




VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO  
Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Konference Vodárenská biologie 2017

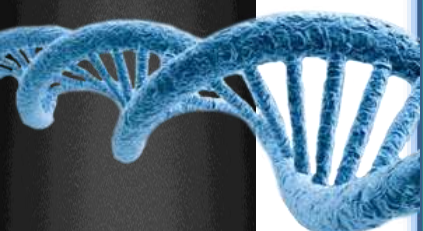


**STANOVENÍ ANTIBIOTICKÉ  
REZISTENCE VÝZNAMNÉHO  
PATOGENU *AEROMONAS*  
SPP. U RYB V  
KAPROVÉM RYBNÍKÁŘSTVÍ**

**Autor : Mgr. Eva Jelínková**

Ústav ekologie a chorob zvířer, ryb a včel  
evickajelinkova@seznam.cz

**Spoluautoři:** doc. MVDr. Palíková M., Ph.D., MVDr. Kohoutová L., RNDr. Dolejská M., Ph.D., prof. MVDr. Čížek A., CSc., MVDr. Papežíková I., Ph.D.  
prof. MVDr. Navrátil S., CSc., Benešová M.



**Cílem** studie bylo izolovat z nemocných ryb v kaprovém rybníkářství aeromonády a u získaných izolátů stanovit fenotyp a genotyp antibiotické rezistence. Dalším cílem bylo u těchto izolátů zjistit zastoupení genů virulence



# Seznamte se, Aeromonáda

- Gram-negativní tyčinka, fakultativně anaerobní
- vázaná na vodní prostředí

## Taxonomické zařazení:

ŘÍŠE: BACTERIA

KMEN: PROTEOBACTERIA

TŘÍDA: Grammaproteobacteria

ŘÁD: Aeromonadales

ČELEĎ: Aeromonadaceae

ROD: *Aeromonas*

DRUH: *Aeromonas hydrophila*

*Aeromonas caviae*

*Aeromonas sorbia*...

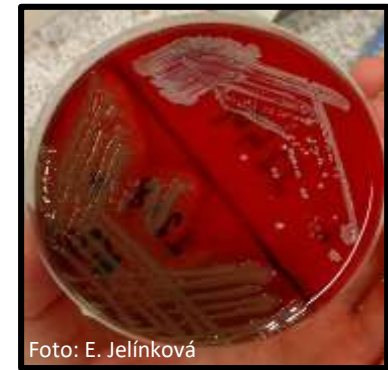


Foto: E. Jelínková

Obr. 1. Aeromonády na KA



akvaportal.cz

Obr. 2. Tyčinkovité bakterie



## Co umím?

- významný ubikvitární patogen způsobující onemocnění ryb
- septikémie, hemoragické a ulcerativní choroby
- jedním z nezávažnějších onemocnění
  - ⇒ erythrodermatitida kaprů
- sekundární infekce
- ⇒ mortalita
- ⇒ ekonomické ztráty v chovech



Foto: E. Jelínková

Obr. 3. Vřed zasahující do svaloviny





## Antibiotika – můj (ne)přítel

-registrované léčivo pro kaprovité ryby:  
medikovaná granulovaná krmná směs **RUPIN SPECIAL**

⇒ **Oxytetracyklin**

### **NARŮSTAJÍCÍ PROBLÉM – ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE!**

-vznik rezistence: - mutacemi přirozených genů  
- transponovatelné elementy (plazmidy,  
transpozony, integrony)

⇒ hledání alternativního léčiva





# Sledované chovy ryb

## 1. hospodářství

lokalita: jižní Morava, 92 rybníků (1 302 ha), roční produkce tržních ryb: 1 000 tun

## 2. hospodářství

lokalita: jižní Morava, 145 rybníků (1 409 ha), roční produkce tržních ryb: 1 200–1 500 tun

## 3. soukromý rybník

lokalita: jižní Morava, 3 ha, roční produkce kapra 5–6 tun



# MATERIÁL A METODIKA

## Izolace aeromonád

- vyšetřeno **154 ryb** (133 ks kapr obecný, 13 ks karas zlatý, 8 ks sumec velký), březen – září 2016

