

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ

Certifikovaná metodika

METODIKA 07/2013

**Využití hmotnostní spektrometrie MALDI TOF a polymerázové řetězové
reakce ke confirmaci suspektních kultur *Aeromonas salmonicida*,
Flavobacterium psychrophilum a *Yersinia ruckeri***

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc., Mgr. Ivan Manga, Ph. D., MVDr. Martina Masaříková

Brno

2014

ISBN 978-80-7375-954-4

Metodika je realizačním výstupem výzkumného projektu MZe ČR NAZV KUS QJ1210013 „Technologie chovu sladkovodních ryb s využitím recirkulačních systémů dánského typu se zaměřením na metody efektivního řízení prostředí a veterinární péče.

Oponenti:

Externí odborný oponent

MVDr. Veronika Piačková, Ph.D.
Fakulta rybářství a ochrany vod
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany

Interní odborný oponent

Prof. MVDr. Jiří Smola, CSc.
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství, Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, www.vfu.cz

Oponent za státní správu

MVDr. Pavel Barták, Ph.D.
Státní veterinární ústav Jihlava,
Ulice: Rantířovská 93
PSČ, Obec: 586 05 Jihlava

Osvědčení o uznání uplatněné certifikované metodiky
R07/2014 - 16230/N_{met} — CERTIFIKOVANÁ METODIKA
ze dne 24. 3. 2014

Vydalo: Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství, Sekce lesního hospodářství,
Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 17, 117 05 Praha 1.

Adresa autorského kolektivu

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. (60 %)
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, www.vfu.cz

Mgr. Ivan Manga, Ph.D. (25 %)
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, www.vfu.cz

MVDr. Martina Masaříková (15 %)
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinárního lékařství, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, www.vfu.cz

Mendelova univerzita v Brně
ISBN 978-80-7375-954-4

Obsah

1. Cíl metodiky	4
2. Vlastní popis metodiky	4
2. 1 Úvod	4
2.2 <i>Aeromonas salmonicida</i>	5
2.3 <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	6
2.4 <i>Yersinia ruckeri</i>	7
2.5 Princip hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	8
2.6 Princip PCR	9
2. 7 Materiál a metody	10
2. 7. 1 Použitá zařízení	10
2. 7. 2 Použitý materiál a reagensie	10
2. 7. 2. 1 Bakteriální kultury	10
2. 7. 2. 2 Použité reagensie	10
2. 7. 3 Použité metody	10
2. 7. 3. 1 Odběr vzorků	11
2. 7. 3. 2 Kultivační vyšetření	11
2. 7. 3. 3 Konfirmace suspektních kultur hmotnostní spektrometrií	12
2. 7. 3. 4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	13
2. 7. 3. 4. 1 Příprava cílové DNA	13
2. 7. 3. 4. 2 Dokumentace údajů	13
2. 7. 3. 4. 3 Příprava „master mixu (MM)“	13
2. 7. 3. 4. 4 Programování termocykléru	14
2. 7. 3. 4. 5 Vizualizace a separace PCR produktu horizontální elektroforézou	15
2. 7. 3. 4. 6 Kontrola kvality	16
2. 7. 3. 4. 7 Vyhodnocení výsledků	16
2. 7. 3. 4. 7. 1 Identifikace izolátů <i>Y. ruckeri</i> a <i>A. salmonicida</i> hmotnostní Spektrometrií	16
2. 7. 3. 4. 7. 2 Konfirmace suspektních terénních izolátů <i>Y. ruckeri</i> , <i>A. salmonicida</i> a <i>F. psychrophilum</i> metodou PCR	16
2. 7. 3. 4. 8 Komentář k výsledkům získaným MALDI-TOF MS	20
2. 7. 3. 4. 9 Komentář k výsledkům získaným metodou PCR	21
2. 7. 3. 4. 10 Závěr	21
3. Příloha	22
4. Srovnání „novosti postupů“	25
5. Popis uplatnění certifikované metodiky	25
6. Ekonomické aspekty	25
7. Seznam použité související literatury	25
8. Seznam publikací, které předcházejí metodice	28

1. Cíl metodiky

Symptomatologie bakteriálních infekcí lososovitých ryb je velmi pestrá a mnohdy chybí specifický klinický a patomorfologický obraz onemocnění, protože ryby hynou za všeobecných příznaků bakteriální sepsy. Proto bakteriologická diagnostika infekcí lososovitých ryb je nezbytným krokem ke stanovení konečné diagnózy a přijetí vhodných opatření k tlumení a zdolání bakteriálních infekcí v intenzivních chovech. Klasický přístup využívá kultivační vyšetření klinického a sekčního materiálu, který pochází ze zjevně nemocných ryb, a identifikaci získaných kultur na základě jejich biochemické aktivity. Takový postup je časově náročný a proto v terénních podmínkách často dochází k dalším ztrátám úhynem v důsledku prodlení při zavádění vhodných opatření. Hlavním cílem metodiky je poskytnout systém rychlé detekce původců nejčastějších bakterióz v intenzivních chovech lososovitých ryb u nás (*Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* a *Aeromonas salmonicida*), který využívá kombinaci kultivačního postupu s hmotnostní spektrometrií MALDI TOF a metodou PCR.

2. Vlastní popis metodiky

Metodika popisuje současný stav identifikace uvedených původců bakteriálních infekcí lososovitých ryb a jeho nedostatky a v návaznosti na to nabízí řešení v podobě využití hmotnostní spektrometrie MALDI TOF a polymerázové řetězové reakce k urychlení a zpřesnění identifikace těchto bakterií.

2.1 Úvod

V našich intenzivních chovech lososovitých ryb se setkáváme s třemi hlavními původci bakteriálních infekcí *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* a *Aeromonas salmonicida*.

Bakteriologická diagnostika uvedených původců infekcí ryb může být založena na jejich kultivaci a následné identifikaci čistých kultur posouzením jejich fyziologických vlastností a biochemické aktivity. Tento klasický postup je často velmi časově náročný, což představuje dobu 1 až 2 týdny. Přitom identifikace *F. psychrophilum* a *A. salmonicida* na základě fenotypových znaků nemusí být ani za tuto dobu ukončena. Značné urychlení identifikace suspektních kultur bakterií v poslední době umožnilo zavedení hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a PCR do rutinní praxe veterinárních bakteriologických laboratoří. První z těchto metod analyzuje profil proteinů zkoumané kultury a ten porovnává s databází známých druhů bakterií. Druhá z metod je založena na amplifikaci úseku DNA specifického pro daný bakteriální druh. Všechny uvedené metody mají své výhody i nevýhody, proto volba diagnostického postupu uvedených původců bakteriálních infekcí lososovitých ryb by měla být podřízena účelu využití výsledků. Z pohledu chovatele je kladen důraz zejména na rychlost laboratorního potvrzení suspektní diagnózy

vyslovené veterinárním lékařem na základě výsledků klinického a patomorfologického nálezu. Včasná diagnóza je pak rozhodující pro zavedení účinných opatření, která mají zabránit ekonomickým ztrátám v intenzivních chovech ryb.

2. 2 *Aeromonas salmonicida*

Bakterie rodu *Aeromonas*, které se vyskytují ve vodních ekosystémech, mohou vyvolávat septikémie, ulcerativní (vředovité) a hemoragické choroby ryb, včetně furunkulózy, která mohou vést k hromadnému úhynu a významným ekonomickým ztrátám ve vodním hospodářství (Austin a Austin, 2007). *Aeromonas salmonicida* s 5 poddruhy (*salmonicida*, *masoucida*, *smithia*, *achromogenes* a *pectinolytica*) a *Aeromonas hydrophila* jsou považovány za nejvýznamnější patogeny ryb z rodu *Aeromonas*. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* je známá více než sto let jako původce furunkulózy pstruhů a dalších lososovitých i jiných druhů ryb (Han a kol., 2011; Noga, 2010; Wiklund a Dalsgaard, 1998). V současnosti je furunkulóza celosvětově rozšířena a její výskyt je hlášen z řady zemí.

