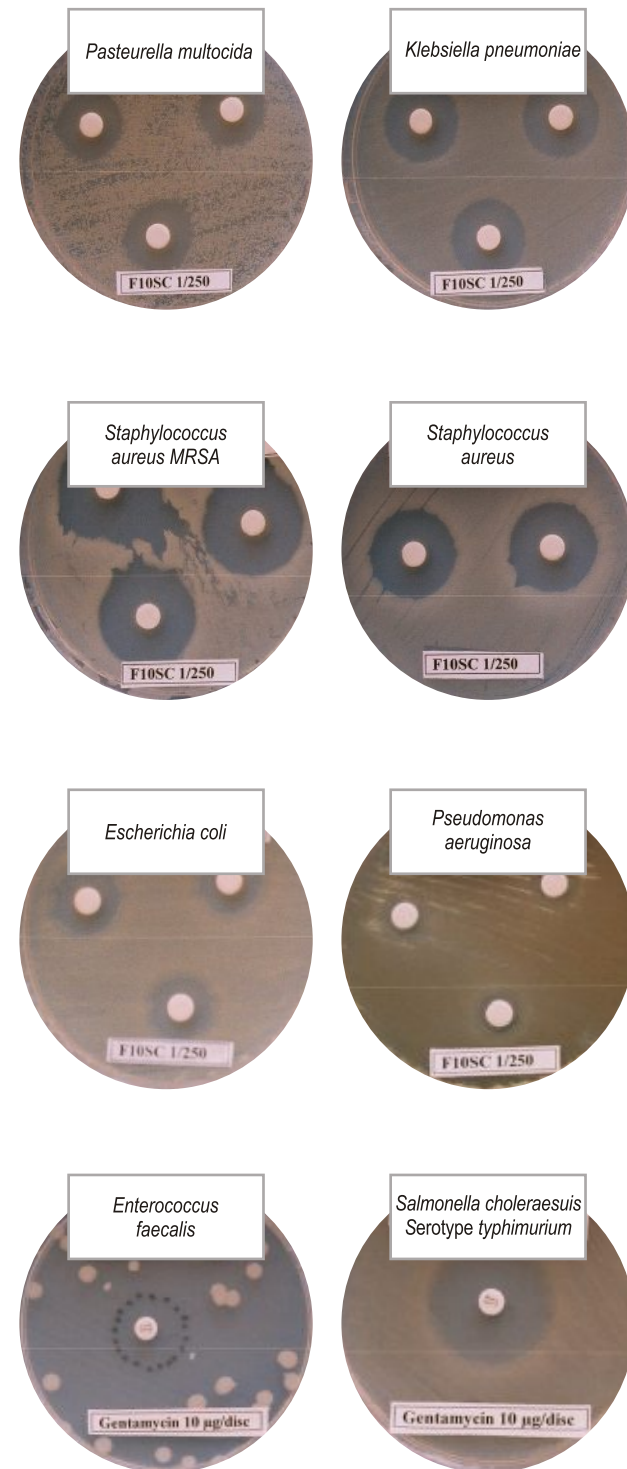
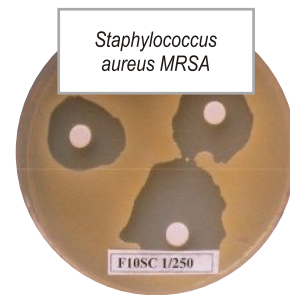


