



FUNKČNÍ VZOREK

**Set pro stanovení citlivosti/rezistence u bakterií
izolovaných z ryb**

**MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Katarína Matiašková**

**3091
2020**

Funkční vzorek 3091/2020

Set pro stanovení citlivosti/rezistence u bakterií izolovaných z ryb

Autoři:

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova
296/70, Brno

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova
296/70, Brno

MVDr. Katarína Matiašková, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova
296/70, Brno

**Funkční vzorek byl vyvinut v rámci projektů Ministerstva školství, mládeže a
tělovýchovy PROFISH (číslo grantu CZ.02.1.01/0.0/16_0000869) a Ministerstva
zemědělství ČR (číslo grantu RO0518)**

ISBN 978-80-88233-09-01

Obsah

Cíl metodiky vývoje funkčního vzorku	3
Účel použití	3
Popis výrobku	3
Interpretace výsledků	5
Ověření funkčnosti a kontrola kvality	7
Skladování	12
Exspirace	12
Způsob likvidace	12
Srovnání „novosti postupů“	13
Seznam použité literatury	14

Cíl vývoje funkčního vzorku

Cílem vývoje funkčního vzorku diagnostického setu na stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) u bakterií izolovaných z ryb byla snaha o vytvoření spolehlivého diagnostického nástroje pro stanovení citlivosti/rezistence těchto bakterií k antimikrobiálním látkám, které jsou k léčbě ryb povoleny v rámci legislativy ČR, jejich testování je doporučeno ve standardizovaných mezinárodních normách nebo je sledování jejich rezistence k antimikrobikům důležité z jiných, například epidemiologických důvodů. Diagnostický set, umožňuje jednorázově stanovit MIC osmi antimikrobiálních látek a dvou kombinací antimikrobiálních látek (Tabulka 1) mikrodiluční metodou a na základě výsledků MIC vyhodnotit citlivost/rezistenci vyšetřovaného kmene k testovaným antimikrobikům.

Účel použití

Laboratorní *in vitro* stanovení citlivosti/rezistence bakteriálních patogenů ryb mikrodiluční metodou k antimikrobiálním látkám, které je nezbytné pro efektivní léčbu bakteriálních onemocnění ryb a významnou měrou přispívá k omezení nežádoucího šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám v bakteriálních populacích.

Popis výrobku

Diagnostický set je mikrotitrační destička s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H). Ve sloupcích je v růstovém médiu naředěno osm antimikrobiálních látek a dvě kombinace antimikrobiálních látek ve stanovených koncentracích v objemu 100 µl (Tabulka 1), ve sloupci 12, řádku A je jamka se 100 µl média bez antimikrobiální látky sloužící jako

pozitivní kontrola růstu testovaných bakterií. Počáteční koncentrace a počet ředění jednotlivých antimikrobiálních látek na destičce jsou rozdílné a jsou voleny tak, aby hodnoty MIC vyšetřovaných bakterií zahrnovaly buď rozmezí breakpointů citlivosti/rezistence testovaných bakterií nebo hodnoty cutoff vybraných antimikrobik podle závazných mezinárodních metodik Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI – VET04-A2, VET03/VET04-S2) a rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů testovaných v rámci kontroly kvality (Tabulka 1).

Tabulka 1: Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u bakterií izolovaných z ryb

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce je uvedena v mg/l.

AMP ampicilin (64 – 0,03 mg/l)
 ENR enrofloxacin (8 – 0,004 mg/l)
 ERY erythromycin (128 – 1 mg/l)
 FFC florfenikol (64 – 0,5 mg/l)
 FLU flumequin (8 – 0,06 mg/l)
 GEN gentamicin (8 – 0,06 mg/l)
 OA oxolinová kyselina (16 – 0,015 mg/l)
 OTC oxytetracyklin (64 – 0,06 mg/l)
 SXO ormetoprim/sulfadimethoxin (1/19) – koncentrace v tabulce platí pro ormetoprim (32 – 0,25 mg/l)
 SXT trimethoprim/sulfamethoxazol (1/19) – koncentrace v tabulce platí pro trimethoprim (4 – 0,06 mg/l)
 PKR pozitivní kontrola růstu

Růstové médium, ve kterém jsou ředěna antimikrobika je Mueller Hinton Broth.

