



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Metody průkazu, laboratorního testování a vyšetření
citlivosti/rezistence k antimikrobikům
izolátů *Streptococcus uberis* z mastitid dojnic**

**MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
Eva Audová**

130
2020

Certifikovaná metodika č. 130/2020

**Metody průkazu, laboratorního testování a vyšetření citlivosti/rezistence
k antimikrobikům izolátů *Streptococcus uberis* z mastitid dojnic**

Autoři:

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

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

Eva Audová, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, Brno

**Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství
ČR NAZV QK 1910212 a Ministerstva zemědělství ČR RO0518**

č. osvědčení SVS/2020/101856-G

Vydalo: Státní veterinární správa

ISBN 978-80-88233-08-4

I. Cíl metodiky

Cílem vypracování certifikované metodiky je zavedení standardní metodiky k průkazu *Streptococcus uberis* ze vzorku sekretu mléčné žlázy jako etiologického agens klinické nebo subklinické mastitidy a stanovení úrovně citlivosti k antimikrobikům u ověřeného izolátu *S. uberis* na setech se speciálním výběrem antimikrobik.

II. Úvod

S. uberis je jedním z nejčastěji izolovaných původců mastitid, které způsobují v chovech dojnic velké ekonomické ztráty, ať už snížením produkce a kvality mléka, vznikem nákladů vynaložených na léčbu, anebo také ztrátami způsobenými vyřazováním dojnic s perzistentními infekcemi a opakujícími se záněty (Hogeveen et al. 2011).

Intramamární infekce *S. uberis* je spojována se subklinickou i klinickou mastitidou, a to jak u dojnic laktujících, tak i u dojnic mimo laktaci. K infekci mléčné žlázy dochází nejčastěji v období stání na sucho (cca 60 %), s následným propuknutím klinické mastitidy v následující laktaci (Kromker et al. 2014).

S. uberis řadíme mezi environmentální streptokoky, vyskytuje se všude v prostředí stájí i na pastvě, zejména v místech, kde se krávy shromažďují a kde odpočívají. Kmeny *S. uberis* se vyznačují velkou genetickou variabilitou a i v rámci jednoho chovu může být detekováno více genotypů *S. uberis* (Davies et al. 2016). Pro většinu kmenů jsou typické přechodné infekce environmentálního původu, kde je zdrojem infekce prostředí (Tassi et al. 2013). Některé kmeny *S. uberis* však mohou být více adaptovány na mléčnou žlázu krávy a tyto kmeny pak vykazují různou míru kontagiozity a šíří se přímo z krávy na krávu, pravděpodobně během procesu dojení. Tyto kmeny jsou schopny perzistovat v mléčné žláze a způsobují rekurentní, chronické infekce (Phuektes et al. 2001).

Právě kvůli ubikvitárnímu výskytu *S. uberis* v prostředí krav a pravděpodobnosti výskytů více různých kmenů (s rozdílnou virulencí) *S. uberis* v jednom chovu je nutné odebírat vzorek velmi pečlivě. Pro diagnostiku a označení vykultivovaného *S. uberis* jako původce mastitidy je velmi důležitý přísně aseptický odběr sekretu mléčné žlázy. Při nedokonalém očištění struku nebo jinak nevhodně odebraného vzorku může dojít ke kontaminaci vzorku z prostředí. Kmen *S. uberis* izolovaný z takového vzorku vůbec nemusí být původce vyšetřované mastitidy.

K léčbě intramamárních infekcí způsobených *S. uberis* je doporučováno použití penicilinů, protože streptokoky jsou známy svou dobrou citlivostí k penicilinům (Bradley 2002, Käppli et al. 2019). Recentní studie však dokládají pomalý, ale viditelný pokles citlivosti izolátů *S. uberis* k beta-laktamům (Haenni et al. 2018). V současné době vzrůstá obliba používání pirlimycinu, zejména k léčbě perzistentních infekcí *S. uberis*. Přestože většina kmenů *S. uberis* je k pirlimycinu citlivá, vyskytují se i izoláty rezistentní. Zahájení léčby bez předchozího laboratorního určení citlivosti izolátu nebo dodatečného ověření citlivosti izolátu k vybranému antimikrobiu by bylo riskantní.

