

## Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti najčešćih bakterija uzročnika mastitisa pomoću disk difuzijske metode



Metoda koja je opisana u ovom protokolu temelji se na europskoj disk difuzijskoj metodi EUCAST-a. Kriteriji tumačenja koji se nalaze u Dodatku 2 su kliničke prijelomne točke prikazane u tablici na internetskoj stranici Wageningen Bioveterinary Research (WBVR), National Reference Laboratory (NRL) za antimikrobnu rezistenciju u životinja. Tablica sadrži međunarodno prihvaćene kriterije koje je objavio EUCAST te su nadopunjene kriterijima iz CLSI dokumenata.

### Priprema

Za praćenje izvedbe ispitivanja, svakog dana rutinskog ispitivanja izolata, dodatno testirajte odgovarajuće kontrolne sojeve (Dodatak 1).

### Materijali

- Uobičajeni laboratorijski materijali i oprema
- Magnetska miješalica
- Denzitometar (ako je moguće) ili 0.5 McFarland standard
- Pinceta ili dozator
- Pomična mjerka
- Sterilni štapići s vatom
- Sterilni prstenovi (1  $\mu$ l)
- Sterilna fiziološka otopina: 0.85% otopina NaCl u vodi (8.5 g/L)
- MH, Mueller Hinton (MH) agar
- MH + 5% mehanički defibrinirane konjske krvi + 20 mg/L  $\beta$ -NAD (MH-F)
- Papirnati diskovi s antimikrobnim sredstvima, vidi Dodatak 2
- Kontrolni sojevi:
  - *Staphylococcus aureus* ATCC29213 (za Gram pozitivne bakterije na MH agar)
  - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (za Gram pozitivne bakterije na MH-F agar)
  - *Escherichia coli* ATCC25922 (za Gram negativne bakterije na MH agar)

### Postupak

#### Priprema inokuluma

- Suspendirajte 3-5 kolonija na kulturi ostavljenoj preko noći na neselektivnom agaru u sterilnoj fiziološkoj otopini (0.85% otopina NaCl u vodi (8.5 g/L)) (Dodatak 3, slika 1A i 1B)
- Miješajte na magnetskoj miješalici;
- Prilagodite mutnoću jednaku onoj 0.5 McFarland standarda (Dodatak 3, slika 2).



### Inokulacija i inkubacija agar pločica

- Umočite sterilni vateni štapić u 0.5 McFarland suspenziju (Dodatak 3, slika 3);
- U slučaju Gram negativne bakterije, uklonite višak tekućine pritiskom i okretanjem štapića o unutarnje stjenke epruvete. U slučaju Gram pozitivne bakterije nemojte pritiskati i okretati štapić;
- U roku od 15 minuta nakon pripreme 0.5 McFarlandove suspenzije, inokulum ravnomjerno rasporedite po cijeloj površini agara, povlačeći štapić u standardnom uzorku, tako da svaki dio agara bude dvaput prošaran, svaki put počevši od sredine agara prema van (vidi sliku 1 i Dodatak 3, slika 4). Tablica 1. sažima uvjete inkubacije i agara koji se preporučuju za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti bakterija uzročnika mastitisa.
- U roku od 15 minuta nakon inokulacije agara, stavite diskove (vidi Dodatak 2 za preporučene ploče) na agar pomoću pincete ili dozatora (Dodatak 3, slika 5A). Disk mora dobro prijanjati uz agar i ne smije se micati jednom kada se stavi na agar;
- U roku od 15 minuta nakon stavljanja diska, premjestite inokuliranu agar pločicu sa diskom na temperaturu od  $35 \pm 1$  °C u trajanju od  $18 \pm 2$  sati.

**Tablica 1. Uvjeti inkubacije i agara koji se preporučuju za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti najčešćih bakterija uzročnika mastitisa.**

MH <sup>a</sup>	MH-F <sup>b</sup>
<i>Enterobacteriaceae</i> , u zraku, $35 \pm 1$ °C $18 \pm 2$ sati	<i>Streptococcus</i> spp., u zraku, $35 \pm 1$ °C $18 \pm 2$ sati
<i>Staphylococcus</i> spp., u zraku, $35 \pm 1$ °C $18 \pm 2$ sati	

<sup>a</sup>MH, Mueller Hinton agar;

<sup>b</sup>MH-F, MH + 5% mehanički defibrinirane konjske krvi + 20 mg/L β-NAD



**Slika 1. Inokulacija agar pločica za disk difuziju.**

### Pregled pločica i interpretacija rezultata

- Provjerite da li je rast konfluentan i ravnomjerno raspoređen preko cijele površine agara. Ako nije, odnosno prisutne su pojedinačne kolonije i nejednolike kružne zone inhibicije, ponovite test;
- Pomičnom mjerkom prvo izmjerite promjer zone inhibicije (mm) za sojeve za kontrolu kvalitete i provjerite da li su zone inhibicije unutar prihvatljivog raspona (Dodatak 1);
- Ako jesu, zatim izmjerite zone inhibicije za rutinske izolate (Dodatak 3, slika 6);
- Interpretirajte promjere zona u kategorije osjetljivosti (S, osjetljivo; I, srednje osjetljivo; R, rezistentno) prema prijelomnim točkama u Dodatku 2 te u skladu s informacijama čiji se sažetak nalazi u Dodatku 4).