Mueller-Hinton Agar



Iso-Sensitest Agar



Závěry

- 1) Dobrý růst všech testovaných mikroorganismů byl pozorován na obou typech medií. Nicméně je třeba kontrolovat konečné ředění bakteriální suspenze aplikované na misky, aby byl získán počet odpovídající 0,5 Mc Farlandů. Standard je přibližně $1,5 \log^3$ cfu/ml, tedy dávka bakterií, která je v rámci kapacity antimikrobiálního roztoku na disku.
- 2) Inhibiční zóny Gram pozitivních a negativních organismů na Mueller-Hintonově agaru byly veskrze čisté a dobře ohraničené s malým zkreslením, dokonce i při velmi vysokých koncentracích F10SC. Nicméně síla agaru musí být přibližně 4mm a musí být položen na rovný povrch.
- 3) U Iso-sensitest agarových misek byl pozorován problém s některými testovanými mikroorganismy, když byla F10SC testována při vysokých koncentracích. Velké zkreslení a překrývání inhibičních zón bylo pozorováno na miskách s naočkováním Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus MRSA a Klebsiella pneumoniae. Disky obsahující F10SC v ředění 1/250; 1/500; 1/1000 a 1/2000 nemohly být užity pro testování citlivosti těchto mikroorganismů na ISO-sensitest agaru. Pouze pokud byla koncentrace F10SC redukována na ekvivalent k 1/4000 a 1/8000, zóny inhibice se méně deformovaly a mohli být měřeny.
- 4) Na provádění testu citlivosti k F10SC je doporučen Mueller-Hintonův agar.
- 5) Objemy, které přesahují 10 µl způsobují deformaci inhibičních zón, díky omezené schopnosti disků absorbovat větší objemy.
- 6) V této studii byl zkoušen pouze jeden bakteriální kmen z každého druhu vybraných rodů mikroorganismů. Díky vnitrorodové variabilitě je nemožné určit limity pro velikost zóny inhibice v rámci skupiny pro rezistentní, středně odolné a citlivé druhy mikroorganismů. Navržená Agar – difuzní metoda může být použita ke screeningu mnohých bakteriálních kmenů ke zjištění zóny inhibice pro bakteriální kmeny považované za rezistentní nebo citlivé.

References

1. SABS report No. 2570437/1936/Y64427
2. SABS report No. 7218/2547288/1317/Y59521
3. Koneman, E.W. Editor: Colour atlas and textbook of Diagnostic Microbiology, 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Maryland.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Supplement 1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa

Výrobce F10 produktů:
Health and Hygiene (Pty) Ltd
P.O. Box 347, Sunninghill, 2157, South Africa
Tel: +27 11 474 1668 • Fax: +27 11 474 1670
www.healthandhygiene.co.za • www.f10products.co.za

OVĚŘENÍ ÚČINNOSTI
VETERINÁRNÍHO
DEZINFEKČNÍHO
PŘÍPRAVKU (F10SC)

Neil Forbes BVetMed Dip ECAMS FRCVS, Elize Lloyd BSc Hons Microbiology

Shrnutí

F10SC veterinární dezinfekce je postavená na základě účinku kvarterních amoniových solí a biguanidů.

Nezávislé testy ukázaly, že je efektivní proti bakteriím, houbám, virům a sporám (houbovým i bakteriálním). Bylo zdokumentováno, že užití diskové metody pro testování velikostí zón účinnosti na agarových plotnách, u různých bakteriálních testacích kmenů má proměnlivé výsledky. Studie¹ byla iniciována za účelem zjištění nejvhodnější metody na zhodnocení účinků F10SC za použití komerčně dostupných disků 10 µg gentamicinu a 5 µg enrofloxacinu jako porovnatelné kontroly.

Všech osm testovaných bakteriálních organismů v 1036 testech bylo citlivých na přípravek k dezinfekci F10SC v ředění 1/250 (konc. 0,4 %) v bujónu a kompletní viditelná inhibice byla pozorována při této koncentraci, ale také při mnohem nižších koncentracích.

Nejvíce rezistentní mikroorganismy jako Pseudomonas aeruginosa nebo Escherichia coli měly malé zóny inhibice na agaru v koncentraci ekvivalentní ředění 1/250 (0,4 %), ale stále byly kompletně inhibovány ředěním 1/1000 (0,1 %), resp. 1/4000 (0,025%) F10SC v bujónu. Více citlivé mikroorganismy, jako například Staphylococcus aureus, měl na agaru velkou zónu inhibice při koncentraci odpovídající ředění 1/250 (0,4 %) a byl kompletně inhibován v bujónu už při nízké koncentraci 1/16 000 (0,0125%). Celkově 146 odečítání bylo hodnoceno z každé gentamicinové a enrofloxacinové kontroly.

Nicméně studie ukázala, že testování musí být prováděno v rámci striktních parametrů jinak jsou dosaženy nekonzistentní a zavádějící výsledky.

