



OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

**Výroba setu pro stanovení citlivosti/rezistence
k antibiotikům u bakterií izolovaných z ryb**

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

2384
2023

Ověřená technologie

2384/2023

Výroba setu pro stanovení citlivosti/rezistence k antibiotikům u bakterií izolovaných z ryb

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, Ph.D. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, Brno

Tato ověřená technologie byla vyvinuta v rámci projektů PROFISH (reg. číslo CZ.02.1.01/0.0/16_0000869) financovaného z Evropského fondu pro regionální rozvoj v rámci operačního programu Věda, výzkum a vzdělávání MŠMT a Ministerstva zemědělství ČR (číslo grantu RO0523).

ISBN 978-80-7672-032-9

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

Set ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u bakterií izolovaných z ryb

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce je uvedena v mg/l.

AMP	ampicilin (64 – 0,03 mg/l)
ENR	enrofloxacin (8 – 0,004 mg/l)
ERY	erythromycin (128 – 1 mg/l)
FFC	florfenikol (64 – 0,5 mg/l)
FLU	flumequin (8 – 0,06 mg/l)
GEN	gentamicin (8 – 0,06 mg/l)
OA	oxolinová kyselina (16 – 0,015 mg/l)
OTC	oxytetracyklin (64 – 0,06 mg/l)
SXO	ormethoprim/sulfadimethoxin (1/19) – koncentrace v tabulce platí pro ormethoprim (32 – 0,25 mg/l)
SXT	trimethoprim/sulfamethoxazol (1/19) – koncentrace v tabulce platí pro trimethoprim (4 – 0,06 mg/l)
PKR	pozitivní kontrola růstu

Růstové médium, ve kterém jsou ředěna antimikrobika je Mueller Hinton Broth.

Technická dokumentace

Účel použití:

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

Popis výrobku:

Diagnostický set je mikrotitrační destička s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H). Ve sloupcích je v růstovém médiu naředěno osm antimikrobiálních látek a dvě kombinace antimikrobiálních látek ve stanovených koncentracích v objemu 100 µl, ve sloupci 12, řádku A je jamka se 100 µl média 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 buď rozmezí breakpointů citlivosti/rezistence testovaných bakterií nebo hodnoty cutoff vybraných antimikrobik podle závazných mezinárodních metodik Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI – VET04-A2, VET03/VET04-S2) a rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů 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,

kteřá 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 10 000 mg/L (K 10 000), 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 v objemu 25 ml do 96 velkých zkumavek (tabulky 1a a 1b). Kombinace antimikrobik se připraví tak, že se 25 ml jedné antimikrobiální látky smíchá s 25 ml druhé antimikrobiální látky v jedné zkumavce, výsledný objem ve zkumavce s kombinací dvou antimikrobiálních látek bude 50 ml. 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 DYNAMIC (Dynex Technologies, s.r.o., ČR), dle návodu výrobce. Rozplněné desky opatřené víčkem jsou baleny po 5 kusech do smrštitelné fólie a uloženy v -80 °C.

Tabulka 1a: Objem antimikrobik (ml) v jednotlivých jamkách destičky v celkovém objemu 25 ml

AMP K 1000 1,6	K 10 0,6	K 10 1,25	ERY K 1000 3,2	FFC K 1000 1,6	FLU K 1000 0,2	K 1 0,8	K 10 0,3	K 10 0,6	K 1000 0,2	ORM K 1000 1,6	PKR
K 1000 0,8	K 10 0,3	K 10 0,6	K 1000 1,6	K 1000 0,8	K 1000 0,1	K 1 0,4	K 10 0,15	K 10 0,3	K 1000 0,1	K 1000 0,8	TRI K 1000 0,2
K 1000 0,4	K 10 0,15	K 10 0,3	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 10 5	GEN K 1000 0,2	OA K 1000 0,4	K 10 0,15	K 10 5	K 1000 0,4	K 1000 0,1
K 1000 0,2	K 1 0,8	K 10 0,15	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 10 2,5	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1 0,8	K 10 2,5	K 1000 0,2	K 10 5
K 1000 0,1	ENR K 1000 0,2	K 1 0,8	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 10 1,25	K 10 5	K 1000 0,1	K 1 0,4	K 10 1,25	K 1000 0,1	K 10 2,5
K 10 5	K 1000 0,1	K 1 0,4	K 1000 0,1	K 10 5	K 10 0,6	K 10 2,5	K 10 5	OTC K 1000 1,6	K 10 0,6	K 10 5	K 10 1,25
K 10 2,5	K 10 5	K 1 0,2	K 10 5	K 10 2,5	K 10 0,3	K 10 1,25	K 10 2,5	K 1000 0,8	K 10 0,3	K 10 2,5	K 10 0,6
K 10 1,25	K 10 2,5	K 1 0,1	K 10 1,25	K 10 1,25	K 10 0,15	K 10 0,6	K 10 1,25	K 1000 0,4	K 10 0,15	K 10 1,25	K 10 0,3

ORM = ormethoprim; TRI = trimethoprim

Tabulka 1b: Objem antimikrobik (ml) v jednotlivých jamkách destičky v celkovém objemu 25 ml

