

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

Výroba setu ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u bakteriálních patogenů psů a koček

**MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D.
MVDr. Jiří Bureš
MVDr. Tomáš Krejčí
prof. MVDr. Alfred Hera, CSc.**

**4588
2016**

**Ověřená technologie
4588/2016**

Výroba setu ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u bakteriálních patogenů psů a koček

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

Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D., Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv,
Hudcova 232/56a, Brno

MVDr. Jiří Bureš, Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova
232/56a, Brno

MVDr. Tomáš Krejčí, LabMediaServis, s.r.o., Vítězná 92, 544 01 Huntířov

prof. MVDr. Alfred Hera, CSc., Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv,
Hudcova 232/56a, Brno

**Ověřená technologie byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR
NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a
tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory
MŠMT v rámci programu NPU I.**

ISBN 978-80-86895-91-8

Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u bakteriálních patogenů psů a koček

Seznam antimikrobiálních látek:

- | | |
|---------|-----------------------------------|
| 1. AMP | ampicilin |
| 2. AMC | amoxicilin/klavuanová kyselina |
| 3. TET | tetracyklin |
| 4. ENR | enrofloxacin |
| 5. MAR | marbofloxacin |
| 6. COL | kolistin |
| 7. CPD | cefpodoxim |
| 8. CLI | klindamycin |
| 9. NF | nitrofurantoin |
| 10. COT | trimethoprim/sulfamethoxazol 1:19 |
| 11. SUL | sulfamethoxazol |
| 12. GEN | gentamicin |
| 13. PKR | pozitivní kontrola růstu |

PKR pozitivní kontrola růstu

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce (mg/l) :

AMP	AMC	TET	ENR	MAR	COL	CPD	CLI	NF	COT	SUL	GEN
16	16	32	16	16	32	32	16	256	32	1024	PKR
8	8	16	8	8	16	16	8	128	16	512	32
4	4	8	4	4	8	8	4	64	8	256	16
2	2	4	2	2	4	4	2	32	4	128	8
1	1	2	1	1	2	2	1	16	2	64	4
0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	1	0,5	8	1	32	2
0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	4	0,5	16	1
0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	2	0,25	8	0,5

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l; koncentrace pro amoxicilin/kyselina klavulanová odpovídá koncentraci amoxicilinu; koncentrace pro trimethoprim/sulfamethoxazol odpovídá koncentraci trimethoprimu

Účel použití:

Laboratorní *in vitro* stanovení citlivosti/rezistence klinických bakteriálních izolátů ze psů a koček 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.

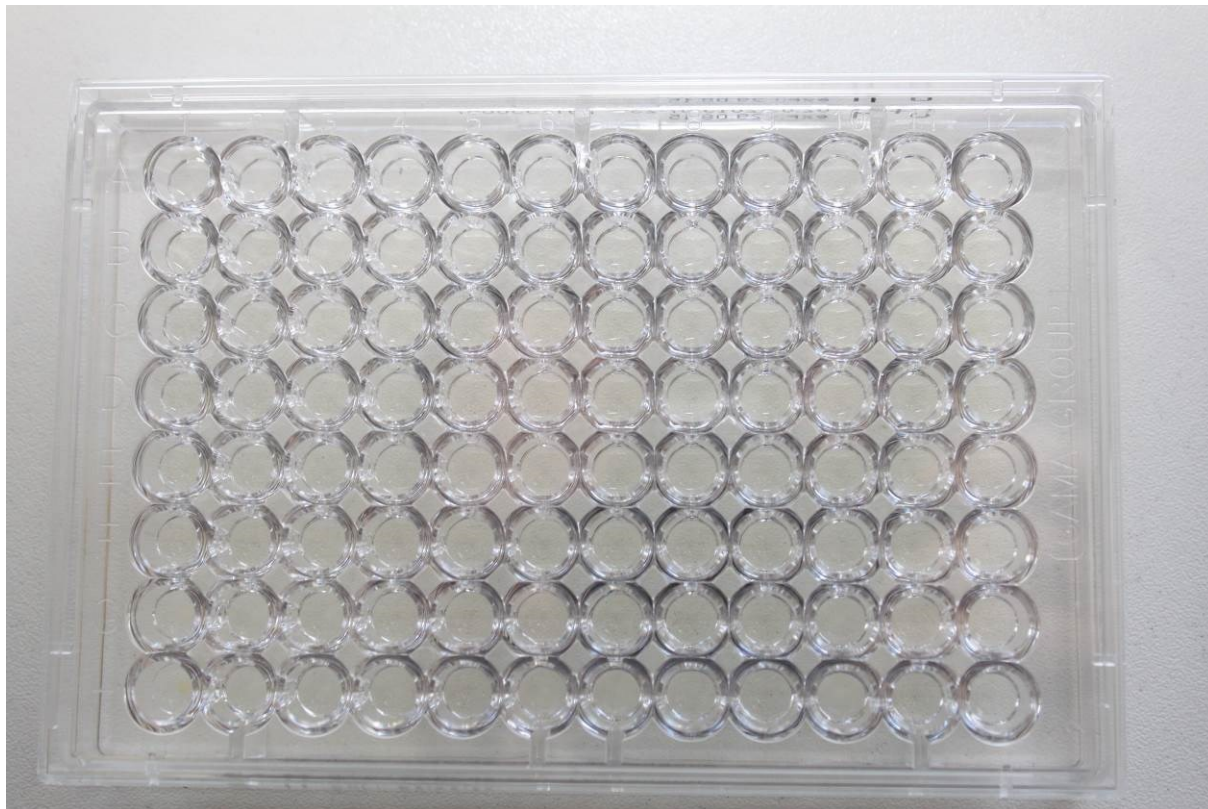
Popis výrobku:

Set ke stanovení MIC bakteriálních izolátů ze psů a koček s originálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek umožňuje testování rezistencí především veterinárních antimikrobik, která jsou užívána k léčbě nemocí psů a koček a jejichž lékové formy jsou v ČR registrovány. V setu jsou také zastoupena antimikrobika, jejichž testování má význam pro predikci jejich účinnosti a z epidemiologických důvodů. V současné době je k testování rezistencí specifických veterinárních antimikrobik možné využít pouze omezenou nabídku setů zahraniční výroby, které většinou vzhledem k zastoupení antimikrobik ne zcela odpovídají potřebám testování v České republice. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí bakteriálních patogenů psů a koček reaguje na aktuální potřebu veterinárních diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může zahraničním výrobkům konkurovat kvalitou provedení, originalitou a především cenovou dostupností. Sety budou vyráběny ve dvou modifikacích, které se budou lišit ve složení živného média, v němž budou ředěny antimikrobiální látky:

- 1. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově nenáročných bakterií - CAMHB**
- 2. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově náročných bakterií – CAMHB s 5 % lyzované koňské krve**

Na mikrotitrační destičce s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H) jsou ve sloupcích dvojkové ředící řady dvanácti navržených antimikrobiálních látek, u jedenácti antimikrobiálních látek (sloupce 1-11) je na destičce 8 ředění (řádky A-H) a u jedné

antimikrobiální látky (sloupec 12) je 7 ředění (řádky B-H) a v řádku A je jamka s médiem bez antimikrobiální látky sloužící jako pozitivní kontrola růstu testovaných bakterií.



Počáteční koncentrace 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:

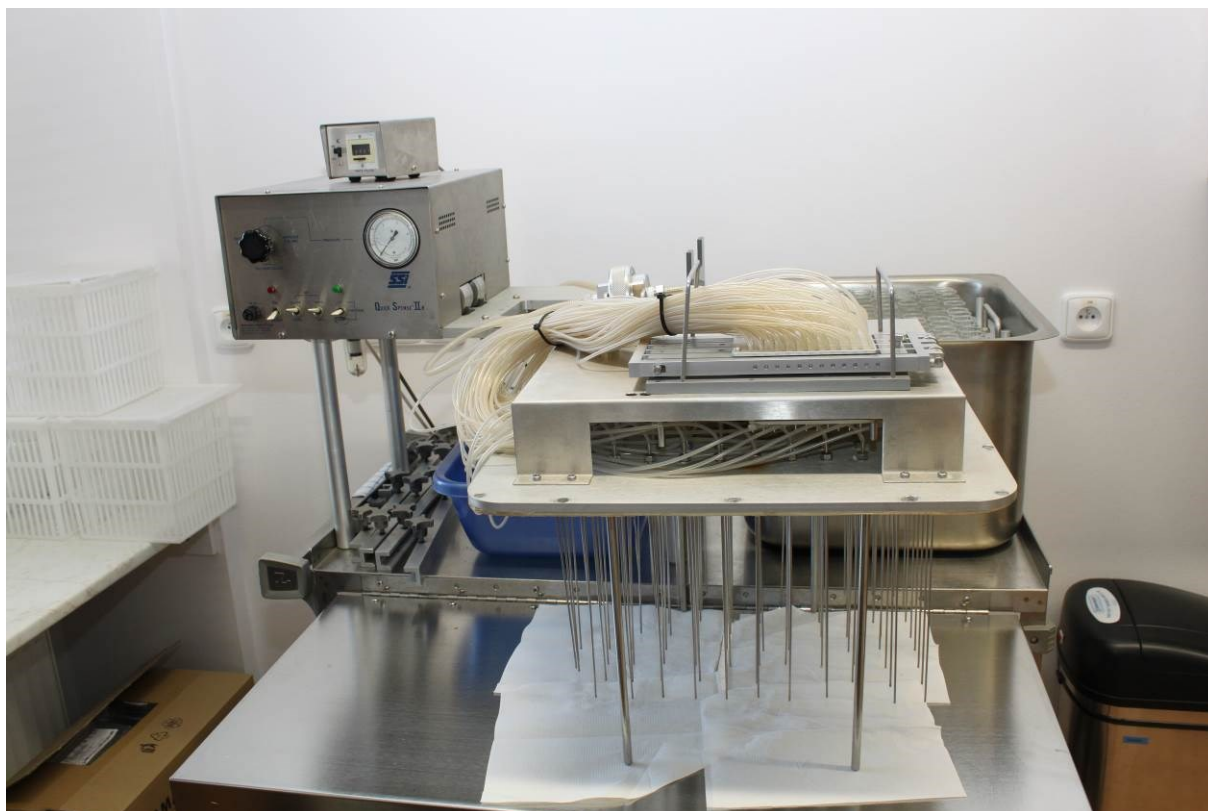
Veškeré práce na přípravě a výrobě MIC setů (příprava roztoků antibiotik a jejich aplikace na destičky) probíhají v prostorách se zajištěnou filtrací vzduchu (třída čistoty A).



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.

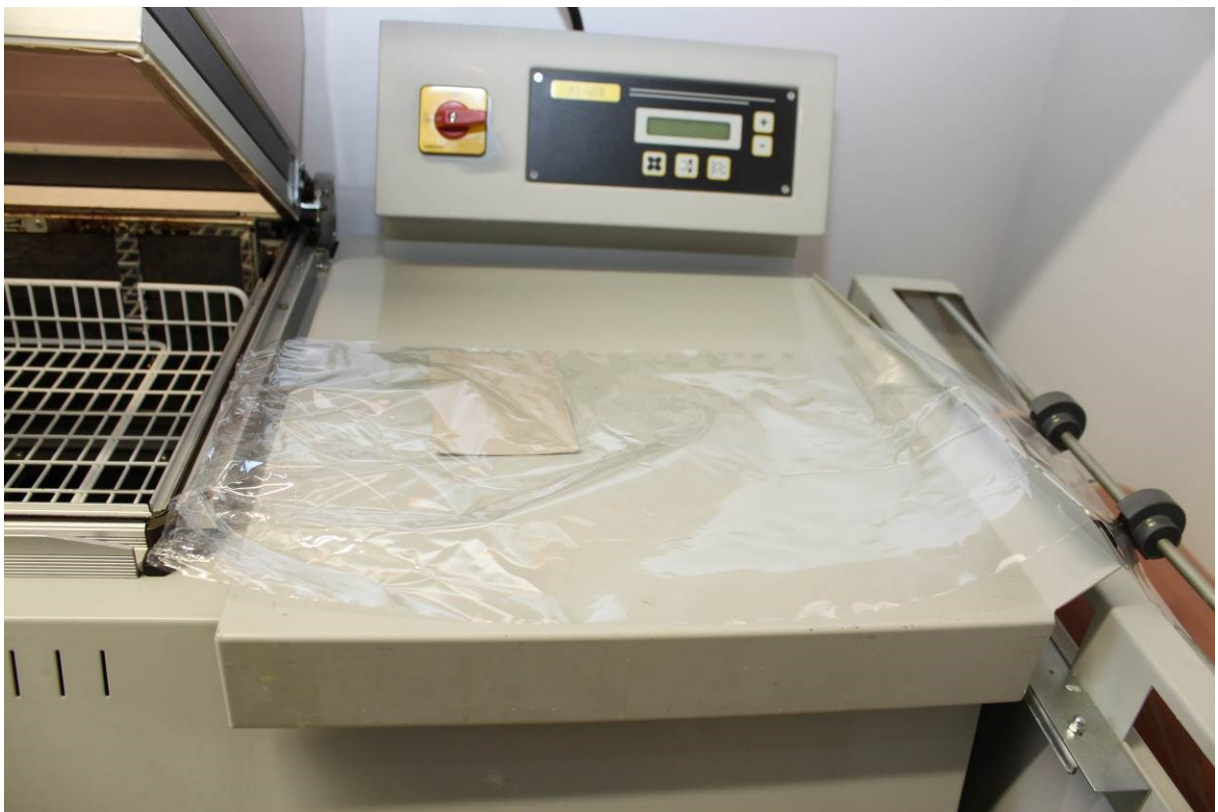


Příprava setů na stanovení MIC:

Ze základních koncentrací antimikrobiálních látek se připravují ředící řady (dvojkové ředění) do konečného počtu 8 (případně 7) ředění - viz popis výrobku. Tyto koncentrace jsou aplikovány do příslušných jamek na destičce v objemu 100 μ l. Rozplňování destiček je prováděno na laboratorním přístroji DYNATECH Laboratories 1036 Quick spenze IIE dle návodu výrobce. Rozplněné desky opatřené víčkem jsou baleny po 5 kusech do smrštitelné fólie a uloženy -80 °C.

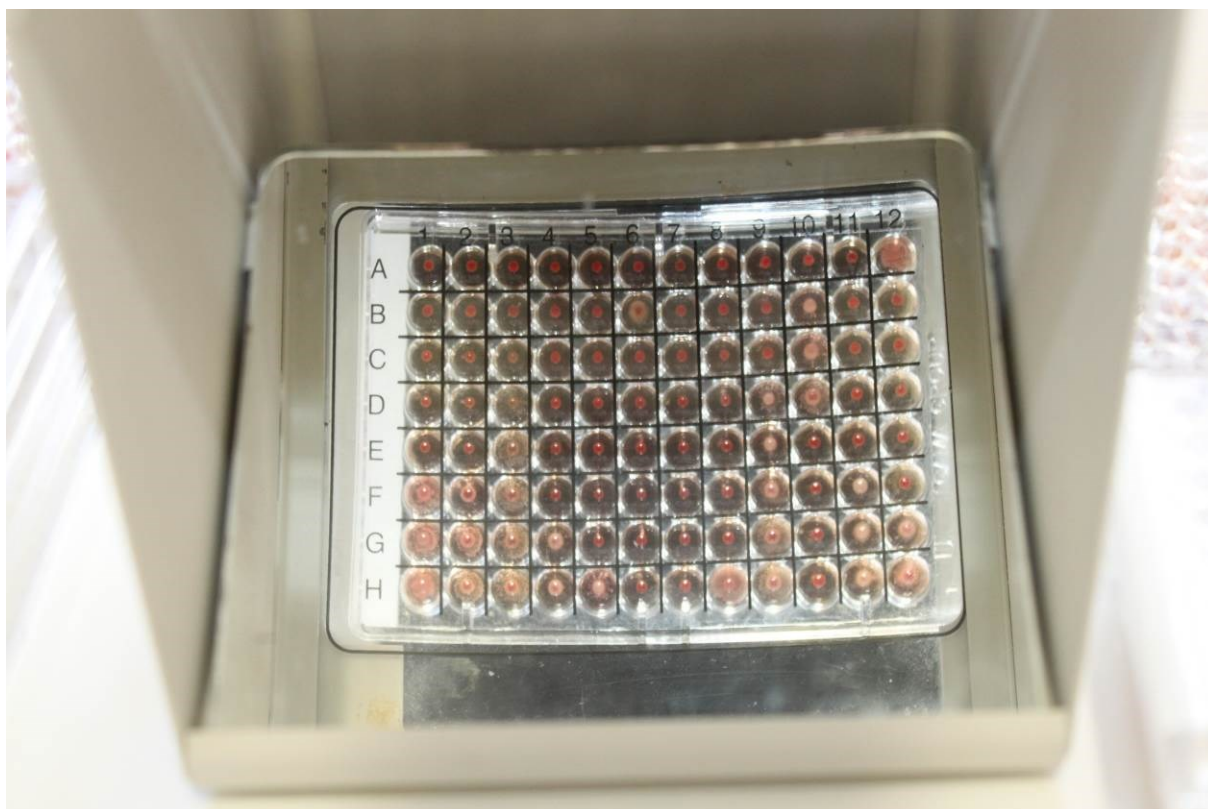






Princip metody:

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, vychází z aktuálně registrovaných veterinárních léčebných přípravků pro psy a kočky. V destičce jsou různá ředění dvanácti 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 standardy vydávanými CLSI a EUCAST.



