

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

**Výroba setu ke stanovení minimálních
inhibičních koncentrací antimikrobiálních
látek u *Streptococcus uberis***

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

**4758
2019**

Ověřená technologie 4758/2019

Výroba setu ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u *Streptococcus uberis*

Autoři:

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova
296/70, Brno

MVDr. Kateřina Nedbalcová, 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 Ministerstva zemědělství ČR
NAZV Program ZEMĚ číslo grantu QK 1910212 a MZE-RO0518.**

ISBN 978-80-88233-74-9

Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u *Streptococcus uberis*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMP	AMC*	CEFL	CEF CEFQ	STR PIR	CLI	ERY	GEN	TET	RIF	SXT**
8	8	4	256	8	512	8	8	512	32	4	PK
4	4	2	128	4	256	4	4	256	16	2	8
2	2	1	64	2	128	2	2	128	8	1	4
1	1	0,5	32	1	64	1	1	64	4	0,5	2
0,5	0,5	0,25	16	4	4	0,5	0,5	8	2	0,25	1
0,25	0,25	0,125	8	2	2	0,25	0,25	4	1	0,125	0,5
0,125	0,125	0,06	4	1	1	0,125	0,125	2	0,5	0,06	0,25
0,06	0,06	0,03	2	0,5	0,5	0,06	0,06	1	0,25	0,03	0,125

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce jsou uvedeny mg/l.

*koncentrace v tabulce platí pro amoxicilin

**koncentrace v tabulce platí pro trimethoprim

Seznam antimikrobiálních látek:

PEN penicilin
 AMP ampicilin
 AMC amoxicilin/klavulanová kyselina 2/1
 CEFL cefalexin
 CEF ceftiofur
 CEFQ cefchinom
 STR streptomycin
 PIR pirlimycin
 CLI klindamycin
 ERY erythromycin
 GEN gentamicin
 TET tetracyklin
 RIF rifampin
 SXT trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19
 PKR pozitivní kontrola růstu

Technická dokumentace

Účel použití:

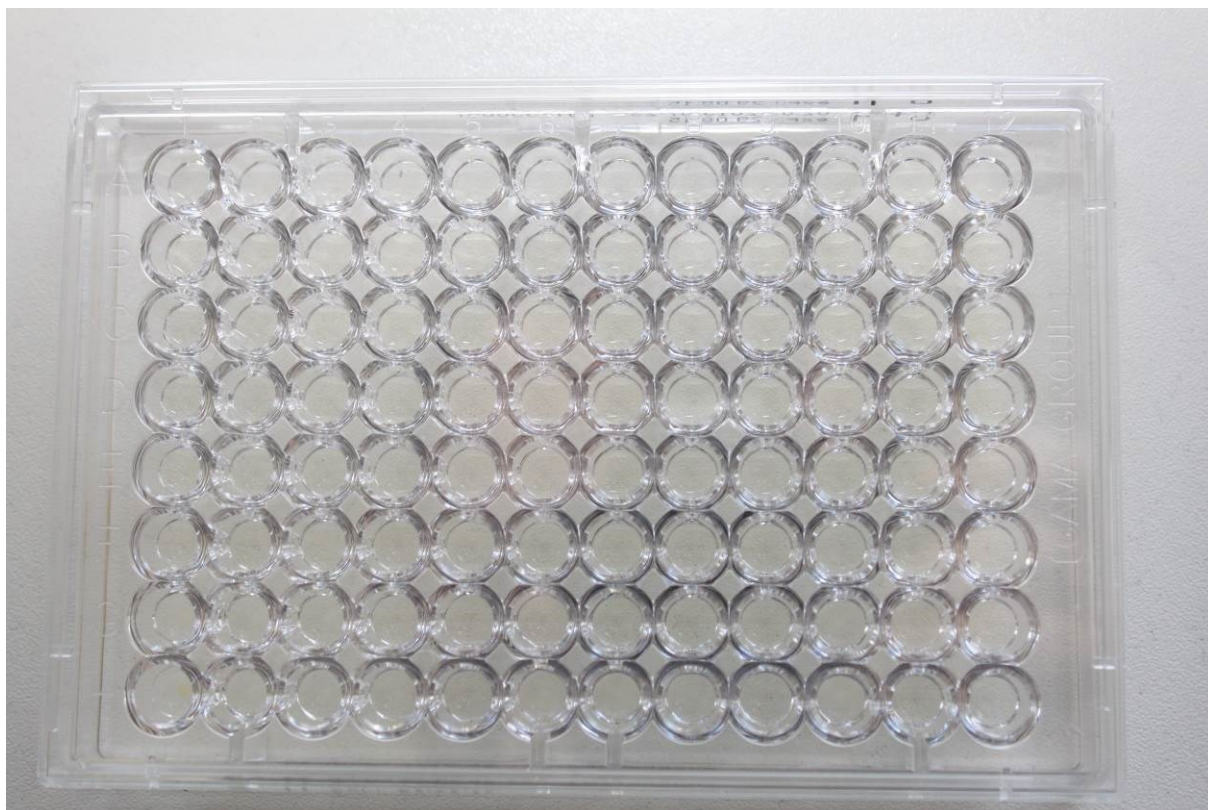
Laboratorní *in vitro* stanovení citlivosti/rezistence klinických izolátů *S. uberis* pocházejících ze vzorků mléka krav stížených mastitidou mikrodiluční metodou k antimikrobiálním látkám, které je nezbytné pro efektivní léčbu a významnou měrou přispívá k omezení nežádoucího šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám v bakteriálních populacích.