Interpretace výsledků

Interpretace výsledků do kategorií citlivosti vyžaduje použití tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek (pro ryby dle platného dokumentu CLSI VET03/VET04-S2), které dělí izoláty do kategorií citlivosti na citlivé, intermediární a rezistentní. Vyšetřovaný kmen bakterie lze kategorizovat za předpokladu, že příslušné breakpointy jsou použity v definovaném fenotypovém systému. Bohužel, v současné době jsou klinické breakpointy pro bakterie izolované z ryb stanoveny pouze u *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* pro kyselinu oxolinovou a oxytetracyklin. U florfenikolu a u kombinace ormethopimu se sulfadimethoxinem lze vycházet při hodnocení ze stanovených hodnot epidemiologických cutoff, které dělí izoláty podle MIC na wild-type (WT) izoláty s hodnotami MIC nižšími než cutoff, u kterých lze předpokládat, že nemají žádné získané mechanismy pro vznik rezistencí k danému léčivu a na non-wild-type (NWT) izoláty s hodnotami MIC vyššími než cutoff, u kterých lze předpokládat rozvoj rezistence k danému léčivu. Hodnoty cutoff jsou definovány rovněž pouze u *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Vzhledem k tomu, že pro všechny testované látky nejsou breakpointy pro jednotlivé bakterie izolované z ryb definovány, jsou v následující tabulce uvedeny pouze známé hodnoty MIC a cutoff pro *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* po inkubaci při 22 ± 2 °C po dobu 44-48 hodin za přístupu vzduchu (Tabulka 2). Pro hodnocení citlivosti / rezistence bakterií izolovaných z ryb k ostatním antimikrobikům je možné vycházet pouze ze zjištěných hodnot MIC nebo z publikovaných farmakokinetických a farmakodynamických hodnot pro ryby, jsou-li stanoveny.

Celosvětově je k léčbě bakteriálních onemocnění ryb v produkčním rybářství povoleno používat pouze málo přípravků obsahujících antimikrobika (v České republice jsou to jen

lčiva obsahujcí oxytetracyklin), ale k lčbě okrasných a akvarijních ryb je využíváno i lčiv obsahujcích další antimikrobika.

Tabulka 2: Interpretační kritéria pro izoláty *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (inkubace při 22±2 °C po dobu 44-48 hodin)

	MIC (mg/l)			Cutoff (mg/l)	
	C	I	R	WT	NWT
kyselina oxolinová	≤0,125	0,25-0,5	≥1	≤0,125	≥0,25
oxytetracyklin	≤1	2-4	≥8	≤1	≥2
florfenikol	-	-	-	≤4	≥8
ormethoprim/sulfadimethoxin	-	-	-	≤0,5/9,5	≥1/19

Ověření funkčnosti a kontrola kvality

Funkčnost vyvíjeného setu byla ověřena stejným způsobem jako je prováděna pravidelná týdenní kontrola kvality vyrobených setů do doby expirace testováním kontrolních kmenů *E. coli* ATCC 25922 a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, které jsou přesně definovány a hodnoty MIC k některým antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI (VET03/VET04-S2). Stanovené hodnoty MIC jednotlivých antimikrobik musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC referenčních kmenů. Referenční rozmezí hodnot MIC (mg/l) kontrolních kmenů *E. coli* a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* za různých podmínek inkubace je vyznačeno v Tabulkách 3 – 12 šedou barvou. Pokud u některých antimikrobiálních látek není pro některý z kontrolních kmenů vyznačeno šedé rozmezí hodnot MIC, nejsou v současné době ještě stanoveny hodnoty MIC kontrolního kmene k těmto antimikrobikům za daných inkubačních podmínek.

Tabulka 3: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 22 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 4: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 22 °C, 44-48 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 5: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 28 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 6: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 28 °C, 44-48 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 7: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 18 °C, 92-96 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,06	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 8: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 22 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 9: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 22 °C, 44-48 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 10: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 28 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 11: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 22 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 12: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 18 °C, 92-96 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06
												≤0,03

Skladování

Sety skladovat zamrazené při teplotě – 80. Po rozmrazení a temperování setu na kultivační teplotu je nutné provést inokulaci destičky do 1h. Rozmrazené sety se nesmí opětovně zmrazit (riziko degradace antimikrobiálních látek).

Exspirace

6 měsíců od data výroby

Způsob likvidace

Použité sety se likvidují jako infekční materiál.

Srovnání „novosti postupů“

Set ke stanovení MIC bakteriálních izolátů z ryb obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k antimikrobiálním látkám, které jsou k léčbě ryb povoleny v rámci legislativy ČR, jejich testování je doporučeno ve standardizovaných mezinárodních normách nebo je sledování jejich rezistence k antimikrobiálním látkám důležité z jiných, například epidemiologických důvodů. Vývoj funkčního vzorku vychází z potřeb řešení projektu MŠMT PROFISH nebo má sledování rezistence k vybraným antibiotikům epidemiologicky význam. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí patogenních izolátů z ryb k antimikrobiálním látkám reagují na aktuální potřebu diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému novým diagnostickým nástrojem, který může v současnosti dostupným podobným výrobkům konkurovat kvalitou provedení, originalitou a příznivou cenou.

Seznam použité a související literatury

CLSI. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document VET04-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2014.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Second Informational Supplement. CLSI document VET03/VET04-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz