

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

**Výroba setu ke stanovení citlivosti/rezistence
gramnegativních bakteriálních patogenů
drůbeže k antimikrobikům**

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

**4747
2019**

Ověřená technologie

4747/2019

Výroba setu ke stanovení citlivosti/rezistence gramnegativních bakteriálních patogenů drůbeže k antimikrobikům

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

Ověřená technologie byla vyvinuta v rámci projektů v rámci projektů Ministerstva zemědělství ČR (čísla grantů: QK1910057 a RO0518)

ISBN 978-80-88233-73-2

Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u G- bakteriálních patogenů drůbeže

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	AMC	CTX	TET	DOX	SPEC	SXT	ENR	FFC	TIA	TYL	TIL
A	32	32	16	32	16	512	64	16	64	128	128	PKR
B	16	16	8	16	8	256	32	8	32	64	64	64
C	8	8	4	8	4	128	16	4	16	32	32	32
D	4	4	2	4	2	64	8	2	8	16	16	16
E	2	2	1	2	1	32	4	1	4	8	8	8
F	1	1	0,5	1	0,5	16	2	0,5	2	4	4	4
G	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	8	1	0,25	1	2	2	2
H	0,25	0,25	0,125	0,25	0,125	4	0,5	0,125	0,5	1	1	1

1. AMP ampicillin
2. AMC amoxicilin/kyselina klavulanová (2/1) – koncentrace v tabulce platí pro amoxicilin
3. CTX cefotaxim
4. TET tetracyklin
5. DOX doxycyklin
6. SPEC spektinomycin
7. SXT trimethoprim/sulfamethoxazol(1/19) – koncentrace v tabulce platí pro trimethoprim
8. ENR enrofloxacin
9. FFC florfenikol
10. TIA tiamulin
11. TYL tylosin
12. TIL tilmikosin

PKR pozitivní kontrola růstu

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce je uvedena v mg/l.

Technická dokumentace

Účel použití:

Laboratorní *in vitro* stanovení citlivosti/rezistence klinických izolátů gramnegativních patogenů drůbeže 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:

Sety ke stanovení minimálních koncentrací (MIC) bakteriálních G- patogenů drůbeže s originálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek umožňují testování jeho rezistencí k antimikrobikům, která jsou užívána k léčbě drůbeže způsobených těmito patogeny. V setech jsou také zastoupena antimikrobika, jejichž testování má význam pro predikci jejich účinnosti a z epidemiologických důvodů ke zjišťování fenotypové rezistence a jejího šíření v bakteriálních populacích. Vývoj a výroba nových setů ke stanovení rezistencí bakteriálních G- patogenů drůbeže reaguje na aktuální potřebu diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může jiným dostupným diagnostickým prostředkům na stanovení rezistence nebo citlivosti bakteriálních G- patogenů drůbeže konkurovat kvalitou provedení, originalitou, umožněním vyšetření rychlou a spolehlivou metodou a příznivou cenou. Sety jsou vyráběny s využitím růstového média Cation Adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB).

Na mikrotitrační destičce s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H) jsou ve sloupcích v růstovém médiu naředěno třináct navržených antimikrobiálních látek v objemu 100 µl, u jedenácti antimikrobiálních látek (sloupce 1-11) je na destičce 8 ředění (řádky A-H), ve sloupci 12 je 7 ředění antimikrobiální látky (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 a počet ředění 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 Clinical Laboratory

Standards Institute (CLSI) a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) a rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů povinně testovaných v rámci kontroly kvality.

Podmínky výroby:

Veškeré práce na přípravě a výrobě MIC setů (příprava roztoků antibiotik a jejich aplikace na destičky) probíhají v prostorách se zajištěnou filtrací vzduchu (třída čistoty A).