Popis výrobku:

Sety ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) izolátů *S. uberis* s originálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek umožňují testování jeho rezistencí k antimikrobikům, která jsou užívána k léčbě intramamárních infekcí krav, způsobených tímto patogenem. 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 *S. uberis* reaguje na aktuální potřebu diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může jiným dostupným diagnostickým prostředkům na stanovení rezistence nebo citlivosti *S. uberis* konkurovat kvalitou provedení, originalitou, umožněním vyšetření rychlou a spolehlivou metodou a příznivou cenou. Sety jsou vyráběny s využitím růstového média Mueller Hinton Broth s lyzovanou koňskou krví (5 %).

Diagnostický set je mikrotitrační destička s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H). Ve sloupcích je v růstovém médiu naředěno čtrnáct navržených antimikrobiálních látek v objemu 100 µl. Sloupce 1-4 a 7-11 obsahují 8 ředění antimikrobní látky (řádky A-H), ve sloupcích 5 a 6 jsou v každém sloupci naředěna vždy 2 antimikrobika ve čtyřech ředěních (řádky A-D a E-H), ve sloupci 12 je obsažena antimikrobní látka v 7 ředěních (řádky B-H) a v řádku A tohoto sloupce je jamka se 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:

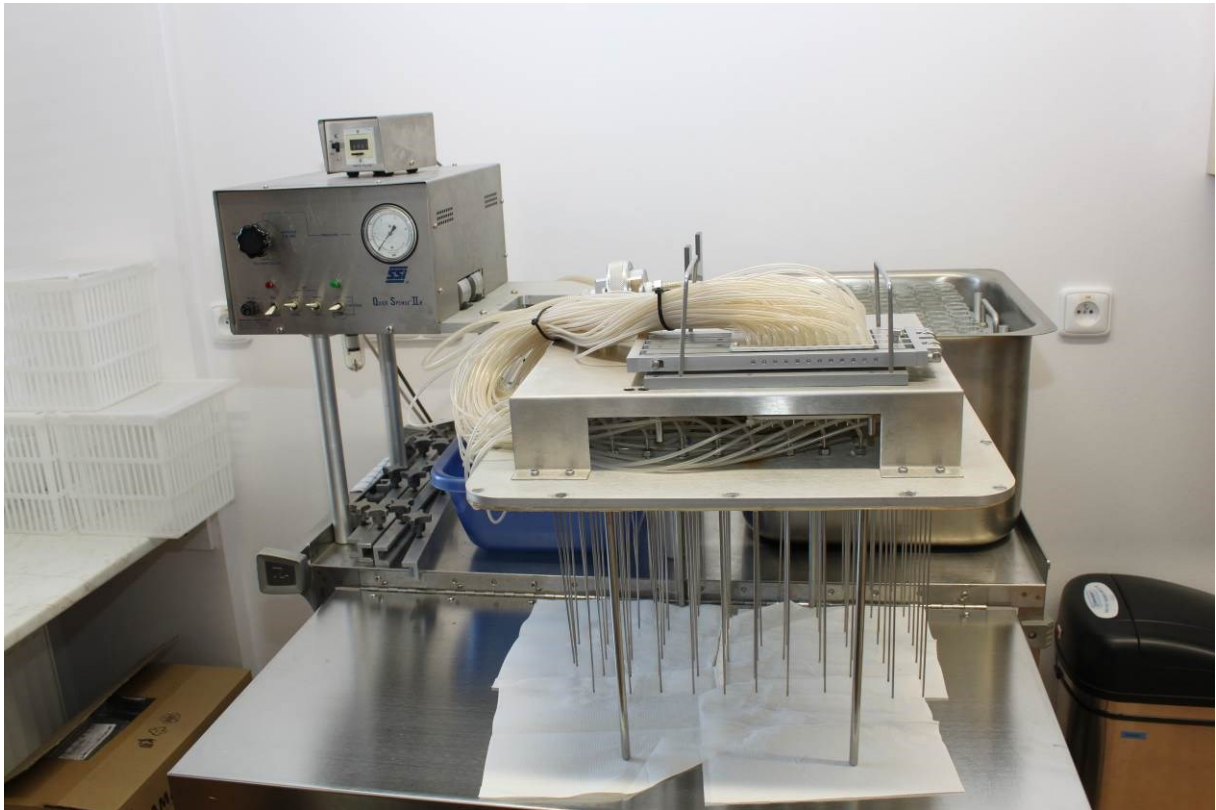
Ze zásobních koncentrací antimikrobiálních látek 10 000 mg/L se připravují pracovní koncentrace antimikrobik 1 000 mg/L (K 1 000), 10 mg/L (K 10) nebo 1 mg/L (K 1) ředěním ve sterilní destilované vodě, ze které se připraví finální koncentrace antimikrobik - viz popis výrobku a tabulka s koncentracemi antimikrobik - v objemu 25 ml do 96 velkých zkumavek (tabulka 1). 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. 1: Objem antimikrobik (ml) v jednotlivých jamkách destičky v celkovém objemu 25 ml

