

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

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

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

**4797
2017**

Ověřená technologie 4797/2017

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

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

**Ověřená technologie byla vyvinuta v rámci projektu Národní agentury zemědělského
výzkumu (QJ1510218) a Národního programu udržitelnosti NPU-I (LO1218) a projektu
Ministerstva zemědělství ČR RO0517.**

ISBN 978-80-88233-25-1

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
PK	pozitivní kontrola růstu

Technická dokumentace

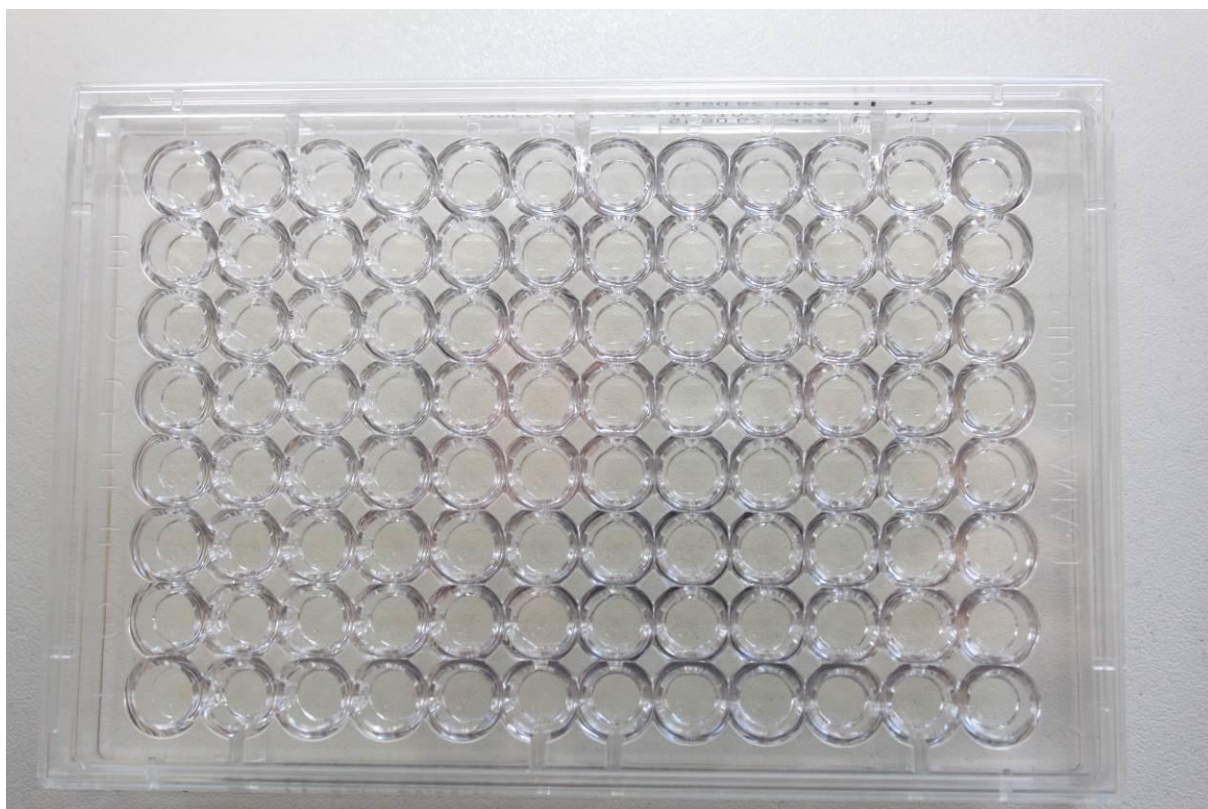
Účel použití:

Laboratorní *in vitro* stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro určení citlivosti/rezistence bakteriálních anaerobních patogenů hospodářských zvířat mikrodiluční metodou na 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 bakteriálních anaerobních patogenů hospodářských zvířat s originálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek umožňuje testování rezistencí veterinárních antimikrobik, která jsou užívána k léčbě infekcí hospodářských zvířat způsobených anaerobními bakteriemi a jejichž léčivé formy jsou v ČR registrovány. V setech jsou také zastoupena antimikrobika, jejichž testování má význam pro predikci jejich účinnosti a z epidemiologických důvodů nebo antimikrobika, která se terapeuticky používají v humánní medicíně a jejich testování má význam ve vztahu k možnosti přenosu rezistentních kmenů mezi lidmi a zvířaty. Vývoj a výroba nových setů ke stanovení rezistencí bakteriálních anaerobních patogenů hospodářských zvířat reaguje na aktuální potřebu veterinárních diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může jiným dostupným diagnostickým prostředkům na stanovení rezistence nebo citlivosti u anaerobních bakterií konkurovat kvalitou provedení, originalitou, umožněním vyšetření rychlou a spolehlivou metodou a především cenovou dostupností. Sety budou vyráběny v jedné modifikaci pro všechny anaerobní bakterie.

