

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 427

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36793**
(22) Přihlášeno: **23.10.2019**
(47) Zapsáno: **03.12.2019**

- (73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
- (72) Původce:
MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D., Brno, Jundrov,
CZ
MVDr. Josef Krejčí, Brno, Královo Pole, CZ
RNDr. Ivana Huvarová, Kuřim, CZ
MVDr. Katarína Matiašková, Brno, Lesná, CZ
Eva Audová, Brno, Slatina, CZ
Romana Ondriašková, Veverská Bítýška, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:
**Souprava k diagnostice antibiotických
rezistencí veterinárních bakteriálních
patogenů**

CZ 33427 U1

Souprava k diagnostice antibiotických rezistencí veterinárních bakteriálních patogenů

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení poskytuje diagnostickou soupravu pro laboratorní zjišťování citlivosti nebo rezistence bakteriálních patogenů k antimikrobiálním látkám mikrodiluční metodou prostřednictvím stanovení minimálních inhibičních koncentrací antibiotik.

10

Dosavadní stav techniky

Jedním z nejzávažnějších úkolů, před nimiž jak veterinární, tak i humánní medicína stojí, je snaha o omezení nadměrného, a často i zcela zbytečného, užívání antibiotik, zvláště širokospektrých antibiotik, vyšších generací. Tato neblahá praxe má za následek rychlý rozvoj rezistencí a ztrátu léčebné účinnosti. Jednou z cest podporujících výše uvedenou snahu je testování citlivosti konkrétních patogenních mikroorganismů vyskytujících se v určitých chovech nebo populacích. Podle jejich aktuální citlivosti (určené na základě stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) vyšetřovaných antibiotik) je pak vybráno účinné antibiotikum a stanoven režim léčby. MIC je možné stanovit několika uznávanými metodikami, které jsou jmenovány v platných mezinárodních normách vydávaných například European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, VETCAST) nebo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) v USA. Jsou to agarové diluční metody, diluční metody prováděné v tekutých médiích nebo komerční testy – např. E-test. Pro usnadnění rutinního provádění testování citlivosti / rezistence bakterií k antibiotikům jsou vyvíjeny různé diagnostické soupravy. V laboratořích největší uplatnění nachází soupravy na stanovení MIC antibiotik pro různé patogeny mikrodiluční metodou. Jsou výrobci dodávány na trh v zamražené nebo lyofilizované formě.

Soupravy určené pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací antibiotik, používaných k léčbě infekcí vyvolaných bakteriemi v lyofilizované modifikaci již tedy existují, avšak jsou vyráběny téměř výhradně pro potřeby humánní medicíny, a jejich aplikace na veterinární patogeny není zcela možná. Je to především z důvodu volby testovaných antibiotik, která se v mnoha případech ve veterinární medicíně k léčbě různých druhů zvířat nepoužívají, nebo je jejich použití přímo zakázáno. Proto jejich použitím nejsou získány relevantní výsledky, které by bylo možné použít při stanovení léčebného režimu u zvířat. Humánní lyofilizované soupravy jsou zejména vyráběny ve Spojených státech. Nicméně, podobné soupravy vyrábějí i někteří evropští výrobci (např. BoiMeriaux); dokonce Lachema ERBA podobné sety nabízí. Pokud jde o výrobu lyofilizovaných mikrodilučních MIC souprav k testování antibiotické citlivosti mikroorganismů běžných ve veterinární medicíně, na tomto poli existuje diametrálně odlišná situace. Podle dostupných informací v Evropě neexistuje výrobce podobných souprav. V USA výrobci lyofilizovaných veterinárních souprav pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací antibiotik existují, jedná se však jen o menší lokální podniky. Přesto, že technologie lyofilizace antibiotik je známa již řadu let, její modifikace pro mikrotitrační destičky je spojena s řadou obtíží vyplývajících z práce s malými objemy. Řešení těchto problémů je jistě možné, není však běžně zveřejňováno, neboť je součástí podnikového „know how“, které si každý výrobce pečlivě hlídá. Všechny dosud vyráběné soupravy obsahují pouze lyofilizované roztoky antibiotik, která musí být před použitím rozpuštěna ve speciálních kultivačních médiích, která jsou v ojedinělých případech dodávána spotřebiteli spolu se soupravami na stanovení minimálních inhibičních koncentrací antibiotik, ale v naprosté většině případů i spotřebitelé před použitím lyofilizovaných souprav musí růstová média pro vyšetřované bakterie připravovat sami, nezávisle na dodaných diagnostických soupravách.

