



FUNKČNÍ VZOREK

**Set ke stanovení minimálních inhibičních
koncentrací antimikrobiálních látek
u bakteriálních anaerobních
patogenů hospodářských zvířat**

**MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Tomáš Krejčí**

**5474
2017**

Funkční vzorek 5474/2017

Set ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u bakteriálních anaerobních patogenů hospodářských zvířat

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D. ¹

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D. ¹

MVDr. Tomáš Krejčí ²

¹ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

² LabMediaServis, s.r.o., Huntířov

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1510218) a Národního programu udržitelnosti NPU-I (LO1218) a projektu Ministerstva zemědělství ČR RO0517.

2017

ISBN 978-80-88233-12-1

OBSAH

Cíl metodiky vývoje funkčního vzorku	3
Účel použití	3
Popis výrobku	3
Interpretace výsledků	5
Ověření funkčnosti a kontrola kvality	5
Skladování	6
Exspirace	6
Způsob likvidace	6
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 bakteriálních anaerobních patogenů hospodářských zvířat byla snaha o zkvalitnění, zjednodušení a zlevnění diagnostiky rezistencí anaerobních bakterií k antimikrobikům. Byl navržen diagnostický nástroj, umožňující 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 bakteriálních anaerobních patogenů hospodářských zvířat 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 200 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 200 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 rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů povinně testovaných v rámci kontroly kvality (Tab. 1). Pro anaerobní bakterie je použito růstové médium Brucella Broth obohacené heminem a vitamínem K1 (CLSI, EUCAST).

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

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	PNC	EFT	VAN	CLI	MER	TIG	ENR	TIA	TYL	FFC	SXT
16	16	128	16	32	64	64	32	64	128	32	PKR
8	8	64	8	16	32	32	16	32	64	16	32
4	4	32	4	8	16	16	8	16	32	8	16
2	2	16	2	4	8	8	4	8	16	4	8
1	1	8	1	2	4	4	2	4	8	2	4
0,5	0,5	4	0,5	1	2	2	1	2	4	1	2
0,25	0,25	2	0,25	0,5	1	1	0,5	1	2	0,5	1
0,125	0,125	1	0,125	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,25	0,5

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l.

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

AMP	ampicilín
PNC	penicilin
EFT	ceftiofur
VAN	vankomycin
CLI	klindamycin
MER	meropenem
TIG	tigecyklin
ENR	enrofloxacin
TIA	tiamulin
TYL	tylosin
FFC	florfenikol
SXT	trimethopri/sulfamethoxazol 1/19

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

Tab. 2: Breakpointy antimikrobiálních látek pro anaerobní bakterie

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	PNC	EFT	VAN	CLI	MER	TIG	ENR	TIA	TYL	FFC	SXT
16	16	128	16	32	64	64	32	64	128	32	PKR
8	8	64	8	16	32	32	16	32	64	16	32
4	4	32	4	8	16	16	8	16	32	8	16
2	2	16	2	4	8	8	4	8	16	4	8
1	1	8	1	2	4	4	2	4	8	2	4
0,5	0,5	4	0,5	1	2	2	1	2	4	1	2
0,25	0,25	2	0,25	0,5	1	1	0,5	1	2	0,5	1
0,125	0,125	1	0,125	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,25	0,5

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 *Clostridium difficile* ATCC 700057, který je přesně definován 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.

Stanovené rozmezí hodnot MIC kontrolního kmene *C. difficile* (mg/l) je vyznačeno v tabulce (Tab. 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 *Clostridium difficile* ATCC 700057

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	PNC	EFT	VAN	CLI	MER	TIG	ENR	TIA	TIL	FFC	SXT
16	16	128	16	32	64	64	32	64	128	32	PKR
8	8	64	8	16	32	32	16	32	64	16	32
4	4	32	4	8	16	16	8	16	32	8	16
2	2	16	2	4	8	8	4	8	16	4	8
1	1	8	1	2	4	4	2	4	8	2	4
0,5	0,5	4	0,5	1	2	2	1	2	4	1	2
0,25	0,25	2	0,25	0,5	1	1	0,5	1	2	0,5	1
0,125	0,125	1	0,125	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,25	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 anaerobních bakteriálních patogenů obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k veterinárně specifickým antimikrobiálním látkám, které jsou užívány k léčbě onemocnění způsobených zvířaty klostridiemi nebo jinými anaerobními bakteriemi a jejichž léčivé formy jsou v ČR registrovány nebo je jejich testování vhodné z hlediska sledování možností léčby infekcí způsobených klostridiemi u lidí. V současné době jsou k testování rezistencí anaerobních bakterií ve veterinární i v humánní medicíně k dispozici e-testy nebo je podle metodik možné testování anaerobních bakterií (kromě skupiny *Bacillus fragilis*) agarovým difúzním testem. Použití mikrodiluční metody, která je buď finančně (e-testy) nebo technicky (agarová difúzní metoda) mnohem výhodnější a vhodnější pro rutinní použití v diagnostických laboratořích, zatím není doporučována jako diagnostický standard, především proto, že dosud nebyly stanoveny harmonizované postupy pro tuto metodu u anaerobních bakterií. V rámci testování přesnosti stanovení MIC u anaerobních bakterií mikrodiluční metodou, specifity a stability vyvíjených testů byla kvalita předkládané metodiky ověřena srovnáním výsledků stanovení MIC u anaerobních bakterií rodu *Clostridium* spp. s výsledky dosaženými paralelním vyšetřováním testovaných kmenů pomocí komerčně vyráběných e-testů i s výsledky dosaženými stanovením MIC kmenů agarovou difúzní metodou. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí anaerobních bakterií k antimikrobikům reaguje na aktuální potřebu veterinárních diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může konkurovat jiným metodám stanovení MIC u anaerobních bakteriálních patogenů konkurovat kvalitou provedení, originalitou a především cenovou dostupností.

Metody vyšetření citlivosti/rezistence anaerobních patogenů k antimikrobiálním látkám a v neposlední řadě také interpretace zjištěných výsledků nejsou v současné době jednotné a neposkytují proto relevantní výsledky pro klinickou veterinární praxi. Využitím předkládaného funkčního vzorku je možné provádět komplexní vyšetřování nebo monitoring rezistence/citlivosti bakteriálních anaerobních patogenů zvířat s významem pro humánní i veterinární oblast. Realizací těchto metod bude dosažena potřebná úroveň výsledků ke sledování a vyhodnocení šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám v bakteriálních populacích.

Seznam použité a související literatury

CLSI, 2012a. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Eighth Edition. M11-A8, vol. 32, No. 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2012: 39 pp.

CLSI, 2012b. 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, 2013a. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. Vet 01-A4, vol. 33, No. 7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2013: 73 pp.

CLSI, 2013b. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. Vet 01-S2, vol. 33, No 8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2013: 63 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/>>

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Název: **Set ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u bakteriálních anaerobních patogenů hospodářských zvířat**

Autoři: MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Tomáš Krejčí



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