***Speed* Mam Color**

**Veterinární diagnostický test
Pouze pro použití *in vitro***

**KlInickÉ POUŽITÍ**

Speed Mam Color je diagnostický nástroj pro identifikaci patogenních bakterií, které způsobují mastitidu u skotu, a pro rychlé stanovení citlivosti na antibiotika. Tento praktický test se snadno provádí přímo se vzorkem mléka. Výsledky profilu citlivosti se objeví do 24 hodin a identifikace bakteriálních původců onemocnění do 48 hodin.

Speed Mam Color je řešením pro individuální diagnostiku mastitidy prováděnou přímo v terénu: umožňuje volbu nejvhodnější antibiotické léčby z široké škály možností, které mají veterináři v současné době k dispozici. Přímo u vzorku mléka vyšetřovaného na mastitidu bere v úvahu synergické nebo antagonistické účinky různých patogenů, jestliže je jejich koncentrace je vyšší nebo rovna 103CFU/ml.

**PRINCIP**
Speed Mam Color je bakteriologický diagnostický test pro hospodářská zvířata, který tvoří kultivační destička zahrnující:

* 14 jamek umožňující stanovení profilu citlivosti patogenů přítomných ve vzorku na 14 různých antibiotik (nebo kombinací antibiotik).
* 8 jamek pro identifikaci patogenních bakterií.
* 2 kontrolní jamky:
	+ Jamka pro kontrolu bakteriálního růstu: změna barvy v této jamce naznačuje přítomnost koncentrací bakterií, které jsou vyšší nebo se rovnají 103 CFU/ml.
	+ Jamka pro negativní kontrolu: změna barvy v této jamce v době odečítání výsledků ukazuje, že test je neplatný.

Speed Mam Color se provádí se vzorkem mléka. Po inokulaci kultivační destičky umožňuje inkubace při kontrolované teplotě (+37 °C) pomocí jednoduché změny barvy v každé jamce jednak vyhodnotit růst patogenních mikroorganismů v přítomnosti antibiotik běžně používaných ve veterinární praxi, a rovněž také identifikaci druhu mikroorganismu(ů) přítomného ve vzorku.

**PRACOVNÍ POSTUP**

Pro každý test budete potřebovat:

Jednu kultivační destičku, jednu lahvičku s *růstovým médiem*, lahvičku s obohacovadlem *Staph Supplement*, lahvičku s *parafínovým olejem*, jednu pipetu, jeden držák kultivační destičky, jeden inkubátor a jeden výsledkový list.

Nikdy nepoužívejte činidla z různých krabiček.

**• OPATŘENÍ:**

- Při odběru vzorku a při všech fázích pracovního postupu (inokulace a odečítání výsledků) se doporučuje nosit ochranné rukavice a ochranný oděv.

- V případě zasažení kůže některým z činidel odstraňte/odložte veškeré kontaminované oblečení a oplachujte opatrně vodou po dobu několika minut.

- V případě zasažení očí některým z činidel oplachujte opatrně vodou po dobu několika minut. Vyjměte kontaktní čočky, pokud je máte nasazeny a je snadné je vyjmout. Pokračujte ve vyplachování.

- Test provádějte na suché, čisté a dezinfikované pracovní ploše.

**• ODBĚR VZORKU:**
- Vzorek mléka musí být odebírán za aseptických podmínek a okamžitě uložen v lednici.

- Doporučujeme skladovat část vzorku při teplotě + 2 °C až + 8 °C po dobu 48 hodin (čas potřebný k získání kompletního výsledku) pro případ, že bude nutné další vyšetření pro potvrzení výsledků.

- Před zahájením testu doporučujeme nechat vzorek mléka po dobu 30 minut zahřát na pokojovou teplotu (nebo mírně zahřát v inkubátoru).

• **PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍ destičky:**

- Kultivační destičku vyjměte z obalu bezprostředně před použitím, na štítek uveďte jméno zvířete a datum kultivace. Odstraňte nalepovací štítek kryjící destičku.

- Uchyťte dlouhý okraj nalepovacího štítku podél dlouhého okraje destičky, aby byl umožněn přístup ke všem jamkám a zároveň byla viditelná jejich identifikace.

- Vezměte prosím na vědomí, že před růstem bakterií nemusí být obsah kontrolních jamek a jamek pro citlivost na antibiotika viditelný pouhým okem.

