

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

**Výroba setu 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**

**4786
2017**

Ověřená technologie 4786/2017

**Výroba setu 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

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

ISBN 978-80-88233-24-4

**Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u *Styphylococcus* spp. a
Streptococcus spp.**

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

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l.

SXT – koncentrace uvedená v tabulce se vztahuje k trimethoprimu.

PEN penicilin

OXA oxacilin

AMP ampicilin

CMP chloramphenicol

TET tetracyklin

VAN vancomycin

ERY erythromycin

CLI clindamycin

CIP ciprofloxacin

GEN gentamicin

TEI teicoplanin

SXT trimethoprim/sulfamethoxazol v poměru 1/19

PK pozitivní kontrola růstu

Technická dokumentace

Účel použití:

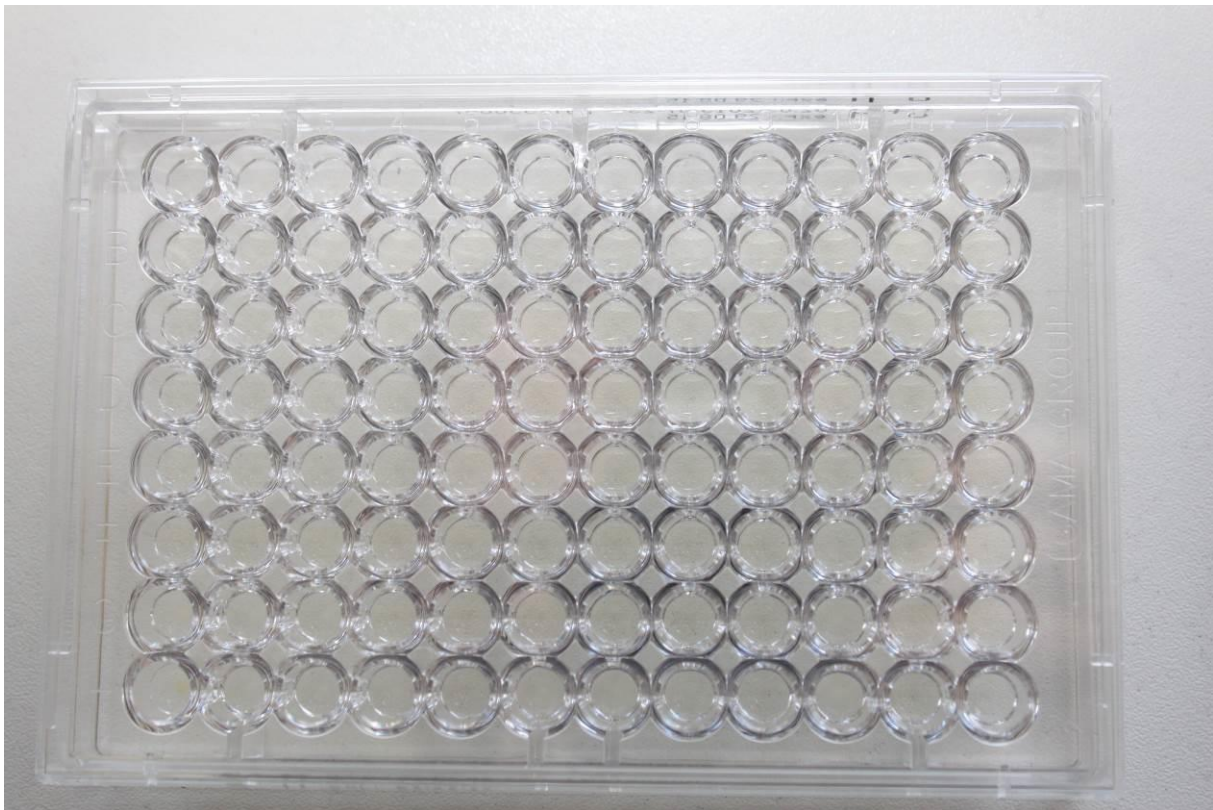
Laboratorní *in vitro* stanovení citlivosti/rezistence klinických izolátů *Staphylococcus* spp. a *Streptococcus* spp. mikrodiluční metodou k antimikrobiálním látkám, které je nezbytné pro efektivní léčbu a významnou měrou přispívá k omezení nežádoucího šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám v bakteriálních populacích.