III. Vlastní popis metodiky

1. Odběr vzorků

Mléko nebo změněný sekret mléčné žlázy odebraný u krav s klinickou (klinické příznaky zánětu) nebo subklinickou (na základě zvýšeného počtu somatických buněk) mastitidou je nutné odebrat přísně asepticky. Odběr se provádí v rukavicích, po důkladném očištění a dezinfekci struků a po odstříknutí prvních tří stříků mléka – nejlépe do nádobky, jejíž obsah poté zlikvidujeme (nedoporučuje se odstříkávat na zem, protože se tak kontaminuje prostředí případným mastitidním patogenem). Do sterilní vzorkovnice se odebere 5-15 ml mléka, vnitřní plocha víčka odběrové nádobky musí být udržována v čistotě, bez dotyku rukou, otočená směrem k podlaze. Odběrová nádoba musí být řádně označena nesmazatelnou fixou.

Vzorky mléka musí být do 48 hodin (nejlépe do 24 hodin) při dodržení chladničkové teploty (do 8 °C) doručeny do laboratoře. Pokud není možné vzorky doručit do 48 hodin do laboratoře, lze je zamrazit.

Pokud je v chovu využívána faremní kultivace a diagnostika s využitím komerčně dodávaných selektivních půd, nejčastěji na bázi chromogenních médií (např. PM test, CHROMagarTM Mastitis), je možné poslat do laboratoře celou misku k ověření identifikace původce mastitidy a k určení citlivosti k antimikrobikům. Miska s narostlými koloniemi by měla být uchovávána v chladničkové teplotě a odeslána do laboratoře do 3 dnů.

2. Identifikace *S. uberis* jako původce mastitidy

Vzorek mléka je v diagnostické laboratoři inokulován na neselektivní agarová média (např. krevní agar s 5 % beraní krve) a inkubuje se 24 hodin při 37 °C (doba inkubace může být podle potřeby prodloužena).

Pokud na agaru naroste monokultura jednoho typu kolonií ve velkém množství, jedná se s velkou pravděpodobností o původce mastitidy. Pokud na misce narostou 3 a více typů kolonií, takový vzorek považujeme za kontaminovaný a z vyšetření se vyloučí, neboť vyšetření takového vzorku se prodraží a výsledek může být zkreslený, protože v případě záchytu *S. uberis* by mohl být zachycen kmen z prostředí, který infekci mléčné žlázy nezpůsobil nebo dokonce ani nebyl schopen infekci vyvolat.

2.1. Identifikace izolátů *S. uberis*

Na krevním agaru vybereme kolonie morfologicky typické pro *S. uberis* (bílé drobné kolonie bez hemolýzy, lesklé, někdy mohou mít mukoidní vzhled) (Obr. 1). K určení bakteriálního druhu suspektní izoláty podrobíme biochemickým testům (např. API STREP, STREPTOtest) nebo provedeme identifikaci pomocí MALDI-TOF-MS. Protože kmeny *S. uberis* jsou velmi geneticky a tedy i fenotypově variabilní, izoláty nejsou těmito metodami často jednoznačně určeny a musí se provést konečné ověření správnosti identifikace izolátu *S. uberis* metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Problém s identifikací bývá zejména u *Streptococcus parauberis*, který je biochemickými testy téměř neodlišitelný (Facklam 2002) od *S. uberis* a ani metoda MALDI-TOF není při jejich odlišení stoprocentní.

U faremní diagnostiky je nutná při identifikaci původců podle barvy a vzhledu kolonií na chromogenních agarech zvláštní opatrnost. Ačkoliv výrobci uvádí, že *S. uberis* na chromogenních médiích roste v modrých koloniích, některé kmeny mají modro-fialovou nebo dokonce čistě fialovou barvu, u některých kmenů *S. uberis* mohou mít i nádechy do zelena. Je to opět způsobeno jejich velikou genetickou variabilitou. Takový netypický kmen *S. uberis* je pak neodlišitelný na chromogenním médiu např. právě od *S. parauberis* nebo od *Aerococcus*

viridans, který se také vyznačuje velkou variabilitou a v mléce a prostředí je velmi často zachytáván.

Obr. 1: Vzhled *Streptococcus uberis* na krevním agaru



2.2. Ověření správnosti identifikace izolátů *S. uberis* metodou PCR

Ověření správnosti identifikace provedeme vyšetřením části genu 16S rRNA, která je druhově specifická pouze pro *S. uberis*, podle publikace Hassan et al. 2001.

Metodu jsme ověřovali na referenčním kmenu *S. uberis* CCM 4617 a šesti izolátech *S. uberis*, u kterých byla příslušnost k tomuto bakteriálnímu druhu ověřena celogenomovým sekvenováním. Pro ověření specifity primerů byla PCR provedena i u jiných druhů streptokoků a enterokoků (*S. parauberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus suis*, *Enterococcus faecalis*), kde se specifický produkt nevytvořil (Obr.2).

2.2.1. Potřeby

Oligonukleotidové primery (Hassan et al. 2001)

16S-UB-f 5'-CGC ATG ACA ATA GGG TAC A-3'

16S-UB-r 5'-GCC TTT AAC TTC AGA CTT ATC A-3'

Primery byly nasyntetizovány firmou GeneriBiotech (Česká Republika). PCR produkt amplifikovaný primery 16S-UB-f + 16S-UB-r je dlouhý 445bp.

Ostatní reagensie

Pro PCR byl použit Combi PPP Master Mix, katalogové číslo C208, firmy TopBio (Česká Republika).

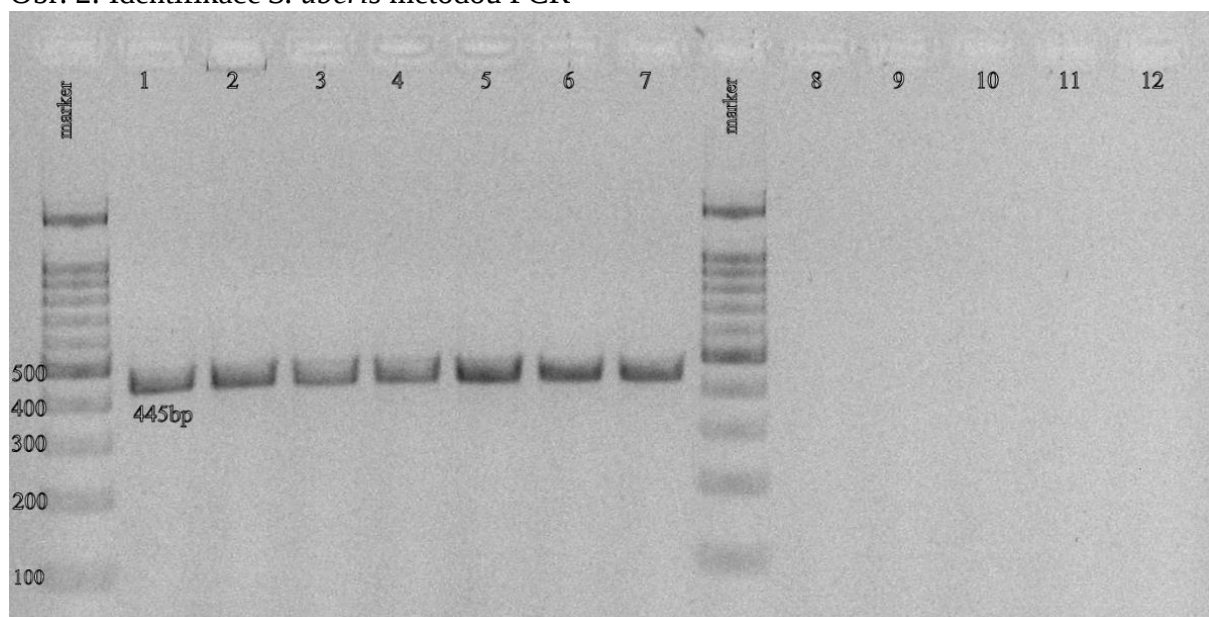
Pro vizualizaci DNA v agarózovém gelu byl použit Ethidium bromid (1mg/ml).

Pro porovnání velikosti produktu byl použit DNA marker 200-1500, katalogové číslo D110, firmy TopBio (Česká republika).

TBE (Tris-borát-EDTA) pufr pro elektroforézu.

PCR H₂O firmy TopBio (Česká Republika).

Obr. 2: Identifikace *S. uberis* metodou PCR



U vzorků 1-7 vzniká typický produkt o velikosti 445bp specifický pro *S. uberis*: vzorek 1 - referenční kmen *S. uberis* CCM 4617; vzorek 2-7 – izoláty *S. uberis* ověřené celogenomovým sekvenováním. Vzorek 8-12 – negativní kontrola: vzorek 8 – *S. parauberis*; 9 – *S. dysgalactiae*; 10 – *S. agalactiae*; 11 – *S. suis*; 12 – *E. faecalis*.

2.2.2 Postup

Izolace DNA

DNA byla připravena povařením bakteriální kultury. Bakteriální kolonie narostlá na krevním agaru byla sterilní kličkou resuspendována v 50 μ l sterilní vody. Zkumavka se suspenzí byla zahřívána 10 minut při teplotě 100 $^{\circ}$ C, poté byla zkumavka centrifugována 10 minut při 10 000 g. Supernatant byl použit jako templát pro PCR.

Příprava směsi pro PCR reakci

Do 200 μ l PCR zkumavek umístěných v chlazeném stojánku byla smíchána směs pro PCR. Na jednu reakci byly použity následující objemy reagentů:

Combi PPP Master Mix	10,0 μ l
16S-SU-f	0,1 μ l (koncentrace zásobního roztoku primeru 100 pmol/ μ l)
16S-SU-r	0,1 μ l (koncentrace zásobního roztoku primeru 100 pmol/ μ l)
H ₂ O	7,80 μ l
DNA	2,0 μ l

PCR program:

1. 95 $^{\circ}$ C 5 min
2. 94 $^{\circ}$ C 30 sec.
3. 55 $^{\circ}$ C 30 sec.
4. 72 $^{\circ}$ C 30 sec
5. GOTO 2 30x
6. 72 $^{\circ}$ C 8 min.
7. 6 $^{\circ}$ C

Elektroforéza

10 µl amplifikovaných produktů bylo vloženo na 2% agarózový gel obarvený ethidium bromidem. Různě dlouhé produkty PCR byly od sebe odděleny při putování v elektroforéze při 120V 40 minut a následně vizualizovány pod UV světlem (312nm).

Vyhodnocení gelu

Pokud je na gelu pod UV světlem jasně viditelný proužek, při srovnání s DNA markerem odpovídající velikosti 445bp, můžeme potvrdit příslušnost izolátu k *S. uberis*.

3. Určení citlivosti izolátu *S. uberis* k antimikrobikům

Citlivost/rezistence k antimikrobikům je stanovována standardizovanou mikrodiluční metodou stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) antimikrobních látek na originálních setech vyrobených podle dokumentu CLSI VET01-A4 (CLSI 2013). Protože *S. uberis* je růstově náročná bakterie, médium obsažené v destičkách (Mueller Hinton Broth) je obohacené o lyzovanou koňskou krev (2,5-5 %). Sada antibiotik testovaná v setech je sestavena přímo pro testování *S. uberis* s ohledem na dostupné intramamární/injekční veterinární léčivé přípravky určené specificky pro tuto indikaci. Z epidemiologických důvodů jsou v sadě zahrnuta i některá antimikrobika, která nejsou pro léčbu mastitid primárně indikována, ale využívají se ke sledování šíření rezistence v bakteriálních populacích. K validaci kitu a metody je používán referenční kmen *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Provedení metody a hodnocení jsou zcela v souladu se standardizovanými metodikami Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2019) a Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2018).

3.1. Set k testování citlivosti k antimikrobikům

Diagnostický set je mikrotitrační destička s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H). Ve sloupcích je v růstovém médiu naředěno čtrnáct navržených antimikrobiálních látek v objemu 100 µl. Sloupce 1-4 a 7-11 obsahují 8 ředění antimikrobní látky (řádky A-H), ve sloupcích 5 a 6 jsou v každém sloupci naředěna vždy 2 antimikrobika ve čtyřech ředěních (řádky A-D a E-H), ve sloupci 12 je obsažena antimikrobní látka v 7 ředěních (řádky B-H) a v řádku A tohoto sloupce 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 rozmezí breakpointů citlivosti/rezistence podle závazných mezinárodních metodik Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) a rozmezí hodnot MIC referenčního kmene *S. pneumoniae* povinně testovaného v rámci kontroly kvality (Tab. 1).

Tab. 1: Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u *Streptococcus uberis*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMP	AMC*	CEFL	CEF CEFQ	STR PIR	CLI	ERY	GEN	TET	RIF	SXT**
8	8	4	256	8	512	8	8	512	32	4	PK
4	4	2	128	4	256	4	4	256	16	2	8
2	2	1	64	2	128	2	2	128	8	1	4
1	1	0,5	32	1	64	1	1	64	4	0,5	2
0,5	0,5	0,25	16	4	4	0,5	0,5	8	2	0,25	1
0,25	0,25	0,125	8	2	2	0,25	0,25	4	1	0,125	0,5
0,125	0,125	0,06	4	1	1	0,125	0,125	2	0,5	0,06	0,25
0,06	0,06	0,03	2	0,5	0,5	0,06	0,06	1	0,25	0,03	0,125

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce jsou uvedeny v mg/l.

*koncentrace v tabulce platí pro amoxicilin

**koncentrace v tabulce platí pro trimethoprim

Seznam antimikrobiálních látek:

PEN penicilin
 AMP ampicilin
 AMC amoxicilin/klavulanová kyselina 2/1
 CEFL cefalexin
 CEF ceftiofur
 CEFQ cefchinom
 STR streptomycin
 PIR pirlimycin
 CLI klindamycin
 ERY erythromycin
 GEN gentamicin
 TET tetracyklin
 RIF rifampin
 SXT trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19
 PKR pozitivní kontrola růstu

Sety se musí skladovat zamrazené při teplotě – 80 °C. Po rozmrazení a temperování setu na kultivační teplotu je nutné provést inokulaci destičky do 1h. Rozmrazené sety se nesmí opětovně zamrazit (riziko degradace antimikrobiálních látek). Při skladování setů v -80 °C je expirace 6 měsíců ode dne výroby.

Kontrola kvality setů je až do doby expirace sledována na pracovišti výrobce setů pravidelným týdenním testováním referenčního kmene *S. pneumoniae* (ATCC 49619), u kterého je přesně definováno rozmezí hodnot MIC k antimikrobiálním látkám, ve kterém se musí nacházet, podle laboratorních standardů CLSI, EUCAST a CA-SFM (v Tab. 2 označeno šedou barvou).

Tab. 2: Rozmezí MIC u kontrolního kmene *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

PNC	AMP	AMC*	CEFL	CEF	STR	CLI	ERY	GEN	TET	RIF	SXT**
				CEFQ	PIR						
8	8	4	256	8	512	8	8	512	32	4	PK
4	4	2	128	4	256	4	4	256	16	2	8
2	2	1	64	2	128	2	2	128	8	1	4
1	1	0,5	32	1	64	1	1	64	4	0,5	2
				0,12-0,5							
0,5	0,5	0,25	16	4	4	0,5	0,5	8	2	0,25	1
0,25	0,25	0,125	8	2	2	0,25	0,25	4	1	0,125	0,5
0,125	0,125	0,06	4	1	1	0,125	0,125	2	0,5	0,06	0,25
0,06	0,06	0,03	2	0,5	0,5	0,06	0,06	1	0,25	0,03	0,125
				0,015-0,06		0,03	0,03		0,06	0,016	

3.2. Příprava inokula

Bakteriologickou kličkou se odebere 3 – 5 bakteriálních kolonií kultivovaných na neselektivním agarovém médiu (inkubovaných při teplotě 34-37 °C po dobu 18 h – 24h) do sterilního bujónu nebo fyziologického roztoku. Denzita suspenze se bujónem nebo fyziologickým roztokem upraví na zákal 0,5 McFarlanda, který na fotometru (vlnová délka 625 nm, kyveta s optickou dráhou 1 cm) odpovídá absorbanci 0,08 – 0,13 nebo denzitu alternativně vyhodnotit vizuálně podle zákalového standardu McFarland. Bakteriální suspenze o denzitě 0,5 McFarlanda (odpovídá 5×10^8 CFU/ml pro *E. coli* ATCC 25 922) se dále 10x zředí (odpovídá 5×10^7 CFU/ml). Touto naředěnou suspenzí budeme inokulovat destičku (5 µl takto naředěného inokula se přenesse do jamky mikrotitrační desky s obsahem 100 µl bujónu), finální koncentrace inokula v jamce bude 5×10^5 CFU.

3.3. Inokulace mikrotitračních destiček

Suspenze inokula se musí naočkovat do jamek vytemperované mikrotitrační destičky nejpozději do 15 minut od jeho přípravy. Do každé jamky destičky, obsahující 100 µl zředěné antimikrobiální látky v bujónu, se přidá maximálně 5 µl suspenze zředěného inokula. (Multikanálovou pipetou přesně 5 µl nebo inokulátorem – ježkem).

Okamžitě po naočkování se ověří skutečná koncentrace inokula. Z jamky pozitivní kontroly růstu se odebere 10 µl bakteriální suspenze, která se následně zředí v 10 ml bujónu nebo fyziologickém roztoku. Z tohoto ředění se přenesse 100 µl kultury na krevní agar, a inkubuje se přes noc. Zkouška se považuje za vyhovující, pokud na agarové půdě vyroste 20 – 80 kolonií.

Ověření bakteriální čistoty: Z jamky bez antimikrobiální látky (pozice 12A na destičce) se odebere 100 µl, které se kultivují na neselektivním agarovém médiu při 34 – 37 °C po dobu 18 – 24 hodin. Zhodnotí se čistota kultury.

3.4. Inkubace mikrotitračních destiček

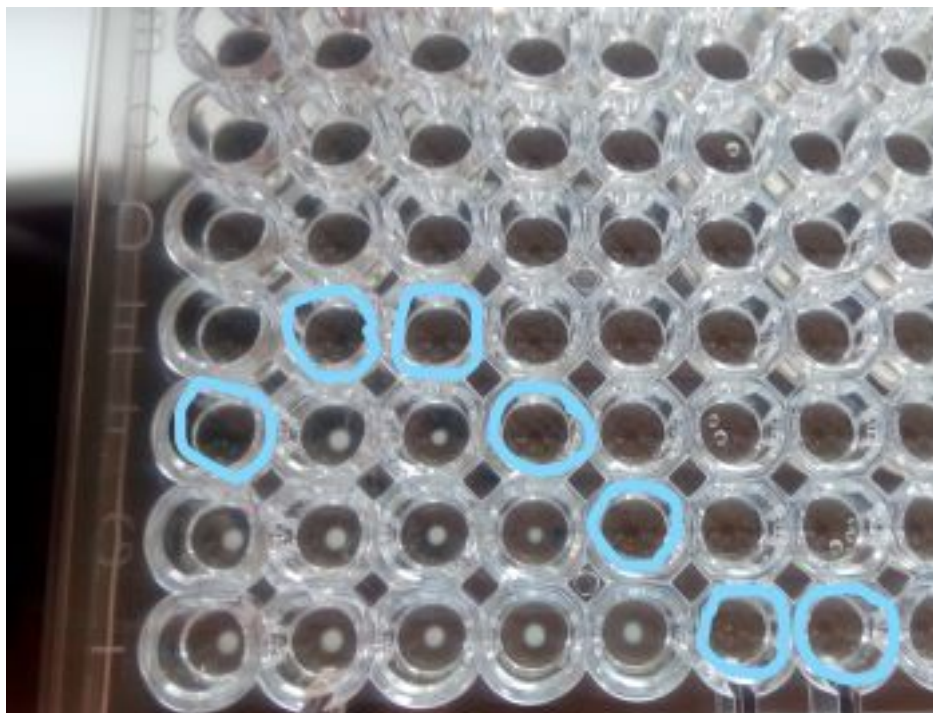
Destičky se opatří víčkem nebo lepící fólií a inkubují se aerobně při teplotě 35 ± 2 °C po dobu 20 - 24 hodin.

3.5. Odečítání výsledků

Výsledky se odečítají po dosažení dostatečného nárůstu mikroorganismu (usazenina nebo zřetelný zákal) a po ověření bakteriální čistoty a příslušné koncentrace inokula. Zjištěná

hodnota MIC představuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která plně inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu (Obr. 3).

Obr. 3: Destička s označením minimální inhibiční koncentrace



3.6. Kontrola kvality výsledků

Stejným postupem, paralelně s testovanými izoláty, testujeme i referenční kmen *S. pneumoniae* ATCC 49619, jehož hodnoty MIC se musí nacházet v rozmezí hodnot uvedených v dokumentech CLSI, EUCAST a CA-SFM (Tab. 2.).

3.7. Interpretace výsledků

Izoláty kategorizujeme podle tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek (EUCAST, CLSI, CA-SFM). Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé (s MIC v hodnotách označených zeleně), intermediální (s MIC v hodnotách označených modře) a rezistentní (s MIC v hodnotách označených červeně) (Tab. 3). Většina hodnot breakpointů z dokumentů CLSI a EUCAST je udávána pro skupinu viridujících streptokoků, u některých antimikrobik jsou udávány hodnoty breakpointů přímo pro *S. uberis* izolovaného z mastitid krav. U některých antimikrobik nejsou klinické breakpointy pro *S. uberis* nebo viridující streptokoky udávány, v tomto případě byla kritéria citlivosti odvozena z breakpointů udávaných pro *S. pneumoniae*.

Tab. 3: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Streptococcus uberis*

PNC	AMP	AMC	CEFL	CEF	STR	CLI	ERY	GEN	TET	RIF	SXT
				CEFQ	PIR						
8	8	4	256	8	512	8	8	512	32	4	PK
4	4	2	128	4	256	4	4	256	16	2	8
2	2	1	64	2	128	2	2	128	8	1	4
1	1	0,5	32	1	64	1	1	64	4	0,5	2
0,5	0,5	0,25	16	4	4	0,5	0,5	8	2	0,25	1
0,25	0,25	0,125	8	2	2	0,25	0,25	4	1	0,125	0,5
0,125	0,125	0,06	4	1	1	0,125	0,125	2	0,5	0,06	0,25
0,06	0,06	0,03	2	0,5	0,5	0,06	0,06	1	0,25	0,03	0,125

Zdroj: EUCAST 2019; CA-SFM 2018; CLSI 2012; CLSI 2018 – VET08, M100

citlivý; intermediální; rezistentní

IV. Srovnání novosti postupu

Laboratoře provádějící rutinní diagnostiku mastitidních patogenů ze vzorků mléka běžně používají k identifikaci původců biochemické testy, stále častěji využívají hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF-MS (Matrix Asisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight-Mass Spectrometry). *S. uberis* je však geneticky a tedy i fenotypově velmi variabilní mikroorganismus, biochemickými testy často není izolát jednoznačně určen a i MALDI může mít s určením netypického izolátu potíže, nezdědka identifikuje *S. uberis* pouze na jeden křížek (score value pod hodnotou 2).

Zařazením metody PCR do postupu identifikace *S. uberis* velmi zvýšíme pravděpodobnost správné identifikace *S. uberis*. Protože v PCR využíváme sekvenci specifickou pro *S. uberis* lze díky tomu identifikovat i netypické izoláty a lze jednoznačně odlišit *S. uberis* i od velmi podobných bakteriálních druhů (*S. parauberis*).

Sety ke stanovení MIC obsahují speciálně vybrané antimikrobiální látky, sestavené přímo pro testování *S. uberis* s ohledem na dostupné intramamární/injekční veterinární léčivé přípravky určené specificky pro tuto indikaci, jejichž lékové formy jsou v ČR registrovány a také mají uvedená interpretační kritéria v dokumentech CLSI, EUCAST a CA-SFM, podle nichž lze kmeny kategorizovat na citlivé, intermediální a rezistentní.

V současné době je k testování rezistencí těchto specifických veterinárních antimikrobik možné využít pouze omezenou nabídku setů zahraniční výroby, které většinou vzhledem k zastoupení antimikrobik ne zcela odpovídají potřebám testování v České republice nebo obsahují antimikrobika a rozsah koncentrací nevhodný pro testování mastitidních viridujících streptokoků, kam řadíme *S. uberis*.

Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí k antimikrobikům u *S. uberis*, izolovaného ze zánětů mléčné žlázy, reaguje na aktuální potřebu veterinárních diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může zahraničním výrobkům konkurovat kvalitou provedení, originalitou a především cenovou dostupností.

Postupy laboratorního testování *S. uberis* v různých laboratořích nejsou jednotné a neposkytují proto relevantní výsledky pro klinickou veterinární praxi, ani pro screening výskytu tohoto

patogenu a jeho rezistencí v chovech v ČR. V předkládané metodice je navrženo komplexní harmonizované řešení metod vzorkování, identifikace, vyšetření a interpretace výsledků rezistence/citlivosti *S. uberis* izolovaných z mastitid dojníc. Realizací těchto metod bude dosažena potřebná úroveň výsledků sledování a vyhodnocení šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám u *S. uberis*, s významem pro veterinární ale i humánní oblast.

V. Popis uplatnění metodiky

Metodika je určena pro veterinární diagnostické laboratoře - certifikovaná veterinární antibiotická střediska, veterinární nebo výzkumné laboratoře, Státní veterinární ústavy a soukromé veterinární laboratoře. Přesná identifikace původce je nutná např. k vyhodnocení účinnosti vakcinace namířené proti *S. uberis*. Je možné její uplatnění v systému celonárodního monitoringu citlivosti/rezistence *S. uberis* k antimikrobiálním látkám vyhodnoceného na základě harmonizovaných standardních postupů.

Spolehlivá diagnostická metoda k odhalení původce mastitidy a zjištění jeho úrovně citlivosti k používaným antimikrobikům umožní v chovech vypracování vhodných cílených ozdravných, preventivních a kontrolních protimastitidních programů pro zajištění vysoké úrovně zdraví a pohody zvířat, k zajištění zdravotně nezávadného mléka a také ke snížení spotřeby antimikrobik k terapii, vedoucí k omezení šíření rezistencí.

VI. Ekonomické aspekty

Diagnostická laboratoř:

U vzorků, kde se běžnými metodami podaří jasně identifikovat *S. uberis* jsou náklady na zavedení postupů uvedených v metodice minimální, protože jejich provedení nevyžaduje žádné speciální přístrojové vybavení bakteriologické laboratoře, je možné s využitím běžných přístrojů a pomůcek (termostat, pipety) a spotřebního materiálu.

U vzorků, kde je potřeba izolát *S. uberis* konfirmovat metodou PCR, je nutné vybavení laboratoře na molekulárně-biologické metody (termocykler, elektroforéza). Většina laboratoří dnes již běžně provádí PCR vyšetření a tedy i náklady na zavedení metody ke konfirmaci izolátu jsou minimální. Náklady pro laboratoř, která ještě toto vybavení nemá, činí přibližně 80 – 150 tis. Toto vybavení má však všestranné využití při diagnostice mnoha dalších infekcí a onemocnění.

