

**Hygiena chovu drůbeže a skotu,  
testování antimikrobního účinku biocidů  
(dezinfekčních přípravků) ve veterinární sféře**

**Autoři**

MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D., doc. MVDr. Soňa Šlosárková, Ph.D., doc. MVDr. Alena Pechová, CSc.,  
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.,  
MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D., MVDr. Vladimír Sládeček,  
MVDr. David Šenk, Ph.D., MVDr. Petr Stolář, MVDr. Matěj Petr

Ptácy s.r.o. Valašská Bystřice, 756 27 Valašská Bystřice 194

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

**2024**

## **Poděkování**

Vydání této publikace vychází i z poznatků řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství ČR - Národní agentury pro zemědělský výzkum číslo QK22020292.

Finančně bylo podpořeno Českou technologickou platformou pro zemědělství.

**Název:** Hygiena chovu drůbeže a skotu, testování antimikrobního účinku biocidů (dezinfekčních přípravků) ve veterinární sféře

**Vydavatel:** Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. (první vydání)  
ZS ČR

**ISBN:** 978-80-7672-061-9

## 1. Obsah

1. Obsah.....	1
2. Úvod .....	4
3. Abstrakt .....	5
4. Summary .....	6
5. Testování mikrobiologické zátěže násadových vajec.....	7
5.1. Úroveň kontaminace násadových vajec, kontrola účinnosti dezinfekce vajec .....	9
5.1.1. Bakteriologické vyšetření skořápek.....	10
5.1.2. Bakteriologické vyšetření vaječných obsahů.....	11
5.1.3. Testování účinnosti dezinfekčních prostředků u násadových vajec .....	12
5.2. Kvalita a kontaminace nalíhlých kuřat.....	14
5.3. Monitoring mikrobiologické zátěže prostředí drůbežárny.....	15
5.3.1. Monitoring mikrobiální zátěže podestýlky .....	15
5.3.2. Monitoring mikrobiální zátěže kadaverů rodičů .....	18
5.3.3. Monitoring mikrobiální zátěže snáškových hnízd .....	18
5.4. Monitoring mikrobiální zátěže líhní.....	18
5.4.1. Vizuální posouzení doručených násadových vajec.....	19
5.4.2. Pravidelná mikrobiologická kontrola prostředí líhně .....	19
5.4.3. Mikrobiologická kontrola líhňářských odpadů .....	20
5.4.4. Pravidelná kontrola hygieny a čištění dopravních prostředků.....	21
5.5. Praktické výstupy pro chovatele a veterináře .....	21
6. Laboratorní část.....	29
6.1. Laboratorní testování dezinfekčního (biocidního) účinku <i>in vitro</i> .....	29
6.1.1. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních (biocidních) prostředků v tekutých médiích .....	29

6.1.1.1. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních (biocidních) prostředků v tekutých médiích v závislosti na jejich koncentraci.....	29
6.1.1.2. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních (biocidních) prostředků v tekutých médiích v závislosti na době expozice .....	30
6.1.1.3. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních (biocidních) prostředků v tekutých médiích v závislosti na testovaném referenčním kmenu mikroorganismu .....	31
6.1.2. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na pevných plochách ....	32
6.1.2.1. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na pevných neporézních plochách.....	32
6.1.2.2. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na pevných porézních plochách.....	33
6.1.2.3. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na měkkých porézních plochách.....	34
6.1.3. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků diskovou difúzní metodou .....	34
6.1.4. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků diluční mikrometodou MIC / MBC.....	36
6.1.5. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků diluční plotnovou metodou MIC / MBC.....	37
6.2. Terénní testování dezinfekčního účinku biocidu <i>in vivo</i> .....	39
6.2.1. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na autentických anorganických površích .....	39
6.2.2. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na organických površích	39
6.2.2.1. Testování účinku dezinfekčního prostředku s pomocí stěru.....	40
6.2.2.2. Testování účinku dezinfekčního prostředku s pomocí abrazivní houbičky.....	42
6.2.2.3. Testování účinku dezinfekčního prostředku s pomocí smyvu.....	43
6.2.3. Rutinní metody detekce mikrobiálního zatížení prostředí a praktická kontrola účinnosti dezinfekce předmětů a prostředí .....	44
6.2.3.1. Odběr a kultivace stěrů z předmětů, ploch a prostředí (kontrola před a po dezinfekci).....	44

6.2.3.2. Otisky z prostředí s pomocí kontaktních agarů na plotnách nebo destičkách.....	46
6.2.3.3. Otisky z prostředí s pomocí sterilních filtračních papírků a běžných agarů na plotnách.....	46
6.2.3.4. Otisky z prostředí s pomocí kontaktních agarů v otiskových soupravách .....	47
6.3. Praktické výstupy pro chovatele a odbornou veřejnost.....	47
6.3.1. Mikrobiologická kontrola kvality mléka a diagnostika onemocnění mléčné žlázy ....	48
6.3.2. Mikrobiologické testy účinnosti dezinfekce mléčné žlázy.....	51
6.3.3. Mikrobiologická kontrola prostředí stáje a dojírny .....	53
6.3.4. Mikrobiologická vyšetření telat se zdravotními problémy.....	54
6.3.5. Mikrobiologická diagnostika problémů s pohybovým aparátem.....	54
6.3.6. Metabolické testy v případě zdravotních problémů .....	55
7. Výpočty hodnot (povrchy a mléčná žláza) .....	55
7.1. Výpočty hodnot získaných při testech povrchů prostor, zařízení a mléčné žlázy .....	55
7.1.1. Příklad výpočtu (povrchy a mléčná žláza) .....	56
7.2. Výpočty hodnot získaných při testech násadových vajec .....	56
7.2.1. Vysvětlivky a příklad výpočtu kontaminace .....	56
7.2.2. Pro stanovení mikrobiální kontaminace u prvního vejce pro EC tedy budeme postupovat následovně: .....	57
7.2.3. Statistické vyhodnocení výsledků.....	57
8. Závěr .....	58
9. Přílohy.....	59
10. Seznam zkratk.....	62
11. Reference .....	63

## 2. Úvod

V současné době je naše zemědělství vystaveno silným ekologickým, ekonomickým a medicínským tlakům. Z ekologických tlaků lze jmenovat snižování využití umělých hnojiv, postřiků a dalších chemických látek zejména v rostlinné výrobě, které často perzistují v půdě, pronikají do spodních vod a odtud cirkulují skrze zemědělské produkty do potravního řetězce zvířat i člověka s následnými velmi negativními ekologickými a zdravotními dopady. Z medicínských tlaků pak připomeňme především snahu snižovat využití antimikrobních látek v živočišné výrobě, které díky propojení environmentálního (prostředového), animálního (zvířecího) a humánního (lidského) mikroekosystému, generují vznik odolných kmenů bakterií v těchto mikroekosystémech a způsobují nejen nárůst obtížně léčitelných infekcí u rostlin, zvířat a lidí, ale i pokles výkonnosti lidského i zvířecího imunitního systému, což může mít již v blízké budoucnosti fatální následky. To se pak promítá i do ekonomiky zemědělské produkce a v kombinaci se špatnými politickými rozhodnutími i nepřízní klimatických změn vše následně vyúsťuje v nižší konkurenceschopnost našich zemědělců na evropských i světových trzích. Je tedy nutné hledat nové cesty z této krize. Pomoci by mohla nová veterinární léčiva a látky k ošetření zemědělských plodin na biologické bázi šetrné k přírodě, jisté rezervy bychom jistě našli i ve šlechtění, výživě zvířat a zejména v zoohygieně. Kvalitní nastavení pravidel zoohygieny, vysoký stupeň čistoty ve stájích, dokonalá hygiena dojení a produkce čistých násadových vajec v případě drůbeže, to vše může přinést dle našeho názoru slušný ekonomický efekt a zlepšení konkurenceschopnosti naší zemědělské produkce. Snad by naše práce mohla jistým způsobem přispět i k ukončení takzvané „války s naší planetou Zemí“ (Šmajš a Herafilm, 2023). Kvalitu zoohygieny je však nezbytné pravidelně kontrolovat a to nás přimělo v rámci řešení našeho projektu k sepsání následující publikace. Tato publikace nabízí nejen zemědělcům, ale i laboratořím navázaným na zemědělsko-průmyslový komplex, postupy testování mikrobiologického zatížení organických i anorganických povrchů a materiálů včetně stájového zařízení, kůže zvířat, především povrchu struků, násadových vajec drůbeže a zařízení farem. Velmi dobře mohou být níže uvedené postupy využity také v humánní medicíně a hygieně.

Obecně lze testování účinku dezinfekčních přípravků, tedy biocidních látek, provádět dvěma způsoby a to *in vitro* (v laboratoři) nebo *in vivo* (v terénu). Laboratorní metody *in vitro* jsou velmi přesné, protože jsou prováděny v monitorovaných podmínkách a nebývají ovlivňovány žádnými vedlejšími nežádoucími vlivy, které mohou přicházet v úvahu u terénních metod *in vivo*. Tyto metody jsou prováděny v přesně definovaných podmínkách, jako jsou teplota, vlhkost, světelný režim, proudění vzduchu, expoziční časy a koncentrace účinných látek. Jsou přesně definovány také druhy testovaných mikroorganismů (referenční nebo terénní kmeny) a jejich koncentrace v roztocích a na testovacích površích. Je přesně definován i charakter expozičních ploch, jejich velikost, teplota, vlhkost, proudění vzduchu, čistota a charakter povrchu a v neposlední řadě i doba expozice. Na základě těchto testů lze vyvozovat velmi přesné závěry, které jsou statisticky snadno hodnotitelné a porovnatelné.

Naopak u metod *in vivo* vstupují do hry další faktory, jakými jsou znečištění, různorodost ošetřovaných povrchů, jejich pH, kvalita práce ošetřovatelského personálu, existence

ochranného kožního filmu zvířat, sekvestrace (odlučování) odumřelých buněk epitelu kůže a sliznic, dále tepelné a světelné podmínky, délka expozice a především ne zcela přesná definice mikroflóry, která bývá složena i z několika desítek různých druhů mikrobů s různými genotypovými a fenotypovými vlastnostmi (rezistence k antimikrobním látkám a dezinfekčním přípravkům, schopnost tvořit spóry, pouzdra a/nebo biofilm). Nicméně i testování *in vivo* má svou nezastupitelnou roli, protože ukazuje, jak se bude dezinfekční účinek projevovat v reálných podmínkách daného zemědělského provozu. Výsledky testů *in vitro* a *in vivo* je pak velmi účelné porovnávat a rozdíly publikovat.

Některé postupy uvedené v této metodice vycházejí tematicky, metodicky, materiálově i statisticky z postupů uvedených v ČSN EN 1040, ČSN EN 1656, ČSN EN 13727+A2, ČSN EN 14349, ČSN EN 16437+A1, dále ze standardních operačních postupů SOP 01/21 Mikrobiologické metody vyšetření klinických, patologických a environmentálních materiálů (Bzdil 2021), metodik Laboratorního hodnocení účinnosti desinfekce veterinárních biocidů a biocidů pro zemědělské a potravinářské provozy (Škaloud a Pokludová 2008) a dalších dokumentů a publikací, nicméně nejsou s nimi identické. Jsou upraveny, zjednodušeny a přizpůsobeny specifikům našeho projektu. **Přesné postupy a validace metod je třeba vždy hledat v legálně získaných textech výše uvedených norem a publikací!**

### 3. Abstrakt

Tato publikace je rozdělena do dvou částí. První část se věnuje problematice hygieny v produkci drůbeže, konkrétně metodám testování mikrobiologické zátěže násadových vajec, kontrole účinnosti desinfekce jejich povrchů, dále kontrole mikrobiálního zatížení jednodenních kuřat, jejich rodičů a prostředí stájí. Ověřování vztahů mezi kontaminací vajec a zdravotními parametry z nich pocházející populace kuřat, jejich kontrola, porovnávání vitality a zdravotního stavu kuřat z vajec z hnízd a z podestýlky by mohly být skvělým nástrojem zlepšování kvality populací drůbeže a sekundárně i nástrojem snižování spotřeby antibiotik v chovech drůbeže. Principy definované pro drůbežářskou praxi by pak mohly být aplikovány i v chovech dalších hospodářských zvířat.

Druhá část publikace se věnuje metodám testování dezinfekčních prostředků v tekutých médiích, na pevných plochách porézních i neporézních *in vitro*, tedy v laboratorních podmínkách. Popisuje i námi vytvořenou novou vlastní metodiku testování účinnosti desinfekce měkkých porézních materiálů, jako jsou textilie, netkané textilie, bavlna, vlna, polyuretan a další materiály, které bývají v zemědělské praxi často používány. Dále popisuje a porovnává metody testování antimikrobního účinku dezinfekčních látek stanovením minimální inhibiční koncentrace a s pomocí diskového difúzního testu a do třetice popisuje metody kontroly mikrobiálního zatížení autentických povrchů stájí i zvířat a stanovení účinnosti dezinfekčních látek na těchto površích, tedy *in vivo*. Zde se podařilo popsat úskalí, se kterými se testující laboratoř může setkat. Především konzistence dezinfekčních přípravků konkrétně určených k toaletě vemene může zkreslovat výsledky testů. Jako problematické se tak ukázaly disková difúzní metoda a mikrometoda stanovení minimální inhibiční/baktericidní

koncentrace MIC/MBC. Naopak, nejlepších výsledků bylo dosaženo v případě diluční plotnové metody stanovení minimální inhibiční/baktericidní koncentrace MIC/MBC. Obě části jsou obohaceny také praktickými zkušenostmi z klinické i laboratorní praxe a řadou obrázků, tabulek a grafů.

**Klíčová slova:** dezinfekce, biocid, povrch, účinnost, mléčná žláza, dojení, expozice, koncentrace, rezistence, statistika, break point, násadová vejce, kuře, stěr, smyv, prostředí, humánní medicína

#### 4. Summary

This publication is divided into two parts. The first part focuses on hygiene in poultry production, specifically methods for testing the microbiological load of hatching eggs, evaluating the effectiveness of disinfecting their surfaces, and assessing the microbial load of day-old chicks, their parents and the poultry house environment. Verifying the relationships between egg contamination and the health parameters of the resulting chicken population, their control, and comparing the vitality and health status of chickens from eggs laid in nests versus those from litter, could be a valuable tool for improving the quality of poultry populations and, secondarily, a tool for reducing antibiotic use in poultry farms. The principles defined for poultry practice could also be applied to the breeding of other farm animals.

The second part of the publication is devoted to methods for testing disinfectants in liquid media and on solid porous and non-porous surfaces *in vitro*, i.e. under laboratory conditions. It also presents a new methodology prepared in house for testing the effectiveness of disinfectants on soft porous materials such as textiles, non-woven fabrics, cotton, wool, polyurethane, and other materials commonly used in agricultural practice. Furthermore, it describes and compares methods for testing the antimicrobial effects of disinfectants, by the determination of the minimum inhibitory concentration using the disk diffusion test. Additionally, it describes methods for monitoring the microbial load on authentic surfaces in animal housing and on animals, as well as evaluating the effectiveness of disinfectants on these surfaces, i.e. *in vivo*. Here, we managed to describe the pitfalls that a testing laboratory may encounter. In particular, the consistency of disinfectants specifically formulated for udder hygiene can distort test results. The disc diffusion method and the micromethod for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) proved to be problematic. On the other hand, the best results were achieved with the dilution plate method for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Both parts are also enriched with practical experiences from clinical and laboratory practice and a number of pictures, tables and graphs.



**Key words:** disinfection, biocide, surface, efficiency, mammary gland, milking, exposition, concentration, resistance, statistics, break point, hatching eggs, chicken, swab, lavage, environment, human medicine

## 5. Testování mikrobiologické zátěže násadových vajec

Na počátku stručně připomeňme, že chovy drůbeže lze rozdělit z hlediska produkce na masné a nosné. Oba typy chovů pak můžeme dále dělit na reprodukční, které zajišťují výrobu násadových vajec pro chovy nižších úrovní pomyslné chovatelské pyramidy a tyto chovy mají dvě podúrovně a to prarodičovskou a rodičovskou. Produkční chovy pak slouží, jak již z jejich názvu vyplývá, buď k produkci masné drůbeže (brojlerů) nebo konzumních vajec.

Zlepšení kvality jednodenních kuřat (JDK), která je zárukou dobrého zdravotního stavu a prosperity chovů na všech úrovních, je mimo jiné dlouhodobým záměrem společnosti Ptácy s.r.o., zabývající se preventivní, diagnostickou a terapeutickou veterinární činností v chovech drůbeže na střední, severní Moravě a ve Slezsku. V současné době díky legislativním tlakům odpovědných orgánů Evropské unie (EU) nabývá tato myšlenka na celoevropské aktuálnosti. Nízká kvalita násadových vajec a JDK je zřejmě hlavním důvodem ztrát jak v rodičovských hejnech, tak v hejnech určených k produkci konzumních vajec a drůbežního masa. Každý chovatel se proto přirozeně snaží zamezit nadměrným úhynům a brakaci ve svém chovu a na druhé straně i masivnímu používání antimikrobiálních látek, které byly doposud nejjednodušším, nejrychlejším a současně i tím nejlevnějším řešením nesnází, ovšem za cenu nárůstu reziduí antimikrobik v podestýlce, prostředí, půdě, vodě a v neposlední řadě i nárůstu antimikrobiálních rezistencí mikroorganismů ve sféře veterinární, humánní i v ekosystému. To vyúsťuje ve zhoršení úspěšnosti léčby mikrobiálních onemocnění v populacích zvířat i lidí. Na počátku problému je ve většině případů znečištění násadových vajec často sbíraných z podestýlky, která jsou největším zdrojem mikrobiologické kontaminace JDK. Již samo násadové vejce může být poškozeno nežádoucí mikroflórou. Mikroorganismy mohou snadno penetrovat drobnými póry ve skořápce a přecházet do vaječného obsahu, kde může v průběhu líhnutí jejich počet dále narůstat a v konečném důsledku způsobit buď odúmrtí plodu, zpomalení jeho vývoje, případně líhnutí kuřat kolonizovaných nežádoucí mikroflórou tvořenou mimo jiné obligátními patogeny (*Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* a dalšími) nebo patogeny podmíněnými – fakultativními (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* atd.). JDK tak přicházejí do odchovů s velkou náloží nežádoucích bakterií, což vede k vysokému výskytu infekcí pupku, žloutkového váčku, septikémií a oslabení imunitní výkonnosti ptáků a zvýšeným úhynům. Lajdáckým a chamtivým přístupem některých producentů násadových vajec se tak problém přenáší na producenty masa a konzumních vajec, kteří jej musí řešit právě použitím antimikrobiálních látek se stále omezenějšími možnostmi. Začarovaný kruh se tak uzavírá. Legislativně stanovená omezení nebo zákazy použití antibiotik v chovech drůbeže tak ekonomicky zasáhnou především produkční chovy, ačkoli zoohygienické či výživové problémy v nich už jsou v současnosti víceméně vyřešeny. Opatření by tedy měla směřovat především k produkčním stupňům, které výkrmu předcházejí, především líhním a rodičovským chovům (RCH). Hlavním zdrojem kontaminace JDK bývá obvykle právě rodičovský chov. Bakterie pravidelně izolované ze žloutkových váčků, vnitřních orgánů a kostní dřevě JDK patří k typickým indikátorům fekální kontaminace: je to především *E. coli* a na druhém místě *E.*

*faecalis/E. faecium*. Podstatné je i zjištění, že mikrobiologická zátěž (a s tím související ztráty) JDK nosného typu je výrazně nižší než u brojlerů. Takzvaně „čistých“ chovů je tedy dnes sice málo, ale jsou, takže cíl, který by zajišťoval produkci násadových vajec s nízkou bakteriální kontaminací lze považovat za dosažitelný.

Platné a v legislativě zakotvené normy pro produkci násadových vajec v ČR v současnosti neexistují. Podle správné praxe by se: a) vejce snesená na zemi nebo s viditelným znečištěním měla vyřazovat a pouze při nedostatku čistých násadových vajec nasazovat v líhni odděleně od ostatních, b) vejce by se měla dezinfikovat do 4 hodin po snesení, než dojde ke chladnutí a smršťování obsahu a tím nasávání povrchové mikrobiální kontaminace skořápkovými póry. Ani jeden z výše uvedených bodů však není v současnosti důsledně dodržován ani kontrolován, praxe se zcela odvíjí jen od svědomitosti personálu. Úspory a nechuť lidí pracovat v drůbežnictví však vede k nedostatku fundovaného personálu, který by výše uvedenou činnost svědomitě prováděl a tak se opět pohybujeme opět v jakémsi začarovaném kruhu, ze kterého není zdánlivě úniku. Také vejce, která nejsou snesená na zemi, mohou být znečištěná. Při dopravě se dotýkají dalších vajec, kontaminují se dopravními pásy, které se čistí sporadicky nebo vůbec. Kvůli střídání směn a nedostatku ošetřovatelek se vejce dezinfikují pozdě, takže do líhně už přicházejí s kontaminovaným obsahem. Líhnoucí se kuřata už v sobě mají vysokou bakteriální „nálož“ a jsou zdrojem křížové kontaminace s ostatními kuřaty v dolíhni, při přepravě a v produkční hale.

Sestavení seznamu možných přípravků a metod dezinfekce vajec představuje velkou výzvu, neboť ÚSKVBL schvaluje pouze přípravky, které přijdou do přímého kontaktu se zvířetem, zatímco ostatní biocidní přípravky podléhají schválení Ministerstvem zdravotnictví ČR. Až dosud byla hlavní metodou dezinfekce násadových vajec fumigace formalínovými parami. Zákaz použití formalínu pro jeho možné kancerogenní a teratogenní účinky vyvolává nutnost hledat jiné metody jejich ošetření. V úvahu proto přicházejí různé nové prostředky a metody od fyzikálních, jako jsou UV záření (problém s degradací plastů, neúčinnost při hrubém znečištění) a studená plazma (technologie používaná v USA), přes dezinfekci ozónem až po biologické prostředky, jako jsou například užitečné mikroorganismy produkující organické kyseliny, bakteriociny a další látky neantibiotického charakteru s bakteriostatickým nebo baktericidním účinkem. Krom toho je nezbytné zlepšit a usnadnit komunikaci mezi jednotlivými stupni reprodukčně-produkční pyramidy s orgány SVS, k čemuž by bylo možné využít počítačový program, monitorující celý integrovaný produkční systém, takže by byly dostupné informace o tom, co se dělo v kterékoli fázi od prarodičovských chovů až po konečný produkt, včetně použitých dezinfekčních prostředků, laboratorních nálezů a na ně vázané aplikace antimikrobiálních látek. Bohužel, komunikace mezi jednotlivými provozy a správními orgány je velice obtížná a naráží na GDPR legislativu. Pokusy o jednotnou elektronickou evidenci sice byly, ale zatím se prakticky nepodařilo je zavést, nicméně v budoucnu budou nezbytností. Co se vzájemné komunikace na úrovni terénu týká, privátní veterinární lékaři a společnosti nemají jinou možnost, než podávat producentům a chovatelům pouze doporučení, nemohou však nic nařizovat, pokud nejde o nebezpečné nákazy. Skutečnou změnu může zavést pouze ten, kdo má ekonomickou vazbu v produkčním řetězci. Není snadné přesvědčit provozy RCH a líhni, aby zavedly poměrně obtížné organizační změny, když jejich důsledky se projeví až ve fázi výkrmu.

Pomoci by mohly i některé propagační strategie, jako jsou anonymní porovnávání výsledků nejhorších a nejlepších provozů, fotografie a videa, prezentace a odborné přednášky názorně ilustrující konečné důsledky jednotlivých opatření a také zapojení odborníků z praxe do výuky na středních a vysokých školách zaměřených na zemědělství a veterinární medicínu. Také níže uvedené metodiky testování mikrobiologické zátěže násadových vajec by mohly přispět ke zlepšení zdravotní a hygienické situace v chovech drůbeže. Ověřování vztahů mezi kontaminací vajec a zdravotními parametry vzniklé populace kuřat a jejich kontrola, porovnávání vitality a zdravotního stavu kuřat z vajec z hnízd a z podestýlky by mohly být skvělým nástrojem zlepšování kvality populací drůbeže a sekundárně i nástrojem snižování látek antibiotického charakteru v chovech drůbeže. Principy definované v drůbežářské praxi by pak mohly být aplikovány i v chovech dalších hospodářských zvířat.

Z výše uvedených informací bychom tedy mohli definovat, v čem by měl spočívat systém kontroly jakosti v reprodukčních i užitkových chovech drůbeže:

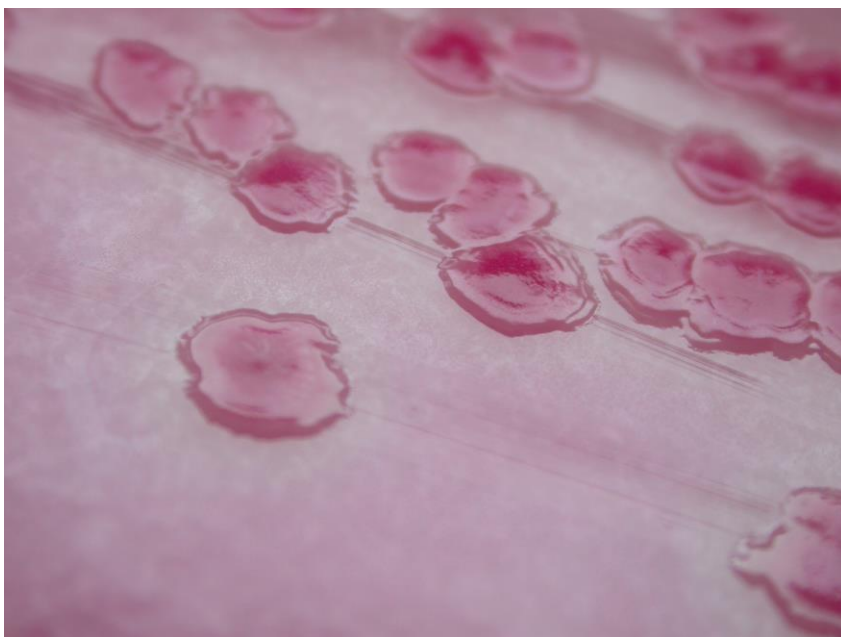
- Kontrola kontaminace a účinnosti dezinfekce násadových vajec
- Kontrola kvality a kontaminace nalíhlých kuřat
- Monitoring mikrobiologické zátěže prostředí drůbežárny
- Monitoring mikrobiologické zátěže prostředí líhni

### **5.1. Úroveň kontaminace násadových vajec, kontrola účinnosti dezinfekce vajec**

Před započítáním monitoringu je třeba definovat počty farem, hal, na kterých se odběry budou provádět a jaká kvanta materiálu budou chovatelé, případně líhně, schopni poskytnout. Na jednotlivých farmách je třeba vytvořit záznam o počtu vajec v hnízdech a v podestýlce. Participanty je třeba přesvědčit, že tento průzkum je tu pro ně. K bakteriologickému vyšetření je v daném chovu sesbíráno s použitím sterilních rukavic a čistých proložek vždy 10 násadových vajec snesených do podestýlky a 10 násadových vajec snesených tentýž den dopoledne ve stejné hale do snáškových hnízd. Vhodné je odebrat namátkově i 10 vajec přímo z každé navážky z každé farmy přímo v líhni. V návaznosti na to je třeba po nebo v průběhu líhnutí spočítat i nedolíhlá vejce a z každé navážky z dané farmy a odebrat ještě i nedolíhlá vejce v počtu alespoň 10 kusů. Je třeba také předem projednat s laboratořemi, zda jsou schopny požadovaná vyšetření vůbec provádět, jaké jsou jejich kapacity a kolik vzorků je možno uskladnit do vyšetření, jaká u nich provést vyšetření a jaké kmeny mikroorganismů je třeba uchovávat pro potřeby testací. Vejce jsou do doby transportu a v průběhu transportu uchována při teplotě +4°C. Transport do laboratoře by měl být proveden do 48 hodin po odběru. U všech skupin vzorků by mělo být provedeno zvlášť vyšetření skořápek a obsahů (je možné rozdělit ještě na bílky, žloutky a podskořápečné blány) a to z každého vejce a každé skupiny, navážky a farmy odděleně. Počty odebraných vzorků je možno libovolně navyšovat, čímž se výsledky zpřesní a budou mít vyšší vypovídací hodnotu. Stejná množství vajec ze stejných skupin a navážek je třeba mikrobiologicky testovat stejnými metodami také po provedené dezinfekci a po uplynutí expoziční doby stanovené výrobcem nebo platnými předpisy. Pokud ty nejsou stanoveny, lze použít postupy a časy, které jsou uvedeny v kapitole 6.1.2.2. Dostatečně účinný biocid by měl snižovat počty mikroorganismů o 4 a více dekadických logaritmu při použití simulace slabého organického znečištění v porovnání s kontrolou (místo biocidu použita sterilní voda).

### 5.1.1. Bakteriologické vyšetření skořápek

Mikrobiologická analýza je prováděna podle Krunt et al. (2021) a Kraus et al. (2021) spočívající v kultivaci materiálu a kalkulaci počtu mikroorganismů ve formě jednotek tvořících kolonie (KTJ, CFU na 1 g nebo 1 ml materiálu nebo na celé vejce) ve vyšetřovaném materiálu. Stanoven je celkový počet mikroorganismů (CPM, TNM) počet *E. coli* (EC), *Enterococcus* spp. (ENT), které jsou nejvýznamnějšími indikátory fekálního znečištění. Dle dohody lze udělat i kultivace pro detekci dalších druhů nebo skupin mikroorganismů. K analýzám nesmí být použita vejce od nosnic léčených antimikrobiky a to do uplynutí ochranné lhůty stanovené pro dané antimikrobikum a komoditu vejce.



**Obrázek 1:** Kolonie *Salmonella* Enteritidis narostlé na Rambachově agaru mají červenou barvu (foto: J. Bzdil).

Stanovení mikrobiologické kontaminace je prováděno z povrchu vaječných skořápek následujícím způsobem. Každé vejce je odděleně umístěno do sterilního plastového sáčku, například homogenizačního, s 10 ml fyziologického roztoku obohaceného peptonem – (9 g chloridu sodného, 1 g peptonu a 1000 ml destilované vody Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). V případě testování dezinfekčního účinku je třeba použít k oplachu neutralizační roztok, který odstraní rezidua dezinfekčních látek, která by mohla zamezit růstu a dělení perzistujících mikroorganismů. Půdy je možno zakoupit hotové i u komerčního výrobce (např. LMS s.r.o., Jaroměř, ČR). Všechna vejce jsou důkladně oplachována po dobu 120 sekund. Pokud není testován účinek biocidu, jsou vejce po tomto úkonu vyjmuta z plastových sáčků s fyziologickým roztokem s peptonem, osušena sterilní gázou nebo buničinou a vydezinfikována alkoholem (éteralkoholem 1 : 1, ten se rychleji odpaří a nezanechá rezidua, která by zkreslila výsledek). Poté je vytvořena série ředění pro každé vejce zvlášť přenášením 1 ml roztoku mezi 5 přichystanými zkumavkami s fyziologickým roztokem s peptonem (složení viz výše) o objemu 10 ml (série ředění  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ). Ředění  $10^0$  je připraveno

přímo z obsahu plastového sáčku po oplachu skořápky. Z každého ředění je přeneseno sterilní pipetou na povrch agarů 0,1 – 0,2 ml tekutiny z každého ředění nebo alternativně 1 ml tekutiny do sterilní Petriho misky k následnému zalití agarem. Při očkování na povrch agarů je inokulum rozetřeno po povrchu agarů sterilní plastovou „hokejkou“ nebo kličkou. Inkubace je provedena po zaschnutí inokula aerobně při 36°C – 37,5°C po dobu při 48 hodin v případě enterokoků a *E. coli*. V případě stanovení počtu mikroorganismů (KTJ, CFU) je inkubace provedena opět aerobně při 30°C po dobu 120 hodin. Denně je třeba provádět kontrolu agarů pro případ jejich přerůstání. Pro detekci *E. coli* je použit Mac-Conkeyův agar, Endův agar, nebo další alternativní agar, na kterém lze bezpečně rozeznat kmeny *E. coli*. Pro kultivaci enterokoků je možno použít Slanetz-Bartley agar nebo jinou alternativní půdu, která spolehlivě indikuje růst enterokoků. Celkové počty mikroorganismů lze posuzovat na Standard Plate Count Agar, případně na masopeptonovém krevním agaru, který detekuje další skupiny nebo rody a druhy mikroorganismů, jako jsou například enterobakterie, pseudomonády (*P. aeruginosa*), aerobní sporuláty (*Bacillus* spp.) případně anaeroby, se kterými jsou u drůbeže také velké problémy (*Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* atd.). Masopeptonový krevní agar ukazuje mimo jiné i hemolytické vlastnosti detekovaných mikroorganismů. Následně je provedeno spočítání kolonií, přepočtení KTJ (CFU) na původní objem materiálu nebo na vejce a záznam hodnot do tabulek. Počty kolonií bývají přepočteny na dekadické logaritmy a ty jsou porovnávány. Konfirmace kmenů je provedena buď biochemickými testy (např. Lachema a.s. Brno, API-test Bio-Mérieux...) nebo molekulárně biologickými metodami (MALDI-TOF, PCR...).

### 5.1.2. Bakteriologické vyšetření vaječných obsahů

Stanovení mikrobiologické kontaminace bílku (případně žloutku nebo podskořápečných blan je podrobena stejnému postupu, jako stanovení kontaminace vaječných skořápek. Před rozklepnutím skořápky musí být její povrch osušen od zbytků oplachového média a dezinfikován opláchnutím v etanolu (o 60 - 96% koncentrace) nebo v éteralkoholu (poměr éteru a alkoholu je 1 : 1 a alkohol bývá 60 - 70%). Rozklepnutí vejce je provedeno po oschnutí dezinfekčního činidla, takže následné vybavení podskořápečných blan, resp. bílku a žloutku je sterilní. Všechny materiály se dají opět do sterilního sáčku s 10 ml fyziologického roztoku s peptonem (viz výše) a materiál se promíchává s médiem 120 vteřin. Výhodné je použít homogenizačních sáčků s membránou a homogenizátoru (např. Stomacher). Následně se tekutina naředí řadou ředění ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ) jako v případě skořápek. Ředění  $10^0$  je připraveno přímo z primárního obsahu plastového sáčku po 120 vteřinovém promíchání s bílkem, žloutkem nebo blanami. Z každého ředění je přeneseno sterilní pipetou na povrch agarů 0,1 – 0,2 ml tekutiny nebo alternativně do sterilní Petriho misky k zalití půdou 1 ml tekutiny. Při očkování na povrch agarů je inokulum rozetřeno po povrchu agarů sterilní plastovou „hokejkou“. Inkubace je provedena po zaschnutí inokula aerobně při 36°C – 37,5°C po dobu 48 hodin v případě enterokoků a *E. coli*. V případě stanovení počtu mikroorganismů (KTJ, CFU) je inkubace agarů provedena opět aerobně při 30°C po dobu 120 hodin. Denně je třeba provádět kontrolu agarů pro případ jejich přerůstání. Pro detekci *E. coli* je použit Mac-Conkey agar Endův agar, nebo další alternativní agar, na kterém lze bezpečně rozeznat kmeny *E. coli*. Pro kultivaci enterokoků je možno použít Slanetz-Bartley agar nebo jinou alternativní půdu, která spolehlivě indikuje růst enterokoků. Celkové počty mikroorganismů lze detekovat na Standard Plate Count Agar, případně na masopeptonovém krevním agaru, který detekuje i hemolytické vlastnosti mikroorganismů. Následně je provedeno spočítání kolonií a

přepočtení KTJ na původní objem materiálu nebo vejce. Počty kolonií bývají přepočteny na dekadické logaritmy a ty jsou porovnávány. Výsledky mohou být také vyjádřeny kvalitativně (mikroorganismus je nebo není přítomen) nebo semikvantitativně s pomocí jednoho až čtyř křížků. Konfirmace kmenů je provedena buď biochemickými testy (Lachema a.s. Brno, API-test Bio-Mérieux...) nebo molekulárně biologickými metodami (MALDI-TOF, PCR...). **Tabulka 1** ukazuje orientační hodnoty mikrobiální kontaminace jednotlivých struktur slepičích vajec ze snáškových hnízd v závislosti na délce a teplotě skladování.

### 5.1.3. Testování účinnosti dezinfekčních prostředků u násadových vajec

Ze stejné série nebo dodávky testujeme alespoň 20 násadových vajec. Celkem 10 suchých vajec je odděleně umístěno do sterilních plastových sáčků, například homogenizačních s 10 ml fyziologického roztoku s peptonem – (9 g chloridu sodného, 1 g peptonu a 1000 ml destilované vody Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Půdy je možno zakoupit hotové i u komerčního výrobce (např. LMS s.r.o., Jaroměř, ČR). Všechna vejce jsou důkladně oplachována po dobu 120 sekund.



**Obrázek 2:** Vejce snesená do podestýlky nejsou z důvodu mikrobiální kontaminace vhodná pro využití v líhni (foto: J. Bzdil).

