

STRATEGII DE TESTARE IN VITRO A SUPRAFETELOR NEPOROASE CU PROPRIETĂȚI ANTIBACTERIENE

STRATEGIES FOR IN VITRO TESTING OF NON-POROUS SURFACES WITH ANTIBACTERIAL PROPERTIES

Cristina Adochițe¹, Sarah Costinaș¹, Mihaela Badea¹, Liliana Rogoza¹, Cătălin Vițelaru², Mihaela Idomir¹

¹Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania din Brașov, România

²National Institute of Research and Development for Optoelectronics – INOE 2000, Măgurele-Ilfov, Romania

Autor corespondent: Mihaela Idomir, email midomir@unitbv.ro

Abstract:

Introduction: Non-porous surfaces with antibacterial properties have begun to gain notoriety because strategies are being sought to prevent infections by methods that are as safe as possible for the human body.

Objectives: Test methods can be variate, such as: ISO 22196 standardized testing, inoculation testing with sterile swab, bacteriological loop and touch-transfer assay. The steps followed in developing and choosing the right strategy for each surface aim at the following aspects, namely: sterilization of working materials to remove the possibility of bacterial superinfection and to correctly interpret the results, selection of bacterial strains and in vitro growth conditions, selection of sampling and colony counting and choice of method for validating and reporting of results.

Discussions: The advantages of the in vitro experimental technique is that it can be easily repeated and reproduced, which helps to draw conclusions about the proven efficacy of the antimicrobial property. However, there are also limitations of this test, namely the fact that the results cannot be extrapolated to in vivo conditions because the very important parameters for bacterial proliferation cannot be maintained and controlled.

Conclusions: These aspects are important for evaluating the real efficiency of surfaces with antibacterial properties.

Rezumat:

Introducere: Suprafețele neporoase cu proprietăți antibacteriene au început să capete notorietate deoarece se caută strategii de a preveni infecțiile prin metode cât mai sigure pentru organismul uman.

Scop: Metodele de testare pot fi variate, precum testarea standardizată ISO 22196, testarea prin inoculare cu ajutorul tamponului steril, cu ajutorul ansei bacteriologice și prin metoda amprentării. Etapele urmărite în dezvoltarea și alegerea strategiei potrivite pentru fiecare suprafață în parte urmăresc următoarele aspecte, și anume: sterilizarea materialelor de lucru pentru a înlătura posibilitatea unei suprainfecții bacteriene și pentru a interpreta corect rezultatele, selectarea tulpinilor bacteriene și a condițiilor de creștere in vitro, selectarea modalităților de eșantionare și numărare a coloniilor și alegerea metodei de validare a raportării rezultatelor.

Discuții: Avantajele tehnicilor experimentale in vitro constau în faptul că pot fi repetate și reproduse facil, aspect care ajută la obținerea de concluzii cu privire la eficiența dovedită a proprietății antimicrobiene. Însă, există și limitări ale acestei testări și anume faptul că rezultatele nu se pot extrapola la condițiile in vivo deoarece nu se pot menține și controla parametrii foarte importanți pentru proliferarea bacteriană.

Concluzii: Aceste aspecte sunt importante pentru evaluarea eficienței reale a suprafețelor cu proprietăți antibacteriene.

Key-words: *antibacterial activity, non-porous surfaces, methods of testing, antibacterial properties*

Cuvinte cheie: *activitate antibacteriană, suprafețe neporoase, metode de testare, proprietăți antibacteriene*

I. Introducere

Infecțiile nosocomiale sunt definite ca fiind infecții dobândite de un pacient care a fost internat într-un spital sau în altă unitate medicală și la momentul internării nu suferea de infecții.

Infecțiile nosocomiale reprezintă o problemă foarte importantă de sănătate publică numărul acestora fiind de circa 8,9 milioane de cazuri în țările Uniunii Europene în perioada 2016-2017 (Perez-Gavilan et al., 2021; Suetens et al., 2018).

Infecțiile nosocomiale pot fi cauzate de diverși agenți patogeni care provin de la alți pacienți, de la personalul medical sau din mediul spitalicesc. Suprafețele atinse mai frecvent, ca mânerle ușilor, mesele, butoanele de asistență medicală sau șinele de pat pot să fie contaminate de agenți potențial patogeni capabili să formeze biofilme și să supraviețuiască pe suprafețe pentru o lungă perioadă de timp. Este cunoscut faptul că unele bacterii rezistente la antibiotice precum MRSA (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) și VRE (Vancomycin Resistant Enterococci) pot să supraviețuiască săptămâni întregi pe diferite suprafețe (Neely and Maley, 2000; Dancer, 2008; Martinez et al., 2003). Pot fi implicate etiologic în infecții nosocomiale și alte microorganisme precum Clostridium difficile (Kaatz et al., 1988), bacili Gram negativi MDR (Multidrug Resistant) cum sunt Pseudomonas, Acinetobacter și Enterobacteriaceae (Tankovic et al., 1994), Norovirus, Coronavirus (Green et al., 1998), diverse specii de Candida. În consecință, utilizarea de protocoale adecvate pentru curățarea și dezinfectarea suprafețelor din spitale sunt cruciale pentru a preveni apariția infecțiilor nosocomiale. Folosirea de diverși dezinfectanți pentru suprafețe este cel mai des practică dar poate fi asociată cu unele dezavantaje legate de faptul că trebuie să fie utilizate în anumite concentrații având grade variate de toxicitate, pot fi aplicate incorect și activitatea lor bactericidă este de scurtă durată, recontaminarea fiind posibilă din nou în câteva minute (Perez-Gavilan et al., 2021).

