de susceptibilitate, trebuie să se utilizeze un echivalent standard de turbiditate de sulfat de bariu la soluția standard 0,5 McFarland sau echivalentul său optic (ex. suspensia particulelor de latex).

Standardul 0,5 McFarland sulfat de bariu se pregătește astfel:

(1) Se adaugă 0,5 ml alicote de 0,048 moli/l  $\text{BaCl}_2$  (1,175% w/v  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) la 99,5 ml de 0,18 moli/l (0,36N)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1% v/v) cu agitare continuă pentru a menține suspensia.

(2) Se verifică densitatea corectă a turbidității standard prin măsurarea absorbției folosind un spectrofotometru. Absorbția la 625 nm ar trebui să fie între 0,08 și 0,13 pentru standardul 0,5 McFarland.

(3) Se transferă suspensia de sulfat de bariu în 4-6 ml alicote, în eprubete cu capac de aceeași dimensiune cu a celor folosite pentru standardizarea inoculului bacterian.

(4) Se sigilează eprubetele și se depozitează la temperatura camerei în întuneric.

(5) Înainte de întrebuințare standardul de turbiditate de sulfat de bariu se agită cu ajutorul unei centrifuge și se verifică apariția uniformă a turbidității. Se înlocuiește standardul dacă apar particule.

(6) Standardele de sulfat de bariu ar trebui să fie înlocuite sau să li se examineze turbiditatea lunar.

### **1.1.8. Standardizarea inoculului bacterian pentru testele de diluție**

(1) Se ajustează turbiditatea culturii inoculate pentru a obține o turbiditate comparabilă cu standardul 0,5 McFarland.

(2) Se diluează cultura în apă sterilă, salină sau bulion astfel încât după inoculare, fiecare godeu să conțină  $5 \times 10^5$  UFC/ml.

(3) Procedura de diluție pentru a obține inoculul final variază în funcție de metodă și trebuie calculată pentru fiecare sistem. Pentru a putea fi realizat acest calcul trebuie să se cunoască volumul exact inoculat în godeuri.

### **1.1.9. Bulionul de inoculare**

Fiecare godeu este inoculat cu 0,05 ml cu ajutorul unei pipete sau a unui replicator de inoculare. Inoculul este diluat, iar bulionul este inoculat în 15 minute după ce inoculul este standardizat. Dacă volumul inoculului depășește 10% din volumul godeului, efectul de diluție al inoculului și a agentului antimicrobian trebuie luat în considerare. Dacă se utilizează o pipetă pentru a inocula bulionul în godeu, diluția care rezultă este de obicei de 1:2 (0,05 ml soluție antimicrobiană + 0,05 ml inocul); dacă se folosește un replicator, diluția care rezultă este de obicei neglijabilă (în general  $<5\mu\text{l}$  inocul în 0,1 ml soluție antimicrobiană). Pentru a preveni uscarea, fiecare plăcuță este sigilată într-o pungă de plastic cu bandă adezivă.

### **1.1.10. Incubarea**

Plăcuțele sunt incubate la 35°C timp de 16-20 ore într-un incubator cu aer forțat. Pentru a menține aceeași temperatură de incubare pentru toate culturile, plăcuțele de microdiluție nu trebuie să fie suprapuse mai mult de 4.

### **1.1.11. Interpretarea rezultatelor**

MIC reprezintă concentrația minimă de agent antimicrobian care inhibă complet dezvoltarea microorganismelor, detectabilă cu ochiul liber.

Turbiditatea din godeurile care conțin agentul antimicrobian este comparată cu turbiditatea din plăcuțele de control al fiecărui set de teste [Clinical and Laboratory Standards Institute, West Valley Road, Suite 2500 Wayne, PA 19087 USA; <https://www.researchgate.net/file>.

PostFileLoader.html?id=56466b465f7f71946b8b45f2&assetKey=AS:295464181223441@1447455558839].

### 1.5. Determinarea sensibilității la unele substanțe antimicrobiene a speciilor *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* prin metoda difuzimetrică

A fost concepută în anul 1940, fiind îmbunătățită de Kirby și Bauer, care au inclus ca procedură standard utilizarea unui mediu de testare, respectiv agarul Müller-Hinton [Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966) - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, Am. J. Clin. Pathol., 36, 493-496.].

Ulterior, plecând de la metoda Kirby-Bauer, diversele organisme internaționale de reglementare și standardizare au publicat mai multe tehnici de referință standard, revizuite periodic. Un astfel de organism, cunoscut în întreaga lume, este Institutul de Standardizare pentru Clinică și Laborator (CLSI – The Clinical and Laboratory Standards Institute), un organism de standardizare interdisciplinară, educațională și internațională non-profit care promovează dezvoltarea de metode de referință standardizate pentru testarea și raportarea rezistenței și sensibilității la substanțele antibacteriene [Clinical and Laboratory Standards Institute, (2006) - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. Ninth Edition. CLSI document M2-A9 [ISBN 1-56238-586-0]. CLSI, M100-S16,USA,Vol.26(3).].

Institutul de Standardizare pentru Clinică și Laborator a creat metode de referință standardizate, pentru testarea sensibilității microorganismelor la substanțele antibacteriene, a impus parametrii pentru controlul calității testării și a furnizat criterii pentru interpretarea rezultatelor obținute, aspecte care ajută laboratoarele să obțină rezultate corecte și reproductibile.

Metodele de referință, elaborate de Institutul de Standardizare pentru Clinică și Laborator, sunt proceduri de referință, aplicabile pentru testarea de rutină a sensibilității bacteriene de către laboratoarele de microbiologie. De asemenea, Institutul de Standardizare pentru Clinică și Laborator are rolul de a elabora liniile directoare pentru strategiile de testare și raportare a sensibilității, de a optimiza detectarea mecanismelor de rezistență prin elaborarea de noi metode sau de revizuire a celor existente.

În concluzie, rolul acestui organism este de a furniza informații corecte, care să permită laboratoarelor de microbiologie să ajute medicii practicieni în alegerea unei terapii antiinfecțioase adecvate.

Menționăm că, necesitatea standardizării metodelor de testare antimicrobiană s-a născut din nevoia de a elimina erorile cauzate de o multitudine de factori, dintre care putem aminti: densitatea inoculului, calitățile mediului de testare, condițiile de termostatare, concentrația substanței antimicrobiene etc.

Prin urmare, elaborarea unor proceduri de verificare a comportamentului bacteriilor la agenții antimicrobieni a urmărit, în primul rând, optimizarea condițiilor de dezvoltare bacteriană, pentru eliminarea posibilelor erori induse de mediile de cultură, temperatură, sau condițiile de incubare, și în al doilea rând, optimizarea activității și integrității substanței antimicrobiene. Cele două aspecte prezentate contribuie la obținerea unor rezultate corecte, consistente și reproductibile.