Po tomto úkonu jsou vejce vyjmuta z plastových sáčků a osušena na vzduchu při  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Poté je vytvořena série ředění pro každé vejce zvlášť přenášením 1 ml roztoku mezi 5 přichystanými zkumavkami s fyziologickým roztokem s peptonem o objemu 10 ml ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ). Ředění  $10^0$  je připraveno přímo z obsahu plastového sáčku po oplachu skořápky. Z každého ředění je přeneseno sterilní pipetou paralelně na povrch 2 ploten agaru po 0,1 – 0,2 ml tekutiny z každého ředění nebo alternativně do sterilní Petriho misky k zalití půdou po 1 ml tekutiny. Při očkování na povrch agaru je inokulum rozetřeno po povrchu agaru sterilní plastovou „hokejkou“ nebo kličkou. Inkubace je provedena po zaschnutí inokula aerobně při  $36^\circ\text{C} - 37,5^\circ\text{C}$  po dobu 48 hodin v případě enterokoků a *E. coli*.



**Obrázek 3:** Detail povrchového znečištění násadových vajec snesených do podestýlky (foto: J. Bzdil).

V případě stanovení počtu mikroorganismů (KTJ, CFU) je inkubace provedena opět aerobně při  $30^\circ\text{C}$  po dobu 120 hodin. Denně je třeba provádět kontrolu agarů pro případ jejich přerůstání saprofytickou mikroflórou. Pro detekci *E. coli* je použit Mac-Conkey agar, Endův agar, nebo další alternativní agar, na kterém lze bezpečně rozeznat kmeny *E. coli*. Pro kultivaci enterokoků je možno použít Slanetz-Bartley agar nebo jinou alternativní půdu, která spolehlivě indikuje růst enterokoků. Celkové počty mikroorganismů lze posuzovat na Standard Plate Count Agar, případně na masopeptonovém krevním agaru, který detekuje další skupiny nebo rody a druhy mikroorganismů, jako jsou například enterobakterie, pseudomonády (*P. aeruginosa*), aerobní sporuláty (*Bacillus* spp.), případně anaeroby, se kterými jsou u drůbeže také velké problémy (*C. perfringens*, *C. difficile*, *C. colinum* atd.) a ukazuje i hemolytické

vlastnosti mikroorganismů. Následně je provedeno spočítání kolonií, přepočtení KTJ (CFU, TNM) na původní objem materiálu nebo na vejce a zaznamenání hodnot do tabulek. Počty kolonií bývají přepočteny na dekadické logaritmy a ty jsou porovnávány. Konfirmace kmenů je provedena buď biochemickými testy (Lachema a.s. Brno, API-test Bio-Mérieux...) nebo molekulárně biologickými metodami (MALDI-TOF, PCR...). Následně je z těchto 10 vajec provedeno vyšetření obsahů a podskořápečných blan. Před rozklepnutím skořápky musí být její povrch osušen od zbytků oplachového média a povrch ošetřen éteralkoholem (1 : 1). Rozklepnutí vejce je provedeno sterilně po oschnutí éteralkoholu, takže následné vybavení podskořápečných blan, resp. bílku a žloutku je sterilní. Všechny materiály se dají opět do sterilního sáčku s 10 ml fyziologického roztoku s peptonem (viz výše) a materiál se promíchává s médiem 120 vteřin. Výhodné je použít homogenizačních sáčků s membránou a homogenizátoru (Stomacher). Následně se tekutina naředí řadou ředění ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ) jako v případě skořápek. Ředění  $10^0$  je připraveno přímo z primárního obsahu plastového sáčku po 120 vteřinovém promíchání s bílkem, žloutkem nebo blanami. Z každého ředění je přeneseno sterilní pipetou na povrch agaru 0,1 – 0,2 ml tekutiny nebo alternativně do sterilní Petriho misky k zalití půdou 1 ml tekutiny.

Zbýlých 10 suchých vajec ze stejné série ponoříme v homogenizačním sáčku do 20 ml pracovního roztoku biocidu (experimentálně může být více různých ředění), nebo vejce ošetříme plynováním, UV zářením, studenou plazmou, ozónem nebo dalšími metodami. Délku procedur, koncentrace látek, intenzitu záření a délku expozic stanoví výrobce těchto látek nebo přístrojů. Pokud tomu tak není, použijeme délky expozic jako v kapitole 6.1.2.2., to jest 1 minutu  $\pm$  5 vteřin až 360 minut  $\pm$  10 vteřin. Exponovaná vejce vyjmeme z roztoku biocidu a necháme oschnout, pokud jsou vlhká. Alternativně je možné provést expozice po 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 a 360 min  $\pm$  10 vteřin. Pak oschlá vejce přemístíme do homogenizačního sáčku s 10 ml TSB s neutralizačním roztokem (1 : 1) a omýváme 120 vteřin, pak vejce vyjmeme a necháme opět oschnout na vzduchu při  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Následně TSB s neutralizačním roztokem po omytí vajec naředíme jako u vajec neošetřených biocidem (viz výše) a kultivujeme, inkubujeme, výsledky vyhodnocujeme a zaznamenáváme stejným postupem. Výsledky odečteme, zapíšeme, logaritmujeme a porovnáme. Z biocidem ošetřených vajec po jejich neutralizaci a oschnutí následně sterilně vyjmeme podskořápečné blány a obsahy a vyšetříme opět stejným způsobem, jako u biocidem neošetřených vajec (viz kapitola 5.1.2.). Před rozbitím skořápky však nepoužíváme povrchovou dezinfekci éteralkoholem, který by výsledky mohl zkreslit!

## 5.2. Kvalita a kontaminace nalíhlých kuřat

Při přejímce kuřat a jejich ustájení je 100 ks jedinců namátkově vybraných z celé zásilky zváženo, stanoveny jsou hraniční hodnoty hmotnosti a stanovena uniformita v %. K mikrobiologickému vyšetření je namátkově z celé zásilky odebráno 10 ks kuřat, která jsou utracena a jsou z nich získány vzorky k mikrobiologickému vyšetření. Tři kuřata jsou s nejnižší hmotností, 3 kuřata s nejvyšší a 4 kuřata s hmotností blízkou průměru. Počty vzorků je možno zvětšit po dohodě s chovatelem. Nálezy u kuřat různých váhových kategorií je možné porovnat i mezi jednotlivými rozmnožovacími chovy. Z utracených kuřat jsou odebrány vzorky dle následujícího postupu. Po manuálním roztržení kůže ve ventrální části stěny tělní dutiny je proveden **stěr z podkoží v oblasti pupku** tamponem systému Transbak. Při odběru je třeba



tamponem pootáčet kolem podélné osy, aby byl záchyt mikroorganismů co nejefektivnější. Stejným způsobem je proveden odběr stěru z **orgánů dutiny tělní** a stěru ze **žloutkového váčku**. Manipulaci s kadavery kuřat a odběr vzorků je třeba provádět vždy v gumových rukavicích, které mezi jednotlivými kuřaty a soubory kuřat musíme dezinfikovat éteralkoholem. Tampony jsou vloženy do Amiesova agaru systému Transbak, pečlivě označeny, vloženy do přepravního nepropustného sáčku a odeslány do laboratoře při chladničkové teplotě (+4°C) do 24 hodin po odběru. Kromě toho mohou být z utracených 10 kuřat každé skupiny namátkově odebrány i **4 stehenní kosti** s pomocí ostrých chirurgických nůžek a umístěny do sterilního sáčku a opět důkladně označeny. Vzorky je třeba opět ve zchlazeném stavu doručit do laboratoře. Navíc je možné odebrat k mikrobiologickým analýzám také **hlavičky** dekapitovaných kuřat a provést kultivaci z mozku. Pozitivní kultivační mikrobiologické nálezy z kostní dřeně a mozku indikují poměrně spolehlivě septikémii.

Jinou variantou je odběr a mikrobiologická kultivace vzorků přímo na místě odběru. Před započítáním kultivace je třeba na pracovní plochu umístit 1 plotnu s krevním agarem s odklopeným víčkem, abychom zjistili počet kolonií ve spadu ze vzduchu a validovali tím naši kultivační metodu. Po ukončení práce plotnu uzavřeme víčkem a označíme vždy na spodku plotny. Každý stěr je proveden stěrovým vatovým tamponem na špejli a po expozici je nakultivován roztěrem na celou plochu krevního agaru ve třech směrech, aby byla dokonale využita plocha plotny. Plotny je třeba otevírat jen na co nejkratší dobu, aby nedošlo ke kontaminaci environmentální mikroflorou. Kultivace kostní dřeně je provedena tenkou sterilní bakteriologickou kličkou nebo inokulační jehlou po opatrném opálení povrchu materiálu opalovací plynovou pistolí a rozlomení nebo přestřížení kosti sterilními nůžkami. Plotny je třeba doručit do laboratoře ve zchlazeném stavu (+4°C). Inkubace je provedena opět aerobně 18 – 24 (48) hodin při 36°C – 37,5°C. Stejnými kultivačními metodami je možno provést kultivaci i na jiné selektivní nebo selektivně diagnostické půdy (Endův agar, XLD agar, RLM agar, Rambachův agar, Edwardsův agar, Slanetz-Bartley agar, Baird-Parkerův agar, Sabouraudův agar), pokud bychom chtěli monitorovat specifické skupiny, rody nebo druhy bakterií (enterobakterie, salmonely, listerie, enterokoky, streptokoky, stafylokoky, kvasinky, plísně, řasy a další). Specifika zpracování a inkubace jsou popsány v předchozích kapitolách, SOP 01/21 (Bzdil, 2021) nebo v patřičných dalších SOP. Výsledek může být vyjádřen kvalitativně (mikroorganizmus je nebo není přítomen), semikvantitativně na jeden až čtyři křížky podle intenzity nárůstu (kritéria hodnocení ukazuje **Tabulka 2**). Přesnější kvantifikaci lze provést vložím 1 g materiálu do 10 ml fyziologického roztoku nebo fyziologického roztoku s peptonem a po 120 vteřinách míchání (vortexování) provést kultivaci (jako u skořápek) včetně desetinasobných ředění až do 10<sup>-6</sup>. Typizace je provedena buď biochemickými testy (Lachema a.s. Brno, API-test Bio-Mérieux...) nebo molekulárně biologickými metodami (MALDI-TOF, PCR...).

### 5.3. Monitoring mikrobiologické zátěže prostředí drůbežárny

#### 5.3.1. Monitoring mikrobiální zátěže podestýlky

Z každého sledovaného rodičovského chovu jsou alespoň 1x ročně nebo 1x v daném zástavu odebrány směsné vzorky podestýlky o hmotnosti 100 gramů. Vzorkování by mělo pokrýt rovnoměrně plochu celé haly (10 míst). Bakteriologické vyšetření by mělo probíhat stejnými

Skořápky				
Délka skladování (dny)	Teplota skladování (°C)	<i>E. coli</i> (log)	Enterokoky (log)	CPM (log)
0	čerstvé	4,82-5,95	1,42-3,37	5,75-6,56
14	5	4,61-5,21	1,41-3,69	4,95-5,58
14	20	3,87-4,97	0,41-1,91	4,78-6,08
28	5	4,03-5,18	0,81-2,98	5,17-6,22
28	20	4,70-5,56	0-2,09	2,60-5,45
Podskořápkové blány				
0	čerstvé	0	0	0-0,48
14	5	0-0,95	0	0-1,62
14	20	0-1,23	0	0,13-1,75
28	5	0	0	0-0,70
28	20	0-0,57	0-0,57	0-0,47
Bílek				
0	čerstvé	0	0	0-0,60
14	5	0-1,23	0	0-0,83
14	20	0-0,57	0	0
28	5	0-1,13	0	0-0,47
28	20	0	0	0-0,70

**Tabulka 1:** Orientační tabulka mikrobiální kontaminace jednotlivých struktur slepičích vajec ze snáškových hnízd v závislosti na délce a teplotě skladování v log CFU/1 vejce (upraveno dle Kraus et al. 2021)

Legenda: Kolonie tvořící jednotky byly manuálně spočítány na Petriho miskách, hodnoty dosazený do vzorce a výsledná hodnota byla zlogaritmována. Vycházeli jsme z následujícího vzorce:  $CFU = (N1 + N2) / 2 \cdot D \cdot K$ ; kde  $N1$  = počet kolonií na 1. Petriho misce,  $N2$  = počet kolonií na 2. Petriho misce,  $D$  – stupeň ředění ( $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  nebo  $10^5$ ),  $K$  = koeficient 10 (pro CPM) nebo 100 (pro EC a ENT).

postupy s použitím stejných půd, jako tomu je u vajec a kuřat. Před kultivací je 100 g směsný vzorek důkladně promíchán sterilní špachtlí nebo jiným sterilním nástrojem. Deset gramů promíchané směsi je pak suspendováno ve 100 ml fyziologického roztoku nebo fyziologického roztoku s peptonem po dobu 120 vteřin. Množství fyziologického roztoku je možné zvětšit při vyšší savosti materiálu. Dále je provedeno ředění v řadě zkumavek s fyziologickým roztokem ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ). Následně je provedena kultivace na agarové půdy a inkubace jako u vajec a kuřat. Hodnocení je provedeno buď kvantitativně s uvedením počtu KTJ na 1 g materiálu, nebo jednotlivých monitorovaných skupin, rodů nebo druhů mikroorganismů, nebo semikvantitativně s pomocí křížků (viz **Tabulka 2**), případně kvalitativně (mikroorganismus je nebo není přítomen). U kvantitativních výsledků je dobré opět kalkulovat s dekadickými logaritmy.



**Obrázek 4:** Hmotnostní rozdíly mezi kuřicemi nalíhlými z vajec z hnízd a vajec z podestýlky mohou být v 87 dnech stáří i více než 50 %. Vlevo je kuřice normálně somaticky vyvinutá, vpravo pak kuřice vylíhlá z kontaminovaného vejce z podestýlky.

### 5.3.2. Monitoring mikrobiální zátěže kadaverů rodičů

Z každého sledovaného rodičovského chovu je 2x ročně odebráno po 5 - 10 kusech čerstvě uhynulé nebo utracené drůbeže s příznaky onemocnění. Bakteriologická kultivace je provedena z plic, jater, tenkého střeva a kosti každého kadaveru na stejné půdy jako v případě kuřat a stejným způsobem probíhá i inkubace. Mikrobiální zátěž je vyjádřena buď semikvantitativně s použitím jednoho až čtyř křížků jako u kuřat (viz **Tabulka 2**), případně se použije ředící kvantitativní metoda s přepočtem na hmotnost vyšetřovaného materiálu a stanovením počtu KTJ na 1 g materiálu nebo jednotlivých monitorovaných skupin, rodů nebo druhů mikroorganismů, případně kvalitativně (mikroorganismus je nebo není přítomen). U kvantitativních výsledků je dobré opět kalkulovat s dekadickými logaritmy.

### 5.3.3. Monitoring mikrobiální zátěže snáškových hnízd

Z každého sledovaného rodičovského chovu je 2x ročně odebráno 10 otisků z prostředí podlahy hnízd tak, aby byla rovnoměrně ovzorkována celá hala. Jako otiskový agar bývá volen masopeptonový krevní agar, případně jiný, na kterém dobře porostou různé rody, druhy a skupiny mikroorganismů. Inkubace je provedena za stejných podmínek jako u kuřat. Po inkubaci je provedeno spočtení kolonií a proveden přepočet KTJ na jednotku plochy (100 cm<sup>2</sup>) a dále jsou identifikovány jednotlivé mikroorganismy kvantitativně, semikvantitativně s pomocí křížků, nebo kvalitativně (mikroorganismus je nebo není přítomen). Jejich izoláty mohou být použity k dalším šetřením (konfirmasi, sekvenace, testace citlivostí atd.). U kvantitativních výsledků je dobré opět kalkulovat s dekadickými logaritmy.

Počet KTJ mikroorganismů na plotně	Počet křížků
1 - 10	+
11 - 50	++
51 - 300	+++
nad 300	++++

**Tabulka 2:** Semikvantitativní hodnocení nárůstu mikroorganismů na Petriho miskách s pomocí křížků (upraveno dle Bzdil 2021).

### 5.4. Monitoring mikrobiální zátěže líhní

Líhně hrají z epizootologického hlediska, tedy z hlediska možného vzniku a šíření nálezů, velmi významnou roli. Je třeba si uvědomit, že se v těchto provozech potkávají násadová vejce z různých regionů a chovů s různou zoohygienickou úrovní a kvalitou vajec, proto i násadová vejce mohou mít rozdílnou kvalitu a mohou na svém povrchu nést velmi rozmanitý mikrobiom, který kromě běžných a neškodných mikroorganismů může obsahovat i významné patogeny. Líhně se tak stávají jakýmsi pomyslným „mixážním mikrobiologickým pultem“. V průběhu líhnutí dochází k uvolňování prachových částic ze skořápek a k tvorbě aerosolu, který může

třeba i díky jedinému znečištěnému nebo infikovanému vejci kontaminovat celou obsádku kuřat. Proto i zde je nezbytné provádět pravidelné kontroly, o kterých by měl být veden záznam a za tímto účelem by líhňařské podniky měly mít vypracovaný funkční systém kontroly kvality. Snad jen pro kontrolu bychom rádi připomněli, jaké úkony a činnosti by měly být z veterinárního hlediska do kontrolních mechanismů systému kvality zapojeny. Lze je shrnout do 4 bodů:

- Vizuální posouzení doručených násadových vajec
- Pravidelná mikrobiologická kontrola prostředí líhně
- Mikrobiologická kontrola líhňařských odpadů
- Pravidelná kontrola hygieny a čištění dopravních prostředků

#### **5.4.1. Vizuální posouzení doručených násadových vajec**

Vizuální kontrola doručených vajec by měla být prováděna u každé doručené série podle jednotlivých dodavatelů. Při dostatečném osvětlení je třeba zkontrolovat čistotu nebo stav znečištění povrchu, velikost, hmotnostní uniformitu, tvar vajec, popsat případné deformity, sílu skořápek, barevné anomálie, poškození a o všem provést zázpis. Ten může být následně součástí zpětné vazby a komunikace s chovatelem. V případě podezření z kontaminace je možné provést mikrobiologickou kontrolu vajec v akreditované laboratoři. K vyšetření by mělo být odebráno alespoň 10 vajec z každé dodávky z dané farmy. Postupy jsou přehledně popsány v kapitolách 5.1.1. a 5.1.2.

#### **5.4.2. Pravidelná mikrobiologická kontrola prostředí líhně**

Z líhňařského provozu je dobré odebrat nejméně 10 stěrů nebo otisků a zpracovat a vyhodnotit je dle metodik uvedených v kapitolách 6.2.3.1. - 6.2.3.4. Odběry by se měly provádět pravidelně a periodicky a to z míst, která jsou nejvíce exponovaná. Tím je především podlaha jednotlivých boxů líhně, stěna líhně, podlaha a stěna chladírny a přípravný vaječ a to v místech, kde je nejintenzivnější pohyb v průběhu manipulací s vozíky nebo bednami a také chodby, kterými se pohybují zaměstnanci. Kritickými místy jsou i pásy přepravující kuřata a ventilační potrubí. Seznam kritických míst, kde je nejpravděpodobnější kontaminace, by si každý podnik navrhnout sám ve spolupráci s veterinárním lékařem. Stěry je dobré provádět z plochy 100 cm<sup>2</sup>, aby bylo možné nález případně kvantifikovat. Podobně je možné provést kontrolní stěry po umytí a dezinfekci transportního vozidla (viz kapitola 5.4.4.). Posoudit lze výsledky opět kvalitativním způsobem (Salmonely jsou nebo nejsou přítomny), semikvantitativním (viz **Tabulka 2**) nebo kvantitativním způsobem s vyjádřením KTJ (CPM) mikroorganismů na jednotku plochy. O kontrolách je třeba provádět záznam, který může sloužit jako doklad pro případné auditory.