Reference:

CLSI, 2012a. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. M 07-A9, vol. 29, No 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2012: 68 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. Approved Standard – Fourth Edition 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.

EUCAST - Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Version 5.13. [Database online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [cit. 2014-11-14]. available in www: <<http://217.70.33.99/Eucast2/>>

1. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově nenáročných bakterií – CAMHB



Složení setu:

Mueller-Hinton II Broth Cationt Adjusted (CAMHB)	22 g
Destilovaná voda	ad 1 000 ml

Ampicilin	0,125 – 16 mg/l
Amoxicilin/klavulanová kyselina 2/1	0,125 – 16 mg/l (koncentrace pro amoxicilin)
Tetracyklin	0,25 – 32 mg/l
Enrofloxacin	0,125 – 16 mg/l
Marbofloxacin	0,125 – 16 mg/l
Kolistin	0,25 – 32 mg/l
Cefpodoxim	0,25 – 32 mg/l

Klindamycin	0,125 – 16 mg/l
Nitrofurantoin	2 – 256 mg/l
Trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19	0,25 – 32 mg/l (koncentrace pro trimethoprim)
Sulfanmethoxazol	8 – 1024 mg/l
Gentamicin	0,5 – 32 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 $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ (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 *Escherichia coli* (ATCC 25 922; NCTC 12241, CIP 7624 nebo DSM 1103) a *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213; NCTC 12973; CIP 103429; DSM 2569).

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).

Expirace:

6 měsíců od data výroby

Způsob likvidace:

Použité sety se likvidují jako infekční materiál.

2. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově náročných bakterií – CAMHB s 5 % lyzované koňské krve



Set je určen ke stanovení MIC u izolatů *Streptococcus* sp., *Pasteurella multocida*

Složení setu:

Mueller-Hinton II Broth Cationt Adjusted (CAMHB)	22 g
Lyzovaná koňská krev	50 ml
Destilovaná voda	ad 1 000 ml
Ampicilin	0,125 – 16 mg/l
Amoxicilin/klavulanová kyselina 2/1	0,125 – 16 mg/l (koncentrace pro amoxicilin)
Tetracyklin	0,25 – 32 mg/l

Enrofloxacin	0,125 – 16 mg/l
Marbofloxacin	0,125 – 16 mg/l
Kolistin	0,25 – 32 mg/l
Cefpodoxim	0,25 – 32 mg/l
Klindamycin	0,125 – 16 mg/l
Nitrofurantoin	2 – 256 mg/l
Trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19	0,25 – 32 mg/l (koncentrace pro trimethoprim)
Sulfanmethoxazol	8 – 1024 mg/l
Gentamicin	0,5 – 32 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 $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ (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 *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 41619; CIP 104340).

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

Způsob likvidace:

Použité sety se likvidují jako infekční materiál.

Ověření funkčnosti

Funkčnost výrobku je ověřena pravidelným týdenním sledováním a kontrolou kvality u všech vyrobených šarží. Kontrola kvality se provádí testováním kontrolních kmenů, 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 testovaných kontrolních kmenů (mg/l) je vyznačeno v tabulkách šedou barvou. Pokud u některých antimikrobiálních látek není pro některý z kontrolních kmenů vyznačeno šedé rozmezí hodnot MIC, není testování této látky relevantní pro určitý bakteriální druh (antimikrobiální látka není účinná nebo vhodná pro léčbu onemocnění tímto mikroorganismem) nebo nejsou k dispozici dostupná data.

1. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově nenáročných bakterií - CAMHB

Kvalita výsledků se kontroluje paralelně s testovaným mikroorganismem stanovením MIC antimikrobiálních látek u referenčního kmene *Escherichia coli* (ATCC 25 922; NCTC 12241, CIP 7624 nebo DSM 1103) a *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213; NCTC 12973; CIP 103429; DSM 2569).