Předkládané technické řešení si klade za cíl poskytnout takovou diagnostickou soupravu, která by umožnila snadnou detekci a odstranila časovou i materiální náročnost testování se v současné době dostupnými diagnostickými soupravami.

55

Podstata technického řešení

5 Předmětem technického řešení je souprava k diagnostice antibiotických rezistencí veterinárních bakteriálních patogenů, která obsahuje vícejamkovou destičku, kde alespoň jedna jamka obsahuje alespoň jedno antibiotikum a složky růstového média pro bakteriální patogeny, přičemž antibiotikum a složky růstového média jsou v suchém stavu.

10 Antibiotika mohou být vybrána ze skupiny zahrnující aminoglykosidy, amfenikoly, cefalosporiny, diterpeny, fluorochinolony, glykopeptidy, karbapenemy, linkosamidy, makrolidy, peniciliny, polypeptidy, sulfonamidy a tetracykliny.

15 S výhodou několik jamek vícejamkové destičky obsahuje antibiotika a složky růstového média, přičemž antibiotika jsou různá a/nebo jsou obsažena v různých množstvích, a alespoň jedna jamka obsahuje pouze složky růstového média.

20 S výhodou jsou antibiotika vybrána ze skupiny zahrnující tetracyklin, doxycyklin, penicilin, ampicilin, amoxicilin, kyselina klavulanová, ceftiofur, enrofloxacin, florfenikol, tilmikosin, tulathromycin, tiamulin, trimethoprim, sulfamethoxazol, a jejich kombinace.

25 Suchými složkami růstového média jsou s výhodou suché složky Mueller-Hintonova bujónu s upravenou koncentrací kationtů Ca^{2+} a Mg^{2+} (známého jako CAMHB, koncentrace Ca^{2+} v tomto médiu je 20 až 25 mg/L a Mg^{2+} 10 až 12,5 mg/L), nebo suché složky Mueller-Hintonova bujónu s upravenou koncentrací kationtů Ca^{2+} a Mg^{2+} obohaceného o lyzovanou koňskou krev a růstový faktor V (NAD = nikotinamidadenindinukleotid).

S výhodou jsou antibiotika a suché složky médií lyofilizované.

30 Vícejamkovou destičkou může být mikrotitrační vícejamková destička.

35 Souprava na diagnostiku rezistencí veterinárních bakteriálních patogenů k antibiotikům, která je předmětem užitého vzoru, je v současné době jedinečná tím, že obsahuje ryze veterinární antibiotika, která jsou používána k léčbě zvířat a tato antibiotika jsou s výhodou lyofilizovaná současně s růstovým médiem.

40 Suché složky (antibiotikum společně s médiem) obsažené v jamkách uvedené soupravy jsou při použití rozpouštěny jen ve sterilní destilované vodě, která je v diagnostických laboratořích běžně dostupná bez složité přípravy. Uživatel tedy nemusí připravovat či zajišťovat růstové médium. Takto připravené diagnostické sety pro přímé použití jsou pro spotřebitele výhodné zejména jednoduchostí použití bez nároků na přípravu vyšetření, zkrácením doby provedení vyšetření a v neposlední řadě zaručují menší variabilitu výsledků vyšetření jednotným složením souprav tak, aby výsledky nemohly být ovlivněny kvalitou kultivačního média, která může být v jednotlivých laboratořích různá.

45 Diagnostické soupravy podle předkládaného technického řešení se připravují tak, že se připraví roztoky antibiotik v růstovém médiu v různých koncentracích, a ty se nanesou do jamek vícejamkové destičky, a následně se odpaří voda, s výhodou lyofilizací.

