



FUNKČNÍ VZOREK

**Set ke stanovení minimálních inhibičních
koncentrací antimikrobiálních látek
u gramnegativních bakterií – II. řada**

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

**5452
2017**

Funkční vzorek 5452/2017

Set ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u gramnegativních bakterií – II. řada

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 projektu Technologické agentury České republiky
TG03010038**

ISBN 978-80-88233-17-6

Obsah

Cíl metodiky vývoje funkčního vzorku	3
Účel použití	3
Popis výrobku	3
Interpretace výsledků	5
Ověření funkčnosti a kontrola kvality	6
Skladování	8
Exspirace	8
Způsob likvidace	8
Srovnání „novosti postupů“	8
Seznam použité literatury	9

Cíl vývoje funkčního vzorku

Cílem vývoje funkčního vzorku diagnostického setu na stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) u bakteriálních gramnegativních humánních patogenů byla snaha o vytvoření spolehlivého diagnostického nástroje pro stanovení citlivosti/rezistence gramnegativních bakterií k antimikrobikům. 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 humánních bakteriálních patogenů 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 dvanáct navržených antimikrobiálních látek v objemu 100 μ l, 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 100 μ l 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 podle závazných mezinárodních metodik CLSI a EUCAST včetně rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů povinně testovaných v rámci kontroly kvality (Tab. 1).

Tab. 1: Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u anaerobních bakterií

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMI	PPT	CPR	CTX	CTZ	CPM	CPS	MER	CIP	TIG	TOB	PIP
64	128	32	16	16	32	64	64	16	16	32	PK
32	64	16	8	8	16	32	32	8	8	16	128
16	32	8	4	4	8	16	16	4	4	8	64
8	16	4	2	2	4	8	8	2	2	4	32
4	8	2	1	1	2	4	4	1	1	2	16
2	4	1	0,5	0,5	1	2	2	0,5	0,5	1	8
1	2	0,5	0,25	0,25	0,5	1	1	0,25	0,25	0,5	4
0,5	1	0,25	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125	0,25	2

1. AMI amikacin
2. PPT piperacillin/tazobactam
3. CPR cefoperazon
4. CTX cefotaxim
5. CTZ ceftazidim
6. CPM cefepim
7. CPS cefoperazon/sulbactam 2/1
8. MER meropenem
9. CIP ciprofloxacin
10. TIG tigecyclin
11. TOB tobramycin
12. PIP piperacillin
- PK pozitivní kontrola růstu

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l.

PPT – koncentrace uvedená v tabulce se vztahuje k piperacilinu; CPS – koncentrace uvedená v tabulce se vztahuje k cefoperazonu.

Sety jsou navrženy ve dvou modifikacích, které se liší použitým růstovým médiem:

1. Set pro stanovení MIC růstově nenáročných gramnegativních bakterií – Mueller Hinton
Broth
2. Set pro stanovení MIC růstově náročných gramnegativních bakterií – Mueller Hinton
Broth, lyzovaná koňská krev (5 %) a β -NAD (20 mg/L)

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* (Tab. 2) a rod *Haemophilus* (Tab. 3). Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé (s MIC v hodnotách označených zeleně), intermediální (s MIC v hodnotách označených modře) a rezistentní. U antimikrobik, kde nejsou koncentrace barevně rozděleny, nejsou breakpointy pro enterobakterie a hemofily stanoveny a účinnost antimikrobiální látky lze posoudit pouze individuálně podle hodnoty MIC.

Tab. 2: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Enterobacteriaceae* spp.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMI	PPT	CPR	CTX	CTZ	CPM	CPS	MER	CIP	TIG	TOB	PIP
64	128	32	16	16	32	64	64	16	16	32	PK
32	64	16	8	8	16	32	32	8	8	16	128
16	32	8	4	4	8	16	16	4	4	8	64
8	16	4	2	2	4	8	8	2	2	4	32
4	8	2	1	1	2	4	4	1	1	2	16
2	4	1	0,5	0,5	1	2	2	0,5	0,5	1	8
1	2	0,5	0,25	0,25	0,5	1	1	0,25	0,25	0,5	4
0,5	1	0,25	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125	0,25	2

Tab. 3: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Haemophilus* spp,

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMI	PPT	CPR	CTX	CTZ	CPM	CPS	MER	CIP	TIG	TOB	PIP
64	128	32	16	16	32	64	64	16	16	32	PK
32	64	16	8	8	16	32	32	8	8	16	128
16	32	8	4	4	8	16	16	4	4	8	64
8	16	4	2	2	4	8	8	2	2	4	32
4	8	2	1	1	2	4	4	1	1	2	16
2	4	1	0,5	0,5	1	2	2	0,5	0,5	1	8
1	2	0,5	0,25	0,25	0,5	1	1	0,25	0,25	0,5	4
0,5	1	0,25	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125	0,25	2

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 *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, 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 *H. influenzae* (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 *Escherichia coli* ATCC 25922

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMI	PPT	CPR	CTX	CTZ	CPM	CPS	MER	CIP	TIG	TOB	PIP
64	128	32	16	16	32	64	64	16	16	32	PK
32	64	16	8	8	16	32	32	8	8	16	128
16	32	8	4	4	8	16	16	4	4	8	64
8	16	4	2	2	4	8	8	2	2	4	32
4	8	2	1	1	2	4	4	1	1	2	16
2	4	1	0,5	0,5	1	2	2	0,5	0,5	1	8
1	2	0,5	0,25	0,25	0,5	1	1	0,25	0,25	0,5	4
0,5	1	0,25	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125	0,25	2
					0,015- 0,12		0,008- 0,06	0,004- 0,015			

Tab. 5: Rozmezí MIC u kmene *Haemophilus influenzae* ATCC 49247

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMI	PPT	CPR	CTX	CTZ	CPM	CPS	MER	CIP	TIG	TOB	PIP
64	128	32	16	16	32	64	64	16	16	32	PK
32	64	16	8	8	16	32	32	8	8	16	128
16	32	8	4	4	8	16	16	4	4	8	64
8	16	4	2	2	4	8	8	2	2	4	32
4	8	2	1	1	2	4	4	1	1	2	16
2	4	1	0,5	0,5	1	2	2	0,5	0,5	1	8
1	2	0,5	0,25	0,25	0,5	1	1	0,25	0,25	0,5	4
0,5	1	0,25	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125	0,25	2
								0,004- 0,03			0,06- 0,5

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 – II. řada obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k antimikrobiálním látkám, které jsou běžně užívány k léčbě onemocnění lidí způsobených gramnegativními bakteriemi. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí gramnegativních humánních bakteriálních patogenů 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 2016: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M 100, 26th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2016: 251 pp.

EUCAST - Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Version 5.13. [Database online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [cit. 2017-12-07]. available in www: <<http://217.70.33.99/Eucast2/>>



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