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:

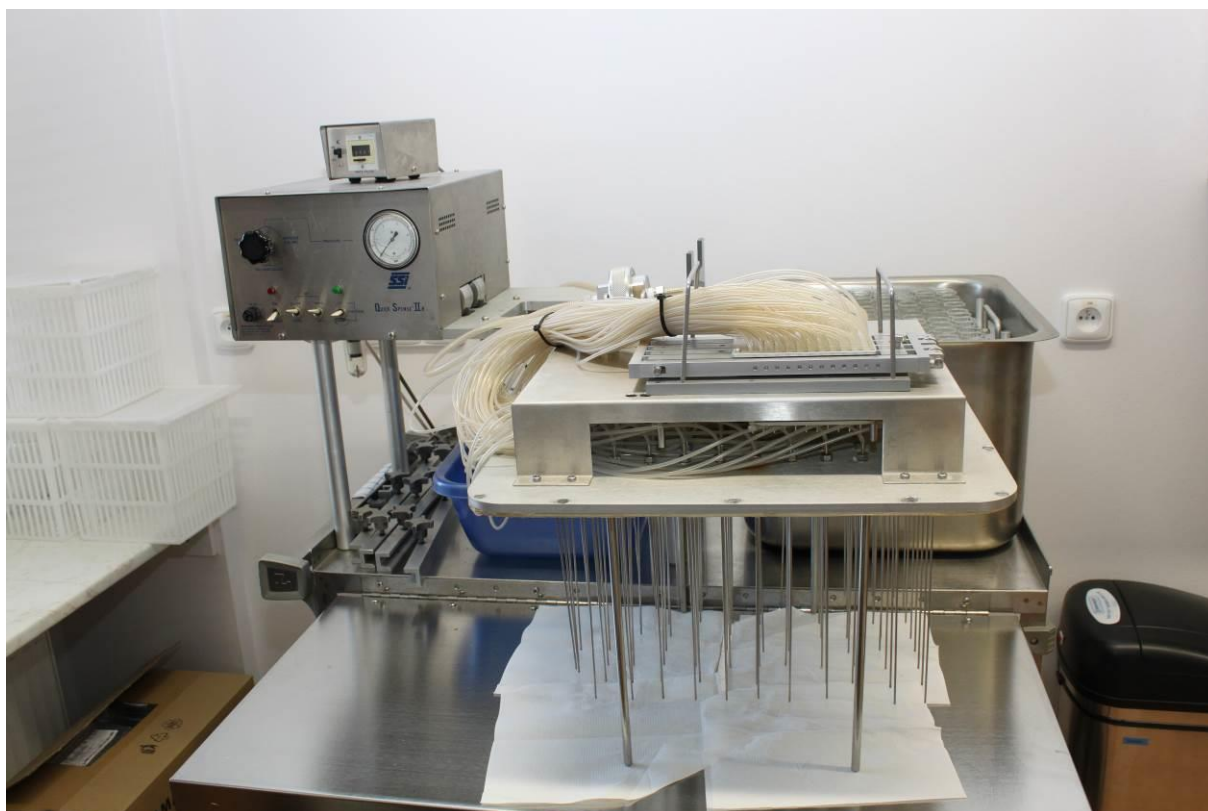
Veškeré práce na přípravě a výrobě MIC setů (příprava roztoků antibiotik a jejich aplikace na destičky) probíhají v prostorách se zajištěnou filtrací vzduchu (třída čistoty A).



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) nebo 10 mg/L (K 10) 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 0,2 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	
AMP	PNC	EFT	VAN	CLI	MER	TIG	ENR	TIA	TYL	FFC	SXT	
											TRI	SUL
K 1000 0,4	K 1000 0,4	K1000 3,2	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 1000 1,6	K 1000 1,6	K 1000 0,8	K 1000 1,6	K1000 3,2	K 1000 0,8	PKR	
K 1000 0,2	K 1000 0,2	K1000 1,6	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K1000 1,6	K 1000 0,4	K 1000 1,6	K 2432* 12,5
K 1000 0,1	K 1000 0,1	K1000 0,8	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K1000 0,8	K 1000 0,2	K 1000 0,8	K 2432 6,25
K 10 5	K 10 5	K1000 0,4	K 10 5	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K1000 0,4	K 1000 0,1	K 1000 0,4	K 2432 3,125
K 10 2,5	K 10 2,5	K1000 0,2	K 10 2,5	K 10 5	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 10 5	K 1000 0,1	K1000 0,2	K 10 5	K 1000 0,2	K 2432 1,6
K 10 1,25	K 10 1,25	K1000 0,1	K 10 1,25	K 10 2,5	K 10 5	K 10 5	K 10 2,5	K 10 5	K1000 0,1	K 10 2,5	K 1000 0,1	K 2432 0,8
K 10 0,625	K 10 0,625	K 10 5	K 10 0,625	K 10 0,25	K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 0,25	K 10 2,5	K 10 5	K 10 0,25	K 10 5	K 2432 0,4
K 10 0,31	K 10 0,31	K 10 2,5	K 10 0,31	K 10 0,625	K 10 0,25	K 10 0,25	K 10 0,625	K 10 0,25	K 10 2,5	K 10 0,625	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

