



Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Metody stanovení citlivosti původců erythrodermatitidy kaprů k antibakteriálním látkám

A. Čížek, V. Piačková





Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Metody stanovení citlivosti původců erythrodermatitidy kaprů k antibakteriálním látkám

A. Čížek, V. Piačková

Vodňany

Publikace byla vytištěna prostřednictvím EU projektu TRAF00N „Traditional Food Network to Improve the Transfer of Knowledge for Innovation“, který je financován Evropskou komisí v rámci FP 7 2007–2013 pod projektovým číslem 613912.



Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:

*MŠMT projektů CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024)
a CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I) – 20 %, a projektu CEITEC
(CZ.1.05/1.1.00/02.0068) – 20 %*

*MZe projekt NAZV QJ1210237 „Prevence závažných infekčních nemocí kaprovitých
ryb“ – 60%*



č. 162

ISBN 978-80-7514-040-1

1. CÍL METODIKY	6
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	6
2.1. Úvod	6
2.2. Indikace k provedení vyšetření citlivosti	8
2.3. Výběr antibakteriálních látek pro rutinní vyšetření citlivosti a sdělování výsledků	8
2.4. Rutinní sdělování výsledků	9
2.5. Postup stanovení minimální inhibiční koncentrace (<i>minimal inhibition concentration; MIC</i>) metodou zředování antibakteriální látky v bujónu	9
2.5.1. Příprava kultivačních médií	9
2.5.2. Příprava bakteriální suspenze (inokulum)	10
2.5.3. Příprava a uchování naředěných antibakteriálních látek	11
2.5.4. Inkubace	14
2.5.5. Stanovení MIC, tzv. <i>end point</i> a interpretace výsledků	14
2.5.6. Kontrola kvality	15
2.5.7. Četnost testování kvality	18
2.5.8. Nápravná opatření	19
2.5.9. Další kontrolní postupy	20
2.6. Postup stanovení citlivosti diskovou difúzní metodou	21
2.6.1. Příprava média	21
2.6.2. Příprava inokula	21
2.6.3. Aplikace disků	22
2.6.4. Inkubace	23
2.6.5. Odečítání výsledků	23
2.6.6. Interpretace výsledků	24
2.6.7. Nepřijatelná kritéria	24
2.6.8. Postupy kontroly kvality	24
2.6.9. Četnost testování kvality	25
2.6.10. Nápravná opatření	26
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	27
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	27
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	28
6. SEZNAM POUŽITÉ A SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	28
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	29
8. PŘÍLOHA – TABULKOVÁ ČÁST	30

1. CÍL METODIKY

Cílem této práce je poskytnout veterinárním bakteriologickým laboratořím metodiky pro stanovení citlivosti původců erythrodermatitidy kaprů. V současné době nejsou v našich laboratořích takové metody dostupné a i na mezinárodní úrovni se teprve postupně tvoří a standardizují. Užitím standardizovaných postupů budou moci laboratoře poskytovat chovatelům ryb a praktickým veterinárním lékařům přesnější a věrohodnější výsledky, což napomůže výběru vhodných antibakteriálních látek pro terapeutické postupy a zkvalitní antibiotickou politiku při intenzivním chovu ryb.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Metodika popisuje současný stav postupů stanovení citlivosti bakterií izolovaných z ryb, jejichž základem se staly mezinárodní metodiky publikované Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006a,b; 2014a,b) a vybrané publikace. Metodika je uplatnitelná pro příslušníky čeledi Enterobacteriaceae (např. *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda*), čeledi Vibrionaceae (např. *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*) a další mezofilní druhy aeromonád, *Aeromonas salmonicida* (typické a některé atypické kmeny) a *Pseudomonas* spp.

2.1. Úvod

Intenzifikace chovu ryb je celosvětově na vzestupu a při vysokých koncentracích ryb v různých typech akvakultur může docházet k jejich stresové zátěži. To se ve svém důsledku může projevit mimo jiné i zvýšeným výskytem infekčních onemocnění. Z tohoto důvodu musí chovatelé a veterinární lékaři zlepšovat profylaktické postupy, aby zamezili ekonomickým ztrátám v ohrožených chovech. Komplex profylaktických opatření proti infekcím bakteriálního původu vychází mimo jiné také z výsledků laboratorních vyšetření. Během posledních několika desetiletí byl dosažen značný pokrok v oblasti izolace a identifikace bakteriálních původců onemocnění ryb. Tato metodika je zaměřena na stanovení citlivosti vůči antibakteriálním látkám u původců erythrodermatitidy kaprů v užším slova smyslu a v širším pohledu u původců infekcí ryb vyvolaných aeromonádami. Jedná se totiž o postupy, které lze aplikovat jednotně na pohyblivé mezofilní druhy aeromonád a jiné než psychrofilní kmeny *A. salmonicida*. Druhy rodu *Aeromonas* mohou vyvolávat septikémie, ulcerativní (vředovité) a hemoragické choroby ryb,

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

včetně furunkulózy (CLSI, 2006a,b; Austin a Austin, 2007). Skutečnost, že mnoho bakteriálních kultur izolovaných z nemocných ryb neodpovídá vždy popisovaným charakteristikám bakteriálního druhu, zejména pokud jsou použity pro jejich identifikaci pouze biochemické znaky, vede k chybám v udávání reálného výskytu a různorodosti druhů podílejících se na infekcích ryb (je ale nad rámec této publikace věnovat se metodám druhového určení aeromonád). Metodika stanovení citlivosti původců erythrodermatitidy se může uplatnit i při stanovení citlivosti jiných kultivačně nenáročných bakterií, které se izolují z infikovaných ryb různých druhů.

V celosvětovém měřítku je v porovnání s ostatními druhy hospodářských zvířat povolen k terapii ryb jen omezený počet antibakteriálních substancí. V ČR jsou aktuálně registrovány pro léčbu ryb v užitkových chovech oxytetracyklin (RUPIN SPECIAL), flumequin (FLUMIQUIL 50%) a florfenikol (AQUAFLO 500 mg/g premix pro medikaci krmiva pro pstruha duhového, *Oncorhynchus mykiss*). Jiná praxe může být uplatňována v chovech okrasných druhů ryb. Evropská legislativa povoluje veterinárním lékařům předepisovat pro akvarijní ryby „extra-label“ užití i některých dalších účinných látek. Tento předpis musí být podložen výsledky laboratorních vyšetření, tj. kultivačním potvrzením bakteriální infekce a výsledky stanovení citlivosti izolátů bakterií vůči antibakteriálním látkám (Kolářová a Nepejchalová, 2014).

Problematika bakteriálních infekcí vodních živočichů, pro jejichž léčbu je možné užít antibakteriálních látek, je velmi široká. Jen z pohledu možných původců bylo popsáno více než 70 druhů bakterií schopných vyvolat u živočichů chovaných v akvakulturách infekční onemocnění. Vedle bakteriálních druhů, které byly dobře charakterizovány jako původci infekcí ryb a jiných vodních živočichů, existuje řada případů, kdy se izolovaný mikroorganismus podaří identifikovat pouze částečně nebo zůstane neidentifikovaný. V takových případech je nutné provést, stejně jako u identifikovaných původců, stanovení citlivosti vůči antibakteriálním látkám před zahájením vlastní chemoterapie. Stanovení citlivosti je indikováno také tehdy, když existuje obava, že bakteriální původci onemocnění mohou být vybaveni mechanismy rezistence proti běžně užívaným antibakteriálním látkám v daném chovu (CLSI, 2014a).

Stanovování citlivosti nepatogenních bakterií pocházejících z vodního ekosystému akvakultur je také důležité pro poznání epidemiologických souvislostí výskytu antibakteriální rezistence. Užívání antibakteriálních látek v akvakulturách vzbuzuje vzrůstající zájem o možné dopady na lidské zdraví. Existují například obavy z průkazu reziduí antibakteriálních látek v sedimentech a s tím souvisejícího výskytu rezistentních bakterií, které jsou výsledkem intenzivního chovu ryb a jejich terapie. Mnoho literárních údajů se věnuje popisu různých postupů stanovení citlivosti. Tyto metody se liší v teplotách a době inkubace, složení médií a koncentracích antibakteriálních

látek. Za účelem odpovídajícího vyhodnocení účinnosti antibakteriálních látek na bakterie pocházející z vodního prostředí je nezbytné, aby byly pro výše uvedené vyšetření využívány standardizované metodiky (CLSI, 2014a).

2.2. Indikace k provedení vyšetření citlivosti

Určení citlivosti je doporučováno pro každý izolát bakteriálního patogenu, který se podílí na infekčním procesu vyžadujícím antibakteriální terapii a jehož citlivost nemůže být spolehlivě ověřena na základě dřívějších znalostí. Bohužel, ne u všech patogenních bakterií byly vyvinuty metody testování citlivosti a kontrola jejich kvality. Rovněž nebyla zavedena kritéria pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti k antibakteriálním látkám. Vyšetření citlivosti je často vyžadováno klienty, kteří se domnívají, že původce onemocnění je rezistentní proti běžně užívaným a registrovaným antibakteriálním léčivům. Přitom je třeba připomenout, že u některých mikroorganismů lze stále předpokládat jejich citlivost, proto je empirický přístup k terapii obecně uznávaný. V neposlední řadě jsou vyšetření citlivosti rovněž důležitá při studiích epidemiologie rezistence a účinnosti nově zaváděných chemoterapeutik (CLSI, 2014a).