50 Důležitým krokem v přípravě diagnostických souprav podle technického řešení je dokonalé odpaření vody z nanesených roztoků antibiotik v růstovém médiu. Dokonalého a velmi šetrného vysušení se dosáhne lyofilizací neboli vymrazováním. Při lyofilizaci se odpařuje voda ze zmrzlého materiálu, aniž by přešel do kapalné fáze. Při snížení tlaku v komoře lyofilizátoru zůstává zmrzlá kapalina v pevném skupenství i při teplotě nad bodem mrazu. Tím se značně urychlí odpařování vody. Pro každou vysušovanou látku je nutné najít optimální podmínky

podtlaku a teploty v komoře přístroje. Na tom pak závisí délka doby vysušování. Pokud jsou vzorky důkladně předmrazeny, nastává první fáze sušení. Pomocí vakuové pumpy je snižován tlak při zachování teploty poličky přístroje pod bodem mrazu. V druhé fázi sušení se zvýší teplota komory přístroje nad bod mrazu a zmrzlá tekutina rychle sublimuje.

5

Příklady uskutečnění technického řešení

Souprava na stanovení minimálních inhibičních koncentrací antibiotik, na základě, kterých lze stanovovat citlivost nebo rezistenci bakterií k antibiotikům, je mikrotitrační destička s 96 jamkami, která má 12 sloupců (1 až 12) a 8 řádků (A až H). Ve 12 sloupcích jsou v jednotlivých jamkách přesně stanovené koncentrace dvanácti antibiotik nebo jejich kombinací (v každém sloupci jedno antibiotikum), jamka A12 neobsahuje žádné antibiotikum a slouží jako pozitivní kontrola růstu testovaného bakteriálního kmenu (Tabulka 1). Jednotlivé koncentrace antibiotik byly připraveny jejich rozpuštěním ve speciálně upraveném růstovém médiu. Pro růstově nenáročnou bakterie se jedná o 10x koncentrovaný Mueller-Hinton bujón s upravenou koncentrací kationtů Ca^{2+} a Mg^{2+} (CAMHB), pro růstově náročnou bakterie je tato půda obohacena o lyzovanou koňskou krev a růstový faktor V (NAD = nikotinamidadenin dinukleotid). Z důvodu optimálního průběhu následné lyofilizace je k médiu přidáván dimethylpolysiloxan a manitol. Počáteční koncentrace jednotlivých antibiotik na destičce jsou rozdílné a jsou voleny tak, aby bylo možné zjištěné minimální koncentrace vyhodnotit podle mezinárodně uznávaných interpretačních kritérií, které bakterie rozdělují na citlivé, intermediární a rezistentní k vyšetřovaným antibiotikům. K použití se destička připraví přidáním pracovního objemu 100 μl sterilní destilované vody do každé jamky, umožňující rozpustit lyofilizované antibiotikum s růstovým médiem.

25

Tabulka 1: Umístění antibiotik a jejich koncentrace (mg/l) v destičce po rozpuštění lyofilizátu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	TET	DOX	PEN	AMP	AMC	EFT	ENR	FFC	TIL	TUL	TIA	SXT
A	64	32	16	32	32	32	8	64	128	128	64	PKR
B	32	16	8	16	16	16	4	32	64	64	32	8
C	16	8	4	8	8	8	2	16	32	32	16	4
D	8	4	2	4	4	4	1	8	16	16	8	2
E	4	2	1	2	2	2	0,5	4	8	8	4	1
F	2	1	0,5	1	1	1	0,25	2	4	4	2	0,5
G	1	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,125	1	2	2	1	0,25
H	0,5	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25	0,06	0,5	1	1	0,5	0,125

30

TET tetracyklin

DOX doxycyklin

PEN penicilin

AMP ampicilin

AMC amoxicilin/kyselina klavulanová 2/1 (koncentrace v tabulce platí pro amoxicilin) AMX

35

amoxicilin; CLA kyselina klavulanová;

EFT ceftiofur

ENR enrofloxacin

FFC florfenikol

TIL tilmikosin

40

TUL tulathromycin

TIA tiamulin

SXT trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19 (koncentrace v tabulce platí pro trimethoprim) TRI = trimethoprim; SUL = sulfamethoxazol

PKR pozitivní kontrola růstau (jamka bez antibiotika)

- 5 *Popis přípravy lyofilizované destičky před lyofilizací:* Ze zásobních koncentrací antibiotik 10 000 mg/L se připravují pracovní koncentrace antibiotik 1 000 mg/L (K 1 000), 10 mg/L (K 10) nebo 2432 mg/L (K 2432) ředěním ve sterilní destilované vodě, ze které se připraví finální
- 10 koncentrace antibiotik - viz popis výrobku a tabulka s koncentracemi antibiotik - v objemu 25 ml do 96 velkých zkumavek (Tabulka 2). Finální koncentrace antibiotik se připravují ředěním v příslušném médiu a jsou aplikovány do příslušných jamek na destičce v objemu 0,01 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 připraveny k lyofilizaci.