Zásobní koncentrace antimikrobiálních látek:

Zásobní vysoké koncentrace všech antimikrobiálních látek (1000 – 10000 mg/L) se připravují ze substancí antimikrobiálních látek, které obsahují známé množství antimikrobiální látky. Substance se rozpouští ve vhodném rozpustidle podle chemické povahy antimikrobiální látky (objem rozpustidla jiného než voda je co nejmenší a dále se ředí vodou na potřebnou výchozí koncentraci, která bude aplikována na destičku). Roztoky se zásobními koncentracemi antimikrobiálních látek jsou uloženy v -80 °C. Postup přípravy koncentrací antimikrobiálních látek a jejich uchování vychází z metodik CLSI a EUCAST.

Příprava setů na stanovení MIC:

Ze zásobních koncentrací antimikrobiálních látek 10 000 mg/L se připravují pracovní koncentrace antimikrobik 10 000 mg/L (K 10 000), 1 000 mg/L (K 1 000), 10 mg/L (K 10) nebo 1 mg/L (K 1) ředěním ve sterilní destilované vodě, ze které se připraví finální koncentrace antimikrobik - viz popis výrobku a tabulka s koncentracemi antimikrobik - v objemu 25 ml do 96 velkých zkumavek (tabulky 1a a 1b). Kombinace antimikrobik se připraví tak, že se 25 ml jedné antimikrobiální látky smíchá s 25 ml druhé antimikrobiální látky v jedné zkumavce, výsledný objem ve zkumavce s kombinací dvou antimikrobiálních látek (AMC a SXT) bude 50 ml. Finální koncentrace antimikrobik se připravují ředěním v médiu a jsou aplikovány do příslušných jamek na destičce v objemu 0,1 ml. Plnění jednotlivých jamek destiček z velkých zkumavek je prováděno laboratorním rozplňovacím

přístrojem DYNATECH Laboratories 1036 Quick spenze IIE dle návodu výrobce. Rozplněné desky opatřené víčkem jsou baleny po 5 kusech do smrštitelné fólie a uloženy v -80 °C.

Tab. 1a: Objem antimikrobik (ml) v jednotlivých jamkách destičky v celkovém objemu 25 ml

AMP	AMX ^a	CTX	TET	DOX	SPEC	SXT	ENR	FFC	TIA	TYL	TIL
K 1000 0,8	K 1000 0,8	K 1000 1,6	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 10000 1,3	K 1000 1,6	K 1000 0,4	K 1000 1,6	K 1000 3,2	K 1000 3,2	25 ml média
K 1000 0,4	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 6,4	K 1000 0,8	K 1000 0,2	K 1000 0,8	K 1000 1,6	K 1000 1,6	K 1000 1,6
K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 1000 3,2	K 1000 0,4	K 1000 0,1	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 1000 0,8	K 1000 0,8
K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 10 5	K 1000 1,6	K 1000 0,2	K 10 5	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 1000 0,4	K 1000 0,4
K 10 5	K 10 5	K 1000 0,1	K 10 5	K 10 2,5	K 1000 0,8	K 1000 0,1	K 10 2,5	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,2
K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 5	K 10 2,5	K 10 1,25	K 1000 0,4	K 10 5	K 10 1,25	K 10 5	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 1000 0,1
K 10 1,25	K 10 1,25	K 10 2,5	K 10 1,25	K 10 0,625	K 1000 0,2	K 10 2,5	K 10 0,625	K 10 2,5	K 10 5	K 10 5	K 10 5
K 10 0,625	K 10 0,625	K 10 1,25	K 10 0,625	K 10 0,31	K 1000 0,1	K 10 1,25	K 10 0,31	K 10 1,25	K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 2,5

^aAMX = amoxicilin; ^bTRI = trimethoprim.