Bakteriální kultura určená k vyšetření by měla být zpracována standardním postupem. Jiné, tzv. zkrácené postupy, vedou k mylným výsledkům a nevhodné volbě antibiotické terapie. Neměly by být testovány smíšené bakteriální kultury. Je zapotřebí se vyhnout praktikám zrychleného přímého vyšetření citlivosti prováděného formou přímé kultivace klinického materiálu. V situacích, kdy podstata infekce je nejasná a vzorek obsahuje směs bakterií různých druhů nebo běžnou mikroflóru, pak nemají izolované bakterie pravděpodobně vztah k infekčnímu procesu. Testy citlivosti jsou proto zbytečné a výsledky často zavádějí k nevhodné antibiotické terapii.

Z jedné epidemie bakteriální infekce je třeba vyšetřit více než jeden izolát původce, protože jsou zaznamenány případy výskytu bakterií s různými profily citlivosti vůči antibakteriálním látkám.

2.3. Výběr antibakteriálních látek pro rutinní vyšetření citlivosti a sdělování výsledků

Výběr nejvhodnějších antibakteriálních látek k testování citlivosti a sdělování výsledků provádí veterinární bakteriologická laboratoř po konzultaci se specialisty na choroby ryb. Ucelený přehled antibakteriálních látek využívaných s různou četností v akvakulturách v celosvětovém měřítku, a to včetně významnosti údajů o kontrole kvality, poskytuje tabulka č. 1.

2.4. Rutinní sdělování výsledků

Rutinní protokoly o výsledcích stanovení citlivosti určené veterinárním lékařům, specialistům na choroby ryb, by měly zahrnovat antibakteriální látky vhodné pro léčebné použití. Pro diagnostické laboratoře může být důležité sledovat změny v citlivosti i u antibakteriálních látek, které jsou využívány v humánní medicíně. Za tímto účelem mohou laboratoře testovat citlivost vůči širšímu spektru látek, než je obvykle schváleno pro specifické potřeby léčby infekcí ryb a dalších vodních živočichů. Záleží na rozvážnosti laboratorních pracovníků a konzultaci s veterinárními lékaři – specialisty, která léčiva jsou vybrána pro rutinní stanovení citlivosti. Některé laboratoře z různých důvodů testují i neschválená chemoterapeutika. V těchto případech je důležité poznamenat, že klient nebo veterinární lékař přebírá všechnu odpovědnost za účinnost, bezpečnost a zamezení výskytu reziduí při použití těchto neschválených látek. Každá laboratoř by měla do sdělení o výsledcích vyšetření zahrnout upozornění na národní předpisy, které tuto činnost regulují (CLSI, 2014a; Kolářová a Nepejchalová, 2014).

2.5. Postup stanovení minimální inhibiční koncentrace (*minimal inhibition concentration; MIC*) metodou zředování antibakteriální látky v bujónu

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je nejnižší koncentrace antibakteriální látky, která inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu ve zkumavkách makrodilučního provedení nebo jamkách destičky u mikrodilučního provedení testu.

2.5.1. Příprava kultivačních médií

Jako médium volby k testování citlivosti běžně izolovaných rychle rostoucích aerobních nebo fakultativně anaerobních bakterií je doporučován Mueller-Hintonův bujón s upravenou koncentrací kationů (*Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth*, CAMHB; CLSI, 2014a). Každá šarže CAMHB se testuje standardní sestavou kontrolních kmenů bakterií, a pokud nejsou dosažena přijatelná kritéria minimálních inhibičních koncentrací („minimal inhibition concentration“ – MIC), prověřuje se předepsaný obsah kationů (Ca^{2+} , Mg^{2+}) i jiné vlivy a složky, které mohly ovlivnit neshodný výsledek.

CAMHB médium můžeme získat z komerčních zdrojů (např. Mueller-Hinton Broth, CM0405, Oxoid) s certifikátem kontroly kvality. Při přípravě tohoto média ze sušeného základu postupujeme podle instrukcí výrobce a u každé

várky kontrolujeme pH, které by mělo být při teplotě 25 °C mezi 7,2 až 7,4. Hotové médium má světle slámovou až slámovou barvu, je bez zákalu nebo opalescence. Médium uchováváme při teplotě 2–8 °C.

2.5.2. Příprava bakteriální suspenze (inokulum)

Zákalový standard pro přípravu bakteriálních suspenzí

Ke standardizaci výchozí suspenze bakterií pro stanovení citlivosti lze využít 0,5 stupně McFarlandova standardu nebo jeho optický ekvivalent. McFarlandův standard můžeme získat z komerčních zdrojů nebo si ho můžeme sami připravit podle následujícího postupu:

1. Přidáme 0,5 ml 0,048 mol.litr⁻¹ BaCl₂ (1,175% w/v BaCl₂ · 2H₂O) k 99,5 ml 0,18 mol.litr⁻¹ (0,36N) H₂SO₄ (1% v/v) za současného míchání, až se vytvoří suspenze.
2. Ověříme správnost intenzity zákalu jeho změřením ve spektrofotometru při užití kyvet o šířce 1 cm a určíme absorbanci. Absorbance při 625 nm by měla být 0,08 až 0,13 pro 0,5 stupně McFarlandova standardu.
3. Ověřený standardní roztok síranu barnatého pipetujeme v množství 4 až 6 ml do zkumavky se šroubovým uzávěrem a po uzavření uchováváme při laboratorní teplotě v temnu. Stejný typ zkumavky pak musíme používat pro přípravu bakteriální suspenze.
4. Tento standard se musí obměňovat každý měsíc a vždy je nezbytné prověřit správnost intenzity zákalu (viz bod 2).

Vlastní příprava bakteriální suspenze

Metoda přímého suspendování kolonií

1. Připravíme inokulum vytvořením suspenze přímo ve fyziologickém roztoku nebo bujónu. Ve většině standardizovaných postupů k provedení dilučních testů se využívá k přípravě inokula deionizovaná voda, ale protože někteří původci infekcí vodních živočichů mohou v tomto prostředí zažít osmotický stres, je obecně doporučováno deionizovanou vodu nepoužívat. V čisté 24 až 48h kultuře na neselektivním agaru, např. krevním agaru, vybereme tři až pět dobře izolovaných kolonií a použijeme je k přípravě suspenze.
2. Standardizujeme koncentraci inokula na 1 až 2 x 10⁸ kolonie tvořících jednotek (KTJ).ml⁻¹, což by mělo odpovídat absorbanci A₆₂₅ 0,08 až 0,13 při měření spektrometrem, 0,5 stupně McFarlandovy zákalové stupnice,

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

když použijeme kolorimetr, nebo 30 až 70 NTU (Nephelometric Turbidity Units), když použijeme zákaloměr.

2.5.3. Příprava a uchování naředěných antibakteriálních látek

Makrodiluční metoda v bujónu

1. Použijeme testační zkumavky velikosti 13 x 100 mm.
2. Použijeme kontrolní zkumavku s bujónem bez antibiotika pro každý vyšetřovaný kmen.
3. Zkumavky uzavřeme šroubovacím, plastovým nebo kovovým uzávěrem, nebo vatovou zátkou.
4. Připravíme konečná dvojnásobná ředění antibiotika v bujónu míšením zásobního roztoku a CAMHB podle tabulky č. 3 (příloha tohoto dokumentu). Nejmenší konečný objem, který budeme potřebovat pro vlastní test, je 1 ml každého ředění. Jedna pipeta se použije pro plnění ředidla (CAMHB) a přidání zásobního roztoku antibiotika do první zkumavky. Pro zbývající ředění použijeme vždy samostatnou pipetu. Je třeba počítat s tím, že účinnou látku přidáním stejného objemu suspenze inokula naředíme 1 : 1, proto ředění účinné látky připravíme v dvojnásobné koncentraci, než je požadovaná konečná koncentrace.

Mikrodiluční metoda v bujónu

Metoda se nazývá mikrodiluční proto, že plníme malé objemy do sterilní mikrotitrační destičky s jamkami s okrouhle kónickým dnem. Každá jamka by měla obsahovat 0,1 ml bujónu. Při přípravě destičky a antibakteriálních látek se řídíme tabulkou č. 2 a 3.

1. K přípravě destiček pro přímé použití nebo pro zamrazení používáme vícekanalovou pipetu nebo plnicí zařízení pro plnění jamek rovným dílem bujónu. Tedy do každé z 96 jamek destičky se naplní objem 0,05 ml bujónu. Roztoky antibakteriálních substancí jsou připraveny v dvojnásobné koncentraci, než je požadovaná koncentrace antibakteriální látky vzhledem k tomu, že po přidání 0,05 ml inokula do každé jamky dojde k výslednému ředění 1 : 1. Každá destička by měla obsahovat růstovou kontrolu (jamka se zaočkovaným bujónem bez antibakteriální látky) a negativní kontrolu (jamka s nezaočkovaným bujónem). Destička s ředěnými antibakteriálními látkami, které budou testovány, se očkuje objemem 0,1 ml inokula vyšetřované bakteriální kultury do každé z 96 jamek s výjimkou negativní kontrolní jamky.

2. Destičky těsně uzavřené v plastovém sáčku se ihned umístí do mrazicího boxu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (přednostně při $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) do té doby, než budou potřebné. Většina antibakteriálních látek je stabilních v zamrazeném stavu po několik měsíců, ale některá agens (např. ampicilin, imipenem) jsou citlivější. Nesmí se skladovat v mrazicích boxech s automatickým odmrazováním a jednou rozmrazené roztoky se nesmí znovu zamrazit. Opakované rozmrazování a zamrazování urychluje degradaci některých antibakteriálních látek, zejména betalaktamových antibiotik.