Ekonomický přínos pro laboratoře bude představovat zisk z provedených vyšetření. Vzhledem k tomu, že *S. uberis* je v současné době jedna z nejčastějších příčin vzniku mastitid a jeho infekce jsou často perzistentní, opakující se, dá se očekávat velké množství vzorků a izolátů zasílaných do diagnostických laboratoří vhodných k vyšetření touto certifikovanou metodikou. Za předpokladu vyšetření cca 400 vzorků ročně na jednu laboratoř, při ceně za jedno vyšetření kolem 400-750 Kč, by se zisk 20 % z tržeb mohl pohybovat kolem 50 tis.

Chovatel:

Cena laboratorního vyšetření je srovnatelná s běžně prováděnými vyšetřeními (tzn. identifikace *S. uberis* a jeho vyšetření citlivosti k antimikrobikům). Při nutnosti ověření izolátu se cena laboratorního vyšetření navýší o cca 350 Kč na jeden vzorek. Zachycení izolátu *S. uberis*, který běžnými metodami nebyl odhalen a jeho následné vyšetření citlivosti k antimikrobikům, umožní včasnou a cílenou léčbu zánětu mléčné žlázy a může zabránit přechodu infekce do chronicity. Zabrání také dalšímu šíření patogenu a přenosu infekce na další dojnice.

V konečném důsledku se uživatelům výsledků vyšetření, tedy chovatelům, sníží ekonomické náklady na léčbu a prevenci onemocnění v chovu a zvýší se tržby za prodej zdravotně nezávadného kvalitního mléka. Chovatel tak může ušetřit desítky tisíc ročně.

VII. Seznam použité literatury

Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 164:116–28.
doi: 10.1053/tvjl.2002.0724

CA-SFM. 2018. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie – Recommandations Vétérinaires. Paris, France, Société Française de Microbiologie, 15.

CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement. M 100-S22, vol. 32, No 3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 184.

CLSI. 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard – Fourth Edition. CLSI document VET01-A4. Wayne, PA, USA, Clinical and Laboratory Standards Institute; 4th ed., 70.

CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th ed. CLSI supplement VET08. Wayne PA, USA, Clinical and Laboratory Standards Institute; 170.

CLSI. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100, 28th Edition. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, 258.

Davies, P.L., Leigh, J.A., Bradley, A.J., Archer, S.C., Emes, R.D., Green, M.J. 2016. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* clinical mastitis in dairy herds: Strain heterogeneity and transmission. *J Clin Microbiol* 54:68–74.

EUCAST. 2019. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. <http://www.eucast.org>.

Facklam, R. 2002. What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15: 613-630.

Haenni, M., Lupo, A., Madec, J. 2018. Antimicrobial resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiol Spectr* 6:1–25. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017

Hassan, A.A., Khan, I.U., Abdulmawjood, A., Lämmler, C. 2001. Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *J Clin Microbiol* 39(4):1618-1621. doi:10.1128/JCM.39.4.1618-1621.2001

Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J. 2011. Economic aspects of mastitis: new developments. *N Z Vet J*. 59:16–23. doi: 10.1080/00480169.2011. 547165

Käppeli, N., Morach, M., Zurfluh, K., Corti, S., Nüesch-Inderbinnen, M., Stephan, R. 2019. Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of *Streptococcus uberis* Isolated From

Kromker, V., Reinecke, F., Paduch, J.H., Grabowski, N. 2014. Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. Clin Microbial 3:157.

Phuektes, P., Mansell, P.D., Dyson, R.S., Hooper, N.D., Dick, J.S. 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. J Clin Microbiol 39:1460-1466.

Tassi, R., Mcneilly, T.N., Fitzpatrick, J.L., Fontaine, M.C., Reddick, D., Ramage, C. 2013. Strain-specific pathogenicity of putative host-adapted and nonadapted strains of *Streptococcus uberis* in dairy cattle. J Dairy Sci 96:5129-5145.

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Šlosárková S., Nedbalcová K., Bzdil J., Fleischer P., Zouharová M., Staněk S., Kašná E., Pechová A. Antimicrobial susceptibility of streptococci most frequently isolated from Czech dairy cows with mastitis. *Annals of Animal Science* 2019;19:679-694. ISSN 2300-8733. DOI: 10.2478/aoas-2019-0015

Zouharová M., Nedbalcová K., Sláma P. Přehled poznatků molekulární epidemiologie *Streptococcus uberis* v chovech dojnic. Veterinářství 2019;69(12):858-860.

Zouharová M., Nedbalcová K., Šlosárková S., Bzdil J., Fleischer P., Pechová A., Kašná E., Staněk S. Rezistence k antimikrobikům u izolátů *Streptococcus uberis* z mastitid skotu. Veterinářství 2019;69(9):585-590.

Oponenti:

MVDr. Milada Dubská – Státní veterinární správa ČR, Praha

MVDr. Martina Masaříková, Ph.D. – Veterinární a farmaceutická univerzita Brno



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