

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Vyšetření citlivosti/rezistence
bakteriálních původců mastitid
k antimikrobiálním látkám stanovením
minimálních inhibičních koncentrací**

**MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D.
MVDr. Jiří Bureš
MVDr. Tomáš Krejčí
prof. MVDr. Alfred Hera, CSc.**

Certifikovaná metodika č. 74/2016

Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních původců mastitid k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací

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

Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D., Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv,
Hudcova 232/56a, Brno

MVDr. Jiří Bureš, Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova
232/56a, Brno

MVDr. Tomáš Krejčí, LabMediaServis, s.r.o., Vítězná 92, 544 01 Huntířov

prof. MVDr. Alfred Hera, CSc., Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv,
Hudcova 232/56a, Brno

Osvědčení o uplatnění certifikované metodice č. SVS/2017/001199-G

CERTIFIKOVANÁ METODIKA ze dne 4. 1. 2017

Vydala: Státní veterinární správa, Slezská 7/100, 120 56 Praha 2

Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.

ISBN 978-80-86895-87-1

I) Cíl metodiky

Cílem vypracování certifikované metodiky je zavedení standardní metodiky stanovení kvantitativní úrovně citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) do široké veterinární laboratorní praxe, kde nejsou zcela zharmonizovány metody stanovení a interpretace výsledků citlivosti pro spektrum veterinárně významných patogenů. Ve veterinárních laboratořích je v současné době většinou rutinně používaná jednoduchá kvalitativní disková difúzní metoda, která není v některých případech dostatečně citlivá a u některých patogenů se její využití ke stanovení citlivosti/rezistence k antimikrobiálním látkám doslova nedoporučuje. Pro zavedení metody stanovení MIC antimikrobiálních látek do praxe ve veterinárních laboratořích nejsou v současnosti pro tyto laboratoře cenově dostupné sety ke stanovení MIC s veterinárními antimikrobiálními látkami nebo je jejich cena vzhledem k nákupu v zahraničí velmi vysoká.

Pro splnění cíle metodiky byly vyvinuty a následně jsou vyráběny sety pro stanovení MIC u bakteriálních původců mastitid u dojnic, které mohou výrazně zvýšit úroveň veterinární diagnostiky bakteriálních rezistencí u terapeuticky používaných antimikrobik. Údaje o stavu a vývoji rezistence bakteriálních původců infekcí jsou nezbytné pro predikci účinnosti antimikrobiálních látek v úvodní antibiotické léčbě a v určení pozice jednotlivých látek jako léků volby a léků alternativních v terapii infekcí. Jsou proto rozhodujícím podkladem pro vytváření objektivních a na farmaceutickém průmyslu nezávislých doporučených postupů pro antibiotickou léčbu.

II) Vlastní popis metodiky

Předkládaná metodika představuje komplexní postup pro stanovení citlivostí/rezistencí bakteriálních původců mastitid od odběru vzorků k bakteriologickému vyšetření až po interpretaci výsledků. Stanovení MIC antimikrobiálních látek k bakteriálním patogenům bude ve veterinární oblasti výrazným přínosem zejména zavedením zlatého standardu, tj. mikrodiluční metody pro testování a hodnocení citlivosti u veterinárních patogenů především z důvodů získání vyšší úrovně dosažených výsledků, které bude možné použít k vyhodnocení šíření rezistencí v bakteriálních populacích.

Hodnoty MIC jednotlivých antimikrobiálních látek bakteriálních izolátů budou stanovovány zcela v souladu se standardizovanými metodikami Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012a,b; 2013a,b), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2014) a Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2014) pomocí originálních setů se speciálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek zvlášť pro gramnegativní a pro grampozitivní bakterie, který umožňuje testování rezistencí především veterinárních antimikrobik užívaných k léčbě mastitid a jejichž léčivé formy jsou v ČR registrovány. Na mikrotitrační destičce s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H) jsou ve sloupcích dvojkové ředící řady dvanácti navržených antimikrobiálních látek, u jedenácti antimikrobiálních látek (sloupce 1-11) je na destičce 8 ředění (řádky A-H) a u jedné antimikrobiální látky (sloupec 12) je 7 ředění (řádky B-H) a v řádku A je jamka s médiem 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 podle závazných mezinárodních metodik CLSI,

EUCAST a CA-SFM a rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů povinně testovaných v rámci kontroly kvality (Tab. 1 a 2).

