



Raport/Studiu
Stabilirea modelului optim de studiu a
rezistenței
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: Prof. dr. Gabriela Tănăsie, Prof. dr. Carmen Panaitescu

Membri: Doctorand Cristina Gaspar, Doctorand Alina - Georgiana Simina,
Biolog Simona Anghel, Asistent Univ. Csilla Zambori

Data finalizării: 15.11.2020

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Oncogen Research Center* - 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.

1. Introducere

Modelele de infecție non-clinică sunt utilizate în mod obișnuit pentru a caracteriza farmacocinetica/farmacodinamia (FK/FD) pentru preparatele antibacteriene și oferă informații critice pentru stabilirea dozelor de administrat la om. Având în vedere că particularitatea preparatelor antibacteriene o constituie faptul că acestea vizează agentul patogen și nu gazda, farmacologia și microbiologia interacțiunii medicament-agent patogen pot fi studiate și în afara cadrului clinic. Se poate presupune că informații obținute *in vitro* sunt valabile, în general, pentru interacțiunile medicament-agent patogen care apar în timpul infecției unei gazde umane.

Scopul realizării unor modele de infecție neclinice este, în primul rând, de a elucidă relațiile expunere-răspuns și apoi de a stabili și optimiza regimurile de dozare. Este crucial să înțelegem modul în care concentrația pe care un agent terapeutic o atinge la locul infecției primare poate maximiza efectul de distrugere bacteriană și poate minimiza apariția rezistenței bacteriene. Odată ce cunoaștem aceste date, se pot alege dozele potrivite pentru a echilibra aceste obiective menținând în același timp un nivel acceptabil de siguranță la om. Stabilirea relațiilor de expunere-toxicitate și identificarea regimurilor optime de administrare sunt importante deoarece variabilitatea între pacienți poate sprijini în mare măsură atingerea acestui echilibru. Datele dobândite prin modelele *in vitro* sau alte modele neclinice sunt indispensabile pentru selectarea dozelor, stabilirea punctelor de întrerupere a susceptibilității și, în cele din urmă, pentru perfecționarea regimurilor clinice de dozare așa încât să se poată ajunge în situația ca toți pacienții să beneficieze de expuneri eficiente la medicamente, limitând în același timp dezvoltarea rezistenței (Bulitta și colab., 2019).

La ora actuală poate fi dificil sau practic imposibil de găsit și recrutat un număr suficient de pacienți (de exemplu, cei cu infecții cauzate de agenți patogeni multidrezistenți) pentru mai multe studii clinice la scară largă concepute pentru testarea noilor preparate. În consecință, poate exista o mare dependență de datele non-clinice care susțin și sporesc cunoștințele obținute în urma studiilor la om. Aceste date cuprind, de asemenea un element important al documentelor de reglementare, după cum reiese din orientări publicate de Agenția Europeană pentru Medicamente (EMA).

2. Considerații privind conceperea modelelor *in vitro*

Selecția tulpinii. Analizele robuste necesită examinarea mai multor tulpini care ar trebui să includă o tulpină de referință (de exemplu, o tulpină ATCC disponibilă pe scară largă) și una susceptibilă precum și două izolate clinice mai puțin sensibile; acestea din urmă pot include o tulpină de la un pacient din terapie intensivă și o tulpină de la un pacient care nu este în terapie intensivă. Tulpinile ar trebui să fie relevante pentru indicația clinică și scopul studiului; acestea ar trebui să includă diferite mecanisme de rezistență și o gamă relevantă (largă) de susceptibilitate la medicamentul studiat. Studiile care evaluează seturi izogene de tulpini pot furniza informații valoroase despre impactul unui mecanism

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistenței

de rezistență specific. Mai mult, tulpinile alese ar trebui să reprezinte cea mai comună mutație frecventă. Acest lucru necesită determinarea mutațiilor frecvente pentru o serie de tulpini; se recomandă testarea a cel puțin trei tulpini ale unei bacterii ale unei specii date. Tulpinile de referință ar trebui utilizate pe parcursul cercetării pentru a demonstra reproductibilitatea. În cele din urmă, dacă este posibil, tulpinile alese ar trebui să fie virulente în modelele animale pentru a sprijini translația eficientă la studii pe animale și virulența trebuie confirmată înainte de efectuarea studiilor *in vitro* (Landersdofer și colab., 2018).

Inoculul și frecvența mutațiilor. Inoculul bacterian inițial trebuie să fie relevant pentru indicația clinică și scopul studiului. Un inocul mare este de obicei utilizat în studiile care vizează pneumonie bacteriană asociată ventilatorului și dobândită în spital și în studii de prevenire a rezistenței. Experimente cu un inocul bacterian total mai mic decât 10^6 UFC nu sunt de obicei relevante pentru indicațiile clinice. Cu toate acestea, studiile de inoculare cu doză redusă pot fi extrem de potrivite pentru a aborda întrebări cum ar fi rata formării de novo a mutațiilor rezistenți sau toleranța fenotipică a populației predominante (Bulitta și colab., 2011).

Durata terapiei și prevenirea rezistenței. Durata studiului depinde de obiectivele studiului. Pentru a determina indici FC/FD care prezic cel mai bine distrugerea bacteriană, studiile pe termen scurt pe aproximativ 1 până la 3 zile pot fi suficiente; sunt necesare studii mai lungi pentru replicarea lentă a bacteriilor și ar trebui să ia în considerare și timpul de diviziune celulară. Pentru a evalua expunerea la medicamente care țintesc bacterii rezistente și pentru a concepe regimurile de dozare care suprimă amplificarea rezistenței, durata tratamentului trebuie să imite durata indicației clinice terapeutice, de obicei, cel puțin 5 până la 8 zile (Louie și colab., 2010).