- patologicko-anatomické vyšetření ⇒ stěr z kůže, lézí, tkáň sleziny



Foto: T. Maturová

Obr. 4. Stěr z kůže plůdku sumce velkého



Foto: E. Jelínková

Obr. 5. Vřed zasahující do svaloviny

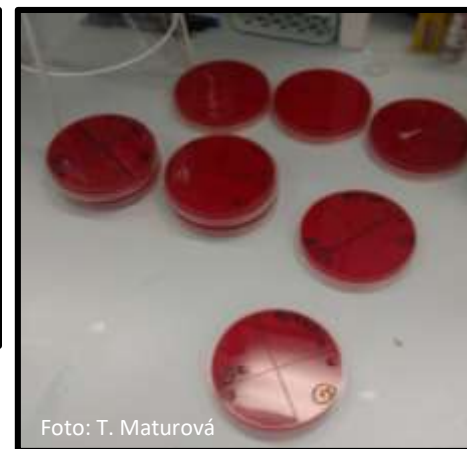
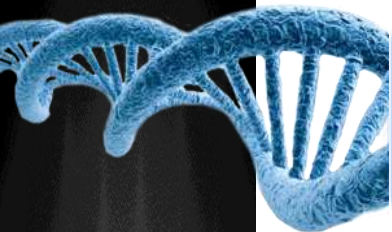


Foto: T. Maturová

Obr. 6. Kultivace na KA

- druhová identifikace na MALDI-TOF Biotyper





# Testování fenotypové rezistence k ATB - disková difúzní metoda



Foto: T. Maturová

Obr. 7. 24 hod. kultura na KA



Foto: T. Maturová

Obr. 8. Bakteriální suspenze 0,5 MF



Foto: T. Maturová

Obr. 9. Nanesení ATB disků

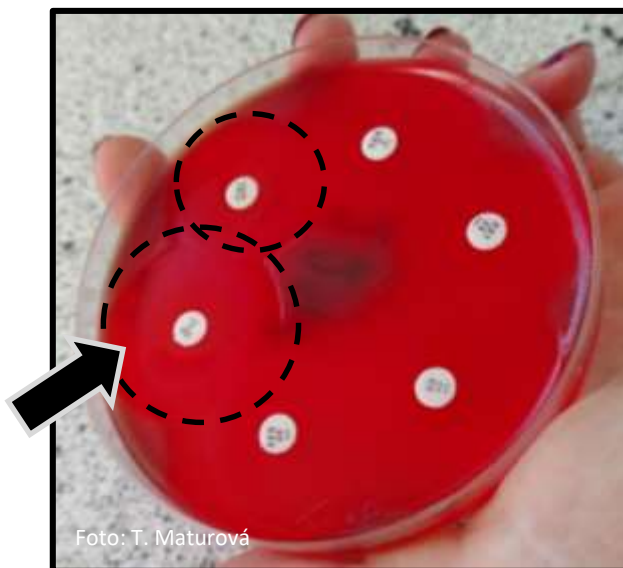


Foto: T. Maturová

Obr. 10. Inhibiční zóny



Foto: T. Maturová

Obr. 11. Odečet velikosti inhib. zón pomocí  
automatické šuplery







## Testování fenotypové rezistence k ATB

### - 6 antimikrobiálních látek:

- oxytetracyklin (Ot)
- florfenikol (Ffc)
- sulfametoxazol/trimetoprim (Sxt)
- flumequin (Ub)
- kyselina oxolinová (Oa)
- enrofloxacin (Enr)





# Polymerázová řetězová reakce (PCR)

## 1. průkaz genů kódujících mechanismy rezistence vůči:

- **tetracyklinům** (*tetA* až *G*)
- **sulfonamidům** (*sul1* až *3*) a **trimetoprimu** (*dhfrA17*, *dhfrA1*, *dhfrA12*)
- **chinolonům** vázanou na plazminech (*qnrA* až *D*, *qnrS*, *qepA*, *oqxAB*, *aac(6′)-Ib-cr*)
- **amfenikolům** (*catA1*, *cmlA* a *floR*)