Tab. 1: Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u gramnegativních původců mastitid

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	AMC	KF	EFT	CEQ	TET	ENR	SXT	COL	GEN	STR	NEO
								MAR			
64	64	64	16	32	64	8	32	8	64	64	PKR
32	32	32	8	16	32	4	16	4	32	32	32
16	16	16	4	8	16	2	8	2	16	16	16
8	8	8	2	4	8	1	4	≤1	8	8	8
4	4	4	1	2	4	0,5		4	4	4	4
2	2	2	0,5	1	2	0,25	1	2	2	2	2
1	1	1	0,25	0,5	1	0,125	0,5	1	1	1	1

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l; koncentrace pro amoxicilin/kyselina klavulanová odpovídá koncentraci amoxicilinu; koncentrace pro trimethoprim/sulfamethoxazol odpovídá koncentraci trimethoprimu

AMP	ampicilin
AMC	amoxicilin/klavulanová kyselina 2/1
KF	cefalotin
EFT	ceftiofur
CEQ	cefchinom
TET	tetracyklin
ENR	enrofloxacin
SXT	trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19
COL	kolistin
MAR	marbofloxacin
GEN	gentamicin
STR	streptomycin
NEO	neomycin
PKR	pozitivní kontrola růstu

Tab. 2 : Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u grampozitivních původců mastitid

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMC	KF	EFT	CLI	GEN	STR	SXT	ENR	TET	RIF	FOX
					NEO						OXA
8	64	64	32	16	256	1024	32	8	32	4	PKR
4	32	32	16	8	128	512	16	4	16	2	16
2	16	16	8	4	8	256	8	2	8	1	8
1	8	8	4	2	4	32	4	1	4	0,5	4
0,5	4	4	2	1	≤2	16	2	0,5	2	0,25	2
0,25	2	2	1	0,5	16	8	1	0,25	1	0,125	1
0,125	1	1	0,5	0,25	8	4	0,5	0,125	0,5	0,06	0,5
0,06	0,5	0,5	0,25	0,125	4	2	0,25	0,06	0,25	0,03	0,25

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l; koncentrace pro amoxicilin/kyselina klavulanová odpovídá koncentraci amoxicilinu; koncentrace pro trimethoprim/sulfamethoxazol odpovídá koncentraci trimethoprimu

PNC	penicilin
AMC	amoxicilin/klavulanová kyselina 2/1
KF	cefalotin
EFT	ceftiofur
CLI	klindamycin
GEN	gentamicin
NEO	neomycin
STR	streptomycin
SXT	trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19
ENR	enrofloxacin
TET	tetracyklin
RIF	rifampicin
FOX	cefoxitin
OXA	oxacilin
PKR	pozitivní kontrola růstu

Sety budou vyráběny ve třech modifikacích, které se budou lišit ve složení živného média, v němž budou ředěny antimikrobiální látky:

1. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u gramnegativních bakterií – CAMHB (Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth)
2. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově nenáročných grampozitivních bakterií – CAMHB
3. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově náročných grampozitivních bakterií – CAMHB s 5 % lyzované koňské krve

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 do doby expirace je na pracovišti výrobce setů sledována pravidelným týdenním testováním kontrolních kmenů, které jsou přesně definovány a jejich hodnoty MIC k antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI, EUCAST a CA-SFM. Stanovené hodnoty MIC jednotlivých antimikrobik musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC referenčních kmenů dle CLSI, EUCAST a CA-SFM.

Pro set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u gramnegativních bakterií se jako referenční kmen použije *Escherichia coli* – ATCC 25 922 (Tab. 3) a u růstově nenáročných grampozitivních bakterií se jako referenční kmen použije *Staphylococcus aureus* – ATCC 29213 (Tab. 4). Pro set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově náročných bakterií s CAMHB + 5 % lyzované koňské krve se jako referenční kmen použije *Streptococcus pneumoniae* – ATCC 41619 (Tab. 5).