Tabulka 2: Objem antibiotik (ml) v jednotlivých jamkách destičky v celkovém objemu 25 ml (poloha jamky na destičce je definována čísly sloupců a písmeny řádků)

	1	2	3	4	5		6
	TET	DOX	PEN	AMP	AMC		EFT
					AMX*	CLA*	
A	K 1000 3,2	K 1000 1,6	K 1000 0,8	K 1000 1,6	K 1000 1,6	K 1000 0,8	K 1000 1,6
B	K 1000 1,6	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 0,8
C	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 0,4
D	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 1000 0,2
E	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 10 5	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 10 5	K 1000 0,1
F	K 1000 0,1	K 10 5	K 10 2,5	K 10 5	K 10 5	K 10 2,5	K 10 5
G	K 10 5	K 10 2,5	K 10 0,25	K 10 2,5	K 10 2,5	K 10 0,25	K 10 2,5
H	K 10 2,5	K 10 0,25	K 10 0,625	K 10 0,25	K 10 0,25	K 10 0,625	K 10 0,25
	7	8	9	10	11	12	
	ENR	FFC	TIL	TUL	TIA	SXT	
TRI*						SUL*	
A	K 1000 0,4	K 1000 3,2	K 1000 6,4	K 1000 6,4	K 1000 3,2	PKR	
B	K 1000 0,2	K 1000 1,6	K 1000 3,2	K 1000 3,2	K 1000 1,6	K 1000 0,4	K 2432 6,4
C	K 1000 0,1	K 1000 0,8	K 1000 1,6	K 1000 1,6	K 1000 0,8	K 1000 0,2	K 2432 3,2
D	K 10 5	K 1000 0,4	K 1000 0,8	K 1000 0,8	K 1000 0,4	K 1000 0,1	K 2432 1,6
E	K 10 2,5	K 1000 0,2	K 1000 0,4	K 1000 0,4	K 1000 0,2	K 10 5	K 2432 0,8
F	K 10 1,25	K 1000 0,1	K 1000 0,2	K 1000 0,2	K 1000 0,1	K 10 2,5	K 2432 0,4
G	K 10 0,625	K 10 5	K 1000 0,1	K 1000 0,1	K 10 5	K 10 1,25	K 2432 0,2
H	K 10 0,31	K 10 2,5	K 10 5	K 10 5	K 10 2,5	K 10 0,625	K 2432 0,1

Příprava zásobních koncentrací antibiotik 10 000 mg/L: Zásobní koncentrace se připraví z antibiotických substancí s vyznačenou aktivitou. Substance se rozpustí ve vhodném rozpustidle, většinou ve vodě, ale v některých případech jsou vhodná jiná rozpustidla (Tabulka 3).
 5 Rozpustidlo jiné, než voda musí být přidáno k substanci v co nejmenším objemu, ve kterém se navážené množství antibiotika rozpustí. Po rozpuštění se přidá potřebné množství ředidla (Tabulka 3).

Tabulka 3: Rozpustidla a ředidla antibiotik

Antibiotikum	Rozpustidlo	Ředidlo
Tetracyklin	Voda	Voda
Doxycyklin	Voda	Voda
Penicilin	Voda	Voda
Ampicilin	0,1 M fosfátový pufr, pH 8	0,1 M fosfátový pufr, pH 8
Amoxicilin	0,1 M fosfátový pufr, pH 6	0,1 M fosfátový pufr, pH 6
Klavulanová kyselina	0,1 M fosfátový pufr, pH 6	0,1 M fosfátový pufr, pH 6
Ceftiofur	Fosfátový pufr, 0,1 mol/l, pH 6	Voda
Enrofloxacin	1/2 objemu vody, pak přidávat NaOH po kapkách do rozpuštění	Voda
Florfenikol	95 % ethanol	Voda
Tilmikosin	95 % ethanol	Voda
Tulathromycin	0,015 M kyselina citronová	Voda (za horka)
Tiamulin	Voda	Voda
Trimethoprim	0,05 mol/l HCl (za horka), do 10 % finálního objemu	Voda (za horka)
Sulfamethoxazol	1/2 objemu horké vody a minimální množství 2,5 mol/l NaOH	Voda

