

Procedurę walidowano dla trzech przedstawicieli prątków kwasoopornych:

1. *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> – niepatogeny szczep szybkoorosnący
2. *Mycobacterium bovis* BCG – atenuowany szczep wywołujący gruźlicę bydła
3. *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv – patogeny, laboratoryjny szczep prątka gruźlicy

Metoda oparta jest na seryjnym mikrorozcieńczaniu związków chemicznych o znanym stężeniu w podłożu 7H9/OADC i wyznaczeniu minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC90/MIC50).

#### **Etap I**

Wstępnie każdy związek chemiczny testowany są w jednym stężeniu 125 µg/ml w objętości 5 µl, zawieszony w 100µl podłoża 7H9 z dodatkiem OADC. Po naniesieniu 100x rozcieńczonej zawiesiny bakteryjnej (100µl) o stałej McFarlanda – 1.0 płytki inkubowane są w temperaturze 37°C (48 godzin dla *M. smegmatis* i 7 dni dla *M. bovis* oraz *M. tuberculosis*). Następnie, po dodaniu do każdej studzienki 20µl resazury, płytki inkubowane są dalsze 24 godziny, 37°C po czym wykonywany jest odczyt absorbancji przy określonej długości fali.

#### **Etap II**

W kolejnym etapie, dla związków chemicznych, które hamują wzrost badanych szczepów w stężeniu 125 µg/ml wykonywany jest szereg rozcieńczeń w postępie geometrycznym. Do tak przygotowanych szeregów, nanoszona jest rozcieńczona 100x zawiesina bakteryjna (100µl) o stałej McFarlanda – 1.0. Po inkubacji płytki w temperaturze 37°C (2-7 dni) do każdej studzienki dodawana jest resazury (20µl). Po kolejnej inkubacji (24 godziny, 37°C) wykonywany jest odczyt absorbancji przy określonej długości fali.