Se discută tot mai mult faptul că suprafețele modificate pot duce la scăderea atașării bacteriene și dezvoltării microorganismelor. A crescut astfel interesul pentru cercetarea filmelor polimerice cu suprafețe structurate cu proprietăți intrinseci sau a filmelor cu agenți antibacterieni încorporați. Există studii care demonstrează faptul că diferiți polimeri cu micro- și nano-topografii specifice pot inhiba atașarea, creșterea și răspândirea microorganismelor (Mann et al., 2014; Adlhart et al., 2018; Ivanova et al., 2013). Au fost dezvoltate diferite materiale polimerice tratate cu argint, cupru, policiați, triclosan, bacteriofagi sau radicali biotoxici cu lumină activată (Cobrado et al., 2017; Champagne and Helfritch, 2013). Dezvoltarea unor suprafețe de acest tip, cu proprietăți anti-

bacteriene, poate avea impact mare în privința stopării dezvoltării infecțiilor. Acestea pot avea aplicabilitate multiplă, nu doar în spitale, ci pot fi utilizate și de populație pe diferite device-uri (Sbera et al., 2020).

Pentru a evalua activitatea filmelor cu proprietăți antibacteriene, sunt necesare teste adecvate. Standardul ISO 22196 (metoda de testare japoneză JIS Z 2801) este utilizat pentru măsurarea activității antibacteriene pe suprafețele din plastic (ISO 22196, 2011). Unele studii însă au descris acest test ca fiind inadecvat, deoarece temperatura de incubație ($35\pm 1^\circ\text{C}$) și umiditatea relativă (peste 90%) nu reflectă condițiile reale (Ojeil, 2013). Astfel, au fost descrise metode alternative pentru studiul in vitro al activității antibacteriene a suprafețelor plastice.

II. Obiective

Studiul își propune evaluarea aplicațiilor, performanțelor și limitelor unor metode de testare a activității antibacteriene a unor materiale.

II.1 Importanța dezvoltării și testării suprafețelor pe care au fost depuse materiale cu proprietăți antibacteriene

II.1.1 Importanța dezvoltării unor suprafețe cu activitate antibacteriană

Infecțiile nosocomiale reprezintă o problemă serioasă care înregistrează, în multe țări, cifre înalte de morbiditate și de mortalitate mai ales la persoanele imunocompromise. Mai mult, utilizarea excesivă a antibioticelor cu un spectru larg a condus la creșterea numărului de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice din diverse clase. Prevenția și controlul acestor infecții constituie o necesitate absolută.

Protocoalele actuale de dezinfecție a suprafețelor cu soluții antibacteriene sunt cunoscute și utilizate în practica medicală. Substanțele chimice, după o utilizare prelungită, pot deveni toxice pentru persoanele ce le manipulează. Nepomuceno și colaboratorii descriu metode de dezinfecție a calculatoarelor și a anexelor acestora împotriva fungilor dintr-un centru medical folosind soluții preparate pe bază de bicarbonat de sodiu și acid acetic (Nepomuceno et al., 2018). Sunt numeroase studii în care sunt semnalate leziuni de tipul dermatitelor la nivelul tegumentelor mâinilor după o utilizare îndelungată a soluțiilor dezinfectante pe bază de alcooli (Pedersen et al., 2005; Tasar et al., 2021).

Dezvoltarea rapidă a nanotehnologiei și potențialul imens în medicină al acesteia au oferit multe oportunități pentru proiectarea suprafețelor cu proprietăți superioare, care pot fi utilizate în dispozitivele medicale de nouă generație. Aceste suprafețe cu potențial antibacterian ar putea fi folosite pe ecranele calculatoarelor, aparaturii, pe tastatură și alte suprafețe des atinse în practica medicală.

II.1.2. Importanța optimizării testărilor suprafețelor cu activitate antibacteriană

Multe materiale cu proprietăți antimicrobiene menționate în literatură nu se materializează în clinică, în principal pentru că introducerea acestora pe piață și utilizarea pe scară largă necesită procese de fabricație simple, robuste și ieftine, în timp ce agențiile de reglementare impun studii clinice mari, costisitoare, adesea imposibil de susținut din punct de vedere statistic (Grainger et al., 2013). În plus, devine din ce în ce mai dificilă obținerea aprobărilor pentru studii pe animale, în majoritatea țărilor aceasta necesitând dovezi in vitro convingătoare ale eficacității. Acest fapt arată nevoia proiectării de metode adecvate de evaluare in vitro pentru materialele cu suprafață antimicrobiană, adaptate mecanismelor specifice de acțiune (Sjollema et al., 2018).

II.2. Metode microbiologice de testare a activității antibacteriene.

Având în vedere creșterea amplitudinii fenomenului de dezvoltare și de testare a unor suprafețe antibacteriene diverse, s-au realizat protocoale standardizate în funcție de tipul suprafeței pe care au fost depuse materiale cu proprietăți antibacteriene (Figura 1).

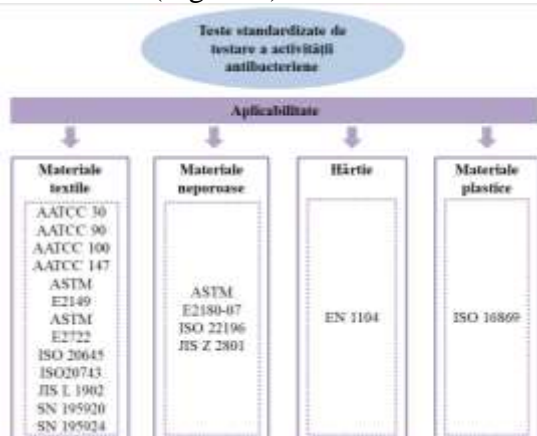


Fig1. Metode standardizate de testare a activității antibacteriene, clasificate în funcție de tipul materialelor

Dintre metodele de testare, se individualizează cele descrise în standardul ISO 22196 (JIS Z 2801) pentru măsurarea activității antibacteriene pe materiale din plastic și suprafețe neporoase, cu aplicabilitate în domeniul medical dar și pentru optimizarea unor folii potrivite pentru diferite device-uri precum laptop, telefon și tabletă. Pornind de la standardul menționat, s-au optimizat și alte metode bacteriologice aplicabile pentru suprafețe cum sunt testul de inoculare prin imersie, testul de inoculare prin metoda amprentării, testul de inoculare cu ansă bacteriologică și testul de inoculare cu ajutorul tamponului steril.

II.2.1 Test standardizat ISO 22196

Metoda de testare standardizată ISO 22196 presupune câteva condiții: suprafața testată să fie din plastic sau alte suprafețe neporoase, să aibă dimensiuni de 5x5 cm, concentrația bacteriană să fie de 10^5 CFU/mL, incubarea suspensiei bacteriene cu suprafața antibacteriană să aibă loc împreună cu altă suprafață de tip polietilenă care să permită contactul intim pe întreaga suprafață cu suspensia bacteriană pregătită. Expunerea se face în condiții precise de temperatură ($35\pm 1^\circ\text{C}$) și umiditate (minim 90%), pentru 24 de ore. Materialul testat este ulterior spălat în mod repetat în același volum de 10 ml soluție neutralizantă. Se însămânțează din lichidul de spălare diluat la diferite concentrații prin metoda incorporării în mediul de creștere. După incubare la termostat 48 de ore, plăcile Petri însămânțate sunt examinate pentru a număra coloniile crescute și pentru a analiza dacă există o reducere a concentrației bacteriene din pricina proprietății antibacteriene a materialului testat (ISO 22196, 2011).

Condițiile mai sus menționate de desfășurare a experimentului în laborator nu reflectă realitatea. În mediul spitalicesc, temperatura și umiditatea ambientală sunt menținute în parametri normali pentru confortul pacienților, iar suprafețele sunt uscate. ISO 22196 este limitat în prezicerea eficienței suprafețelor antibacteriene în condiții reale. Un studiu desfășurat într-un spital din UK pe durata unui an a comparat rezultatele obținute la testarea suprafețelor antimicrobiene atât la parametrii menționați în ISO 22196, cât și la temperatură de 20°C și umiditate relativă 40%, respectiv 50% pentru a observa dacă există diferențe în eficiența antibacteriană a suprafețelor. Toate materialele pe

bază de cupru au fost eficiente în reducerea contaminării microbiene pe o durată de 24 h. Parametrii la care suprafețele au înregistrat reducere maximă a concentrației bacteriene sunt cei prevăzuți în metoda standardizată; acest aspect sugerează faptul că ISO 22196 testează proprietatea antimicrobiană a materialelor în condiții favorabile și nu în condiții reale (Ojeil M., 2013).

II.2.2. Test standardizat ASTM E2149

ASTM E2149 este o metodă microbiologică standardizată cantitativă pentru evaluarea eficacității antimicrobiene atât a materialelor non-poroase cât și a celor poroase în condiții dinamice. Protocolul evaluează și stabilitatea pe termen lung a unui tratament antibacterian aplicat materialului de interes (Santos M., 2016). Acesta presupune imersia mostrei din materialul de testat în suspensia bacteriană de concentrație cunoscută, într-un balon agitat mecanic pe o durată de timp între 1-24h. Se evaluează atașarea și supraviețuirea bacteriilor direct pe suprafața materialului studiat. Această testare permite testarea rezistenței bacteriene la agenții antibacterieni cu care au fost tratate materialele în cauză. Eficacitatea antimicrobiană se calculează prin scăderea din numărului de microorganisme existente anterior imersiei materialului a numărul de microorganisme viabile după expunere (ASTM E2149, 2020). Spre deosebire de ISO 22196 care e ales pentru testarea suprafețelor plane, ASTM E2149 poate fi folosit la cercetarea proprietății antimicrobiene pe materiale/obiecte de formă neregulată.

Un studiu demonstrează că deși materialul testat posedă proprietăți antibacteriene la 37°C pentru 24h, la temperaturi ambientale, același material nu induce scăderea concentrației bacteriene (Campos MD., 2016). Metoda este limitată; aceasta nu prezintă aplicabilitate în domeniul sanitar, ci doar în laborator, unde se întrunesc condițiile precizate anterior.

II.2.3 Test standardizat ASTM E2180

ASTM E2180 este o metodă cantitativă standardizată de testare in vitro a efectului antibacterian pentru materiale polimerice cu agenți antimicrobieni încorporați sau pentru materiale hidrofobe precum plastic, rășini epoxidice și alte suprafețe dure. Metoda permite de asemenea, stabilirea termenului de valabilitate a efectului

antibacterian pentru suprafețele testate. Inoculul bacterian, fiind o suspensie apoasă, formează picături pe suprafața tratată. Acestea apar din cauza tensiunii superficiale mari datorate forțelor intermoleculare puternice (forțe de coeziune). Acest fenomen previne contactul intim cu suprafața hidrofobă a suspensiei. ASTM E2180 rezolvă acest obstacol prin incorporarea suspensiei bacteriene în mediu agar turnat într-o eprubetă la înclinație de peste 45° „agar slurry”. Astfel inoculul bacterian se transformă într-un pseudo-biofilm, ce poate fi pus în contact intim cu materialul tratat. Eficiența agentului antibacterian este evaluată prin rata de reducere a concentrației bacteriene după 24 h de contact. (ASTM 2180, 2012).

