



FUNKČNÍ VZOREK

**Set ke stanovení minimálních inhibičních
koncentrací antimikrobiálních látek
u *Streptococcus uberis***

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

4709
2019

Funkční vzorek 4709/2019

Set ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u *Streptococcus uberis*

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

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
QK 1910212 a MZE-RO0518.**

ISBN 978-80-88233-71-8

Obsah

Cíl metodiky vývoje funkčního vzorku	3
Účel použití	3
Popis výrobku	3
Interpretace výsledků	5
Ověření funkčnosti a kontrola kvality	6
Skladování	7
Exspirace	7
Způsob likvidace	7
Srovnání „novosti postupů“	7
Seznam použité literatury	8

Cíl vývoje funkčního vzorku

Cílem vývoje funkčního vzorku diagnostického setu na stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) u patogenního bakteriálního druhu *Streptococcus uberis*, způsobujícího mastitidy u krav, bylo vytvoření spolehlivého diagnostického nástroje pro stanovení citlivosti/rezistence těchto bakterií k antimikrobikům, která jsou schválena k léčbě mastitid, ale také k antimikrobikům, u kterých je sledování rezistence důležité z jiných, například epidemiologických důvodů. Diagnostický set, umožňuje jednorázově stanovit MIC čtrnácti 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 *S. uberis* pocházejících ze vzorků mléka krav stížených mastitidou 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 čtrnáct navržených antimikrobiálních látek v objemu 100 µl, u osmi antimikrobiálních látek (sloupce 1-4 a 7-11) je na destičce 8 ředění (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), u jedné antimikrobiální látky (sloupec 12) je 7 ředění (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 on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), musí zahrnovat také rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů povinně testovaných v rámci kontroly kvality. Rozmezí testovaných koncentrací je znázorněno v tabulce 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	STR	CLI	ERY	GEN	TET	RIF	SXT
					CEFQ	PIR						
A	8	8	4	256	8	512	8	8	512	32	4	PK
B	4	4	2	128	4	256	4	4	256	16	2	8
C	2	2	1	64	2	128	2	2	128	8	1	4
D	1	1	0,5	32	1	64	1	1	64	4	0,5	2
E	0,5	0,5	0,25	16	4	4	0,5	0,5	8	2	0,25	1
F	0,25	0,25	0,125	8	2	2	0,25	0,25	4	1	0,125	0,5
G	0,125	0,125	0,06	4	1	1	0,125	0,125	2	0,5	0,06	0,25
H	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.

Seznam antimikrobiálních látek:

PNC penicilin

AMP ampicilin

AMC amoxicilin/klavulanová kyselina 2/1 (koncentrace v tabulce platí pro amoxicilin)

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 (koncentrace v tabulce platí pro trimethoprim)

PK pozitivní kontrola růstu

Antimikrobika jsou naředěna v růstovém bujónu Mueller Hinton Broth s přidavkem 4 % lyzované koňské krve.

Interpretace výsledků

Interpretace výsledků do kategorií citlivé, intermediální a rezistentní vyžaduje použití tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek (EUCAST, CLSI)(Tab.2). 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 *S. uberis*, případně pro další viridující streptokoky. U některých antimikrobik nejsou klinické breakpointy pro *S. uberis* nebo viridující streptokoky udávány, v tomto případě byla kritéria citlivosti odvozena z breakpointů udávaných pro *Streptococcus pneumoniae*.

Tab. 2: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Streptococcus uberis*

Antimikrobiální látka		MIC breakpoint (mg/l)			Zdroj
		≤C	I	≥R	
penicilin	PNC	0,25	0,5-2	4	EUCAST, 2019
ampicilin	AMP	0,5	1-2	4	EUCAST, 2019
amoxicilin/kyselina klavulanová	AMC	0,5	1	2	EUCAST, 2019
cefalexin	CEFL	8	16-32	64	CA-SFM, 2018
ceftiofur	CEF	2	4	8	VET08, CLSI, 2018
cefchinom	CEFQ	1	2	4	CLSI, 2012
streptomycin	STR	256	-	512	CA-SFM, 2018
pirlimycin	PIR	2	-	4	VET08, CLSI, 2018
klindamycin	CLI	0,5	-	1	EUCAST, 2019
erythromycin	ERY	0,25	0,5	1	EUCAST, 2019
gentamicin	GEN	128	-	256	EUCAST, 2019
tetracyklin	TET	2	4	8	M100, CLSI, 2018
rifampin	RIF	0,06	0,125-0,5	1	EUCAST, 2019
trimethoprim/sulfamethoxazol	SXT	1	-	4	EUCAST, 2019

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 kontrolního kmene *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, který je přesně definován a hodnoty MIC k některým antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI 2018 (VET 08 a M100) a EUCAST. Stanovené hodnoty MIC jednotlivých antimikrobik musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC referenčních kmenů dle CLSI a EUCAST.

Referenční rozmezí hodnot MIC kontrolního kmene *S. pneumoniae* (mg/l) je vyznačeno v tabulce 3 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 *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	

Skladování

Sety je nutné skladovat zamražené při teplotě – 80. Po rozmrazení a temperování setu na kultivační teplotu je nutné provést inokulaci destičky do 1h. Rozmražené 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 *Streptococcus uberis* obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence klinických izolátů k antimikrobiálním látkám, které jsou běžně užívány u krav k léčbě mastitid způsobených *S. uberis*. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí *S. uberis* 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

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/>

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

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.

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



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