#### 1.1.12. Principiul metodei

*Metoda difuzimetrică* de testare a sensibilității la substanțele antibacteriene este de fapt o evaluare semicantitativă a sensibilității la substanțe antimicrobiene a bacteriilor aerobe, a bacteriilor patogene cu creștere rapidă, și a unor bacterii mai pretențioase la condițiile de cultivare (*Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* ș.a.), utilizând microcomprimate impregnate cu substanțe antibacteriene în anumite concentrații, aplicate pe suprafața agarului Mueller-Hinton, inoculat anterior cu suspensie bacteriană din tulpina supusă testării [**Andor, C.S. (2009)** – Teză de doctorat: Studiu asupra serovarurilor de *Salmonella* izolate de la animale în arealul de epidemiosupraveghere al județului Satu Mare. *Facultatea de Medicină Veterinară*. Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca.].

Substanța antimicrobiană existentă în microcomprimate difuzează în mediul inoculat anterior cu tulpina bacteriană de testat, consecința fiind apariția unei zone de inhibiție, circulară, al cărei diametru este dependent de sensibilitatea tulpinii bacteriene supusă testării. Pentru a obține rezultate valide și reproductibile, este absolut esențială aplicarea integrală a metodei de referință elaborate de CLSI, în condiții de testare precizate, întregul proces de testare fiind validat de rezultatele obținute la controlul calității (consecutiv utilizării de tulpini bacteriene de referință - ATCC cu comportament cunoscut la diverse substanțe antibacteriene).

Alegerea substanțelor antimicrobiene, criteriile de interpretare a zonelor de inhibiție și validarea rezultatelor se face pe baza cercetărilor clinice și de laborator, care sunt revizuite anual. Astfel, conform ultimelor revizuri ale metodelor de referință, testarea prin metoda

Raport: Metode clasice perfecționate și pregătite pentru screening: macrodiluție, microdiluție, difuziune în jurul discurilor difuzimetrică, bazată pe prezența sau absența unei zone de inhibiție, fără ca aceasta să fie măsurată, nu mai este acceptată. CLSI consideră valide numai rezultatele obținute prin măsurarea diametrului zonei de inhibiție, corelate cu concentrația minimă inhibitorie (CMI) și cu tulpini cunoscute ca fiind sensibile sau rezistente la diverse substanțe antimicrobiene [Clinical and Laboratory Standards Institute (2013) - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement, CLSI document M100-S23. CLSI, Wayne, PA.].

Menționăm că, evaluarea comportamentului la substanțele antimicrobiene este oportună și extrem de utilă atât pentru studiul epidemiologic al antibioretistenței microbiene, cât și pentru evaluarea noilor substanțe antimicrobiene.

De asemenea, este foarte important de subliniat faptul că, în cazul tulpinilor izolate din cazuri clinice, consecutiv unei toxiinfecții alimentare, când se pune problema comunicării rapide a rezultatelor, se pot testa colonii bine izolate din culturile primare aflate pe mediul solid. Deseori, testarea sensibilității se face în paralel cu identificarea tulpinilor izolate.

Dorim să menționăm că nu este recomandată testarea culturilor bacteriene mixte, a culturilor impure, sau direct a prelevatelor din probe, deoarece este dovedit faptul că rezultatele sunt eronate. Excepție fac urgențele majore, când pentru testare se poate utiliza prelevatul clinic, dacă examenul bacterioscopic sugerează prezența unui singur agent patogen, iar în acest caz, rezultatele se vor raporta ca fiind preliminare, urmând a se repeta testarea conform procedurii de referință standardizate [Dumitrache, Rodica, (2008) - Teză de doctorat: Studiul tulpinilor de *Salmonella* izolate din episoade de salmoneloză n animală. Universitatea de Științe Agricole și Medicină veterinară București.].

#### 1.1.13. Materiale necesare

##### **Tulpinile bacteriene** *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*

Pentru experimentele privind comportamentul la unele substanțe antimicrobiene, se vor lua în studiu atât tulpini de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* izolate din diverse procese patologice, cât și din teste de sanitație. Astfel, vor fi testate, prin metoda difuzimetrică un număr de aproximativ 600 tulpini de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*, izolate pe parcursul perioadei experimentale.

#### 1.1.14. Selectarea substanțelor antimicrobiene

Din considerente care includ relevanța clinică, prevalența antibioretistenței, limitarea riscului de apariție a multirezistenței, strategia de păstrare a unei game de antibiotice (de rezervă), pentru cazurile clinice, în care rezultatele obținute (*in vitro*) au aplicabilitate în terapia antiinfecțioasă, selectarea antibioticelor, testarea și raportarea rezultatelor se face după reguli foarte stricte și rigide.

Când însă testarea se face în scop experimental, ea nu mai este supusă acestor restricții, cu condiția ca rezultatele obținute să aibă o circulație controlată și eventual să fie comunicate pe clase de antibiotice [**Dumitrache, Rodica, (2008)** - Teză de doctorat: Studiul tulpinilor de *Salmonella* izolate din episoade de salmoneloză n animală. Universitatea de Științe Agricole și Medicină veterinară București.].

Pentru cazurile clinice, selectarea celor mai adecvate substanțe antimicrobiene, pentru a fi testate și raportate, este cea mai bună decizie pe care o adoptă laboratorul, prin consultarea cu specialiștii implicați în combaterea bolilor biotice, terapeuți, farmaciștii și organisme guvernamentale de profil.

CLSI face astfel de recomandări, pentru selectarea substanțelor antimicrobiene, în mod diferențiat, pentru grupe de agenși patogeni, recomandări ce includ substanțe ce manifestă performanțe acceptabile la testare (*in vitro*).

Pentru a evita interpretările eronate, reportarea către terapeuți va conține numai acele substanțe antiinfecțioase, adecvate pentru terapie. În scop epidemiologic sau taxonomic, pot fi testate și alte substanțe decât cele utilizate în terapie, însă acestea nu vor fi incluse pe lista rezultatelor furnizate terapeuților. La nevoie ele pot fi comunicate epidemiologilor sau specialiștilor implicați în controlul antiinfecțios.

Selectarea substanțelor antimicrobiene pentru testare este în strânsă corelație cu spectrul de activitate al acestora. De asemenea, pentru evitarea unor rezultate neconcludente, este recomandabil ca la raportarea rezultatelor obținute să se utilizeze substanța activă, inclusă în microcomprimate, și nu denumirea lor comercială.

Pentru testarea antibioretistenței, prin metoda difuzimetrică, vom folosi cartușe disponibile în comerț, impregnate cu o anumită cantitate din substanța antimicrobiană. Astfel, vom utiliza microcomprimate produse de OXOID Ltd, Anglia (tabelul 1), care sunt cu indicații speciale pentru testarea sensibilității microbiene și care sunt ambalate în condiții anhidre. Practic, acestea sunt discuri confecționate dintr-o hârtie specială absorbantă, cu

Raport: Metode clasice perfecționate și pregătite pentru screening: macrodiluție, microdiluție, difuziune în jurul discurilor diametrul de 6 mm, impregnate cu substanțe antimicrobiene, marcate pe ambele fețe cu litere și numere care codifică substanța antimicrobiană și concentrația acesteia. Încărcătura per disc este normată de CLSI și precizată în standardele de referință [**Andor, C.S. (2009)**] – Teză de doctorat: Studiu asupra serovarurilor de *Salmonella* izolate de la animale în arealul de epidemiosupraveghere al județului Satu Mare. *Facultatea de Medicină Veterinară. Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca.*].