Limita acestei metode constă în testarea materialelor tratate doar pe bacteriile în fază planctonică liberă și nu poate fi aplicată pentru biofilmele bacteriene, agentul antimicrobian fiind ineficient în acest caz. Bacteriile în fază planctonică sunt microorganisme libere, ce plutesc prin suspensia cu care au fost inoculate, urmând a se fixa prin producerea de substanță polimerică extracelulară adezivă. Bacteriile din cadrul biofilmului prezintă rezistență împotriva antibioticelor crescută de până la 1000 de ori mai mare decât omoloagele lor în fază planctonică (Mah T.F., 2012).

II.2.4. Protocolul EPA

EPA (Agenția de protecție a mediului) descrie un protocol de testare a activității bactericide a materialelor ce conțin cupru. Este o metoda microbiologică cantitativă nestandardizată, dar folosită frecvent de laboratoarele specializate în testarea suprafețelor antibacteriene (Damian L., 2014). Metoda pune în contact materialul de testat cu inoculul bacterian preparat, iar apoi lasă 20-40 minute timp de uscare suspensiei microbiene. Potențialul antibacterian se confirmă dacă concentrația bacteriană după timpul de contact este mai mică comparativ cu concentrația bacteriană inițială, anterior expunerii la materialul studiat.

Particularitatea metodei este testarea proprietății materialului în condiții de uscare. Permite aplicarea în spațiul clinic și merită să fie luată în calcul pentru cercetarea suprafețelor antibacteriene. Metoda este însă limitată în cazul vopsirii sau lăcuirii materialului.

Într-un studiu desfășurat pe o perioadă de

21 luni, efectul antimicrobian exercitat de suprafețele ce conțin cupru a fost imediat și constant, cu o reducere semnificativă de 83% a biofilmului microbial (*Schmidt MG, 2012*).

II.2.5. Test de inoculare prin metoda amprentării

Knoblock et al. (2017) conduce un studiu care testează proprietatea antibacteriană a mai multor suprafețe prin contaminarea acestora în condiții realiste de temperatură 22°C și umiditatea relativă de 50%, dar și la parametrii descriși de ISO 22196: 37°C și umiditate relativă de peste 90%. Gradul de contaminare al suprafețelor este evaluat printr-o metodă nouă, menită să mimeze cât mai mult transferul bacterian prin mâini/mănuși contaminate. Se însămânțează pe mediu de creștere prin atingere cu degetul dezinfectat sau acoperit de o mănușă sterilă de bumbac și se menține timp de 10 secunde pentru a se realiza transferul microbial. Rezultatele studiului arată că foliile plastice de protecție cu proprietăți antibacteriene comerciale nu sunt cu nimic superioare foliilor normale în ceea ce privește reducerea contaminării microbiene. Cea mai puternică activitatea antibacteriană testată prin această metoda o deține suprafața din aliaj de cupru.

Particularitatea metodei constă în reproducerea modului de contaminare al suprafețelor din spital. Scopul acestei noi metode este să respecte cât mai mult contextul obișnuit prin care se realizează transferul microbial de pe o suprafață pe alta. Acest protocol poate fi aplicat în spitale pentru testarea suprafețelor antibacteriene (*Mann E., 2014*).

Dezavantajul metodei este reprezentat de imposibilitatea standardizării transferului bacterian ce se realizează prin atingerea suprafețelor contaminate, respectiv a mediului de creștere. Manualitatea cercetătorului este un factor ce influențează mult rezultatele.

II.3. Etape de lucru și parametrii importanți în derularea experimentelor de testare a activității antibacteriene a suprafețelor neporoase

II.3.1. Sterilizarea mediului de lucru și a materialelor

Tehnicile de sterilizare pot fi clasificate în metode fizice și chimice. Metodele fizice includ sterilizarea prin căldură uscată, sterilizarea cu

abur în autoclav, iradierea cu radiațiile UV sau cu raze gamma. Tratamentele cu substanțe chimice precum oxidul de etilenă, ozon, formaldehidă și fenoli sunt metode de sterilizare chimică (*Zhang et al., 1996*).

În majoritatea metodelor de evaluare a proprietăților antibacteriene, suprafețele sunt expuse suspensiilor bacteriene fără tratamentul/sterilizarea prealabilă. Sterilizarea biomaterialelor poate lăsa reziduuri pe suprafața acestora afectând suprafața proiectată (*Brétagne et al., 2008*). În cazul sterilizării cu oxid de etilenă pot rămâne reziduuri iritante, mutagene și la concentrații ridicate, carcinogene (*Anand et al., 2003*). Aspectele de siguranță legate de utilizarea oxidului de etilenă sunt descrise în standardul ISO 10993 care ghidează evaluarea biocompatibilității dispozitivelor medicale. O metodă recomandată pentru a steriliza materialele și mediul de lucru este utilizarea radiațiilor UV (*Daniell et al., 2016*).

Iradieră UV este împărțită în patru zone spectrale distincte în funcție de lungimea de undă, și anume: vid-UV (100-200μm), UVC (200-280μm), UVB (280-315μm) și UVA (315-400μm). UVC s-a dovedit a avea o capacitate antimicrobiană ridicată. Sursele de UV, de exemplu diode emițătoare de lumină, laserul și plasma UV generată de microunde, sunt disponibile pentru aplicații biomedicale (*Gupta et al., 2013*).