## 2. detekce genů kódujících **integrázy** (*intl1* a *intl2*)

## 3. detekce **genů virulence** (*ahh1*, *asa1*, *act*, *ast*, *ascV*, *eno*, *aexT*)





Foto: H. Hafner

Obr. 12. Příprava PCR směsi v PCR boxu



Foto: H. Hafner

Obr. 13. Termocycler

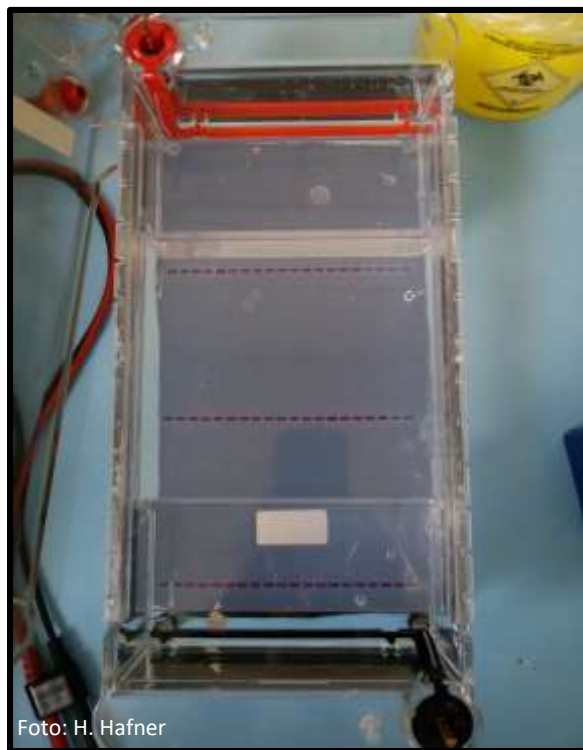


Foto: H. Hafner

Obr. 14. Agarózový gel se vzorky



Foto: H. Hafner

Obr. 15. Elektroforetické vany



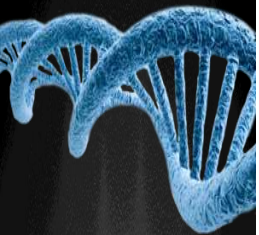


Foto: H. Hafner

Obr. 16. Fotodokumentační zařízení



Foto: H. Hafner

Obr. 17. Vyhodnocení gel. elektroforézy

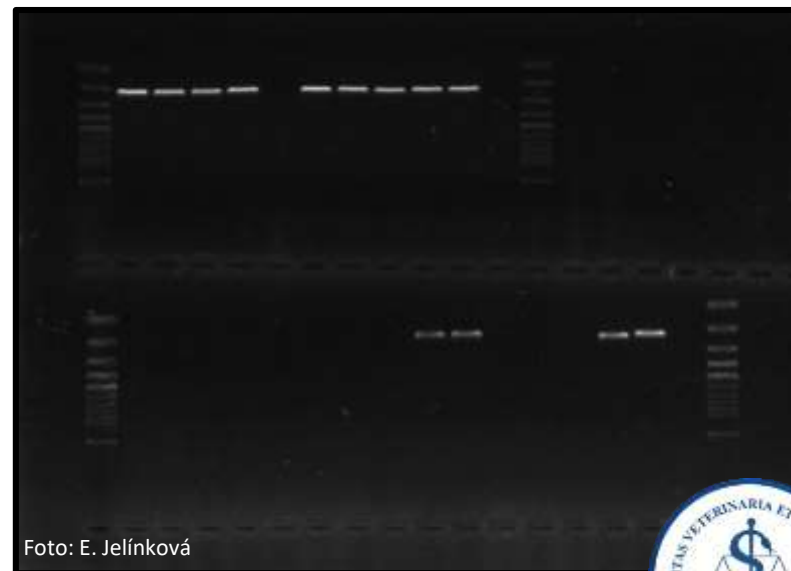


Foto: E. Jelínková

Obr. 18. Výsledná fotka gelu





# Výsledky

## 1. hospodářství

vyšetřeno 120 ryb, z toho 36 ryb (30 %) kultivačně pozitivních

## 2. hospodářství

vyšetřeno 25 ryb, z toho 6 ryb (24 %) kultivačně pozitivních

## 3. soukromý rybník

vyšetřeno 9 ryb, z toho 8 ryb (88,9 %) kultivačně pozitivních

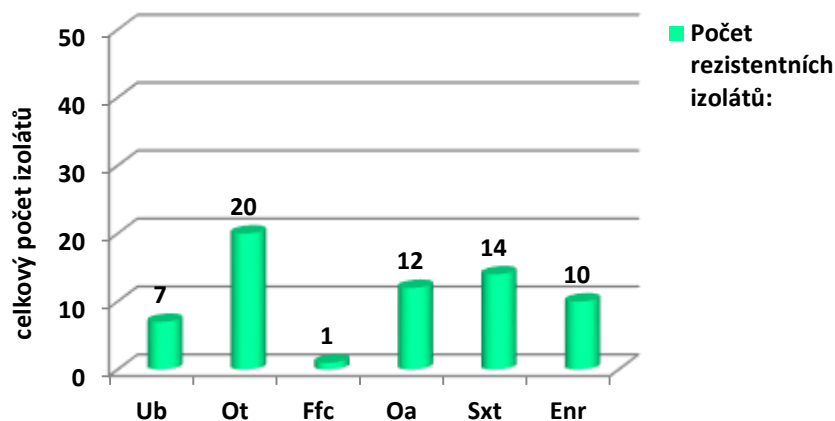


## Výsledky – fenotypová rezistence

- u 17 % ryb kožní léze, u 8 % atrofie zadní části plyn. měchýře, u 5 % meziorgánové srůsty