Úvod

Studie byla prováděna s následujícími cíli:

- Přezkoušet diskovou metodu ve vztahu k hodnocení citlivosti aerobních a fakultativně anaerobních bakterií k F10SC.

- Porovnat výsledky diskové metody v šíři čtyř až šesti různých koncentrací F10SC na dvou typech agaru běžně používaných na citlivost. Konkrétně Mueller Hintonův agar (Merck) a Iso-sensitest Agar (Oxoid) (C.A.Milsch).

- Porovnat citlivost či rezistenci osmi testovaných

mikroorganismů ke komerčně dostupným diskům s obsahem 10 µg gentamicinu a 5 µg enrofloxacinu na těchto dvou typech agaru.

- Zjistit MIC (minimální inhibiční koncentraci) dezinfekčního prostředku F10SC proti běžným bakteriálním patogenům, včetně ATCC kmenů, lokálním izolátům a ptačím patogenům.

Studie

Testované mikroorganismy

Byly použity následující sbírkové mikroorganismy:

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	Lokální izolát dodaný H F Verwoerd Hospital 3/1995 B/N 177/6
<i>Pasteurella multocida</i>	Lokální ptáčí izolát dodaný veterinární fakultou Onderstepoort
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Salmonella choleraesuis</i> serotype typhimurium	ATCC 13311

Příprava bakteriální suspenze

Podle NCCLS průvodce⁴ byla vybrána metoda přímé koloniální suspenze.

Bakteriální kultury byly pěstovány na neselektivním agaru (živná agarová půda) po dobu 16-18h při 35 st. C (+/- 2°C) a byly resuspendovány se sterilním fyziologickým roztokem (0,85% roztok Na Cl). Získaná koncentrovaná suspenze byla ředěna ve sterilním fyziologickém roztoku (0,85% roztok Na Cl), aby odpovídala turbiditě 0,5 McFarlandova standardu (přibližně 70-75% T v 600 nm). Výsledná bakteriální suspenze obsahovala přibližně $1,5 \times 10^8$ cfu/ml.

Určení MIC v bujónu

Ředění bujónu pro určení minimální inhibiční koncentrace bylo provedeno dle směrnic popsanych v NCCLS⁴.

Mueller-hintonův bujón (pH 7,2 – 7,4) dodávaný Merckem. Bujón byl připraven a sterilizován dle pokynů výrobce. Kationtová koncentrace bujónu nebyla upravena a bujón byl použit, tak jak byl.

Byly připraveny 2 řady 11 zkumavek, duplikovaných pro každý testovaný mikroorganismus, začínající v první zkumavce na ředění F10SC 1/125 (0,8 %), přímo v Mueller-Hintonově bujónu. Zkumavka 1 a 2 obsahovala 1 ml tohoto roztoku.

Do zkumavek 2 - 11 byl přidán sterilní Mueller-Hiltonův bujón (1ml). Počáteční koncentrace 1/125 (0,8 %) ve zkumavce 2 tak byla naředěna 1:1 se sterilním bujónem, což vedlo k snížení koncentrace na ředění 1/250(0,4%)ve zkumavce č. 2. Ze zkumavky 2 se přidal 1 ml do zkumavky 3. Stejným způsobem se provedla další sériová ředění až po zkumavku 9 pokrývající rozpětí ředění od 1/125 (0,8 %) až do 1/32000 (0,0031 %). Zkumavka 10 obsahovala naočkovaný bujón a sloužila jako pozitivní kontrola. Zkumavka 11 obsahovala nenačkovaný bujón jako negativní kontrola. Obě zkumavky 10 a 11 neobsahovali žádné antimikrobní látky. Všechny zkumavky obsahovaly 1 ml Mueller- Hiltonova bujónu.

Bakteriální suspenze získané metodou přímé koloniální suspenze obsahovaly průměrně $1,5 \times 10^8$ cfu/ml. Tyto suspenze byly dále naředěny: 2ml suspenze do 10 ml sterilního fyziologického roztoku na získání přibližně počtu 3×10^7 cfu/ml či zkumavku. Do zkumavky 1 – 10 s obsahem 1ml Mueller Hintonova bujonu a naředěné koncentrace F10SC, bylo přidáno 10μl (0,01ml) připravené bakteriální suspenze testovaného bakteriálního kmene, aby se získala koncentrace přibližně 3×10^7 cfu/ml, neboli na zkumavku. Zkumavka 11 obsahovala nenačkovaný bujón jako negativní kontrola.