Skutečnost, že mnoho izolátů z nemocných ryb neodpovídá vždy popisovaným charakteristikám *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* nebo patomorfologický nález nemusí být specifický pro furunkulózu, často vede k jejich označování „atypické izoláty“ a „atypická furunkulóza“. Tím se vysvětluje i podíl jiných poddruhů *A. salmonicida*, případně dalších druhů aeromonád na vzniku furunkulózy ryb jiných druhů než lososovitých (Wiklund a Dalsgaard, 1998). To bývá někdy matoucí, protože termín „atypický“ je používán různými autory různě. Navzdory tomu se někteří autoři snažili popsat specifické klinické příznaky pro tyto patologické stavy, ale v praxi jsou téměř nerozlišitelné od těch spojených s furunkulózou, vředovými chorobami nebo septikémiemi vyvolanými jinými druhy pohyblivých aeromonád. Typická nebo atypická furunkulóza a septikémie vyvolaná pohyblivými aeromonádami jsou provázeny podobnými klinickými příznaky, které jsou také běžně pozorovány u dalších systémových chorob vyvolaných jinými druhy bakterií a virovými patogeny. Proto konečná diagnóza vždy vyžaduje izolaci a identifikaci bakteriální kultury z lézí nemocných nebo vnitřních orgánů uhynulých ryb. V případě latentně infikovaných ryb je třeba dát pozor na falešně negativní výsledky. Někteří autoři doporučují použít krok pomnožení vzorku před vlastním průkazem metodou PCR nebo kombinaci kultivačního průkazu s PCR (Byers a kol., 2002a, b; Gustafson a kol., 1992).

Jak bylo již uvedeno, druh *A. salmonicida* zahrnuje 5 poddruhů, které je prakticky nemožné rozlišit na základě fenotypových znaků, ale i molekulárními metodami. Všechny s výjimkou poddruhu *pectinolytica* byly izolovány z nemocných ryb s patologickými změnami (Austin a Austin, 2007; Han a kol., 2011; Noga, 2010; Wiklund a Dalsgaard, 1998). Vzhledem k tomu, že není možné biochemickým vyšetřením izoláty uvedených poddruhů z nemocných ryb

přesvědčivě rozlišit, jsou označovány jako atypická *A. salmonicida*, aby se odlišily od typických zástupců *A. salmonicida*, tedy poddruhu *salmonicida* (Beaz-Hidalgo a kol., 2008; Goodwin a Merry, 2009; Wiklund a Daalsgard, 1998). Typické izoláty jsou psychrofilní, nepohyblivé a tvoří hnědý pigment. V protikladu atypické izoláty *A. salmonicida* jsou více heterogenní skupinou s rozdílnými fenotypovými rysy a jsou obvykle izolovány z jiných než lososovitých druhů ryb (Noga, 2010). Mezi atypickými izoláty *A. salmonicida* je skupina, která se projevuje jako mezofilní (růst při 37°C), pohyblivá, neprodukuje pigment (Figueras, 2005). Odlišení těchto mezofilních izolátů *A. salmonicida* od podobných mezofilních druhů, např. *A. bestiarum* nebo *A. piscicola*, je při užití biochemických znaků nebo sekvence genu 16S rRNA prakticky nemožné (Beaz-Hidalgo a kol., 2010). Jistou nadějí mohou být variabilní sekvence house-keeping genu *rpoD* (Beaz-Hidalgo a kol., 2010) a nověji i genu *fstA*, které lze využít pro metodu PCR. V případě *Aeromonas salmonicida* bylo navrženo a ověřeno několik cílových sekvencí DNA genu pro 16S rRNA, *rpoD* a *gyrB*. Díky existenci vysoké míry podobnosti (99,8-100) genu pro 16S rRNA mezi druhy *A. salmonicida*, *A. bestiarum* a *A. piscicola* byly ověřeny i „house-keeping“ geny *rpoD* nebo *gyrB* a gen *fstA*, který kóduje receptor siderofor pro železité ionty. PCR zacílená na tento posledně jmenovaný gen umožnila *A. salmonicida* odlišit od těchto velmi příbuzných druhů (Beaz-Hidalgo et al., 2013).

2. 3 *Flavobacterium psychrophilum*

Flavobacterium psychrophilum (dříve *Cytophaga psychrophila*, *Flexibacter psychrophilus*) (Bernardet et al., 1996) je původcem „**C**old-**W**ater **D**isease“ (CWD) a „**R**ainbow **T**ROUT **F**RY **S**YNDROME (RTFS) u lososovitých ryb a sporadicky vyvolává infekce i jiných druhů ryb (Lehmann et al., 1991; Iida a Muzikami, 1996). Jedná se o časté infekční onemocnění s celosvětovým rozšířením, které působí v intenzivních chovech lososovitých ryb závažné ekonomické ztráty. Diagnostika těchto infekcí je založena na hodnocení klinických příznaků a patomorfologických změn, které jsou velmi pestré a ne vždy specifické. Klasickým příznakem onemocnění jsou eroze na ocase a ocasní ploutvi. Martínez et al. (2004) popisují, že prvním z příznaků infekce je tvorba bělavého materiálu podél okraje ocasní ploutve a změny se prohlubují až v progresivní nekrózu. Avšak i když tyto příznaky chybí, tak jiné příznaky jsou velmi pestré. Bývá to ulcerace spodní čelisti, světlá nebo nekrotická žábra, hyperplazie epidermis, zvýšená produkce hlenu, zvýšená pigmentace kůže (zvláště zadní části – „*black tail*“), ascites (vodnatelnost), letargie, zánět rohovky, anémie, zvětšená slezina, zánět střeva, exoftalmus, světle zabarvená játra a ledviny, nervové poruchy, abnormality páteře, krváceniny, výhřez anální sliznice, plavání břichem vzhůru. U větších ryb mohou být častěji zjišťovány klasické nekrotické

změny na kůži. Neurologické příznaky, jako plavání břichem vzhůru a deformity páteře, mohou být pozdním následkem infekce (Barnes a Brown, 2011).

Potvrzení klinické a patomorfologické diagnózy vyžaduje průkaz původce ve vzorcích změněných tkání nemocných ryb. Izolace a identifikace tohoto patogena však není vždy jednoduchá, a to vzhledem k jeho různé úrovni záchytnosti na izolačních půdách (Cepeda et al., 2004). Za poslední období bylo také ověřeno několik postupů PCR ke specifickému průkazu *F. psychrophilum*, které detekují 16S rDNA a gen *gyrB*. Překvapivě byly zjištěny rozdíly při porovnání výsledků přímého kultivačního průkazu původce na agarech a přímého průkazu metodou PCR (Tirola et al., 2002). To znamená, že *F. psychrophilum* se podařilo detekovat v tkáních pstruhů metodou PCR a kultivace přitom byla negativní.

Z uvedených skutečností vyplývá, že diagnostika těchto infekcí musí být založena na komplexním přístupu, který vychází ze zhodnocení klinických příznaků, pitevního nálezu, případně orientační mikroskopie barvených otiskových preparátů z parenchymatózních orgánů. Následně lze diagnózu potvrdit kultivačním vyšetřením, které může být zakončeno konfirmací získaných bakteriálních kultur metodou PCR.

2. 4 *Yersinia ruckeri*

Yersinia ruckeri vyvolává závažné septikémie v intenzivních chovech lososovitých ryb v řadě zemí světa. Závažnost infekcí se může lišit v závislosti na sérotypu původce, druhu postižených lososovitých ryb a jejich stáří. Akutní infekce pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) jsou provázené charakteristickými krváčeninami v tlamě a v kaudálním úseku střeva, proto je onemocnění známé pod označením **E**nteric **R**ed **M**outh (ERM). U pstruhů duhových se vyskytuje i bezpříznakové bacilonosičství, kdy je původce zjišťován v ledvinách a zadním úseku střeva ryb bez zjevných příznaků onemocnění (Furones et al., 1993).

Původce patří do čeledě Enterobacteriaceae a v rámci rodu *Yersinia* se svým fenotypem výrazně liší od ostatních zástupců rodu. *Yersinia ruckeri* se dále člení na klonální typy podle biochemické aktivity, O antigenní struktury a zastoupení proteinů ve vnější membráně buněčné stěny. Většina kmenů patří do sérologické skupiny O1, v níž se rozlišuje 6 klonálních typů. Evropské izoláty *Yersinia ruckeri* patří do klonálních typů 2 a 5, australské izoláty patří do typů 1 a 3. Ostatní typy jsou považovány za relativně avirulentní (Toback et al., 2007).

Diagnostika onemocnění je založena na hodnocení klinických příznaků a patomorfologických změn nemocných a uhynulých ryb. Suspektní diagnóza by měla být potvrzena bakteriologickým vyšetřením.

