VÚVeL
VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v. v. i.

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

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

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Marek Brychta
MVDr. Ivana Kucharovičová

4903
2018

Ověřená technologie 4903/2018

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

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. Marek Brychta, Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93/20, 586 01 Jihlava

MVDr. Ivana Kucharovičová, Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93/20, 586 01 Jihlava

Ověřená technologie byla vyvinuta v rámci projektů Ministerstva zemědělství ČR NAZV Program ZEMĚ, číslo grantu QK 1810193, projektu RV 0518 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.

ISBN 978-80-88233-34-3

Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u *Streptococcus suis*

PEN	AMP	AMC*	EFT	ENR	FFC	CLI	TIA	TIL	TUL	TET	SXT**
4	4	32	16	8	64	16	32	128	128	32	PKR
2	2	16	8	4	32	8	16	64	64	16	4
1	1	8	4	2	16	4	8	32	32	8	2
0,5	0,5	4	2	1	8	2	4	16	16	4	1
0,25	0,25	2	1	0,5	4	1	2	8	8	2	0,5
0,125	0,125	1	0,5	0,25	2	0,5	1	4	4	1	0,25
0,06	0,06	0,5	0,25	0,125	1	0,25	0,5	2	2	0,5	0,125
0,03	0,03	0,25	0,125	0,06	0,5	0,125	0,25	1	1	0,25	0,06

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
EFT ceftiofur
FFC florfenikol
CLI klindamycin
TIA tiamulin
TIL tilmikosin
TUL tulathromycin
TET tetracyklin
SXT trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19
PKR pozitivní kontrola růstu

Technická dokumentace

Účel použití:

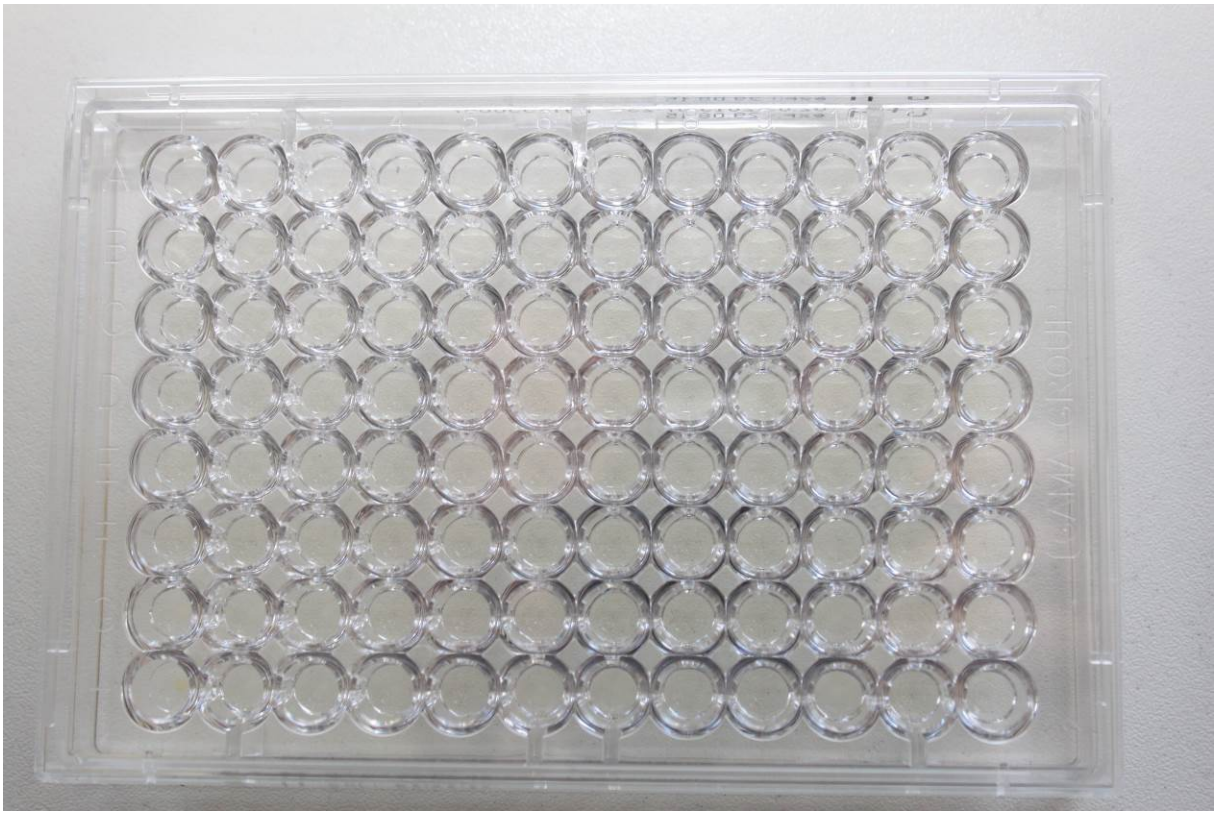
Laboratorní *in vitro* stanovení citlivosti/rezistence klinických izolátů *S. suis* pocházejících z kinických vzorků tkání a krve prasat mikrodiluční metodou k antimikrobiálním látkám, které je nezbytné pro efektivní léčbu a významnou měrou přispívá k omezení nežádoucího šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám v bakteriálních populacích.