Stanovené rozmezí hodnot MIC testovaných kontrolních kmenů (mg/l) je vyznačeno v tabulkách (Tab. 3, 4 a 5) šedou barvou. Pokud u některých antimikrobiálních látek není pro některý z kontrolních kmenů vyznačeno šedé rozmezí hodnot MIC, není testování této látky relevantní pro určitý bakteriální druh (antimikrobiální látka není účinná nebo vhodná pro léčbu onemocnění tímto mikroorganismem) nebo nejsou k dispozici dostupná data.

Tab. 3: Rozmezí MIC u kmene *Escherichia coli* – ATCC 25 922

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	AMC	KF	EFT	CEQ	TET	ENR	SXT	COL	GEN	STR	NEO
								MAR			
64	64	64	16	32	64	8	32	8	64	64	PKR
32	32	32	8	16	32	4	16	4	32	32	32
16	16	16	4	8	16	2	8	2	16	16	16
8	8	8	2	4	8	1	4	≤1	8	8	8
4	4	4	1	2	4	0,5		4	4	4	4
2	2	2	0,5	1	2	0,25	1	2	2	2	2
1	1	1	0,25	0,5	1	0,125	0,5	1	1	1	1
				≥	≥	≥	≥	≥	≥		

Tab. 4: Rozmezí MIC u kmene *Staphylococcus aureus* – ATCC 29213

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMC	KF	EFT	CLI	GEN	STR	SXT	ENR	TET	RIF	FOX
					NEO						OXA
8	64	64	32	16	256	1024	32	8	32	4	PKR
4	32	32	16	8	128	512	16	4	16	2	16
2	16	16	8	4	8	256	8	2	8	1	8
1	8	8	4	2	4	32	4	1	4	0,5	4
0,5	4	4	2	1	≤2	16	2	0,5	2	0,25	2
0,25	2	2	1	0,5	16	8	1	0,25	1	0,125	1
0,125	1	1	0,5	0,25	8	4	0,5	0,125	0,5	0,06	0,5
0,06	0,5	0,5	0,25	0,125	4	2	0,25	0,06	0,25	0,03	0,25
		≥	≥		≥		≥	≥	≥	≥	≥

Tab. 5: Rozmezí MIC u kmene *Streptococcus pneumoniae* – ATCC 41619

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMC	KF	EFT	CLI	GEN	STR	SXT	ENR	TET	RIF	FOX
					NEO						OXA
8	64	64	32	16	256	1024	32	8	32	4	PKR
4	32	32	16	8	128	512	16	4	16	2	16
2	16	16	8	4	8	256	8	2	8	1	8
1	8	8	4	2	4	32	4	1	4	0,5	4
0,5	4	4	2	1	≤2	16	2	0,5	2	0,25	2
0,25	2	2	1	0,5	16	8	1	0,25	1	0,125	1
0,125	1	1	0,5	0,25	8	4	0,5	0,125	0,5	0,06	0,5
0,06	0,5	0,5	0,25	0,125	4	2	0,25	0,06	0,25	0,03	0,25
		≥		≥	≥		≥		≥	≥	

IIa) Odběr vzorků k bakteriologickému vyšetření a transport vzorků do laboratoře

K vyšetření je nutný čerstvý a řádně odebraný vzorek mléka. Do sterilní vzorkovnice (zkumavky) se odebere 5 – 10 ml mléka. Odběr se provádí v rukavicích, po očištění struků a po oddojení prvních 3 stříků mléka do pomocné nádoby (obsah se neškodně zlikviduje), vnitřní plocha víčka zkumavky musí být udržována v čistotě, bez dotyku rukou, směrem k podlaze. Potom teprve se nadojí vzorek mléka tak, aby nedošlo ke kontaminaci z prostředí. Řádně označená zkumavka musí být co nejdříve v chladícím boxu doručena do laboratoře k bakteriologickému vyšetření. Podle potřeby je možné zaslat čtvrtový, půlový nebo směsný vzorek ze všech struků; z akutních, chronických nebo subklinických případů mastitid.