Escherichia coli – ATCC 25922

AMP	AMC	TET	ENR	MAR	COL	CPD	CLI	NF	COT	SUL	GEN
16	16	32	16	16	32	32	16	256	32	1024	PKR
8	8	16	8	8	16	16	8	128	16	512	32
4	4	8	4	4	8	8	4	64	8	256	16
2	2	4	2	2	4	4	2	32	4	128	8
1	1	2	1	1	2	2	1	16	2	64	4
0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	1	0,5	8	1	32	2
0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	4	0,5	16	1
0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	2	0,25	8	0,5
≤				≤				≤		≤	

Staphylococcus aureus – ATCC 29213

AMP	AMC	TET	ENR	MAR	COL	CPD	CLI	NF	COT	SUL	GEN
16	16	32	16	16	32	32	16	256	32	1024	PKR
8	8	16	8	8	16	16	8	128	16	512	32
4	4	8	4	4	8	8	4	64	8	256	16
2	2	4	2	2	4	4	2	32	4	128	8
1	1	2	1	1	2	2	1	16	2	64	4
0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	1	0,5	8	1	32	2
0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	4	0,5	16	1
0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	2	0,25	8	0,5
≤				≤				≤		≤	

2. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově náročných bakterií – CAMHB s 5 % lyzované koňské krve

Kvalita výsledků se kontroluje paralelně s testovaným mikroorganismem stanovením MIC antimikrobiálních látek u referenčního kmene *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 41619; CIP 104340).

Streptococcus pneumoniae – ATCC 41619

AMP	AMC	TET	ENR	MAR	COL	CPD	CLI	NF	COT	SUL	GEN
16	16	32	16	16	32	32	16	256	32	1024	PKR
8	8	16	8	8	16	16	8	128	16	512	32
4	4	8	4	4	8	8	4	64	8	256	16
2	2	4	2	2	4	4	2	32	4	128	8
1	1	2	1	1	2	2	1	16	2	64	4
0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	1	0,5	8	1	32	2
0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	4	0,5	16	1
0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	2	0,25	8	0,5
≤	≤	≤				≤	≤		≤		

Interpretační kritéria - breakpointy

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. Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé (s MIC v hodnotách označených zeleně), středně citlivé (s MIC v hodnotách označených modře) a rezistentní. U antimikrobik, kde nejsou koncentrace barevně rozděleny, nejsou breakpointy pro určité skupiny patogenů definovány.

Breakpointy antimikrobiálních látek pro gramnegativní bakterie

AMP	AMC	TET	ENR	MAR	COL	CPD	CLI	NF	COT	SUL	GEN
16	16	32	16	16	32	32	16	256	32	1024	PKR
8	8	16	8	8	16	16	8	128	16	512	32
4	4	8	4	4	8	8	4	64	8	256	16
2	2	4	2	2	4	4	2	32	4	128	8
1	1	2	1	1	2	2	1	16	2	64	4
0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	1	0,5	8	1	32	2
0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	4	0,5	16	1
0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	2	0,25	8	0,5

Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Staphylococcus spp.*

AMP	AMC	TET	ENR	MAR	COL	CPD	CLI	NF	COT	SUL	GEN
16	16	32	16	16	32	32	16	256	32	1024	PKR
8	8	16	8	8	16	16	8	128	16	512	32
4	4	8	4	4	8	8	4	64	8	256	16
2	2	4	2	2	4	4	2	32	4	128	8
1	1	2	1	1	2	2	1	16	2	64	4
0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	1	0,5	8	1	32	2
0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	4	0,5	16	1
0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	2	0,25	8	0,5

Breakpointy antimikrobiálních látek pro beta-hemolytické streptokoky

AMP*	AMC	TET	ENR	MAR	COL	CPD	CLI	NF	COT	SUL	GEN
16	16	32	16	16	32	32	16	256	32	1024	PKR
8	8	16	8	8	16	16	8	128	16	512	32
4	4	8	4	4	8	8	4	64	8	256	16
2	2	4	2	2	4	4	2	32	4	128	8
1	1	2	1	1	2	2	1	16	2	64	4
0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	1	0,5	8	1	32	2
0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	4	0,5	16	1
0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	2	0,25	8	0,5

Breakpointy antimikrobiálních látek pro viridující streptokoky

AMP	AMC	TET	ENR	MAR	COL	CPD	CLI	NF	COT	SUL	GEN
16	16	32	16	16	32	32	16	256	32	1024	PKR
8	8	16	8	8	16	16	8	128	16	512	32
4	4	8	4	4	8	8	4	64	8	256	16
2	2	4	2	2	4	4	2	32	4	128	8
1	1	2	1	1	2	2	1	16	2	64	4
0,5	0,5	1	0,5	0,5	1	1	0,5	8	1	32	2
0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	4	0,5	16	1
0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	2	0,25	8	0,5

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.

CA-SFM 2014. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2014. Lyon, France 2014: 122 pp.



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