



## FUNKČNÍ VZOREK

---

**Set ke stanovení minimálních inhibičních  
koncentrací antimikrobiálních látek  
u *Staphylococcus* spp. a *Streptococcus* spp.**

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

5455  
2017

## **Funkční vzorek 5455/2017**

### **Set ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u *Staphylococcus* spp. a *Streptococcus* spp.**

#### **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 978-80-88233-23-7**

## **Obsah**

Cíl metodiky vývoje funkčního vzorku	3
Účel použití	3
Popis výrobku	3
Interpretace výsledků	5
Ověření funkčnosti a kontrola kvality	7
Skladování	9
Exspirace	9
Způsob likvidace	9
Srovnání „novosti postupů“	9
Seznam použité literatury	10

## **Cíl vývoje funkčního vzorku**

Cílem vývoje funkčního vzorku diagnostického setu na stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) u bakteriálních grampozitivních humánních patogenů – stafylokoků a streptokoků – byla snaha o vytvoření spolehlivého diagnostického nástroje pro stanovení citlivosti/rezistence těchto 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 grampozitivních stafylokoků a streptokoků 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 stafylokoků a streptokoků

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>PEN</b>	<b>OXA</b>	<b>AMP</b>	<b>CMP</b>	<b>TET</b>	<b>VAN</b>	<b>ERY</b>	<b>CLI</b>	<b>CIP</b>	<b>GEN</b>	<b>TEI</b>	<b>SXT</b>
2	16	64	32	16	64	8	8	8	32	64	<b>PK</b>
1	8	32	16	8	32	4	4	4	16	32	64
0.5	4	16	8	4	16	2	2	2	8	16	32
0.25	2	8	4	2	8	1	1	1	4	8	16
0.125	1	4	2	1	4	0.5	0.5	0.5	2	4	8
0.063	0.5	2	1	0.5	2	0.25	0.25	0.25	1	2	4
0.031	0.25	1	0.5	0.25	1	0.125	0.125	0.125	0.5	1	2
0.015	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.063	0.063	0.063	0.25	0.5	1

1. PEN penicilin
  2. OXA oxacilin
  3. AMP ampicilin
  4. CMP chloramphenicol
  5. TET tetracyklin
  6. VAN vancomycin
  7. ERY erythromycin
  8. CLI clindamycin
  9. CIP ciprofloxacin
  10. GEN gentamicin
  11. TEI teicoplanin
  12. SXT trimethoprim/sulfamethoxazol v poměru 1/19
- PK pozitivní kontrola růstu

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l.

SXT – koncentrace trimethoprim/sulfamethoxazol je 1/19; koncentrace uvedená v tabulce se vztahuje k trimethoprimu.

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

1. Set pro stanovení MIC stafylokoků – Mueller Hinton Broth
2. Set pro stanovení MIC streptokoků – Mueller Hinton Broth s lyzovanou koňskou krví

(5 %)

## 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 *Streptococcus* (Tab. 3, 4, 5). 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 stafylokoky a streptokoky stanoveny a účinnost antimikrobiální látky lze posoudit pouze individuálně podle hodnoty MIC.

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

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>PEN</b>	<b>OXA*</b>	<b>AMP</b>	<b>CMP</b>	<b>TET</b>	<b>VAN</b>	<b>ERY</b>	<b>CLI</b>	<b>CIP</b>	<b>GEN</b>	<b>TEI**</b>	<b>SXT</b>
2	16	64	32	16	64	8	8	8	32	64	<b>PK</b>
1	8	32	16	8	32	4	4	4	16	32	64
0.5	4	16	8	4	16	2	2	2	8	16	32
0.25	2	8	4	2	8	1	1	1	4	8	16
0.125	1	4	2	1	4	0.5	0.5	0.5	2	4	8
0.063	0.5	2	1	0.5	2	0.25	0.25	0.25	1	2	4
0.031	0.25	1	0.5	0.25	1	0.125	0.125	0.125	0.5	1	2
0.015	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.063	0.063	0.063	0.25	0.5	1

\*platí pro *S. aureus* a *S. lugdunensis*; pro koaguláza negativní stafylokoky je C ≤2 mg/L a R >2 mg/L

\*\* platí pro *S. aureus* a *S. lugdunensis*; pro koaguláza negativní stafylokoky je C ≤4 mg/L a R >4 mg/L