Je možné také vyšetřit 50 g prachu ze zařízení nebo ventilačních průduchů a trubek na *Salmonella* spp. Tento prach se smísí s 200 ml předeřáté pufované peptonové vody (BPV, PPV). Suspenze je důkladně promíchána sterilní tyčinkou nebo dřevěnou špachtlí, protřepána na třepače po dobu 120 vteřin a inkubována při 37 ± 1°C po dobu 18 ± 2 hod. Následně se provede selektivní pomnožení na semisolidním agaru dle Rappaport - Vassiliadise (MSRV) po

dobu  $24 \pm 3$  hod při  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Pipetou se odebere 0,1 ml inkubované PPV u stěny vzorkovnice z povrchové vrstvy tekutiny a naočkují se 3 jednotlivé kapky na povrch plotny ( $\varnothing$  140 mm), nebo po 1 kapce na 2 plotny ( $\varnothing$  90 – 100 mm). Plotny s MSR/V se inkubují víčkem nahoru, aby nedošlo k potrhání agarů. Pozitivní nárůst salmonel se projeví zónou růstu a obláčkovitým zákalem půdy s jasným okrajem. V případě, že je MSR/V po  $24 \pm 3$  hodinách negativní, prodlužuje se inkubace o dalších  $24 \pm 3$  hodiny a teprve pak se přikročí k vyočkování na pevné půdy z okraje zákalu na MSR/V na XLD a 1 další selektivní půdu dle vlastního výběru. Půdy musí být předeřhřátý na pokojovou teplotu a musí mít zavadlý povrch. Z okraje růstové zóny na MSR/V se odebere kličkou (obj. 10  $\mu\text{l}$ ) z hloubky agarů materiál a naočkuje se obvyklým způsobem na povrch obou selektivních půd. Pokud není patrná zóna, odebere se materiál přímo z inokulovaného bodu. Agarové selektivní půdy se inkubují při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu  $24 \pm 3$  hodiny. Pozor na kolonie atypické (laktózopozitivní, bez sirovodíku, nebo v R-fázi růstu!). Diagnostika rodu, druhu a sérovaru probíhá molekulárně (MALDI-TOF, PCR), biochemicky testy pro *Enterobacteriaceae* a sérologicky s pomocí O a H sér. Výsledky kultivací mohou být vyjádřeny kvalitativně (mikroorganismus je nebo není přítomen) nebo semikvantitativně na jeden až čtyři křížky podle intenzity nárůstu (kritéria hodnocení ukazuje opět **Tabulka 2**). Vyšetření prachu je poměrně přesným indikátorem přítomnosti salmonel v provozu a jejich nález bývá v líhních překvapivě vysoký.

#### 5.4.3. Mikrobiologická kontrola líhňářských odpadů

V průběhu líhnutí kuřat dochází ke vzniku odpadů, jako jsou skořápky s podskořápečnými blanami a zbytky tekutin, prach nebo nedolíhlá vejce. Vzhledem k tomu, že odpady prošly dlouhodobou inkubací, bylo by asi bezpředmětné stanovovat počty mikroorganismů v určitém množství odpadu, můžeme však kvalitativně ověřit alespoň přítomnost některých oportunních nebo potenciálních patogenů, jako jsou salmonely, pasteurely, galibakteria, ornitobakterie, avibakteria, *S. aureus*, listerie, mykoplazmata, chlamydie, patogenní kmeny *E. coli*, případně další dle uvážení a aktuální epizootologické situace. K vyšetření odebereme směsný vzorek odpadu z různých částí líhne po vylíhnutí kuřat. Ten je tvořen především zbytky skořápek, podskořápečných blan, tekutin a prachu o hmotnosti 200 g. Sto gramů je v laboratoři ve větší sterilní nádobě rozdrobeno na menší kousky a důkladně promícháno a zalito fyziologickým roztokem nebo fyziologickým roztokem s peptonem tak, aby odpad zcela nasákl tekutinou a aby hladina tekutiny dosahovala asi 1 - 2 cm nad povrch materiálu. Po dobu 120 vteřin suspenzi třepeme při nízkých otáčkách na třepačce a následně vyočkujeme tekutinu sterilní mikrobiologickou kličkou nebo vatovým tampónem na povrch krevního agarů. Inkubace je prováděna aerobně 18 – 24 (48) hodin při  $36^\circ\text{C}$  –  $37,5^\circ\text{C}$ . Stejným postupem je možno provést kultivaci i na jiné selektivní nebo selektivně diagnostické půdy (Endův agar, XLD agar, RLM agar, Rambachův agar, Edwardsův agar, Slanetz-Bartley agar, Baird-Parkerův agar, Sabouraudův agar), pokud bychom chtěli monitorovat specifické skupiny, rody nebo druhy bakterií (enterobakterie, salmonely, listerie, enterokoky, streptokoky, stafylokoky, kvasinky, plísně, řasy a další). Pokud bychom chtěli vyšetřit materiál na viry, mykoplazmata nebo chlamydie, je možné materiál zpracovat stejným způsobem ale jako médium by byla použita sterilní destilovaná voda. Jeden až 2 ml suspenze by pak byly odebrány do sterilní Eppendorfovy zkumavky a předány k vyšetření metodou PCR.

Dalších 100 g materiálu je možno použít k detekci salmonel, se kterými mají chovatelé vleklé problémy. Materiál je zalit pufrovanou peptonovou vodou (PPV, BPV) tak, aby její hladina sahala asi 1 - 2 cm nad povrch materiálu, suspenze je důkladně promíchána sterilní tyčinkou nebo dřevěnou špachtlí, protřepána na třepačce po dobu 120 vteřin a inkubována při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu  $18 \pm 2$  hod. Následně se provede selektivní pomnožení na semisolidní agar dle Rappaport - Vassiliadis (MSRV) po dobu  $24 \pm 3$  hod při  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Pipetou se odebere 0,1 ml inkubované PPV u stěny vzorkovnice z povrchové vrstvy tekutiny a naočkují se 3 jednotlivé kapky na zavadlý povrch plotny ( $\varnothing$  140 mm), nebo po 1 kapce na 2 plotny ( $\varnothing$  90 – 100 mm). Plotny s MSRV se inkubují opět víčkem nahoru. Pozitivní nárůst se projeví zónou růstu a zákalem půdy s jasným okrajem. V případě, že je MSRV po  $24 \pm 3$  hodinách negativní, prodlužuje se inkubace o dalších  $24 \pm 3$  hodiny a teprve pak se přikročí k vyočkování na pevné půdy z okraje zákalu na MSRV na XLD a 1 další selektivní půdu dle vlastního výběru. Půdy musí být předeřhřaty na pokojovou teplotu a musí mít zavadlý povrch. Z okraje růstové zóny v MSRV se odebere klíčkou (obj. 10  $\mu\text{l}$ ) z hloubky agaru materiál a naočkuje se obvyklým způsobem na povrch obou selektivních půd. Pokud není patrná zóna zákalu, odebere se materiál přímo z inokulovaného bodu. Pokud je MSRV agar zkalený celý, provede se inokulace z okraje plotny. Agarové selektivní půdy se inkubují při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu  $24 \pm 3$  hodiny. Pozor na kolonie atypické (laktózo pozitivní, bez sirovodíku, nebo v R-fázi růstu!). Diagnostika rodu, druhu a serovaru probíhá molekulárně (MALDI-TOF, PCR), biochemicky testy pro *Enterobacteriaceae* a sérologicky s pomocí O a H sér. Výsledky kultivací mohou být vyjádřeny kvalitativně (mikroorganismus je nebo není přítomen) nebo semikvantitativně na jeden až čtyři křížky podle intenzity nárůstu (kritéria hodnocení ukazuje opět **Tabulka 2**).

#### 5.4.4. Pravidelná kontrola hygieny a čištění dopravních prostředků

Z každého vozidla je dobré odebrat nejméně 3 stěry nebo otisky a zpracovat a vyhodnotit je dle metodik uvedených v kapitolách 6.2.3.1. - 6.2.3.4. Odběry by se měly provádět po ukončení přejímky na farmách a to z míst, která jsou nejvíce exponovaná. Tím je především podlaha korby v místě dveří nebo povrch hydraulické plošiny, s pomocí které se vozíky s bednami, v nichž jsou kuřata uložena, spouštějí na zem. Jeden stěr by bylo dobré udělat z libovolného místa vnitřní stěny korby. Stěry je dobré provádět z plochy 100  $\text{cm}^2$ , aby bylo možné nález případně kvantifikovat. Podobně je možné provést kontrolní stěry po umytí a dezinfekci vozidla. Posoudit lze výsledky kvalitativním způsobem (Salmonely jsou nebo nejsou přítomny) nebo kvantitativním způsobem s vyjádřením KTJ (CPM) mikroorganismů na jednotku plochy. O kontrolách je třeba provádět záznam.

#### 5.5. Praktické výstupy pro chovatele a veterináře

Práce Krause et al. (2021) poukazuje na závislost mikrobiální kontaminace vajec z hnízd na plemenné příslušnosti nosnic. Nejlepších výsledků a nejmenší mikrobiální zátěž vykazuje plemeno Leghornka bílá. Je to dáno pravděpodobně plemennou schopností tvořit silnější skořápku a silnější a kvalitnější kutikulu vejce a produkovat více antimikrobní látky lysozymu do kutikuly a vaječného obsahu. Statisticky stejní autoři překvapivě prokázali, že skladováním vajec při vhodné teplotě počet mikroorganismů v jednotlivých strukturách vejce s časem paradoxně klesá. Za optimální teplotu a čas, kdy je úbytek mikroorganismů největší, je skladování po dobu 28 dnů při  $20^\circ\text{C}$ . Těchto poznatků by bylo možno využít v průběhu ošetření

vajec před líhnutím (možná by bylo dobré otestovat přípravky s obsahem lysozymu, imunopeptidů a vosků na ošetření povrchu vajec), případně delší skladování oplozených a ošetřených vajec při vhodné teplotě a vlhkosti.

Jako praktický příklad negativního vlivu mikrobiální kontaminace násadových vajec uvádíme níže dvě tabulky, které dokladují nárůst nálezu a spektra enterokoků ve žloutkových váčcích a orgánech jednodenních kuřat z produkčních a reprodukčních chovů drůbeže v posledních dvou letech (viz **Tabulky 3 a 4**). Z některých neoficiálních zdrojů víme, že se v roce 2024 zvýšila poptávka po jednodenních kuřatech, nicméně kapacita produkce násadových vajec v rodičovských chovech byla nedostačující. V líhních byla proto využívána ve větší míře (snad i nevědomě) také kontaminovaná vejce z podestýlky. Následky na sebe nenechaly dlouho čekat. Jako veterinární lékaři jsme v roce 2024 museli řešit na drůbežích farmách Moravy a Slezska vysokou míru nemocnosti zvířat. I přes intenzivní kurativní činnost došlo na několika farmách k úhynům a ztrátám až 10 % populace. Stav se nám podařilo stabilizovat v některých případech až po 3 týdnech. Když jsme zpětně analyzovali výsledky mikrobiologických rozborů jednodenních kuřat, ukázalo se, že na všech farmách s výjimkou jedné, kde zdravotní problémy zaznamenány nebyly, se meziročně v porovnání s rokem 2023 zvýšil počet nálezů enterokoků v orgánech a žloutkových váčcích a rovněž se zvýšila druhová rozmanitost těchto mikrobů, což jasně ukazuje na zhoršenou kvalitu násadových vajec. V **Tabulkách 3 a 4** jsou nárůsty nálezů (prevalencí) označeny žlutě. Z toho vyplývá, že by chovatelé rozhodně neměli litovat finančních nákladů na vyšetření, která mohou osvětlit příčinu ztrát. Rovněž je třeba doporučit chovatelům zvyšovat tlak na producenty násadových vajec a líhňářské podniky ve smyslu zvyšování kvality násadových vajec i jednodenních kuřat. Chovatelé stále argumentují tím, že takové možnosti jsou velmi omezené, že kapacita líhní i rodičovských chovů není tak vysoká a že nákup vajec nebo JDK v zahraničí, například v západní Evropě, je příliš drahý.

Ne všechny problémy lze ale svádět jen na kvalitu jednodenních kuřat. Kvalitu krmiv máme, jak již bylo řečeno, po stránce zastoupení jednotlivých živin podchycenou a stabilizovanou, nicméně kvalita surovin pro jejich výrobu bývá v mnoha případech nevalná. V mnoha případech je problémem i mechanická struktura krmiv. Zatímco vzorek šarže krmiva dodaný výrobcem je v pořádku, krmivo odebrané přímo z přepravního vozu obsahuje často vysoký podíl prachové složky. Někteří zootechnici a chovatelé nás informovali až o 50% přítomnosti prachové složky v krmivu. Prachová složka ve voleti absorbuje vodu, může se změnit v těstovitou hmotu a vznikne takzvané měkké vole. Jeho obsah se nepasážeje trávicím traktem, může podlehnout mikrobiálnímu rozkladu a následně může vyvolat autointoxikaci (samootravu) postižených zvířat rozpadnými produkty a metabolity mikrobů. Někdy se setkáváme i s případy, že díky některým složkám drůbež krmivo vůbec nechce přijímat, což je alarmující. Dle některých odborníků i chovatelů mohou být příčinou nekvalitní kafilerní tuky přidané do krmiva nebo jiné aditivní látky. Při kontrolách provozu farem posuzujeme i uchovávání krmných směsí. Ty jsou často uchovávány v laminátových silech, v některých případech i kovových, které jsou vystaveny slunečnímu záření a výkyvům teplot. Jakou kvalitu může mít krmivo po několika dnech takovýchto extrémů? Přestože má krmivo velmi rychlý obrát, doporučujeme provádět i jeho kontrolu. V průběhu skladování může docházet ke kondenzaci vody v zásobnících a následnému pomnožení některých mikroorganismů, které mohou produkovat opět nejrůznější metabolity nebo toxiny (*Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., plísně, kvasinky a další).



V posledních třech měsících jsme provedli v rámci kontroly prostředí chovů také kontrolu napájecích systémů. Výsledky byly rovněž alarmující. Při rozebrání koncového úseku napájecích systémů bylo zachyceno až několik litrů usazenin černé barvy a fekálního pachu, se kterými se běžně setkáváme například při čištění odpadních systémů nebo kanalizace (viz **Obrázky 5 a 6**). Mikrobiologickým rozbohem byla zaznamenána rozkladná mikroflóra, která může drůbež svými produkty a metabolity chronicky intoxikovat, tedy otravovat a oslabovat imunitní výkonnost zvířat, nebo způsobovat septická onemocnění či alimentární intoxikace. Ze zachycených mikroorganismů můžeme jmenovat *Enterobacter cloaceae*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*, *Escherichia coli*, *Ochrobactrum* sp., *Citrobacter braakii*, *Citrobacter murlinae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Delftia acidovorans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosum*, *Enterococcus faecalis*, v jednom případě byl v jedné z hal izolován dokonce i *Staphylococcus aureus*, tedy zlatý stafylokok. Většina mikroorganismů byla detekována v silné až masivní intenzitě. Pokud by takovýto „koktejl“ mikroorganismů pozřel s vodou nebo potravou například člověk, je možné garantovat, že by se nevyhnul přinejmenším těžkým zažívacím potížím. Uvědomme si, že skrze napájecí systém aplikujeme v průběhu zástavu různé výživové doplňky, vitamíny, minerály, aminokyseliny a také antimikrobní látky. To je výborný základ a prostředí pro pomnožování mikroorganismů v potrubí a díky transportu antimikrobních látek také reálným zdrojem bakteriálních kmenů rezistentních vůči těmto látkám. Jak vypadá obsah neudržovaného napájecího systému, ukazují opět **Obrázky 5 a 6**. Z toho vyplývá, že by se chovatelé měli věnovat i pravidelné kontrole, důkladnému čištění a dezinfekci napájecího systému nejméně 4x za rok, lépe častěji podle aktuálních potřeb a určitě v době před naskladněním nových turnusů. V souladu s omezováním aplikace průmyslově vyráběných antimikrobních látek lze rovněž chovatelům doporučit, aby se zajímali o přírodní produkty s antimikrobními účinky, kterými by bylo možno antibiotika nahradit. Je třeba přiznat, že humánní medicína je překvapivě v tomto směru mnohem dál, než medicína veterinární. V odborné literatuře se pravidelně setkáváme s články o používání nejrůznějších antimikrobních rostlinných produktů nejen ve stomatologii, ale i v dermatologii, gastroenterologii nebo interní medicíně. Je proto třeba v tomto směru vyvíjet i tlaky na výrobce veterinárních léčiv, neboť zde máme velké rezervy. Společnost Ptácy s.r.o. se sama spolupodílí na výzkumu v oblasti bakteriofágů určených proti *E. coli*, enterokokům a v blízké budoucnosti snad i dalším mikroorganismům.



**Obrázek 5:** Neudržovaný napájecí systém může obsahovat tmavou usazeninu tvořenou mikrobiálním biofilmem a zbytky nutričních látek aplikovaných vodou (foto: V. Sládeček).



**Obrázek 6:** Bakteriální biofilm může ucpávat i niplíky kapkových napaječek (foto: V. Sládeček).

Podestýlka je rovněž velmi důležitým zoohygienickým faktorem. Má funkci tepelně izolační a především savou a adsorpční. Jen díky kvalitní podestýlce se daří drůbež udržovat v suchu, což sekundárně snižuje bakteriální nálož v chovných halách a následně i produkci stájových plynů.