Popis výrobku:

Sety ke stanovení minimálních MIC bakterií rodů *Staphylococcus* a *Streptococcus* s originálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek umožňuje testování rezistencí těchto bakterií k antimikrobikům, která jsou užívána k léčbě infekcí lidí způsobených grampozitivními koky. 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 bakterií *Staphylococcus* spp. a *Streptococcus* 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 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 %)

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:

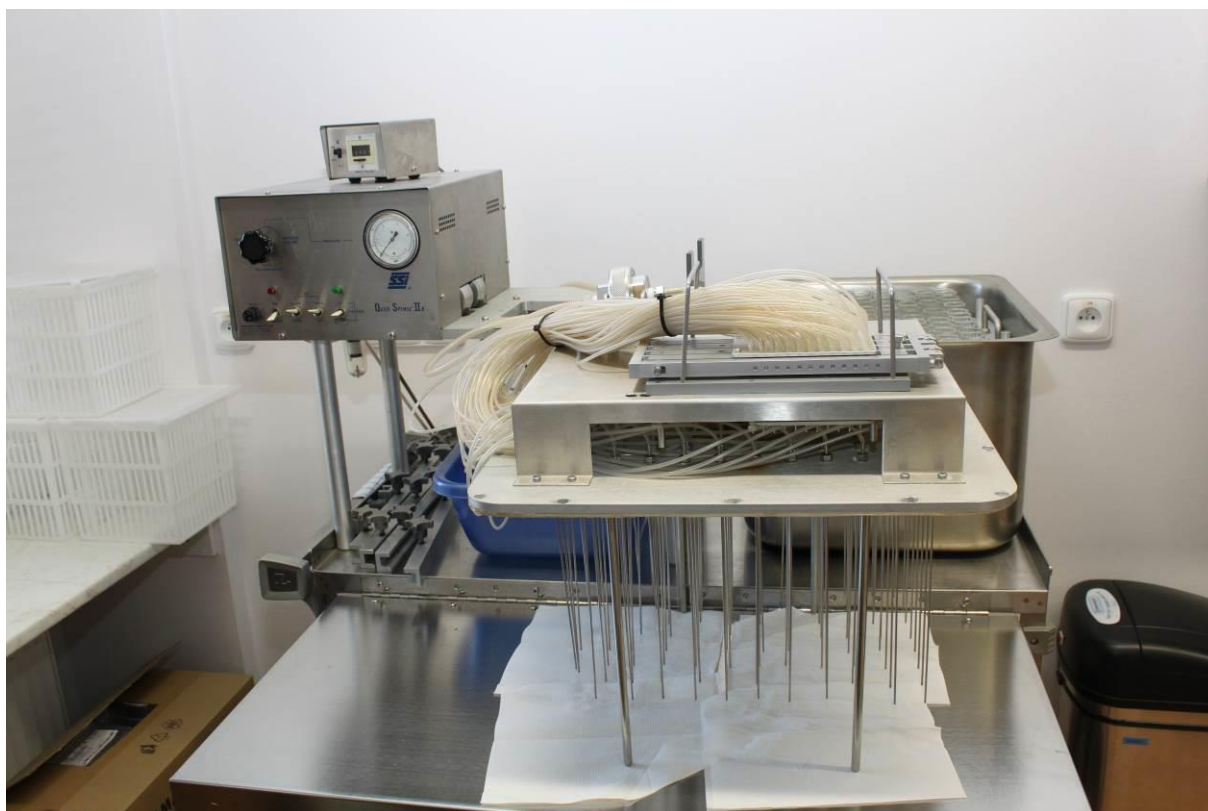
Veškeré práce na přípravě a výrobě MIC setů (příprava roztoků antibiotik a jejich aplikace na destičky) probíhají v prostorách se zajištěnou filtrací vzduchu (třída čistoty A).