IIb) Laboratorní zpracování vzorků, izolace a identifikace původce onemocnění

V diagnostické laboratoři se provádí kultivační vyšetření ze vzorků mléka obvyklým způsobem na neselektivním agarovém médiu, např. krevní agar. Inkubace probíhá při teplotě 34 °C - 37 °C po 18 h – 24 h (doba inkubace může být podle potřeby prodloužena). Následná izolace původce z primokultivací se provádí podle druhů bakterií, které jsou podle předpokladu původci onemocnění, na selektivních i neselektivních agarových médiích. Vždy je nutná přesná identifikace druhu původce onemocnění (prováděná pomocí MALDI TOF, biochemickými, molekulárně diagnostickými a jinými povinnými nebo doporučovanými testy), protože provedení stanovení MIC antimikrobiálních látek a interpretace výsledků vyšetření, zda se jedná o izolát citlivý nebo rezistentní k dané antimikrobiální látce, úzce souvisí s vyšetřovaným bakteriálním druhem.

IIC) Stanovení minimální inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek

1. Sety pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací u gramnegativních a růstově nenáročných grampozitivních původců mastitid

Stanovení MIC u růstově nenáročných izolátů se provádí na destičkách s CAMHB.

1.1. Příprava inokula

Bakteriologickou kličkou se odebere 3 – 5 bakteriálních kolonií kultivovaných na neselektivním agarovém médiu (inkubovaných při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 18 h – 24 h (pokud není požadován delší čas inkubace) 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 je možné použít jiný vhodný ověřený nefelometr nebo denzitu alternativně vyhodnotit vizuálně podle zákalového standardu McFarland. Bakteriální suspenze o denzitě 0,5 McFarlanda (odpovídá 5×10^8 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922) se dále naředí na finální koncentraci inokula v jamce mikrotitrační desky 5×10^5 CFU.

Příklad postupu:

1 ml inokula o denzitě 0,5 MCFarlanda se naředí 9 ml sterilního fyziologického roztoku (odpovídá 5×10^7 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922), po přenesení 5 µl takto naředěného inokula do jamky mikrotitrační desky s obsahem 100 µl bujónu je dosažena finální koncentrace inokula v jamce 5×10^5 CFU.

1.2. Naočkování mikrotitračních destiček

Rozmražené mikrotitrační destičky se musí naočkovat do 15 minut po standardizaci suspenze inokula. Do každé jamky destičky obsahující 100 μ l zředěné antimikrobiální látky v bujónu se přidá maximálně 5 μ l suspenze zředěného inokula. (Multikanálovou pipetou přesně 5 μ l nebo inokulátorem – ježkem).

Okamžitě po naočkování se ověří skutečná hustota inokula. Z jamky pozitivní kontroly růstu se odebere 10 μ l bakteriální suspenze, která se následně zředí v 10 ml bujónu nebo fyziologickém roztoku. Z tohoto ředění se přenesou 100 μ l kultury na vhodnou agarovou půdu, která se inkubuje přes noc. Zkouška se považuje za vyhovující, pokud na agarové půdě vyrostou 20 – 80 kolonií.

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

Před inkubací se mikrotitrační destičky uzavřou těsnícím víčkem nebo lepicí fólií.

1.3. Inkubace mikrotitračních destiček

Naočkované destičky musí být vloženy do inkubátoru do 15 minut po inokulaci. Pokud se pro testovaný bakteriální druh nevhodí jinak, mikrotitrační destičky pro růstově nenáročné mikroorganismy se inkubují aerobně při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 18 – 20 hodin.

1.4. Kontrola kvality výsledků

Kvalita výsledků se kontroluje paralelně s testovaným mikroorganismem stanovením MIC antimikrobiálních látek u referenčních kmenů stejným způsobem, jakým je prováděna kontrola kvality vyrobených setů (viz bod. II).

1.5. 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.

2. Sety pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací u růstově náročných grampozitivních původců mastitid

Stanovení MIC se provádí na destičkách s CAMHB s přidavkem lyzované koňské krve (*Streptococcus spp.*).

2.1. Příprava inokula

Bakteriologickou kličkou se odebere 3 – 5 bakteriálních kolonií kultivovaných na neselektivním agarovém médiu (inkubovaných při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 18 h – 24 h (pokud není požadován delší čas inkubace) 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 absorpenci 0,08 – 0,13 nebo je možné použít jiný vhodný ověřený nefelometr nebo denzitu alternativně vyhodnotit vizuálně podle zákalového standardu McFarland. Bakteriální suspenze o denzitě 0,5 McFarlanda (odpovídá 5×10^8 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922) se dále naředí na finální koncentraci inokula v jamce mikrotitrační desky 5×10^5 CFU.

