



Preskušanje protimikrobne občutljivosti najpogostejših bakterij, ki povzročajo mastitis, s pomočjo disk difuzijske metode

Metoda opisana v tem protokolu temelji na evropski disk difuzijski metodi EUCAST.

Kriteriji za razlago, ki se nahajo v Dodatku 2 so klinično mejne vrednosti, prikazane v tabeli na spletni strani Wageningen Bioveterinary Research (WBVR), National Reference Laboratory (NRL) za protimikrobno odpornost pri živalih. Ta tabela vsebuje mednarodno sprejete kriterije, ki jih je objavil EUCAST in so dopolnjeni s kriteriji dokumentov CLSI.

Priprava

Za spremljanje uspešnosti testiranja, vsak dan rutinskega testiranja izolatov, dodatno testirajte ustrezne kontrolne seve (Dodatek 1).

Materiali

- Običajen laboratorijski material in oprema
- Stresalnik Vortex
- Denzitometer (če je možno) ali 0,5 McFarland standard
- Pinceta ali dozator
- Kljunasto merilo
- Sterilne vatirane palčke
- Sterilne zanke (1 µl)
- Sterilna fiziološka raztopina: 0,85% raztopina NaCl v vodi (8,5 g/l)
- MH, Mueller Hinton (MH) agar
- MH + 5% mehansko defibrinirane konjske krvi + 20 mg/l β-NAD (MH-F)
- Papirnati diski s protimikrobnimi sredstvi, glejte Dodatek 2
- Kontrolni sevi:
 - *Staphylococcus aureus* ATCC29213 (za grampozitivne bakterije na MH agarju)
 - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (za grampozitivne bakterije na MH-F agarju)
 - *Escherichia coli* ATCC25922 (za gramnegativne bakterije na MH agarju)

Postopek

Priprava inokuluma

- Suspendirajte 3-5 kolonij čez noč na gojišču na neselektivnem agarju v sterilni fiziološki raztopini (0,85% raztopina NaCl v vodi (8,5 g/l)) (Dodatek 3, slika 1A in 1B);
- Zmešajte na Vortex stresalniku;
- Prilagodite motnost enakovredno 0,5 McFarlandovega standarda (Dodatek 3, slika 2).

Inokulacija in inkubacija agarne plošč

- Namočite sterilno vatirano palčko v 0,5 McFarlandovo suspenzijo (Dodatek 3, slika 3);
- V primeru gramnegativnih bakterij, odstranite odvečno tekočino s pritiskom in obračanjem zanke proti notranji steni epruvete. V primeru grampozitivnih bakterij ne pritiskajte in obračajte zanke;
- V 15 minutah po pripravi 0,5 McFarlandove suspenzije, inokulum raznesete po celotni površini agarja, tako da z zanko naredite standardni vzorec, da vsak del agarja zajamete dvakrat, vsakokrat od sredine agarja proti zunanji strani (glejte sliko 1 in Dodatek 3, slika 4). Tabela 1 povzema agarje in pogoje inkubacije priporočljive za testiranje protimikrobne občutljivosti bakterij, ki povzročajo mastitis.
- V 15 minutah po inokulaciji agarja nanesite diske (glejte Dodatek 2 za priporočene plošče) na agar s pomočjo pincete ali dozatorja (Dodatek 3, slika 5A). Diski morajo biti v tesnem stiku z agarjem in se jih ne sme premakniti, potem ko se jih nanese na agar;
- V 15 minutah po nanosu diskov, prenesite inokulirano agar ploščo z diski na temperaturo 35 ± 1 °C za 18 ± 2 uri.

Tabela 1: Agarji in pogoji inkubacije, ki se priporočajo za testiranje protimikrobne občutljivosti najpogostejših bakterij, ki povzročajo mastitis.

MH ^a	MH-F ^b
<i>Enterobacteriaceae</i> , v zraku, 35 ± 1 °C 18 ± 2 uri	<i>Streptococcus</i> spp., v zraku, 35 ± 1 °C 18 ± 2 ur
<i>Staphylococcus</i> spp., v zraku, 35 ± 1 °C 18 ± 2 uri	

^aMH, Mueller hinton agar;

^bMH-F, MH + 5% mehansko defibrinirane konjske krvi + 20 mg/l β-NAD.



Slika 1: Inokulacija agarne plošče za disk difuzijo.

