



FUNKČNÍ VZOREK

**Set pro stanovení citlivosti/rezistence
gramnegativních
bakteriálních patogenů drůbeže**

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

**3966
2019**

Funkční vzorek 3966/2019

**Set pro stanovení citlivosti/rezistence gramnegativních
bakteriálních patogenů drůbeže**

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 zemědělství ČR (čísla grantů:
QK1910057 a RO0518)**

ISBN 978-80-88233-58-9

Obsah

Cíl metodiky vývoje funkčního vzorku	3
Účel použití	3
Popis výrobku	3
Interpretace výsledků	5
Ověření funkčnosti a kontrola kvality	7
Skladování	8
Exspirace	8
Způsob likvidace	8
Srovnání „novosti postupů“	9
Seznam použité literatury	10

Cíl vývoje funkčního vzorku

Cílem vývoje funkčního vzorku diagnostického setu na stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) u bakteriálních gramnegativních patogenů drůbeže – zejména rodů *Enterobacteriaceae* a *Pasteurellaceae* – byla snaha o vytvoření spolehlivého diagnostického nástroje pro stanovení citlivosti/rezistence těchto bakterií k antimikrobikům, která jsou k léčbě drůbeže povolena v rámci legislativy ČR, jejichž sledování vychází z potřeb řešení projektu MZE NAZV QK1910057 nebo je sledování jejich rezistence k antimikrobikům důležité z jiných, například epidemiologických důvodů. Diagnostický set, umožňuje jednorázově stanovit MIC dvanácti antimikrobiálních látek mikrodiluční metodou a na základě výsledků MIC vyhodnotit citlivost/rezistenci vyšetřovaného kmene k testovaným antimikrobikům.

Účel použití

Laboratorní *in vitro* stanovení citlivosti/rezistence klinických izolátů gramnegativních patogenů drůbeže mikrodiluční metodou k antimikrobiálním látkám, které je nezbytné pro efektivní léčbu 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 třináct navržených antimikrobiálních látek v objemu 100 µl, u jedenácti antimikrobiálních látek (sloupce 1-11) je na destičce 8 ředění (řádky A-H), ve sloupci 12 je 7 ředění antimikrobiální látky (řádky B – H) a v řádku A je

jamka s 100 µl média bez antimikrobiální látky sloužící jako pozitivní kontrola růstu testovaných bakterií. Počáteční koncentrace jednotlivých antimikrobiálních látek na destičce jsou rozdílné a jsou voleny tak, aby hodnoty MIC vyšetřovaných bakterií zahrnovaly rozmezí breakpointů citlivosti/rezistence testovaných patogenů podle závazných mezinárodních metodik Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) a European Committee od Antimicrobial Susceptibility Testiny (EUCAST) a rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů testovaných v rámci kontroly kvality (Tab. 1).

Tab. 1: Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u G- bakteriálních patogenů drůbeže

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	AMC	CTX	TET	DOX	SPEC	SXT	ENR	FFC	TIA	TYL	TIL
A	32	32	16	32	16	512	64	16	64	128	128	PKR
B	16	16	8	16	8	256	32	8	32	64	64	64
C	8	8	4	8	4	128	16	4	16	32	32	32
D	4	4	2	4	2	64	8	2	8	16	16	16
E	2	2	1	2	1	32	4	1	4	8	8	8
F	1	1	0,5	1	0,5	16	2	0,5	2	4	4	4
G	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	8	1	0,25	1	2	2	2
H	0,25	0,25	0,125	0,25	0,125	4	0,5	0,125	0,5	1	1	1

1. AMP ampicillin
2. AMC amoxicilin/kyselina klavulanová (2/1) – koncentrace v tabulce platí pro amoxicilin
3. CTX cefotaxim
4. TET tetracyklin
5. DOX doxycyklin
6. SPEC spektinomycin
7. SXT trimethoprim/sulfamethoxazol(1/19) – koncentrace v tabulce platí pro trimethoprim
8. ENR enrofloxacin
9. FFC florfenikol
10. TIA tiamulin
11. TYL tylosin
12. TIL tilmikosin

PKR pozitivní kontrola růstu

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

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 (EUCAST, CLSI). Vyšetřovaný kmen bakterie lze kategorizovat za předpokladu, že příslušné breakpointy jsou použity v definovaném fenotypovém systému, to znamená, že níže uvedené breakpointy platí pouze pro rod *Enterobacteriaceae* nebo *Pasteurellaceae* (Tab. 2). Vzhledem k tomu, že breakpointy u příslušných patogenů většinou nejsou přímo pro drůbež definovány, byly derivovány z humánních interpretačních kritérií nebo u veterinárních antimikrobik z breakpointů pro jiné druhy zvířat. Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé, intermediální a rezistentní. U antimikrobik, kde nejsou breakpointy uvedeny, lze účinnost antimikrobiální látky posoudit pouze individuálně podle hodnoty MIC.

Tab. 2: Breakpointy antimikrobiálních látek pro G- patogeny drůbeže

Antimikrobiální látky		G- patogeny drůbeže			Zdroj
		MIC breakpoint (mg/l)			
		≤C	I	≥R	
ampicilin - <i>Enterobacteriaceae</i>	AMP	8	16	32	VET08
ampicilin - <i>Pasteurellaceae</i>	AMP	1		2	EUCAST
amoxicilin/kyselina klavulanová - <i>Enterobacteriaceae</i>	AMC	8/4	16/8	32/16	VET08
amoxicilin/kyselina klavulanová - <i>Pasteurellaceae</i>	AMC	1/0,5		2/1	EUCAST
cefotaxim - <i>Enterobacteriaceae</i>	CTX	1	2	4	EUCAST
tetracyklin - <i>Enterobacteriaceae</i>	TET	4	8	16	VET08
tetracyklin - <i>Pasteurellaceae</i>	TET	0,5	1	2	VET08
doxycyklin - <i>Enterobacteriaceae</i>	DOX	4	8	16	VET08
doxycyklin - <i>Pasteurellaceae</i>	DOX	1		2	EUCAST
spektinomycin - <i>Pasteurellaceae</i>	SPEC	32	64	128	VET08
trimethoprim/sulfamethoxazol - <i>Enterobacteriaceae</i>	SXT	2/38		4/76	VET08
enrofloxacin - <i>Enterobacteriaceae</i>	ENR	0,25	0,5-1	2	VET08
enrofloxacin - <i>Pasteurellaceae</i>	ENR	0,25	0,5-1	2	VET08
florfenikol - <i>Enterobacteriaceae</i>	FFC	4	8	16	VET08
florfenikol - <i>Pasteurellaceae</i>	FFC	2	4	8	VET08
tiamulin - <i>Pasteurellaceae</i>	TIA	4	8-16	32	Jones,R.N., (2002)
tylosin <i>Pasteurellaceae</i>	TYL	-	-	-	-
tilmikosin - <i>Pasteurellaceae</i>	TIL	16		32	VET08

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 *Escherichia coli* ATCC 25922 a *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27090, které jsou přesně definovány a hodnoty MIC k některým antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI a EUCAST. Stanovené hodnoty MIC jednotlivých antimikrobik musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC referenčních kmenů dle CLSI a EUCAST.

Referenční rozmezí hodnot MIC kontrolních kmenů *E. coli* a *A. pleuropneumoniae* (mg/l) je vyznačeno v tabulkách 3 a 4 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.

Tab. 3: Rozmezí MIC u kmene *Escherichia coli* ATCC 25922

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	AMC	CTX	TET	DOX	SPEC	SXT	ENR	FFC	TIA	TYL	TIL
A	32	32	16	32	16	512	64	16	64	128	128	PKR
B	16	16	8	16	8	256	32	8	32	64	64	64
C	8	8	4	8	4	128	16	4	16	32	32	32
D	4	4	2	4	2	64	8	2	8	16	16	16
E	2	2	1	2	1	32	4	1	4	8	8	8
F	1	1	0,5	1	0,5	16	2	0,5	2	4	4	4
G	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	8	1	0,25	1	2	2	2
H	0,25	0,25	0,125	0,25	0,125	4	0,5	0,125	0,5	1	1	1

Tab. 4: Rozmezí MIC u kmene *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27090

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	AMC	CTX	TET	DOX	SPEC	SXT	ENR	FFC	TIA	TYL	TIL
A	32	32	16	32	16	512	64	16	64	128	128	PKR
B	16	16	8	16	8	256	32	8	32	64	64	64
C	8	8	4	8	4	128	16	4	16	32	32	32
D	4	4	2	4	2	64	8	2	8	16	16	16
E	2	2	1	2	1	32	4	1	4	8	8	8
F	1	1	0,5	1	0,5	16	2	0,5	2	4	4	4
G	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	8	1	0,25	1	2	2	2
H	0,25	0,25	0,125	0,25	0,125	4	0,5	0,125	0,5	1	1	1
							≤	≤				

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 gramnegativních patogenů drůbeže obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k antimikrobiálním látkám, které jsou běžně užívány k léčbě onemocnění drůbeže způsobených zejména bakteriemi rodů *Enterobacteriaceae* a *Pasteurellaceae*, jejichž sledování vychází z potřeb řešení projektu MZE NAZV QK1910057 nebo sledování jejich rezistence k vybraným antimikrobikům má epidemiologický význam. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí gramnegativních bakteriálních patogenů drůbeže k antimikrobikům reaguje 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, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement. M 100-S22, vol. 32, No 3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2012: 184 pp.

CLSI, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Dick and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. VET08, 4th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2018: 170 pp.

EUCAST - Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Version 5.13. [Database online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [cit. 2019-09-04].

Available in <<http://www.eucast.org/>>

Jones,R.,N., et al. 2002; J Clin Microbiol. Feb 2002; 40(2): 461–465.



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