Příprava inokula pro naočkování destičky

Standardizované inokulum může být připraveno tak, jak bylo popsáno pro makrodiluční a mikrodiluční metodu.

1. Optimálně během 15 minut připravíme inokulum a očkujeme testační jamky/zkumavky odpovídajícím objemem upravené bakteriální suspenze tak, že v každé zkumavce (makrodiluční metoda) a jamce (mikrodiluční metoda) bude obsaženo přibližně 5×10^5 KTJ.ml⁻¹. **Ředící postup vedoucí k získání tohoto konečného inokula se mění v závislosti na metodě použité k přidání inokula do jednotlivých jamek nebo zkumavek a podle mikroorganismu, který je testovaný (viz bod 2 a 3).**
2. Při mikrodilučních testech musí být známý přesný objem přenášený do jamek, aby mohl být proveden výpočet koncentrace bakterií. Například, jestliže je objem média v jamce 0,1 ml a objem inokula je 0,005 ml, pak suspenze o denzitě 0,5 stupně McFarlandovy stupnice (1×10^8 KTJ.ml⁻¹) by měla být ředěna 1 : 9, abychom získali 10^7 KTJ.ml⁻¹. Když 0,005 ml této suspenze je očkováno do bujónu, konečná koncentrace bakterií by měla být přibližně 5×10^5 KTJ.ml⁻¹ (odpovídá 5×10^4 KTJ na jamku u mikrodiluční metody). Dejte pozor, aby při použití zamrazených testů v destičkách byl dodržen v každé jamce požadovaný objem.
3. Laboratoře by měly být vedeny k tomu, aby pravidelně prováděly kontrolu počtu bakterií v suspenzi kultivačním vyšetřením, aby se ujistily, že výsledná koncentrace bakterií v prováděných testech citlivosti je přibližně 5×10^5 KTJ.ml⁻¹. To lze snadno provést odebráním 0,01 ml z jamky/zkumavky s kontrolou růstu po naočkování a ředit ve sterilním fyziologickém roztoku 1 : 1 000. Po promíchání 0,1 ml naředěného inokula rozetřeme na povrch vhodného agarového média. Po inkubaci bychom měli získat přibližně 50 kolonií, což bude dokazovat, že hustota inokula splnila předepsanou koncentraci 5×10^5 KTJ.ml⁻¹.

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

Očkování makrodilučních testů ve zkumavkách a mikrodilučních testů v destičkách

Očkování makrodilučních testů ve zkumavkách

Během 15 minut po standardizaci hustoty inokula (viz kapitola 2.5.3.) přidáme 1 ml inokula do každé zkumavky, která již obsahuje 1 ml roztoku antibakteriální látky ve zvolené řadě ředění. Navíc je zařazena zkumavka s bujónem bez antibakteriální látky, která slouží jako pozitivní kontrola. Obsah každé zkumavky zamícháme a získáme tak ředění antibakteriální látky 1 : 1 a ředění inokula 1 : 1.

Doporučuje se zkontrolovat čistotu inokula vyočkováním na neselektivní agarové médium, které paralelně inkubujeme s testovanými zkumavkami.

Očkování mikrodilučních testů v destičkách

Čerstvě připravenou nebo rozmrazenou suchou destičku očkujeme pipetováním inokula nebo jeho hromadným nanesením s využitím replikátoru (multiinokulátoru). Stejně jako u makrometody je optimální naředit inokulum během 15 minut po standardizaci hustoty. Pokud by objem inokula překročil 10 % stávajícího objemu jamky, je třeba brát v úvahu ředící účinek inokula na antibakteriální látku. Obvykle je v připravených destičkách užíváno ředění 1 : 1 (0,05 ml roztoku antibakteriální látky + 0,05 ml inokula).

Do každé jamky destičky obsahující 100 µl zředěné antibakteriální látky v bujónu se přidá maximálně 5 µl suspenze zředěného inokula (multikanálovou pipetou přesně 5 µl nebo inokulátorem – ježkem).

Doporučuje se zkontrolovat čistotu inokula vyočkováním na neselektivní agarové médium, které paralelně inkubujeme s testovanými zkumavkami. Každou uzavřenou destičku umístíme před inkubaci do plastického sáčku, abychom zabránili vysychání.

Ihned po naočkování se ověří skutečná hustota inokula. Z jamky pozitivní kontroly růstu se odebere 10 µl bakteriální suspenze, která se následně zředí v 10 ml bujónu nebo fyziologického roztoku. Z tohoto ředění se přenesou 100 µl kultury na vhodnou agarovou půdu, která se inkubuje podle náročnosti vyšetřovaného druhu bakteriální kultury. Zkouška se považuje za vyhovující, pokud na agarové půdě vyroste 20 až 80 kolonií.

Ověření bakteriální čistoty: Z jamky bez antibakteriální látky (pozice 12A na destičce) se odebere 100 µl, ty se kultivují na neselektivním agarovém médiu, které se inkubuje podle náročnosti vyšetřovaného druhu bakteriální kultury.

Před inkubací se mikrotitrační destičky uzavrou těsnícím víčkem nebo lepicí fólií.

2.5.4. Inkubace

Makrodiluční nebo mikrodiluční testy inkubujeme při 22 ± 2 °C po dobu 24 až 28 hodin a/nebo 44 až 48 hodin; nebo při 28 ± 2 °C po dobu 24 až 28 hodin v inkubátoru za aerobních podmínek. Pro udržení stejné inkubační teploty a správné cirkulace vzduchu pro všechny kultury se doporučuje omezit vršení destiček na sebe na minimum.

2.5.5. Stanovení MIC, tzv. *end point* a interpretace výsledků

Všeobecně, MIC stanovená u gramnegativních tyčinek mikrodiluční metodou je buď stejná, nebo o jedno či dvojnásobné ředění nižší než srovnatelná MIC dosažená makrodiluční metodou. To by mělo být bráno v úvahu při porovnávání výsledků získaných standardním postupem a těch docílených agar- diluční metodou nebo technikou difuze v gradientu (E test). Pro takové případy by měla být provedena odpovídající validační studie.

Výsledky se odečítají po dosažení dostatečného nárůstu mikroorganismu (sediment nebo zřetelný zákal) a po ověření čistoty bakteriální kultury a příslušné koncentrace inokula.

Pro odečtení výsledků může být využito zobrazovací zařízení, které usnadňuje odečtení výsledků a zaznamenání výsledků mikrodilučních testů, pokud se nepřipustí žádný kompromis ve schopnosti rozlišit růst v jamkách. Porovnáváme intenzitu růstu ve zkumavkách nebo jamkách obsahujících antibakteriální látky s intenzitou růstu v pozitivních kontrolách růstu (bez antibakteriálních látek), které jsou v každé sestavě testů. Za platné a přijatelné výsledky jsou považovány např. sediment ≥ 2 mm (viz obr. 1) nebo odpovídající zákal v pozitivní kontrole růstu. V případě trimetoprimu a sulfonamidů mohou antagonisté těchto sloučenin dovolit pouze slabý růst, proto odečítáme *end point* jako koncentraci, při které je 80% nebo větší potlačení růstu, nebo 20% hustota růstu ve srovnání s pozitivní kontrolou růstu.

Když se při odečítání výsledků dilučního testu vyskytne inhibice růstu v jedné jamce nebo zkumavce v souvislé řadě testu (náhodné vynechání), zaznamenáme vyšší ze dvou MIC. Pokud dojde k vynechání více než jedné jamky, pak výsledky neodečítáme a test zopakujeme.

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

Interpretační kritéria byla doposud stanovena pouze pro izoláty *Aeromonas salmonicida* pro oxytetracyklin a kyselinu oxolinovou (tabulka č. 4). Pro další antibakteriální látky byla zavedena zatím pouze tzv. epidemiologická „cut off“ (tabulka č. 5). U dalších příbuzných druhů je třeba kritéria odvodit z těchto údajů, ale pouze pro orientační posouzení.



Obr. 1. Stanovení MIC metodou zředování antibakteriální látky v bujónu: mikrotitrační destička před odečtením výsledků (A) a detail mikrotitrační destičky s patrným projevem růstu v podobě knoflíčkovitého sedimentu na dně jamek a s inhibicí růstu v prvních třech jamkách první A řady (B) (foto A. Čížek).

2.5.6. Kontrola kvality

Účel

Účelem zavedení programu kontroly kvality je napomoci sledování:

- přesnosti (opakovatelnosti) a správnosti postupu testování citlivosti,
- spolehlivosti činidel využívaných při testování,
- spolehlivosti pracovníků, kteří provádějí kultivace a odečítání výsledků.

Toho lze nejlépe dosáhnout používáním kontrolních kmenů se známou citlivostí k testovaným antibakteriálním látkám.

Odpovědnost za kontrolu kvality

Moderní laboratoře jsou při zajišťování reagensů, médií a testovacích systémů pro provedení testování antibakteriální citlivosti velmi závislé na komerčních farmaceutických a diagnostických produktech. Přestože se jedná o standardní metody, je možné využívat některé komerčně dostupné systémy testování, které vycházejí hlavně nebo zčásti z těchto metod.

Logické rozčlenění odpovědnosti může být následující:

- Výrobci
 - Antibakteriální stabilita, označování antibakteriální látky, účinnost zásobního roztoku antibakteriální látky, vyhovění státnímu systému regulace, celistvost produktu.
- Uživatel (laborať)
 - Uchování za podmínek doporučených výrobcem (zabránění znehodnocení).
 - Způsobilost laboratorních pracovníků provádět testy.
 - Dodržování zavedených postupů (např. příprava inokula, podmínky inkubace, interpretace výsledků).