Testarea sterilității materialelor este foarte importantă atunci când se realizează teste ale proprietăților antibacteriene deoarece poate furniza informații pentru a indica 3 aspecte (*Daniell et al., 2016*):

- a) materialele testate sunt lipsite de microorganisme viabile;
- b) materialele testate au fost manipulate și depozitate corect pentru a nu deteriora suprafețele active și a introduce un contaminant;
- c) personalul de laborator care efectuează testul manipulează probele în mediul de testare fără a introduce un contaminant.

Deoarece aceste aspecte se limitează la condițiile prezentate, nu se poate afirma faptul că ar putea fi adecvate pentru a oferi siguranța sterilității materialelor testate. Din acest punct de vedere tehnic, metodele detaliate nu pot furniza o măsură a eficacității procesului de sterilizare. Prin urmare, testele pentru sterilitate pe materialul testat într-un proces de sterilizare

de rutină nu ar trebui utilizat ca o măsură a eficacității procesului de sterilizare (*Food and Drug Administration, 2008*).

Însă această etapă este foarte importantă pentru a avea un control asupra concentrațiilor bacteriilor inoculate pe materialul de testat și pentru prevenirea unei eventuale contaminări cu alte microorganisme. Controlul asupra proceselor de sterilizare este esențial în prelucrarea datelor și interpretarea rezultatelor.

II.3.2. Selectarea tulpinilor bacteriene și a condițiilor de creștere

Alegerea tulpinilor bacteriene pentru testarea unor materiale cu suprafață antibacteriană este foarte importantă și este necesară evaluarea tipurilor de tulpini responsabile de cele mai frecvente infecții pentru a putea avea aplicabilitate în practica medicală și nu numai.

Multe microorganisme cauzatoare de infecții sunt asociate pielii, intestinelor sau cavității bucale, în special după utilizarea pe termen scurt a unui implant sau dispozitiv sau a unei igiene precare. Pot fi implicați agenți patogeni oportuniști ca *Prevotella intermedia* și *Porphyromonas gingivalis* în infecțiile asociate implanturilor dentare (*Loesche, 1986*). Infecția după utilizarea pe termen scurt a cateterelor urinare se datorează adesea *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* sau *Enterococcus faecalis*, în timp ce după cateterizare pe termen lung pot apărea infecții cu *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* și *Klebsiella pneumoniae* (*Linsenmeyer, 2018; Flores-Mireles et al., 2015; Bono and Reygaert., 2020*). Prin urmare, testările trebuie să implice specii Gram-pozitive ca *Staphylococcus aureus* sau *Staphylococcus epidermidis*. Fiindcă peretele celular al tulpinilor bacteriene Gram-negative și Gram-pozitive diferă considerabil (*Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005*), cu un posibil impact asupra eficacității materialelor cu suprafață antimicrobiană, ar trebui inclusă și cel puțin o tulpină Gram-negativă. În consecință, în JIS Z 2801, este sugerat să se utilizeze atât *E. coli* Gram negativ cât și *S. aureus*, Gram pozitiv. În funcție de aplicația vizată, fungi precum *Candida* species ar trebui să fie incluse în evaluarea eficienței suprafeței antimicrobiene (*Sjollema et al., 2015*).

În absența unor date bine documentate cu

privire la numărul de microorganisme găsite pe implanturi și dispozitive (*Bjarnsholt et al., 2013*), testele standard indică utilizarea unui inocul definit care este exprimat ca numărul de unități care formează colonii pe unitate de volum (CFU) de suspensie, în care este plasat un material cu o suprafață specificată. Concentrațiile de inocul indicate în JIS Z 2801, de exemplu $2.5 \cdot 10^6$ CFU/ml, reflectă concentrația bacteriilor găsite în urină la pacienții cu infecție urinară asociată utilizării cateterului - 10^5 chiar până la 10^8 CFU/ml (*Stickler et al., 2014; Sjollema et al., 2018; Schmiemann et al., 2010*)

II.3.4. Eșantionarea și numărarea coloniilor

Substanțele antibacteriene pot acționa activ, având efect bactericid direct sau împiedică creșterea fără a ucide germenii sau acționează pasiv împiedicând bacteriile să colonizeze suprafețele prin obstrucționarea aderenței bacteriene (*Wei et al., 2019*). Pentru a putea evalua și compara eficacitatea diferitelor tratamente aplicate suprafețelor, activitatea antibacteriană a acestora trebuie confirmată experimental deoarece există variații considerabile de la un material la altul. Indiferent de metoda de testare aleasă, este necesară cunoașterea caracterelor de cultură ale bacteriilor care au crescut pentru a evita erori de identificare (posibilitatea suprainfecțării cu microorganisme), menținerea parametrilor pentru dezvoltarea optimă a bacteriilor (umiditate, temperatură, oxigen, pH, cerințe nutriționale - carbon, azot, minerale) (*De Silvestri et al., 2018; Liang et al., 2021; Lendenmann et al., 2000*). Cuantificarea coloniilor se poate realiza manual sau automat folosind analizoare specifice (*Brugger et al., 2012; Zhu et al., 2018*) la 18-24 ore de la incubare (*Siewwerts et al., 2008*).

II.3.5. Validarea și raportarea rezultatelor

Indiferent de metoda de testare aleasă, pentru fiecare test este nevoie de analiza a trei probe din fiecare tip de suprafață și a unor probe de control, martori atât pozitivi cât și negativi. Pentru raportarea datelor este necesară calcularea mediei numărului de colonii crescute pe mediile de cultură și calculul deviației standard pentru fiecare probă în parte. Rezultatele sunt exprimate ca logaritm de CFU/cm² sau ca CFU/ml (*Perez-Gavilan et al., 2021*).

