



FUNKČNÍ VZOREK

**Set pro stanovení citlivosti/rezistence klasických
a potencovaných sulfonamidů u bakteriálních
patogenů drůbeže**

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

**6582
2024**

Funkční vzorek 6582/2024

Set pro stanovení citlivosti/rezistence klasických a potencovaných sulfonamidů u bakteriálních patogenů drůbeže

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

**Funkční vzorek byl vyvinut v rámci projektů Ministerstva zemědělství ČR (čísla grantů:
QL24010174 a RO0523)**

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

ISBN 978-80-7672-066-4

Obsah

Cíl metodiky vývoje funkčního vzorku	3
Účel použití	3
Popis výrobku	3
Interpretace výsledků	5
Ověření funkčnosti a kontrola kvality	7
Skladování	7
Exspirace	8
Způsob likvidace	8
Srovnání „novosti postupů“	8
Seznam použité literatury	9

Cíl vývoje funkčního vzorku

Cílem vývoje funkčního vzorku diagnostického setu na stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) klasických a potencionovaných sulfonamidů u bakteriálních patogenů drůbeže byla snaha o vytvoření spolehlivého diagnostického nástroje pro stanovení citlivosti/rezistence těchto bakterií ke klasickým a potencionovým sulfonamidům. Sledování jejich rezistence vychází z potřeb řešení projektu MZE NAZV QL24010174. Diagnostický set, umožňuje jednorázově stanovit MIC dvanácti klasických nebo potencionovaných sulfonamidů mikrodiluční metodou a na základě výsledků MIC vyhodnotit citlivost/rezistenci vyšetřovaného kmene k testovaným antimikrobikům.

Účel použití

Laboratorní *in vitro* stanovení citlivosti/rezistence klinických izolátů patogenů drůbeže mikrodiluční metodou k antimikrobiálním látkám je nezbytné pro efektivní léčbu a významnou měrou přispívá k omezení nežádoucího šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám v bakteriálních populacích. Tento diagnostický set bude používán v průběhu řešení výzkumného projektu NAZV QL24010174.

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 dvanáct navržených antimikrobiálních látek nebo jejich kombinací v objemu 100 µl. U jedenácti antimikrobiálních látek (sloupce 1-11) je na destičce 8 ředění (řádky A-H), ve sloupci 12 je 7 ředění antimikrobiální látky (řádky B – H) a v řádku A je jamka s 100 µl média bez antimikrobiální látky sloužící jako pozitivní kontrola růstu testovaných bakterií (PKR). Koncentrace jednotlivých antimikrobiálních látek nebo jejich kombinací na destičce jsou voleny tak, aby hodnoty MIC vyšetřovaných bakterií

zahrnovaly rozmezí breakpointů nebo derivovaných breakpointů citlivosti pro testované látky a jednotlivé bakteriální patogeny podle závazných mezinárodních metodik Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testiny (EUCAST) nebo programu pro sledování rezistencí bakterií k antimikrobikům v Kanadě (CIPARS) a rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů testovaných v rámci kontroly kvality (Tab. 1).

Tab. 1: Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u patogenů drůbeže pro klasické a potencované sulfonamidy

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SDZT	SDZO	SMTT	SMT0	SDMT	SDMO	SMXT	SMXO	SDZ	SMT	SDM	SMX
A	32	32	32	32	32	32	32	32	1024	1024	1024	PKR
B	16	16	16	16	16	16	16	16	512	512	512	1024
C	8	8	8	8	8	8	8	8	256	256	256	512
D	4	4	4	4	4	4	4	4	128	128	128	256
E	2	2	2	2	2	2	2	2	64	64	64	128
F	1	1	1	1	1	1	1	1	32	32	32	64
G	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	16	16	16	32
H	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	8	8	8	16

1. SDZT trimethoprim/sulfadiazin (1/19)*
2. SDZO ormethorim/sulfadiazin (1/19)**
3. SMTT trimethoprim/sulfametazin (1/19)*
4. SMT0 ormethorim/sulfametazin (1/19)**
5. SDMT trimethoprim/sulfadimethoxin (1/19)*
6. SDMO ormethorim/sulfadimethoxin (1/19)**
7. SMXT trimethoprim/sulfamethoxazol (1/19)*
8. SMXO ormethorim/sulfamethoxazol (1/19)**
9. SDZ sulfadiazin
10. SMT sulfametazin
11. SDM sulfadimethoxin
12. SMX sulfamethoxazol

PKR pozitivní kontrola růstu

*Koncentrace uvedená v tabulce platí pro trimethoprim

**Koncentrace uvedená v tabulce platí pro ormethoprim

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

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

Interpretace výsledků

Interpretace výsledků do kategorií citlivosti vyžaduje použití tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek (EUCAST, CLSI). Klinické breakpointy pro klasické sulfonamidy byly stanoveny podle hodnot cutoff (EUCAST) a odpovídají i interpretačním kritériím pro klasické sulfonamidy podle programu sledování bakteriálních rezistencí v Kanadě (CIPARS) pro sulfisoxazol. Breakpointy pro potencionované sulfonamidy byly odvozeny od breakpointů pro trimethoprim/sulfamethoxazol podle 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 rod *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Streptococcus* nebo *Staphylococcus* (Tab. 2, 3 a 4). Vzhledem k tomu, že breakpointy u příslušných patogenů většinou nejsou přímo pro drůbež definovány, byly derivovány z humánních interpretačních kritérií. Breakpointy rozdělují bakteriální izoláty na citlivé, intermediální a rezistentní.