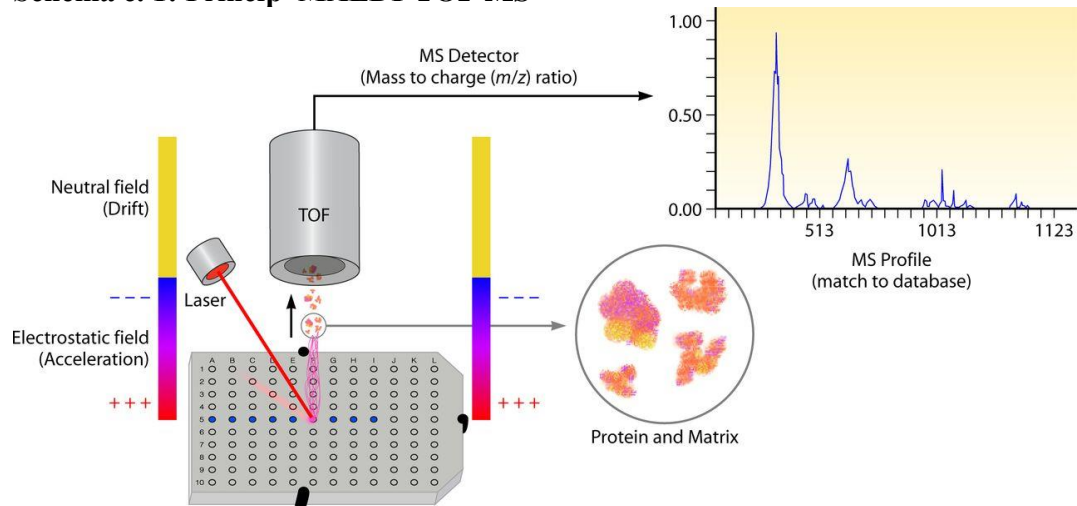
Specifické klinické příznaky, které by charakterizovaly časnou infekci vyvolanou *Yersinia ruckeri*, u ryb chybí. Jsou rozvinuty pouze příznaky společné pro všechny bakteriální septikémie ryb. U potěru bývá zaznamenán zvýšený úhyn nad úroveň přirozeného úbytku. Jsou patrné změny v chování, jako plavání při hladině a pomalé plavání, dále je zjišťována tmavá pigmentace ryb a snížený příjem krmiva. U dospělců pstruha duhového jsou nápadné krváceniny pod sliznicí v tlamě, překrvení na bázi prsních a řitních ploutví, rozšířený řitní otvor, bledá anemická žábra a exoftalmus. Mohou se vyskytnout kožní léze, které se vyvíjí až do kolikvace okrsků svalové tkáně. Na vnitřních orgánech jsou zjišťovány zánětlivé změny a krváceniny; bývá zvětšená slezina, játra a ledviny; játra mohou být anemická; může se vyvinout vodnatelnost dutiny břišní, žaludku a střeva; zadní úsek střeva bývá vyplněn žlutým hlenem s příměsí krve (Tobback et al., 2007).

Konečná diagnóza vyžaduje izolaci původce ze vzorků tkání ryb a jeho identifikaci na základě biochemické aktivity. PCR slouží ke confirmaci izolovaných kultur a neměla by být používána k přímé detekci původce u ryb bez klinických příznaků a patomorfologických změn (Altinock et al., 2001; Tobback et al., 2007).

2. 5 Princip hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie je jednou z nejnovějších analytických technik využívaných i pro účely mikrobiologické diagnostiky. Bakterie jsou identifikovány na základě porovnání profilů hmotnostního spektra jejich exprimovaných ribosomálních proteinů. Nejrozšířenější modifikací hmotnostní spektrometrie pro analýzu biomolekul je Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Princip MALDI-TOF MS spočívá v ionizaci bakteriálních proteinů laserem spektrometru, které předchází ko-krystalizace bakteriální masy s krystalizační maticí (nejčastěji jde o deriváty kyseliny skořicové). Proteinové ionty jsou elektrostaticky urychleny a prolétávají vakuovou trubicí směrem k detektoru a délka letu pak odpovídá jejich hmotnosti a velikosti náboje. Čas v nanosekundách, který uplyne mezi pulzačním zrychlením iontů a signálem zachyceným detektorem přístroje, lze přesně přepočítat na molekulovou hmotnost každého jednotlivého proteinu. Pro vlastní analýzu hmotových spekter jsou získaná data převáděna na soubor píků, který je v průběhu vlastního měření porovnáván se všemi referenčními profily uloženými v databázi přístroje (Masaříková, 2013). Spektrum letových délek všech exprimovaných proteinů vyšetřovaného vzorku je unikátní pro každý bakteriální druh (Schéma č. 1).

Schéma č. 1: Princip MALDI-TOF MS



Převzato z Clark et al. Clin. Microbiol. Rev. 2013; 26:547-603

2. 6 Princip PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je rychlá diagnostická metoda, která využívá specifických oligonukleotidových primerů, termostabilní polymerázy k amplifikaci (zmnožení) cílových sekvencí DNA. Je známo, že sekvence DNA, které kódují bakteriální 16S ribozomální RNA (rRNA), jsou u většiny bakterií vysoce konzervativní a specifické pro příslušný bakteriální druh. V tomto případě vysoce specifické pro bakteriální patogeny ryb. Pro PCR může být zvolen i jiný gen, který poskytne druhově specifické sekvence využitelné pro rozlišení bakteriálních patogenů ryb. Vlastní PCR může mít také různé provedení podle účelu jejího použití. Může být optimalizována pro přímou detekci patogena z tkání nemocné nebo uhynulé ryby nebo ke konfirmaci již izolovaných bakteriálních kultur. V prvním případě je výhodnější použít v prvním kole PCR univerzální primery a v druhém kole druhově specifické primery, tedy tzv. nested PCR. Pro druhovou konfirmaci suspektních kultur se využívají pouze specifické primery.

Sestavy primerů pro bakteriální patogeny ryb byly již dříve navrženy a ověřeny pro průkaz specifických sekvencí 16S rRNA *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* (Cepeda and Santos, 2000; Del Cerro *et al.*, 2002; Onuk *et al.*, 2010) a genu *fstA* pro rozlišení *Aeromonas salmonicida* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2008).

2. 7 Materiál a metody

2. 7. 1 Použitá zařízení

- a) Infinite M200 Pro, NanoQuant Plate (Tecan, Švýcarsko) pro kontrolu koncentrace a čistoty izolované DNA
- b) Termocyklér Biometra Professional TRIO (Biometra, Německo)
- c) Automatické pipety s nastavitelným objemem 0,5 až 2 µl; 1 až 25 µl; 20 až 200 µl (Gilson, Francie)
- d) Termoblok (suchá lázeň) – Digital dry bath (Pagnet International, Jižní Korea)
- e) MALDI TOF MS Microflex LT se softwarem FlexControl–microflex v 3.3 a Maldi Biotyper v 3.0. (Bruker Daltonics, Brehmen, Německo)
- f) Souprava na elektroforézu: zdroj napětí a elektroforetická vana EasyCast, B2 (Owl, Thermo Scientific, USA)

2. 7. 2 Použitý materiál a reagensie

2. 7. 2. 1 Bakteriální kultury

Aeromonas salmonicida CCM 7246, *A. bestiarum* CCM 4707^T, *A. piscicola* CCM 7715^T, *Flavobacterium psychrophilum* CCM 3594, *F. branchiophilum* LMG 13707^T, *F. columnare* LMG 13035^T, *Yersinia ruckeri* CCM 6093, dále také terénní izoláty bakterií.