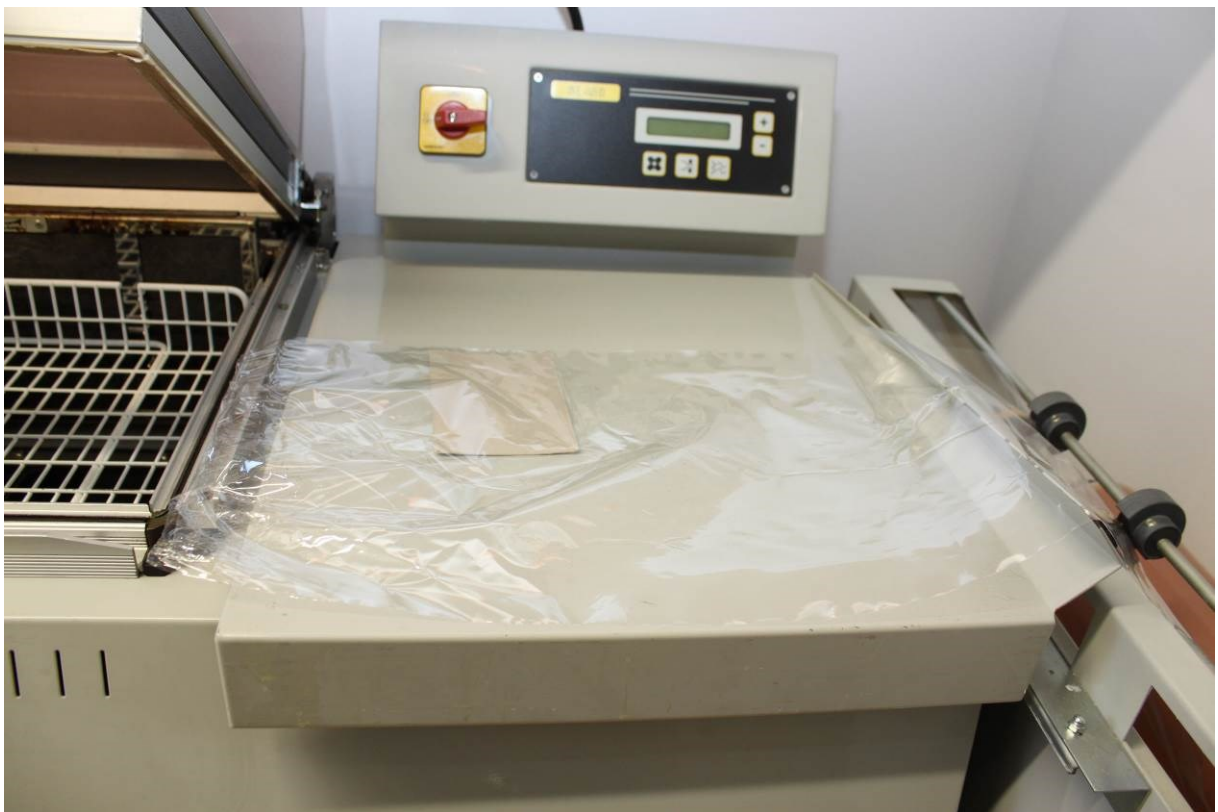
PNC	AMP	AMC		CEFL	CEF	STR	CLI	ERY	GEN	TET	RIF	SXT	
		AMX	CLA*		CEFQ	PIR						TRI*	SUL*
K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 10 5	K 1000 6,4	K 1000 0,2	K 1000 12,8	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 12,8	K 1000 3,2	K 1000 0,1	PK	
K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 10 5	K 10 2,5	K 1000 3,2	K 1000 0,1	K 1000 6,4	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 1000 6,4	K 1000 1,6	K 10 5	K 1000 0,2	K 2432** 1,6
K 10 5	K 10 5	K 10 2,5	K 10 1,25	K 1000 1,6	K 10 5	K 1000 3,2	K 10 5	K 10 5	K 1000 3,2	K 1000 0,8	K 10 2,5	K 1000 0,1	K 2432 0,8
K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 1,25	K 10 0,625	K 1000 0,8	K 10 2,5	K 1000 1,6	K 10 2,5	K 10 2,5	K 1000 1,6	K 1000 0,4	K 10 1,25	K 10 5	K 2432 0,4
K 10 1,25	K 10 1,25	K 10 0,625	K 10 0,31	K 1000 0,4	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 10 1,25	K 10 1,25	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 10 0,625	K 10 2,5	K 2432 0,2
K 10 0,625	K 10 0,625	K10 0,31	K 10 0,16	K 1000 0,2	K 10 5	K 10 5	K 10 0,625	K 10 0,625	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K10 0,31	K 10 1,25	K 2432 0,1
K 10 0,31	K 10 0,31	K 1 0,16	K 1 0,8	K 1000 0,1	K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 0,31	K 10 0,31	K 10 5	K 10 5	K 10 0,16	K 10 0,625	K 24,32 5
K10 0,16	K10 0,16	K 1 0,8	K 1 0,4	K 10 5	K 10 1,25	K 10 1,25	K10 0,16	K10 0,16	K 10 2,5	K 10 2,5	K 1 0,8	K 10 0,31	K 24,32 2,5

*CLA = klavulanová kyselina; TRI = trimethoprim; SUL = sulfamethoxazol.

**Příprava pracovní koncentrace 2432 mg/L (K 2432): 121,6 mg sulfamethoxazolu
rozpuštěných v 10 ml destilované vody se naředí médiem do 50 ml