Tab. 3: Breakpointy antimikrobiálních látek pro beta-hemolytické streptokoky

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>PEN</b>	<b>OXA</b>	<b>AMP</b>	<b>CMP</b>	<b>TET</b>	<b>VAN</b>	<b>ERY</b>	<b>CLI</b>	<b>CIP</b>	<b>GEN</b>	<b>TEI</b>	<b>SXT</b>
2	16	64	32	16	64	8	8	8	32	64	<b>PK</b>
1	8	32	16	8	32	4	4	4	16	32	64
0.5	4	16	8	4	16	2	2	2	8	16	32
0.25	2	8	4	2	8	1	1	1	4	8	16
0.125	1	4	2	1	4	0.5	0.5	0.5	2	4	8
0.063	0.5	2	1	0.5	2	0.25	0.25	0.25	1	2	4
0.031	0.25	1	0.5	0.25	1	0.125	0.125	0.125	0.5	1	2
0.015	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.063	0.063	0.063	0.25	0.5	1

Tab. 4: Breakpointy antimikrobiálních látek pro viridující streptokoky

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>PEN</b>	<b>OXA</b>	<b>AMP</b>	<b>CMP</b>	<b>TET</b>	<b>VAN</b>	<b>ERY</b>	<b>CLI</b>	<b>CIP</b>	<b>GEN</b>	<b>TEI</b>	<b>SXT</b>
2	16	64	32	16	64	8	8	8	32	64	<b>PK</b>
1	8	32	16	8	32	4	4	4	16	32	64
0.5	4	16	8	4	16	2	2	2	8	16	32
0.25	2	8	4	2	8	1	1	1	4	8	16
0.125	1	4	2	1	4	0.5	0.5	0.5	2	4	8
0.063	0.5	2	1	0.5	2	0.25	0.25	0.25	1	2	4
0.031	0.25	1	0.5	0.25	1	0.125	0.125	0.125	0.5	1	2
0.015	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.063	0.063	0.063	0.25	0.5	1

Tab. 3: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Streptococcus pneumoniae*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PEN*	OXA	AMP	CMP	TET	VAN	ERY	CLI	CIP	GEN	TEI	SXT
2	16	64	32	16	64	8	8	8	32	64	PK
1	8	32	16	8	32	4	4	4	16	32	64
0.5	4	16	8	4	16	2	2	2	8	16	32
0.25	2	8	4	2	8	1	1	1	4	8	16
0.125	1	4	2	1	4	0.5	0.5	0.5	2	4	8
0.063	0.5	2	1	0.5	2	0.25	0.25	0.25	1	2	4
0.031	0.25	1	0.5	0.25	1	0.125	0.125	0.125	0.5	1	2
0.015	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.063	0.063	0.063	0.25	0.5	1

\*Penicilin – meningitidy C≤0,06 mg/L a R >0,06 mg/L; v ostatních případech C≤0,06 mg/L a R >2 mg/L

## 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 *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, 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 *S. pneumoniae* (mg/l) je vyznačeno v tabulkách 6 a 7 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. 6: Rozmezí MIC u kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>PEN</b>	<b>OXA</b>	<b>AMP</b>	<b>CMP</b>	<b>TET</b>	<b>VAN</b>	<b>ERY</b>	<b>CLI</b>	<b>CIP</b>	<b>GEN</b>	<b>TEI</b>	<b>SXT</b>
2	16	64	32	16	64	8	8	8	32	64	<b>PK</b>
1	8	32	16	8	32	4	4	4	16	32	64
0.5	4	16	8	4	16	2	2	2	8	16	32
0.25	2	8	4	2	8	1	1	1	4	8	16
0.125	1	4	2	1	4	0.5	0.5	0.5	2	4	8
0.063	0.5	2	1	0.5	2	0.25	0.25	0.25	1	2	4
0.031	0.25	1	0.5	0.25	1	0.125	0.125	0.125	0.5	1	2
0.015	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.063	0.063	0.063	0.25	0.5	1

Tab. 7: Rozmezí MIC u kmene *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>PEN</b>	<b>OXA</b>	<b>AMP</b>	<b>CMP</b>	<b>TET</b>	<b>VAN</b>	<b>ERY</b>	<b>CLI</b>	<b>CIP</b>	<b>GEN</b>	<b>TEI</b>	<b>SXT</b>
2	16	64	32	16	64	8	8	8	32	64	<b>PK</b>
1	8	32	16	8	32	4	4	4	16	32	64
0.5	4	16	8	4	16	2	2	2	8	16	32
0.25	2	8	4	2	8	1	1	1	4	8	16
0.125	1	4	2	1	4	0.5	0.5	0.5	2	4	8
0.063	0.5	2	1	0.5	2	0.25	0.25	0.25	1	2	4
0.031	0.25	1	0.5	0.25	1	0.125	0.125	0.125	0.5	1	2
0.015	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.063	0.063	0.063	0.25	0.5	1
		0,06- 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 gram pozitivních patogenů – stafylokoků a streptokoků – 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 těmito bakteriálními druhy. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí gram pozitivních 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/>>

VU<sup>Ve</sup>L 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)