III. Discuții

Testarea suprafețelor de dimensiuni mici reduce costurile și permite testarea concomitentă a mai multor materiale sau a diverselor tratamente aplicate aceluiași material. Tehnica experimentală in vitro poate fi repetată și reprodusă facil, aspect care ajută la obținerea de concluzii cu privire la eficiența dovedită a proprietății antimicrobiene.

Limitele testării vizează condițiile in vitro în care se desfășoară studiul acestor materiale cu proprietăți antibacteriene. Parametrii asigurați în laborator precum temperatura și umiditatea dar și utilizarea bulionului nutritiv din suspensia bacteriană inoculată nu sunt îndepliniți in vivo, de aceea este de preferat testarea materialelor variind acești parametri, pentru o observație cât mai reală a eficienței lor. Proprietatea antibacteriană variază și în funcție de protocolul de testare utilizat (*Campos et al., 2016*). Alt aspect important este executarea corectă a tehnicilor și respectiv diferențele legate de tehnicile utilizate.

IV. Concluzii

Atunci când se efectuează testarea antibacteriană a suprafețelor, trebuie luate în considerare câteva aspecte importante pentru a identifica un protocol de testare adecvat:

- tipul materialului depus pe suprafața de testat;
- metoda de testare (de exemplu ISO 22196, testul de inoculare prin imersie/testul de inoculare prin metoda amprentării/testul de inoculare cu ajutorul tamponului steril);
- metoda de sterilizare (aleasă în funcție de tipul materialului depus);
- selectarea tipului de microorganisme (bacterii, fungi);
- condițiile de incubare;
- metoda de numărare a coloniilor bacteriene;
- modul de interpretare și raportare a rezultatelor.

De asemenea, pentru a putea extrapola rezultatele testelor in vitro la mediul înconjurător este nevoie de teste folosind mai multe bacterii în același timp pentru a sublinia posibilele efecte de sinergism realizate între speciile bacteriene în prezența materialelor cu o suprafață specifică. Totodată este importantă optimizarea unui test care să imite condițiile de proliferare bacteriană pe diferite suprafețe în cazul

persoanelor care prezintă predispoziție la apariția infecțiilor.

Importanța dezvoltării unor astfel de suprafețe rezultă din aplicabilitatea acestor suprafețe în numeroase domenii, printre care și cel medical – implanturi medicale, acoperirea suprafețelor des atinse din spitale (aparatură, mânerul ușilor, ecranele dispozitivelor etc.). Totodată, ca perspectivă de dezvoltare, se pot optimiza și pentru utilizarea de către persoanele care își doresc protecția ecranelor telefonului, tabletelor, calculatoarelor și a altor ecrane predispuse la a fi potențiale căi de infecție prin aderare și proliferare bacteriană.

Bibliografie

- [1] Adlhart C., Verran J., Azevedo N.F., Olmez H., Keinänen-Toivola M.M., Gouveia I., Melo L.F., Crijns F. 2018, Surface modifications for antimicrobial effects in the healthcare setting: a critical overview, *Journal of Hospital Infection*, Volume 99, Issue 3, pg 239-249, <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.01.018>.
- [2] American Society for Testing & Materials ASTM E2149, 2020: Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions [on-line]. <https://standards.globalspec.com/std/14338807/ASTM%20E2149> (Accesat: 03.06.2021).
- [3] Anand VP, Cogdill CP, Klausner KA, Lister L, Barbolt T, Page BFJ, Urbanski P, Woss CJ. & Boyce J. 2003, Reevaluation of ethylene oxide hemolysis and irritation potential. *J. Biomed. Mater. Res.*, 64A: pp 648-654, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10422>
- [4] Bjarnsholt T., Alhede M., Alhede M, Eickhardt Sørensen SR., Moser C., Kühl M., Jensen PØ. & Høiby N. 2013. The in vivo biofilm. *Trends in microbiology*, 21(9), pp 466-474, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.06.002>.
- [5] Bono MJ, Reygaert WC. Urinary Tract Infection. [Updated 2020 Nov 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. [on-line]. Valabil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470195/> (Accesat 03.06.2021)
- [6] Brétagne F., Rauscher H., Hasiwa M., Kylián O., Ceccone G., Hazell L., Paul AJ., Lefranc O. & Rossi F. 2008. The effect of sterilization processes on the bioadhesive properties and surface chemistry of a plasma-polymerized polyethylene glycol film: XPS characterization and L929 cell proliferation tests. *Acta biomaterialia*, 4(6), 1745-1751.

