



FUNKČNÍ VZOREK

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

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

**3967
2019**

Funkční vzorek 3967/2019

Set pro stanovení citlivosti/rezistence grampozitivních 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 978-80-88233-59-6

Obsah

Cíl metodiky vývoje funkčního vzorku	3
Účel použití	3
Popis výrobku	3
Interpretace výsledků	5
Ověření funkčnosti a kontrola kvality	8
Skladování	9
Exspirace	9
Způsob likvidace	9
Srovnání „novosti postupů“	10
Seznam použité literatury	11

Cíl vývoje funkčního vzorku

Cílem vývoje funkčního vzorku diagnostického setu na stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) u bakteriálních grampozitivních patogenů drůbeže – zejména stafylokoků a enterokoků – 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 třinácti 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 grampozitivních 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), u jedné antimikrobiální látky (ve sloupci 12) 4 ředění (řádky E – H) a u druhé antimikrobiální látky 3 ředění (řádky B-D) 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 on Antimicrobial Susceptibility Testing (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
	PNC	AMP	AMC	ERY	LIN	SPEC	ENR	FFC	TET	DOX	SXT	FOX
												OXA
A	16	64	64	16	16	512	8	64	64	32	32	PKR
B	8	32	32	8	8	256	4	32	32	16	16	16
C	4	16	16	4	4	128	2	16	16	8	8	8
D	2	8	8	2	2	64	1	8	8	4	4	4
E	1	4	4	1	1	32	0,5	4	4	2	2	2
F	0,5	2	2	0,5	0,5	16	0,25	2	2	1	1	1
G	0,25	1	1	0,25	0,25	8	0,125	1	1	0,5	0,5	0,5
H	0,125	0,5	0,5	0,125	0,125	4	0,06	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25

1. PNC penicillin
 2. AMP ampicillin
 3. AMC amoxicilin/kyselina klavulanová (2/1) – koncentrace v tabulce platí pro amoxicilin
 4. ERY erytromycin
 5. LIN linkospektin
 6. SPEC spektinomycin
 7. ENR enrofloxacin
 8. FFC florfenikol
 9. TET tetracyklin
 10. DOX doxycyklin
 11. SXT trimethoprim/sulfamethoxazol(1/19) – koncentrace v tabulce platí pro trimethoprim
 12. FOX cefoxitin
 13. OXA oxacilin
- 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 *Staphylococcus* (Tab. 2) a rod *Enterococcus* (Tab. 3). 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 *Streptococcus* spp.

Antimikrobiální látká		Staphylococcus spp.			Zdroj
		MIC breakpoint (mg/l)			
		≤C	I	≥R	
penicilin	PNC	0,12		0,25	VET08
ampicilin	AMP	-	-	-	-
amoxicilin/kyselina klavulanová	AMC	-	-	-	-
erythromycin	ERY	0,5	1-4	8	VET08
linkospektin*	LIN	2	4-8	16	VET08
spektinomycin	SPEC	-	-	-	-
enrofloxacin	ENR	0,5	1-2	4	VET08
florfenikol**	FFC	8	16	32	VET08
tetracyklin	TET	1	2	4	EUCAST
doxycyklin	DOX	1	2	4	EUCAST
trimethoprim/sulfamethoxazol	SXT	2/38	4/76	8/152	EUCAST
cefoxitin- <i>S. aureus</i> , <i>S. lugdunensis</i>	FOX	4		8	EUCAST
oxacillin <i>S. aureus</i> , <i>S.</i> <i>lugdunensis</i>	OXA	2		4	EUCAST
oxacillin CoNS***	OXA	0,25		0,5	VET01S

*breakpointy pro linkospectin byly odvozeny od linkomycinu

**breakpointy pro florfenikol byly odvozeny od chloramfenikolu

***CoNS = koaguláza negativní stafylokoky

Tab. 3: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Enterococcus* spp.

Antimikrobiální látka		Enterococcus spp.			Zdroj
		MIC breakpoint (mg/l)			
		≤C	I	≥R	
penicilin	PNC	8		16	VET08
ampicilin	AMP	4	8	16	EUCAST
amoxicilin/kyselina klavulanová	AMC	4	8	16	EUCAST
erythromycin	ERY	0,5	1-4	8	VET08
linkospektin	LIN	-	-	-	-
spektinomycin	SPEC	-	-	-	-
enrofloxacin	ENR	0,25	0,5-1	2	VET01S
florfenikol*	FFC	8	16	32	VET08
tetracyklin**	TET	4	8	16	VET08
doxycyklin	DOX	-	-	-	-
trimethoprim/sulfamethoxazol	SXT	≤0,03/0,6	0,06-1	2/38	EUCAST
cefoxitin	FOX	-	-	-	-
oxacillin	OXA	-	-	-	-

*breakpointy pro florfenikol byly odvozeny od chloramfenikolu

**výsledek platí v případě citlivosti i pro doxycyklin

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 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 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 *S. aureus* a *E. faecalis* (mg/l) je vyznačeno v tabulkách 4 a 5 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. 4: Rozmezí MIC u kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMP	AMC	ERY	LIN	SPEC	ENR	FFC	TET	DOX	SXT	FOX
											OXA
8	64	64	16	16	512	8	64	64	32	32	PKR
4	32	32	8	8	256	4	32	32	16	16	16
2	16	16	4	4	128	2	16	16	8	8	8
1	8	8	2	2	64	1	8	8	4	4	4
0,5	4	4	1	1	32	0,5	4	4	2	2	2
0,25	2	2	0,5	0,5	16	0,25	2	2	1	1	1
0,125	1	1	0,25	0,25	8	0,125	1	1	0,5	0,5	0,5
0,125	0,5	0,5	0,125	0,125	4	0,06	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25

Tab. 5: Rozmezí MIC u kmene *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMP	AMC	ERY	LIN	SPEC	ENR	FFC	TET	DOX	SXT	FOX
											OXA
8	64	64	16	16	512	8	64	64	32	32	PKR
4	32	32	8	8	256	4	32	32	16	16	16
2	16	16	4	4	128	2	16	16	8	8	8
1	8	8	2	2	64	1	8	8	4	4	4
0,5	4	4	1	1	32	0,5	4	4	2	2	2
0,25	2	2	0,5	0,5	16	0,25	2	2	1	1	1
0,125	1	1	0,25	0,25	8	0,125	1	1	0,5	0,5	0,5
0,125	0,5	0,5	0,125	0,125	4	0,06	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25

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 grampozitivních patogenů drůbeže – stafylokoků a enterokoků – 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 stafylokoky a enterokoky, 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 grampozitivních 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/>>



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