Pregled plošč in interpretacija rezultatov

- Preverite, ali je rast konfluentna in enakomerno porazdeljena po celotni površini agarja. Če ni, oziroma so prisotne posamezne kolonije in neenakomerne krožne cone inhibicije, ponovite test;
- S kljunastim merilom najprej izmerite premer cone inhibicije (mm) za seve za nadzor kakovosti in preverite, ali so cone inhibicije znotraj sprejemljivih razponov (Dodatek 1);
- Če je odgovor pritrdilen, potem izmerite cono inhibicije za rutinske izolate (Dodatek 3, slika 6);
- Interpretirajte premere con inhibicij v kategorije po občutljivosti (S, občutljiv; I, srednje občutljiv; R, rezistenten) glede na mejne vrednosti, navedene v Dodatku 2, in v skladu z povzetimi informacijami iz Dodatka 4.



CONNECTED BY CARE®

Viri

- <http://www.eucast.org/>
- <https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksinstituten/Bioveterinary-Research/Diergezondheid/Antibioticaresistentie-1/Gevoeligheidstest-antibiotica.htm>

Dodatek 1
Kontrolni sevi

***Staphylococcus aureus* ATCC29213**

Antibiotik	Vsebnost diska	Cilj (mm)	Razpon (mm)
Penicilin	1 Enota	15	12 - 18
Cefoksitin	30 µg	27	24 - 30
Trim/sulfa	1,25-23,75 µg	29	26 - 32
Klindamicin ^a	2 µg	26	23 - 29
Eritromicin ^a	15 µg	26	23 - 29
Kanamycin	30 µg	NA ^a	NA
Neomicin	10 µg	NA	NA

***Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619**

Antibiotik	Vsebnost diska	Cilj (mm)	Razpon (mm)
Penicilin	1 Enota	19	16 - 22
Trim/sulfa	1,25-23,75 µg	22	18 - 26
Klindamicin	2 µg	25	22 - 28
Eritromicin	15 µg	29	26 - 32

***Escherichia coli* ATCC25922**

Antibiotik	Vsebnost diska	Cilj (mm)	Razpon (mm)
Ampicilin	10 µg	18 - 19	15 - 22
Cefotaksim	5 µg	28	25 - 31
Trim/sulfa	1,25-23,75 µg	26	23 - 29
Enrofloksacin	5 µg	NA	NA
Kanamycin	30 µg	NA	NA
Neomicin	10 µg	NA	NA

^aNA, ni na voljo.

Dodatek 2

Priporočene preskusne plošče in kategorije občutljivosti za patogene, ki so glavni povzročitelji mastitisa

Staphylococcus aureus - Gram pozitiven obroč iz papirja

Antibiotik	Vsebnost diska	Premer cone inhibicije (mm)		
		S (\geq)	I	R (<)
Penicilin	1 Enota	26	-	26
Cefoksitin	30 μ g	22	-	22
Trim/sulfa	1,25-23,75 μ g	17	14 - 16	14
Klindamicin ^a	2 μ g	22	19 - 21	19
Eritromicin ^a	15 μ g	21	18 - 20	18
Kanamycin	30 μ g	18	14 - 17	14
Neomicin	10 μ g	14	-	14

Koagulaza negativni stafilokoki - Gram pozitiven obroč iz papirja

Antibiotik	Vsebnost diska	Premer cone inhibicije (mm)		
		S (\geq)	I	R (<)
Penicilin	1 Enota	26	-	26
Cefoksitin	30 μ g	25	-	25
Trim/sulfa	1,25-23,75 μ g	17	14 - 16	14
Klindamicin ^a	2 μ g	22	19 - 21	19
Eritromicin ^a	15 μ g	21	18 - 20	18
Kanamycin	30 μ g	18	14 - 17	14
Neomicin	10 μ g	14	-	14

Streptokoki - Gram pozitiven obroč iz papirja

Antibiotik	Vsebnost diska	Premer cone inhibicije (mm)		
		S (\geq)	I	R (<)
Penicilin	1 Enota	18	-	18
Trim/sulfa	1,25-23,75 μ g	18	15 - 17	15
Klindamicin ^b	2 μ g	17	-	17
Eritromicin ^b	15 μ g	21	18 - 20	18

Escherichia coli & Klebsiella spp. - Gram negativen obroč iz papirja

Antibiotik	Vsebnost diska	Premer cone inhibicije (mm)		
		S (\geq)	I	R (<)
Ampicilin ^c	10 μ g	14	-	14
Cefotaksim	5 μ g	20	-	20
Trim/sulfa	1,25-23,75 μ g	16	13 - 15	13
Enrofloksacin	5 μ g	23	17 - 22	17
Kanamicin	30 μ g	18	14 - 17	14
Neomicin	10 μ g	12	-	12

^aDiske postavite 12–20 mm narazen (D-test: če je eritromicin R in je prisotno zožanje cone inhibicije okrog diska s klindamicinom, ki je blizu diska z eritromicinom (nastane cona inhibicije v obliki črke D), poročajte rezultat za klindamicin kot R, ne glede na premer cone inhibicije klindamicina);

^bDiske postavite 12-16 mm narazen (D-test: glejte pod ^a);

^c*Klebsiella* spp. so naravno odporni na ampicilin.