Výrobci by měli doporučit program kontroly kvality, který uživatelům umožňuje hodnotit faktory (např. hustotu inokula, podmínky přepravy a uchování), které mohou s největší pravděpodobností působit problémy při použití, a stanovit vhodnost testu, když je proveden podle zavedeného protokolu.

Referenční kmeny

Vhodné referenční kmeny vybrané pro kontrolu kvality dilučního testu v bujónu by měly poskytovat MIC hodnoty, které spadají do blízkosti středu koncentračního rozpětí přijatých hodnot, které jsou běžné pro vyšetřované patogenní bakterie (např. ideální je inhibice růstu kontrolního kmene ve čtvrtém ředění v sérii sedmi ředění, ale kmeny s hodnotou MIC ve třetím nebo pátém ředění by měly být také přijatelné). Další informace je možné nalézt v dokumentu CLSI (2014b).

Pokud tři nebo méně přílehlých ředění antibakteriální substance jsou testovány těmito metodami, musí být metody pro kontrolu kvality modifikovány. Vhodnou alternativou je užití kontrolního kmene s MIC, která je stejná nebo ne menší než o jedno dvojnásobné ředění nižší koncentrace, a druhý kontrolní kmen má hodnotu MIC, která je stejná nebo ne vyšší

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

než o jedno dvojnásobné ředění vyšší koncentrace. Kombinace výsledků odvozených z testování těchto dvou kmenů by měla poskytnout nejméně jeden *end point* v testované škále ředění.

V současné době se doporučuje využívat ke kontrole kvality kterýkoliv z následujících kmenů: *Escherichia coli* ATCC 25922 (CCM 3954) a *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 (CCM 7246¹).

Kmen *E. coli* ATCC 25922 byl zvolen jako kontrolní pro jeho široký rozsah teplotní tolerance, široké spektrum citlivosti a také proto, že je již běžně užíván v zavedených veterinárních vyšetřovacích metodikách.

Kmen *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 byl vybrán pro kontrolu kvality, protože vykazuje relativně nízké hodnoty MIC u některých antibakteriálních substancí (např. erytromycin, chloramfenikol), které jsou u *E. coli* vysoké. Některé kmeny *A. salmonicida* tvoří „A-layer“, povrchovou vrstvu spojenou s virulencí a autoagregací. Po opakovaných pasážích na médiích při vyšších teplotách než je optimální teplota pro *A. salmonicida* se tento genotyp ztratí. Kontrolní kmen ATCC 33658 A-layer netvoří. Přítomnost či nepřítomnost této vrstvy může ovlivnit výsledek citlivosti vůči některým antibakteriálním látkám, proto by laboratoře měly, jestliže nastanou problémy, kontrolovat takový genotyp izolátů používáním tohoto kmene ke kontrole kvality.

Další kontrolní kmeny, které lze využít ke kontrole kvality, jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Uchování referenčních kmenů

Prodloužené uchování kmenů je možné při teplotě -20 °C nebo nižší (preferovat bychom měli teplotu -60 °C nebo nižší nebo tekutý dusík) ve vhodném kryoprotektivním médiu (např. bujón s 50 % telecího fetálního séra, 10% až 15% glycerol v tryptózo-sójovém bujónu, defibrinovaná ovčí krev nebo odstředěné mléko), nebo v lyofilizovaném stavu.

Pracovní kultury se uchovávají na tryptózo-sójovém šikmém agaru při 2 až 8 °C a subkultivují se každý týden, ne však více než 3 po sobě jdoucí týdny. Pracovní kultury se připravují ze zamrazených kultur každý měsíc nebo se získají komerční kultury např. ve formě želatinových disků z České sbírky mikroorganismů.

Kultury získané kultivací ze zamrazených a lyofilizovaných kmenů musí být dvakrát subkultivovány před vlastním zařazením do testování citlivosti. Kolonie se nechají narůst nebo se suspendují pro následné testování podle doporučených postupů přípravy inokula.

Kontrolní kmeny mohou být použity ke sledování přesnosti (opakovatelnosti) a správnosti dilučního testu v bujónu, pokud není zjištěna významná změna v hodnotě MIC, která nemůže být přisuzována metodické chybě. Jestliže získáme nevysvětlitelné výsledky, které ukazují změnu vlastní citlivosti mikroorganismu, je třeba získat novou kulturu kontrolního kmene.

Kontrola médií a materiálu

Testujeme každou novou šarži/várku zkumavek nebo destiček odpovídajícím kontrolním kmenem, a jestliže získané MIC hodnoty spadají do přijatelného rozsahu (tabulky č. 6 až 10), médium vyhovuje. Pokud jsou hodnoty mimo přijatelný rozsah, pak šarže/várka média nevyhovuje.

U každé várky média alespoň jednu zkumavku nebo mikrotitrační destičku s rozplněným bujónem inkubujeme přes noc, abychom mohli posoudit sterilitu připravené várky média.

2.5.7. Četnost testování kvality

Když je testování MIC prováděno méně než jedenkrát týdně, měla by být testována kvalita paralelně v ten den, kdy provádíme vyšetřování. Pokud se vyšetřuje MIC častěji, může být kontrola kvality prováděna denně, a jestliže jsou výsledky přijatelné, testujeme s využitím kontrolních kmenů jednou týdně.

Každodenní testování

Za vyhovující je při každodenním testování kvality považováno, když ne více než 3 ze 30 po sobě jdoucích výsledků pro každou jednotlivou kombinaci antibakteriální látka/mikroorganismus přesáhnou přijatelné limity uvedené v tabulkách č. 6 až 10. Laboratoř musí provést nápravná opatření, pokud je tato frekvence překročena.

Týdenní testování

Musí být provedeno odpovídající šetření kvality, aby bylo možné přejít z každodenní na týdenní kontrolu kvality.

1. Testujeme všechny kontrolní kmeny po 20 nebo 30 po sobě jdoucích dnů a zaznamenáme výsledky.
2. Na týdenní testování kvality přejdeme, pokud ne více než jeden z 20 nebo 3 ze 30 hodnot MIC pro každou kombinaci antibakteriální substance/mikroorganismus nepřesáhnou přijatelné rozsahy MIC hodnot uvedené v tabulkách č. 6 až 10.

2.5.8. Nápravná opatření

Neshodný výsledek v důsledku evidentní chyby

Evidentní chyby zahrnují: (i) použití nevhodného kontrolního kmene, (ii) evidentní kontaminaci kontrolního kmene nebo média a (iii) použití nevhodné inkubační teploty nebo jiných podmínek inkubace.

V takových případech příčinu chyby zaznamenáme a opakovaně kontrolní kmen testujeme ve stejný den, kdy byla chyba zjištěna. Pokud jsou získané výsledky v přijatelném rozmezí hodnot, není zapotřebí žádné nápravné opatření.

Neshodný výsledek bez zjevné chyby

Okamžitá nápravná opatření

Jestliže je zjištěn výsledek, který neodpovídá přijatým kritériím kvality rozsahu MIC u kontrolních kmenů, je třeba okamžitě provést nápravná opatření:

- Test/postup, ve kterém byla zjištěna chyba, musí být přezkoumán a sledován v každodenním intervalu 5 po sobě jdoucích dnů a všechny výsledky musí být dokumentovány.
- Jestliže všech 5 hodnot MIC naměřených u příslušné kombinace antibakteriální látka/kontrolní kmen odpovídá přijatým kritériím kvality uvedené v tabulkách č. 6 až 10, pak není třeba zavádět nápravná opatření.
- Jestliže některá z pěti hodnot MIC je mimo přijatá kritéria kvality, je nezbytné provést dodatečná nápravná opatření podle kapitoly 2.5.9. – části Kontrola čistoty.
- Každodenní kontrolní vyšetření musí pokračovat, dokud není problém vyřešen.

Dodatečná nápravná opatření

Pokud okamžitá nápravná opatření neshodný výsledek nevyřeší, pak se pravděpodobně jedná o systémovou nebo náhodnou chybu. Měly by být prověřeny následující zdroje chyb:

- expirace standardu pro měření zákalu, jeho správná příprava a promíchání před použitím, kalibrace měřičů zákalu,
- expirace všeho použitého materiálu a správnost podmínek jeho uchování,

- správnost inkubační teploty a atmosféry,
- správnost měření průměrů a přepisu hodnot,
- správnost funkce ostatních zařízení (např. pipet),
- odpovídající teplota při uchovávání destiček,
- vyloučení záměny nebo kontaminace referenčních kontrolních kmenů,
- správnost postupu při přípravě a úpravě suspenze,
- adekvátnost podmínek inkubace kultury kontrolního kmene před přípravou suspenze.

Může se ukázat nezbytné získat nové kontrolní kmeny (ze zamrazení nebo spolehlivého zdroje) a nové šarže dalšího materiálu (včetně standardů pro měření zákalu), nejlépe od různých dodavatelů. Užitečné může být dvoustranné porovnání s jinou laboratoří, která používá stejnou metodu vyšetření.

Jakmile je příčina neshodného výsledku odhalena, můžeme se vrátit ke každodennímu testování kvality, a to za předpokladu, že evidujeme vyhovující výsledky kontroly kvality po dalších 20 až 30 po sobě jdoucích dnech.

2.5.9. Další kontrolní postupy

Kontrola růstu

Každá mikrotitrační destička nebo řada zkumavek při makrodilučním testu pro testování citlivosti obsahuje růstové kontroly, které tvoří základní bujón bez antibakteriální látky, a ty slouží k ověření životnosti testované bakteriální kultury. Současně se tyto růstové kontroly využívají při odečítání „end pointu“ u potencovaných sulfonamidů.