- získáno **50** bakteriálních izolátů (*A. veronii*, *A. ichthiosmia*, *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *Shewanella baltica* (2x), *Plesiomonas shigelloides* (1x), *Stenotrophomonas rhizophila* (1x))

- fenotypová rezistence k **Ot u 20 izolátů (40 %)**



Sxt u 14 izolátů (28 %)

Oa u 12 izolátů (24 %)

Enr u 10 izolátů (20 %)

Ub u 7 izolátů (14 %)

**Ffc u 1 izolátu (2 %)**





## Výsledky – genotypová rezistence

- 18 izolátů (n=50) neslo alespoň jeden gen rezistence
- **18** izolátů (**36 %**) - gen rezistence vůči **tetracyklinům** (*tetE* u 13 izolátů, *tetA* u 5 izolátů)
- **3** izoláty (**6 %**) - gen rezistence vůči **chinolonům** (*qnrS1*, *qnrS2*, u jednoho izolátu *qnr* zatím neurčena varianta genu)
- **1** izolát - geny rezistence k **sulfonamidům**, včetně potencovaných (*sul2* a *dhfrA1*)
- gen ***intl1*** u jednoho izolátu, gen *intl2* nebyl nalezen



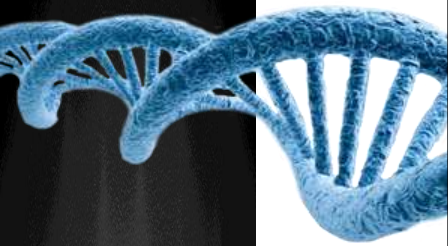


## Výsledky – geny virulence

- **19** izolátů (**38 %**) neslo **5 ze 7 testovaných genů virulence**
- **3** izoláty (**6 %**) nesly pouze **1 gen virulence**
- gen ***ast*** nebyl detekován u žádného izolátu
- vyšší počet genů virulence  $\Rightarrow$  vyšší virulence izolátů