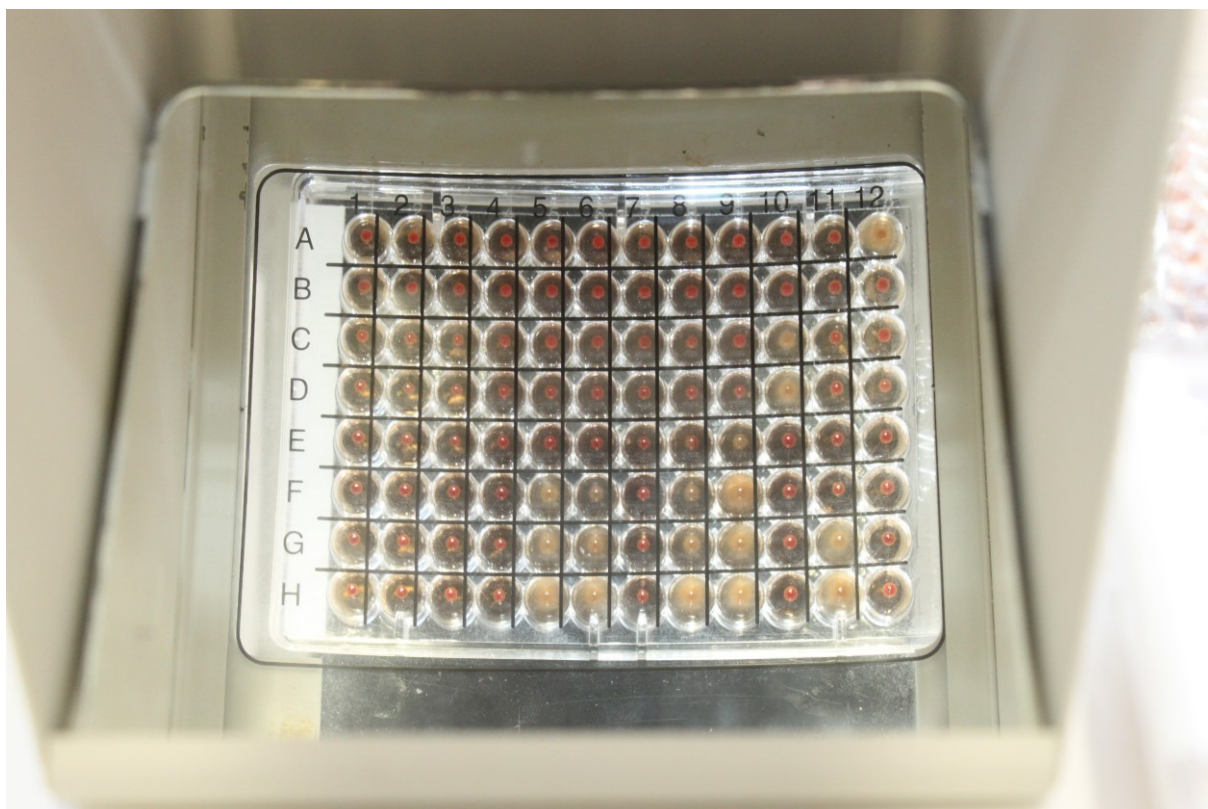
										SDM* K 2432 12,5	PKR
										K 2432 6,25	SMO* K 2432 1,6
										K 2432 3,125	K 2432 0,8
										K 2432 1,6	K 2432 0,4
										K 2432 0,8	K 2432 0,2
										K 2432 0,4	K 2432 0,1
										K 2432 0,2	K 243,2 0,5
										K 2432 0,1	K 243,2 0,25

SDM = sulfadimethoxin; SMO = sulfamethoxazol.

*Příprava pracovní koncentrace 2432 mg/L (K 2432): 121,6 mg sulfadimethoxinu nebo 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
Destilovaná voda	ad 1 000 ml
ampicilin	0,25 - 32 mg/L
amoxicilin/kyselina klavulanová v poměru 2/1	0,25 - 32 / 0,125 – 16 mg/L
cefotaxim	0,125 – 16 mg/L
tetracyklin	0,25 - 32 mg/L
doxycyklin	0,125 – 16 mg/L
spektinomycin	4 – 512 mg/L
trimethoprim/sulfamethoxazol v poměru 1/19	0,5 – 64 mg/L / 9,5 – 1216 mg/ml
enrofloxacin	0,125 – 16 mg/L
florfenikol	0,5 – 64 mg/L
tiamulin	1 – 128 mg/L
tylosin	1 – 128 mg/L
tilmikosin	1 – 64 mg/L
Konečné pH $7,2 \pm 0,1$	

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 5×10^5 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 kmenů *Escherichia coli* ATCC 25922 a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658.

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 vyvíjeného setu je ověřena stejným způsobem jako se provádí pravidelná týdenní kontrola kvality vyrobených setů do doby expirace testováním kontrolních kmenů *E. coli* ATCC 25922 a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, které jsou přesně definovány a hodnoty MIC k některým antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI (VET03/VET04-S2). Stanovené hodnoty MIC jednotlivých antimikrobik musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC referenčních kmenů. Referenční rozmezí hodnot MIC (mg/l) kontrolních kmenů *E. coli* a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* za různých podmínek inkubace je vyznačeno v Tabulkách 3 – 12 šedou barvou. 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 za daných inkubačních podmínek.