Kontrola čistoty

Následně po posouzení růstových kontrol (pozitivní kontrola) z nich provedeme vyočkování na vhodné agarové médium a inkubujeme s cílem vyloučit kontaminaci.

Kontrola inokula

Okamžitě po zaočkování růstových kontrol provedeme počítáním KTJ v desetinásobných ředěních inokula po jejich vyočkování a inkubaci na vhodném agarovém médiu.

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

Kontrola k rozlišení „end point“

Rozlišení „end pointu“ je pravidelně posuzováno, aby se minimalizovaly rozdíly v hodnocení MIC („end pointů“) mezi prohlížiteli. Laboratorní personál, který provádí tyto metody, by měl nezávisle odečíst sestavu vybraných dilučních testů. Výsledky se zaznamenávají a porovnávají s výsledky zkušeného pracovníka. Všechny odečtené výsledky by měly souhlasit v mezích \pm jednoho dvojnásobného ředění.

2.6. Postup stanovení citlivosti diskovou difúzní metodou

2.6.1. Příprava média

Získáme Mueller-Hintonův agar (M-HA) z ověřených zdrojů (Oxoid, Difco a další) a připravíme destilovanou vodu nebo deionizovanou vodu (vodivost nesmí přesáhnout 10 μ S).

M-HA připravíme podle instrukcí v příbalovém letáku a kontrolujeme pH agaru, které by mělo být při laboratorní teplotě v rozmezí 7,2 až 7,4. M-HA sterilizujeme podle objemu připravovaného média, po sterilizaci temperujeme ve vodní lázni na teplotu 45 až 50 °C a pak plníme do sterilních Petriho misek tak, aby výška agaru dosahovala 4 mm (tj. 25–30 ml na misku o průměru 100 mm), přitom omezíme tvorbu bublin a necháme agar zchladnout při laboratorní teplotě. Každá agarová půda musí být před kultivací bez kapek kondenzní vody. Proto, je-li to nutné, vysušíme misky v inkubátoru při 28 až 37 °C, nebo v laminárním boxu s pootevřeným víčkem po dobu maximálně 30 minut. U reprezentativního počtu misek z příslušné várky se kontroluje sterilita inkubací při 28 až 35 \pm 2 °C po dobu 24 hodin nebo déle. Média mohou být skladována v chladničce po 7 dnů ve vzduchotěsném obalu, aby se omezilo vysychání.

2.6.2. Příprava inokula

1. Standardizované inokulum se připravuje suspendováním kolonií z 24hodinové (u pomalu rostoucích bakterií 48 až 72 h) kultury vypěstované při teplotě, která bude použita pro testování citlivosti. K izolaci použijeme živné, neselektivní médium, jako například krevní agar nebo živný agar.
2. Inokulum připravíme suspendováním minimálně 3 kolonií ze startovací kultury přímo ve sterilním fyziologickém roztoku nebo bujónu. Inokulum

standardizujeme na koncentraci 1 až 2×10^8 KTJ.ml⁻¹, což by mělo korelovat s optickou denzitou OD₆₂₅ 0,08 až 0,13 při užití spektrofotometru; 0,5 stupněm McFarlandovy zákalové škály; nebo 60 nefelometrickými jednotkami. **Pro bakterie izolované z ryb je doporučováno ověřit tuto koncentraci rutinním kultivačním vyšetřením desetinásobných ředění testované kultury.**

3. Alternativně, pokud chybí potřebné vybavení, lze použít metodu prostého porovnání připravované suspenze se standardem 0,5 stupně McFarlandovy zákalové škály proti bílému pozadí se silnými černými čarami (čárová metoda). Před kterýmkoliv měřením zákalu je nutné suspenzi intenzivně promíchat na třepačce (Vortex). Jestliže testovaný kmen autoaglutinuje, je třeba kulturu rovněž důkladně protřepat. Tento postup dává srovnatelné výsledky pro řadu bakteriálních druhů, přesto pečlivě ověřujeme koncentraci kultivačním stanovením počtu KTJ, a to zejména u bakterií patogenních pro ryby, dokud nezískáme dostatek údajů pro validaci postupu přípravy inokula kultur, které rutinně nevyšetřujeme.
4. Nejpozději do 15 minut od přípravy ponoříme sterilní vatový tampon do standardizované suspenze. Přebytek suspenze odstraníme rotací tamponu o stěnu zkumavky.
5. Naočkujeme celý povrch M-HA tamponem, s kterým během kultivace otáčíme na povrchu agarů. Pootočíme misku o 60° a naočkujeme celý povrch agarů stejným postupem, opět pootočíme o 60° a kultivujeme celý povrch agarů stejným způsobem.
6. Pokud byla média správně připravena, není třeba po kultivaci M-HA vysušovat. V opačném případě pootevřeme misku k vysušení při laboratorní teplotě a přitom zajistíme aseptické podmínky, nejdéle však na 15 minut.

2.6.3. Aplikace disků

1. Prověříme obsah antibakteriální látky v discích (doporučené koncentrace látek najdeme v tabulkách č. 11 až 13). Disky skladujeme podle instrukcí výrobce. Pokud nejsou příslušné disky komerčně vyráběny, lze je připravit podle dokumentovaného postupu (CLSI, 2006a).
2. Aplikátorem (obr. 2) nanese maximálně 5 disků na misku o průměru 100 mm a 12 disků na misku o průměru 150 mm. Minimální vzdálenost mezi středy disků by měla být 24 mm. Jestliže se inhibiční zóny překrývají, snížíme počet disků na misce. Nikdy nepřemísťujeme disky, které již byly v kontaktu s povrchem agarů.

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM



Obr. 2. Aplikátor disků (foto A. Čížek).

2.6.4. Inkubace

1. Misky neinkubujeme před vlastním nanesením disků.
2. Inkubujeme všechny misky aerobně, buď při 22 ± 2 °C nebo 28 ± 2 °C, a to co nejdříve po nanesení disků. Zajistíme dostatečnou vlhkost během inkubace např. vložením misek do mikrotenového sáčku.
3. Standardní doba inkubace je 24 až 28 h při 28 ± 2 °C a 44 až 48 h při použití 22 ± 2 °C.

2.6.5. Odečítání výsledků

1. V procházejícím světle měříme zóny inhibice růstu. Pokud se zjistí jednotlivé kolonie v inhibiční zóně, je třeba je reizolovat, ověřit identitu kultury a opakovaně zjistit její citlivost.
2. Průměr zón měříme kalibrovaným digitálním nebo posuvným měřítkem nebo pravítkem v celých milimetrech.

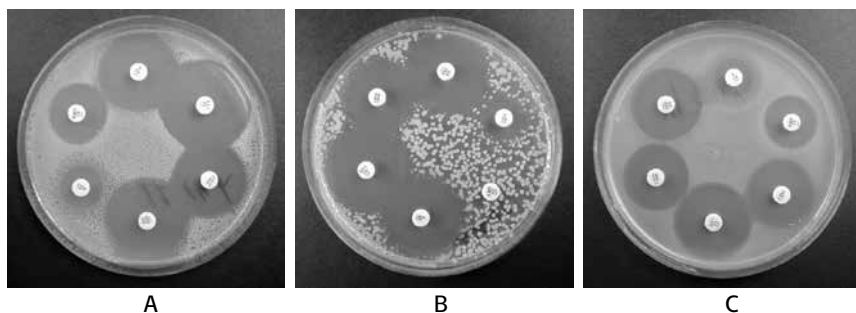
Obrázek 3 znázorňuje výsledek difuzní diskové metody při různých hustotách inokula.

2.6.6. Interpretace výsledků

Doposud byla přijata interpretační kritéria pro izoláty *Aeromonas salmonicida* pro posouzení citlivosti vůči oxytetracyklinu a kyselině oxolinové. Tato kritéria lze jen orientačně využít pro další zástupce rodu *Aeromonas*. Pro zástupce z čeledi Enterobacteriaceae a rodu *Pseudomonas* by bylo možné odvodit kritéria pro posouzení citlivosti z dokumentu VET01-S2 (CLSI, 2013). Přijatá interpretační kritéria jsou uvedena v tabulkách č. 11 a 12.

2.6.7. Nepřijatelná kritéria

- Příliš řídké inokulum (kolonie se nedotýkají).
- Zóny inhibice se překrývají (obr. 3a, b).



Obr. 3. Disková difúzní metoda: výsledek použití optimální hustoty inokula (A), příliš řídkého inokula (B) a příliš hustého inokula (C) (foto A. Čížek).

2.6.8. Postupy kontroly kvality

Účel použití

Účelem zavedení programu kontroly kvality je sledování následujících ukazatelů:

- přesnosti (opakovatelnosti) a správnosti postupu testování citlivosti,
- spolehlivosti činidel využívaných při testování,
- spolehlivosti pracovníků, kteří provádějí testování a odečítání výsledků.

Tyto cíle lze nejlépe dosáhnout používáním kontrolních kmenů se známou citlivostí k testovaným antibakteriálním látkám.

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

Referenční kmeny

V současnosti jsou doporučovány pro kontrolu kvality diskové difúzní metody při 22 ± 2 °C nebo 28 ± 2 °C následující kontrolní kmeny: *E. coli* ATCC 25922 (CCM 3954) a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 (CCM 7246¹).