Popis výrobku:

Sety ke stanovení minimálních MIC bakterie *S. suis* s originálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek umožňují testování jeho rezistencí k antimikrobikům, která jsou užívána k léčbě infekcí prasat, které způsobuje. 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. suis* reaguje na aktuální potřebu diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může jiným dostupným diagnostickým prostředkům na stanovení rezistence nebo citlivosti *S. suis* 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 %).

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.



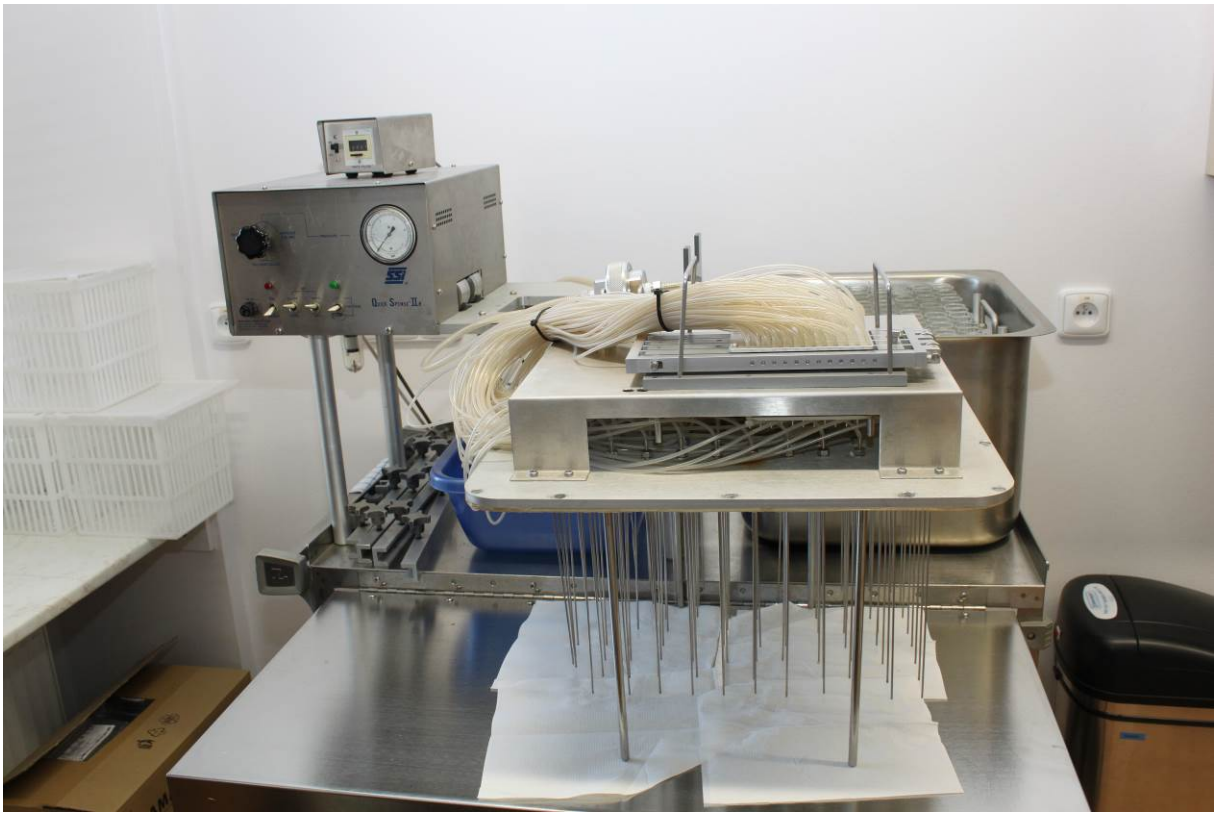
Podmínky výroby:

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.