### 1.1.15. Microcomprimate utilizate în testarea sensibilității tulpinilor tulpinilor bacteriene prin metoda difuzimetrică

Păstrarea microcomprimatelor se va face, conform recomandărilor producătorului, prin refrigerare la 2-4°C sau congelare la -14°C. Cutiile sigilate care conțin microcomprimate impregnate cu antibiotice din clasa β-lactaminelor se vor stoca prin congelare, exceptând cartușele reținute pentru utilizare imediată, care se vor păstra la temperatura de refrigerare timp de maxim șapte zile.

Tabelul 1

Nr. crt.	Denumirea	Simbolul	Încărcare
1	<b>Ampicilin/sulbactam</b>	<b>SAM</b>	<b>20 μg</b>
2	<b>Acid nalidixic</b>	<b>NA</b>	<b>30 μg</b>
3	<b>Colostin sulfat</b>	<b>CT</b>	<b>10 μg</b>
4	<b>Claritromicină</b>	<b>CLR</b>	<b>15 μg</b>
5	<b>Furazolidon</b>	<b>FR</b>	<b>100 μg</b>
6	<b>Gentamicină</b>	<b>CN</b>	<b>10 μg</b>
7	<b>Nitrofurantoin</b>	<b>F</b>	<b>100 μg</b>
8	<b>Polimixina B</b>	<b>PB</b>	<b>300 μg</b>
9	<b>Tetraciclină</b>	<b>TE</b>	<b>30 μg</b>
10	<b>Trimethoprim/sulfamethoxazol</b>	<b>SXT</b>	<b>25 μg</b>

Menționăm că înainte de a fi utilizate, cartușele nedeschise, aflate la temperatura de congelare sau refrigerare, pentru a se evita fenomenul de condens, se vor menține la

Raport: Metode clasice perfecționate și pregătite pentru screening: macrodiluție, microdiluție, difuziune în jurul discurilor  
temperatura camerei timp de 1-2 ore. Se vor utiliza doar microcomprimate aflate în perioada de valabilitate.

### 1.1.16. Agarul Mueller-Hinton

Pentru testarea sensibilității antimicrobiene a tulpinilor de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*, luate în studiu, vom utiliza agarul Mueller-Hinton, mediu de cultură recomandat de CSLI, pentru testarea sensibilității la substanțele antimicrobiene.

Menționăm că utilizarea acestui mediu are următoarele avantaje:

- conferă reproductabilitate testărilor;
- este sărac în inhibitori ai tetraciclinelor, sulfonamidelor și trimethoprimului;
- oferă suportul nutritiv, adecvat bacteriilor patogene cu dezvoltare rapidă;
- este inclus în metoda de referință standardizată, ceea ce permite verificarea proprietăților nutritive ale fiecărei șarje, prin evaluarea diametrului zonelor de inhibiție produse de tulpinile de referință, al căror comportament, față de anumite substanțe antimicrobiene, este cunoscut;
- existența, în literatura de specialitate, a numeroase date privind testarea sensibilității bacteriilor pe mediul Mueller-Hinton.

### 1.1.17. Scala McFarland

Pentru obținerea unei culturi bacteriene, cu o turbiditate standard (0,5 McFarland), se va utiliza standardul McFarland, preparat din sulfat de bariu. Menționăm că în testare este necesară ajustarea inoculului utilizat pentru efectuarea testului.

Standardul 0,5 McFarland sulfat de bariu se pregătește astfel:

- se amestecă 0,05 ml clorură de bariu dihidrat 1,175% ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), cu 9,95 ml acid sulfuric 1% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) cu agitare continuă, pentru a menține suspensia;
- se verifică densitatea corectă a turbidității standard prin măsurarea absorbției folosind un spectrofotometru; absorbția la 625 nm ar trebui să fie între 0,08 și 0,13 pentru standardul 0,5 McFarland;
- se transferă suspensia de sulfat de bariu în 4-6 ml alicote în eprubete cu capac de aceeași dimensiune cu a celor folosite pentru standardizarea inoculului bacterian;
- se sigilează eprubetele și se depozitează la temperatura camerei în întuneric.

De reținut că, atunci când este utilizată, suspensia de sulfat de bariu trebuie să aibă o turbiditate uniformă, ceea ce se poate obține printr-o agitare energetică, sau cu ajutorul unui vortex. În cazul în care se utilizează o suspensie de particule de latex, omogenizarea se face lent, cu mâna, fără a fi folosit vortexul.

### 1.1.18. Tulpinile bacteriene martor

Pentru controlul acurateții procedurii de testare se vor folosi tulpini bacteriene de referință, calitativ certificate, care au un comportament cunoscut la acțiunea anumitor substanțe antimicrobiene. Astfel, pentru controlul calitativ al testării tulpinilor de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* se vor utiliza trei tulpini de referință:

- *E. coli* ATCC 35218 - este producătoare de  $\beta$ -lactamază, și se utilizează pentru controlul calitativ, atunci când se aplică în testare combinații de antibiotic cu inhibitori de  $\beta$ -lactamază (acid clavulanic, sulbactam sau tazobactam);

- *E. coli* ATCC 25922 - o tulpină intens studiată și stabilă în ceea ce privește comportamentul său față de o gamă foarte largă de substanțe antiinfecțioase, constituind un instrument foarte eficace pentru monitorizarea acurateții modului de lucru în studiul comportamentului la substanțe antimicrobiene a tulpinilor bacteriene;

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 - este utilizat pentru stabilirea calității agarului Mueller-Hinton în ceea ce privește conținutul în timidină și timidină, prin verificarea diametrului zonei de inhibiție pe care tulpina o formează când este testată cu trimethoprim/sulfametoxazol.

Testarea tulpinilor de referință, pentru controlul calității, se face în aceleași condiții, și cu aceleași materiale, ca și testarea propriu-zisă. Inoculul se prepară din colonii izolate, prin suspensionare sau cultivare în mediu lichid, în mod asemănător cu procedura descrisă în standardul de referință. Culturile de lucru se prepară din cultura stoc (liofilizată) și se pot păstra la refrigerare, transferându-le săptămânal. La interval de cel puțin o lună se vor prepara noi culturi de lucru din cultura stoc (liofilizată).

Pentru testare se utilizează culturi pure, în stare proaspătă. Prepararea inoculului se face din colonii izolate, din cultura de 24 de ore, obținută din pasarea culturii refrigerate. Culturile congelate vor fi pasate de două ori, înainte de prepararea inoculului. Culturile de referință se pot folosi pentru verificarea controlului calității, atâta timp cât nu apar modificări ale zonei de inhibiție. Dacă sunt sesizate astfel de modificări, în mod obligatoriu, se va reface testarea cu noi culturi proaspete ale tulpinii de control.

Validarea calitativă a întregului proces analitic se face prin compararea zonelor de inhibiţie, formate din tulpina de referinţă, testate cu limitele furnizate de metoda standard (tabelul 2) [**Clinical and Laboratory Standards Institute, (2006)** - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. Ninth Edition. CLSI document M2-A9 [ISBN 1-56238-586-0]. CLSI, M100-S16,USA,Vol.26(3)].