Číslo vzorku	Bakteriální druh	Číslo DNA	<i>asa</i>	<i>ast</i>	<i>act</i>	<i>ascV</i>	<i>aexT</i>	<i>ahh1</i>	<i>eno</i>
609	<i>A. bestiarum</i>	1	-	-	+	-	-	+	+
630	<i>A. veronii</i>	2	+	-	+	-	-	-	+
633	<i>A. veronii</i>	3	+	-	+	-	-	-	+
878	<i>Shewanella baltica</i>	4	-	-	-	-	-	-	-
880	<i>Shewanella baltica</i>	5	-	-	-	-	-	-	-
943	<i>A. veronii</i>	6	+	-	+	-	-	-	+
947	<i>A. veronii</i>	7	+	-	+	-	-	-	+
1106	<i>A. veronii</i>	8	+	-	+	-	-	-	+
1109	<i>A. veronii</i>	9	+	-	+	+	+	-	+
1119	<i>A. veronii</i>	10	-	-	+	+	+	-	+
1120	<i>A. veronii</i>	11	+	-	+	+	-	-	+
1122	<i>A. veronii</i>	12	+	-	+	-	-	-	+
1276	<i>A. ichthiosmia</i>	13	+	-	+	-	-	-	-
1277	<i>A. ichthiosmia</i>	14	+	-	+	+	+	-	+
1278	<i>A. veronii</i>	15	+	-	+	+	+	-	+
1287	<i>A. ichthiosmia</i>	16	+	-	+	-	-	-	+
1459	<i>A. veronii</i>	17	+	-	+	+	+	-	+
1464	<i>A. veronii</i>	18	+	-	+	+	+	-	+
1465	<i>A. veronii</i>	19	+	-	+	-	+	-	+
1466 A	<i>A. veronii</i>	20	+	-	+	-	+	-	+
1508	<i>A. veronii</i>	21	+	-	+	-	-	-	+
1509	<i>A. veronii</i>	22	+	-	+	+	+	-	+
1510	<i>A. veronii</i>	23	+	-	+	+	+	-	+
1511	<i>A. hydrophila</i>	24	+	-	+	+	+	-	+
1513	<i>A. veronii</i>	25	+	-	+	+	+	-	+
1514	<i>A. veronii</i>	26	+	-	+	-	-	-	+
1515	<i>A. veronii</i>	27	+	-	+	+	+	-	+
1565	<i>A. veronii</i>	28	+	-	+	+	+	-	+
1566	<i>A. veronii</i>	29	+	-	+	+	+	-	+
1569	<i>A. veronii</i>	30	+	-	+	-	-	-	+
1575	<i>A. veronii</i>	31	-	-	-	-	-	-	+
1578	<i>A. veronii</i>	32	+	-	+	+	+	-	+
1585	<i>Plesiom. shigelloides</i>	33	+	-	+	-	-	-	+
2248	<i>A. veroni</i>	34	+	-	+	-	+	-	+
2249 m	<i>A. veroni</i>	35	-	-	-	-	-	-	+
2249 v	<i>A. veroni</i>	36	-	-	-	-	-	-	+
2256	<i>A. veroni</i>	37	+	-	+	-	+	-	+
2258	<i>A. veroni</i>	38	+	-	+	-	+	-	+
2264	<i>A. veroni</i>	39	+	-	+	-	-	-	+
2265	<i>A. veroni</i>	40	+	-	+	+	+	-	+
2274	<i>A. veroni</i>	41	+	-	+	+	+	-	+
2275	<i>A. veroni</i>	42	+	-	+	-	-	-	+
2277	<i>A. veroni</i>	43	-	-	+	-	+	-	+
2279	<i>A. veroni</i>	44	+	-	+	-	-	-	+
2281	<i>A. veroni</i>	45	+	-	+	+	+	-	+
2283	<i>A. veroni</i>	46	+	-	+	+	+	-	+
2286	<i>A. veroni</i>	47	-	-	-	-	-	-	+
2287	<i>A. veroni</i>	48	+	-	+	+	+	-	+
2288	<i>A. veroni</i>	49	+	-	+	+	+	-	+
2289	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	50	-	-	-	-	-	-	-

geny virulence





## Závěr

Lze konstatovat, že k **oxytetracyklinu**, který je registrován jako jediné antibiotikum k léčbě bakterióz kaprovitých ryb, byla zjištěna **poměrně vysoká rezistence**, naopak **florfenikol**, registrovaný pro pstruha duhového, by mohl být k tomuto antibiotiku adekvátní **alternativou**.

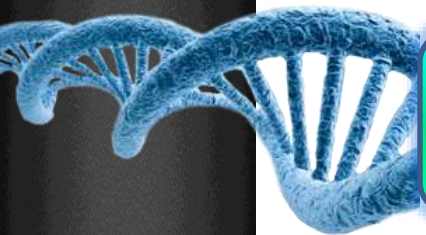




## Poděkování

*Tato práce byla financovaná grantem IGA  
VFU Brno 219/2016/FVHE.*





**DĚKUJI ZA POZORNOST!**