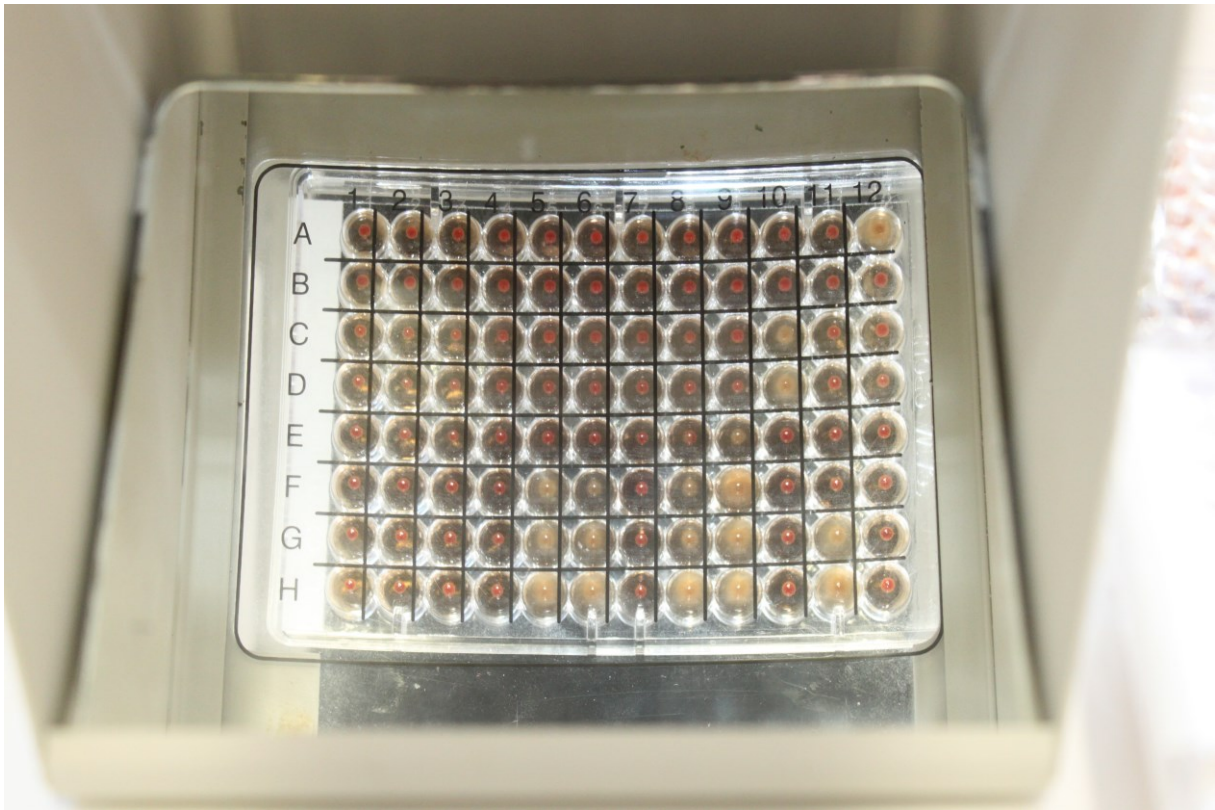






Princip metody:

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
Lyzovaná koňská krev	50 ml
Destilovaná voda	ad 1 000 ml
penicilin	0,06 – 8 mg/L
ampicilin	0,06 – 8 mg/L
amoxicilin/kyselina klavulanová 2/1	0,03 – 4 / 0,015 - 2 mg/L
cefalexin	2 – 256 mg/L
ceftiofur	1 – 8 mg/L
cefchinom	0,5 – 4 mg/L
streptomycin	64 - 512 mg/L
pirlimycin	0,5 - 4 mg/L
klindamycin	0,06 – 8 mg/L
erythromycin	0,06 – 8 mg/L
gentamicin	1 – 512 mg/L
tetracyklin	0,25 – 32 mg/L
rifampin	0,03 - 4 mg/L
trimethoprim/sulfamethoxazol v poměru 1/19	0,125 – 8 / 2,38 – 152 mg/L

Konečné pH $7,2 \pm 0,1$

Pracovní postup použití pro vyšetření citlivosti/rezistence:

Inokulum v objemu 5 µl 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 nejnížší 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 (jen pro *S. uberis*).

Kontrola kvality setu:

Kvalita výsledků se kontroluje paralelně s testovaným mikroorganismem stanovením MIC antimikrobiálních látek u referenčního kmene *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

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 *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, který je přesně definován a jeho hodnoty MIC k antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI 2018 (VET 08 a M100) a EUCAST, výsledné hodnoty MIC u kontrolního kmene musí být v tomto stanoveném rozmezí hodnot.