Stabilitatea medicamentelor. Este esențial să se evalueze solubilitatea și stabilitatea medicamentului în funcție de condiții (solvenți, medii, temperaturi de stocare și experimentare, precum și durata experimentelor planificate) Multe antibiotice sunt hidrofile și solubile în apă, dar unele au o solubilitate limitată și concentrațiile lor pot scădea în timp datorită precipitării lente. În plus, unele preparate testate se pot lega nespecific de baloane, tuburi, filtre și fibre fiind important de evaluat dacă aceste probleme există pentru medicamentul studiat (O'Shea și Moser, 2008).

Profilurile de concentrare a medicamentelor. Când sunt disponibile, ar trebui utilizate datele provenite de la pacienții cu infecție, cum ar fi date despre legarea de proteine și farmacocinetica. Acest lucru este important deoarece profilurile de expunere la pacienți poate diferi de cei de la voluntarii sănătoși și variabilitatea între pacienți poate să fie substanțială la bolnavii critici. De remarcat, infecția și inflamația asociată pot modifica expunerea la medicamente în fluidul periepitelial (ELF) sau în lichidul cefalorahidian (LCR) și unele antibiotice au o distribuție eterogenă între țesuturile și organele majore. De exemplu, polimixina B se acumulează în rinichi, dar mai puțin în plămâni. Mai este important de înțeles și de simulat expunerile la medicamente care nu sunt legate de proteine, care sunt relevante la locul infecției. Dacă un metabolit activ contribuie la uciderea generală a bacteriilor, atât molecula sursă cât și metabolitul trebuie evaluate separat și profilurile de concentrație-timp ale ambelor compuși trebuie generați *in vitro* la valorile găsite la infecția la pacienți (Bergen și colab., 2006).

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistenței

Cuantificarea populațiilor bacteriene. Impactul expunerii la medicamente asupra tuturor populațiilor bacteriene, inclusiv a celor mai puțin sensibile ar trebui evaluate (Ly și colab., 2015) atunci când obiectivele studiului includ evaluarea prevenirii rezistenței.

•Probleme ridicate de interpretarea rezultatelor *in vitro*

Datele generate folosind sistemele *in vitro* oferă informații valoroase asupra interacțiunii directe dintre agentul patogen și medicament. În unele cazuri, rezultatele s-ar putea să nu se traducă direct în clinică, deoarece *in vitro* sistemele nu imită pe deplin mediul *in vivo*. Țintele necesare în pacienți pot fi mai mici sau mai mari decât cele *in vitro* dacă factorii gazdă afectează uciderea bacteriană sau dacă *in vivo* capacitatea mutanților rezistenți este redusă. O țintă *in vivo* poate să fie mai puțin rezistentă dacă răspunsul imun contribuie semnificativ la uciderea bacteriană; dimpotrivă, ținta *in vivo* poate fi mai puternică dacă factorii gazdă reduc susceptibilitatea bacteriilor (de exemplu, datorită legării de surfactantul pulmonar sau persistenței în adâncime sau în locurile de infecție sechestrare). Mai mult, trebuie luată în considerare legarea medicamentului în plasmă, deoarece, în general, este disponibil doar partea de medicament liber va putea interacționa cu receptorii bacterieni.

În cazul studiilor de rezistență poate fi prudent să interpretăm rezultatele ca pe o evaluare a riscului în absența factorilor gazdă (de exemplu, sistemul imunitar), mai degrabă decât ca o predicție directă a rezultatului clinic (Rees și colab., 2016). De exemplu, în timp ce modelele *in vitro* sunt excelent pentru studierea aminoglicozidelor ca parte a regimurilor combinate, nu sunt potrivite pentru testarea monoterapiei cu aminoglicozide, deoarece aceasta clasa de medicamente generează cu ușurință variante cu colonii mici, care sunt mai puțin frecvente *in vivo* (Drusano și colab., 2009).

Evaluarea ulterioară a combinațiilor de medicamente sinergice, precum și a condițiilor fizice și virulenței *in vivo* poate ghida translația către modele animale și, în cele din urmă, către pacienți.

În continuarea acestui studiu vom prezenta propunerea noastră de modelare *in vitro* a rezistenței bacteriene cu ajutorul tehnicilor de formare a biofilmelor.

S-au utilizat tulpini bacteriene multirezistente de E. Coli, respectiv Stafilococ multirezistent, provenite din banca proprie de tulpini bacteriene multirezistente generată în etapa inițială a acestui proiect.

Ca tehnică de bază s-a utilizat tehnica în plăci de microtitrare, dar s-a încercat o posibilă optimizare a tehnicilor de lucru care să permită reducerea consumului de reactivi și/sau a timpului de lucru.

3. Investigarea proprietății unor tulpini bacteriene de *E. Coli* multirezistent de a forma biofilme

3.1. Materiale și metode

Au fost investigate 6 tulpini *E. Coli* multirezistent provenite din banca de bacterii generată în proiectul de față (1. CO1165, 2. CP7921, 3. DK0336, 4. CU0181, 5. DM3527, 6. CO1453)

S-a utilizat următorul protocol de lucru:

- Din cultura de 24 h (agar cu sânge), s-au prelevat colonii izolate și s-au inoculat în bulion cord-creier (BHI), pentru a obține un inocul echivalent standardului McFarland 0,5 (a fost suficientă o singură colonie);
- Din inoculul corespunzător fiecărei tulpini, s-au transferat câte 150 μl în godeurile plăcilor de microtitrare (2 plăci). Ca martor, s-a folosit BHI. Plăcile au fost lăsate la incubat, în termostatul clasic, 72 h la 37°C. Modul în care s-au distribuit martorii și tulpinile în godeuri este descris în figura 1;
- După expirarea timpului, s-au parcurs următoarele etape:
 - îndepărtare bulion+cultură din godeuri,
 - spălare 1x cu ser fiziologic 160 μl – pentru ambele plăci;
 - colorare cu cristal violet 1% 160 μl/10 min,
 - îndepărtare colorant,
 - 2 spalari la interval de 7 zile cu ser fiziologic 160 μl,
 - decolorare cu etanol 96% 160 μl/30 min – pentru o singură placă, din cealaltă urmând a fi recoltate probele pentru cuantificarea celulelor viabile din biofilm;
- Citirile s-au făcut la spectrofotometrul Tecan, la 540 nm, iar valorile de la care s-a pornit interpretarea, reprezintă media a 3 citiri consecutive.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 1. Modul în care s-au distribuit martorii și tulpinile în godeuri.

Coloanele 1 și 12 – libere; Coloana 2 și linia H – martori (bulion)

Coloanele 3,4,5/6,7,8/9,10,11 – tulpini bacteriene (21 godeuri/tulpină)

Pentru **cuantificarea celulelor bacteriene viabile aderente în biofilm** (CFU/ml prin tehnica diluțiilor zecimale), pentru fiecare tulpină, s-a recoltat, de pe placa necolorată, din godeul corespondent celei mai mari valori a densității optice. S-a folosit o singură placă pentru fiecare diluție și s-a însămânțat doar din ultimele 3 diluții (10^{-3} , 10^{-4} și 10^{-5}) (ziua 1).

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistenței

În ziua 7, pentru fiecare tulpină, s-a recoltat din godeurile (corespondent, de pe placa necolorată) cu **valori ale densității optice aproape de medie**. S-a însămânțat din aceleași diluții, cu mențiunea că la diluția 10^{-4} s-au folosit 2 plăci: agar nutritiv simplu și agar cu sânge, pentru a vedea dacă rezultatele sunt similare și dacă astfel, se poate face economie la agarul cu sânge. Pentru că agarul nutritiv simplu, proaspăt preparat și turnat în plăci, nu poate îngloba 1 ml de lichid (cum se întâmplă în cazul agarului cu sânge gata turnat în plăci, care se deshidratează prin stocare), volumul însămânțat a fost de 0,5 ml. S-au luat în considerare plăcile cu 25-300 colonii, cu condiția să respecte titrul diluției și coloniile să nu fie confluate. S-a folosit următoarea formulă de calcul:

$$CFU/ml = \frac{\sum (\text{nr. colonii} \times \text{diluție})}{\text{nr. plăci} \times \text{volumul însămânțat}}$$

Modul de calcul al valorilor finale pentru densitățile optice

Pentru a înlătura valorile extreme (cele care nu s-au încadrat în $\pm 1\sigma$ abatere de la distribuția normală), s-a calculat întâi deviația standard pentru fiecare categorie de valori (34 de martori și 21 godeuri/tulpină). Ulterior, valorile extreme au fost excluse și s-a recalculat valoarea medie a martorului. Pentru fiecare tulpină, din fiecare valoare rămasă, s-a scăzut valoarea medie a martorului și din nou s-a calculat deviația standard, pentru a exclude încă o dată extremele. În final, s-au calculat media și deviația standard pentru tulpinile luate în studiu, precizându-se pentru fiecare și numărul valorilor extreme excluse.

Pentru a stabili dacă **numărul de bacterii aderente în biofilm are vreo influență asupra masei totale de biofilm (densitatea optică)**, s-a aplicat **corelația Pearson**.

3.2. Rezultate

Ziua 1

- martorii au fost colorați (fără ca la scoaterea din termostat să se observe contaminarea/însămânțarea lor cu tulpini din godeurile alăturate);
- în cadrul aceleiași tulpini, biofilmele din godeurile marginale au încorporat mult mai mult colorant decât cele aflate mai în interiorul plăcii („**edge effect**” sau **efectul de margine**). Efectul de margine apare în godeurile marginale din două motive: în primul rând, acestea sunt mai expuse evaporării în timpul incubării (ceea ce face ca și celulele în mod obișnuit neaderente/neîncorporate în biofilm, să se atașeze la godeu/la pereți și să nu poată fi îndepărtate în totalitate prin spălare) și în al doilea rând, celulele bacteriene aflate aici beneficiază de mai mult oxigen decât cele aflate în godeurile din interior, ceea ce le favorizează multiplicarea și capacitatea de a produce biofilm.

Cuantificarea celulelor bacteriene viabile aderente în biofilm

- La primele două diluții, numărul de colonii nu a putut fi cuantificat (mult peste 300), iar la 10^{-5} , numărul de colonii de pe placă a variat de la 56 la 138, cu valorile finale redată în Tabelul 1.
- S-a constatat că între cele două variabile (numărul de bacterii aderente în biofilm și masa totală a biofilmului, exprimată în DO), nu există corelație $r(62)=0.1779$, $p=0.1596$ (Fig. 2).