Potřebná navážka antibiotika se vypočítá podle vzorce:

$$\text{Navážka (mg)} = \text{objem (ml)} \times \text{koncentrace (mg/ml)} / \text{aktivita (}\mu\text{g/mg)}$$

Příklad:

Aktivita substance je 920 $\mu\text{g/mg}$. K přípravě 10 ml zásobní koncentrace 10 000 mg/l je zapotřebí navážit 108,69 mg substance ($108,69 = 10 \times 10\,000 / 920$)

Příprava pracovních koncentrací antibiotik:

- Pracovní koncentrace 1 000 mg/l (K 1000): k 1 ml zásobní koncentrace antibiotika 10 000 mg/l se přidá 9 ml vody.
- Pracovní koncentrace 10 mg/l (K 10): k 0,2 ml pracovní koncentrace antibiotika 1000 mg/l se přidá 19,8 ml vody
- Pracovní koncentrace 2432 mg/l (K 2432) – pro SUL: k 121,6 mg sulfamethoxazolu rozpuštěných v minimálním množství rozpustidla se přidá voda do objemu 10 ml a 40 ml CAMHB

Pracovní koncentrace antibiotik se použijí na přípravu jednotlivých koncentrací antibiotik v destičce dle Tabulky 2 v objemu 25 ml ve velkých zkumavkách, do jednotlivých jamek

mikrotitračních destiček se naplní z velké zkumavky 10 µl rozpuštěného a naředěného antibiotika o stanovené koncentraci (Tabulky 1 a 2). Destičky se zamrazí na -80 °C.

Lyofilizace:

5

K vymražení vody z destiček byl použit lyofilizátor Labconco FreeZone Triad Freeze Dry System. Kolektor byl vychlazen na -80 °C, deska komory přístroje na -20 °C. Zmražené testovací destičky se odvíčkují a umístí se do přístroje a zavřou se dvířka. Chladí se na -20 °C po dobu 30 minut, aby bylo jisté, že jsou po manipulaci všechny jamky dokonale zmražené. Pak se zapne vakuová pumpa, která by měla vytvořit tlak minimálně 0,5 mBa nebo i nižší. Teplota -20 °C se udržuje po dobu dalších 30 min. Pak lze teplotu v komoře zvýšit na 8 °C. Za těchto podmínek probíhá sušení další 4 hodiny. V závěru se zvýší teplota na 20 °C na dobu 20 min, aby nedošlo ke kondenzaci vodních par na chladném povrchu destičky. Hned po ukončení lyofilizace se destičky uzavřou aluminiovou fólií.

10

Kontrola funkčnosti a kvality vyrobených šarží lyofilizovaných setů:

Funkčnost a kvalita vyrobených šarží lyofilizovaných setů byla ověřena pravidelným týdenním sledováním a kontrolou kvality u všech vyrobených testovacích šarží. Kontrola byla prováděna testováním kontrolních kmenů *Escherichia coli* ATCC 25922 a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, které jsou přesně definovány a jejich hodnoty MIC k antibiotikům jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI a EUCAST. Hodnoty MIC u jednotlivých antibiotik byly ve sledovaném časovém intervalu vždy v rozmezí definovaných hodnot MIC dle CLSI a EUCAST.

Stanovené rozmezí hodnot MIC kontrolních kmenů *E. coli* a *S. aureus* (mg/l) je vyznačeno v následujících tabulkách pro konkrétní antibiotika v jednotlivých sloupcích silnými čarami (Tabulky 4 a 5). Pokud u některých antibiotik není pro některý z kontrolních kmenů silnými čarami vyznačeno rozmezí hodnot MIC, nejsou v současné době ještě stanoveny hodnoty MIC kontrolního kmene k těmto antibiotikům. Nejčastěji hodnoty MIC u jednotlivých antibiotik, zjišťované pomocí navrhované soupravy, jsou v případech referenčních kmenů vyneseny v tabulkách a jsou vyznačeny tučně a šedou barvou pozadí.