Dodatek 3



Slike postopka

1A



1B



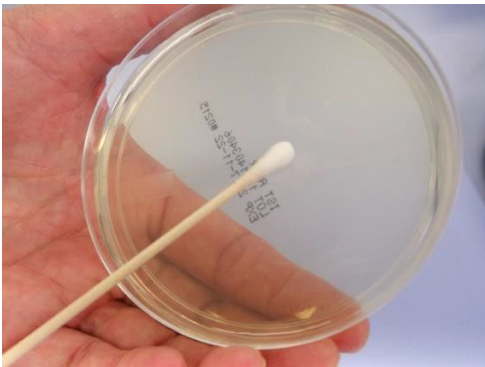
2



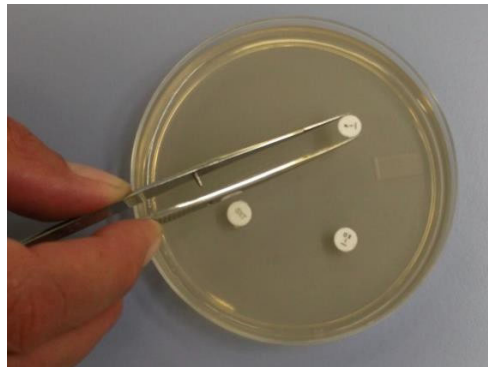
3



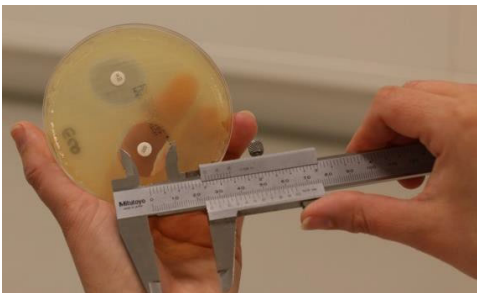
4



5



6



Interpretacija rezultatov preskusov protimikrobne občutljivosti patogenov, ki so glavni povzročitelji mastitisa

Interpretacija	
Stafilokoki - β-laktami	<ul style="list-style-type: none"> • Če je premer cone inhibicije penicilina ≥ 26 mm IN so robovi cone ostri, poročajte kot R (proizvajalec penicilinaze) <p>Penicilin S in cefoksitin S:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ vsi β-laktami S <p>Penicilin R in cefoksitin S:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ penicilini (pen/amoks/ampi) R ➤ vsi plosintetični penicilini (npr. kloksacilin in nafcilin), amoksicilin-klavulanska kislina in vsi cefalosporini S <p>Penicilin S ali R in cefoksitin R^a:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ vsi β-laktami R^b (vključno s cefalosporini)
Stafilokoki & streptokoki-D-test	<ul style="list-style-type: none"> • Test inducibilne odpornosti na linkozamid (D-test) (glejte Dodatek 2) <p>Eritromicin R in klindamicin S in D-test pozitiven:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Eritromicin R in klindamicin R, ne glede na premer cone klindamicina
<i>Escherichia coli</i> & <i>Klebsiella</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> je naravno rezistentna na (benzil)penicilin • <i>Klebsiella</i> spp. so naravno rezistentne na (benzil)penicilin in ampicilin <p>Ampicilin S in cefotaksim S:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ vsi β-laktami S <p>Ampicilin R in cefotaksim S:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ amoksicilin, ampicilin in 1. generacija cefalosporinov R ➤ amoksicilin-klavulanska kislina, 3. in 4. generacija cefalosporinov S <p>Ampicilin R in cefotaksim R:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ vsi β-laktami R (priporočilo: ne uporabljajte amoksicilin-klavulanske kisline)

^aIndikativno za prisotnost gena *mecA* (MRSA, *mecA*-pozitivni *Staphylococcus aureus*);

^bRazen na anti-MRSA cefalosporine, razvite za uporabo v humani medicini (ceftobiprol in ceftarolin);

^cNi narejena razlika med ESBL- in AmpC- proizvajalci.