• **příprava vzorku:**

- Po homogenizaci vzorku mléka **přidejte pomocí přiložené pipety 3 kapky mléka do lahvičky s *růstovým médiem***. Poté homogenizujte pomalým převracením lahvičky.

• **Inokulace DESTIČKY:**

- **Inokulace** jamek: Pomocí přiloženého víčka s kapátkem přidejte **do každé jamky 3 kapky naočkovaného *růstového média***.

- Přidejte **2 kapky *obohacovadla Staph Supplement* do jamky STAPH**.

- Přidejte **2 kapky *parafinového oleje* do každé jamky s výjimkou jamek E. COLI, PSEUDO a STAPH**.

- Přemístěte lepicí štítek na destičku.

- Umístěte destičku do pevného kartonového držáku pro lepší kontrast při odečítání výsledků a během kultivace udržujte ve všech jamkách homogenní teplotu.

**• KULTIVACE**:

- Po naočkování nechte destičku ihned inkubovat v inkubátoru při + 37 °C.

**ODEČÍTÁNÍ VÝSLEDKŮ:**

**1 – Hodnocení kontrolních jamek:**

**Vyhodnoťte kontrolní jamky po 24 hodinách inkubace při teplotě + 37 °C (plus/minus 2 hodiny)**

|  |  |
| --- | --- |
| * + Jamka pro negativní kontrolu by měla zůstat bezbarvá:
 |  |
| * + Změna u jamky s kontrolou růstu z bezbarvé na červenou nebo na červené proužky naznačuje, že koncentrace patogenních bakterií je vyšší než 103 CFU/ml
 |
| Nepřítomnost patogenních bakterií (s výjimkou *Mycoplasma* spp.) jamka zůstává bezbarvá | Přítomnost patogenních bakterií  jamka zčervená nebo se objeví červené proužky |
|  |  |
|  | positif 1 nebo positif 2 |
|  | V tomto případě lze odečíst profil citlivosti na antibiotika. |

- Vzorek lze považovat za neinfekční bez patogenních bakterií (s výjimkou mykoplazmat), pokud  jamka nezměnila zabarvení po 48 hodinách.

*Zvláštní případ u mykoplazmových infekcí:*

 jamky a jamky pro citlivost na antibiotika u testu Speed Mam Color neumožňují rychlý a efektivní růst *Mycoplasma* spp. Růst *Mycoplasma* spp. **vyžaduje u testu Speed Mam Color 7 dní inkubace při teplotě + 37 °C a je umožněn pouze v jamce MYCOP**.

Z těchto důvodů nemůže být jamka indikátorem přítomnosti nebo nepřítomnosti *Mycoplasma* spp. ve vzorku. **Navíc *Mycoplasma* spp. nevykazuje na kultivační destičce žádný profil citlivosti k antibiotikům.**

**2 – Odečítání výsledků u jamek pro citlivost na antibiotika:**

**Vyhodnoťte jamky pro citlivost na antibiotika ihned po interpretaci kontrolních jamek.**

Jamky pro citlivost na antibiotikamohou být interpretovány pouze tehdy, jestliže jamka pro negativní kontrolu je bezbarvá a u jamky pro pozitivní kontrolu pozorujeme červené zbarvení.

|  |  |
| --- | --- |
|  | positif 1 nebo positif 2 |
| Žádná změna barvy.Žádný růst bakterií.*Bakterie CITLIVÉ k antibiotikům* | Červené zbarvení nebo přítomnost červených proužků.Bakteriální růst *Bakterie REZISTENTNÍ na antibiotika* |

**Tabulka antibiotik v testu Speed Mam Color:**

Označení antibiotika přítomného v každé jamce je vytištěno na nalepovacím štítku nad každou jamkou.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Zkratka** | **Antibiotikum** | **Zkratka** | **Antibiotikum** |
| CLO | Kloxacilin | GEN | Gentamicin |
| AMC | Amoxicilin +kyselina klavulanová | SPI | Spiramycin |
| AMPCOL | Ampicilin + kolistin | TYL | Tylosin |
| CFL | Cefalexin | MAR | Marbofloxacin |
| CFP | Cefoperazon | PENDHS | Penicilin + streptomycin |
| CFT | Ceftiofur | SULTMP | Sulfonamidy + trimethoprim |
| CFQ | Cefchinom | TETNEOBAC | Tetracyklin + neomycin + bacitracin |

**3 Interpretace bakteriálního nálezu:**

**Hodnoťte jamky po 48 hodinách inkubace při + 37 °C, plus/minus 2 hodiny – (24 hodin po interpretaci jamek kontrol a citlivosti na antibiotika)**

Pouze jamky na mykoplazmata je možné odečíst po 7 dnech inkubace při teplotě + 37 °C.

