

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

**Výroba setu ke stanovení minimálních
inhibičních koncentrací antimikrobiálních
látek u *Enterococcus* spp.**

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

**4782
2017**

Ověřená technologie 4782/2017

Výroba setu ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u *Enterococcus* 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

Ověřená technologie byla vyvinuta v rámci projektu Technologické agentury České republiky TG03010038

ISBN 978-80-88233-22-0

Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u *Enterococcus* spp.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMP	TIG	GEN	CMP	TET	ERY	CIP	VAN	TEI	LNZ	FUR
4	16	4	128	32	16	4	16	32	32	32	PK
2	8	2	64	16	8	2	8	16	16	16	128
1	4	1	32	8	4	1	4	8	8	8	64
0,5	2	0,5	16	4	2	0,5	2	4	4	4	32
0,25	1	0,25	8	2	1	0,25	1	2	2	2	16
0,125	0,5	0,125	4	1	0,5	0,125	0,5	1	1	1	8
0,063	0,25	0,063	2	0,5	0,25	0,063	0,25	0,5	0,5	0,5	4
0,031	0,125	0,031	1	0,25	0,125	0,031	0,125	0,25	0,25	0,25	2

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l.

1. PNC penicillin
2. AMP ampicillin
3. TIG tigecycline
4. GEN gentamicin
5. CMP chloramphenicol
6. TET tetracycline
7. ERY erytromycin
8. CIP ciprofloxacin
9. VAN vancomycin
10. TEI teicoplanin
11. LNZ linezolid
12. FUR nitrofurantoin

PK pozitivní kontrola růstu

Technická dokumentace

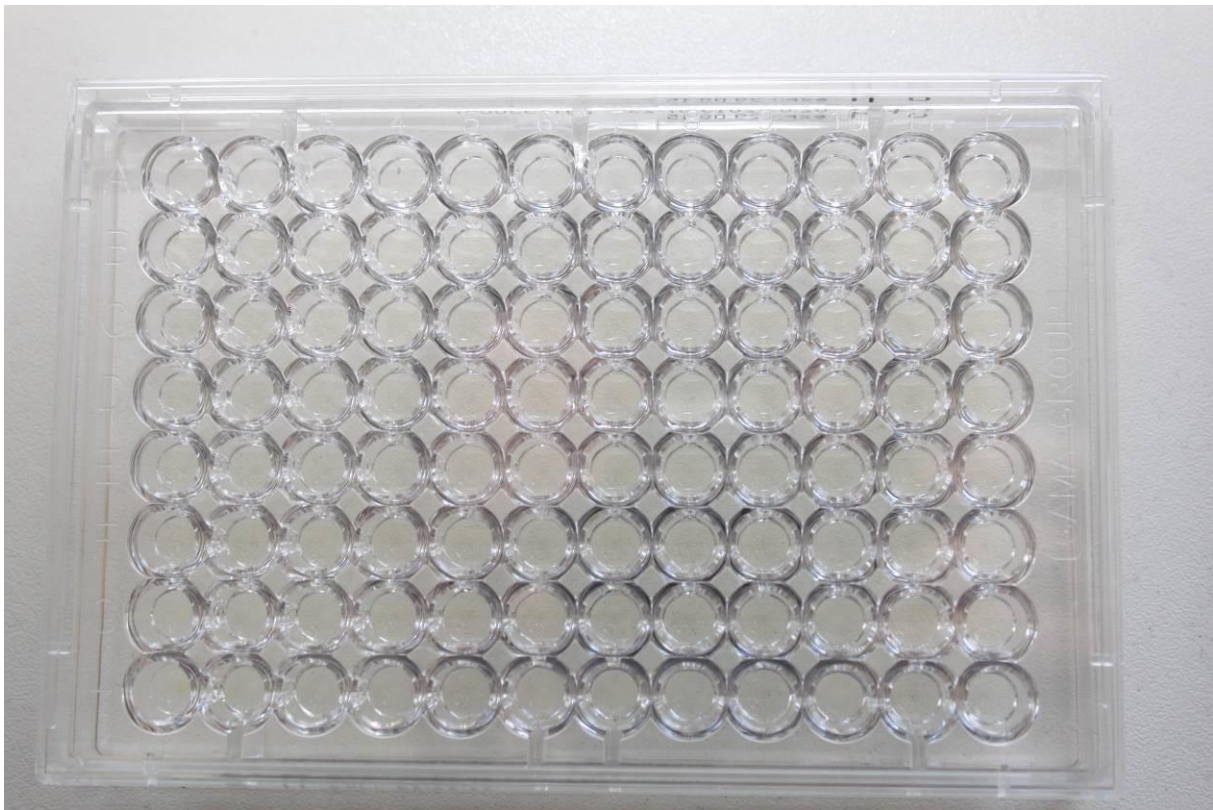
Účel použití:

Laboratorní *in vitro* stanovení citlivosti/rezistence klinických izolátů *Enterococcus* spp. 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:

Set ke stanovení minimálních MIC bakterií rodu *Enterococcus* spp. s originálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek umožňuje testování rezistencí těchto bakterií k antimikrobikům, která jsou užívána k léčbě infekcí lidí způsobených enterokoky. V setu 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 nového setu ke stanovení rezistencí bakterií *Enterococcus* spp. reaguje na aktuální potřebu diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může jiným dostupným diagnostickým prostředkům na stanovení rezistence nebo citlivosti cílové skupiny bakteriálních patogenů konkurovat kvalitou provedení, originalitou, umožněním vyšetření rychlou a spolehlivou metodou a příznivou cenou. Sety budou vyráběny v jedné modifikaci pro všechny druhy rodu *Enterococcus*.

Na mikrotitrační destičce s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H) jsou ve sloupcích dvojkové ředící řady navržených antimikrobiálních látek, v jamce A12 je růstové médium 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:

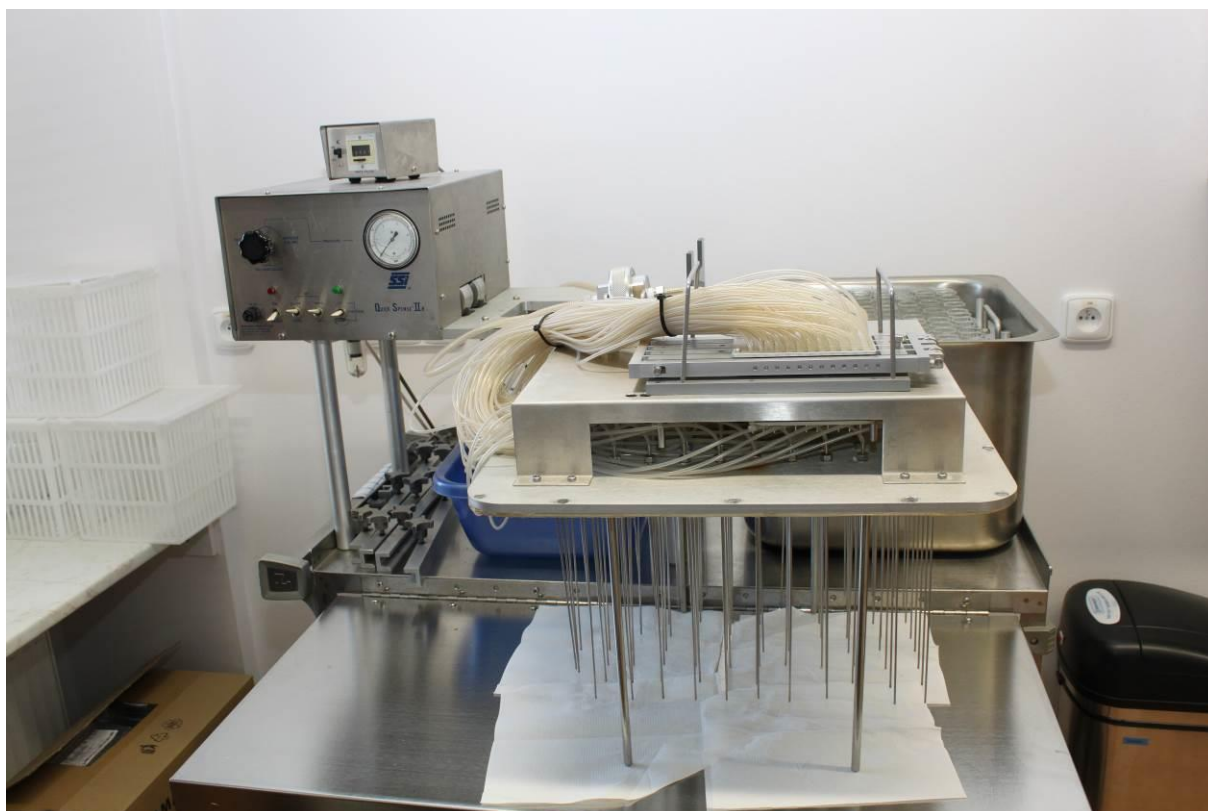
Veškeré práce na přípravě a výrobě MIC setů (příprava roztoků antibiotik a jejich aplikace na destičky) probíhají v prostorách se zajištěnou filtrací vzduchu (třída čistoty A).