15

Tabulka 4: Rozmezí MIC u kmene *Escherichia coli* ATCC 25922

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	TET	DOX	PEN	AMP	AMC	EFT	ENR	FFC	TIL	TUL	TIA	SXT
A	64	32	16	32	32	32	8	64	128	128	64	PKR
B	32	16	8	16	16	16	4	32	64	64	32	8
C	16	8	4	8	8	8	2	16	32	32	16	4
D	8	4	2	4	4	4	1	8	16	16	8	2
E	4	2	1	2	2	2	0,5	4	8	8	4	1
F	2	1	0,5	1	1	1	0,25	2	4	4	2	0,5
G	1	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,125	1	2	2	1	0,25
H	0,5	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25	0,06	0,5	1	1	0,5	0,125
							≤					

35

Tabulka 5: Rozmezí MIC u kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	TET	DOX	PEN	AMP	AMC	EFT	ENR	FFC	TIL	TUL	TIA	SXT
A	64	32	16	32	32	32	8	64	128	128	64	PKR
B	32	16	8	16	16	16	4	32	64	64	32	8
C	16	8	4	8	8	8	2	16	32	32	16	4

D	8	4	2	4	4	4	1	8	16	16	8	2
E	4	2	1	2	2	2	0,5	4	8	8	4	1
F	2	1	0,5	1	1	1	0,25	2	4	4	2	0,5
G	1	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,125	1	2	2	1	0,25
H	0,5	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25	0,06	0,5	1	1	0,5	0,125

Příklad použití lyofilizované soupravy pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací antibiotik vyšetřované bakteriální kultury (inokula):

- 5 Do všech jamek na destičce se aplikuje 0,1 ml sterilní destilované vody pro rozpuštění lyofilizátu a získání požadovaných koncentrací antibiotik. Aby bylo dosaženo dokonalého rozpuštění antibiotik, musí se obsah jamek v destičce šetrně promíchat na laboratorní třepačce (10 minut) nebo je potřeba obsah jednotlivých jamek promíchat pipetou. Inokulum v objemu 5 μ l se
- 10 naočkuje do všech jamek mikrotitrační destičky tak, aby výsledná koncentrace inokula byla 5×10^5 CFU v jamce. Destičky se opatří víčkem nebo lepicí fólií a inkubují se aerobně při teplotě 34 °C až 37 °C po dobu 18 h \pm 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
- 15 kategorií citlivosti vyžaduje použití interpretačních kritérií, která stanoví mezinárodní normy, vydávané například European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, VETCAST) nebo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) v USA.

20

NÁROKY NA OCHRANU

1. Souprava pro diagnostiku antibiotických rezistencí veterinárních bakteriálních patogenů, **vyznačující se tím**, že obsahuje vícejamkovou destičku, kde alespoň jedna jamka obsahuje alespoň jedno antibiotikum vybrané ze skupiny zahrnující aminoglykosidy, amfenikoly,
- 25 cefalosporiny, diterpeny, fluorochinolony, glykopeptidy, karbapenemy, linkosamidy, makrolidy, peniciliny, polypeptidy, sulfonamidy, tetracykliny, a dále obsahuje složky růstového média pro bakteriální patogeny, přičemž antibiotikum a složky růstového média jsou v suchém stavu.
- 30 2. Souprava podle nároku 1, **vyznačená tím**, že několik jamek vícejamkové destičky obsahuje antibiotika a složky růstového média, přičemž antibiotika jsou různá a/nebo jsou obsažena v různých množstvích, a alespoň jedna jamka obsahuje pouze složky růstového média.
3. Souprava podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že antibiotika jsou
- 35 vybrána ze skupiny zahrnující tetracyklin, doxycyklin, penicilin, ampicilin, amoxicilin, kyselina klavulanová, ceftiofur, enrofloxacin, florfenikol, tilmikosin, tulathromycin, tiamulin, trimethoprim, sulfamethoxazol, a jejich kombinace.
4. Souprava podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že suchými
- 40 složkami růstového média jsou suché složky Mueller-Hintonova bujónu s koncentrací kationtů Ca^{2+} 20 až 25 mg/L a Mg^{2+} 10 až 12,5 mg/L, nebo suché složky Mueller-Hintonova bujónu s koncentrací kationtů Ca^{2+} 20 až 25 mg/L a Mg^{2+} 10 až 12,5 mg/L, obohaceného o lyzovanou koňskou krev a růstový faktor V.
- 45 5. Souprava podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že jsou antibiotika a suché složky médií lyofilizované.

6. Souprava podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že vícejamkovou destičkou je mikrotitrační vícejamková destička.