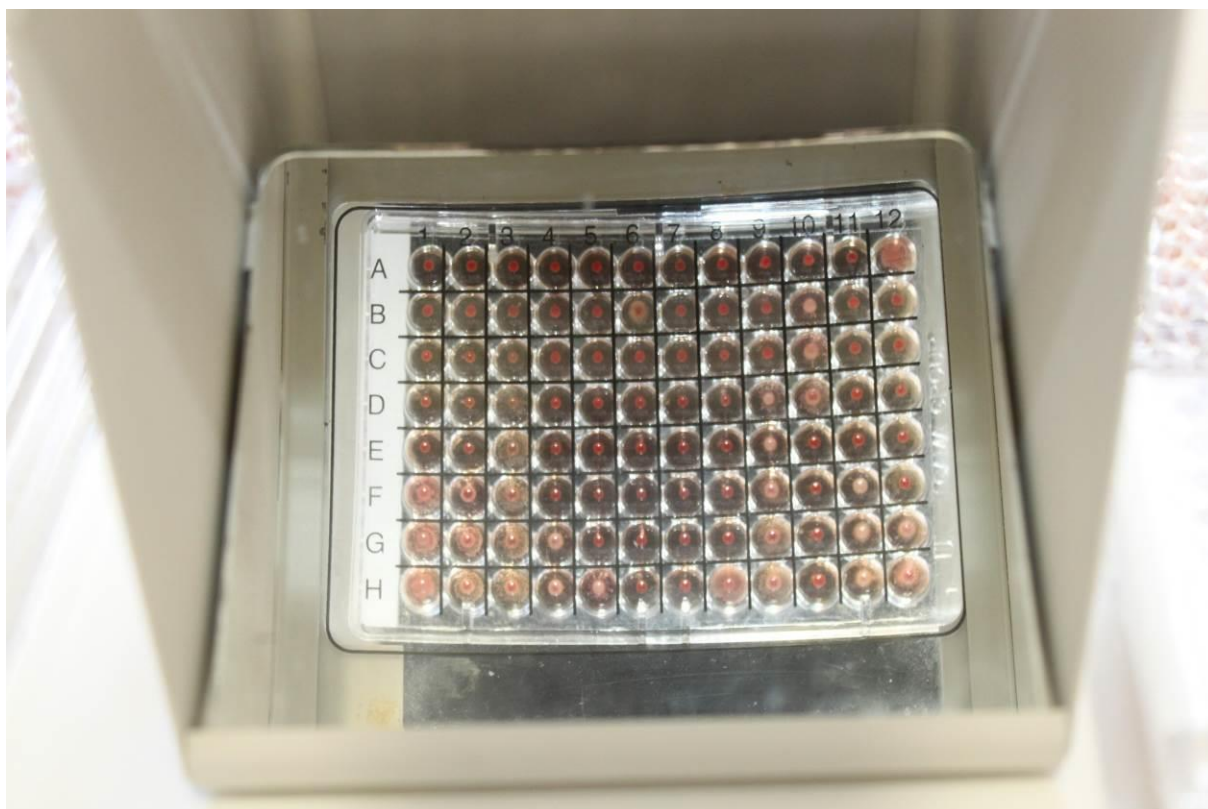






Princip metody:

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 0,2 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:

Brucella Broth Base	45 g
Hemin	5 µg
Vitaním K ₁	1 µg
Lyzovaná koňská krev	50 ml
Destilovaná voda	ad 1 000 ml