### 1.1.19. Modul de lucru

#### Prepararea agarului Mueller-Hinton

Bulionul Mueller-Hinton este mediul utilizat curent pentru testele de antibioretistenţă, aplicate pentru microorganismele aerobe sau facultativ aerobe cu creştere rapidă deoarece:

- a demonstrat un nivel acceptabil de reproductibilitate în testele de susceptibilitate;
- are o concentraţie foarte redusă de inhibitori ai sulfonamidelor, trimethoprimului şi tetraciclinei;
- asigură creşterea satisfăcătoare a majorităţii agenţilor patogeni;
- majoritatea rezultatelor obţinute până în prezent prin această metodă au la bază utilizarea acestui mediu.

Tabelul 2

#### Limite ale zonelor de inhibiţie acceptabile pentru tulpinile de referinţă utilizate pentru

#### monitorizarea acurateţii metodei difuzimetrice [după CLSI, 2006]

Agentul antimicrobian	Încărcătura/ disc	<i>E. coli</i> ATTC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 35218
Amikacin	30 µg	19 - 26	-
Amoxicilin-acid clavulonic	20/10 µg	18 - 24	17 - 22
Ampicilina	30 µg	16 - 22	6
Ampicilin-sulbactam	10/10 µg	19 - 24	13 - 19
Azitromycin	15 µg	-	-
Azlomicin	75 µg	-	-
Aztreonam	30 µg	28 - 36	-
Carbencinil	100 µg	23 - 29	-
Cefaclor	30 µg	23 - 27	-
Cefamandole	30 µg	26 - 32	-
Cefazolin	30 µg	21 - 27	-
Cefdinir	5 µg	24 - 28	-



Raport: Metode clasice perfecționate  i pregătite pentru screening: macrodiluție, microdiluție, difuziune în jurul discurilor

Cefditoren	5 µg	22 - 28	-
Cefepime	30 µg	31 - 37	-
Cefetamet	10 µg	24 - 29	-
Cefixime	5 µg	23 - 27	-
Cefmetazole	30 µg	26 - 32	-
Cefonicid	30 µg	25 - 29	-
Cefoperazone	75 µg	28 - 42	-
Cefotaxime	30 µg	29 - 35	-
Cefotetan	30 µg	24 - 38	-
Cefoxitin	30 µg	23 - 29	-
Cefpodoxime	10 µg	23 - 38	-
Cefprozil	30 µg	21 - 27	-
Ceftazidime	30 µg	25 - 32	-
Cefibuten	30 µg	27 - 35	-
Ceftizoxime	30 µg	30 - 36	-
Ceftobiprole	30 µg	30 - 36	-
Ceftriaxone	30 µg	29 - 35	-
Cefuroxime	30 µg	20 - 26	-
Cephalotin	30 µg	15 - 21	-
Chloramphenicol	30 µg	21 - 27	-
Cinoxacin	100 µg	26 - 32	-
Ciprofloxacin	5 µg	30 - 40	-
Clinafloxacin	5 µg	31 - 40	-
Doripenem	10 µg	28 - 35	-
Doxiciclina	30 µg	18 - 24	-
Enoxacin	10 µg	28 - 36	-
Etrapanem	10 µg	29 - 36	-
Fleroxacin	5 µg	28 - 34	-
Fosfomicin	200 µg	22 - 30	-
Garenoxacin	5 µg	28 - 35	-
Gatifloxacin	5 µg	30 - 37	-
Gemifloxacin	5 µg	29 - 36	-
Gentamicin	10 µg	19 - 26	-
Grepaploxacin	5 µg	28 - 36	-
Imipenem	10 µg	26 - 32	-
Kanamycin	30 µg	17 - 25	-
Levofloxacin	5 µg	29 - 37	-
Lomefloxacin	10 µg	27 - 33	-
Loracarbef	30 µg	23 - 29	-
Mecillian	10 µg	24 - 30	-

Meropenem	10 µg	28 - 34	-
Mezlocilin	5 µg	23 - 29	-
Minocyclina	30 µg	19 - 25	-
Moxalactam	30 µg	28 - 35	-
Moxifloxacin	5 µg	28 - 35	-
Acid nalidixic	30 µg	22 - 28	-
Netilmicin	30 µg	22 - 30	-
Nitrofurantion	300 µg	20 - 25	-
Norfloxacin	10 µg	28 - 35	-
Ofloxacin	5 µg	29 - 33	-
Piperacilin	100 µg	24 - 30	12 - 18
Piperacilin-tazobactam	100/10 µg	24 - 30	24 - 30
Rifampin	5 µg	8 - 10	-
Sparfloxacin	5 µg	30 - 38	-
Streptomicina	10 µg	12 - 20	-
Sulfisoxazol	250 sau 300 µg	25 - 23	-
Tetraciclina	30 µg	18 - 25	-
Ticarciclin	75 µg	24 - 30	6
Ticarciclin-acid clavulanic	75/10 µg	24 - 30	21 - 25
Tigecyclina	15 µg	20 - 27	-
Tobramicin	10 µg	18 - 26	-
Trimethoprim	5 µg	21 - 28	-
Trimethoprim-sulphamethoxazole	1,25/23,75µg	23 - 29	-
Trospectomycin	30 µg	10 - 16	-
Trovafloxacin	10 µg	29 - 36	-

În cadrul cercetărilor noastre, pentru efectuarea experimentelor, vom utiliza mediul Mueller-Hinton, în varianta deshidratată, produs de firma OXOID Ltd. (Anglia), cu următoarea compoziție (g/l):

- extract de carne                    2,0 g;
- hidrolizat acid de cazeină    17,5 g;
- amidon                                1,5 g;
- agar                                      17,0 g.

Din compoziția obținută se adaugă 38 g pulbere la un litru de apă distilată. Se lasă pe baia de apă, până la completa dizolvare, apoi se sterilizează prin autoclavare la 121°C, timp de 15 minute. În timpul preparării trebuie respectate următoarele condiții:

- prepararea se va face numai din medii deshidratate, existente pe piață, respectând instrucțiunile producătorului;
- imediat după autoclavare, mediul se răcește pe baie de apă, la 45-50°C;
- turnarea mediului proaspăt, răcit la 45-50°C, în plăci Petri din plastic sau sticlă, în strat uniform, gros de 4 mm; pentru îndeplinirea acestei condiții se rapartizează câte 60-70 ml mediu, în plăcile cu diametrul de 150 mm, sau 25-30 ml, în plăcile cu diametrul de 100 mm, aflate pe o suprafață perfect orizontală, care asigură uniformitatea stratului de agar;
- solidificarea plăcilor, la temperatura camerei, în hota cu flux laminar; în cazul în care plăcile nu se utilizează în aceeași zi, se vor păstra la 2-8°C, în pungi de polietilenă;
- plăcile astfel pregătite, se vor utiliza în decurs de șapte zile, cu excepția cazurilor în care sunt luate măsuri pentru a se evita deshidratarea mediului (ambalare în pungi de polietilenă, prevăzute cu sistem de etanșeizare);

Înainte de însămânțare, plăcile care au picături de condens se lasă în hotă, cu capacul întredeschis, pentru evaporarea condensului existent pe suprafața agarului sau pe capacul plăcii. De asemenea, este obligatorie verificarea sterilității fiecărei șarje de mediu, prin incubarea plăcilor la 35°C, timp de 24 ore.