Tabulka 3: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 22 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 4: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 22 °C, 44-48 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 5: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 28 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 6: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 28 °C, 44-48 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 7: Rozmezí MIC referenčního kmene *Escherichia coli* ATCC 25922 při 18 °C, 92-96 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,06	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 8: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 22 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 9: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 22 °C, 44-48 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 10: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 28 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 11: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 22 °C, 24-28 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06

Tabulka 12: Rozmezí MIC referenčního kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 při 18 °C, 92-96 hodin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AMP 64	0,25	0,5	ERY 128	FFC 64	FLU 8	0,03	0,125	0,25	8	SXO 32	PKR
B	32	0,125	0,25	64	32	4	0,015	0,06	0,125	4	16	SXT 4
C	16	0,06	0,125	32	16	2	GEN 8	OA 16	0,06	2	8	2
D	8	0,03	0,06	16	8	1	4	8	0,03	1	4	1
E	4	ENR 8	0,03	8	4	0,5	2	4	0,015	0,5	2	0,5
F	2	4	0,015	4	2	0,25	1	2	OTC 64	0,25	1	0,25
G	1	2	0,008	2	1	0,125	0,5	1	32	0,125	0,5	0,125
H	0,5	1	0,004	1	0,5	0,06	0,25	0,5	16	0,06	0,25	0,06
												≤0,03

Interpretační kritéria stanovení MIC - breakpointy

Interpretace výsledků do kategorií citlivosti vyžaduje použití tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek (pro ryby dle platného dokumentu CLSI VET03/VET04-S2), které dělí izoláty do kategorií citlivosti na citlivé, intermediární a rezistentní. Vyšetřovaný kmen bakterie lze kategorizovat za předpokladu, že příslušné breakpointy jsou použity v definovaném fenotypovém systému. Bohužel, v současné době jsou klinické breakpointy pro bakterie izolované z ryb stanoveny pouze u *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* pro kyselinu oxolinovou a oxytetracyklin. U florfenikolu a u kombinace ormethopimu se sulfadimethoxinem lze vycházet při hodnocení ze stanovených hodnot epidemiologických cutoff, které dělí izoláty podle MIC na wild-type (WT) izoláty s hodnotami MIC nižšími než cutoff, u kterých lze předpokládat, že nemají žádné získané mechanismy pro vznik rezistencí k danému léčivu a na non-wild-type (NWT)

izoláty s hodnotami MIC vyššími než cutoff, u kterých lze předpokládat rozvoj rezistence k danému léčivu. Hodnoty cutoff jsou definovány rovněž pouze u *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Vzhledem k tomu, že pro všechny testované látky nejsou breakpointy pro jednotlivé bakterie izolované z ryb definovány, jsou v následující tabulce uvedeny pouze známé hodnoty MIC a cutoff pro *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* po inkubaci při 22±2 °C po dobu 44-48 hodin za přítomnosti vzduchu (Tabulka 2). Pro hodnocení citlivosti / rezistence bakterií izolovaných z ryb k ostatním antimikrobikům je možné vycházet pouze ze zjištěných hodnot MIC nebo z publikovaných farmakokinetických a farmakodynamických hodnot pro ryby, jsou-li stanoveny.

Celosvětově je k léčbě bakteriálních onemocnění ryb v produkčním rybnářství povoleno používat pouze málo přípravků obsahujících antimikrobika (v České republice jsou to jen léčiva obsahující oxytetracyklin), ale k léčbě okrasných a akvarijních ryb je využíváno i léčiv obsahujících další antimikrobika.

Tabulka 2: Interpretační kritéria pro izoláty *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (inkubace při 22±2 °C po dobu 44-48 hodin)

	MIC (mg/l)			Cutoff (mg/l)	
	C	I	R	WT	NWT
kyselina oxolinová	≤0,125	0,25-0,5	≥1	≤0,125	≥0,25
oxytetracyklin	≤1	2-4	≥8	≤1	≥2
florfenikol	-	-	-	≤4	≥8
ormethoprim/sulfadimethoxin	-	-	-	≤0,5/9,5	≥1/19

Srovnání „novosti postupů“

Set ke stanovení MIC bakteriálních izolátů z ryb obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k antimikrobiálním látkám, které jsou k léčbě ryb povoleny v rámci legislativy ČR, jejich testování je doporučeno ve standardizovaných mezinárodních normách nebo je sledování jejich rezistence k antimikrobiálním látkám důležité z jiných, například epidemiologických důvodů. Vývoj funkčního vzorku vychází z potřeb řešení projektu MŠMT PROFISH nebo má sledování rezistence k vybraným antibiotikům epidemiologicky význam. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí patogenních izolátů z ryb k antimikrobiálním látkám reagují 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

1. CLSI. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document VET04-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2014.
2. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Second Informal Supplement. CLSI document VET03/VET04-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

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