2. 7. 2. 2 Použité reagensie

10x TBE pufr (složení: 1g NaOH (MW 40 g); 108 g Tris Base (MW 121,10 g); 55 g kyselina boritá (MW 61,83); 7,4 g EDTA (MW 372,24); doplnit H₂O do 1 l), primery (naředěné v sterilní PCR vodě na koncentraci 100 pmol/µl v zásobním roztoku a 10 pmol/µl v pracovním roztoku), PPP PCR master mix obsahující Taq polymerázu, 5 mM MgCl₂, 400 µM dNTP a další komponenty (Top-Bio, Česká republika)

2. 7. 3 Použité metody

2. 7. 3. 1 Odběr vzorků

Průkaz bakteriálních patogenů ryb vyžaduje vyšetření některých tkání a orgánů (zejména ledvin, sleziny, jater, kůže, případně jiných tkání) z reprezentativního počtu živých nebo čerstvě uhynulých ryb. Doporučuje se vyšetřit mezi 4 a 10 nemocnými rybami pro průkaz původce a mezi 10 a 60 rybami v populaci s nízkou mortalitou nebo ryb zjevně zdravých (Noga, 2010), zejména proto, že mezi bacilonosiči s nízkou koncentrací původce jsou časté falešně negativní nálezy. Průkaz patogenů v hlenu, krvi a výkalech je také doporučován, a to zejména proto, že tyto vzorky

nevyžadují usmrcení ryb (Beaz-Hidalgo et al., 2010). Pro záchyt většího počtu bacilonosičů kombinujeme pomnožení vzorků s jejich izolací na selektivních a neselektivních agarech a polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) (Byers a kol., 2002).

2. 7. 3. 2 Kultivační vyšetření

Aeromonas salmonicida

Vzorky změněných tkání jater, ledviny, sleziny, případně jiné vzorky (obsah střeva, stěry z kožních vředů, aj.) kultivujeme na Columbia krevní agar s 5 % ovčí krve nebo Tryptózo-sojový agar (TSA) a agar s mozkosrdcovou infuzí (BHIA). Naočkované agary inkubujeme aerobně při teplotě 20 - 25 °C po dobu 3-4 dnů. Suspektní kolonie na TSA a BHIA poznáme podle produkce hnědého difuzibilního pigmentu v okolí kolonií *A. salmonicida*. Je nutné počítat s tím, že některé kmeny *A. salmonicida* tento pigment netvoří nebo naopak jej tvoří jiné druhy aeromonád (např. *A. media*). Na Columbia krevním agaru je kolem kolonií patrná úzká zóna úplné hemolýzy. Podezřelé kolonie přeočkujeme na některé z uvedených médií a za stejných podmínek získáme čisté kultury, které následně identifikujeme dle biochemické aktivity, dnes zejména komerčními testy, např. API 20E (Biomérieux, Francie). Profil v API testu bývá 0006104, 2006104, 4006104, 6006104 a 6006504. Inkubace při teplotě 22-25 °C může k negativním výsledkům prvních tří testů: arginindihydrolázy, lyzindekarboxyláza a beta-galaktozidázy. Proto na první pozici v profilu mohou být takto variabilní výsledky. Nulová hodnota je často získána po 24-48 hodinách inkubace testu při laboratorní teplotě a prodlouženou inkubací se mohou získat pozitivní výsledky. Dalšími testy k potvrzení suspektní kultury *A. salmonicida* je negativní pohyb, pozitivní cytochromoxidázový test a fermentace glukózy v OF testu.

Flavobacterium psychrophilum

Vzorky stěrů z kožních změn a parenchymatózních orgánů kultivujeme na Anacker a Ordalův agar [Bacto Peptone (Difco) 5 g . l⁻¹; yeast extract (Oxoid) 0,5 g . l⁻¹; sodium acetate (Sigma, St. Louis, USA) 0,01 g . l⁻¹; agar No. 1 (Oxoid) 15 g . l⁻¹] a inkubujeme aerobně při teplotě

18 °C po dobu 3-5 dnů. Suspektní kolonie jsou jasně žluté s konvexním středem a plazivě se šířícími okraji. Je třeba uvést, že existují i další média např. TYES agar [Bacto Tryptone (Difco) 4,0 g . l⁻¹; yeast extract (Oxoid), 0,4 g . l⁻¹; CaCl₂ . 2H₂O (Sigma), 0,2 g . l⁻¹;

MgSO₄ · 7H₂O (Sigma) 0,5 g · l⁻¹; Agar No. 1 10,0 g · l⁻¹], která mohou poskytovat i vyšší záchytnost z terénních vzorků. Z biochemické aktivity jsou nápadné negativní testy na utilizaci glukózy, laktózy a sacharózy; negativní redukce nitrátů, slabá katalázová zkouška, produkce sirovodíku, proteolýza želatiny, kaseinu a albuminu. Test na flexirubin je pozitivní, tj. oranžovohnědé zbarvení kolonií po přidání 20% KOH. Pro značnou variabilitu morfologie kolonií, která je závislá na podmínkách kultivace (složení média, inkubační teplota apod.), a přítomnost řady druhů flavobakterií ve vodním prostředí se doporučuje potvrdit identifikaci metodou PCR.

Yersinia ruckeri

Vzorky změněných tkání jater, ledviny, sleziny, případně jiné vzorky (obsah střeva, stěry z kožních změn, očních změn aj.) kultivujeme na tryptózo-sojový agar, MacConkey agar nebo agar s xylózou lyzinem a desoxycholátem sodným – XLD (Oxoid, Velká Británie), zejména chceme-li zjistit úroveň bacilonosičství ve střevě ryb. Naočkované agary inkubujeme aerobně při teplotě 25 ° C po dobu 3 dnů. Suspektní kolonie jsou podrobeny biochemické identifikaci některým z komerčně dostupných mikrotestů pro enterobakterie, např. API 20E (Biomerieux, Francie). Odpovídající profil v API testu bývá 5100100, 5104100. Podobnou biochemickou aktivitou vynikají zástupci rodu *Hafnia* a *Serratia*, což může u použití mikrotestů činit potíže při konečné identifikaci.

2. 7. 3. 3 Konfirmace suspektních kultur hmotnostní spektrometrií

Identifikace bakteriálních kultur je prováděna podle instrukcí výrobce s využitím MALDI TOF MS Microflex LT se softwarem FlexControl–microflex v 3.3 a Maldi Biotyper v 3.1. (Bruker Daltonics, Brehmen, Germany). Zkráceně, bakteriální masa z jedné izolované kolonie je přenesena na terčík krystalizační destičky a převrstvena jedním mikrolitrem krystalizační matrice (kys. skořicová). Organické rozpouštědlo, které je v matrici obsaženo, extrahuje z mikroorganismu jednotlivé bílkoviny. Po dokončení krystalizace je destička vložena do hmotnostního spektrometru a po obnovení vakua je zahájeno vlastní měření. Výsledek analýzy se zobrazí v podobě názvu identifikovaného bakteriálního druhu a je doprovázen číselným skóre, které představuje míru pravděpodobnosti konkrétní klasifikace. Další podrobnosti je možno nalézt v Maldi Biotyper 3.1, uživatelský manuál.

2. 7. 3. 4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

2. 7. 3. 4. 1 Příprava cílové DNA

Ze suspektní bakteriální kultury izolujeme DNA komerčně vyráběným kitem (např. Qiagen, ...) nebo povařením kultury. Koncentraci DNA ve vzorku změříme a upravíme na požadovanou koncentraci.

Pokud izolujeme DNA přímo z bakteriální kultury, není nezbytné používat extrakční kit a je možné izolovat DNA tímto způsobem:

- a) do Eppendorfovy zkumavky nepipetujeme 200 μ l TE pufru
- b) sterilní bakteriologickou kličkou odebereme čistou bakteriální kulturu a suspendujeme ji v TE pufru
- c) upravíme denzitu změřením zákalu na spektrofotometru tak, aby optická denzita při 525 nm byla $\leq 0,6$, nebo kulturu ředíme na koncentraci $0,6 \times 10^{-4}$ KTJ (tj. připravíme zákal o denzitě 2,0 stupně Mc Farlandovy zákalové škály a ředíme 1: 10 000). Do „master mixu“ přidáme 10 μ l ředěné kultury.

2. 7. 3. 4. 2 Dokumentace údajů

1. Údaje o vzorku zapíšeme do příslušného pracovního listu (viz. Příloha).
2. Zaznamenáme údaje o výpočtu podílu jednotlivých složek v „master mixu“ podle počtu vzorků včetně pozitivní a negativní kontroly.