EuroClone
TÜV



Příprava setů na stanovení MIC:

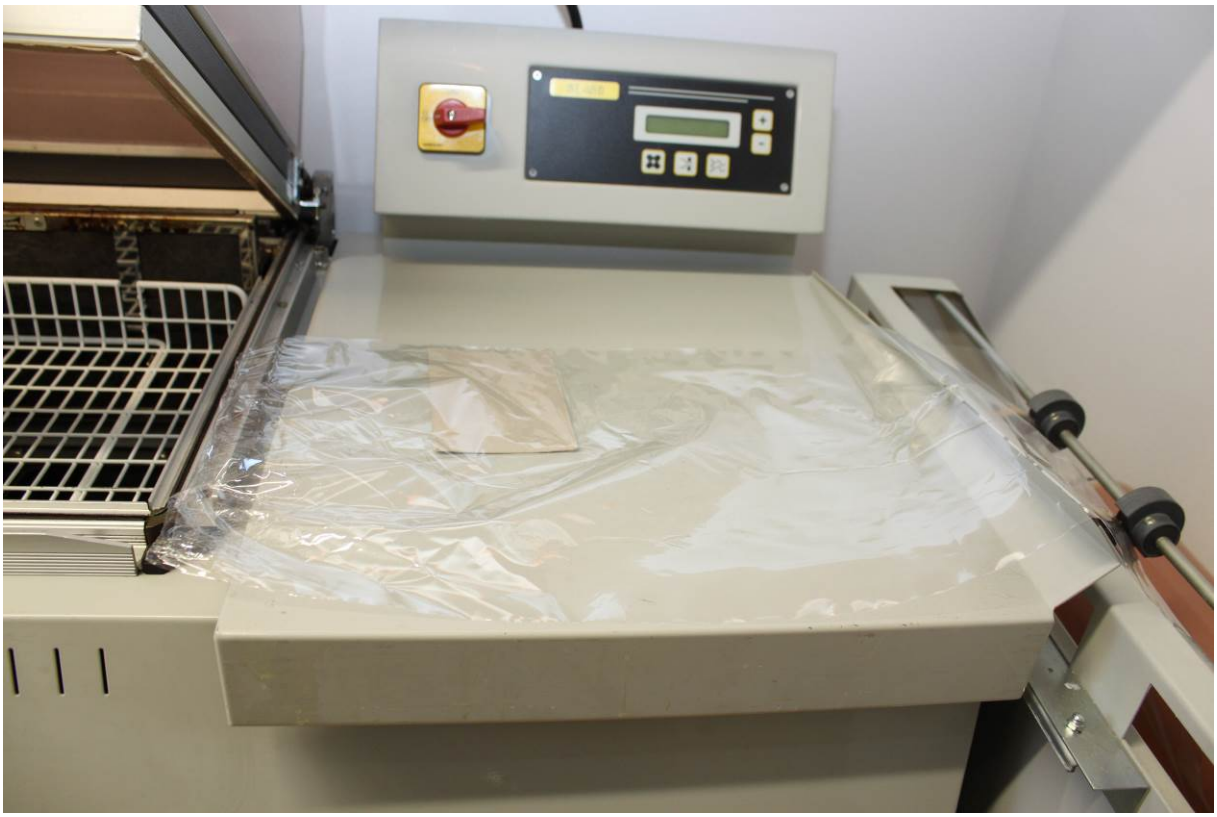
Ze zásobních koncentrací antimikrobiálních látek 10 000 mg/L se připravují pracovní koncentrace antimikrobik 1 000 mg/L (K 1 000), 10 mg/L (K 10) nebo 1 mg/L (K 1) ředěním ve sterilní destilované vodě, ze které se připraví finální koncentrace antimikrobik - viz popis výrobku a tabulka s koncentracemi 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