**Izvor**

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



## Dodatak 1 Kontrolni sojevi



### **Staphylococcus aureus ATCC29213**

<b>Antibiotik</b>	<b>Sadržaj diska</b>	<b>Cilj (mm)</b>	<b>Raspon (mm)</b>
Penicilin	1 jedin.	15	12 - 18
Cefoksitin	30 µg	27	24 - 30
Trim/sulfa	1.25-23.75 µg	29	26 - 32
Klindamicin <sup>3</sup>	2 µg	26	23 - 29
Eritromicin <sup>3</sup>	15 µg	26	23 - 29
Kanamycin	30 µg	ND <sup>a</sup>	ND
Neomicin	10 µg	ND	ND

### **Streptococcus pneumoniae ATCC 49619**

<b>Antibiotik</b>	<b>Sadržaj diska</b>	<b>Cilj (mm)</b>	<b>Raspon (mm)</b>
Penicilin	1 jedin.	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**

<b>Antibiotik</b>	<b>Sadržaj diska</b>	<b>Cilj (mm)</b>	<b>Raspon (mm)</b>
Ampicilin	10 µg	18-19	15-22
Cefatoksim	5 µg	28	25-31
Trim/sulfa	1.25-23.75 µg	26	23-29
Enrofloksacin	5 µg	ND	ND
Kanamycin	30 µg	ND	ND
Neomicin	10 µg	ND	ND

<sup>a</sup>ND, nije dostupno.



CONNECTED BY CARE

## Dodatak 2

Preporučeni testni paneli i kategorije osjetljivosti za patogene koji su glavni uzročnici mastitisa

### *Staphylococcus aureus*

#### Gram pozitivni prsten papirnatog diska

Promjer zone inhibicije (mm)

Antibiotik	Sadržaj diska	S(>)		R (<)
Penicilin	1 jedin.	26	-	26
Cefoksitin	30 µg	22	-	22
Trim/sulfa	1.25-23.75 µg 2	17	14 - 16	14
Klindamicin <sup>a</sup>	µg	22	19-21	19
Eritromicin <sup>a</sup>	15 µg	21	18-20	18
Kanamycin	30 µg	18	14-17	14
Neomicin	10 µg	14	-	14

### Koagulaza negativni stafilokoki

#### Gram pozitivni prsten papirnatog diska

Promjer zone inhibicije (mm)

Antibiotik	Sadržaj diska	S(>)		R (<)
Penicilin	1 jedin.	26	-	26
Cefoksitin	30 µg	25	-	25
Trim/sulfa	1.25-23.75 µg	17	14-16	14
Klindamicin <sup>a</sup>	2 µg	22	19-21	19
Eritromicin <sup>a</sup>	15 µg	21	18-20	18
Kanamycin	30 µg	18	14-17	14
Neomicin	10 µg	14	-	14

**Streptokoki****Gram pozitivni prsten papirnato disk**

Promjer zone inhibicije (mm)

Antibiotik	Sadržaj diska	S(>)		R (<)
Penicilin	1 jedinica	18	-	18
Trim/sulfa	1.25-23.75 µg	18	15 - 17	15
Klindamicin <sup>b</sup>	2 µg	17	-	17
Eritromicin <sup>b</sup>	15 µg	21	18-20	18

***Escherichia coli* & *Klebsiella* spp.****Gram negativni prsten papirnato disk**

Promjer zone inhibicije (mm)

Antibiotik	Sadržaj diska	S(>)		R (<)
Ampicilin <sup>c</sup>	10 µg	14	-	14
Cefatoksim	5 µg	20	-	20
Trim/sulfa	1.25-23.75 µg	16	13 - 15	13
Enrofloksacin	5 µg	23	17-22	17
Kanamycin	30 µg	18	14-17	14
Neomicin	10 µg	12	-	12

<sup>a</sup> Postavite diskove na razmak od 12-20 mm (D-test: ako je eritromicin R te je prisutno zaravnavanje zone inhibicije oko klindamicin diska proksimalno u odnosu na eritromicin disk (stvarajući zonu inhibicije u obliku slova D) prijavite rezultate za klindamicin kao R, bez obzira na promjer zone inhibicija klindamicina); <sup>b</sup> Postavite diskove na razmak od 12-16 mm (D-test; vidi pod <sup>a</sup>);

<sup>c</sup>*Klebsiella* spp. su prirodno rezistentne na ampicilin.