2. 7. 3. 4. 3 Příprava „master mixu (MM)“

1. V PCR boxu nebo v místnosti určené k přípravě PCR reakcí smísíme z jednotlivých složek MM, a rozplníme ho podle provedených výpočtů. Zkumavky pro PCR s 24 μ l MM těsně uzavřeme a přeneseme do místnosti pro přidání vzorků.
2. Zkumavky popíšeme čísly vzorků podle pracovního listu. Pipetujeme 1 μ l vzorku do jednotlivých zkumavek, které těsně uzavřeme.

a) Pro confirmaci *A. salmonicida* byly použity primery pro gen *fstA* podle Beaz-Hidalgo *et al.*, (2008): Fer-3: 5' CGGTTTTGGCGCAGTGACG 3';

Fer-4: 5' AGGCGCTCGGGTTGGCTATCT 3'. Objem reakce byl 20 μ l a byl použit PPP MasterMix (Top-Bio) a 1 μ l DNA na každou reakci (DNA izolovaná varem a kitem (Macherey-Nagel, NucleoSpin Blood kit).

b) Pro konfirmaci *F. psychrophilum* byly použity primery podle Cepeda a Santos, (2000): PSY1: 5'- CGA TCC TAC TTG CGT AG - 3'; PSY2: 5'-GTT GGC ATC AAC ACA CT -3'.

c) Pro konfirmaci *Y. ruckeri* byly použity primery podle Onuk *et al.*, (2010) : YER8: 5'- GCG AGG AGG AAG GGT TAA GTG- 3'; YER10: 5'- GAA GGC ACC AAG GCA TCT CTG -3'

2. 7. 3. 4. 4 Programování termocykléru

Aeromonas salmonicida

- a) Počáteční denaturace při 94°C po dobu 5 minut
- b) 36 cyklů: denaturace při 94°C po dobu 45 vteřin, vazba primerů při 64 °C po dobu 50 vteřin, amplifikace při 72°C po dobu 45 vteřin
- c) Závěrečná amplifikace při 72°C po dobu 4 minut
- d) Uchování při 4 °C

Flavobacterium psychrophilum

- a) Počáteční denaturace při 94°C po dobu 5 minut
- b) 40 cyklů: denaturace při 94°C po dobu 45 vteřin, vazba primerů při 52,5 °C po dobu 60 vteřin, amplifikace při 72°C po dobu 60 vteřin
- c) Závěrečná amplifikace při 72°C po dobu 4 minut
- d) Uchování při 4 °C

Yersinia ruckeri

- a) Počáteční denaturace při 94°C po dobu 5 minut
- b) 32 cyklů: denaturace při 94°C po dobu 45 vteřin, vazba primerů při 57 °C po dobu 45 vteřin, amplifikace při 72°C po dobu 45 vteřin
- c) Závěrečná amplifikace při 72°C po dobu 4 minut
- d) Uchování při 4 °C

2. 7. 3. 4. 5 Vizualizace a separace PCR produktu horizontální elektroforézou

- a) Připravíme 1x TBE pufr ze zásobního 10x koncentrovaného pufru pro následnou přípravu agarózového gelu a pro naplnění elektroforetické vany. K přípravě pufru použijeme sterilní deionizovanou vodu.

- b) Připravíme vhodnou vaničku pro horizontální elektroforézu podle pokynů výrobce. Vypočítáme odpovídající objem pufru podle objemu vzorku, který chceme nanášet do jamky gelu a velikosti vaničky pro elektroforézu.
- c) Připravíme 1,5% agarózový gel tak, že navážíme odpovídající navážku agarózy do odpovídajícího objemu 1x pufru TBE v NTS láhvi s modrým uzávěrem.
- d) V mikrovlnné troubě při maximálním příkonu zahřejeme po dobu 30 vteřin. Láhev vyjmeme a krouživým pohybem lehce promícháme. Opět zahřejeme 30 vteřin při maximálním výkonu a stejným způsobem promícháme. Opakujeme, dokud se roztok nezačne vařit a agaróza není kompletně rozvařena. Dříve než agarózu nalijeme do vaničky ELFO, zchladíme ji na 65°C (měříme teploměrem nebo orientačně zkusíme přiložit hřbet ruky – nesmí nás pálit).
- e) Agarózu vylijeme do vaničky, aby výška dosáhla asi 1 cm (bereme v úvahu při výpočtu objemu připravované agarózy) a zkontrolujeme polohu hřebínku. Špičkou pipety nebo jednorázovou kličkou odstraníme tvořící se bubliny.
- f) Agarózu necháme dostatečně dlouho chladnout a pak odstraníme hřebínek a boční zarážky vaničky.
- g) Upravíme pozici agarózového gelu tak, aby konec s jamkami byl blíže negativní (černé) elektrodě.
- h) Opatrně naplníme ELFO 1x koncentrovaným pufrem TBE tak, aby byl gel asi 1 mm ponořen.
- i) Do pracovního listu zapíšeme pozice vzorků (produktů PCR), DNA markeru a kontrol na gelu.
- j) Pro každý vzorek napipetujeme kapky 2 μ l barviva pro plnění (gel loading dye) na čistý proužek parafilmu v dostatečné vzdálenosti od sebe, aby při míšení vzorků nedošlo k jejich kontaminaci. Před nanesením vzorku odebereme 10 μ l vzorku (PCR produktu) a na parafilmu dostatečně smísíme s barvivem opakovaným vypuzením a nasátím. Celý tento krok lze vypustit, pokud použijeme MM, který je svým složením přizpůsoben přímému nanesení vzorku po provedené amplifikaci (např. PPP master mix, Top-Bio).
- k) Připravený vzorek aplikujeme v objemu 10 μ l do jamky gelu v pořadí podle pracovního listu. Stejným postupem naneseeme pozitivní a negativní kontroly. Rovněž naneseeme DNA marker, a to na první a poslední pozici.
- l) Elektroforéza probíhá v 1,5 % agarózovém gelu při 110 V po dobu cca 90 minut.

2. 7. 3. 4. 6 Kontrola kvality

Jako pozitivní kontrolní bakteriální kultury používáme typové kmeny s návazností na ATCC a CCM: *Flavobacterium psychrophilum* CCM 3594, *Yersinia ruckeri* CCM 6093, *Aeromonas salmonicida* CCM 7246. Jako negativní kontrolní bakteriální kultury sloužily kmeny s návazností na ATCC a CCM: *A. bestiarum* CCM 4707^T, *A. piscicola* CCM 7715^T, *F. branchiophilum* LMG 13707^T a *F. columnare* LMG 13035^T.

2. 7. 3. 4. 7 Vyhodnocení výsledků

2. 7. 3. 4. 7. 1 Identifikace izolátů *Y. ruckeri* a *A. salmonicida* hmotnostní spektrometrií

Dostupná databáze FlexControl–microflex v 3.3 a Maldi Biotyper v 3.1 (DB 4613) zahrnuje pouze 8 druhů flavobakterií bez druhu *F. psychrophilum*. Proto využití MALDI TOF pro identifikaci *F. psychrophilum* zatím není možné. Identifikace druhů *Y. ruckeri* a *A. salmonicida* je možná podle instrukcí výrobce zařízení. Hodnoty „Score value“ udávají 2,3 až 3,0 vysoce pravděpodobná identifikace druhu, 2,0 až 2,3 pravděpodobná identifikace druhu a bezpečná identifikace rodu, 1,7 až 1,9 pravděpodobná identifikace rodu, 0 až 1,699 nespolehlivá identifikace (Maldi Biotyper 3.1, uživatelský manuál). U hodnot nižších než 2,300 doporučujeme identifikaci potvrdit druhově specifickou PCR.

2. 7. 3. 4. 7. 2 Konfirmace suspektních terénních izolátů *Y. ruckeri*, *A. salmonicida* a *F. psychrophilum* metodou PCR

Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida

PCR zaměřená na specifický průkaz *A. salmonicida* vychází z uveřejněných publikací (Beaz-Hidalgo et al., 2008; 2013), které umožňují odlišit *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* od ostatních poddruhů a blízkce příbuzných druhů aeromonád. Při použití cílové DNA izolované považením kultury jsou získány intenzivní reakce bez výskytu nespecifických produktů (obr. č. 1), nespecifické produkty se mohou vyskytnout při použití DNA izolované kitem (obr. č. 2). Je možné odlišit i blízkce příbuzné druhy *A. bestiarum* a *A. piscicola*. Velikost produktu specifického pro *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* je 422 bp.