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 2). 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. 2: Objem antimikrobik (ml) v jednotlivých jamkách destičky v celkovém objemu 25 ml

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMP	TIG	GEN	CMP	TET	ERY	CIP	VAN	TEI	LNZ	FUR
K 1000 0,1	K 1000 0,4	K 1000 0,1	K1000 3,2	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 0,1	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 1000 0,8	K 1000 0,8	PK
K 10 5	K 1000 0,2	K 10 5	K1000 1,6	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 10 5	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 1000 0,4	K 1000 0,4	K1000 3,2
K 10 2,5	K 1000 0,1	K 10 2,5	K1000 0,8	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 10 2,5	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K1000 1,6
K 10 1,25	K 10 5	K 10 1,25	K1000 0,4	K 1000 0,1	K 10 5	K 10 1,25	K 10 5	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K1000 0,8
K 10 0,625	K 10 2,5	K 10 0,625	K1000 0,2	K 10 5	K 10 2,5	K 10 0,625	K 10 2,5	K 10 5	K 10 5	K 10 5	K1000 0,4
K 10 0,31	K 10 1,25	K 10 0,31	K1000 0,1	K 10 2,5	K 10 1,25	K 10 0,31	K 10 1,25	K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 2,5	K1000 0,2
K10 0,16	K 10 0,625	K10 0,16	K 10 5	K 10 0,25	K 10 0,625	K10 0,16	K 10 0,625	K 10 0,25	K 10 0,25	K 10 0,25	K1000 0,1
K 10 0,08	K 10 0,31	K 10 0,08	K 10 2,5	K 10 0,625	K 10 0,31	K 10 0,08	K 10 0,31	K 10 0,625	K 10 0,625	K 10 0,625	K 10 5







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

penicillin	0,031 – 4 mg/L
ampicillin	0,125 – 16 mg/L
tigecycline	0,031 – 4 mg/L
gentamicin	1 – 128 mg/L
chloramphenicol	0,25 – 32 mg/L
tetracycline	0,125 – 16 mg/L
erythromycin	0,031 – 4 mg/L
ciprofloxacin	0,125 – 16 mg/L
vancomycin	0,25 – 32 mg/L
teicoplanin	0,25 – 32 mg/L
linezolid	0,25 – 32 mg/L
nitrofurantoin	2 – 128 mg/L

Konečné pH $7,2 \pm 0,1$

Pracovní postup:

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 $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. 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 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

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 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 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. faecalis* (mg/l) je vyznačeno v následující tabulce šedou barvou (Tab. 3). 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 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC	AMP	TIG	GEN	CMP	TET	ERY	CIP	VAN	TEI	LNZ	FUR
4	16	4	128	32	16	4	16	32	32	32	PK
2	8	2	64	16	8	2	8	16	16	16	128
1	4	1	32	8	4	1	4	8	8	8	64
0,5	2	0,5	16	4	2	0,5	2	4	4	4	32
0,25	1	0,25	8	2	1	0,25	1	2	2	2	16
0,125	0,5	0,125	4	1	0,5	0,125	0,5	1	1	1	8
0,063	0,25	0,063	2	0,5	0,25	0,063	0,25	0,5	0,5	0,5	4
0,031	0,125	0,031	1	0,25	0,125	0,031	0,125	0,25	0,25	0,25	2

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 *Enterococcus* spp. Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé (s MIC v hodnotách označených zeleně), intermediální (s MIC v hodnotách označených modře) a rezistentní (Tab. 4). U antimikrobik, kde nejsou koncentrace barevně rozděleny, nejsou breakpointy pro enterokoky stanoveny a účinnost antimikrobiální látky lze posoudit pouze individuálně podle hodnoty MIC.

Tab. 4: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Enterococcus* spp.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PNC*	AMP	TIG	GEN**	CMP	TET	ERY***	CIP	VAN	TEI	LNZ	FUR
4	16	4	128	32	16	4	16	32	32	32	PK
2	8	2	64	16	8	2	8	16	16	16	128
1	4	1	32	8	4	1	4	8	8	8	64
0,5	2	0,5	16	4	2	0,5	2	4	4	4	32
0,25	1	0,25	8	2	1	0,25	1	2	2	2	16
0,125	0,5	0,125	4	1	0,5	0,125	0,5	1	1	1	8
0,063	0,25	0,063	2	0,5	0,25	0,063	0,25	0,5	0,5	0,5	4
0,031	0,125	0,031	1	0,25	0,125	0,031	0,125	0,25	0,25	0,25	2

*Penicilin C ≤8 mg/l a R >8 mg/l

**Gentamicin C ≤128 mg/L a R >128 mg/L

***Erythromycin C ≤0,5 mg/L, I 1 – 4 mg/L a R >4 mg/L

Srovnání „novosti postupů“

Set ke stanovení MIC gramnegativních patogenů – *Enterococcus* spp. – 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 enterokoky. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí *Enterococcus* spp. 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:

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