La fiecare șarjă, în momentul preparării, se verifica pH-ul, care trebuie să se situeze între 7,2-7,4, la temperatura camerei, după solidificare. Un pH mai mic poate inhiba activitatea unor antibiotice (aminoglicozide, macrolide, quinolone) sau, dimpotrivă, potențează activitatea altora (tetraciline). Când pH-ul este prea mare, sunt de așteptat efecte inverse.

Cantitățile excesive de timidină sau timină, existente în compoziția mediului pe care se face testarea, pot anula efectul inhibitor al sulfonamidelor și trimethoprimului, prin micșorarea sau absența zonelor de inhibiție, ceea ce poate duce la obținerea unor rezultate eronate de falsă rezistență. Acest aspect a făcut necesară verificarea lotului de mediu Mueller-Hinton, privind conținutul acestor substanțe, verificare ce a constat în testarea pe lotul de mediu achiziționat de laborator a tulpinii de *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 sau ATCC 29212, cu discuri de trimethoprim/sulphamethoxazol; obținerea unor zone de inhibiție, cu diametrul de peste 20 mm, a validat calitatea mediului.

### 1.1.20. Prepararea inoculului

Inoculul bacterian, utilizat la însămânțarea plăcilor, trebuie să aibă o densitate standard, corespunzătoare cu 0.5 pe scala McFarland, sau o densitate optică echivalentă. Pentru standardizarea inoculului, vom utiliza un turbidimetru electronic, care măsoară electronic gradul de turbiditate. Suspensia bacteriană se prepară prin selectarea a 3-5 colonii izolate, tipice, cu aceleași caracteristici morfologice, care se vor transfera într-un tub cu 4-5 ml mediu lichid cu suport nutritiv adecvat (ex. bulion soia triptonă).

Cultura în bulion se incubează pentru 2-6 ore la 37°C, timp suficient să dobândească o turbiditate echivalentă cu 0.5 pe scala McFarland. Dacă turbiditatea este mai mare, se poate ajusta cu ser fiziologic sau bulion steril, astfel încât să se obțină o turbiditate standard, corespunzătoare cu 0.5 pe scala McFarland, ceea ce corespunde cu o suspensie de aproximativ  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml pentru *E. coli* ATCC 25922.

În absența turbidimetrului, măsurarea turbidității inoculului se poate face prin comparație vizuală cu suspensia de sulfat de bariu, echivalentă cu 0.5 pe scala McFarland, în lumină adecvată, pe un fond alb cu linii orizontale de culoare neagră.

O altă modalitate de preparare a inoculului constă în suspensionarea directă (fără termostatare) în bulion sau ser fiziologic steril a coloniilor de testat, existente pe un mediu solid neselectiv, incubat 18-24 ore pe agar cu sânge sau agar nutritiv. Ajustarea densității echivalentă cu 0.5 pe scala McFarland se face la fel.

### 1.1.21. Inocularea plăcilor

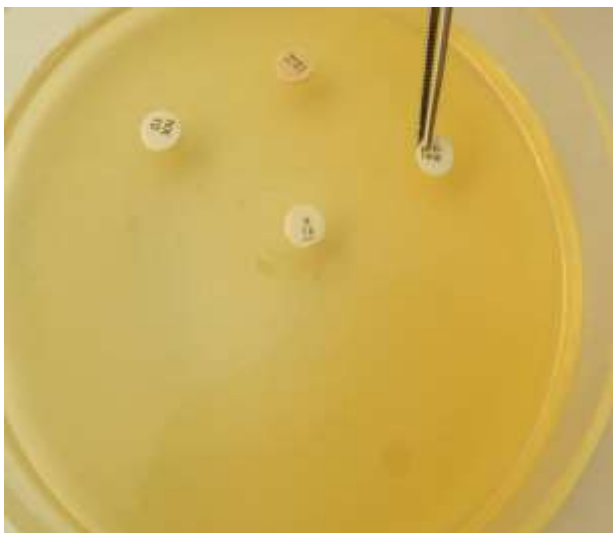
Plăcile cu mediul Mueller Hinton, a căror suprafață este perfect uscată, fără picături de condens, se vor însămânța prin inundare în maxim 15 minute de la ajustarea turbidității suspensiei bacteriene. Plăcile astfel însămânțate, se înclină de câteva ori pentru distribuirea uniformă a suspensiei, după care excesul de cultură se aspiră cu o pipetă Pasteur.

Pentru uscarea suprafeței mediului însămânțat, plăcile se lasă în vecinătatea flăcării unui bec de gaz, sau în hota cu flux laminar, cu capacul întredeschis, timp de aproximativ 15 minute, înainte de a aplica microcomprimetele impregnate cu substanța antibacteriană.

Deoarece rezultatele sunt în mare măsură condiționate de corectitudinea acestor etape, nu se vor utiliza pentru inoculare culturi în bulion incubate peste noapte și nediluate, sau suspensii mai dense de 0.5 pe scala McFarland.

### 1.1.22. Aplicarea microcomprimatelor

Aplicarea microcomprimatelor cu substanța antibacteriană, pe suprafața mediului, se poate face manual, sau cu ajutorul unei pense (fig. 1). La aplicare, fiecare microcomprimat trebuie ușor presat, pentru a adera ferm la suprafața mediului. Indiferent de modalitatea de aplicare, microcompartimentele vor fi plasate astfel încât distanța dintre două discuri să fie de minim 24 mm (de la un centru la altul). Menționăm, că pe o placă de 150 mm pot fi aplicate maxim 12 microcomprimatelor (fig. 2), iar pe cea de 100 mm, maxim cinci microcomprimatelor. După amplasarea microcomprimatelor, plăcile se întorc cu capacul în jos și se vor incuba la 37°C, în maxim 15 minute, în condiții de aerobioză.



**Fig. 1. Aplicarea microcomprimatelor în antibiograma prin metoda difuzimetrică**



**Fig. 2. Placă Petri cu microcomprimate în metoda difuzimetrică**

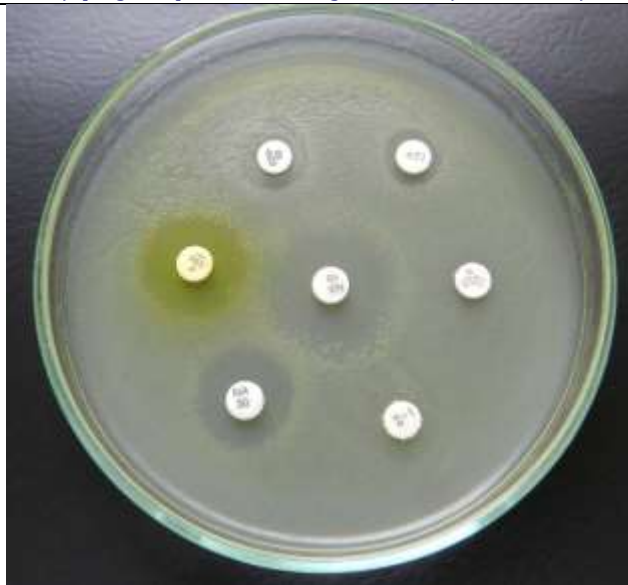
### **Citirea plăcilor**

Citirea se va face după o incubare a plăcilor de minim 16-18 ore. Dacă toate etapele au fost corect efectuate ar trebui ca zona de inhibiţie să fie uniform circulară, iar cultura bacteriană să fie uniform dezvoltată. În cazul în care suspensia bacteriană a fost săracă, coloniile nu confluează, ci se dezvoltă izolat, caz în care testarea trebuie repetată.