- <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.06.013>
- [7] Brugger SD., Baumberger C., Jost M., Jenni W., Brugger U. & Mühlemann K. 2012. Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. *PLoS one*, 7(3), e33695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033695>
- [8] Cabeen M., Jacobs-Wagner C. 2005 Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol* 3, pp 601–610. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1205>
- [9] Campos MD, Zucchi PC, Phung A, Leonard SN, Hirsch EB. 2016. The Activity of Antimicrobial Surfaces Varies by Testing Protocol Utilized. *PLoS ONE* 11(8): e0160728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160728>
- [10] Champagne VK. & Helfritsch DJ. 2013. A demonstration of the antimicrobial effectiveness of various copper surfaces. *Journal of biological engineering*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-8>
- [11] Cobrado L., Silva-Dias A., Azevedo M.M., Rodrigues A.G. 2017. High-touch surfaces: microbial neighbours at hand. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36, 2053–2062. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3042-4>
- [12] Damian L., PaŃachia S. 2014. Method for testing the antimicrobial character of the materials and their fitting to the scope. *Bulletin of the Transilvania University of Braşov* Vol. 7 (56) Nr. 2.
- [13] Dancer SJ. 2008. Importance of the environment in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *The Lancet. Infectious diseases*, 8(2), 101–113. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70241-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70241-4)
- [14] Daniell E., Bryans T., Darnell K., Hansen J., Hitchins V. M, Saavedra M. 2016. Product Sterility Testing To Test or Not to Test? That Is the Question. *Biomed Instrum Technol*; 50 (s3): pp 35–43. <https://doi.org/10.2345/0899-8205-50.s3.35>
- [15] De Silvestri A., Ferrari E., Gozzi S., Marchi F., Foschino R. 2018. Determination of Temperature Dependent Growth Parameters in Psychrotrophic Pathogen Bacteria and Tentative Use of Mean Kinetic Temperature for the Microbiological Control of Food. *Journal Frontiers in Microbiology*, Volume 9, pp 3023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03023>
- [16] Flores-Mireles AL, Walker JN., Caparon M., & Hultgren SJ. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), pp 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- [17] Food and Drug Administration. Container and Closure Integrity Testing in lieu of Sterility Testing as a Component of The Stability Protocol for Sterile Products. 2008, FDA Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, pg 5. [on-line]. Valabil la: www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM146076.pdf (Accesat 06.06.2021).
- [18] Grainger DW., van der Mei HC., Jutte PC., van den Dungen JJ., Schultz MJ, van der Laan BF, Zaat SA, & Busscher HJ. 2013. Critical factors in the translation of improved anti-microbial strategies for medical implants and devices. *Biomaterials*, 34(37), pp 9237–9243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.043>
- [19] Green J, Wright PA., Gallimore CI., Mitchell O, Morgan-Capner P. & Brown DW. 1998. The role of environmental contamination with small round structured viruses in a hospital outbreak investigated by reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay. *The Journal of hospital infection*, 39(1), pp 39–45. [https://doi.org/10.1016/s0195-6701\(98\)90241-9](https://doi.org/10.1016/s0195-6701(98)90241-9)
- [20] Gupta A., Avci P., Dai T., Huang Y. & Hamblin MR. 2013. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Advances in wound care*, 2(8), pp 422–437. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0366>
- [21] International Organization for Standardization. ISO 22196:2011. Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces. *Plastics—Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces: International Standard; 2011* [on-line]. Valabil la: <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/04/07/40759.html> (Accesat 03.06.2021)
- [22] Ivanova E., Hasan J., Webb H, Gervinskis G., Juodkakis S., Truong V.K., Wu A.H.F., Lamb R.N., Baulin V.A., Watson G.S., Watson J.A., Mainwaring D.E., Crawford R.J. 2013. Bactericidal activity of black silicon. *Nat Commun* 4, 2838. <https://doi.org/10.1038/ncomms3838>
- [23] Kaatz GW., Gitlin SD., Schaberg DR., Wilson KH., Kauffman CA., Seo SM., & Fekety R. 1988. Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *American journal of epidemiology*, 127(6), pp 1289–1294. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114921>
- [24] Knobloch JK, Tofern S, Kunz W, Schütze S, Riecke M, Solbach W, Wuske T. 2017. "Life-like" assessment of antimicrobial surfaces by a new touch transfer assay displays strong superiority of a copper alloy compared to silver containing surfaces. *PLoS One*; 12(11):e0187442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187442>