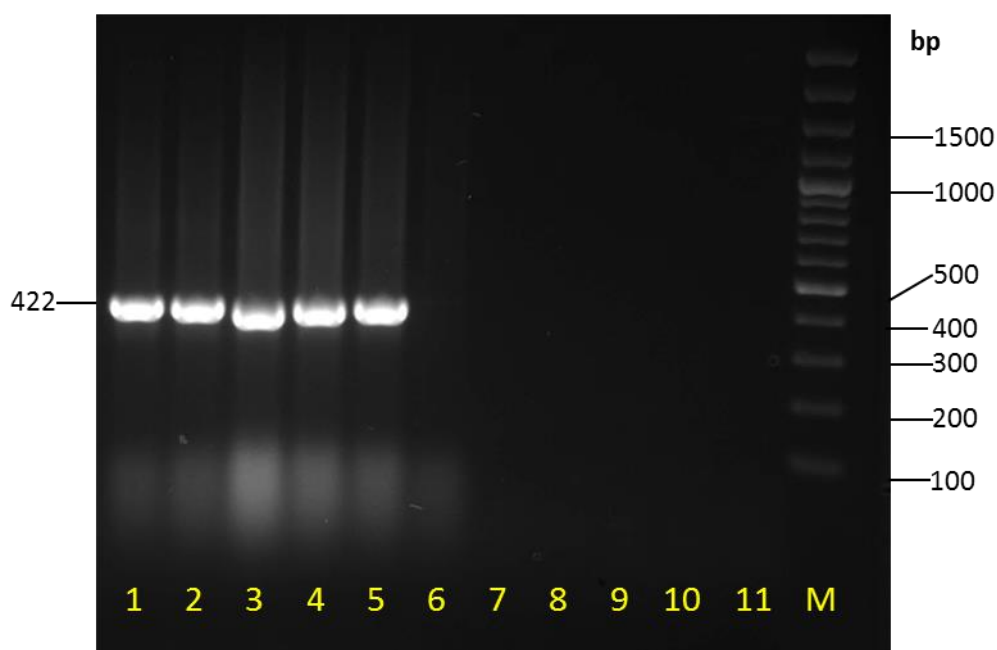
Flavobacterium psychrophilum

Ke specifickému průkazu *Flavobacterium psychrophilum* metodou PCR byla použita sestava primerů publikovaných Cepeda a Santos (2000). PCR probíhá bez nespecifických reakcí a

dává spolehlivý a silný signál o velikosti 1100 bp při použití DNA izolované kitem. Specifitu reakce dokládají výsledky dokumentované na obrázcích č. 3 a 4.

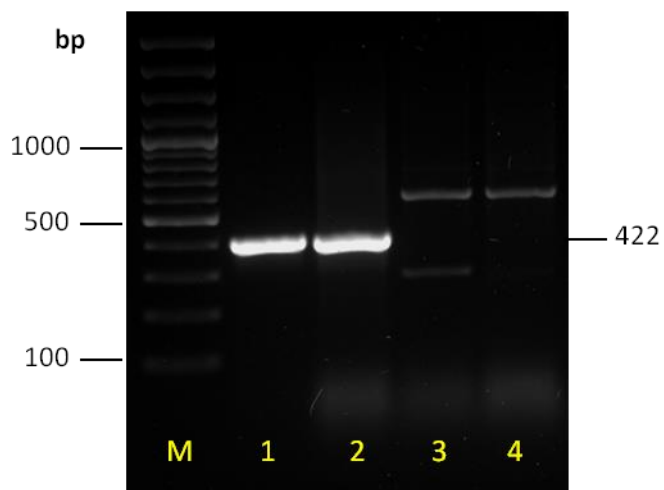
Yersinia ruckeri

Ke specifickému průkazu *Yersinia ruckeri* metodou PCR byla použita sestava primerů publikovaných Onuk *et al.* (2010). Získané výsledky PCR jsou znázorněny na obrázku č. 5. Velikost specifického produktu je 575 bp. Tvorba nespecifický produktů amplifikace nebyla zaznamenána.

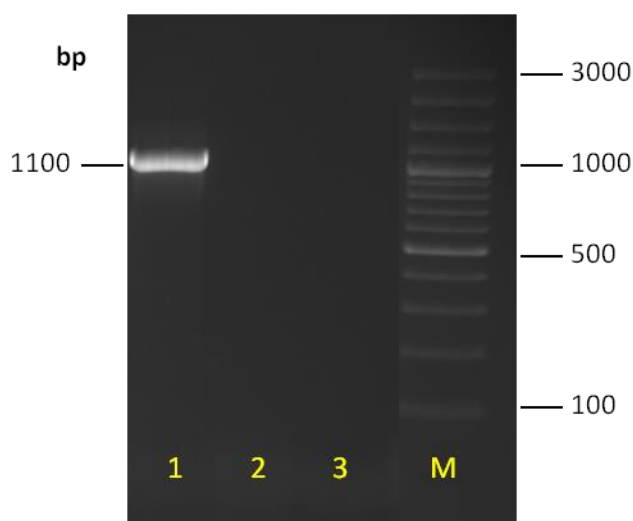


Obrázek č. 1: Porovnání výsledku PCR zaměřené na průkaz *A. salmonicida* (1,5 % agarózový gel; 110 V; cca 90 min)

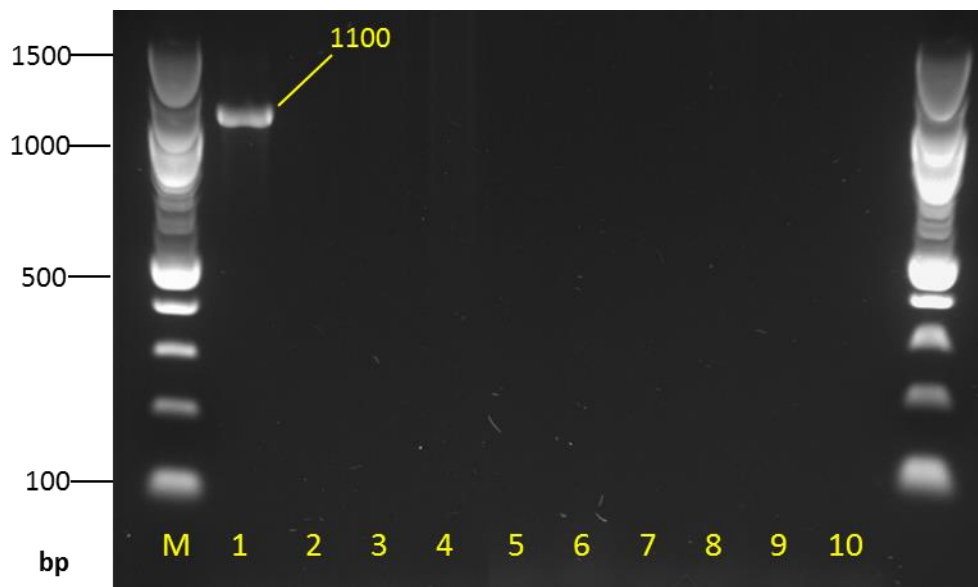
- 1 – *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (CCM 7246), DNA varem
- 2 – *Aeromonas salmonicida* (83882 – terénní izolát), DNA varem
- 3 – *Aeromonas salmonicida* (87948 – terénní izolát), DNA varem
- 4 – *Aeromonas salmonicida* (88080 – terénní izolát), DNA varem
- 5 – *Aeromonas salmonicida* (89406 – terénní izolát), DNA varem
- 6 – *Yersinia ruckeri* (CCM 6093), DNA varem
- 7 – *Flavobacterium psychrophilum* (CCM 3594), DNA varem
- 8 – *Salmonella* spp. (č. 58)
- 9 – *Salmonella* spp. (č. 1)
- 10 – *Enterobacter cloacae* (č. 216)
- 11 – vzorek bez DNA
- M – DNA marker M – DNA marker (GeneRuler 100 bp Plus, Thermo Scientific, USA)



Obrázek č. 2: Porovnání výsledku PCR zaměřené na průkaz *A. salmonicida*
 1,5 % agarózový gel; 110 V; cca 100 min a 130 min
 1 – *Aeromonas salmonicida* (CCM 7246), DNA kitem
 2 – *A. salmonicida* (CCM 7246), DNA varem
 3 – *A. bestiarum* (CCM 4707), DNA varem
 4 – *A. piscicola* (CCM 7715), DNA varem
 M – DNA marker (GeneRuler 100 bp Plus, Thermo Scientific, USA)