Diametrul zonelor de inhibiţie se măsoară în milimetri, cu ochiul liber, sau cu ajutorul unei rigle sau şubler, pe spatele plăcii Petri, de la o margine la alta, inclusiv dimensiunile microcomprimatului (fig. 3).

Coloniile nesesizabile cu ochiul liber vor fi neglijate. Dacă însă apar colonii discrete în interiorul zonei clare de inhibiţie acestea trebuiesc recultivate, reidentificate şi retestate.

Mărimea zonelor de inhibiţie este interpretată conform tabelelor furnizate de standardele în vigoare. În funcţie de mărimea diametrului zonelor de inhibiţie, tulpina testată va fi raportată ca fiind sensibilă, moderat sensibilă sau rezistentă la substanţele antimicrobiene testate.



**Fig. 3. Zone de inhibiție în metoda difuzimetrică**

### **Interpretarea rezultatelor**

Metoda standardizată a elaborat criteriile de interpretare a zonelor de inhibiție, prin consultarea cărora se poate stabili nivelul de sensibilitate al diverselor substanțe antimicrobiene a tulpinilor testate.

Aceste criterii de interpretare au fost stabilite prin corelarea zonelor de inhibiție cu concentrația minimă inhibitorie. Elaborarea lor s-a făcut pe baza studiului unui mare număr de germeni bacterieni, inclusiv a celor ce posedă mecanisme de rezistență, cunoscute pentru anumite clase de substanțe antimicrobiene, și în corelație cu farmacocinetica substanțelor antimicrobiene utilizate în terapie, precum și cu eficacitatea lor clinică.

În funcție de diametrul zonei de inhibiție, tulpina bacteriană testată poate fi interpretată ca fiind sensibilă, moderat sensibilă sau rezistentă la acțiunea substanțelor antimicrobiene.

Categoria „*sensibilă*” presupune faptul că tulpinile testate sunt inhibate de concentrații uzuale ale substanței antimicrobiene, atunci când aceasta este utilizată în doza obișnuită.

Categoria „*moderat sensibilă*” include situațiile în care concentrația minimă inhibitorie a substanței antimicrobiene atinge un anumit nivel sangvin și tisular, însă rata de răspuns a organismului poate fi mai scăzută decât cele din categoria “sensibilă”.

Substanțele incluse în categoria *moderat sensibilă* se pot utiliza în terapia unor infecții localizate, unde antibioticul se concentrează în mod fiziologic, sau în situațiile în care este posibilă utilizarea unei doze mai mari decât cele obișnuite. Utilizarea substanțelor incluse în această categorie ar trebui făcută cu precauție, mai ales pentru substanțele cu limite de farmacotoxicitate apropiate.

Categoria „*rezistentă*” presupune că tulpina testată nu este inhibată de concentrația sistemică obișnuită, atinsă de substanța antimicrobiană, administrată în doză uzuală, sau că tulpina testată posedă mecanisme specifice de rezistență; în astfel de cazuri, terapia este ineficace.

Există și situații particulare, în care anumite combinații tulpină testată/substanță antimicrobiană par a fi eficiente „*in vitro*”, însă sunt complet ineficiente clinic și, prin urmare, nu vor fi raportate terapeuților. Un astfel de exemplu îl constituie tulpinile de *Salmonella* și *Shigella* care, „*in vivo*”, sunt rezistente la prima și la a doua generație de cefalosporine, cefamicin și aminoglicozide. Astfel de situații sunt specificate și marcate corespunzător în tabelele de interpretare elaborate de CLSI.

## 1.6. Determinarea sensibilității la unele substanțe antimicrobiene a speciilor *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* cu ajutorul echipamentului Vitek 2 (Biomérieux, Franța)

### 1.1.23. Tupini bacteriene utilizate

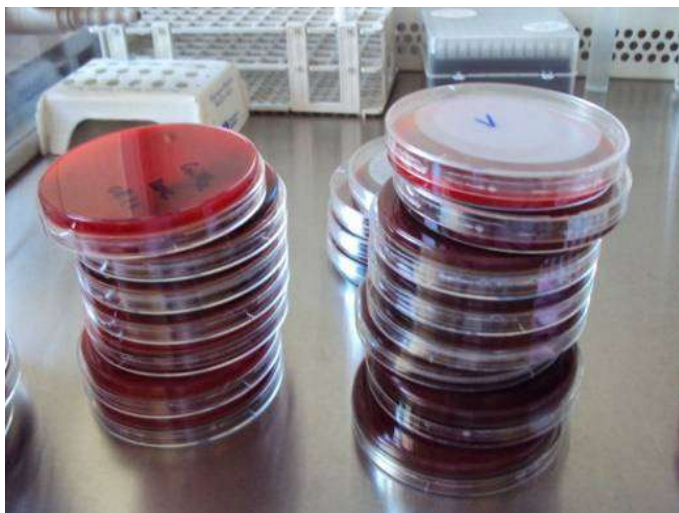
Dintre tulpinile bacteriene, aparținând genului *Escherichia* și *Staphylococcus*, izolate din mamite clinice, furaje și hrană, apă, portanță etc., vor fi testate minim 300 tulpini pentru fiecare specie luată în studiu.

### 1.1.24. Substanțe antimicrobiene utilizate

Pentru tulpinile izolate va fi testată sensibilitatea la un număr mare de substanțe antibacteriene, dintre care putem menționa: ampicilină, cefotaxim, ceftazidim, cloramfenicol, ciprofloxacina, gentamicină, acid nalidixic, streptomycină, sulfametoxazol, tetraciclină, trimetoprim, florfenicol, kanamicină etc.

Echipamentul Vitek 2, utilizat pentru testarea rezistenței la substanțele antimicrobiene a tulpinilor bacteriene, aparținând genurilor *Escherichia* și *Staphylococcus*, este format dintr-un sistem de analiză, denumit „Advanced Expert System (AES)”, capabil să recunoască și să clasifice tulpinile testate după anumite tipare de sensibilitate la substanțele antibacteriene care indică un fenotip specific și care ulterior este interpretat.

Tulpinile bacteriene vor fi izolate pe agar cu sânge (Fig. 4) și identificate cu ajutorul echipamentului Vitek 2. Culturile stoc, după izolare, vor fi fost păstrate la  $-50^{\circ}\text{C}$ , în bulion cord creier (bulion BHI Oxoid) și glicerol. Înainte de fiecare experiment tulpinile vor fi însămânțate pe agar cu sânge și incubate la  $37^{\circ}\text{C}$ , timp de 24 de ore.