Příklad postupu:

1 ml inokula o denzitě 0,5 MCFarlanda se naředí 9 ml sterilního fyziologického roztoku (odpovídá 5×10^7 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922), po přenesení 5 µl takto naředěného inokula do jamky mikrotitrační desky s obsahem 100 µl bujónu je dosažena finální koncentrace inokula v jamce 5×10^5 CFU.

2.2. Naočkování mikrotitračních destiček

Rozmražené mikrotitrační destičky se musí naočkovat do 15 min. po standardizaci suspenze inokula. Do každé jamky destičky obsahující 100 μ l zředěné antimikrobiální látky v bujónu se přidá maximálně 5 μ l suspenze zředěného inokula. (Multikanálovou pipetou přesně 5 μ l nebo inokulátorem – ježkem).

Okamžitě po naočkování se ověří skutečná denzita inokula. Z jamky pozitivní kontroly růstu se odebere 10 μ l bakteriální suspenze, která se následně zředí v 10 ml bujónu nebo fyziologickém roztoku. Z tohoto ředění se přenesou 100 μ l kultury na vhodnou agarovou půdu, která se inkubuje přes noc. Zkouška se považuje za vyhovující, pokud na agarové půdě vyrostou 20 – 80 kolonií.

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

Před inkubací se mikrotitrační destičky uzavřou těsnícím víčkem nebo lepicí fólií.

2.3. Inkubace mikrotitračních destiček

Naočkované destičky musí být vloženy do inkubátoru do 15 minut po inokulaci. Pokud se pro testovaný bakteriální druh neuvádí jinak, probíhá inkubace destiček v teplotě 35 °C po dobu 18 – 24 hodin.

2.4. Kontrola kvality výsledků

Kvalita výsledků se kontroluje paralelně s testovaným mikroorganismem stanovením MIC antimikrobiálních látek u referenčních kmenů stejným způsobem, jakým je prováděna kontrola kvality vyrobených setů (viz bod. II).

2.5. 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.

II d) Interpretace výsledků

Interpretace výsledků do kategorií citlivosti vyžaduje použití tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek. Vyšetřovaný kmen bakterie lze kategorizovat za předpokladu, že příslušné breakpointy jsou použity v definovaném fenotypovém systému. Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé (s MIC v hodnotách označených zeleně), středně citlivé (s MIC v hodnotách označených modře) a rezistentní (Tab. 6, 7, 8, 9, 10). U antimikrobik, kde nejsou koncentrace barevně rozděleny, nejsou breakpointy pro určité skupiny patogenů definovány.

Tab. 6: Breakpointy antimikrobiálních látek pro gramnegativní původce mastitid

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	AMC	KF	EFT	CEQ	TET	ENR	SXT	COL	GEN	STR	NEO
								MAR			
64	64	64	16	32	64	8	32	8	64	64	PKR
32	32	32	8	16	32	4	16	4	32	32	32
16	16	16	4	8	16	2	8	2	16	16	16
8	8	8	2	4	8	1	4	≤1	8	8	8
4	4	4	1	2	4	0,5		4	4	4	4
2	2	2	0,5	1	2	0,25	1	2	2	2	2
1	1	1	0,25	0,5	1	0,125	0,5	1	1	1	1

Tab. 7: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Staphylococcus spp.*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMC	KF	EFT	CLI	GEN	STR	SXT	ENR	TET	RIF	FOX
					NEO						OXA
8	64	64	32	16	256	1024	32	8	32	4	PKR
4	32	32	16	8	128	512	16	4	16	2	16
2	16	16	8	4	8	256	8	2	8	1	8
1	8	8	4	2	4	32	4	1	4	0,5	4
0,5	4	4	2	1	≤2	16	2	0,5	2	0,25	2
0,25	2	2	1	0,5	16	8	1	0,25	1	0,125	1
0,125	1	1	0,5	0,25	8	4	0,5	0,125	0,5	0,06	0,5
0,06	0,5	0,5	0,25	0,125	4	2	0,25	0,06	0,25	0,03	0,25