Tab. 1b: Objem antimikrobik (ml) v jednotlivých jamkách destičky v celkovém objemu 25 ml

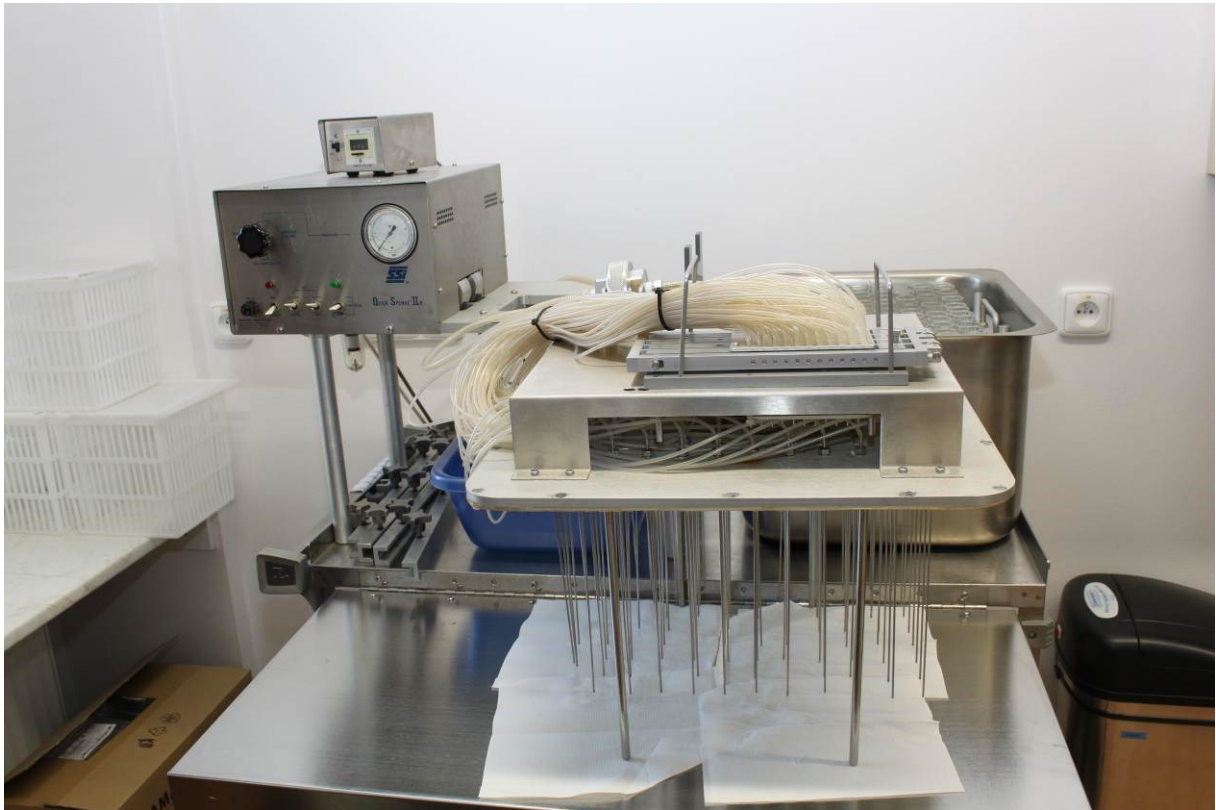
	CLA ^c					SUL ^{d*}					
	K 1000 0,4					K 2432* 12,8					
	K 1000 0,2					K 2432 6,4					
	K 1000 0,1					K 2432 3,2					
	K 10 5					K 2432 1,6					
	K 10 2,5					K 2432 0,8					
	K 10 1,25					K 2432 6,25					
	K 10 0,625					K 2432 0,4					
	K 10 0,31					K 2432 0,2					

^cCLA = klavulanová kyselina; ^dTRI = trimetoprim; ^dSUL = sulfamethoxazol.

*Příprava pracovní koncentrace 2432 mg/L (K 2432): 121,6 mg sulfamethoxazolu rozpuštěných v 10 ml destilované vody se naředí médiem do 40 ml