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistenței

Tabel 1. Media, deviația standard, numărul celulelor viabile aderente în biofilme și numărul valorilor extreme eliminate, pentru tulpinile de *E. coli*, din ziua 1

	CO1165	CP7921	DK0336	CU0181	DM3527	CO1453	TOTAL
Medie (DO)	0.115582	0.880945	0.371791	0.132527	0.029232	0.219874	
DS	0.054273	0.083929	0.137623	0.019853	0.015438	0.046503	
CFU/ml	56 x 10 ⁵	104 x 10 ⁵	74 x 10 ⁵	71 x 10 ⁵	138 x 10 ⁵	81 x 10 ⁵	
Nr. valori eliminate	9	9	13	11	12	8	62
Total godeuri	21	21	21	21	21	21	126

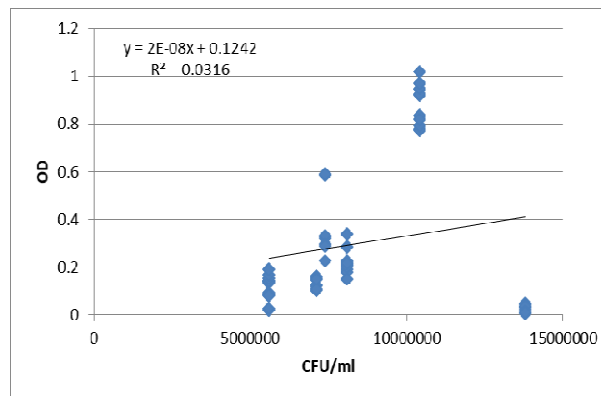


Figura 2. Lipsa corelației între numărul de bacterii aderente în biofilm și masa totală a biofilmului

- **Ziua 2**

- rezultatele au fost neomogene, ceea ce a condus la excluderea unui număr ușor mai mare de valori, de la calcularea mediilor (Tabelul 2).
- efectul de margine a fost și el, aparent, mai pronunțat, în aceleași condiții de incubare ca și în ziua 1 (figura 3)
- S-a constatat că între cele două variabile există o corelație negativă acceptabilă $r(59) = -0.5955$, $p < 0.00001$, masa totală a biofilmului depinzând în proporție de 35.47% de numărul de bacterii aderente în biofilm (figura 4).

Tabel 2. Media, deviația standard, numărul celulelor viabile aderente în biofilme și numărul valorilor extreme eliminate, pentru tulpinile de *E. coli*, din ziua 2

	CO1165	CP7921	DK0336	CU0181	DM3527	CO1453	TOTAL
Medie (DO)	0.363226	0.671408	1.26464	0.290696	0.054717	0.679466	
DS	0.085919	0.107018	0.411332	0.045167	0.04611	0.282692	
CFU/ml	77.5 x 10 ⁴	36.5 x 10 ⁴	40 x 10 ⁴	92 x 10 ⁴	34 x 10 ⁵	26 x 10 ⁴	
Nr. valori eliminate	9	8	14	10	13	11	65
Total godeuri	21	21	21	21	21	21	126

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistenței



Figura 3. Se pot observa urme de colorant rămase în partea superioară a unor godeuri, care ulterior au fost antrenate în interior în timpul decolorării, ducând la valori false

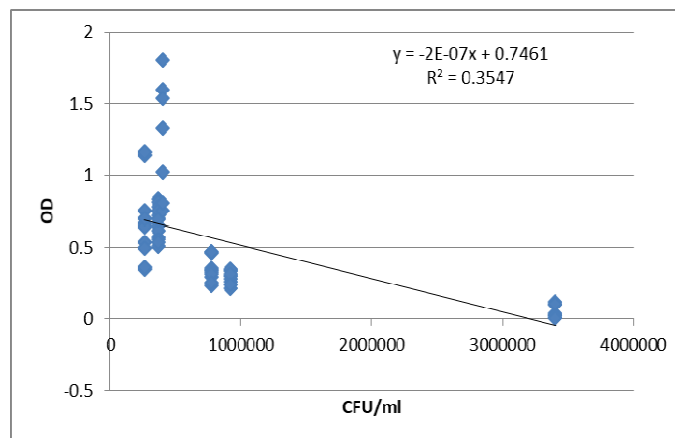


Figura 4. Corelație negativă acceptabilă între densitatea optică a masei totale de biofilm (OD) și numărul bacteriilor aderente (CFU/ml)

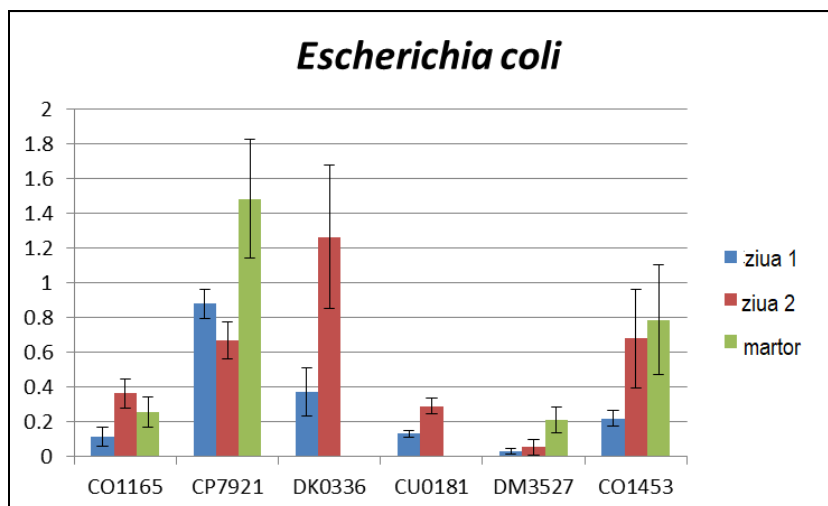


Figura 5. Reprezentarea grafică a rezultatelor celor trei determinări efectuate pe aceleași tulpini bacteriene (media±DS). Între numărul valorilor excluse, în urma determinărilor din ziua 1 și ziua 7, nu există diferențe semnificative $\chi^2(1, N=252) = 0.1429$, $p = 0.705448$ (testul Chi-pătrat).