Tab. 8: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Enterococcus spp.*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMC	KF	EFT	CLI	GEN	STR	SXT	ENR	TET	RIF	FOX
					NEO						OXA
8	64	64	32	16	256	1024	32	8	32	4	PKR
4	32	32	16	8	128	512	16	4	16	2	16
2	16	16	8	4	8	256	8	2	8	1	8
1	8	8	4	2	4	32	4	1	4	0,5	4
0,5	4	4	2	1	≤2	16	2	0,5	2	0,25	2
0,25	2	2	1	0,5	16	8	1	0,25	1	0,125	1
0,125	1	1	0,5	0,25	8	4	0,5	0,125	0,5	0,06	0,5
0,06	0,5	0,5	0,25	0,125	4	2	0,25	0,06	0,25	0,03	0,25

Tab. 9: Breakpointy antimikrobiálních látek pro beta-hemolytické streptokoky

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMC	KF	EFT	CLI	GEN	STR	SXT	ENR	TET	RIF	FOX
					NEO						OXA
8	64	64	32	16	256	1024	32	8	32	4	PKR
4	32	32	16	8	128	512	16	4	16	2	16
2	16	16	8	4	8	256	8	2	8	1	8
1	8	8	4	2	4	32	4	1	4	0,5	4
0,5	4	4	2	1	≤2	16	2	0,5	2	0,25	2
0,25	2	2	1	0,5	16	8	1	0,25	1	0,125	1
0,125	1	1	0,5	0,25	8	4	0,5	0,125	0,5	0,06	0,5
0,06	0,5	0,5	0,25	0,125	4	2	0,25	0,06	0,25	0,03	0,25

Tab. 10: Breakpointy antimikrobiálních látek pro viridující streptokoky

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMC	KF	EFT	CLI	GEN	STR	SXT	ENR	TET	RIF	FOX
					NEO						OXA
8	64	64	32	16	256	1024	32	8	32	4	PKR
4	32	32	16	8	128	512	16	4	16	2	16
2	16	16	8	4	8	256	8	2	8	1	8
1	8	8	4	2	4	32	4	1	4	0,5	4
0,5	4	4	2	1	≤2	16	2	0,5	2	0,25	2
0,25	2	2	1	0,5	16	8	1	0,25	1	0,125	1
0,125	1	1	0,5	0,25	8	4	0,5	0,125	0,5	0,06	0,5
0,06	0,5	0,5	0,25	0,125	4	2	0,25	0,06	0,25	0,03	0,25

III. Srovnání „novosti postupů“

Set ke stanovení MIC bakteriálních původců mastitid obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k veterinárně specifickým antimikrobiálním látkám, které jsou užívány k léčbě mastitid a jejichž léčivé formy jsou v ČR registrovány. 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. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí bakteriálních původců mastitid k antimikrobikům reaguje na aktuální potřebu veterinárních diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může zahraničním výrobkům konkurovat kvalitou provedení, originalitou a především cenovou dostupností.

Metody vyšetření citlivosti/rezistence patogenů k antimikrobiálním látkám a v neposlední řadě také interpretace zjištěných výsledků nejsou v současné době jednotné a neposkytují proto relevantní výsledky pro klinickou veterinární praxi. V předkládané metodice je navrženo komplexní harmonizované řešení metod vzorkování, vyšetření a interpretace výsledků rezistence/citlivosti bakteriálních původců mastitid s významem pro humánní i veterinární oblast. Realizací těchto metod bude dosažena potřebná úroveň výsledků ke sledování a vyhodnocení šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám v bakteriálních populacích.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro veterinární diagnostické laboratoře - certifikovaná veterinární antibiotická střediska, veterinární nebo výzkumné laboratoře, Státní veterinární ústavy a soukromé veterinární laboratoře. Je možné její uplatnění v systému celonárodního monitoringu citlivosti/rezistence vybraných veterinárních patogenů k antimikrobiálním látkám vyhodnoceného na základě harmonizovaných standardních postupů. V konečném důsledku se uplatnění metodiky projeví ve zkvalitnění terapie mastitid bakteriálního původu vhodnou volbou léčiv.

V. Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou minimální (0 – 5 tis. Kč), protože jejich provedení nevyžaduje žádné speciální přístrojové vybavení bakteriologické laboratoře, je možné s využitím běžných přístrojů a pomůcek (termostat, pipety) a spotřebního materiálu.

Ekonomický přínos pro laboratoře bude představovat zisk z provedených vyšetření. Za předpokladu vyšetření v jedné laboratoři cca 500 vzorků ročně při ceně za jedno vyšetření kolem 500,- Kč, by se zisk 20 % z tržeb mohl pohybovat kolem 50 tis. pro jednu laboratoř.

V konečném důsledku budou uživatelé výsledků vyšetření chovatelé dojnic, kterým se sníží zlepšením diagnostiky ekonomické náklady na léčbu a prevenci onemocnění a zvýší se tržby za prodej zdravotně nezávadného kvalitního mléka.

VI. Seznam použité a související literatury

CLSI, 2012a. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition. M07-A9, vol. 32, No. 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2012: 68 pp.

CLSI, 2012b. 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, 2013a. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. Vet 01-A4, vol. 33, No. 7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2013: 73 pp.

CLSI, 2013b. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. Vet 01-S2, vol. 33, No 8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2013: 63 pp.

EUCAST - Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Version 5.13. [Database online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [cit. 2014-11-14]. available in www: <<http://217.70.33.99/Eucast2/>>

CA-SFM 2014. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2014. Lyon, France 2014: 122 pp.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice/Výstupy z originální práce

Nedbalcova, K., Kucerovala, Z.: Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* isolates associated with porcine pneumonia. Acta Veterinaria Brno, 2013, 82(1), 3-7.

Dedikace: *This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant numbers QH 71051, QH 71053 and MZE 0002716202) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant number ED0006/01/01 AdmireVet).*

Nedbalcova, K., Nechvatalova, K., Pokludova, L., Bures, J., Kucerovala, Z., Koutecka, L., Hera, A.: Resistance to selected beta-lactam antibiotics. Veterinary Microbiology, 2014, 171(3-4), 328-336.

Dedikace: *This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant numbers QJ 1210119 and MZE 0002716202) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant number ED0006/01/01 AdmireVet).*

Nedbalcova, K., Nechvatalova, K., Kucerovala, Z.: Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and mutant prevention concentration (MPC) of selected antimicrobials in bovine and swine *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* isolates. Acta Vet Brno, 2015, 84(2), 83-89.

Dedikace: *This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant number QJ1210119) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant number LO1218). The results of the project LO1218 were obtained with a financial support from the MEYS of the CR under the NPU I program.*

Nedbalcova, K., Kucharovičová, I., Černý, T., Pokludová, L., Bureš, J., Hera, A., Šatrán, P.: Sledování rezistencí k antimikrobikům u veterinárně významných patogenů. Veterinářství, 2015, 65(3), 206-211.

Dedikace: *Rukopis byl vypracován v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu Ministerstva zemědělství ČR (číslo grantu QJ1210119), za finanční podpory Ministerstva zemědělství prostřednictvím Státní veterinární správy ČR a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.*

Nedbalcová, K., Pokludová, L., Bureš, J., Krejčí, T., Hera, A.: Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních patogenů prasat k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací. Certifikovaná metodika 45/2014, ISBN 978-80-86895-51-2, VÚVeL Brno, 2015.
Číslo osvědčení: SVS/2015/025687

Dedikace: *Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.*

Nedbalcová, K., Pokludová, L., Bureš, J., Krejčí, T., Hera, A.: Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních patogenů skotu k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací. Certifikovaná metodika č. 46/2014, ISBN 978-80-86895-52-9, VÚVeL Brno, 2015. Číslo osvědčení: SVS/2015/025859

Dedikace: *Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství,*

mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.

Nedbalcová, K., Zouharová, M., Pokludová, L., Bureš, J., Krejčí, T., Hera, A.: Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních patogenů drůbeže k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací. Certifikovaná metodika č. 71/2015, ISBN 978-80-86895-79-6, VÚVeL Brno 2015. Číslo osvědčení: SVS/2016/006578-G

Dedikace: *Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.*

Oponenti:

MVDr. Milada Dubská – Státní veterinární správa ČR, Praha

Ing. Petr Sába, Ph.D. – Mendelova univerzita v Brně



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