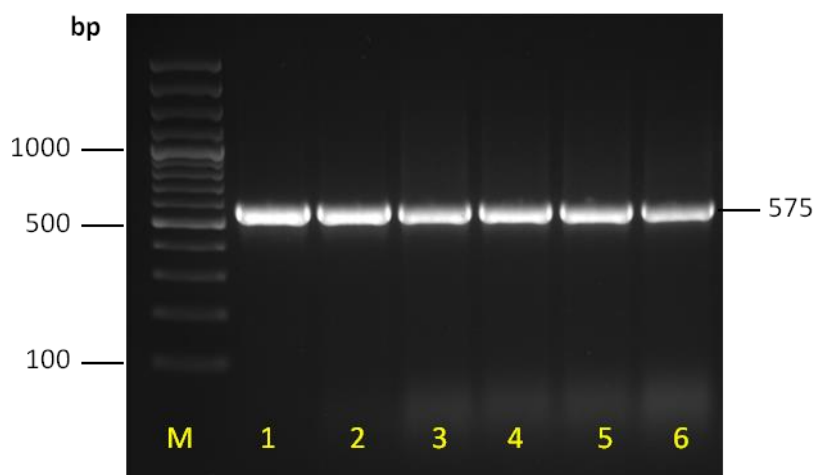


Obrázek č. 3: Porovnání výsledku PCR při vyšetření 3 druhů flavobakterií patogenních pro ryby
 1 – *Flavobacterium psychrophilum* (CCM 3594), DNA kitem
 2 – *F. columnare*, (LMG 13035), DNA varem
 3 – *F. branchiophilum*, (LMG 13707), DNA varem
 M – DNA marker (GeneRuler 100 bp Plus, Thermo Scientific, USA)



Obrázek č. 4: Výsledky vyšetření DNA různého původu metodou PCR zaměřenou na průkaz *Flavobacterium psychrophilum*

- 1 – *Flavobacterium psychrophilum* (CCM 3594), DNA kitem
- 2 – *Yersinia ruckeri* (CCM 6093), DNA kitem
- 3 – *Aeromonas salmonicida* (CCM 7246), DNA kitem
- 4 – *Y. ruckeri* (88802, terénní kmen), DNA kitem
- 5 – *Escherichia coli* (č. 3861), DNA varem
- 6 – *Yersinia ruckeri* (CCM 6093), DNA varem
- 7 – *Aeromonas salmonicida* (CCM 7246), DNA varem
- 8 – *Y. ruckeri* (88802, terénní kmen), DNA varem
- 9 – *Salmonella* spp. (č. 58), DNA varem
- 10 – *Enterobacter cloacae* (č. 216) DNA varem
- M – DNA marker (100 bp ladder, New England Biolabs)



Obrázek č. 5: Výsledky vyšetření DNA kultur *Y. ruckeri* metodou PCR (1,5 % agarózový gel; 110 V; cca 1 h 20 min)
M – DNA marker (GeneRuler 100 bp Plus, Thermo Scientific, USA)
1 – *Yersinia ruckeri* (CCM 6093), DNA kitem
2 – *Y. ruckeri* (CCM 6093), DNA varem
3 – *Y. ruckeri* (85365, terénní kmen)
4 – *Y. ruckeri* (85719, terénní kmen), ledvina B
5 – *Y. ruckeri* (88805, terénní kmen)
6 – *Y. ruckeri* (88808, terénní kmen)

2. 7. 3. 4. 8 Komentář k výsledkům získaným MALDI-TOF MS

Odlišení *A. salmonicida* a *A. bestiarum* na základě vysoké příbuznosti sekvencí of 16S rRNA je velmi obtížné (liší se pozicí pouze 2 nukleotidů) (Martin-Carnahan a Joseph, 2005). Při identifikaci typických suspektních izolátů *A. salmonicida* jsou tyto vyhodnocovány jako *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, případně i *A. eucrenophila*. Definitivní identifikace *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* by měla být ještě potvrzena metodou PCR.

V současné době je známo 127 validních druhů v rámci rodu *Flavobacterium* a většina z nich je součástí vodních ekosystémů. Většině laboratoří dostupná databáze FlexControl–microflex v 3.3 a Maldi Biotyper v 3.1 (DB 4613) zahrnuje pouze 8 druhů flavobakterií bez druhu *F. psychrophilum*. Proto využití MALDI TOF pro identifikaci *F. psychrophilum* zatím není možné.

V případě *Y. ruckeri* je třeba se řídit instrukcemi výrobce dle velikosti identifikačního skóre. Opět při nižším skóre než 2,300 je vhodné identifikaci potvrdit druhově specifickou PCR.

2. 7. 3. 4. 9 Komentář k výsledkům získaným metodou PCR

I na úrovni poddruhů tvoří *A. salmonicida* velmi uniformní skupinu, u které je možné najít jen malé rozdíly v sekvencích genů *gyrB* a housekeeping genů *rpoB* a *rpoD*. Z těchto důvodů nebyla donedávna k dispozici spolehlivá metoda k rozlišení *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Odlišení umožňuje PCR, která detekuje sekvence genu *fstA*, který kóduje sideroforový receptor pro železité ionty (Beaz-Hidalgo et al., 2013). Tento formát PCR umožňuje rychlou confirmaci suspektních kultur *A. salmonicida*.

V případě specifického průkazu *Flavobacterium psychrophilum* metodou PCR byly ověřeny primery navržené Cepeda a Santos (2000). Jelikož byl k dispozici pouze typový kmen a sbírkové kmeny příbuzných druhů, nebylo možné provést vyšetření terénních izolátů příslušného druhu. PCR vyžaduje použití DNA izolované komerčními kity, při využití DNA získané varem může poskytovat negativní výsledky.

Ke specifickému průkazu *Yersinia ruckeri* metodou PCR byla použita sestava primerů publikovaných Onuk et al. (2010). Tvorba nespecifický produktů amplifikace nebyla zaznamenána a PCR se na testovaném souboru terénních izolátů osvědčila.

2. 7. 3. 4. 10 Závěr

- K identifikaci suspektních kultur *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* a *Yersinia ruckeri* lze využít popsané metodiky PCR.
- MALDI-TOF MS usnadňuje výběr kolonií *Aeromonas salmonicida* a *Yersinia ruckeri* vhodných pro další subkultivaci a následnou identifikaci těchto původců bakteriálních infekcí ryb
- Spojení MALDI-TOF MS a PCR poskytuje urychlení identifikace suspektních kultur *Aeromonas salmonicida* a *Yersinia ruckeri*.
- Aplikace MALDI-TOF MS a PCR usnadňuje a zpřesňuje diagnostiku významných bakterií lososovitých ryb, které mohou unikat pozornosti bakteriologů v diagnostických laboratořích.

3. Příloha

Pracovní list pro průkaz *Aeromonas salmonicida* metodou PCR

Primery pro *Aeromonas salmonicida*

Forward	Reverse
5'- CGGTTTTGGCGCAGTGACG - 3'	5'-AGGCGCTCGGGTTGGCTATCT-3'

Datum ředění	
Označení primerů	
Místo uložení	

KONTROLNÍ ÚDAJE

Pozitivní kontrola

<i>Aeromonas salmonicida</i> CCM....		
Datum extrakce	Číslo extraktu	Výsledek PCR +/-

Negativní kontrola

<i>Aeromonas hydrophila</i> CCM		
Datum extrakce	Číslo extraktu	Výsledek PCR +/-

Použitý termocyklér

Typ/inventární číslo	Datum, čas	Program číslo

Údaje o použitém gelu

Objem pufru (ml)	Typ/výrobce agarózy	Navážka agarózy (g)

DNA ladder	Typ	Výrobní číslo

Pozice vzorků na gelu

(zaznamenej číslo vzorku k příslušné jamce, včetně + a - kontrol)
- ladder je vždy v první a poslední jamce

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	24				

Datum:

Podpis pracovníka:

Pracovní list pro průkaz *Flavobacterium psychrophilum* metodou PCR

Primery pro *Flavobacterium psychrophilum*

Forward	Reverse
5´ - CGA TCC TAC TTG CGT AG - 3´	5´-GTT GGC ATC AAC ACA CT -3´

Datum ředění	
Označení primerů	
Místo uložení	

KONTROLNÍ ÚDAJE

Pozitivní kontrola

<i>Flavobacterium psychrophilum</i> CCM....		
Datum extrakce	Číslo extraktu	Výsledek PCR +/-

Negativní kontrola

<i>Flavobacterium columnare</i> BCC		
Datum extrakce	Číslo extraktu	Výsledek PCR +/-