Slike postupka  
1A



1B



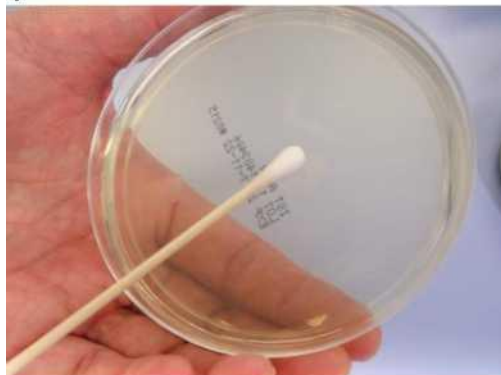
2



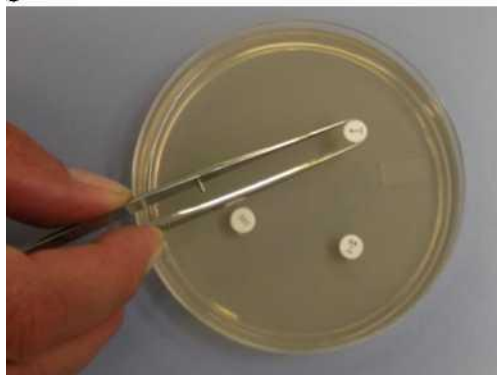
3



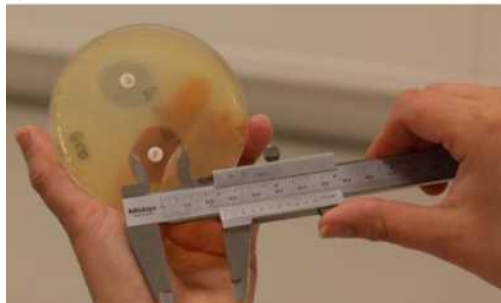
4



5



6



## Interpretacija rezultata antimikrobnog ispitivanja osjetljivosti patogeni koji su glavni uzročnici mastitisa

	Interpretacija
<b>Stafilokoki - <math>\beta</math>-laktami</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>Ako je promjer penicilin zone &gt;26 mm TE su rubove zone oštri, prijavite kao R (proizvođač penicilinaze)</li></ul> <p>Penicilin S i cefoksitin S:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>&gt; svi <math>\beta</math>-laktami S</li></ul> <p>Penicilin R i cefoksitin S:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>&gt; Penicilini (pen/amoks/ampi) R</li><li>&gt; Svi polusintetski penicilini (npr. kloksacilin i nafcilin), amoksicilin-klavulanska kiselina i svi cefalosporini S</li></ul> <p>Penicilin S ili R i cefoksitin R<sup>a</sup>:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>&gt; Svi <math>\beta</math>-laktami R<sup>b</sup> (uklj. cefalosporine)</li></ul>
<b>Stafilokoki &amp; streptokoki - D-test</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>Ispitivanje inducibilne rezistencije na linkozamid (D-test) (vidi Dodatak 2)</li></ul> <p>Eritromicin R i klindamicin S i D-test pozitivan:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>&gt; Eritromicin R i klindamicin R, bez obzira na promjer zone klindamicina</li></ul>
<b>Escherichia coli &amp; Klebsiella spp.</b>	<ul style="list-style-type: none"><li><i>E. coli</i> je prirodno rezistentan na (benzil)penicilin</li><li><i>Klebsiella</i> spp. je prirodno rezistentna na (benzil)penicilin i ampicilin</li></ul> <p>Ampicilin S i cefotaksim S:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>&gt; svi <math>\beta</math>-laktami S</li></ul> <p>Ampicilin R i cefotaksim S:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>&gt; amoksicilin, ampicilin i 1. generacija cefalospirina R</li><li>&gt; amoksicilin-klavulanska kiselina, 3. i 4. generacija cefalosporina S</li></ul> <p>Ampicilin R i cefotaksim R:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>&gt; svi <math>\beta</math>-laktami R (preporuka: ne koristiti amoksicilin-klavulansku kiselinu)</li></ul>

<sup>a</sup> Indikativno za prisutnost *mecA* gena (MRSA, *mecA*-pozitivni *Staphylococcus aureus*);

<sup>b</sup> Osim na anti-MRSA cefalosporine razvijene za primjenu kod ljudi (ceftobiprol i ceftarolin);

<sup>c</sup> Nije rađena razlika između ESBL- i AmpC-proizvođača.