Tab. 2: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Enterobacterales* a *Staphylococcus* spp.
(mg/l)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SDZT	SDZO	SMTT	SMT0	SDMT	SDMO	SMXT	SMXO	SDZ	SMT	SDM	SMX
A	32	32	32	32	32	32	32	32	1024	1024	1024	PKR
B	16	16	16	16	16	16	16	16	512	512	512	1024
C	8	8	8	8	8	8	8	8	256	256	256	512
D	4	4	4	4	4	4	4	4	128	128	128	256
E	2	2	2	2	2	2	2	2	64	64	64	128
F	1	1	1	1	1	1	1	1	32	32	32	64
G	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	16	16	16	32
H	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	8	8	8	16

Citlivý, rezistentní

Tab. 3: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Enterococcus* spp. (mg/l)

	SDZT	SDZO	SMTT	SMT0	SDMT	SDMO	SMXT	SMXO	SDZ	SMT	SDM	SMX
A	32	32	32	32	32	32	32	32	1024	1024	1024	PKR
B	16	16	16	16	16	16	16	16	512	512	512	1024
C	8	8	8	8	8	8	8	8	256	256	256	512
D	4	4	4	4	4	4	4	4	128	128	128	256
E	2	2	2	2	2	2	2	2	64	64	64	128
F	1	1	1	1	1	1	1	1	32	32	32	64
G	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	16	16	16	32
H	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	8	8	8	16

Citlivý, rezistentní

Tab. 2: Breakpointy antimikrobiálních látek pro *Streptococcus* spp. (mg/l)

	SDZT	SDZO	SMTT	SMT0	SDMT	SDMO	SMXT	SMXO	SDZ	SMT	SDM	SMX
A	32	32	32	32	32	32	32	32	1024	1024	1024	PKR
B	16	16	16	16	16	16	16	16	512	512	512	1024
C	8	8	8	8	8	8	8	8	256	256	256	512
D	4	4	4	4	4	4	4	4	128	128	128	256
E	2	2	2	2	2	2	2	2	64	64	64	128
F	1	1	1	1	1	1	1	1	32	32	32	64
G	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	16	16	16	32
H	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	8	8	8	16

Citlivý, rezistentní

1. SDZT trimethoprim/sulfadiazin (1/19)*
2. SDZO ormethorim/sulfadiazin (1/19)**
3. SMTT trimethoprim/sulfametazin (1/19)*
4. SMT0 ormethorim/sulfametazin (1/19)**
5. SDMT trimethoprim/sulfadimethoxin (1/19)*
6. SDMO ormethorim/sulfadimethoxin (1/19)**
7. SMXT trimethoprim/sulfamethoxazol (1/19)*
8. SMXO ormethorim/sulfamethoxazol (1/19)**
9. SDZ sulfadiazin
10. SMT sulfametazin
11. SDM sulfadimethoxin
12. SMX sulfamethoxazol

PKR pozitivní kontrola růstu

*Koncentrace uvedená v tabulce platí pro trimethoprim

**Koncentrace uvedená v tabulce platí pro ormethoprim

Ověření funkčnosti a kontrola kvality

Funkčnost vyvíjeného setu byla ověřena stejným způsobem jako je prováděna pravidelná týdenní kontrola kvality vyrobených setů do doby expirace testováním kontrolních kmenů *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, které jsou přesně definovány a mají stanovené rozmezí hodnot MIC pro klasické (sulfisoxazol) a potencované (trimethoprim/sulfamethoxazol) sulfonamidy (CLSI a EUCAST). Stanovené hodnoty MIC pro klasické i potencované sulfonamidy musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC referenčních kmenů dle CLSI a EUCAST – viz Tab. 5.

Tab. 5: Rozmezí MIC (mg/l) u referenčních kmenů pro klasické i potencované sulfonamidy

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
klasické sulfonamidy	8 - 32	32 - 128	32 - 128	není stanoveno
potencované sulfonamidy	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	≤0,5/9,5	0,12/2,4 – 1/19

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.

Srovnání „novosti postupů“

Set ke stanovení MIC klasických a potencovaných sulfonamidů u bakteriálních patogenů drůbeže obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů – patogenů drůbeže a dlouhodobé sledování trendů rozvoje jejich rezistence k sulfonamidům klasickým i potencovaným. Set byl sestaven pro potřeby řešení projektu NAZV QL24200174, ale může být využit na různých úrovních monitoringu vývoje a šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám. Umožňuje jako jediný na trhu sledování klasických sulfonamidů. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí klasických a potencovaných sulfonamidů jsou zcela v souladu s celospolečenskou snahou o tlumení rozvoje antimikrobiálních rezistencí a obezřetné používání antimikrobik. Je novým diagnostickým nástrojem pro cílenou a efektivní léčbu ve veterinární pomoci sulfonamidů, který může v současnosti dostupným podobným výrobkům konkurovat kvalitou provedení, originalitou a příznivou cenou.

Seznam použité a související literatury

CLSI, 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; 4th ed. Approved standards. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI, 2024. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; 7th ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute.

EUCAST - Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Version 5.13. [Database online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [cit. 2024-11-27].

Available in <<http://www.eucast.org/>>

CIPARS, 2018. Canadian integrated program for antimicrobial resistance surveillance, [cit. 2024-11-27].

Available in: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/drugs-health-products/cipars-2018-annual-report-design-methods.html>.



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