Test může odhalit společenství různých bakterií.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Negativní kontrola | Pozitivníkontrola | Senzitivní na ATB | Rezistentní na ATB  | STAPH | STREP | STREP+ESC | ENTEROCOCCUS | PSEUDO | E. COLI | ENTEROBACT | MYCOP |
| *Staph* spp. | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Žlutá | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Červená | Oranžová |
| *Strep. agalactiae* | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Červená | Šedo-modrá | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Červená | Oranžová |
| *Strep. dysgalactiae* | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Červená | Šedo-modrá  | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Červená | Oranžová |
| *Strep. uberis* | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Červená | Šedo-modrá  | Černá | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Červená | Oranžová |
| *Enterococcus* | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Červená | Šedo-modrá | Černá | Hnědo-černá | Bezbarvé | Bezbarvé | Červená | Oranžová |
| *Pseudomonas* | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Červená | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Tmavo-modrá | Bezbarvé | Červená | Oranžová |
| *E. coli* | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Červená | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Modrý kroužek | Oranžovo-žlutá | Oranžová |
| *Enterobacteriaceae(s výjimkou E. coli)* | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Bezbarvé | Sans titre-1Červená | Červená | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Oranžovo- žlutá | Oranžová |
| *Mycoplasma* | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Červená | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Bezbarvé | Červená | Růžovo-červená |

• **Poznámky:**

*Neúplná změna barvy:*

Pokud se zbarvení identifikační jamky změní na přechodovou barvu (často souvisí s kalným médiem) po 48 hodinách inkubace při teplotě + 37 °C (např. jamka staph se změní z červené na kalnou oranžovou), měla by být jamka znovu přezkoumána po 24 hodinách (72 hodin po naočkování).

*Výsledek po 72 hodinách:*

- Kompletní změna barvy: identifikace bakterií je potvrzena.

- Přechodová barva přetrvává: identifikace bakterií se považuje za negativní.

* **INTERPRETACE**

Přiložený výsledkový list umožňuje zaznamenat zjištěné bakterie a jejich profily citlivosti a rezistence vůči antibiotikům. Při výběru antibiotika by měly být brány v úvahu výsledky analýzy a farmakokinetika zvoleného léčiva.

* **DOPORUČENÍ**
* **STABILITA/SKLADOVÁNÍ**

- Sada je stabilní při teplotě v rozmezí + 2 °C až + 8 °C po dobu 16 měsíců ode dne výroby (viz datum exspirace na štítku sady). Nevystavujte sadu teplotám pod bodem mrazu (0 °C).

- Je vhodné ponechat všechna činidla a destičku alespoň 15 minut před použitím při pokojové teplotě.

- Nikdy nepoužívejte lahvičky s činidly z různých krabiček.

• **Upozornění:**

- Objem a počet kapek vzorku a *růstového média* doporučené v protokolu jsou rozhodující pro kvalitu výsledků.

- Během odečítání výsledků doporučujeme ponechat destičku v pevném kartonovém držáku.

- Když jamka nemění barvu po 24 hodinách inkubace při teplotě + 37 °C, nechte ji inkubovat dalších 24 hodin, aby se potvrdila nepřítomnost patogenu ve vzorku (s výjimkou *Mycoplasma* spp.*).*

Výše uvedená doporučení jsou pouze orientační; žádná diagnostická metoda není stoprocentně přesná. Účelem tohoto testu je identifikovat bakteriální druh odpovědný za mastitidu skotu a pomoci veterinárnímu lékaři s volbou léčby. Veterinář by při interpretaci testu měl vždy brát v úvahu anamnézu, klinické vyšetření a výsledky všech dalších diagnostických testů. Definitivní diagnózu stanovuje výhradně veterinární lékař, který je za ni zodpovědný.

Společnost Virbac Diagnostics a jeho distributoři nemohou nést odpovědnost za případné důsledky spojené s nesprávným použitím tohoto testu nebo s nesprávnou interpretací výsledků.