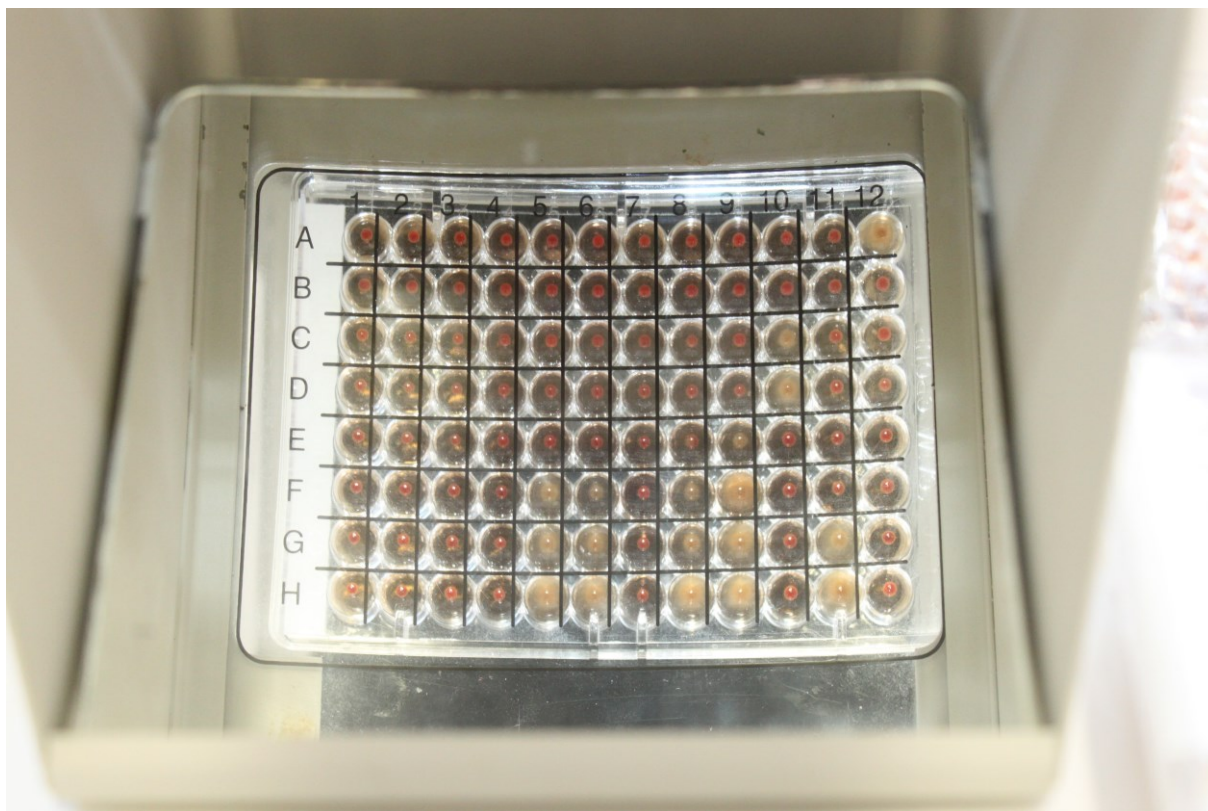






Princip metody:

Mikrodiluční metoda umožňuje stanovit minimální inhibiční koncentrace antimikrobiálních látek v malých objemech na mikrotitrační 96-jamkové destičce s kónickým dnem. Volba antimikrobiálních látek zastoupených v setu je originální. V destičkách jsou různá ředění antimikrobiálních látek v živném médiu v objemu 0,1 ml. Po inokulaci všech jamek v destičce testovaným kmenem a následné kultivaci je vizuálně hodnocen růst bakteriální kultury v každé jamce. Metoda je zcela v souladu s platnými laboratorními normami vydávanými CLSI a EUCAST.