Zkumavky byly inkubovány při 35 °C 16-20h. MIC (minimální inhibiční koncentrace) je nejnižší koncentrace antimikrobní látky (F10SC), která inhibuje viditelný růst testovaných organismů. Je to tedy koncentrace obsažená v první zkumavce v naředěné sérii, kde je viditelné inhibován růst testovaných mikroorganismů.

Po vyočkování inkubovaných suspenzí na agarové plotny byly odečteny celkové počty životaschopných mikroorganismů obsažených v testovaných suspenzích (ze zkumavek získaných sériovým ředěním).

Určení zóny inhibice diskovou metodou

Byla použita Kirby Baueroва metoda diskové difuzní zóny inhibice růstu bakterií popsaná Konemanem.

Mueller- Hinton agar (pH 7,2 - 7,4) dodaný Merckem. Agar byl připraven a sterilizován dle instrukcí výrobce (± 25 ml bylo vylito na 90 mm Petriho misky. Vrstva agaru asi 4 mm.)

Iso- Sensitest agar (výrobce Oxoid) dodaný C A Milschem. Agar byl připraven a sterilizován dle pokynů výrobce. (± 25ml bylo vylito do 90mm Petriho misek. Vrstva agaru přibližně 4mm.)

Příprava disků a F10SC zásobních roztoků

K získání určité koncentrace aktivních látek přítomných v 1 ml specifického ředění bujónu F10SC na discích, které neobsahují více než 10 μl (0,01 ml), je třeba připravit zásobní roztoky F10SC. **Například:** Požadovaná koncentrace na disku: 0,4% F10SC (ředění 1/250 F10SC je ekvivalentní k 0,4% F10SC).

Požadovaná koncentrace na disku (0,4% F10SC) = koncentrace zásobního roztoku (40%)
Množství aplikované na disk (0,01ml)

Takže 0,01 ml 40% roztoku na disku obsahuje stejné množství aktivních látek jako 1 ml 0,4% roztoku F10SC. Připravené zásobní roztoky v rozsahu od 40% do 1,25% byly nanесeny na disky. Koncentrace F10SC v připravených testacích discích reprezentují 1 ml bujonu v ředěních F10SC od 1/250 (0,4 %) do 1/8000 (0,0125 %). Pracujeme tedy se stejnou řadou testacích ředění F10SC jako u metody „ určení MIC v bujónu „.

Aplikované množství zásobního roztoku pro optimální nasycení testacního papírového disku bylo stanoveno na 0,01 ml = 10 μl. Vyšší objemy vedou ke zkresleným výsledkům.

Příprava Petriho misek

Bylo použito přibližně 130 misek Mueller-Hiltonova agaru a Iso-Sensitestu agaru. Testy všech koncentrací F10SC byly prováděny duplicitně na dvou agarových plotnách. Bylo použito průměrně 6 disků pro každé ředění zásobních roztoků F10SC na obou miskách. Sterilní čisté disky (Mast) 6,5mm v průměru byly získány z Davies Diagnostics.

Agarové plotny byly při pokojové teplotě třikrát očkovány v úhlu 60° přes celý povrch bavlněnými tyčinkami namočenými do suspenze aby se zajistilo rovnoměrné naočkování testovaných organismů. Vyhnuli jsme se přílišnému zvlhčení.

Všechny agarové misky byly naočkovány bakteriální suspenzí připravenou metodou přímé koloniální suspenze, jak bylo popsáno výše.

Misky se nechaly 3- 5 minut zaschnout. Přibližně 3 čisté disky na 90 mm misku byly položeny na naočkovaný povrch Mueller-Hinton a Iso-Sensitest agaru za použití sterilních pinzet a jemným tlakem sterilní pinzetou přitlačeny k zajištění úplného kontaktu disků s agarem. Na oba dva typy inokulovaných agarů byly aplikovány také testací disky pro Gentamicin (Oxoid) 10μg a testací disky pro Enrofloxacin 5μg - referenční disky.