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	
PEN	OXA	AMP	CMP	TET	VAN	ERY	CLI	CIP	GEN	TEI	SXT	
											TRI	SUL
K 10 5	K 1000 0,4	K 1000 1,6	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 1,6	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,8	K 1000 1,6	PK	
K 10 2,5	K 1000 0,2	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 0,8	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 1000 1,6	K 2432* 12,5
K 10 1,25	K 1000 0,1	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 1000 0,4	K 10 5	K 10 5	K 10 5	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 2432 6,25
K 10 0,625	K 10 5	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 10 5	K 1000 0,2	K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 2,5	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 2432 3,125
K 10 0,31	K 10 2,5	K 1000 0,1	K 10 5	K 10 2,5	K 1000 0,1	K 10 1,25	K 10 1,25	K 10 1,25	K 10 5	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 2432 1,6
K10 0,16	K 10 1,25	K 10 5	K 10 2,5	K 10 1,25	K 10 5	K 10 0,625	K 10 0,625	K 10 0,625	K 10 2,5	K 10 5	K 1000 0,1	K 2432 0,8
K 1 0,8	K 10 0,625	K 10 2,5	K 10 0,25	K 10 0,625	K 10 2,5	K 10 0,31	K 10 0,31	K 10 0,31	K 10 0,25	K 10 2,5	K 10 5	K 2432 0,4
K 1 0,4	K 10 0,31	K 10 0,25	K 10 0,625	K 10 0,31	K 10 0,25	K10 0,16	K10 0,16	K10 0,16	K 10 0,625	K 10 0,25	K 10 2,5	K 2432 0,2

*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:

1. Set pro stanovení MIC u *Staphylococcus* spp.

Mueller-Hinton II Broth Cation Adjusted (CAMHB)	22 g
Destilovaná voda	ad 1 000 ml
penicilin	0,015 – 2 mg/L
oxacilin	0,125 – 16 mg/L
ampicilin	0,5 – 64 mg/L
chloramphenicol	0,25 – 32 mg/L
tetracyklin	0,125 – 16 mg/L
vancomycin	0,5 – 64 mg/L
erythromycin	0,063 – 8 mg/L
clindamycin	0,063 – 8 mg/L
ciprofloxacin	0,063 – 8 mg/L
gentamicin	0,25 – 32 mg/L
teicoplanin	0,5 – 64 mg/L
trimethoprim/sulfamethoxazol v poměru 1/19	1 – 64 mg/L

Konečné pH $7,2 \pm 0,1$

2. Set pro stanovení MIC u *Streptococcus* spp.

Mueller-Hinton II Broth Cation Adjusted (CAMHB)	22 g
Lyzovaná koňská krev	50 ml
Destilovaná voda	ad 1 000 ml
penicilin	0,015 – 2 mg/L
oxacilin	0,125 – 16 mg/L
ampicilin	0,5 – 64 mg/L
chloramphenicol	0,25 – 32 mg/L
tetracyklin	0,125 – 16 mg/L
vancomycin	0,5 – 64 mg/L

erythromycin	0,063 – 8 mg/L
clindamycin	0,063 – 8 mg/L
ciprofloxacin	0,063 – 8 mg/L
gentamicin	0,25 – 32 mg/L
teicoplanin	0,5 – 64 mg/L
trimethoprim/sulfamethoxazol v poměru 1/19	1 – 64 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 referenčních kmenů *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a *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).

6 měsíců od data výroby

Funkčnost výrobku je ověřena pravidelným týdenním sledováním a kontrolou kvality u všech vyrobených šarží. Kontrola kvality se provádí testováním kontrolních kmenů *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a *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 rozmezí hodnot MIC kontrolního kmene *S. aureus* a *S. pneumoniae* (mg/l) je vyznačeno v následujících tabulkách šedou barvou (Tab. 3 a 4). 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 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213:

[illegible]

Tab. 4: Rozmezí MIC u kmene *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

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
		0,06- 0,25									

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 *Staphylococcus* spp., resp.

Streptococcus spp. U streptokoků platí pro některá antimikrobika jiné breakpointy pro beta-hemolytické streptokoky, viridující streptokoky a *Streptococcus pneumoniae*. Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé (s MIC v hodnotách označených zeleně), intermediální (s MIC v hodnotách označených modře) a rezistentní (Tab. 5 – 8). U antimikrobik, kde nejsou koncentrace barevně rozděleny, nejsou breakpointy pro stafylokoky nebo streptokoky stanoveny a účinnost antimikrobiální látky lze posoudit pouze individuálně podle hodnoty MIC.

Tab. 5: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Staphylococcus* spp.

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

*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. 6: Breakpointy antimikrobiálních látek pro beta-hemolytické streptokoky

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

Tab. 7: Breakpointy antimikrobiálních látek pro viridující streptokoky

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

Tab. 8: 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

Srovnání „novosti postupů“

Sety ke stanovení MIC gramnegativních patogenů – *Staphylococcus* a *Streptococcus* spp. – obsahují speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňují testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k antimikrobiálním látkám, které jsou běžně užívány k léčbě onemocnění lidí způsobených těmito patogeny. Vývoj a výroba nových setů ke stanovení rezistencí *Staphylococcus* a *Streptococcus* 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