



FUNKČNÍ VZOREK

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

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

**5453
2017**

Funkční vzorek 5453/2017

Set ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u gramnegativních bakterií – I. 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 978-80-88233-15-2

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 µl, 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 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 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
AMP	AMS	CZL	CRX	CXT	CMP	TET	GEN	SXT	COL	OFL	AZT
64	32	64	64	32	64	32	32	64	32	16	PK
32	16	32	32	16	32	16	16	32	16	8	64
16	8	16	16	8	16	8	8	16	8	4	32
8	4	8	8	4	8	4	4	8	4	2	16
4	2	4	4	2	4	2	2	4	2	1	8
2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	0,5	4
1	0,5	1	1	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,25	2
0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25	0,125	1

AMP ampicillin
AMS ampicillin/sulbactam 2/1
CZL cefazolin
CRX cefuroxim
CXT ceftioxin
CMP chloramfenicol
TET tetracyklin
GEN gentamicin
COT trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19
SXT kolistin
OFL ofloxacin
AZT aztreonam
PK pozitivní kontrola růstu

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l.

SXT –koncentrace uvedená v tabulce se vztahuje k trimethoprimu; AMS – koncentrace uvedená v tabulce se vztahuje k ampicilinu

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 hemofilu 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
AMP	AMS	CZL	CRX	CXT	CMP	TET	GEN	SXT	COL	OFL	AZT
64	32	64	64	32	64	32	32	64	32	16	PK
32	16	32	32	16	32	16	16	32	16	8	64
16	8	16	16	8	16	8	8	16	8	4	32
8	4	8	8	4	8	4	4	8	4	2	16
4	2	4	4	2	4	2	2	4	2	1	8
2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	0,5	4
1	0,5	1	1	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,25	2
0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25	0,125	1

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

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	AMS	CZL	CRX	CXT	CMP	TET	GEN	SXT	COL	OFL	AZT
64	32	64	64	32	64	32	32	64	32	16	PK
32	16	32	32	16	32	16	16	32	16	8	64
16	8	16	16	8	16	8	8	16	8	4	32
8	4	8	8	4	8	4	4	8	4	2	16
4	2	4	4	2	4	2	2	4	2	1	8
2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	0,5	4
1	0,5	1	1	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,25	2
0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25	0,125	1

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
AMP	AMS	CZL	CRX	CXT	CMP	TET	GEN	SXT	COL	OFL	AZT
64	32	64	64	32	64	32	32	64	32	16	PK
32	16	32	32	16	32	16	16	32	16	8	64
16	8	16	16	8	16	8	8	16	8	4	32
8	4	8	8	4	8	4	4	8	4	2	16
4	2	4	4	2	4	2	2	4	2	1	8
2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	0,5	4
1	0,5	1	1	0,5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,25	2
0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25	0,125	1
								≤		≤	0,06-0,25

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

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	AMS	CZL	CRX	CXT	CMP	TET	GEN	SXT	COL	OFL	AZT
64	32	64	64	32	64	32	32	64	32	16	PK
32	16	32	32	16	32	16	16	32	16	8	64
16	8	16	16	8	16	8	8	16	8	4	32
8	4	8	8	4	8	4	4	8	4	2	16
4	2	4	4	2	4	2	2	4	2	1	8
2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	0,5	4
1	0,5	1	1	0,5		0,5	0,5	1	0,5	0,25	2
0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25	0,125	1
					≤			0,03-0,25		0,015-0,06	0,12-0,5

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 – I. 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