Kmen *E. coli* ATCC 25922 byl zvolen jako kontrolní pro jeho široký rozsah teplotní tolerance, široké spektrum citlivosti a také proto, že je již běžně užíván v zavedených veterinárních vyšetřovacích metodikách. Kmen *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 byl vybrán pro kontrolu kvality, protože vykazuje citlivost vůči některým antibakteriálním substancím (např. erytromycin – 15 µg na disk, chloramfenikol – 15 µg na disk), které u *E. coli* dávají při kontrole kvality příliš malé zóny inhibice.

Uchování kontrolních kmenů se provádí za podmínek popsaných v kapitole 2.5.7.

Kontrola M-HA a disků

Testujeme každou novou šarži/várku M-HA a testačních disků. Postupujeme podle kapitoly 2.6.1. až 2.6.5.

2.6.9. Četnost testování kvality

Každodenní testování

Za vyhovující je při každodenním testování kvality považováno, když ne více než 1 z 20 nebo ne více než 3 ze 30 po sobě jdoucích výsledků pro každou kombinaci antibakteriální látka/mikroorganismus přesáhnou přijatelné limity uvedené v tabulkách 13, 14 nebo 15. Laboratoř musí provést nápravná opatření, pokud je tato četnost neshodné práce překročena.

Týdenní testování

Přechod z každodenní na týdenní kontrolu kvality může následovat až po předvedení odpovídajícího šetření kvality.

- Testujeme všechny kontrolní kmeny po 20 nebo 30 po sobě jdoucích dnů a zaznamenáme výsledky.
- Na týdenní testování kvality přejdeme, pokud ne více než 1 z 20 nebo 3 ze 30 hodnot průměru zón pro každou kombinaci antibakteriální

substance/mikroorganismus nepřesáhnou přijatelné rozsahy průměrů zón uvedené v tabulce č. 13, 14 nebo 15.

2.6.10. Nápravná opatření

Neshodný výsledek v důsledku evidentní chyby

Evidentní chyby zahrnují:

- použití špatného disku,
- ztrátu účinnosti antibakteriální látky v disku v průběhu skladování nebo manipulace v laboratoři,
- použití nevhodného kontrolního kmene,
- evidentní kontaminaci kontrolního kmene, nebo
- použití nevhodné inkubační teploty nebo jiných podmínek inkubace.

V takových případech příčinu chyby zaznamenáme a opakovaně kmen testujeme ve stejný den, kdy byla chyba zjištěna. Pokud jsou získané výsledky v přijatelném rozmezí hodnot, není zapotřebí žádné nápravné opatření.

Neshodný výsledek bez zjevné chyby

Okamžitá nápravná opatření

Jestliže je zjištěn výsledek, který neodpovídá přijatým kritériím kvality diskové difúzní metody, je třeba okamžitě provést nápravná opatření:

- Test/postup, ve kterém byla zjištěna chyba, musí být přezkoumán a sledován v každodenním intervalu 5 po sobě jdoucích dnů a výsledky musí být dokumentovány.
- Jestliže průměry zón naměřené u příslušné kombinace antibakteriální látka/kontrolní kmen odpovídají přijatým kritériím kvality uvedeným v tabulce 13, 14 nebo 15, pak není třeba zavádět nápravná opatření.
- Jestliže některý z pěti rozměrů inhibiční zóny je mimo přijatá kritéria kvality, je nezbytné provést dodatečná nápravná opatření (viz níže).
- Každodenní kontrolní vyšetření musí pokračovat, dokud není problém vyřešen.

Dodatečná nápravná opatření

Pokud okamžitá nápravná opatření nevyřeší neshodný výsledek, pak se pravděpodobně jedná o systémovou nebo náhodnou chybu. Měly by být prověřeny následující zdroje chyb:

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

- správnost měření průměrů a přepisu hodnot,
- expirace standardu pro měření zákalu, jeho správná příprava a promíchání před použitím, kalibrace měřičů zákalu,
- expirace všeho použitého materiálu a správnost podmínek jeho uchování,
- správnost inkubační teploty,
- kontaminace referenčních kontrolních kmenů,
- příprava a úprava suspenze,
- adekvátnost podmínek inkubace kultury kontrolního kmene.

Může být nezbytné získat nové kontrolní kmeny (ze zamrazení nebo spolehlivého zdroje) a nové šarže dalšího materiálu (včetně standardů pro měření zákalu), nejlépe od různých dodavatelů. Užitečné může být dvoustranné porovnání s jinou laboratoří, která používá stejnou metodu vyšetření. Jakmile je příčina neshodného výsledku odhalena, můžeme se vrátit ke každotýdennímu testování kvality, a to za předpokladu, že evidujeme vyhovující výsledky kontroly kvality po dalších 20 až 30 po sobě jdoucích dnů.

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V současné době se citlivost vůči antibakteriálním látkám u bakterií z vodních živočichů testuje nestandardně aplikací metodik pro teplokrevná zvířata. Této metodiky je možné využít k testování citlivosti podle standardních metodik, takže získané výsledky mohou být srovnatelné mezi laboratořemi na národní i mezinárodní úrovni. To je důležité pro hodnocení situace ve vývoji antibiotické rezistence v globálním měřítku a při zavádění nových účinnějších antibakteriálních přípravků pro léčbu bakteriálních infekcí ryb.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena pro veterinární diagnostické laboratoře, výzkumné laboratoře, soukromé veterinární laboratoře a Státní veterinární ústavy.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Na základě včasné a přesné diagnostiky citlivosti původců bakterióz ryb vůči antibakteriálním látkám a následné správné interpretace zjištěných výsledků mohou být přijata účinnější opatření k jejich zdolání a zabránění jejich dalšímu šíření. Takto mohou být omezeny ekonomické ztráty v důsledku hromadného hynutí ryb.

6. SEZNAM POUŽITÉ A SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Austin, B., Austin, D., 2007. Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish. Fourth Edition. Springer Praxis Publishing Ltd. Chichester, UK, 552 pp.
- CLSI, 2006a. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; approved guideline. CLSI document M42-A, Vol. 26, No. 23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 43 pp.
- CLSI, 2006b. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; approved guideline. CLSI document M49-A, Vol. 26, No. 24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 48 pp.
- CLSI, 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; second informational supplement. CLSI document VET01-S2, Vol. 33, No. 8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 63 pp.
- CLSI, 2014a. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; approved guideline – second edition. CLSI document VET04-A2, Vol. 34, No. 14. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 44 pp.
- CLSI, 2014b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; second informational supplement. CLSI document VET03/VET04-S2 -A2, Vol. 34, No. 15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 38 pp.
- Kolářová, J., Nepejchalová, L., 2014. Terapeutické možnosti v chovech ryb ČR – přehled. Veterinářství 64 (7): 533–538.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Cizek, A., Dolejska, M., Sochorova, R., Strachotova, K., Piackova, V., Vesely, T., 2010. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Microbiology* 142 (3–4): 435–439. (dedikace: MZe-NAZV QH71057, MSM6007665809)
- Čížek, A., Manga, I., Masaříková M., 2014. Využití hmotnostní spektrometrie MALDI TOF a polymerázové řetězové reakce ke konfirmaci suspektních kultur *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* a *Yersinia ruckeri*. Certifikovaná metodika R07/2013, první vydání, Mendelova univerzita v Brně, Brno, 30 s. (dedikace: MZe ČR NAZV KUS QJ1210013)
- Piačková, V., Čížek, A., Veselý T., Pokorová, D., 2013. Odběr vzorků pro bakteriologické a virologické vyšetření ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 142, 26 s. (dedikace: CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024, NAZV QJ1210237, MZE 0002716202)
- Dobiasova, H., Kutilova, I., Piackova, V., Vesely, T., Cizek, A., Dolejska, M., 2014. Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Veterinary Microbiology* 171 (3–4): 413–421. (dedikace: NAZV QJ1210237, MZE0002716202, CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068 , CZ.1.05/2.1.00/01.0024)

8. PŘÍLOHA – TABULKOVÁ ČÁST

Tab. 1. Přijatelné meze MIC v $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pro referenční kmeny testované v M-H (Mueller-Hinton) bujónu při $35 \pm 2^\circ\text{C}$ po době inkubace 16 až 20 hodin.