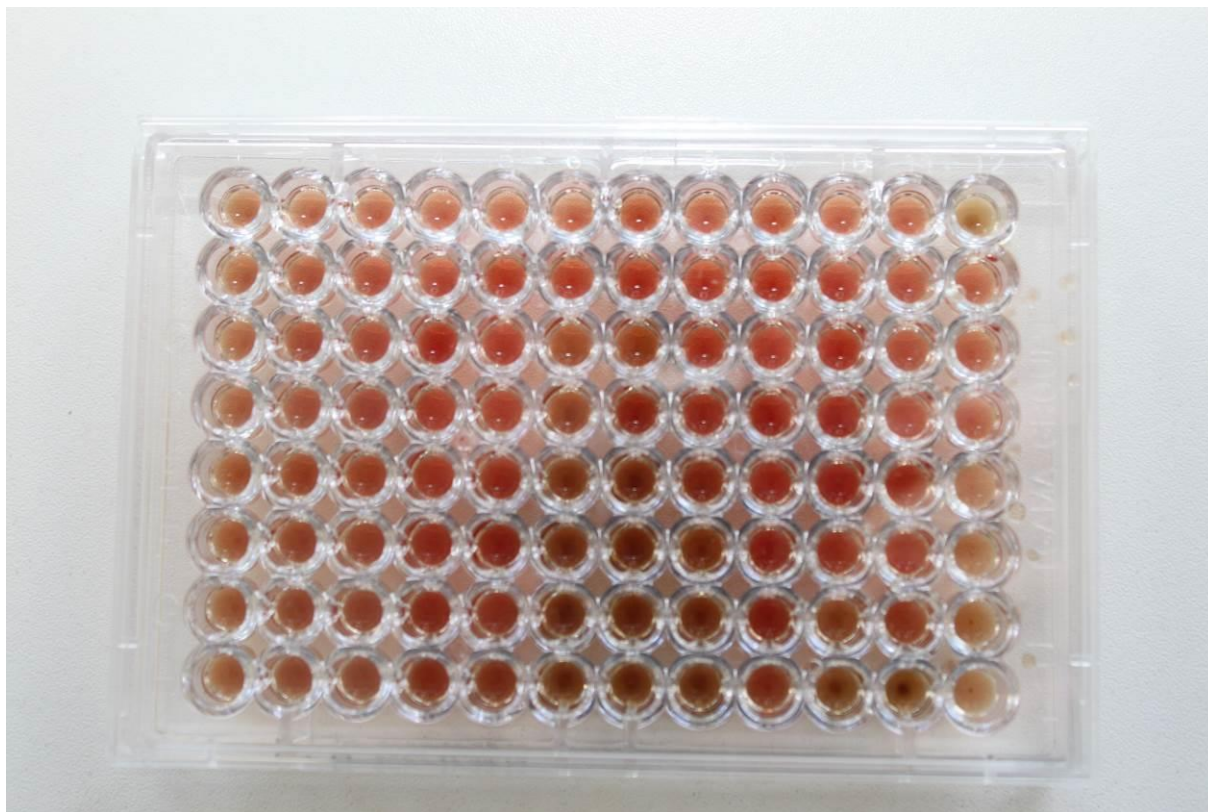
ampicilin	0,125 – 16 mg/L
penicilin	0,125 – 16 mg/L
ceftiofur	1 – 128 mg/L
vankomycin	0,125 – 16 mg/L
klindamycin	0,25 – 32 mg/l
meropenem	0,5 – 64 mg/L
tigecyklin	0,5 – 64 mg/L
enrofloxacin	0,25 – 32 mg/L
tiamulin	0,5 – 64 mg/L
tylosin	1 – 128 mg/L
florfenikol	0,25 – 32 mg/L
trimethopri/sulfamethoxazol 1/19	0,5 – 32 mg/L (koncentrace pro trimethoprim)

Konečné pH 7,5 ± 0,1

Pracovní postup:

Inokulum v objemu 10 µl se naočkuje do všech jamek mikrotitrační destičky tak, aby výsledná koncentrace inokula byla 5×10^5 CFU v jamce. Destičky se opatří víčkem bez lepící fólie a inkubují se anaerobně při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 72 h ± 2 h (pokud se pro testovaný bakteriální druh neuvádí jinak). 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 *Clostridium difficile* ATCC 700057.

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 *Clostridium difficile* ATCC 700057, 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 (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, nebo pro kontrolní kmen k dispozici dostupná data.

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
						≤			≤		

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 anaerobní bakterie. 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 anaerobní bakterie stanoveny a účinnost antimikrobiální látky lze posoudit pouze individuálně podle hodnoty MIC.

Tab. 4: 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

Srovnání „novosti postupů“

Set ke stanovení MIC anaerobních 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 zvířat 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, 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. V předkládané metodice je navrženo komplexní harmonizované řešení metod vzorkování, vyšetření a interpretace výsledků rezistence/citlivosti bakteriálních původců mastitid 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.

Reference:

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/>>



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