4. Investigarea proprietății unor tulpini bacteriene de Stafilococ multirezistent de a forma biofilme

4.1. Materiale și metode

Au fost investigate 5 tulpini Stafilococ aureus multirezistent provenite din banca de bacterii generată în proiectul de față (1. CP7438, 2. CO0587, 3. CP7170, 4. CP8150, 5. CL9002).

Pentru fiecare tulpină s-au făcut două determinări:

- pentru prima determinare, s-a respectat aceeași distribuție a tulpinilor în godeuri, ca și în cazul determinărilor anterioare (E. coli), însă plăcile au fost incubate la camera climatică, la temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ și umiditate relativă 95%. Toate referirile la acest protocol vor fi notate, în continuare, cu prescurtarea „CC”.
- pentru ce-a de-a doua determinare, tulpinile au fost distribuite în godeuri conform protocolului prezentat de Shukla și Toleti (2017), astfel încât să se încerce reducerea efectului de margine. Modul de distribuire este redat în figura 5. Plăcile au fost incubate la termostat, la 37°C . Toate referirile la acest protocol vor fi notate, în continuare, cu prescurtarea „EE”

S-a urmat același protocol de lucru ca și în cazul tulpinilor de E. coli, cu următoarele diferențe:

- Din inoculul corespunzător fiecărei tulpini, s-au transferat câte 150 μl în godeurile plăcilor de microtitrare (2 plăci). Ca martor, s-a folosit BHI.
- După expirarea timpului, s-au parcurs următoarele etape: îndepărtare bulion+cultură din godeuri, spălare 1x cu ser fiziologic 160 μl – pentru ambele plăci; colorare cu cristal violet 1% 160 μl / 10 min, îndepărtare colorant, spălare 3x cu ser fiziologic 200 μl , decolorare cu etanol 96% 160 μl / 30 min – pentru o singură placă, din cealaltă urmând a fi recoltate probele pentru cuantificarea celulelor viabile din biofilm;
- Citirile s-au făcut la spectrofotometrul Tecan, la 540 nm, iar valorile de la care s-a pornit interpretarea, reprezintă media a 3 citiri consecutive.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 5. Modul în care s-au distribuit martorii și tulpinile în godeuri.

Marcajul verde –ser; marcajul galben – martori (bulion)

Coloanele cu diferite nuanțe de gri – tulpini bacteriene (12 godeuri/tulpină).

Pentru **cuantificarea celulelor bacteriene viabile aderente în biofilm** (CFU/ml prin tehnica diluțiilor zecimale), pentru fiecare tulpină, s-a recoltat, din godeurile

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistenței

(corespondent, de pe placa necolorată) cu valori ale densității optice cât mai apropiate de valoarea medie. S-au folosit 2 plăci cu agar nutritiv pentru fiecare diluție și s-a însămânțat din diluțiile 10^{-2} , 10^{-3} și 10^{-4} . Volumul însămânțat a fost de 0,2 ml. S-au luat în considerare plăcile cu 25-300 colonii, cu condiția să respecte titrul diluției și coloniile să nu fie confluate. S-a folosit următoarea formulă de calcul:

$$\text{CFU/ml} = \frac{\Sigma (\text{nr. colonii} \times \text{diluție})}{\text{nr. plăci} \times \text{volumul însămânțat}}$$

Modul de calcul al valorilor finale pentru densitățile optice

S-a folosit același protocol ca în cazul E. coli

Pentru a stabili dacă **numărul de bacterii aderente în biofilm are vreo influență asupra masei totale de biofilm (densitatea optică)**, s-a aplicat **corelația Pearson**.

4.2. Rezultate

Tabel 3. Media, deviația standard, numărul celulelor viabile aderente în biofilme și numărul valorilor extreme eliminate, pentru tulpinile de *S. aureus* – protocolul EE

	CP7438	CP7170	CP8150	CL9002	CO0587	TOTAL
Medie (DO)	0.283805	0.040724	0.408894	0.09568	0.336069	
DS	0.023113	0.005345	0.053726	0.0397	0.028633	
CFU/ml	$106,3 \times 10^4$	3×10^4	$62,5 \times 10^3$	26×10^4	106×10^4	
Nr. valori eliminate	6	7	5	4	7	29
Total godeuri	12	12	12	12	12	60

S-a constatat că între numărul de bacterii aderente în biofilm și masa totală a biofilmului, exprimată în DO), există o corelație pozitivă slabă $r(29)=0.3125$, dar ne semnificativă din punct de vedere statistic $p=0.086$ (Fig. 6).

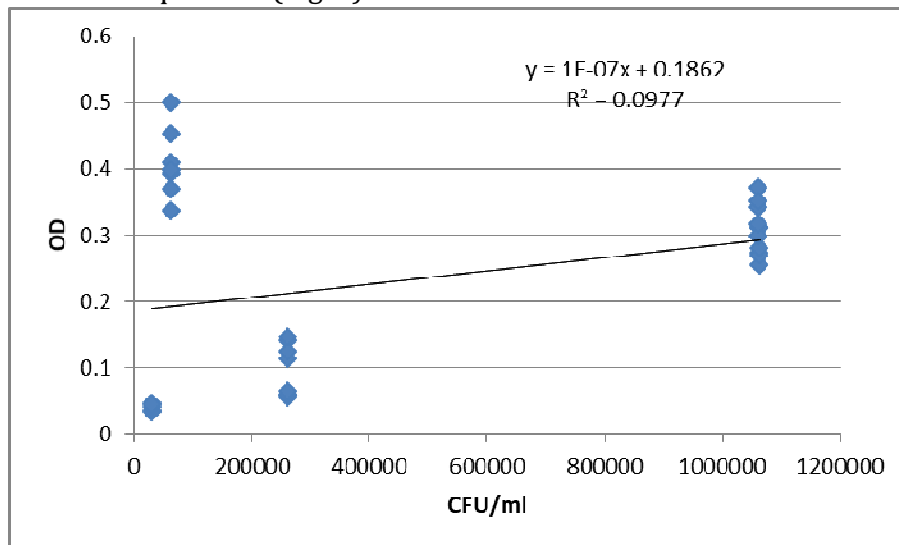


Figura 6. Corelație negativă slabă, dar fără semnificație, între densitatea optică a masei totale de biofilm (OD) și numărul bacteriilor aderente (CFU/ml)