Složení setu:

Mueller-Hinton II Broth Cation Adjusted (CAMHB)	22 g
Destilovaná voda	ad 1 000 ml
ampicilin	0,25 - 32 mg/L
amoxicilin/kyselina klavulanová v poměru 2/1	0,25 - 32 / 0,125 – 16 mg/L
cefotaxim	0,125 – 16 mg/L
tetracyklin	0,25 - 32 mg/L
doxycyklin	0,125 – 16 mg/L
spektinomycin	4 – 512 mg/L
trimethoprim/sulfamethoxazol v poměru 1/19	0,5 – 64 mg/L / 9,5 – 1216 mg/ml
enrofloxacin	0,125 – 16 mg/L
florfenikol	0,5 – 64 mg/L
tiamulin	1 – 128 mg/L
tylosin	1 – 128 mg/L
tilmikosin	1 – 64 mg/L

Konečné pH $7,2 \pm 0,1$

Pracovní postup použití pro vyšetření citlivosti/rezistence:

Inokulum v objemu 5 μ l se naočkuje do všech jamek mikrotitrační destičky tak, aby výsledná koncentrace inokula byla 5×10^5 CFU v jamce. Destičky se opatří víčkem nebo lepící fólií a inkubují se aerobně při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 18 h $\pm$ 2 h. Výsledky se odečítají po dosažení dostatečného nárůstu mikroorganismu (usazenina nebo zřetelný zákal) a po ověření bakteriální čistoty a příslušné koncentrace inokula. Zjištěná hodnota MIC představuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která plně inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu. Interpretace výsledků do kategorií citlivosti vyžaduje použití tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek. Vyšetřovaný kmen bakterie lze kategorizovat za předpokladu, že příslušné breakpointy jsou použity v definovaném fenotypovém systému.

Kontrola kvality setu:

Kvalita výsledků se kontroluje paralelně s testovaným mikroorganismem stanovením MIC antimikrobiálních látek u referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922.

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.

Ověření funkčnosti

Funkčnost výrobku je ověřena pravidelným týdenním sledováním a kontrolou kvality u všech vyrobených šarží. Kontrola kvality se provádí testováním kontrolního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922, který je přesně definován a jeho hodnoty MIC k antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI a EUCAST. Hodnoty MIC u jednotlivých antimikrobik musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC dle CLSI a EUCAST.

Stanovené rozmezí hodnot MIC kontrolního kmene *E. coli* (mg/l) je vyznačeno v následující tabulce šedou barvou (Tab. 2). 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. 2: Rozmezí MIC u kmene *Escherichia coli* ATCC 25922

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	AMC	CTX	TET	DOX	SPEC	SXT	ENR	FFC	TIA	TYL	TIL
A	32	32	16	32	16	512	64	16	64	128	128	PKR
B	16	16	8	16	8	256	32	8	32	64	64	64
C	8	8	4	8	4	128	16	4	16	32	32	32
D	4	4	2	4	2	64	8	2	8	16	16	16
E	2	2	1	2	1	32	4	1	4	8	8	8
F	1	1	0,5	1	0,5	16	2	0,5	2	4	4	4
G	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	8	1	0,25	1	2	2	2
H	0,25	0,25	0,125	0,25	0,125	4	0,5	0,125	0,5	1	1	1

Interpretační kritéria - breakpointy

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 bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* nebo *Pasteurellaceae*. Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé (s MIC v hodnotách označených zeleně), intermediální (s MIC v hodnotách označených modře) a rezistentní (Tab. 3). U antimikrobik, kde nejsou koncentrace barevně rozděleny, nejsou breakpointy pro streptokoky stanoveny a účinnost antimikrobiální látky lze posoudit pouze individuálně podle hodnoty MIC.

Srovnání „novosti postupů“

Set ke stanovení MIC gramnegativních patogenů drůbeže obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k antimikrobiálním látkám, které jsou běžně užívány k léčbě onemocnění drůbeže způsobených zejména bakteriemi rodů *Enterobacteriaceae* a *Pasteurellaceae*, jejichž sledování vychází z potřeb řešení projektu MZE NAZV QK1910057 nebo sledování jejich rezistence k vybraným antimikrobikům má epidemiologický význam. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí gramnegativních bakteriálních patogenů drůbeže 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.