Stanovené rozmezí hodnot MIC kontrolního kmene *S. pneumoniae* (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 kontrolního kmene *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

PNC	AMP	AMC*	CEFL	CEF	STR	CLI	ERY	GEN	TET	RIF	SXT**
				CEFQ	PIR						
8	8	4	256	8	512	8	8	512	32	4	PK
4	4	2	128	4	256	4	4	256	16	2	8
2	2	1	64	2	128	2	2	128	8	1	4
1	1	0,5	32	1	64	1	1	64	4	0,5	2
				0,12-0,5							
0,5	0,5	0,25	16	4	4	0,5	0,5	8	2	0,25	1
0,25	0,25	0,125	8	2	2	0,25	0,25	4	1	0,125	0,5
0,125	0,125	0,06	4	1	1	0,125	0,125	2	0,5	0,06	0,25
0,06	0,06	0,03	2	0,5	0,5	0,06	0,06	1	0,25	0,03	0,125
				0,015-0,06		0,03	0,03		0,06	0,016	

Interpretační kritéria - breakpointy

Interpretace výsledků do kategorií citlivosti vyžaduje použití tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek (EUCAST, CLSI). Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé (s MIC v hodnotách označených zeleně), intermediální (s MIC v hodnotách označených modře) a rezistentní (s MIC v hodnotách označených červeně) (Tab. 3). Většina hodnot breakpointů z dokumentů CLSI a EUCAST je udávána pro skupinu viridujících streptokoků, u některých antimikrobik jsou udávány hodnoty breakpointů přímo pro *S. uberis* izolovaného z mastitid krav. U některých antimikrobik nejsou klinické breakpointy pro *S. uberis* nebo viridující streptokoky udávány, v tomto případě byla kritéria citlivosti odvozena z breakpointů udávaných pro *Streptococcus pneumoniae*.

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

PNC	AMP	AMC	CEFL	CEF	STR	CLI	ERY	GEN	TET	RIF	SXT
				CEFQ	PIR						
8	8	4	256	8	512	8	8	512	32	4	PK
4	4	2	128	4	256	4	4	256	16	2	8
2	2	1	64	2	128	2	2	128	8	1	4
1	1	0,5	32	1	64	1	1	64	4	0,5	2
0,5	0,5	0,25	16	4	4	0,5	0,5	8	2	0,25	1
0,25	0,25	0,125	8	2	2	0,25	0,25	4	1	0,125	0,5
0,125	0,125	0,06	4	1	1	0,125	0,125	2	0,5	0,06	0,25
0,06	0,06	0,03	2	0,5	0,5	0,06	0,06	1	0,25	0,03	0,125

Zdroj: EUCAST 2019; CA-SFM 2018; CLSI 2012; CLSI 2018 – VET08, M100

citlivý; intermediální; rezistentní

Srovnání „novosti postupů“

Sety ke stanovení MIC *S. uberis* obsahují speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňují testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k antimikrobiálním látkám, které jsou běžně užívány k léčbě intramamárních infekcí krav způsobených tímto patogenem. Vývoj a výroba nových setů ke stanovení rezistencí speciálně pro *S. uberis* 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.

Reference:

EUCAST - Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Version 5.13. [Database online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [cit. 2019-09-04].

Available in <http://www.eucast.org/>

CA-SFM, 2018. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie – Recommandations Vétérinaires 2018. Paris, France, Société Française de Microbiologie, 15 pp.

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.

CLSI, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100, 28th Edition. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne 2018: 258 pp.

Protokol o testování (ověření) technologie

Název technologie:

Výroba setu ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u *Streptococcus uberis*

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 *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, které jsou přesně definovány a jejich 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 hodnoty MIC u jednotlivých antimikrobiálních látek odpovídalo definovaným hodnotám MIC dle CLSI a EUCAST.

Doba testování:

červenec 2019 – září 2019

Stručný popis novosti technologie:

Sety ke stanovení minimálních MIC bakterií *Streptococcus uberis* originálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek umožňuje testování rezistencí těchto bakterií k antimikrobikům, která jsou užívána k léčbě intramamárních infekcí u krav. 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
621 00 BRNO, Hugova 70

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
mikrobiologická laboratoř
oddělení imunologie VÚVeL

 VÝROBA KREVŇÍCH DERIVÁTŮ
KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ
A DIAGNOSTICKÝCH ROZTOKŮ
IČ: 275 12 388 DIČ: CZ27512380
tel.: 497 810 091 www.LABMEDIASERVIS.cz
NÁRODNÍ 84, JAROMĚŘ 551 01
datová schránka: 77nht

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