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistenței

Tabel 4. Media, deviația standard, numărul celulelor viabile aderente în biofilme și numărul valorilor extreme eliminate, pentru tulpinile de *S. aureus* – protocolul CC

	CP7438	CP7170	CP8150	CL9002	CO0587	TOTAL
Medie (DO)	0.726884	0.201412	0.954736	0.208999	0.783432	
DS	0.039399	0.069513	0.114076	0.069468	0.055975	
CFU/ml	70,5 x 10 ⁴	45,5 x 10 ³	130,5 x 10 ³	17,2 x 10 ⁴	2,8 x 10 ⁴	
Nr. valori eliminate	12	11	12	10	8	53
Total godeuri	21	21	21	21	21	105

S-a constatat că între numărul de bacterii aderente în biofilm și masa totală a biofilmului, exprimată în DO), nu există corelație $r(50)=0.1722$, $p=0.222$ (Fig. 7).

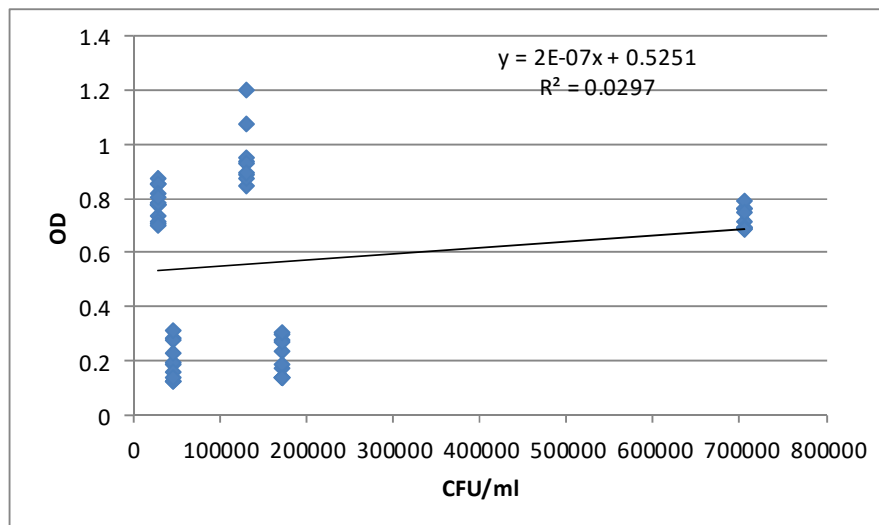


Figura 7. Lipsa corelației între numărul de bacterii aderente în biofilm (CFU/ml) și masa totală a biofilmului (OD)

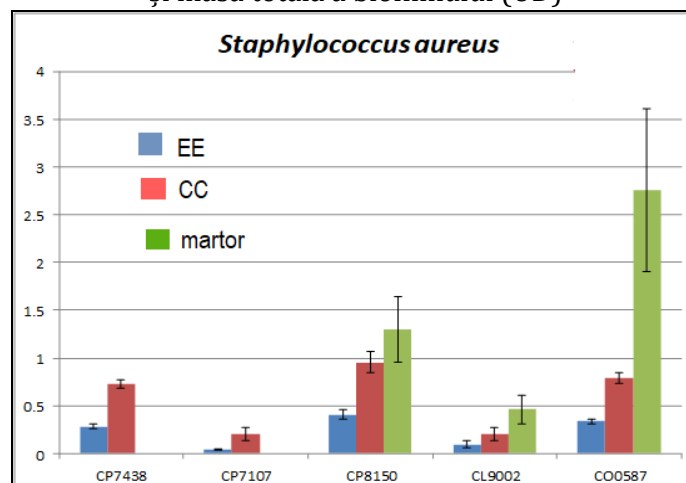


Figura 8. Reprezentarea grafică a rezultatelor celor trei determinări efectuate pe aceleași tulpini bacteriene (media±DS)

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistenței

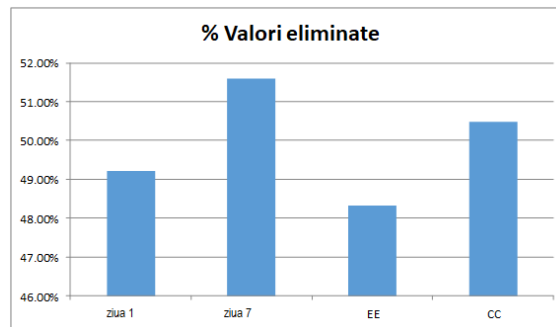


Figura 9. Proportia valorilor eliminate, în cadrul celor patru determinări efectuate pe tulpinile de *E. coli* și *S. aureus*

În Fig. 9, se observă că, indiferent de protocolul de lucru aplicat, aproximativ jumătate din valorile citite pentru fiecare tulpină, au fost eliminate ca urmare a neîncadrării într-o abatere de la distribuția normală a mediei, cu variații de la 48,33% în cazul protocolului EE până la 51,59%, în cazul determinării din 10.08. Diferențele dintre numărul valorilor eliminate, în cadrul diferitelor protocoale, sunt nesemnificative din punct de vedere statistic $X^2(3, N=417) = 0.2325, p = 0.9721$ (testul Chi-pătrat).