Mikropipetou (eppendorffovou pipetou) se nakapalo po 10 μl z připravené sady testacních zásobních roztoků F10SC na disky položené na agarových plotnách.

Misky nebyly otočeny dnem vzhůru a po 15 minutách po aplikaci byly inkubovány po 16-18h při 35°C (± 2°C).

Všechna testování byla provedena duplicitně a byly stanoveny celkové počty životaschopných mikroorganismů obsažených ve všech testovaných suspenzích.

Kvalitativní kontrola média

Na kvalitativní kontrolu Mueller-Hintonova agaru a bujónu byly použity tři ATCC referenční linie testovacích bakterií:

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

Mueller-Hintonův agar: Byly použity všechny tři mikroorganismy. Bylo zkontrolováno, že vrstva agaru má tloušťku 4mm pro minimalizaci rozdílů velikosti zón. Komerčně dostupný Oxoid disk s obsahem gentamicinu 10 μg byl testován na miskách s Mueller-Hintonovým agarem, používaných pro testování F10SC. Průměrná zóna inhibice získaná pro gentamicin byla ve shodě se stanoveným přípustným rozmezím pro každý určitý referenční mikroorganismus jako indikátor podle NCCLS⁴.

Mueller-Hintonův bujón: Byly použity *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2783 a *Escherichia coli* ATCC 25922. SABS nemohl dodat *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 referenční kmen navržený NCCLS⁴ pro testování Mueller-Hintonova agaru. Použití *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2783 a *Escherichia coli* ATCC 25922 pro kvalitativní účely bylo shledáno jako dostatečné pro platné výsledky. Bylo připraveno sériové ředění Mueller-Hintonova bujónu, který obsahoval gentamicin v rozsahu od 10 do 0,078 μg/ml. MIC hodnoty pozorované pro oba mikroorganismy byly ve shodě s přípustným rozmezím specifikovaným NCCLS⁴.

Pozitivní kontrola: Sterilní Mueller-Hintonův bujón, Mueller-Hinton agarové misky a Iso-Sensitest agarové misky byly inokulovány testovací suspenzí mikroorganismů užitých pro příslušné testy a po 16-20h byl pozorován dobrý růst.

Negativní kontrola: Sterilní -Hintonův bujón, Mueller-Hinton agarové misky a Iso-Sensitest agarové misky byly inkubovány za stejných podmínek jako testované zkumavky a misky na potvrzení sterility.

VÝSLEDKY

Výsledky MIC hodnoty v Mueller-Hintonově bujónu

Průměrné výsledky v obou testovaných zkumavkách pro každý mikroorganismus se ukázaly jako jeden výsledek v případě, když výsledky byly stejné. Dva výsledky poukazovaly na to, kde byly zjištěny rozdíly mezi pozorovanými duplikátními výsledky testů.

Tabulka 1

číslo zkumavky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 Negativní kontrola	11 Pozitivní kontrola
Koncentrace F10SC	0,8%	0,4%	0,2%	0,1%	0,05%	0,025%	0,0125%	0,00625%	0,0031%		
Ředění F10SC	1/125	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	-	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA lokální isolát	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+++
<i>Pasteurella multocida</i> Lokální isolát	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++
<i>Salmonella choleraesuis</i> Serotype typhimurium ATCC 13311	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	+++

+++ znamená dobře viditelný růst testovaného mikroorganismu

- znamená, že růst testovaného mikroorganismu nebyl viditelný

F10SC MIC hodnoty Obr. 1

Testovaný mikroorganismus:	Koncentrace F10SC (ředění) jejímž Výsledkem je úplná viditelná inhibice testovaného mikroorganismu = MIC hodnoty
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Ředění 1/1000 neboli 0,1 % F10SC
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Ředění 1/4000 neboli 0,025 % F10SC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Ředění 1/16 000 neboli 0,00625% F10SC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	Ředění 1/4000 neboli 0,025 % F10SC
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA Local isolate	Ředění 1/16 000 neboli 0,00625% F10SC
<i>Pasteurella multocida</i> Local isolate	Ředění 1/16 000 neboli 0,00625% F10SC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	Ředění 1/16 000 neboli 0,00625% F10SC
<i>Salmonella choleraesuis</i> Serotype typhimurium ATCC 13311	Ředění 1/8000 neboli 0,0125 % F10SC

Zopakovatelnost výsledků: Hodnoty získané pro *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 byly tytéž jako ty, které byly získané v předchozím testu za stejných podmínek².