Antibakteriální látka	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619
Amikacin	1–4	64–256	0,5–4	1–4	–
Amoxicillin	–	–	–	–	0,03–0,12
Amoxicillin-klavulanát	0,12/0,06–0,5/0,25	0,25/0,12–1,0/0,5	2/1–8/4	–	0,03/0,015–0,12/0,06
Ampicillin	0,5–2	0,5–2	2–8	–	0,06–0,25
Apramycin	2–8	–	2–16	2–16	–
Cefazolin	0,25–1	–	1–4	–	–
Cefovecin	0,5–2	–	0,5–2	512–2048	0,12–0,5
Cefoxitin	1–4	–	2–8	–	–
Cefpodoxim	1–8	–	0,25–1	–	0,03–0,12
Cefquinom	0,25–2	–	0,03–0,12	–	0,015–0,06
Ceftiofur	0,25–1,0	–	0,25–1	16–64	0,12–0,5
Cephalothin	0,12–0,5	–	4–16	–	0,5–2
Clindamycin	0,06–0,25	4–16	–	–	0,03–0,12
Danofloxacin	0,06–0,25	0,25–1	0,008–0,06	0,5–2	–
Difloxacin	0,06–0,5	1–4	0,015–0,12	1–8	–
Doxycyklin	0,12–0,5	2–8	0,5–2	–	0,015–0,12
Enrofloxacin	0,03–0,12	0,12–1	0,008–0,03	1–4	–
Erythromycin	0,25–1	1–4	–	–	0,03–0,12
Florfenicol	2–8	2–8	2–8	–	1–4
Flumequin	–	–	0,25–1	–	–
Fosfomycin	0,5–4	32–128	0,5–2	2–8	–
Gentamicin	0,12–1	4–16	0,25–1	0,5–2	–
Chloramfenikol	2–16	4–16	2–8	–	2–8
Imipenem	0,015–0,06	0,5–2	0,06–0,25	1–4	0,03–0,12
Kanamycin	1–4	16–64	1–4	–	–
Kyselina nalidixová	–	–	1–4	–	–

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ
ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

Antibakteriální látka	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619
Kyselina oxolinová	-	-	0,06–0,25	-	-
Marbofloxacin	0,12–0,5	0,5–2	0,008–0,03	0,5–2	-
Minocyklin	0,06–0,5	1–4	0,25–1	-	-
Nitrofurantoin	8–32	4–16	4–16	-	4–16
Orbifloxacin	0,25–2	1–8	0,015–0,12	2–16	-
Ormetoprim-sulfadimethoxin (1/19)	-	-	0,06/1,2–1/19	-	-
Oxacillin	0,12–0,5	8–32	-	-	-
Oxytetracyklin	-	-	0,5–4	-	-
Penicillin	0,25–2	1–4	-	-	0,25–1
Penicillin-novobiocin	0,015/0,03–0,06/0,12	0,25/0,5–2/4	> 8/16	-	-
Pirlimycin	0,25–1,0	2–8	-	-	-
Pradofloxacin	0,03–0,12	0,12–0,5	0,008–0,03	0,25–1	-
Rifampin	0,004–0,016	0,5–4	4–16	16–64	0,016–0,06
Spectinomycin	64–256	64–256	8–64	≥ 256	-
Sulfisoxazol	32–128	32–128	8–32	-	-
Tetracyklin	0,12–1	8–32	0,5–2	8–32	0,06–0,5
Tiamulin	0,5–2	-	-	-	0,5–4
Ticarcillin	2–8	16–64	4–16	8–32	-
Ticarcillin-klavulanát	0,5/2–2/2	16/2–64/2	4/2–16/2	8/2–32/2	-
Tilmicosin	1–4	8–32	-	-	-
Trimethoprim	1–4	-	0,5–2	-	-
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1/19)	≤ 0,5/9,5	≤ 0,5/9,5	≤ 0,5/9,5	8/152–32/608	0,12/2,4–1/19
Tulathromycin	2–8	4–32	-	-	0,12–1
Tylosin	0,5–4	0,5–4	-	-	-
Vancomycin	0,5–2	1–	-	-	0,12–0,5

Tab. 2. Rozpouštědla a ředidla pro přípravu zásobních roztoků antibakteriálních látek.

Antibakteriální látka	Rozpouštědlo	Ředidlo
Amikacin	voda	
Amoxicilin	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Ampicilin	fosfátový pufr, pH=8,0; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Apramycin	95% ethanol	voda
Azithromycin	95% ethanol nebo ledová kyselina octová	bujón
Azlocilin	voda	
Aztreonam	nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného	voda
Carbencilin	voda	
Cefaclor	voda	
Cefadroxil	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	voda
Cefamandol	Voda	
Cefazolin	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Cefdinir	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	voda
Cefditoren	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	voda
Cefepim	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Cefetamet	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	voda
Cefibuten	1/10 objem DMSO	voda
Cefitofur	voda nebo bujón	voda nebo bujón
Cefixim	fosfátový pufr, pH = 7,0; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 7,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Cefmetazol	voda	voda
Cefonicid	voda	
Cefoperazon	voda	
Cefotaxim	voda	
Cefotetan	DMSO	voda
Cefoxitin	voda	
Cefozoxim	voda	

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ
ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

Antibakteriální látka	Rozpouštědlo	Ředidlo
Cefpodoxim	0,10% (11,9 mmol.l ⁻¹ vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného	voda
Cefprozil	voda	
Ceftazidim	uhličitan sodný	voda
Ceftriaxon	voda	
Cefuroxim	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Cephalexin	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	voda
Cephalothin	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	voda
Cephapirin	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	voda
Cephradin	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	voda
Cinoxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Ciprofloxacin	voda	
Clarithromycin	methanol nebo ledová kyselina octová	fosfátový pufr, pH = 6,5; 0,1 mol.l ⁻¹
Clinafloxacin	voda	
Clindamycin	voda	
Danofloxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Difloxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Dirithromycin	ledová kyselina octová	voda
Doxycyklin	voda	
Enoxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 0,1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Enrofloxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Erythromycin	95% ethanol nebo ledová kyselina octová	voda
Fleroxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Florfenikol	95% ethanol	voda
Flumequin	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Garenoxacin	voda (za míchání)	
Gatifloxacin	voda (za míchání)	

Antibakteriální látka	Rozpouštědlo	Ředidlo
Gemifloxacin	voda	
Gentamicin	voda	
Chloramfenikol	95% ethanol	voda
Imipenem	fosfátový pufr, pH = 7,2; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 7,2; 0,1 mol.l ⁻¹
Kanamycin	voda	
Kyselina klavulanová	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Kyselina nalidixová	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	
Kyselina oxolinová	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Levofloxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 0,1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Linezolid	voda	
Loracarbef	voda	
Marbofloxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Mecillinam	voda	
Meropenem	voda	
Methicillin	voda	
Metronidazol	DMSO	voda
Mezlocillin	voda	
Minocyklin	voda	
Moxalactam	0,04 mol.l ⁻¹ HCl	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Moxifloxacin	voda	
Nafcilin	voda	
Netilmicin	voda	
Nitrofurantoin	fosfátový pufr, pH = 8,0; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 8,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Norfloxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 0,1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Novobiocin	voda	
Ofloxacín	1/2 objemu vody, potom přidat 0,1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda

**METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ
ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM**

Antibakteriální látka	Rozpouštědlo	Ředidlo
Orbifloxacin	1/2 objemu vody, potom přidat 1 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Ormetoprim	0,05 mol.l ⁻¹ mléčné nebo chlorovodíkové, 10 % konečného objemu	voda
Oxacilin	voda	
Oxytetracyklin	100% methanol	voda
Penicilin	voda	
Piperacilin	voda	
Pirlimycin	voda	
Quinupristin-dalfopristin	voda	
Rifampin	methanol (maximální koncentrace = 640 µg.ml ⁻¹)	voda (za míchání)
Sparfloxacin	voda	
Spectinomycin	voda	
Streptomycin	voda	
Sulbactam	voda	
Sulfonamidy	1/2 objemu vody, potom přidat 2,5 mol.l ⁻¹ NaOH po kapkách, aby se rozpustil	voda
Tazobactam	voda	
Telithromycin	ledová kyselina octová	voda
Tetracyklin	voda	
Tiamulin	voda	
Ticarcilin	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹	fosfátový pufr, pH = 6,0; 0,1 mol.l ⁻¹
Tilmicosin	95% ethanol	voda
Tobramycin	voda	
Trimethoprim	0,05 mol.l ⁻¹ mléčné nebo chlorovodíkové, 10 % konečného objemu	voda (možná potřeba zahřívání)
Trimethoprim (laktát)	voda	
Trospectomycin	voda	
Tylosin	95% ethanol	voda
Vancomycin	voda	

Tab. 3. Schéma přípravy ředění antibakteriálních látek pro diluční test v bujónu.

Krok	Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Zdroj	Objem (ml)	CAMHB (ml)	Výsledná koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Log_2
1	5 120	Zásobní roztok	1	9	512	9
2	512	krok 1	1	1	256	8
3	512	krok 1	1	3	128	7
4	512	krok 1	1	7	64	6
5	64	krok 4	1	1	32	5
6	64	krok 4	1	3	16	4
7	64	krok 4	1	7	8	3
8	8	krok 7	1	1	4	2
9	8	krok 7	1	3	2	1
10	8	krok 7	1	7	1	0
11	1	krok 10	1	1	0,5	-1
12	1	krok 10	1	3	0,25	-2
13	1	krok 10	1	7	0,125	-3

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ
ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

Tab. 4. Hraniční minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro posouzení citlivosti izolátů *Aeromonas salmonicida*

Antibakteriální látka	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)		
	S	I	R
Kyselina oxolinová	$\leq 0,12$	0,25–0,5	≥ 1
Oxytetracyklin	≤ 1	2,0–4,0	≥ 8

Vysvětlivky: S – citlivý, I – středně citlivý, R – rezistentní

Tab. 5. Minimální inhibiční koncentrace (MIC), tzv. epidemiologická „cut off“ pro *Aeromonas salmonicida*.

Antibakteriální látka	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	
	WT	NWT
Erytromycin	–	–
Florfenikol	≤ 4	≥ 8
Gentamicin	–	–
Kyselina oxolinová	$\leq 0,12$	$\geq 0,25$
Ormetoprim-sulfadimethoxin	$\leq 0,5/9,5$	$\geq 1/19$
Oxytetracyklin	≤ 1	≥ 2
Trimethoprim-sulfamethoxazol	–	–

Vysvětlivky: WT – „wild type“ cutoff znamená, že izoláty jsou citlivé a bez mechanismu rezistence; NWT – „non-wild-type“ cutoff znamená, že izoláty vlastní získaný nebo mutací navozený mechanismus rezistence

Tab. 6. Přijatelné meze MIC v $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pro referenční kmeny testované v M-H (Mueller-Hinton) bujónu při 22 ± 2 °C po době inkubace 24 až 48 hodin.