Mnozí malochovatelé a provozovatelé biofarem by si v tomto směru mohli vzít paradoxně z velkochovů příklad. Podestýlka může být však i zdrojem některých druhů nežádoucích mikroorganismů, které při vysychání trusu a dalších sekretů zvířat mohou přejít do aerosolu a po provedené léčbě mohou zodpovídat za reinfekce nebo dokonce za onemocnění ošetřovatelského personálu. Máme na mysli zejména mikroorganismy *Salmonella* spp. nebo patogenní kmeny *E. coli*. Podestýlka je rovněž možným zdrojem reziduí použitých antimikrobních léčiv, která se mohou zpětně podílet na růstu rezistencí jak zvířecích, tak lidských patogenů a v případě využití podestýlky jako hnojiva mohou tyto látky kontaminovat ekosystém, především půdu a spodní vodu. Mállokterý chovatel ví, že organoleptické závady v krmivech mohou vést k nechotě přijímání takových krmiv drůbeží a náhražkovým příjmem většího množství podestýlky hladovějícími zvířaty, což může vyústit nejen v ucpaní (obturaci) volat a trávicího traktu, ale také v následné infekce takto postižené drůbeže vyvolané patogenními kmeny *E. coli*, enterokoky nebo i koaguláza negativními stafylokoky, které jsou v substrátech podestýlky hojně obsaženy, v horším případě jersiniemi, salmonelami nebo dalšími patogeny. Podestýlka může být také díky zbytkům krmiva vítaným zdrojem potravy některých druhů hmyzu, zejména potemníka stájového (*Alphitobius diaperinus*), který může být také přenašečem různých bakteriálních, mykotických, virových nebo parazitárních onemocnění. Jak taková invaze může v extrémních případech vypadat, ukazují **Obrázky 7 a 8**. V rámci monitoringu patogenů je proto velmi dobré provádět čas od času i odběr hmyzu k laboratornímu vyšetření. Ideální je odebrat asi 50 - 100 kusů hmyzu (může být i méně, pokud výše uvedené počty nejsou k dispozici) nebo jejich vývojových stádií do sterilního plastového sáčku nebo sterilní vzorkovnice, důkladně je uzavřít a shromážděný hmyz usmrtit v mrazáku při -20°C po dobu alespoň 2 hodin. Následně by měly být vzorky odeslány v zamraženém stavu do laboratoře s perfektně vyplněnou objednávkou vyšetření. Pokud bychom pátrali po pasteurelách, galibakteriích nebo jiných citlivějších bakteriálních původcích, vzorky by neměly být zamrazovány. Na vyšetření je třeba se vždy předem domluvit s pracovníky laboratoří. Samozřejmostí v každém chovu by měla být také pravidelná kontrola volně žijících hlodavců a dalších živočichů, jako jsou například ptáci. V případě ptáků by stále měly být zajištěny s pomocí mřížek a sítí proti jejich vniknutí. Volně žijící ptactvo může být zdrojem původců aviární chřivky, salmonelózy, tuberkulózy, cholery drůbeže, jersiniózy nebo parazitárních infekcí, jako jsou například trichomonády, histomonády, škrkavky, roupi, kapilárie nebo čmelíci. V případě hlodavců je třeba monitorovat jejich výskyt a provádět pravidelnou deratizaci a vést o tom záznamy. To se také děje a je vidět, že jsou chovatelé v tomto směru dobře instruováni. Uhynulé kusy potkanů, myší a dalších druhů hlodavců je dobré ve spolupráci s ošetřujícím veterinárním lékařem pravidelně posílat do akreditovaných laboratoří k pitvě a mikrobiologickému vyšetření se zaměřením zejména na salmonely, pasteurely, patogenní kmeny *E. coli*, stafylokoky, případně další aktuální původce, kteří v chovu dělají potíže.



**Obrázek 7:** Masivní invaze potemníka stájového na stěnách stáje po ukončení turnusu (foto: V. Sládeček).



**Obrázek 8:** Detail invaze potemníka stájového (*Alphitobius diaperinus*) na stěnách stáje (foto: V. Sládeček).

Farma	FARMA 1
-------	---------

Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Počet pozitivních	14	32	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Prevalence %	40	91,4	2,9	0	0	2,9	0	0	0	0	0	0
Farma	FARMA 2											
Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Počet pozitivních	6	8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Prevalence%	75	100	0	12,5	0	0	0	0	0	0	0	0
CELKEM												
Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43
Počet pozitivních	20	40	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Prevalence%	46,5	93	2,3	2,3	0	2,3	0	0	0	0	0	0

**Tabulka 3:** Prevalence enterokoků na drůbežích farmách Moravy a Slezska v letech 2023 a 2024 u kuřat brojlerů v orgánech a žloutku (autor: J. Bzdil).

Farma	FARMA1											
Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	8	6	8	6	8	6	8	6	8	6	8	6
Počet pozitivních	1	6	0	0	0	6	0	0	0	2	0	0
Prevalence%	12,5	100	0	0	0	100	0	0	0	33,3	0	0
Farma	FARMA 2											

Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	14	6	14	6	14	6	14	6	14	6	14	6
Počet pozitivních	3	6	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
Prevalence%	21,4	100	0	33,3	7,1	0	0	0	0	0	0	0
Farma	FARMA 3											
Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	18	21	18	21	18	21	18	21	18	21	18	21
Počet pozitivních	9	13	0	4	0	4	0	0	1	0	0	0
Prevalence%	50	61,9	0	19	0	19	0	0	5,6	0	0	0
Farma	FARMA 4											
Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	16	14	16	14	16	14	16	14	16	14	16	14
Počet pozitivních	4	13	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0
Prevalence%	25	92,9	0	7,1	0	28,6	0	0	0	0	0	0
Farma	FARMA 5											
Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Počet pozitivních	0	4	0	0	2	2	0	0	0	0	0	1
Prevalence%	0	66,7	0	0	33,3	33,3	0	0	0	0	0	16,7
Farma	FARMA 6											
Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	
Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0
Počet pozitivních	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prevalence%	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CELKEM												
Druh	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. cecorum</i>		<i>E. hirae</i>		<i>E. casseliflavus</i>	

Rok	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024	2023	2024
Počet vyš. vzorků	66	53	66	53	66	53	66	53	66	53	66	53
Počet pozitivních	19	42	0	7	3	16	0	0	1	2	0	1
Prevalence%	28,8	79,2	0	13,2	4,5	30,2	0	0	1,5	3,8	0	1,9

**Tabulka 4:** Prevalence enterokoků na drůbežích farmách Moravy a Slezska v letech 2023 a 2024 v orgánech a žloutcích kuřat masných rodičů (autor: J. Bzdil).

## 6. Laboratorní část

### 6.1. Laboratorní testování dezinfekčního (biocidního) účinku *in vitro*

Testování *in vitro* lze provádět na kulturách v tekutých médiích, na pevných plochách nebo metodou minimální inhibiční koncentrace (MIC). Metodou MIC lze stanovit přesně koncentraci účinné látky dezinfekčního prostředku v mg/l nebo µg/ml, která bude účinná vůči různým skupinám, rodům nebo druhům mikroorganismů. Metody MIC mají však svá omezení a úskalí (viz kapitola 6.1.3.). Účinek je možno označit za vyhovující při poklesu mikroorganismů po dezinfekci alespoň o 4 - 5 log (dekadických logaritmů) při simulaci slabého nebo silnějšího organického znečištění při testování v suspenzi. Tento limit se vztahuje na humánní i veterinární přípravky včetně dipů.

#### 6.1.1. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních (biocidních) prostředků v tekutých médiích

V první fázi připravíme výchozí ředění referenční bakteriální kultury, tedy zkušební suspenze. Z referenčních kmenů (RK) lze doporučit pro naše účely například *Staphylococcus aureus* (CCM 4516 = ATCC 6538), *Streptococcus uberis* (CCM 4617), *Escherichia coli* (CCM 3954 = ATCC 25922 nebo CNCTC 10538), *Enterococcus faecium* (ATCC 6057), *Enterococcus hirae* (ATCC 10541), *Enterococcus faecalis* (CAPM 5613), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) a/nebo *Bacillus cereus* (CCM 2010). S pomocí turbidimetru vytvoříme z porostu RK na trypton sojovém agaru (TSA), živném nebo masopeptonovém krevním agaru suspenzi o zákalu 0,5° nebo 1° Mc Farlanda (1,5 x 10<sup>8</sup> nebo 3 x 10<sup>8</sup> bakteriálních buněk v 1 ml suspenze ve zředovacím nebo fyziologickém roztoku) a následně zředíme tak, aby výsledný počet buněk (CFU) byl 1,5 x 10<sup>4</sup> případně 3 x 10<sup>4</sup>. Pro MIC a diskovou difúzní metodu jsou stanovena jiná ředění (viz kapitoly 6.1.3 – 6.1.5.).

##### 6.1.1.1. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních (biocidních) prostředků v tekutých médiích v závislosti na jejich koncentraci

Pokud budeme chtít sledovat antimikrobní účinky biocidního preparátu různých koncentrací bez imitace organického znečištění, připravíme ředění zkoumané látky (nejlépe tvrdou vodou sterilizovanou membránovou filtrací). Budeme-li předpokládat, že originální přípravek má koncentraci 100 %, pak výsledná koncentrace v testech bude díky ředění v testovací směsi maximálně 90 %. Z původního objemu biocidu můžeme provést desetinné ředění, to znamená, že k 9 ml suspenze původního ředění přidáme 1 ml ředícího nebo fyziologického

roztoku, v další zkumavce k 8 ml výchozí suspenze přidáme 2 ml ředícího roztoku, v další zkumavce k 7 ml původní suspenze přidáme 3 ml ředícího roztoku a tak pokračujeme, až ke směsi 1 ml výchozí suspenze s 9 ml ředícího roztoku čímž dosáhneme ředění 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 % původní koncentrace. Další diluci lze provést i desetinásobným ředěním, čímž bychom získali výsledné koncentrace 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001 a 0,000001 %, což znamená, že k 9 ml ředícího roztoku přidáme 1 ml výchozího dezinfekčního prostředku, po promíchání vezmeme z první zkumavky 1 ml ředěné suspenze a přeneseme jej do druhé zkumavky s 9 ml čistého ředícího nebo fyziologického roztoku, po promíchání vezmeme z druhé zkumavky opět 1 ml ředěné suspenze a přeneseme jej do třetí zkumavky s dalšími 9 ml ředícího nebo fyziologického roztoku a tak pokračujeme ještě sedmkrát. Následně do 9 ml každého ředění dezinfekčního roztoku (biocidu) přidáme po 1 ml bakteriální suspenze ( $1,5 \times 10^5$  buněk) a každé ředění s kulturou důkladně promícháme vortex mixerem nebo pipetou s balónkem. **Minimální expoziční čas pro testování přípravků před dojením je 0,5 min  $\pm$  5 sec a pro prostředky k dezinfekci vemene po dojení a povrchy je 1 min  $\pm$  5 sec. Maximální expoziční čas pro testování přípravků před dojením je 3 min  $\pm$  10 sec, pro přípravky po dojení je 30 min  $\pm$  10 sec a pro povrchy je 120 min  $\pm$  10 sec.** Po uplynutí expoziční doby stanovené výrobcem nebo po 0,5 minutě  $\pm$  5 vteřinách až 30 minutách  $\pm$  10 vteřinách expozice exponovanou směs znovu promícháme a přeneseme 1 ml této směsi do 9 ml neutralizačního roztoku, abychom zrušili antimikrobní působení účinné látky. Po důkladném promíchání a neutralizaci po dobu 5 minut  $\pm$  10 vteřin vyočkujeme neutralizovanou směs paralelně na 2 plotny s trypton sójovým agarem (TSA), krevním nebo živným agarem bez krve po 0,2 ml, rozetřeme sterilní hokejkou, necháme povrch půdy zavadnout a následně inkubujeme aerobně 24 hodin při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Jako kontrolu naočkujeme stejným způsobem 0,2 ml ze směsi 1 ml původní bakteriální suspenze ředěné v 9 ml ředícího nebo fyziologického roztoku. Po inkubaci kolonie spočítáme a vytvoříme tabulku, případně graf. Úbytky kolonií porovnáváme s kontrolní kultivací, hodnoty přepočteme na dekadické logaritmy a statisticky vyhodnotíme. Stanovíme koncentraci, při které ještě dochází a při které již nedojde k žádnému nárůstu referenčního kmene na plotnách (break point). Pro publikaci je nutné od každého ředění udělat alespoň 2 kultivace z každého ředění a pracovat s průměrem CFU z obou ploten. Pokud bychom chtěli brát v úvahu vliv slabého nebo silného znečištění, je nezbytné vzít jako výchozí koncentraci suspenze  $RK 3 \times 10^5$ . Jeden ml této bakteriální suspenze zředíme 1 ml jedním z roztoků D, E, F, G, H nebo I pro imitaci nízkého nebo vyššího organického znečištění (viz kapitola 9) a tuto směs pak použijeme k testům místo čisté suspenze RK v ředícím nebo fyziologickém roztoku. Pokud bychom chtěli brát v úvahu vliv tvrdosti vody na výsledky testů, je třeba biocid naředit sterilní tvrdou vodou místo ředícího roztoku. Maximální počty mikroorganismů na 1 plotně by měly být do 300 CFU (KTJ). Všechny testy by měly probíhat při  $20^\circ\text{C}$ , stejně tak všechny pracovní roztoky a suspenze musí mít  $20^\circ\text{C}$ , čehož lze dosáhnout temperováním ve vodní lázni nebo termostatu. Pro každou biocidní látku je stanoven jiný druh inaktivátoru (viz kapitola 9. Přílohy), vhodné je však použít univerzální neutralizační roztok (Škaloud a Pokludová 2008 nebo ČSN EN 1040 až ČSN EN 16437+A1).

#### **6.1.1.2. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních (biocidních) prostředků v tekutých médiích v závislosti na době expozice**

Těsně před provedením experimentu zvolíme koncentraci biocidu, se kterou budeme chtít pracovat a případně provedeme jeho naředění. Následně do 9 ml pracovního ředění



biocidního (dezinfekčního) roztoku přidáme 1 ml bakteriální suspenze ( $1,5 \times 10^5$  CFU RK) a směs biocidu s kulturou důkladně promícháme vortex mixerem nebo pipetou s balónkem. Z expozičních časů jsou obvykle voleny 0,5, 1, 5, 15, 30, 60, 90 nebo 120 minut. Individuálně můžeme zvolit vlastní doby expozic. Expoziční časy do 1 minuty mají toleranci odchylky  $\pm 5$  vteřin a časy nad 1 min mají toleranci  $\pm 10$  vteřin. **Minimální expoziční čas pro testování přípravků před dojením je 0,5 min  $\pm$  5 sec a pro prostředky k dezinfekci vemene po dojení a povrchy je 1 min  $\pm$  5 sec. Maximální expoziční čas pro testování přípravků před dojením je 3 min  $\pm$  10 sec, pro přípravky po dojení je 30 min  $\pm$  10 sec a pro povrchy je 120 min  $\pm$  10 sec.** Po uplynutí expoziční doby, kterou zvolíme, přeneseme 1 ml exponované směsi do 9 ml neutralizačního roztoku, abychom zrušili antimikrobní působení účinné látky. Po důkladném promíchání a neutralizaci po dobu 5 minut  $\pm$  5 vteřin vyočkujeme neutralizovanou směs paralelně na 2 plotny s trypton sojovým agarem (TSA), krevním nebo živným agarem bez krve po 0,2 ml, rozetřeme sterilní hokejkou, necháme povrch půdy zavadnout a následně inkubujeme aerobně 24 hodin při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Jako kontrolu naočkujeme stejným způsobem 0,2 ml ze směsi 1 ml původní bakteriální suspenze ředěné 9 ml ředícího nebo fyziologického roztoku namísto biocidu. Po inkubaci kolonie spočítáme a vytvoříme tabulku, případně graf. Úbytky kolonií v čase porovnáváme s kontrolní kultivací, hodnoty přepočteme na logaritmy a statisticky vyhodnotíme. Stanovíme dobu expozice, při které ještě dochází a při které již nedojde k žádnému nárůstu referenčního kmene na plotnách (break point) při dané koncentraci biocidního (dezinfekčního) přípravku. Pro publikaci je nutné od každého ředění udělat alespoň 2 kultivace z každého ředění a pracovat s průměrem CFU z obou ploten. Pokud bychom chtěli vzít v úvahu vliv slabého nebo silného znečištění, je nezbytné vzít jako výchozí koncentraci suspenze RK  $3 \times 10^5$  CFU. Jeden ml této suspenze zředíme 1 ml jednoho ze zvolených roztoků D, E, F, G, H nebo I (viz kapitola 9) pro imitaci nízkého nebo vyššího organického znečištění a tuto směs pak použijeme k testům místo čisté suspenze RK v ředícím nebo fyziologickém roztoku. Pokud bychom chtěli brát v úvahu vliv tvrdosti vody na výsledky testů, je třeba biocid naředit sterilní tvrdou vodou místo ředícího roztoku. Maximální počty mikroorganismů na 1 plotně by měly být opět do 300 CFU (KTJ). Všechny testy by měly probíhat při  $20^\circ\text{C}$ , stejně tak všechny pracovní roztoky a suspenze musí mít  $20^\circ\text{C}$ , čehož lze dosáhnout temperováním ve vodní lázni nebo termostatu.

### **6.1.1.3. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních (biocidních) prostředků v tekutých médiích v závislosti na testovaném referenčním kmenu mikroorganismu**

Testy probíhají shodným způsobem jako v bodech 6.1.1.1. nebo 6.1.1.2. Mění se jen druh použitého mikroorganismu. Jak již bylo řečeno, z referenčních kmenů (RK) lze doporučit pro naše účely například *S. aureus* (CCM 4516 = ATCC 6538), *S. uberis* (CCM 4617), *E. coli* (CCM 3954 = ATCC 25922 nebo CNCTC 10538), *E. faecium* (ATCC 6057), *E. hirae* (ATCC 10541), *E. faecalis* (CAPM 5613), *P. aeruginosa* (ATCC 15442) a/nebo *B. cereus* (CCM 2010). S pomocí turbidimetru vytvoříme z porostu RK na trypton sojovém agaru, živném nebo masopeptonovém krevním agaru suspenzi o zákalu  $0,5^\circ$  Mc Farlanda ( $1,5 \times 10^8$  bakteriálních buněk v 1 ml suspenze ve zředovacím nebo fyziologickém roztoku) a následně zředíme tak, aby výsledný počet buněk byl  $1,5 \times 10^4$  nebo  $3 \times 10^4$  podle toho, zda použijeme nebo nepoužijeme interferenční suspenze. Při výrobě suspenze je doporučováno roztok s kulturou třepat ve sterilní lahvi s 10 ml ředícího roztoku a 5 g sterilních skleněných kuliček po dobu 3 minut z důvodu lepší homogenizace. Pokud použijeme terénní kmeny, je třeba definovat jejich

vlastnosti (fenotypové nebo genotypové). Lze provést i testování účinku biocidů na směsích kultur mikroorganismů v určitých poměrech, aby byly co nejlépe simulovány reálné podmínky panující v terénu. U každého referenčního kmene (RK) a biocidního prostředku můžeme testovat dezinfekční účinek v závislosti na době expozice nebo koncentraci biocidu. Postup smísení kultury RK s testovacím roztokem biocidu a neutralizačním roztokem, kultivace, inkubace, počítání CFU a zpracování výsledků jsou shodné s postupy v kapitolách 6.1.1.1. a 6.1.1.2. Rovněž postupy ověření vlivu interferujícího roztoku a tvrdé vody jsou shodné s postupy v kapitolách 6.1.1.1. a 6.1.1.2.