- [25] Lendenmann U., Snozzi M. & Egli T. 2000. Growth kinetics of *Escherichia coli* with galactose and several other sugars in carbon-limited chemostat culture. *Canadian journal of microbiology*, 46(1), pp 72–80. <https://doi.org/10.1139/cjm-46-1-72>
- [26] Liang, Y., Li, B., Zhang, Q., Zhang, S., He, X., Jiang L. & Jin, Y. 2021. Interaction analyses based on growth parameters of GWAS between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *AMB Express*, 11(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01192-x>
- [27] Linsenmeyer TA. 2018. Catheter-associated urinary tract infections in persons with neurogenic bladders. *The journal of spinal cord medicine*, 41(2), 132–141. <https://doi.org/10.1080/10790268.2017.1415419>
- [28] Loesche W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological reviews*, 50(4), pp 353–380. <https://doi.org/10.1128/mr.50.4.353-380.1986>
- [29] Mah TF. 2012. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.*; 7(9), pp 1061-72. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>
- [30] Mann EE., Manna D., Mettetal MR., May RM., Dannemiller EM., Chung KK., Brennan AB., Reddy ST. 2014. Surface micropattern limits bacterial contamination. *Antimicrob Resist Infect Control* 3, 28. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-28>.
- [31] Martínez, JA., Ruthazer R., Hansjosten K., Barefoot L., & Snyderman D. R. 2003. Role of environmental contamination as a risk factor for acquisition of vancomycin-resistant enterococci in patients treated in a medical intensive care unit. *Archives of internal medicine*, 163(16), pp 1905–1912. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.16.1905>
- [32] Neely AN., Maley MP. 2000. Survival of Enterococci and Staphylococci on Hospital Fabrics and Plastic. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (2) pp 724-726; DOI: 10.1128/JCM.38.2.724-726.2000.
- [33] Nepomuceno DB., Lima DV., Silva MO., Porto J. & Mobin M. 2018. Evaluation of disinfectants in order to eliminate fungal contamination in computer keyboards of an integrated health center in Piauí, Brazil. *Environmental monitoring and assessment*, 190(10), 608. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6987-6>.
- [34] Ojeil M., Jermann C., Holah J., Denyer S.P., Maillard JY. 2013. Evaluation of new in vitro efficacy test for antimicrobial surface activity reflecting UK hospital conditions, *Journal of Hospital Infection*, Volume 85, Issue 4, pg 274-281, <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.08.007>.
- [35] Pedersen LK., Held E., Johansen JD, & Agner T. 2005. Short-term effects of alcohol -based disinfectant and detergent on skin irritation. *Contact dermatitis*, 52(2), pp 82–87. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00504.x>.
- [36] Perez-Gavilan A., de Castro, JV., Arana A., Merino S., Retolaza A., Alves S.A., Francone A., Kehagias N., Sotomayor-Torres C.M., Cocina D., Mortera R., Crapanzano S., Pelegrín C.J., Garrigos M.C., Jiménez A., Galindo B., Araque M.C, Dykeman D., Neves N.M., Marimón J.M. (2021). Antibacterial activity testing methods for hydrophobic patterned surfaces. *Sci Rep* 11, 6675. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85995-9>.
- [37] Sanders ER. (2012). Aseptic laboratory techniques: plating methods. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (63), e3064. <https://doi.org/10.3791/3064>
- [38] Santos M., Fonseca ACV., Branco R., Serra AC., Morais PV. & Coelho J. (2016). Recent Developments in Antimicrobial Polymers: A Review. *Materials* (Basel, Switzerland), 9(7), 599. <https://doi.org/10.3390/ma9070599>
- [39] Sbera R., Badea M., Rogozea L., Idomir M. (2020). Contamination of medical staff's phones and the possibility of their disinfection. *Jurnal Medical Brasovean*, nr.2, pp 29-33. DOI: <https://doi.org/10.31926/jmb.2020.2.6>.
- [40] Schmidt MG., Attaway HH., Sharpe PA, John J. Jr, Sepkowitz KA, Morgan A, Fairey SE., Singh S., Steed LL., Cantey JR., Freeman KD., Michels HT. & Salgado CD. (2012). Sustained reduction of microbial burden on common hospital surfaces through introduction of copper. *Journal of clinical microbiology*, 50(7), pp 2217–2223. <https://doi.org/10.1128/JCM.01032-12>
- [41] Schmiemann G., Kniehl E., Gebhardt K., Matejczyk MM. & Hummers-Pradier E. (2010). The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. *Deutsches Arzteblatt international*, 107(21), 361–367. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0361>
- [42] Sieuwerts S., De Bok F., Mols E., De Vos W. and Van Hylckama Vlieg J. (2008), A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47: pp 275-278. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x>
- [43] Sjollem J., Zaat S. A. J., Fontaine V., Ramstedt M., Luginbuehl R., Thevissen K., Li J., van der Mei H. C., Busscher H. J. (2018). In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs, *Acta Biomaterialia*, vol. 70, pp 12-24, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.001>.
- [44] Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) in Polymeric or Hydrophobic Materials. (2012). ASTM E2180-07. [on-line]. Valabil la:

- <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E2180-07> (Accesat 06.06.2021)
- [45] Stickler DJ. (2014). Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *Journal of internal medicine*, 276(2), 120–129. <https://doi.org/10.1111/joim.12220>
- [46] Suetens C., Latour K., Kärki T., Ricchizzi E., Kinross P., Moro M.L., Jans B., Hopkins S., Hansen S., Lyytikäinen O., Reilly J., Deptula A., Zingg W., Plachouras D., Monnet D.L., the Healthcare-Associated Infections Prevalence Study Group. 2018. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Eurosurveillance*, vol. 23, Issue 46. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800516>.
- [47] Tankovic J., Legrand P., De Gatines G., Chemineau V., Brun-Buisson C. & Duval J. 1994. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *Journal of clinical microbiology*, 32(11), pp 2677–2681. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.11.2677-2681.1994>.
- [48] Tasar R., Wiegand C. & Elsner P. 2021. How irritant are n-propanol and isopropanol? - A systematic review. *Contact dermatitis*, 84(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/cod.13722>.
- [49] US Environmental Protection Agency. (2009). Test Method for the Continuous Reduction of Bacterial Contamination on Copper Alloy Surfaces. [on-line]. Valabil la: <https://archive.epa.gov/pesticides/oppad001/web/pdf/copper-copper-alloy-surface-protocol.pdf> (Accesat 06.06.2021)
- [50] Wei T., Yu Q. & Chen H. (2019). Responsive and Synergistic Antibacterial Coatings: Fighting against Bacteria in a Smart and Effective Way. *Advanced healthcare materials*, 8(3), e1801381. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801381>
- [51] Zhang YZ., Bjursten LM, Freij-Larsson C, Kober M. & Wesslén B. (1996). Tissue response to commercial silicone and polyurethane elastomers after different sterilization procedures. *Biomaterials*, 17(23), pp 2265–2272. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)00055-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)00055-5)
- [52] Zhu G., Yan B., Xing M. & Tian C. (2018). Automated counting of bacterial colonies on agar plates based on images captured at near-infrared light. *Journal of microbiological methods*, 153, pp 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.004>

Mulțumiri: Această lucrare a fost susținută de un grant al Ministerului Cercetării, Inovării și Digitalizării, CNCS / CCCDI - UEFISCDI, proiect nr. 489PED/2020, în cadrul PNCDI III

Contribuția autorilor: conceptualizare: MB, MI, CA, SC; designul cercetării: CA, MI, validarea metodologiei: MI, MB, CV, LR; culegerea datelor: CA SC, analiza datelor și / sau interpretarea datelor: CA, SC, MB, LR, CV, MI; scriere-pregătirea textului inițial: CA, SC revizuire și editare: CA, MI, MB, LR.

Surse de finanțare: grant al Ministerului Cercetării, Inovării și Digitalizării, CNCS / CCCDI - UEFISCDI, proiect nr. 489PED / 2020, în cadrul PNCDI III

Conflicte de interese: autorii nu au conflicte de interese relevante pentru acest articol