**Fig. 4. *E. coli*. - cultura pură pregătită pentru testarea sensibilității la substanțele antimicrobiene prin metoda microdiluțiilor**

#### **1.1.25. Pregătirea probelor**

După 24 de ore, din fiecare cultură pură va fi realizată o suspensie bacteriană care va fi suspendată 3 ml ser fiziologic (0,9% NaCl), obținându-se o densitate de 0.5 pe scala *McFarland*, într-un tub de plastic de 12 x 75 mm (Fig. 5).



**Fig. 5. Măsurarea turbidității suspensiei bacteriene cu ajutorul aparatului DensiCheck**

#### 1.1.26. Inocularea

Testarea tulpinilor bacteriene va fi făcută cu ajutorul unor cartele specifice cu 64 de godeuri, în care se vor regăsi diverse antibiotice în diferite concentrații.

Astfel, cardurile de identificare, împreună cu suspensia de microorganisme, va fi introdusă în camera de presurizare (tip vacuum) (Fig. 6), după care tubul cu suspensia de microorganisme va fi introdusă într-un locaș special al casetei de identificare al echipamentului iar cardul de identificare în imediata vecinătate.

După ce caseta cu cardul și suspensia bacteriană vor fi introduse în camera vacuum, suspensiile de microorganisme vor fi transferate la nivelul cardului.



## Fig. 6. Prelucrarea cardurilor pentru testarea sensibilității la substanțele antimicrobiene în camera de presurizare

### 1.1.27. Sigilarea cardurilor

După inocularea cardului, se va întrerupe transferul de la nivelul tuburilor și acesta se sigilează înainte de a fi introdus în incubatorul sistemului. Cardul a fost preluat și incubat la temperatura de 35.5°C. În timpul incubării fiecare godeu al cardului a fost periodic analizat de un spectrofotometru integrat în echipament, fiecare reacție fiind citită din 15 în 15 minute pentru a măsura turbiditatea sau colorarea rezultată în urma metabolizării substratului (Fig. 7 și 8). După un interval de timp, cuprins între opt și 24 de ore, sistemul de analiză AES a făcut interpretarea citirilor și a afișat rezultatele [Kuper, K.M., Boles, D.M., Mohr, J.F., Wanger, A. (2009) - Antimicrobial Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians - Ph. D. Pharmacotherapy, 29(11), 1326-1343. Pincus, D.H. (2005) - Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods Volume 1. Ed. Miller, M. J. Chapter 1 *Microbial Identification using the Biomérieux VITEK® 2 System* Biomérieux, Inc. Hazelwood, MO USA PDA/DHI 1-32.]



Fig. 7. Incubarea cardurilor pentru testarea sensibilității la substanțele antimicrobiene prin metoda microdiluțiilor

În ultima etapă s-a realizat interpretarea rezultatelor cu citirea codului de bare pentru identificare și a datelor obținute, transferate în calculatorul atașat echipamentului.

Metodă este denumită a „microdiluțiilor” deoarece presupune utilizarea unor mici volume de bulion introduse în plăci de microtitrare care au porțiunea inferioară a godeurilor

Raport: Metode clasice perfecționate și pregătite pentru screening: macrodiluție, microdiluție, difuziune în jurul discurilor rotundă sau conică. Fiecare godeu va conține 0,1 ml bulion. Metoda microdiluțiilor în bulion descrisă în acest standard este identică cu cea prezentată în ISO 20776-1.



**Fig. 8. Citirea codului de bare și interpretarea rezultatelor**

### 1.1.28. Medii utilizate în testare

**Bulionul Mueller-Hinton (MHB)** este mediul de elecție pentru testele de susceptibilitate aplicate pentru microorganismele aerobe sau facultativ aerobe cu creștere rapidă deoarece:

- a demonstrat un nivel acceptabil de reproductibilitate în testele de susceptibilitate;
- are o concentrație foarte redusă de inhibitori ai sulfonamidelor, trimethoprimului și tetraciclinei;
- asigură creșterea satisfăcătoare a majorității agenților patogeni;
- majoritatea rezultatelor obținute până în prezent prin această metodă au la bază utilizarea acestui mediu.

Pentru testarea de rutină se utilizează bulionul Mueller-Hinton suplimentat cu cationi. Acest bulion este comercializat sub două forme:

- fără supliment de cationi – BMH;
- cu supliment de cationi (20-25 mg Ca<sup>2+</sup>/l și 10-12,5 mg Mg<sup>2+</sup>/l) – CAMHB.

Primul produs trebuie suplimentat cu calciu și magneziu, iar cel de-al doilea se utilizează ca atare, cu excepția următoarelor situații:

- pentru testarea daptomicinei, este necesară o concentrație de 50 mg/l Ca<sup>2+</sup>;
- pentru testarea dalbavancinei și oritavancinei se adaugă polisorb-80 (P-80) în concentrație de 0,002%;
- pentru testarea oxacilinei și a stafilococilor se adaugă NaCl în concentrație de 2%.

În vederea determinării calității mediului și a preabilității sale pentru testele de susceptibilitate, se recomandă determinarea concentrației inhibitorii minime (CIM) cu ajutorul *Enterococcus faecalis* ATCC®29212. Punctul terminal ar trebui să fie ușor de citit – cu o reducere a nivelului de creștere cu 80% sau mai mare, în comparație cu matorul. Se poate considera că mediul este adecvat dacă CIM pentru trimethoprim-sulfamethoxazole are valoarea ≤ 0,5/9,5 μg/ml.

### 1.1.29. Prepararea agenților antimicrobieni

Pentru efectuarea experimentelor se vor realiza diluții seriale ale agenților microbieni în bulion sau apă sterilă. Astfel, pentru soluțiile antimicrobiene intermediare (10x) se va dilua soluția concentrată (soluția stoc) conform schemei prezentate în tabelele 4 și 5. Pentru adăugarea diluantului și a soluției stoc în primul tub se utilizează o singură pipetă, apoi se va schimba pipeta la fiecare etapă a realizării diluțiilor seriale. Schema prezentată în tabelul 5 va fi aplicată pentru agenții antimicrobieni insolubili în apă, precum dalbavancina.

Tabelul 4

#### Schema diluării agenților antimicrobieni în vederea utilizării în teste de susceptibilitate bazate pe metoda microdiluției

Agentul antimicrobian						
Etapa	Concentrația μg/ml	Sursa	Volumul <sup>a</sup> (ml)	Volum CAMHB (ml)	Concentrație finală	Log <sub>2</sub>
1	5120	Sol. stoc	1	9	512	9
2	512	Etapa 1	1	1	256	8
3	512	Etapa 1	1	3	128	7
4	512	Etapa 1	1	7	64	6

5	64	Etapa 4	1	1	32	5
6	64	Etapa 4	1	3	16	4
7	64	Etapa 4	1	7	8	3
8	8	Etapa 7	1	1	4	2
9	8	Etapa 7	1	3	2	1
10	8	Etapa 7	1	7	1	0
11	1	Etapa 10	1	1	0,5	-1
12	1	Etapa 10	1	3	0,25	-2
13	1	Etapa 10	1	7	0,125	-3

**<sup>a</sup>Volumul soluției antimicrobiene poate fi orice multiplu al valorii prezentate în tabel, în funcție de numărul de teste care trebuie efectuate; CAMHB - bulion Mueller-Hinton cu supliment de cationi**

Soluția stoc se prepară prin diluarea agentului antimicrobian (pudră) într-un solvent adecvat. În final, soluția va trebui să aibă o concentrație mai mare de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , recomandându-se o concentrație de zece ori mai mare decât cea mai mare concentrație care trebuie testată.