### **6.1.2. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na pevných plochách**

V první fázi opět připravíme výchozí ředění referenční bakteriální kultury (RK), tedy zkušební suspenze. Z referenčních kmenů (RK) lze doporučit pro naše účely například *S. aureus* (CCM 4516 = ATCC 6538), *S. uberis* (CCM 4617), *E. coli* (CCM 3954 = ATCC 25922 nebo CNCTC 10538), *E. faecium* (ATCC 6057), *E. hirae* (ATCC 10541), *E. faecalis* (CAPM 5613), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *P. vulgaris* (ATCC 13315) a/nebo *B. cereus* (CCM 2010), případně jiné mikroorganismy. S pomocí turbidimetru vytvoříme z porostu RK na trypton sojovém agaru (TSA), živném nebo masopeptonovém krevním agaru (MPKA) suspenzi o zákalu  $2^\circ$  Mc Farlanda ( $6 \times 10^8$  bakteriálních buněk v 1 ml suspenze ve zředovacím nebo fyziologickém roztoku) a následně zředíme tak, aby výsledný pracovní počet buněk byl  $6 \times 10^5$  CFU/1ml. Při výrobě suspenze je doporučováno kulturu třepat ve sterilní lahvi s 10 ml ředícího roztoku a 5 g sterilních skleněných kuliček po dobu 3 minut pro důkladnější homogenizaci.

#### **6.1.2.1. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na pevných neporézních plochách**

Jako testovací povrch se používá kotouč z nerezové oceli 304 s povrchem třídy 2 na obou stranách o průměru 2 cm. Ten musí být očištěn před použitím v kádince o objemu 50 ml přelitím 20 ml 5% Deconu nebo podobného přípravku po dobu 60 minut. Pak disk opláchneme 10 vteřin tekoucí sterilní destilovanou vodou. Následně disk ponoříme do 95% lázně 2-propanolu na 15 minut a následně necháme zbytky propanolu odpařit. Ke sterilizaci je možno použít i jiných metod (záření, horkovzdušná sterilizace), alternativně lze použít i autentické materiály, jako jsou například sklo, porcelán, plast a podobně, které je však potřeba vysterylizovat v autoklávu nebo horkovzdušné sušárně. Jednou použité disky nebo autentické materiály se dále nepoužívají. Pokud chceme imitovat organické znečištění, pak smísíme 1 ml bakteriální suspenze s 1 ml interferenčního roztoku imitujícího vysoké nebo nízké znečištění a při testovací teplotě promícháme po dobu 2 minut  $\pm$  10 vteřin (denzita buněk  $3 \times 10^5$  CFU/1 ml). Pokud nechceme imitovat znečištění, přidáme k 1 ml bakteriální suspenze 1 ml dilučního roztoku místo roztoku interferenčního. Celkem 0,05 ml této směsi přeneseme na povrch disku a necháme zaschnout při 37°C. Pak přidáme 0,1 ml testované látky (lze testovat různá ředění), aby zaschlá testovací směs byla zcela překryta. Expozice probíhá obligátně při  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  (alternativně také při  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  a  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  ...). Obligátní expoziční čas je 30 minut  $\pm$  10 vteřin (alternativně i 1min  $\pm$  10 sec, 5 min  $\pm$  10 sec a 60 min  $\pm$  10 sec...). Po expozici disk vložíme do sterilní lahve s 10 ml neutralizačního roztoku exponovanou ploškou dolů. Na dně neutralizační tekutiny jsou sterilní skleněné kuličky. Třepeme 5 min  $\pm$  10 sec a následně vyočkujeme 0,1 ml výsledné neutralizační suspenze se smytým RK na povrch TSA nebo jiného

agaru a současně přeneseme 1 ml neutralizační suspenze po 5 min třepání také do 9 ml ředícího roztoku. Po promíchání přeneseme opět 1 ml do dalších 9 ml ředícího roztoku a vytvoříme tak dvě ředění ( $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ ), která vyočkujeme, každé ředění vždy na 2 plotny s TSA nebo jiným agarem po 0,1 ml. Po zavadnutí povrchu agarů inkubujeme při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  24 hodin. Výsledky odečteme a zapíšeme.

Dostatečně účinný biocid by měl snižovat počty mikroorganismů o 4 a více dekadických logaritmu i při použití simulace slabého nebo silného organického znečištění v porovnání s kontrolou (místo biocidu je použita voda).

#### **6.1.2.2. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na pevných porézních plochách**

Jako testovací povrch bývá použito topolové dřevo. Použité destičky jsou z alespoň 1 rok sušeného dřeva a mají mít rozměr 1 cm x 2 cm x 0,6 – 1 mm. Plochy musí být hladké. Dřevěné plošky sterilizujeme 15 minut při  $121^\circ\text{C}$  v autoklávu na Petriho misce. Každá ploška smí být použita jen jedenkrát. Bakteriální suspenzi připravíme jako v bodě 6.1.2. Testovaný preparát použijeme nejméně ve 3 koncentracích (ředěno dilučním, tedy ředícím roztokem, nebo sterilní tvrdou vodou sterilizovanou membránovou filtrací). Jeden ml bakteriální suspenze o koncentraci  $6 \times 10^5$  CFU smísíme ve sterilní zkumavce s 1 ml ředícího roztoku nebo 1 ml interferenční suspenze imitující slabé znečištění a při zvolené teplotě inkubujeme 2 minuty  $\pm$  10 vteřin. Inkubační teplota by měla být obligátně  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  (alternativně také při  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  a  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  ...). Následně nanese na 3 destičky v Petriho misce po 0,1 ml této pracovní směsi mikrobů. Destičky vysušíme při  $37^\circ\text{C}$ . Sušení by nemělo trvat déle než 60 minut. Každou suchou destičku pak ponoříme v jiné Petriho misce do 20 ml pracovního roztoku biocidu (3 různých ředění) a po 1 minutě  $\pm$  5 vteřinách až 360 minutách  $\pm$  10 vteřinách přemístíme destičky do další Petriho misky bez tekutiny vzhůru testovanou plochou a vložíme do termostatu s požadovanou inkubační teplotou. Alternativně je možné provést expozice po 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 a 360 min  $\pm$  10 sec. Pak destičky přemístíme do další nádoby s 10 ml TSB s neutralizačním roztokem v poměru 1 : 1 a mícháme 15 vteřin, následně dáme nádoby s destičkami do vodní lázně při  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  na 25 minut  $\pm$  10 vteřin. Pak znovu promícháme a vložíme nádoby s destičkami v TSB s neutralizačním roztokem do ultrazvukové myčky (frekvence 30 - 55 kHz a maximální výkon 1000 W). Teplota lázně by měla být 0 –  $4^\circ\text{C}$ , aby se povrch nepřehříval a aby se uvolnily mikroorganismy z povrchů destiček. Po 5 minutách  $\pm$  10 vteřinách vyjmeme destičky z neutralizačního roztoku a ten naředíme řadou desetinásobných ředění v ředícím nebo fyziologickém roztoku od  $10^{-1}$  do  $10^{-3}$ . Vyočkujeme z každého ředění včetně původní suspenze ( $10^0$ ) 0,1 ml vždy na 2 plotny s TSA nebo jiným agarem. Rozetřeme po povrchu sterilní hokejkou a necháme zavadnout. Inkubujeme při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  24 hodin. Výsledky odečteme a zapíšeme, logaritmuje výsledky a porovnáme.

Dostatečně účinný biocid by měl snižovat počty mikroorganismů o 4 a více dekadických logaritmu při použití simulace slabého organického znečištění v porovnání s kontrolou (místo biocidu použita sterilní voda).

### 6.1.2.3. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na měkkých porézních plochách

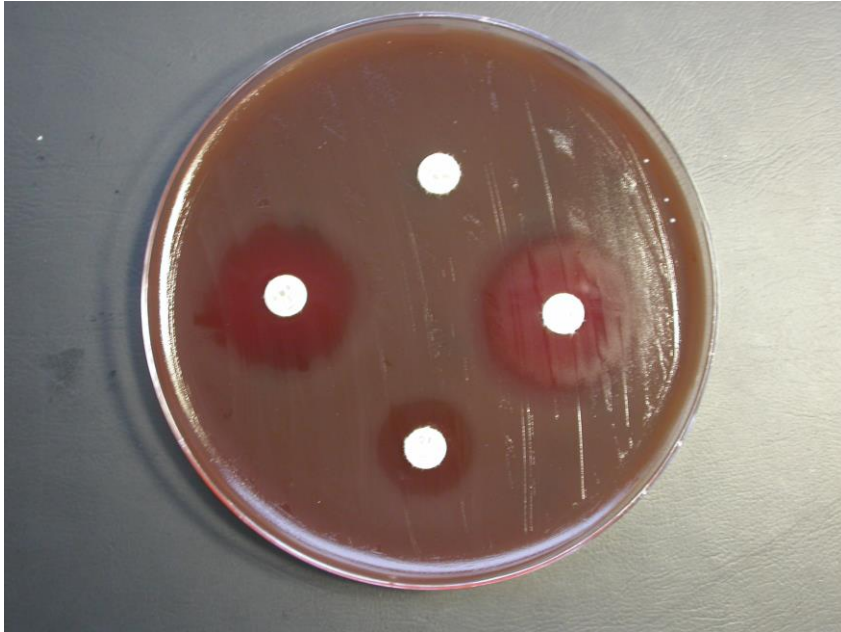
Jako testovací povrchy (plošky) bývají použity textilie, netkané textilie, bavlna, vlna, polyuretanová houbička a další materiály. Použité testovací plochy mají rozměr 1 cm x 2 cm x 1 - 5 mm a před použitím je třeba je vysterilizovat v autoklávu 15 minut při 121°C na Petriho misce. Je třeba však upozornit, že ne všechny materiály toto ošetření snesou a proto je třeba zvolit jinou účinnou metodu jejich sterilizace. Každá ploška smí být opět použita jen jedenkrát. Bakteriální suspenzi připravíme jako v bodě 6.1.2. Testovaný preparát (biocid) použijeme nejméně ve 3 koncentracích (ředěno ředícím roztokem nebo sterilní tvrdou vodou sterilizovanou membránovou filtrací). Jeden ml bakteriální suspenze ( $6 \times 10^5$  CFU) smísíme ve sterilní zkumavce s 1 ml ředícího roztoku nebo sterilní tvrdé vody nebo 1 ml interferenční suspenze imitující slabé znečištění a při zvolené teplotě inkubujeme 2 minuty  $\pm$  10 vteřin. Inkubační teplota by měla být obligátně  $10 \pm 1^\circ\text{C}$ . (alternativně také při  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  a  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  ...). Následně nanese na 3 testovací plošky v Petriho misce po 0,1 ml této pracovní mikrobiální směsi. Materiál vysušíme při 37°C. Sušení by nemělo trvat déle než 60 minut. Suché plošky převrstvíme v místě aplikace pracovní kultury 0,5 ml různých ředění biocidu (3 ředění) na Petriho misce a inkubujeme po dobu 1 minuty  $\pm$  5 vteřin až 360 minut  $\pm$  10 vteřin v termostatu s požadovanou inkubační teplotou (viz výše). Alternativně je možné provést expozice po 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 a 360 min  $\pm$  10 sec. Pak plošky přemístíme do homogenizačního sáčku s membránou s 10 ml směsi TSB s neutralizačním roztokem (1 : 1) a homogenizujeme ve Stomacheru 30 vteřin, následně dáme sáčky s ploškami do vodní lázně při  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  na 25 minut  $\pm$  10 vteřin. Pak znovu 30 vteřin homogenizujeme ve Stomacheru. Pak vyjmeme plošky z neutralizačního roztoku a ten zředíme řadou desetinásobných ředění v ředícím nebo fyziologickém roztoku od  $10^{-1}$  do  $10^{-3}$ . Vyočkujeme z každého ředění včetně původní suspenze ( $10^0$ ) po 0,1 ml vždy na 2 plotny s TSA nebo jiným agarem. Rozetřeme po povrchu sterilní hokejkou a necháme zavadnout. Inkubujeme při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  24 hodin. Výsledky odečteme, zapíšeme, logaritmujeme a porovnáme.

Dostatečně účinný biocid by měl snižovat počty mikroorganismů o 4 a více dekadických logaritmů při použití simulace slabého organického znečištění v porovnání s kontrolou (místo biocidu použita sterilní voda).

### 6.1.3. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků diskovou difúzní metodou

Pro tento účel je třeba referenčních a/nebo terénních bakteriálních kmenů zachycených z mastitidního mléka, nebo kmenů terénních zachycených z bazénových vzorků. Z referenčních kmenů lze použít rody a druhy mikroorganismů uvedené v kapitole 6.1.2. Referenční kmeny zajistí porovnatelnost výsledků vyšetření a mohou být současně použity jako kmeny validační pro testování kvality disků a půd. Pro kultivaci kmenů a provedení testů použijeme Mueller – Hintonův (MHA) agar bez krve (LMS s.r.o. Jaroměř, ČR). U hůře nebo pomalu rostoucích kmenů (např. hemolytických streptokoků) je třeba použít Mueller – Hintonův agar s krví, nebo lépe s jiným suplementem podporujícím růst původce (LMS s.r.o. Jaroměř, ČR). Je třeba však upozornit, že výsledky mohou být přídatkem krve nebo jiného organického suplementu zkresleny. Agar musí být precizně rozlitý v Petriho misce v tloušťce 4

mm  $\pm$  0,5 mm (na 1 plotnu o průměru 90 mm se rozlévá obvykle asi 25 ml půdy). Bakteriální testovací kultury by měly být inkubovány na MHA při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu 16 – 24 hodin. Inkubační doba i teplota by měly být u všech pokusů jednotné. Z kmenů vyrobíme těsně před použitím s pomocí bakteriologické kličky a turbidimetru suspenzi o hustotě  $0,5^\circ\text{ Mc}$  Farlanda ve fyziologickém roztoku s 1 % glukózy nebo v Maximum Recovery Diluentu (MRD) (LMS s.r.o. Jaroměř, ČR nebo Trios s.r.o. Praha, ČR...).



**Obrázek 9:** Disková difúzní metoda testování antimikrobního účinku biocidů. Antimikrobní účinek se projevívá vznikem zóny inhibice růstu v okolí disku (foto: J. Bzdil).

U špatně nebo pomalu rostoucích mikroorganismů (streptokoky) je možné použít suspenzi o hustotě  $1^\circ\text{ Mc}$  Farlanda. Následně nanese mikropipetou 0,1 ml bakteriální suspenze na zavadlý povrch agarů a dobře rozetřeme po povrchu agarů sterilní plastovou hokejkou. Po zavadnutí inokula po 10 – 15 minutách naklademe na povrch inokulovaného agarů disky (blank) o průměru 6 mm (Thermo Fisher Scientific s.r.o., Brno, ČR) napuštěné ve zkoumaném biocidu o známé koncentraci. Těsně před testem je nezbytné připravit roztok přesně podle návodu výrobce. Některé roztoky se musí vytvořit z více složek nebo přimísením aktivátoru. Disky do čerstvého roztoku ponoříme na Petriho misce na 30 vteřin a pak je klademe na plotnu s kulturou (asi 3 – 6 disků maximálně na plotnu). Plotny inkubujeme obvykle dnem vzhůru při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin. Máme-li pochybnost o schopnosti disku absorbovat zkoumanou tekutinu, je možné do agarů vytvořit důlky o průměru 2 – 3 mm speciální sterilní raznicí a po nanesení kmene (RK) na povrch agarů můžeme nakápnout 1 – 5  $\mu\text{l}$  zkoumaného biocidu do každé takto vytvořené jamky dle konzistence prostředku, případně můžeme prostředek kápnout ve stejném množství přímo na povrch plotny po zavadnutí bakteriálního inokulátu, aby nedošlo k „rozpítí“ zkoumaného prostředku. Zakapané plotny inkubujeme ve striktně vodorovné poloze dnem obvykle dolů, aby nedošlo ke skápnutí zkoumané látky. Případné zóny inhibice změříme posuvným měřítkem s přesností na desetiny mm, hodnoty zapíšeme do tabulek a následně statisticky vyhodnotíme. Při testování kultur mohou být použity i takzvané interferenční látky organické a anorganické, jako jsou tvrdá voda nebo interferenční roztok (kapitola 9, body D-I). Naše praktická zkušenost ukázala, že příměs organických ani

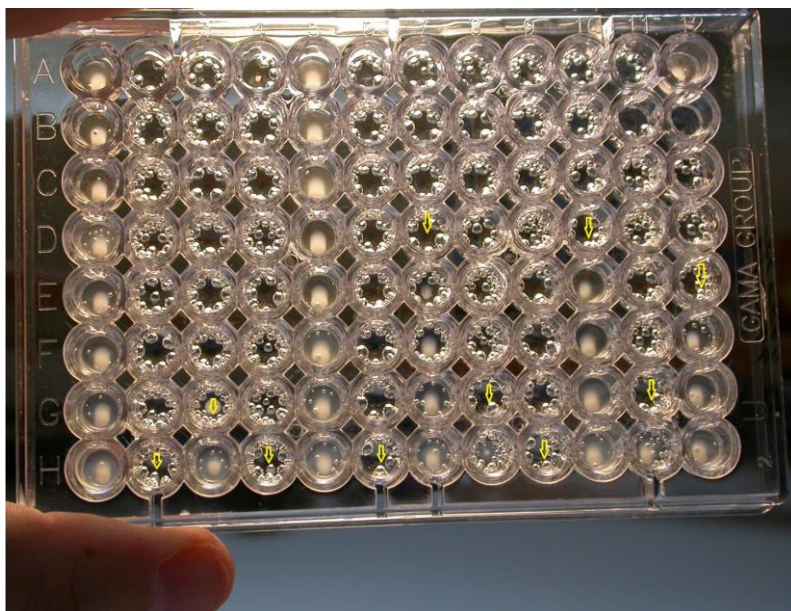
anorganických interferenčních látek ve vodě neměla žádný vliv na výsledek testů. Za významné by bylo možné však považovat vysoké nebo nízké pH používaných roztoků a suspenzí činidel, které samo o sobě může bránit v růstu mikroorganismů nebo způsobuje koagulaci v médiích. Pro minimalizaci chyby je třeba testy dělat paralelně ve dvou až třech provedeních. Je třeba upozornit, že některé látky mohou být množstvím organických složek v půdě vyvážány a žádná inhibice nemusí být zaznamenána ani v nejvyšší koncentraci zkoumaného prostředku, nebo nemusí být účinné látky schopny difúze v agarech. Pak je třeba zvolit některou z metod v kapitolách 6.1.1. a 6.1.2.