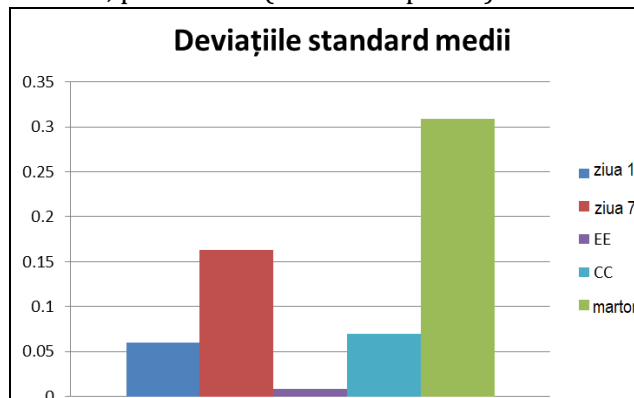


Figura 10. Valorile medii ale deviațiilor standard, obținute în urma diferitelor protocoale

În Fig. 10 se observă că valoarea medie a deviațiilor standard obținute în urma protocolului prin care s-a încercat minimalizarea efectului de margine, este cea mai scăzută ($p < 0,05$) (Anova One Way).

Întrucât în cadrul protocolului EE, au fost eliminate cele mai puține valori (Fig. 9) și s-au obținut cele mai mici deviații standard (Fig. 10) apare recomandarea de a fi utilizat, pentru obținerea unor rezultate cât mai omogene, dar și datorită faptului că volumul de muncă se reduce considerabil, întrucât etapele de spălare, colorare, îndepărtare a excesului de colorant prin spălări multiple, decolorare, vor fi efectuate pe mai puține godeuri decât în cazul protocolului clasic.

Această concluzie e sprijinită și de imaginile din figurile 11-13.

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistenței

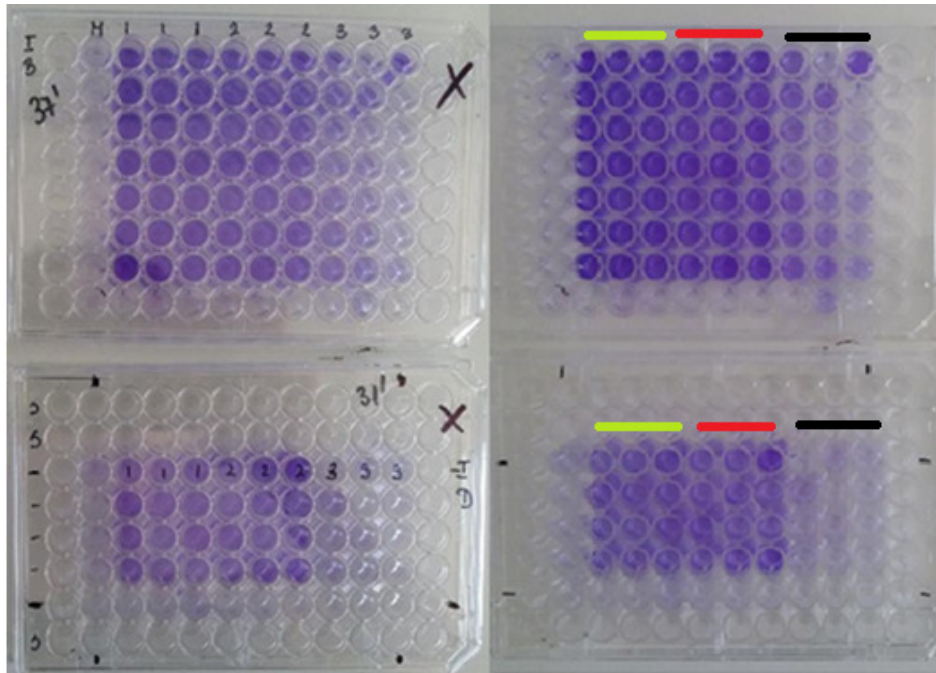


Figura 11. Protocolul CC – partea superioară a imaginii; Protocolul EE – partea inferioară (culturile diferite indică cele 3 coloane aferente fiecărei tulpini)

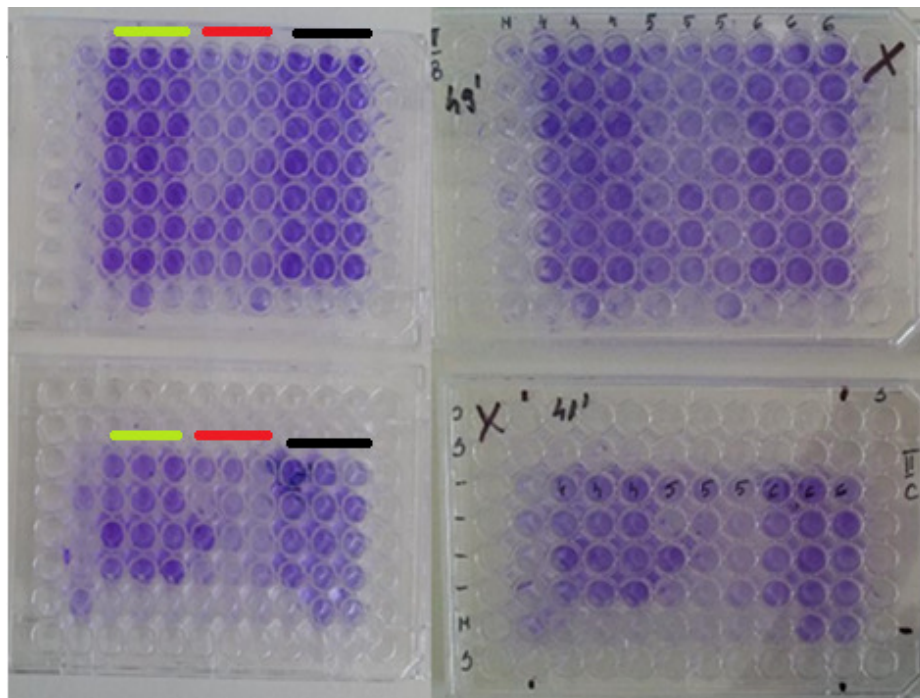


Figura 12. Protocolul CC – partea superioară a imaginii; Protocolul EE – partea inferioară (culturile diferite indică cele 3 coloane aferente fiecărei tulpini)