În condițiile în care contaminarea soluțiilor antimicrobiene este rară, se consideră că prepararea aseptică a acestora este adecvată. Dacă se dorește, se poate recurge și la sterilizarea prin filtrare (nu se vor utiliza filtre de hârtie, azbest sau sticlă sinterizată).

În godeurile plăcii de microtitrare se va pipeta câte un volum de 0,1 ml pentru fiecare concentrație de agent antimicrobian care trebuie testată.

**Schema diluării agenților antimicrobieni insolubili în apă în vederea utilizării în teste de susceptibilitate bazate pe metoda microdiluției [conform standardului M100-S22]**

<i>Agentul antimicrobian</i>							
<i>Etapa</i>	<i>Concentrația</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Sursa</i>	<i>Volumul</i> (ml)	<i>Solvent</i> (ex. DMSO) (ml)	<i>Conc. intermediară</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Conc. finală la 1:100</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Lo g<sup>2</sup></i>
<b>1</b>	1600	Sol. stoc			1600	16	4
<b>2</b>	1600	Sol. stoc	0,5	0,5	800	8	3
<b>3</b>	1600	Sol. stoc	0,5	1,5	400	4	2
<b>4</b>	1600	Sol. stoc	0,5	3,5	200	2	1
<b>5</b>	200	Etapa 4	0,5	0,5	100	1	0
<b>6</b>	200	Etapa 4	0,5	1,5	50	0,5	-1
<b>7</b>	200	Etapa 4	0,5	3,5	25	0,25	-2
<b>8</b>	25	Etapa 7	0,5	0,5	12,5	0,125	-3
<b>9</b>	25	Etapa 7	0,5	1,5	6,25	0,062	-4
<b>10</b>	25	Etapa 7	0,5	3,5	3,1	0,03	-5
<b>11</b>	3,1	Etapa 10	0,5	0,5	1,6	0,016	-6
<b>12</b>	3,1	Etapa 10	0,5	1,5	0,8	0,008	-7
<b>13</b>	3,1	Etapa 10	0,5	3,5	0,4	0,004	-8
<b>14</b>	0,4	Etapa 13	0,05	0,5	0,2	0,002	-9

### 1.1.30. Prepararea inoculului

#### *Metoda suspensiei directe*

Este cea mai facilă metodă și presupune suspendarea în bulion, sau soluție salină izotonă, a coloniilor bacteriene izolate de pe agarul turnat într-o placă Petri, după 18-24 de ore de incubație.

Inoculul trebuie adus la turbiditatea de 0,5 unități McFarland. Aceasta presupune utilizarea unei suspensii care conține, de exemplu, aproximativ  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml pentru *Escherichia coli* ATCC®a 25922. Pentru verificarea și ajustarea acestei turbidități se va

Raport: Metode clasice perfecționate și pregătite pentru screening: macrodiluție, microdiluție, difuziune în jurul discurilor  
recurge la utilizarea fie a unui aparat fotometric, fie a unei eprubete cu soluție standard (de obicei  $\text{BaSO}_4$  cu turbiditatea de 0,5 McFarland), care va fi comparată vizual pe un fond alb cu linii negre.

#### *Metoda cultivării*

Se aplică pentru germenii mai puțin pretențioși, în situația în care nu sunt disponibile culturi proaspete ale bacteriilor luate în studiu. Astfel, se preiau de pe o placă cu agar două, trei colonii cu morfologie similară și se transferă într-o eprubetă cu 4-5 ml bulion (de obicei bulion tripticază soia). Se incubează la  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  până se atinge o turbiditate de 0,5 unități McFarland sau superioară acestei valori (de regulă după 2-6 ore de incubație).

În interval de 15 minute de la obținerea inoculului cu turbiditatea de 0,5 unități McFarland se va realiza ajustarea suspensiei la  $5 \times 10^5$  UFC/ml (limite  $2-8 \times 10^5$  UFC/ml).

De exemplu, dacă volumul de bulion tripticază soia cu agent antimicrobian din godeuri este 0,1 ml, volumul de inocul care se adaugă nu trebuie să depășească 10%, adică 0,01 ml. Suspensia inițială, cu turbiditatea 0,5 unități McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml), va trebui diluată 1:20 pentru a se atinge densitatea de  $5 \times 10^6$  UFC/ml, apoi se va transfera 0,01 ml din această suspensie în cei 0,1 ml de bulion din godeu, rezultând densitatea cerută, de  $5 \times 10^5$  UFC/ml.

Pentru verificarea purității inoculului se recomandă însămânțarea unui alicot din suspensia ajustată pe o placă cu mediu neselectiv (agar nutritiv). De asemenea, se recomandă verificarea numărului de colonii, pentru a se asigura o densitate de aproximativ  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Pentru aceasta se aspiră 0,01 ml suspensie, din godeul martor imediat după adăugarea inoculului, și se diluează în 10 ml soluție salină izotonă (diluție 1:1000). După omogenizare, se însămânțează 0,1 ml de suspensie pe o placă cu mediu solid. Dezvoltarea a circa 50 de colonii/placă indică o densitate de  $5 \times 10^5$  UFC/ml.

#### *Incubarea*

Plăcile de microtitrare vor fi introduse în termostat în maxim 15 minute de la adăugarea inoculului. Termostatarea se realizează la  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  într-un incubator clasic, pe o perioadă de timp de aproximativ 16-20 de ore.

În vederea termostatării plăcile vor fi introduse în pungi de plastic, vor fi sigilate cu bandă adezivă sau vor fi acoperite cu capacul, pentru a se evita evaporarea conținutului godeurilor. Pentru a asigura aceeași temperatură de incubație pentru toate culturile, se recomandă suprapunerea a maxim patru plăci de microtitrare.

Concentrația minimă inhibitorie este cea mai redusă concentrație a unui agent microbial care inhibă creșterea microorganismelor din godeuri. Citirea se realizează vizual (cu ochiul liber), având ca termen de comparație godeul martor (care conține mediu de cultură și agentul patogen, fără substanța antimicrobială). De asemenea, se pot utiliza și diferite dispozitive de vizualizare, dar se recomandă folosirea acestora doar atunci când capacitatea de a detecta creșterea în godeuri nu este viciată.

Astfel, se va compara gradul de creștere al bacteriilor din godeuri cu nivelul de creștere al bacteriilor din godeurile martor la diferite concentrații ale agenților antimicrobieni. Pentru ca testul să fie considerat valid, creșterea din godeul martor trebuie să fie acceptabilă – sediment de 2 mm sau turbiditate evidentă a mediului.

În cazul testării trimethoprimului și sulfonamidei se va ține cont de faptul că antagoniștii din mediu reduc acțiunea antimicrobială a acestora. Astfel, punctul terminal va fi considerat godeul în care se obține o reducere a creșterii cu 80% comparativ cu godeul martor.