Naše praktické zkušenosti ukazují, že disková difúzní metoda nedává spolehlivé výsledky, přestože jsou opačné zkušenosti publikovány i v mezinárodních časopisech s impakt faktorem (Fitzpatrick et al. 2019; Fitzpatrick et al. 2021). V našem případě bylo nejlepších výsledků dosahováno pouze u přípravků na bázi chlorhexidinu. Příčinu se nepodařilo odhalit, lze se však domnívat, že většina účinných látek se váže na některé složky agarů a není schopna tímto agarem dostatečně difundovat. Opakovaně lepších výsledků jsme dosáhli diluční plotnovou metodou 6.1.5.

#### **6.1.4. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků diluční mikrometodou MIC / MBC**

Publikovány byly metody stanovení minimální inhibiční a minimální baktericidní koncentrace biocidů v tekutých médiích na mikrotitračních destičkách. K testům použijeme opět referenční a/nebo terénní bakteriální kmeny zachycené z mastitidního mléka, nebo kmeny terénní zachycené z bazénových vzorků mléka na běžném Columbia krevním agaru s 5 % beraní krve nebo na tryptózo sojovém agaru s 5 % beraní krve (LMS s.r.o. Jaroměř, ČR). Z referenčních kmenů lze použít rody a druhy mikroorganismů uvedené v kapitole 6.1.2. Referenční kmeny zajistí porovnatelnost výsledků vyšetření a mohou být současně použity jako kmeny validační pro testování a půd. K vlastnímu testu vytvoříme kličkou v Mueller – Hintonově bujónu bakteriální suspenzi o zákalu  $0,5 \text{ }^\circ \text{ Mc Farlanda}$  ( $1,5 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ ). Tuto suspenzi rozkapeme do jamek (po 0,5 ml) na sterilní mikrotitrační destičce (v každé svislé řadě bude 1 bakteriální kmen). Biocid (nebo účinnou látku) naředíme ve zvláštních zkumavkách sterilní destilovanou vodou na koncentrace 10, 5, 1, 0,5 a 0,1 objemového %. Koncentrace mohou být i vyšší nebo nižší. Některé přípravky je třeba naředit předem podle návodu výrobce, nebo provést jejich aktivaci před použitím. Ve svislých řadách přidáme ke každému testovanému kmeni stejné množství (0,5 ml) naředěného biocidu v různých koncentracích (viz **Tabulka 5**). Plotny přikryjeme víčkem a inkubujeme při  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  po dobu 24 hodin. Odečteme breakpointy, tedy nejnížší koncentrace, při kterých již nedojde k pomnožení mikrobů a vytvoření zákalu nebo sedimentu v jamce plotny (viz **Obrázek 10**). Následně vyočkujeme kličkou z každé jamky, kde nebyl zaznamenán nárůst mikrobů, na agarovou půdu a opět inkubujeme plotny při  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  po dobu 16 – 24 hodin. Pokud mikroorganismy z jamek bez zákalu narostly, je možné říci, že biocid způsobil pouze inhibici, pokud nenarostly, je možné říci, že biocidní prostředek měl pouze inhibiční účinek. Breakpointy MIC a MBC se mohou lišit, pokud aktivní látka účinkuje obojím způsobem! Pro minimalizaci chyby je třeba testy dělat paralelně ve dvou až třech provedeních. Podobně jako u diskové difúzní metody nepředstavuje příměs anorganických ani organických interferenčních látek v testech žádný problém, nežádoucí vliv může mít jen vysoké nebo nízké pH, které samo o sobě může bránit v růstu mikroorganismů nebo

způsobovat koagulaci v médiích. Je třeba opět upozornit, že některé látky mohou být množstvím organických složek v půdě vyvážány a žádná inhibice nemusí být zaznamenána ani v nejvyšší koncentraci zkoumaného prostředku. Pak je třeba zvolit některou z metod v kapitolách 6.1.1. a 6.1.2. Naše zkušenost ukazuje na občasné potíže s ředěním některých komerčně vyráběných biocidů z důvodu jejich hustoty nebo složení díky jejich velmi vazké, tukovité nebo pěnovité konzistenci.



**Obrázek 10:** Testování antimikrobiního účinku biocidů diluční mikrometodou MIC/MBC. Antimikrobiní účinek se projeví inhibicí růstu mikroorganismů, nedochází ke zkalení média a lze tak určit takzvaný break point, tedy nejnižší koncentrace biocidu, která zastavuje růst mikroorganismů. Breakpointy jsou na obrázku označeny žlutými šipkami (foto: J. Bzdil).

#### 6.1.5. Testování antimikrobiního účinku dezinfekčních přípravků diluční plotnovou metodou MIC / MBC

Nejprve vytvoříme suspenzi testovacích mikroorganismů. Použijeme vybrané referenční kmeny (viz kapitola 6.1.2.) a/nebo i izolované terénní kmeny narostlé na Mueller – Hintonově agaru. Z čistých kultur vytvoříme ve zkumavkách ve fyziologickém roztoku nebo jiném médiu, které není antagonistické s testovanou látkou, suspenze kultur o turbiditě  $0,5^{\circ}$  Mc Farlanda ( $1,5 \times 10^8$  CFU v 1 ml suspenze). Suspenze musí být použity do 30 minut po vytvoření. Dále připravíme Mueller – Hintonův agar, který po autoklávování vložíme ve sterilní nádobě do vodní lázně na  $50^{\circ}\text{C}$ , kde bude až do použití. U hemolytických streptokoků můžeme přidat do agaru 5 % beraní krve. Pokud jde o náročnější organizmy, přidáme další přísady a růstové faktory. Dále vytvoříme ředění účinné látky nebo originál přípravku, které budeme testovat. Z původní suspenze vytvoříme základní koncentrace 10240, 2560, 320, 40, 5 a 0,625 mg/l, ze kterých pak vytvoříme finální koncentrace v agaru od 512 mg/l agaru do 0,004 mg/l agaru (viz **Tabulka 5**). Podle potřeby je možné vytvořit i jiné série ředění, především u komerčních přípravků, kde je účinná látka obvykle již naředěna. Konečné ředění účinné látky provedeme smísením 1 ml předředěné substance s 19 ml rozvařeného MHA, důkladně ve zvláštních nádobkách promícháme a následně rozlijeme na Petriho misky o průměru 90 mm a necháme

při pokojové teplotě ztuhnout. Inokulum přeneseme na osušené plotny včetně 1 kontrolní bez testované látky replikátorem s kolíky o průměru 2,5 mm nebo mikropipetou či bakteriologickou kličkou. Objem inokula by měl být 1  $\mu$ l (koncentrace  $10^4$  CFU/1 ml).

Výchozí ředění účinné látky (mg/l)	Objem výchozí suspenze pro další ředění (ml)	Objem přidávané destilované vody v dalším ředění (ml)	Výsledná koncentrace finálního ředění (mg/l)	Výsledná koncentrace látky v 19 ml agaru po přidání 1 ml finální suspenze (mg/l)
10240	1	0	10240	512
10240	1	1	5120	256
10240	1	3	2560	128
2560	1	1	1280	64
2560	1	3	640	32
2560	1	7	320	16
320	1	1	160	8
320	1	3	80	4
320	1	7	40	2
40	1	1	20	1
40	1	3	10	0,5
40	1	7	5	0,25
5	1	1	2,5	0,125
5	1	3	1,25	0,06
5	1	7	0,625	0,03
0,625	1	1	0,3125	0,015
0,625	1	3	0,1562	0,008
0,625	1	7	0,0781	0,004

**Tabulka 5:** Ředění testované antimikrobní látky pro testy plotnové diluční MIC (upraveno dle EUCAST 2000).

Inokulační body se nechají zaschnout při pokojové teplotě. Plotny se následně inkubují dnem vzhůru po dobu 18 až 24 hodin při 35 – 37°C, nevyžadují li to podmínky jinak. Odečte se, ve kterém nejnižším ředění biocidu došlo k inhibici růstu kmene (break point) a hodnoty se zaznamenají. Na 1 plotnu je možno inokulovat 3 i více bakteriálních kultur, pokud nedojde k propojení inhibičních zón nebo přerůstání ploten. Znovu je třeba upozornit, že některé látky mohou být množstvím organických složek nebo jiných složek v půdě vyvázány a žádná inhibice nemusí být zaznamenána ani v nejvyšší koncentraci zkoumaného prostředku. Pak je třeba zvolit některou z metod v kapitolách 6.1.1. a 6.1.2.

V našem případě byla tato metoda lepší a spolehlivější než například metoda disková difúzní uvedená v bodě 6.1.3. a současně méně pracná a nákladná než metoda 6.1.4.



## 6.2. Terénní testování dezinfekčního účinku biocidu *in vivo*

Toto testování má svá úskalí. Je třeba si uvědomit, že pracujeme v kontaminovaném prostředí s aerosolovou a prašnou zátěží a proto je třeba pracovat rychle a čistě. Je třeba používat ochranné pracovní prostředky a gumové rukavice, které je třeba mezi každým odběrem nebo úkonem dezinfikovat éteralkoholem, protože se rychle odpařuje, nezanechává rezidua a nezkrsluje tak nálezy. Éter a alkohol by měly být smíseny v poměru 1:1 a alkohol by měl mít koncentraci alespoň 60%.

### 6.2.1. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na autentických anorganických površích

Tento způsob testování zahrnuje podobné postupy jako testování *in vitro* v laboratorních podmínkách. Lze ho provést s pomocí vlhčených stěrových tamponů z přesně rozměrově stanovené plochy (obvykle 100 cm<sup>2</sup>) s pomocí sterilní šablony a stěrového tampónu, který se po expozici umístí do zkumavky s vhodnou pevnou půdou zabraňující růstu a multiplikaci mikrobů, například Amiesovou půdou s aktivním uhlím (osvědčený je systém Transbak, Dispolab Brno, ČR nebo PUR-Blue, Bioing, Ivančice, ČR...), nebo se urychleně doručí do laboratoře při maximálně +4°C v originálním obalu nebo nádobce, aby vatová hlavice nevyschla, nebo se vloží přímo do sterilního ředícího nebo fyziologického roztoku a vytřepe se do média na místě odběru po dobu 5 min ± 10 sec. Po vytřepání se tampón z roztoku odstraní, aby doba, po kterou se uvolňují mikroorganismy do roztoku, byla standardní. Další metodou je stěr z povrchu exponované plochy abrazivní navlhčenou houbičkou. Metody mohou být provedeny postupy kvantitativními nebo kvalitativními s určením přítomnosti nebo nepřítomnosti zvolené skupiny, rodu nebo druhu mikroorganismů (*S. aureus*, *E. coli*, *S. uberis*, *E. faecalis*, *Salmonella* species atd). Další metodou může být otisk s použitím kontaktního agaru na plotně (LMS s.r.o. Jaroměř, ČR) nebo s použitím otiskových agarů kontaktní soupravy, např. Hygicult nebo Easicult (Aidian Oy, Espoo, Finland). Poslední jmenované soupravy jsou ale neúměrně drahé. Metodiky jsou již popsány v kapitolách 6.1.2.1 – 6.1.2.4. a vycházejí z metodik ČSN EN 1040, ČSN EN 1656, ČSN EN 14349 a ČSN EN 16437+A1. Dle uvedených metodik je možné testovat originální mikrobiální zátěž prostředí před a po rutinní aplikaci biocidu, nebo provést experimentální kontaminaci povrchu referenčním nebo terénním bakteriálním kmenem a pokus s přesně ředěnou účinnou látkou dle norem. Při testování účinnosti biocidu provedeme stěr (otisk) z dané plochy před dezinfekcí a pak po dezinfekci, výsledky se porovnají.

### 6.2.2. Testování antimikrobního účinku dezinfekčních přípravků na organických površích

Za organické povrchy považujeme především srst, kůži a sliznice zvířat. V našem případě se jedná o kůži vemene respektive struku. Je třeba pamatovat, že stáj, ležiště i kůže zvířete jsou obvykle silně kontaminovány stájovou mikroflórou. Každý úkon navíc zvíře stresuje a může to být osobě, která odběr provádí, dáno najevo i velmi nevybíravým způsobem. Je proto třeba pracovat rychle, klidně, čistě a přesně a vystavovat odběrový materiál vlivu prostředí jen nad dobu nezbytně nutnou.

### 6.2.2.1. Testování účinku dezinfekčního prostředku s pomocí stěru

K odběru stěrů se obvykle používají systémy Transbak nebo PUR-Blue (Transbak, Dispolab Brno, ČR nebo PUR-Blue, Bioing, Ivančice, ČR...). Suchý tampon PUR-Blue je pro naše účely lepší, protože má větší stěrovou plošku a pevnější, kratší a také robustnější tyčinku, která umožňuje vyvinout při stírání větší tlak na kůži. Stěrový tampón nejprve zvlhčíme doporučenou sterilní přepravní tekutinou, jako je fyziologický nebo ředící roztok, ve kterých by nemělo docházet k růstu a multiplikaci mikroorganismů. Tyto roztoky používáme tehdy, pokud zjišťujeme jen bakteriální zátěž ploch. Pokud provádíme testy s biocidy, je dobré používat neutralizační roztok, který by měl navíc neutralizovat biocidní látku. Zvlhčení provedeme nejlépe ve sterilních podmínkách laboratoře nejdéle 24 hodin před odběrem. Přebytek tekutiny vypudíme z tampónu jeho mírným stlačováním o stěnu nádoby za současného pootáčení kolem jeho podélné osy ještě v laboratoři. U systému Transbak vatový konec stěrovky můžeme zvlhčit i ponořením do přepravní pudy těsně před jeho použitím. Od zvlhčení do okamžiku použití uchováme tampóny při chladničkové teplotě do +4°C. V první fázi provedeme nejprve stěr z povrchu neomytého a nedezinfikovaného struku s použitím sterilních gumových rukavic. Vlastní stěr provedeme pod mírným tlakem trojím obkroužením hrotu struku ve vzdálenosti do 1 cm od hrotu včetně vyústění strukového kanálku se současným pootáčením tampónu kolem jeho podélné osy, abychom co nejefektivněji využili stěrovou plošku. Stírání by mělo trvat 10 vteřin. Exponovaný tampón zasuneme buď do zkumavky s agarem (systém Transbak) nebo do sterilní nádoby bez média (systém PUR-Blue) a přepravíme do laboratoře při maximálně +4°C. Zpracování musí být provedeno do 24 hodin po odběru. Doba od odběru do zpracování musí být vždy konstantní. Ve druhé fázi provedeme dezinfekci stejného struku predipem a vyčkáme, dokud neproběhne expoziční doba stanovená výrobcem. Pokud výrobce nestanoví konkrétní expoziční čas, provedeme odběr po 0,5 - 3 minutách expozice (obligátní doba expozice) a to stejným způsobem, jako u nedezinfikovaného struku. ČSN EN stanoví pro predipy minimální expoziční dobu 0,5 minuty ± 5 sec a maximální 3 minuty ± 10 sec. Pokud bychom chtěli sledovat účinnost prostředku, můžeme v souladu s uvedenými ČSN EN provést odběry v různých časech po aplikaci dezinfekčního přípravku (1, 5, 30, 60). Po odběru stěru po ošetření predipem je třeba zvíře vydojit a následně aplikovat postdip. Ve třetí fázi provedeme další odběr ze stejného struku po aplikaci postdipu a expozici minimálně 1 minuty ± 5 sec a maximálně 30 minut ± 10 sec (opět stanoveno normami ČSN EN). Uchování, transport do laboratoře a zpracování vzorků jsou stejné jako u nedezinfikovaných struků. V laboratoři provedeme vytřepání a uvolnění mikroorganismů z tampónů po přesně stanovenou dobu (obvykle 5 minut ± 10 vteřin) s pomocí vortex mixéru do sterilního neutralizačního roztoku o objemu 2 ml. Pak je třeba tampón z tekutiny ihned vyjmout a tuto tekutinu naředit v řadě desetinasobných ředění a vše nakultivovat (viz níže). To znamená, že 1 ml původní suspenze (ředění  $10^0$ ) po vytřepání tampónu přeneseme do 9 ml sterilního fyziologického roztoku nebo autoklávem sterilizovaného fyziologického nebo ředícího (dilučního) roztoku obsahujícího 8,5 g NaCl a 1 g tryptonu (pankreatického digestátu kaseinu) v 1000 ml sterilní destilované vody s výsledným pH  $7,2 \pm 0,2$  (vyrábí běžně LMS Jaroměř), čímž vznikne ředění  $10^{-1}$ . Po důkladném promísání na vortexu odebereme z 1. ředění opět 1 ml suspenze a přeneseme do 9 ml dalšího fyziologického nebo ředícího roztoku, čímž vznikne druhé ředění  $10^{-2}$ . Tak pokračujeme až do ředění  $10^{-6}$ . Z každého ředění včetně původní suspenze ( $10^0$ ) pak nakultivujeme 0,2 ml

tekutiny na každou plotnu s TSA (Trypton sójový agar, vyrábí běžně LMS Jaroměř), živným agarem, masopectonovým krevním agarem, případně selektivně diagnostickou půdou.