R. 2.7.1 Stabilirea modelului optim de studiu a rezistentei

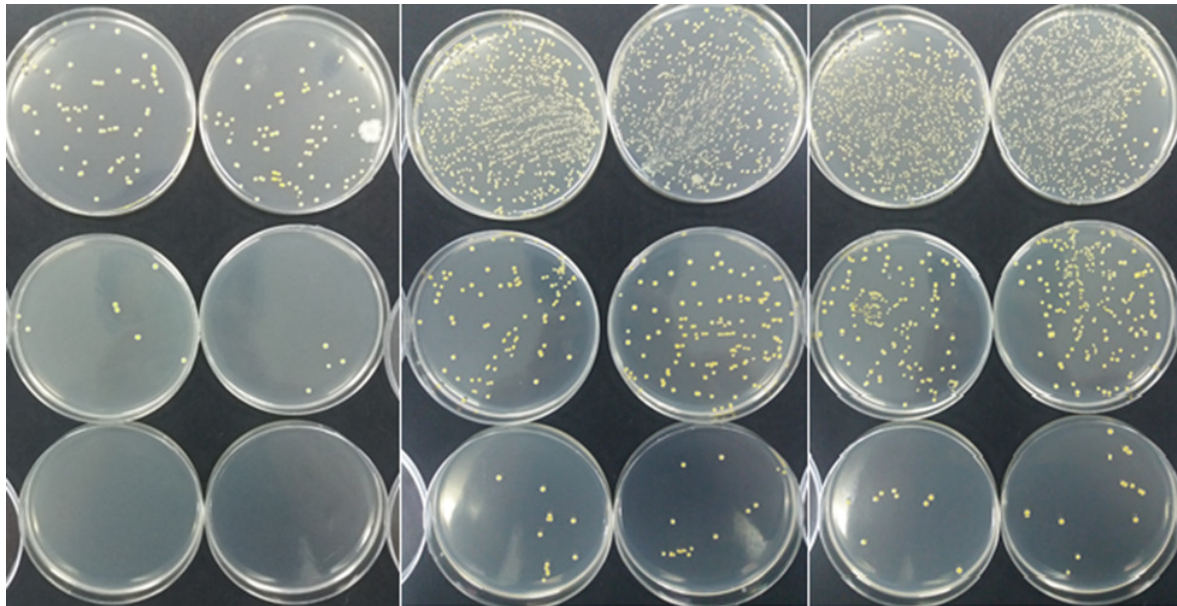


Figura 13. Aspectul coloniilor de stafilococi, pe agar nutritiv (tehnica diluțiilor zecimale)

Bibliografie

1. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. (2006). Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1953–1958.
2. Bulitta JB, Hope WW, Eakin AE, Guina T, Tam VH, Louie A., Drusano GL, Hoover JL. (2019) Generating Robust and Informative Nonclinical *In Vitro* and *In Vivo* Bacterial Infection Model Efficacy Data To Support Translation to Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63, 5: e02307-18
3. Bulitta JB, Landersdorfer CB, Forrest A, Brown SV, Neely MN, Tsuji BT, Louie A. (2011). Relevance of pharmacokinetic and pharmacodynamics modeling to clinical care of critically ill patients. *Curr Pharm Biotechnol* 12:2044 –2061.
4. Drusano GL, Liu W, Fregeau C, Kulawy R, Louie A. (2009). Differing effects of combination chemotherapy with meropenem and tobramycin on cell kill and suppression of resistance of wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and its isogenic MexAB efflux pump-overexpressed mutant. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2266 –2273.
5. Landersdorfer CB, Yadav R, Rogers KE, Kim TH, Shin BS, Boyce JD, Nation RL, Bulitta JB. (2018) Combating carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by an optimized imipenem-plus-tobramycin dosage regimen: prospective validation via hollow-fiber infection and mathematical modeling. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
6. Louie A, Grasso C, Bahniuk N, Van Scoy B, Brown DL, Kulawy R, Drusano GL. (2010). The combination of meropenem and levofloxacin is synergistic with respect to both *Pseudomonas aeruginosa* kill rate and resistance suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2646 –2654.
7. Ly NS, Bulitta JB, Rao GG, Landersdorfer CB, Holden PN, Forrest A, Bergen PJ, Nation RL, Li J, Tsuji BT. (2015). Colistin and doripenem combinations against *Pseudomonas aeruginosa*: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance. *J Antimicrob Chemother* 70:1434 –1442.
8. O'Shea R, Moser HE. (2008) Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *J Med Chem* 51:2871–2878
9. Rees VE, Bulitta JB, Oliver A, Tsuji BT, Rayner CR, Nation RL, Landersdorfer CB. (2016). Resistance suppression by high-intensity, shortduration aminoglycoside exposure against hypermutable and nonhypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 71:3157–3167
10. Shukla S, Toleti SR. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Micro-Titre Plate. 2017; 10.1101/100214