PEN	AMP	AMC		EFT	ENR	FFC	CLI	TIA	TYL	TUL	TET	SXT	
		AMX	CLA*									TRI*	SUL*
K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 1,6	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 1000 3,2	K 1000 3,2	K 1000 0,8	PK	
K 10 5	K 10 5	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 1000 0,8	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 1000 1,6	K 1000 1,6	K 1000 0,4	K 1000 0,1	K 2432** 0,8
K 10 2,5	K 10 2,5	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 10 5	K 1000 0,4	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1000 0,8	K 1000 0,8	K 1000 0,2	K 10 5	K 2432 6,25
K 10 1,25	K 10 1,25	K 1000 0,1	K 10 5	K 10 5	K 10 2,5	K 1000 0,2	K 10 5	K 1000 0,1	K 1000 0,4	K 1000 0,4	K 1000 0,1	K 10 2,5	K 2432 0,4
K 10 0,625	K 10 0,625	K 10 5	K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 1,25	K 1000 0,1	K 10 2,5	K 10 5	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 10 5	K 10 1,25	K 2432 0,2
K10 0,31	K10 0,31	K 10 2,5	K 10 1,25	K 10 1,25	K 10 0,625	K 10 5	K 10 1,25	K 10 2,5	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 10 2,5	K 10 0,625	K 2432 0,1
K 1 0,16	K 1 0,16	K 10 0,25	K 10 0,625	K 10 0,625	K 10 0,31	K 10 2,5	K 10 0,625	K 10 0,25	K 10 5	K 10 5	K 10 0,25	K10 0,31	K 24,32 5
K 1 0,8	K 1 0,8	K 10 0,625	K 10 0,31	K 10 0,31	K10 0,16	K 10 0,25	K 10 0,31	K 10 0,625	K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 0,625	K 1 0,16	K 24,32 2,5

*CLA = klavulanová kyselina; TRI = trimetoprim; SUL = 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
Lyzovaná koňská krev	50 ml
Destilovaná voda	ad 1 000 ml

penicilin	0,03 – 4 mg/L
ampicilin	0,03 – 4 mg/L
amoxicilin/kyselina klavulanová 2/1	0,25 – 32 / 0,125 - 16 mg/L
ceftiofur	0,125 – 16 mg/L
enrofloxacin	0,06 – 8 mg/L
florfenikol	0,5 – 64 mg/L
klindamycin	0,125 – 16 mg/L
tiamulin	0,25 – 32 mg/L
tilmikosin	1 – 128 mg/L
tulathromycin	1 – 128 mg/L
tetracyklin	0,25 – 32 mg/L
trimethoprim/sulfamethoxazol v poměru 1/19	0,06 – 4 / 1,14 – 76 mg/L

Konečné pH 7,2 ± 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 x 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 ± 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 *Streptococus 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 *Streptococus pneumoniae* ATCC 49619, 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 *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 kmene *Streptococus pneumoniae* ATCC

PEN	AMP	AMC	EFT	ENR	FFC	CLI	TIA	TIL	TUL	TET	SXT
4	4	32	16	8	64	16	32	128	128	32	PKR
2	2	16	8	4	32	8	16	64	64	16	4
1	1	8	4	2	16	4	8	32	32	8	2
0,5	0,5	4	2	1	8	2	4	16	16	4	1
0,25	0,25	2	1	0,5	4	1	2	8	8	2	0,5
0,125	0,125	1	0,5	0,25	2	0,5	1	4	4	1	0,25
0,06	0,06	0,5	0,25	0,125	1	0,25	0,5	2	2	0,5	0,125
0,03	0,03	0,25	0,125	0,06	0,5	0,125	0,25	1	1	0,25	0,06
		0,03-0,125				0,03			0,125	0,06	

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 *S. suis*. 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.

Tab. 2: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Streptococcus suis*

PEN	AMP	AMC	EFT	ENR	FFC	CLI	TIA	TIL	TUL	TET	SXT
4	4	32	16	8	64	16	32	128	128	32	PKR
2	2	16	8	4	32	8	16	64	64	16	4
1	1	8	4	2	16	4	8	32	32	8	2
0,5	0,5	4	2	1	8	2	4	16	16	4	1
0,25	0,25	2	1	0,5	4	1	2	8	8	2	0,5
0,125	0,125	1	0,5	0,25	2	0,5	1	4	4	1	0,25
0,06	0,06	0,5	0,25	0,125	1	0,25	0,5	2	2	0,5	0,125
0,03	0,03	0,25	0,125	0,06	0,5	0,125	0,25	1	1	0,25	0,06

citlivý; intermediální; rezistentní

Srovnání „novosti postupů“

Sety ke stanovení MIC *S. suis* obsahují speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňují testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k antimikrobiálním látkám, které jsou běžně užívány k léčbě onemocnění prasat způsobených tímto patogenem. Vývoj a výroba nových setů ke stanovení rezistencí speciálně pro *S. suis* 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, 2013. 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. 2018-09-06]. available in www: <http://217.70.33.99/Eucast2/>

VÚVeL

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