Antibakteriální látka	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658
Ampicilin	2–16	0,12–1
Enrofloxacin	0,004–0,015	0,008–0,03
Erythromycin	–	4–16
Florfenikol	2–16	0,25–1
Flumequin	0,06–0,5	0,015–0,12
Gentamicin	0,12–0,5	0,25–1
Kyselina oxolinová	0,03–0,25	0,008–0,03
Ormetoprim-sulfadimethoxin (1/19)	0,12/2,4–1/19	0,06/1,2–0,25/4,8
Oxytetracyklin	0,25–1	0,06–0,25
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1/19)	0,03/0,6– 0,12/2,4	0,03/0,6–0,12/2,4

Tab. 7. Přijatelné meze MIC v $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pro referenční kmeny testované v M-H (Mueller-Hinton) bujónu při 22 ± 2 °C po době inkubace 44 až 48 hodin.

Antibakteriální látka	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658
Ampicilin	4–6	0,25–1
Enrofloxacin	0,004–0,015	0,008–0,03
Erythromycin	–	4–32
Florfenikol	4–16	0,5–2
Flumequin	0,12–0,5	0,03–0,12
Gentamicin	0,25–1	0,25–2
Kyselina oxolinová	0,06–0,25	0,008–0,03
Ormetoprim-sulfadimethoxin (1/19)	0,25/4,8–2/38	0,06/1,2–0,5/9,5
Oxytetracyklin	0,5–2	0,12–1
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1/19)	0,03/0,6–0,25/4,8	0,03/0,6–0,25/4,8

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ
ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

Tab. 8. Přijatelné meze MIC v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro referenční kmeny testované v M-H (Mueller-Hinton) bujónu při 28 ± 2 °C po době inkubace 24 až 28 hodin.

Antibakteriální látka	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658
Ampicilin	2–16	0,12–1
Enrofloxacin	0,008–0,03	0,004–0,03
Erythromycin	–	4–32
Florfenikol	4–16	0,5–2
Flumequin	0,12–0,5	0,015–0,12
Gentamicin	0,25–1	0,25–1
Kyselina oxolinová	0,06–0,25	0,008–0,03
Ormetoprim-sulfadimethoxin (1/19)	0,12/2,4–1/19	0,06/1,2–0,5/9,5
Oxytetracyklin	0,5–2	0,12–1
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1/19)	0,03/0,6–0,25/4,8	0,03/0,6–0,25/4,8

Tab. 9. Přijatelné meze MIC v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro referenční kmeny testované v M-H (Mueller-Hinton) bujónu při 18 ± 2 °C po době inkubace 92 až 96 hodin.

Antibakteriální látka	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658
Ampicilin	2–8	0,06–0,25
Enrofloxacin	–	0,004–0,03
Erythromycin	4–16	4–16
Florfenikol	4–32	0,25–1
Flumequin	0,06–0,25	0,015–0,06
Kyselina oxolinová	0,03–0,12	0,008–0,03
Ormetoprim-sulfadimethoxin (1/19)	–	0,03/0,59–0,25/4,75
Oxytetracyklin	0,12–1	0,06–0,25
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1/19)	0,015/0,3–0,12/2,38	0,015/0,3–0,06/1,19

Tab. 10. Přijatelné meze MIC v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro referenční kmeny testované v M-H (Mueller-Hinton) bujónu při 28 ± 2 °C po době inkubace 44 až 48 hodin.

Antibakteriální látka	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658
Ampicilin	1–4	0,06–0,25
Enrofloxacin	0,002–0,015	0,004–0,015
Erythromycin	16–64	4–16
Florfenikol	2–8	0,25–1
Flumequin	0,06–0,5	0,015–0,06
Kyselina oxolinová	0,03–0,12	0,008–0,03
Ormetoprim-sulfadimethoxin (1/19)	0,12/2,38–0,5/9,5	0,06/1,19–0,25/4,75
Oxytetracyklin	0,12–1	0,06–0,25
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1/19)	0,015/0,3–0,12/2,38	0,03/0,59–0,12/2,38

Tab. 11. Hraniční průměry inhibičních zón pro posouzení citlivosti izolátů *Aeromonas salmonicida*

Antibakteriální látka	Obsah v disku	Průměr zóny (mm)		
		S	I	R
Kyselina oxolinová	2 μg	≥ 30	25–29	≤ 24
Oxytetracyklin	30 μg	≥ 28	22–27	≤ 21

Vysvětlivky: S – citlivý, I – středně citlivý, R - rezistentní

METODY STANOVENÍ CITLIVOSTI PŮVODCŮ ERYTRODERMATITIDY KAPRŮ K ANTIBAKTERIÁLNÍM LÁTKÁM

Tab. 12: Hraniční průměry inhibičních zón tzv. epidemiologické „cutoff“, pro *Aeromonas salmonicida*

Antibakteriální látka	Obsah v disku	Průměr zóny (mm)	
		WT	NWT
Erytromycin	15 µg	≥ 14	≤ 13
Florfenikol	30 µg	≥ 27	≤ 26
Gentamicin	10 µg	≥ 18	≤ 17
Kyselina oxolinová	2 µg	≥ 30	≤ 29
Ormetoprim-sulfadimethoxin	1,25/23,75 µg	≥ 20	≤ 19
Oxytetracyklin	30 µg	≥ 28	≤ 27
Trimethoprim-sulfamethoxazol	1,25/23,75 µg	≥ 20	≤ 19

Vysvětlivky: WT – „wild type“ cutoff znamená, že izoláty jsou citlivé a bez mechanismu rezistence; NWT – „non-wild-type“ cutoff znamená, že izoláty vlastní získaný nebo mutací navozený mechanismus rezistence

Tab. 13. Přijatelná rozpětí průměrů inhibičních zón (mm) pro kontrolu kvality u kmene *Escherichia coli* ATCC[®] 25922 při testování na M-H agaru při 22 ± 2 °C.

Antibakteriální látka	Obsah v disku	Inkubace při	Inkubace při
		22 ± 2 °C po dobu 24 až 28 h	22 ± 2 °C po dobu 44 až 88 h
Ampicilin	10 µg	16–23	13–22
Enrofloxacin	5 µg	–	–
Erythromycin	15 µg	13–21	13–20
Florfenikol	30 µg	20–32	20–32
Gentamicin	10 µg	24–32	23–34
Kyselina oxolinová	2 µg	28–37	28–40
Oxytetracyklin	30 µg	26–35	25–35
Ormetoprim-sulfadimethoxin (1/19)	1,25/23,75 µg	14–26	13–22
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1/19)	1,25/23,75 µg	27–40	26–36

Tab. 14. Přijatelná rozpětí průměrů inhibičních zón (mm) pro kontrolu kvality u kmene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658 při testování na M-H agaru při 22 ± 2 °C.

Antibakteriální látka	Obsah v disku	Inkubace při 22 ± 2 °C po dobu 24 až 28 h	Inkubace při 22 ± 2 °C po dobu 44 až 88 h
Ampicilin	10 µg	34–42	35–44
Enrofloxacin	5 µg	36–46	37–49
Erythromycin	15 µg	17–28	19–31
Florfenikol	30 µg	32–44	34–47
Gentamicin	10 µg	23–29	22–32
Kyselina oxolinová	2 µg	34–43	33–45
Oxytetracyklin	30 µg	30–39	28–38
Ormetoprim-sulfadimethoxin (1/19)	1,25/23,75 µg	24–38	21–35
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1/19)	1,25/23,75 µg	27–40	24–39

Tab. 15. Přijatelná rozpětí průměrů inhibičních zón (mm) pro kontrolu kvality u kmenů *Escherichia coli* ATCC® 25922 a *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC® 33658 při testování na M-H agaru při 28 ± 2 °C.

Antibakteriální látka	Obsah v disku	<i>E. coli</i> ATCC 25922 při 28 °C po dobu 24 až 28 h	<i>A. salmonicida</i> ATCC 3365 při 28 °C po dobu 24 až 28 h
Ampicilin	10 µg	14–23	33–41
Enrofloxacin	5 µg	–	35–45
Erythromycin	15 µg	10–15	21–29
Florfenikol	30 µg	20–30	33–41
Gentamicin	10 µg	22–29	24–30
Kyselina oxolinová	2 µg	25–32	32–41
Oxytetracyklin	30 µg	23–29	28–34
Ormetoprim-sulfadimethoxin (1/19)	1,25/23,75 µg	17–23	21–32
Trimethoprim-sulfamethoxazol (1/19)	1,25/23,75 µg	25–32	26–36

Externí odborný oponent

RNDr. Antonín Prouza
Státní veterinární ústav Jihlava, pracoviště České Budějovice
Dolní 2, 370 05 České Budějovice

Interní odborný oponent

MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Jihočeské
výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybnářský
a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

Oponent za státní správu

MVDr. Ivana Kucharovičová
Státní veterinární ústav Jihlava,
Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. SVS/2015/136607-G
ze dne 14. 12. 2015

vydala Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy,
Slezská 7/100, 120 56 Praha 2

Adresa autorského kolektivu

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. (80 %)
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství, Ústav
infekčních chorob a mikrobiologie, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, www.vfu.cz

MVDr. Veronika Piačková, Ph.D. (20 %)
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Jihočeské
výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybnářský
a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz;
odborný editor: Ing. Antonín Kouba, Ph.D., redakce: Zuzana Dvořáková; náklad: 180 ks,
1. vydání; metodika uplatněna v roce 2015; vytištěna v roce 2016;
grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.



Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



ISBN 978-80-7514-040-1