Výsledky difuzní citlivosti

Všechny mikroorganismy byly citlivé na F10SC v ředění 1/250 v bujónu a kompletní viditelná inhibice byla pozorována při této i při mnohem nižších koncentracích. Nejvíce rezistentní mikroorganismy např. *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*, produkovaly malou inhibiční zónu v agaru při koncentraci 1/250, ale byly stále kompletně inhibovány v bujónu při ředění 1/1000, resp. 1/4000 F10SC.

Citlivější mikroorganismus *Staphylococcus aureus*, produkoval velké zóny inhibice na agaru při koncentraci odpovídající ředění 1/250 a došlo kompletně k inhibici v bujónu při ředění tak nízkých, jako je 1/16000.

Efekt F10SC koncentrací byl měřen na osmi rozdílných mikroorganismech. Průměrná velikost zóny inhibice byla zapsána v mm. (V průměru bylo použito 6 disků pro každé ředění F10SC na dvou miskách.)

Měření zóny

Účinek F10SC koncentrací na osm rozdílných mikroorganismů. Inhibiční zóna měřena v mm kolem disku, (± 6 disků pro F10SC ředění na dvou miskách).

Tabulka 2- Mueller-Hinton Agar

Ředění F10SC						
Ředění	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000
%F10SC (1ml/100ml) na Discích, které obsahují 10μl zásobního roztoku	0,4%	0,2%	0,1%	0,05%	0,025%	0,0125%
F10SC zásobní roztok Použity pro přípravu disků	40%	20%	10%	5%	2,5%	1,25%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9,7	9,4	9,1	8,8	8,6	Netestováno
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16,7	15,1	13,9	12,0	11,2	Netestováno
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	23,7	22,3	20,6	17,6 zkreslení	15,9 zkreslení	14,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	21,7	20,6	19,2	17,8	15,5	14,4
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA Local isolate	23,3	23,9	21,3	20,6	16,5	12,6
<i>Pasteurella multocida</i> Local isolate	19,9	17,4	15,3	13,5	Netestováno	Netestováno
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	23,0	22,3	19,1	18,2	16,1	13,3
<i>Salmonella choleraesuis</i> Serotype typhimurium ATCC 13311	17,7	16,2	13,1	11,6	Netestováno	Netestováno

Tabulka 3-Iso-sensitest agar

Ředění F10SC						
Ředění	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000
%F10SC (1ml/100ml) na discích obsahujících10μl zásobního roztoku	0,4%	0,2%	0,1%	0,05%	0,025%	0,0125%
F10SC zásobní roztok Použity pro přípravu disků	40%	20%	10%	5%	2,5%	1,25%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10,1	9,5	9,5	9,3	8,9	Netestováno
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15,6	14,4	12,9	11,0	10,4	Netestováno
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Zkreslení, Velké překryvání	Zkreslení, Velké překryvání	Zkreslení, Velké překryvání	Zkreslení, Velké překryvání	15,6 Zkreslení, překryvání	13,6 Zkreslení, překryvání
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	Zkreslení Velké překryvání	21,1 Zkreslení, Překryvání	19,7 Zkreslení, Překryvání	16,1 Zkreslení, Překryvání	Bez výsledku Zkreslení Překryvání	16,6 Zkreslení Překryvání
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA Local isolate	23,3 Zkreslení	Bez výsledku Velké překryvání	Vážné překryvání	20,7 Zkreslení, překryvání	21,2	16,7
<i>Pasteurella multocida</i> Local isolate	17,9	15,6	14,3	12,5	Netestováno	Netestováno
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	19,8	18,7	17,4	15,9	14,5	13,0
<i>Salmonella choleraesuis</i> Serotype typhimurium ATCC 13311	17,2	16,1	14,4	12,3	Netestováno	Netestováno