Použitý termocyklér

Typ/inventární číslo	Datum, čas	Program číslo

Údaje o použitém gelu

Objem pufru (ml)	Typ/výrobce agarózy	Navážka agarózy (g)

DNA ladder	Typ	Výrobní číslo

Pozice vzorků na gelu (zaznamenej číslo vzorku k příslušné jamce, včetně + a - kontrol)
- ladder je vždy v první a poslední jamce

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	24				

Datum:

Podpis pracovníka:

Pracovní list pro průkaz *Yersinia ruckeri* metodou PCR

Primery pro *Yersinia ruckeri*

Forward	Reverse
5'- GCG AGG AGG AAG GGT TAA GTG - 3'	5'- GAA GGC ACC AAG GCA TCT CTG - 3'

Datum ředění	
Označení primerů	
Místo uložení	

KONTROLNÍ ÚDAJE

Pozitivní kontrola

<i>Yersinia ruckeri</i> CCM....		
Datum extrakce	Číslo extraktu	Výsledek PCR +/-

Negativní kontrola

<i>Yersinia enterocolitica</i> CCM		
Datum extrakce	Číslo extraktu	Výsledek PCR +/-

Použitý termocyklér

Typ/inventární číslo	Datum, čas	Program číslo

Údaje o použitém gelu

Objem pufru (ml)	Typ/výrobce agarózy	Navážka agarózy (g)

DNA ladder	Typ	Výrobní číslo

Pozice vzorků na gelu

(zaznamenej číslo vzorku k příslušné jamce, včetně + a - kontrol)
- ladder je vždy v první a poslední jamce

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	24				

Datum:

Podpis pracovníka:

4. Srovnání „novosti postupů“

Za poslední období několika málo let došlo k získání řady nových poznatků, které objasňují dřívější neúspěchy při průkazu *F. psychrophilum* a identifikaci atypických izolátů *A. salmonicida*. Dále došlo k rozšíření instrumentálního vybavení veterinárních diagnostických laboratoří pro zabezpečení metod molekulární biologie, což umožňuje jejich širší využití v rutinních postupech mikrobiologické diagnostiky. Tato metodika využívá aktuální vědecké poznatky, které jsou zapracovány do samostatného standardního operačního postupu (SOP) pro confirmaci kultur *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* a *Aeromonas salmonicida* metodami hmotnostní spektrometrie a PCR.

5. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro veterinární diagnostické laboratoře a pro vědecké pracovníky, kteří se zabývají diagnostikou infekčních chorob ryb. Metodika může být využita veterinárními laboratořemi k urychlení a zkvalitnění stávajících postupů diagnostiky bakterióz lososovitých ryb a diferenciální diagnostiky bakterióz i jiných druhů ryb.

6. Ekonomické aspekty

Ekonomický přínos metodiky vychází z předpokladu včasné diagnostiky bakteriálních infekcí lososovitých ryb. Využívání předloženého metodického postupu povede k zrychlení a zpřesnění bakteriologické diagnostiky u ryb z recirkulačních systémů i jiných technologií. Lze předpokládat, že zavedením metodiky dojde ke zkrácení doby pro potvrzení konečné diagnózy a tím včasnějšímu zavedení léčebných a preventivních opatření. To může snížit ztráty úhynem ryb řádově o několik procent, což bude představovat například pro podnik s produkcí 30 tun lososovitých ryb finanční částku ve výši 60 000 až 90 000 Kč ročně.

7. Seznam použité související literatury

- Altinok I., Grizzle J.M., Liu Z. (2001) Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 44, pp.29–34.
- Anacker, R.L., Ordal, E.J. (1959). Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*: I. Serological typing. *Journal of Bacteriology* 78, pp. 25– 32.
- Austin, B., Austin, D.A., (2007). Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish. Fourth edition. Springer-Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK., 552 pp.
- Barnes, M.E. a Brown, M.L. (2011). A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. *The Open Fish Science Journal* 4, pp. 40-48.
- Beaz-Hidalgo, R., Magi, G.E., Balboa, S., Barja, J.L., Romalde, J.L. (2008). Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Veterinary Microbiology* 128, pp. 386-394.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J.L., Figueras, M.J. (2010). Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology* 33, pp. 149-153.
- Beaz-Hidalgo, R., Latif-Eugenin, F., Figueras, M.J. (2013). The improved PCR of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene differentiates the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* from other *Aeromonas* species. *Veterinary Microbiology* 166, pp. 659-663
- Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P., (1996). Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, pp. 128– 148.
- Byers, H.K., Gudkovs, N., Crane, M.S. (2002a). PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* I. Evaluation of three PCR primer sets for detection and identification. *Diseases of Aquatic Organisms* 49, pp. 129-138.
- Byers, H.K.; Cipriano, R.C.; Gudkovs, N., Crane, M.S. (2002b). PCR-based assays for the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* II. Further evaluation and validation of three PCR primer sets with infected fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 49, pp. 139-144.

- Cepeda, C., Santos, Y. (2000.) Rapid and low-level toxic PCR-based method for routine identification of *Flavobacterium psychrophilum*. *International Microbiology*, 3, pp. 235-238.
- Cepeda, C., García-Márquez, S., Santos, Y. (2004). Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. *Aquaculture* 238, pp. 75-82.
- Clark, A.E, Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M. (2013) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 26, pp. 547-603.
- Del Cerro, A., Marquez, I., Guijarro, J. A. (2002). Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 68, pp.5177-5180.
- Figueras, M. J. (2005). Clinical relevance of *Aeromonas*. *Reviews in Medical Microbiology* 16, pp. 145-153.
- Furones, M., Rodgers, C., Mann, C. (1993). *Yersinia ruckeri*, the causal agent of Enteric Redmouth Disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3, pp.105-125.
- Goodwin, A.E. a Merry, G.E. (2009). Are all koi ulcer cases associated with infection by atypical *Aeromonas salmonicida*? Polymerase chain reaction assays of koi carp skin swabs submitted by hobbyists. *Journal of Aquatic Animal Health* 21, pp. 98-103.
- Gustafson, C.E., Thomas, C.J., Trust, J.T. (1992). Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Applied and Environmental Microbiology* 58, pp. 3816-3825.
- Han, H.J., Kim, D.Y., Kim, W.S., Kim, C.S., Jung, S.J., Oh, M.J., Kim, D.H. (2011). Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in the black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf, in Korea. *Journal of Fish Diseases* 34, pp. 47-55.
- Iida, Y., Mizokami, A., (1996). Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathology* 34, pp. 89– 90.
- Lehmann, J., Mock, D., Stürenberg, F.J., Bernardet, J.F., (1991). First isolation of *Cytophaga psychrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids. *Diseases of Aquatic Organisms* 10, pp. 217– 220.
- Noga, E.J. (2010). *Fish Diseases* (2nd edition) Willey-Blackwell, ISBN 978-0-8138-0697-6, Singapore.

Martin-Carnahan A, Joseph SW (2005) Genus I. *Aeromonas* Stanier 1943, 213AL. In: D. J. Brenner NRK, J. T Staley, and, GMG (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York, NY.: Springer.,. 557–578.

Martínez, J.L., Casado, A, Enríquez, R. (2004). Experimental infection of *Flavobacterium psychrophilum* in fins of Atlantic salmon *Salmo salar* revealed by scanning electron microscopy. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, pp. 74-84.

Onuk, E.E., Ciftci, A., Findik, A., Durmaz, Y. (2010). Development and evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in culture fisheries. *Journal of Veterinary Science* 11, pp. 235-241.

Tirola, M., Valtonen, E.T., Rintamäki-Kinnunen, P. (2002). Diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes. *Diseases of Aquatic Organisms* 51, pp. 93-100.

Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 30, 257–268

Wiklund, T. a Dalsgaard, I. (1998). Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish hosts. *Diseases of Aquatic Organisms* 32, pp. 49-69.

8. Seznam publikací, které předcházejí metodice

Čížek, A., Dolejská, M., Sochorová, R., Strachotová, K., Piačková, V., Veselý, 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, pp. 435-439.

**Využití hmotnostní spektrometrie MALDI TOF a polymerázové řetězové reakce ke
konfirmasi suspektních kultur *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*
a *Yersinia ruckeri***

Alois Čížek, Ivan Manga, Martina Masaříková

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno.
Tisk: Ediční středisko Mendelovy univerzity v Brně
Vydání: první, 2014
Počet stran: 32
Náklad: 50 ks
ISBN 978-80-7375-954-4