Tab. 3: Breakpointy antimikrobiálních látek pro G- patogeny drůbeže

Antimikrobiální látka		G- patogeny drůbeže			Zdroj
		MIC breakpoint (mg/l)			
		≤C	I	≥R	
ampicilin - <i>Enterobacteriaceae</i>	AMP	8	16	32	VET08
ampicilin - <i>Pasteurellaceae</i>	AMP	1		2	EUCAST
amoxicilin/kyselina klavulanová - <i>Enterobacteriaceae</i>	AMC	8/4	16/8	32/16	VET08
amoxicilin/kyselina klavulanová - <i>Pasteurellaceae</i>	AMC	1/0,5		2/1	EUCAST
cefotaxim - <i>Enterobacteriaceae</i>	CTX	1	2	4	EUCAST
tetracyklin - <i>Enterobacteriaceae</i>	TET	4	8	16	VET08
tetracyklin - <i>Pasteurellaceae</i>	TET	0,5	1	2	VET08
doxycyklin - <i>Enterobacteriaceae</i>	DOX	4	8	16	VET08
doxycyklin - <i>Pasteurellaceae</i>	DOX	1		2	EUCAST
spektinomycin - <i>Pasteurellaceae</i>	SPEC	32	64	128	VET08
trimethoprim/sulfamethoxazol - <i>Enterobacteriaceae</i>	SXT	2/38		4/76	VET08
enrofloxacin - <i>Enterobacteriaceae</i>	ENR	0,25	0,5-1	2	VET08
enrofloxacin - <i>Pasteurellaceae</i>	ENR	0,25	0,5-1	2	VET08
florfenikol - <i>Enterobacteriaceae</i>	FFC	4	8	16	VET08
florfenikol - <i>Pasteurellaceae</i>	FFC	2	4	8	VET08
tiamulin - <i>Pasteurellaceae</i>	TIA	4	8-16	32	Jones,R.N., (2002)
tylosin <i>Pasteurellaceae</i>	TYL	-	-	-	-
tilmikosin - <i>Pasteurellaceae</i>	TIL	16		32	VET08

Reference

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.

EUCAST - Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Version 5.13. [Database online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [cit. 2019-10-28]. Available in <<http://www.eucast.org/>>

Jones,R.,N., et al. 2002; J Clin Microbiol. Feb 2002; 40(2): 461–465.

Protokol o testování (ověření) technologie

Název technologie:

Výroba setu ke stanovení citlivosti / rezistence gramnegativních bakteriálních patogenů drůbeže k antimikrobikům

Tvůrci technologie:

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

Forma ověření:

Kvalita a funkčnost výrobku byla ověřena pravidelným týdenním sledováním a kontrolou kvality u zkušebně vyrobených šarží až do doby expirace (6 měsíců) testováním kontrolního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922, které jsou přesně definovány a jejich hodnoty MIC k antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI a EUCAST. Hodnoty MIC u jednotlivých antimikrobiků musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC dle CLSI a EUCAST. Stanovené hodnoty MIC u jednotlivých antimikrobiálních látek odpovídalo definovaným hodnotám MIC dle CLSI a EUCAST.

Doba testování:

březen 2019 – září 2019

Stručný popis novosti technologie:

Sety ke stanovení citlivosti /rezistence bakteriálních gramnegativních patogenů drůbeže originálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek umožňuje testování rezistencí těchto bakterií k antimikrobikům, která jsou užívána k léčbě způsobených těmito patogeny. V setech jsou také zastoupena antimikrobika, jejichž testování má význam pro predikci jejich účinnosti a z epidemiologických důvodů ke zjišťování fenotypové rezistence a jejího šíření v bakteriálních populacích.

V Brně 17. 10. 2019

**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.**
odd. imunologie
602 00 BRNO, Hudecova 70

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
mikrobiologická laboratoř
oddělení imunologie VÚVeL

 **VÝROBA KREVŇÍCH DERIVÁTŮ
KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ
A DIAGNOSTICKÝCH ROZTOKŮ**
IČ: 279 12 360 DIČ: CZ27512330
tel.: 491 810 091 www.LABMEDIASERVIS.cz
NÁRODNÍ 84, J. ROP. PR 651 01
patová schránka: 77nhsif

MVDr. Tomáš Krejčí
LabMediaServis, s.r.o.



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