**Obrázek 11:** *Různé typy stěrových tamponů. Vlevo suchý tampon, uprostřed zkumavka na exponovaný suchý tampon, vpravo stěrová souprava a zkumavka s transportní půdou (foto: J.Bzdil).*



**Obrázek 12:** *Stěrová souprava pro odběr materiálu z přesně definované plochy. Vlevo je sterilní šablona, uprostřed transportní zkumavka s roztokem a vpravo je stěrový tampón (foto: J. Bzdil).*

Inokulát rozetřeme plastovou sterilní hokejkou a necháme na povrchu agaru zavadnout. Inokulované plotny inkubujeme 24 hodin při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  v aerobní atmosféře, pokud nehledáme anaeroby. Každou kultivaci z každého ředění provedeme na 2 agarové plotny (duplikovaně), abychom minimalizovali chybu a zpřesnili výsledek. Pokud bychom inokulát chtěli zalít do agaru, bylo by třeba použít 1 ml suspenze. Metoda zalévání je však podstatně pracnější a u neprůhledných agarů (MPKA, Rambach atd.) jí nelze použít. Při výpočtech CFU (KTJ) tedy použijeme průměrný počet kolonií vypočtený z obou ploten každého ředění. Pokud je po inkubaci nárůst slabý, nebo nic nenaroste, je možné tuto inkubaci prodloužit na 48 hodin. Časy a podmínky inkubací je však třeba ve všech případech sjednotit! Výsledné počty kolonií vynásobíme pěti a hodnotou ředění a získáme tak počet CFU (KTJ) v 1 ml původní suspenze. Pokud výsledné počty násobíme 10, získáme počet mikrobů (KTJ resp. CFU, TNM) v celém tampónu. Je třeba promyslet a sjednotit, jak výsledky hodnotit. Hodnoty CFU (KTJ) je dobré převést do podoby dekadických logaritmů. Výsledky zapíšeme a statisticky vyhodnotíme. Účinek dipů je možno označit za vyhovující při poklesu mikroorganismů po dezinfekci alepoň o 5 lg (dekadických logaritmů). Odběr s pomocí tampónů je méně validní než u houbiček a smyvů, protože nemusíme dokonale setřít celou vyšetřovanou plochu. Navíc může snadno dojít ke kontaminaci stěrky stájovým prachem a aerosolem při odběru a manipulaci s tampónem. Mezi jednotlivými testovanými struky je třeba vyměnit gumové rukavice nebo je desinfikovat éteralkoholem, který je potřeba po aplikaci nechat odvětrat (je to otázkou několika sekund). Odpaření roztoku se pozná tak, že přestaneme pociťovat chlad v prstech a na dlaních ruky přes materiál rukavice. **Při manipulaci s éteralkoholem je přísně zakázáno používat otevřený oheň, protože hrozí nebezpečí vznícení!**

#### 6.2.2.2. Testování účinku dezinfekčního prostředku s pomocí abrazivní houbičky

Pro naše potřeby je ideální například vlhčená celulózová houbička v homogenizačním sáčku o objemu 530 ml bez média (Bioing, Ivančice, ČR). Můžeme použít i vlhčenou polyuretanovou houbičku s rukojetí a 530 ml homogenizační sáček do Stomacheru s drátkem bez média. Odběr provedeme opět ve sterilních gumových rukavicích. Houbičku, která není vlhčená, maximálně 24 hodin před odběrem zvlhčíme fyziologickým nebo ředícím roztokem a přes stěnu sáčku ji vymačkáme prsty a zbavíme přebytečné tekutiny. Pokud zkoumáme účinky biocidů, zvlhčíme houbičku neutralizačním roztokem a přes stěnu sáčku ji opět důkladně vymačkáme a zbavíme přebytečné tekutiny a přebytečnou tekutinu odsajeme. Při odběru ji sterilně vyjmeme ze sáčku a abrazivní vrstvičkou důkladně otřeme struk od hrotu struku směrem k jeho bázi do vzdálenosti 1 cm od hrotu struku. Lze setřít i větší plochu, ale tato plocha musí být konstantní při všech odběrech. Využíváme při tom celé abrazivní plochy houbičky a působíme na kůži přiměřeným tlakem prstů nebo pinzety. Odběr by měl trvat 10 vteřin. Následně houbičku vrátíme do homogenizačního sáčku, který uzavřeme zipem a při teplotě  $4^\circ\text{C}$  jí dopravíme do laboratoře. Následně struk vydezinfikujeme daným dezinfekčním prostředkem, necháme exponovat po dobu předepsanou výrobcem nebo  $0,5 \text{ min} \pm 5 \text{ sec}$  až  $3 \text{ min} \pm 10 \text{ sec}$  a odběr provedeme stejným způsobem jako před dezinfekcí. Stejným způsobem provedeme i dezinfekci a expozici postupem, jen expozice bude trvat minimálně 1 minutu  $\pm 5 \text{ sec}$  a maximálně 30 minut  $\pm 10 \text{ sec}$  (opět stanoveno normami ČSN EN). Uchování, transport do laboratoře a zpracování vzorků je shodné jako u nedezinfikovaných struků. V laboratoři k houbičce v sáčku přilijeme sterilně 10 ml neutralizačního roztoku a vložíme do homogenizátoru (Stomacher) a při plném výkonu homogenizujeme po dobu (obvykle 5 minut

$\pm 10$  vteřin). Pak houbičku přes stěnu sáčku vyždímáme prsty a odstraníme ze sáčku a vyšetříme suspenzi. Následně provedeme opět naředění původní suspenze desetinásobnou řadou ředění, což znamená, že 1 ml původní suspenze přeneseme do 9 ml ředícího roztoku, čímž vznikne ředění  $10^{-1}$ . Po důkladném promíslení na vortexu odebereme z 1. ředění opět 1 ml suspenze a přeneseme do 9 ml dalšího ředícího roztoku, čímž vznikne druhé ředění  $10^{-2}$ . Tak pokračujeme až do ředění  $10^{-6}$ . Z každého ředění včetně původní suspenze  $10^0$  pak nakultivujeme 0,2 ml tekutiny na 2 plotny s TSA, nebo masopeptonovým krevním či jiným agarem. Inokulát rozetřeme plastovou sterilní hokejkou a necháme na povrchu agaru zavadnout. Inokulované plotny inkubujeme dnem vzhůru 24 hodin při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  v aerobní atmosféře, pokud nehledáme anaeroby. Inkubaci je možné prodloužit na 48 hodin, pokud je nárůst slabý, nebo nenaroste nic. Doby a podmínky inkubací je však potřeba sjednotit, aby výsledky byly komparabilní. Dobré je dělat z každého ředění kultivaci na 2 - 3 plotny s agarem a součty pak zprůměrovat.



**Obrázek 13:** Odběrová souprava se stěrovou abrazivní houbičkou, kterou lze stírat vyšetřované povrchy v terénu a v laboratoři mikrobiologicky vyšetřit (foto: J. Bzdil).

Počty kolonií spočteme, vynásobíme 5 a hodnotou ředění a získáme tak počet CFU (KTJ) v 1 ml původní suspenze nebo 50 a hodnotou ředění a dostaneme počet CFU v celém stěru. Výsledky zapíšeme a statisticky vyhodnotíme. Stěrování houbičkami je efektivnější, důkladnější a hrozí menší možnost kontaminace než u stěrových tamponů.

### 6.2.2.3. Testování účinku dezinfekčního prostředku s pomocí smyvu

K odběru můžeme použít sterilní odběrové PE sáčky, třeba Nasco WHIRL-PAK o objemu 58 ml (7,5 x 12,5 cm), (Bioing, Ivančice, ČR) nebo BagPage 100 o objemu 100 ml s membránou (18 x 9,5 cm) (Werkon s.r.o., Praha, ČR) nebo jiné s podobným objemem a parametry. Sáčky v laboratoři před použitím naplníme sterilním fyziologickým nebo ředícím roztokem o objemu 10 ml. Testujeme-li biocid, použijeme neutralizační roztok o objemu 10 ml a sterilně uzavřeme. Nedezinfikovaný struk vsuneme do sáčku, který při bázi struku palcem a

ukazovákem levé ruky stiskneme, aby do sáčku nenapadal prach ani aerosol a struk s pomocí palce, ukazováku a prostředníku pravé ruky důkladně pod mírným 10 vteřin omýváme a důkladně ze všech stran hněteme do délky 3 cm od hrotu struku směrem k jeho bázi. Lze smýt i větší plochu, ale velikost smývané plochy je třeba sjednotit u všech odběrů. Pak struk vyjmeme a sáček uzavřeme zipem a při teplotě 4°C ho dopravíme do laboratoře. Následně struk vydezinfikujeme daným dezinfekčním prostředkem (predipem), necháme exponovat po dobu předepsanou výrobcem nebo 0,5 min ± 5 sec až 3 min ± 10 sec. Následně provedeme vydojení mléka a stejným způsobem provedeme i dezinfekci a expozici postdipem, jen expozice bude trvat minimálně 1 minutu ± 5 sec a maximálně 30 minut ± 10 sec (opět stanoveno normami ČSN EN). Uchování, transport do laboratoře a zpracování vzorků jsou shodné jako u nedezinfikovaných struků. V laboratoři sáčky se smyvy v neutralizačním roztoku vložíme do homogenizátoru (Stomacher) a při plném výkonu homogenizujeme po dobu obvykle 5 minut ± 10 vteřin. Následně provedeme opět naředění původní suspenze desetinásobnou řadou ředění, což znamená, že 1 ml původní suspenze přeneseme do 9 ml ředícího roztoku, čímž vznikne ředění 10<sup>-1</sup>. Po důkladném promísání na vortexu odebereme z 1. ředění opět 1 ml suspenze a přeneseme do 9 ml dalšího ředícího roztoku, čímž vznikne druhé ředění 10<sup>-2</sup>. Tak pokračujeme až do ředění 10<sup>-6</sup>. Z každého ředění včetně původní suspenze 10<sup>0</sup> pak nakultivujeme 0,2 ml tekutiny na 2 - 3 plotny s TSA nebo masopeptonovým krevním či jiným agarem, inokulát rozetřeme plastovou sterilní hokejkou a necháme na povrchu agarů zavadnout. Inokulované plotny inkubujeme dnem vzhůru 24 hodin při 37 ± 1°C v aerobní atmosféře, pokud nehledáme anaeroby. Inkubaci je možné prodloužit na 48 hodin, pokud je nárůst slabý, nebo nenaroste nic. Doby a podmínky inkubací je však potřeba sjednotit, aby výsledky byly komparabilní. Součty CPM z obou ploten zprůměrujeme. Počty kolonií spočteme, vynásobíme 5 a hodnotou ředění a získáme tak počet CFU (KTJ) v 1 ml původní suspenze nebo 50 a hodnotou ředění a dostaneme počet CFU v celém stěru. Výsledky zapíšeme a statisticky vyhodnotíme. Smyv by měl být ze všech metod uvedených v kapitole 5.2.2. nejefektivnější a nejpřesnější, protože do sáčku při smývání nenapadají žádné nečistoty a žádné mikroorganismy neulpí na povrchu stěrového tampónu ani houbičky. Obtížně se však kontroluje rozsah smývané plochy struku.

### **6.2.3. Rutinní metody detekce mikrobiálního zatížení prostředí a praktická kontrola účinnosti dezinfekce předmětů a prostředí**

#### **6.2.3.1. Odběr a kultivace stěrů z předmětů, ploch a prostředí (kontrola před a po dezinfekci)**

Stěry lze provést i zvlhčeným tamponem z plochy 100 cm<sup>2</sup> s použitím sterilní plastové šablony a vyhodnotit kvalitativně (zastoupení jednotlivých druhů, rodů a skupin mikrobů) nebo kvantitativně (počty mikrobů na jednotku plochy nebo objem média). U kvalitativní metody je třeba přímo nakultivovat stěr nebo smyv na TSA, masopeptonový krevní agar nebo selektivně diagnostické půdy, provést inkubaci, odečítání výsledků. Interpretaci je třeba provést sdělením, zda hledaný mikroorganismus byl nebo nebyl detekován (kvalitativní metoda vyšetření). V případě kvantitativního hodnocení se stanovením počtu mikroorganismů (KTJ, CFU, TNM) exponovaný tampón vložíme do zkumavky s 5 ml fyziologického nebo neutralizačního roztoku a důkladně jej v roztoku vytřepeme s použitím vortex mixéru po dobu obvykle 5 minut ± 10 vteřin. Současně připravíme řadu zkumavek s 9 ml fyziologického roztoku (asi 6 ředění podle předpokladu mikrobiální zátěže). Ze zkumavky s tamponem (ředění 10<sup>0</sup>)

provedeme přenesení 1 ml suspenze do první zkumavky a důkladně vortexujeme 10 sec, čímž vytvoříme ředění  $10^{-1}$ , z první zkumavky přeneseme opět 1 ml a přemístíme do druhé zkumavky, čímž vytvoříme ředění  $10^{-2}$ , podobně pokračujeme dál až do ředění  $10^{-6}$ . Po důkladném promíchání všech suspenzí včetně původní ( $10^0$ ) provedeme kultivaci 0,2 ml na každou agarovou plotnu, inokulát rozetřeme plastovou sterilní hokejkou a necháme na povrchu agaru zavadnout. Inokulované plotny inkubujeme 24 hodin při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  v aerobní atmosféře, pokud nehledáme anaeroby. Tento typ stěrů je vhodný pro potravinářské, zemědělské a další provozy. Výsledky odečteme, zaznamenané a vyhodnotíme statisticky. Bývá zvykem, že se počty KTJ (CFU) převedou na dekadické logaritmy a ty se porovnávají.

Tato metoda se s obměnami používá i jako kontrola účinnosti dezinfekce v chovech zvířat na bázi přítomnosti koliformních bakterií ve vyšetřovaných stěrech. Metoda vychází z předpokladu, že koliformní bakterie působí jako indikátorové mikroorganizmy přetrvávající fekální kontaminace prostředí a tedy i neúčinně provedené dezinfekce. Principem testu je vyšetření 6 stěrů na přítomnost koliformních bakterií, které po pomnožení v tekuté půdě zkvašují laktózu s tvorbou plynu. Stěry jsou přijaty a vyšetřeny jako jednotlivé vzorky. Tampóny před odběrem zvlhčíme ve sterilním fyziologickém nebo ředícím roztoku a přebytek tekutiny z tampónů vytlačíme rotačním pohybem kolem podélné osy tampónu o stěnu nádoby s roztokem. Provedeme stěr asi ze 100 cm<sup>2</sup> testované plochy. Tampón pak vložíme sterilně do původního obalu a doručíme do laboratoře při  $+4^\circ\text{C}$  do 24 hodin. Vzorky kultivujeme ve zkumavkách s tekutou živnou půdou Andrade Peptone Water s laktózou a plynokou. Inkubujeme při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu 24 hod, případně až 48 hod. Po 24 hod inkubaci půdy vyhodnotíme a v případě, že nebyl zaznamenán nárůst, prodlužujeme inkubaci až na 48 hod. V případě nárůstu provedeme vyhodnocení dle **Tabulky 6**.

Příznak	Přítomnost příznaku	
Zákal (růst)	+	-
Tvorba plynu	+	-
Změna pH(barvy)	+	-
Koliformní bakterie	Prokázány	Neprokázány

**Tabulka 6:** Znaky nárůstu bakterií v APW (upraveno dle Bzdil, 2021)

Legenda: Koliformní bakterie **neprokázány** závěrečná dezinfekce **účinná**  
 Koliformní bakterie **prokázány** závěrečná dezinfekce **neúčinná**

Mimo normu lze hodnotit test 10 tampónů s obměnou. Každý tampón zalomíme do samostatné zkumavky s Andrade Peptone Water s laktózou a plynokou. Inkubujeme při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu 24 hod, případně až 48 hod. Pokud není ani pak zaznamenán nárůst, nebo je zaznamenán nárůst maximálně ve 2 zkumavkách, je dezinfekce vyhovující, pokud je porost zaznamenán ve 3 - 6 zkumavkách, je dezinfekce podmíněně vyhovující, pokud je růst zaznamenán v 7 a více zkumavkách, pak je dezinfekce nevyhovující. Podobné vyšetření lze provést i s jinými tekutými půdami. Z půd s nárůstem lze provést vyočkování na masopeptonový krevní agar a některou selektivně diagnostickou půdu podle toho, která druhy mikrobů nás zajímají. Salmonely je možno zachytit na XLD nebo Rambachově agaru,

streptokoky na Edwardsově agaru, enterokoky na Slanetz-Bartleyově agaru, stafylokoky na krevním agaru nebo Baird-Parkerově agaru, enterobakterie na Endově nebo Mac Conkeyově agaru.

### 6.2.3.2. Otisky z prostředí s pomocí kontaktních agarů na plotnách nebo destičkách

V místě odběru vyjmeme agarovou plotnu z obalu, odkryjeme víčko a agar přitiskneme jemně k vyšetřovanému povrchu, aby důkladně na tento povrch dosedl celou plochou, ale aby nepraskl nebo nebyl jinak poškozen (viz **Obrázek 14**). Po 5 – 10 vteřinách agar z testované plochy sejmeme, uzavřeme víčkem, vložíme zpět do primárního obalu nebo sterilního plastového sáčku a dodáme do laboratoře při +4°C. Inkubace kontaktního agaru s krví se provádí aerobně, v případě půd určených pro detekci anaerobů anaerobně při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin. V případě, že na plotně nic nenaroste, prodloužíme inkubaci až na 48 hodin. Kontaktní půdy na kvasinky a plísně je třeba inkubovat 48 - 120 hodin a denně je kontrolovat. Počet narostlých kolonií odečteme a zaznamenáme do pracovního protokolu. Kvantum mikrobů je možno vyjádřit na  $1\text{ cm}^2$  nebo na  $100\text{ cm}^2$ . Počty mikrobů vydělíme plochou plotny v  $\text{cm}^2$  ( $\pi r^2$ ), čímž získáme počet kolonií (CFU tedy Colony Forming Units) na  $1\text{ cm}^2$ . Po vynásobení tohoto výsledku získáme počet kolonií KTJ (CFU) na  $100\text{ cm}^2$ . Plotna s agarem o průměru 90 mm má plochu  $63,6\text{ cm}^2$ .



**Obrázek 14:** Otisk z mikrobiologicky testovaného povrchu s pomocí takzvaného kontaktního (otiskového) agaru. Po expozici se agar nechá inkubovat v termostatu a následně se narostlé bakteriální kolonie spočtou, typizují a následně přepočítají na jednotku plochy (foto: J. Bzdil).

### 6.2.3.3. Otisky z prostředí s pomocí sterilních filtračních papírků a běžných agarů na plotnách.

V testovaném prostoru vyjmeme sterilní pinzetou z obalu sterilní čtvercový filtrační papír o rozměrech  $5 \times 5\text{ cm}$  ( $25\text{ cm}^2$ ), smočíme ho v nádobce ve sterilním fyziologickém roztoku, na stěně nádoby ho necháme opatrně okapat od přebytečné tekutiny a položíme a důkladně



přitiskneme na testovaný povrch sterilní pinzetou. Po 5 - 10 vteřinách exponovaný papírek sejmeme z testované plochy a exponovanou stranou ho přitiskneme doprostřed agarové plotny, přitlačíme lehce pinzetou k agaru, aby pod ním nebyly vzduchové bubliny. Po 10 vteřinách papírek odstraníme, plotnu s agarem uzavřeme a označenou plotnu vložíme do sterilního přepravního obalu a krabičky a doručíme do laboratoře při +4°C. Inkubace a odečítání se provede jako v bodě 6.2.3.2. Po odečtení počtu narostlých kolonií provedeme přepočty na 1 cm<sup>2</sup> (vydělením počtu kolonií 25), nebo na 100 cm<sup>2</sup> (vynásobením počtu kolonií 4).

#### 6.2.3.4. Otisky z prostředí s pomocí kontaktních agarů v otiskových soupravách

Toto vyšetření lze provést například s pomocí souprav Hygicult nebo Easicult. Testovací nádoby vyjmeme z krabičky na místě provedení testu, odšroubujeme víčko s destičkou naplněnou agarem. Opatrně, aby agar nebyl poškozen, přitiskneme na testovanou plochu a 5 - 10 vteřin exponujeme. Po expozici víčko s destičkou vsuneme zpět do nádoby (nebo obalu) a zašroubujeme nebo hermeticky uzavřeme, dáme do přepravního sterilního obalu a do přepravního boxu a doručíme do laboratoře při +4°C. Při inkubaci se řídíme pokyny výrobce. Pokud nejsou k dispozici, provedeme inkubaci jako u agarů na plotnách. Soupravami je možné změřit množství mikrobů i v tekutinách. Destička se celá ponoří do tekutiny na 5 vteřin, po vytažení se zbytky stékající tekutiny odsají na dolní hraně přitisknutím k savému sterilnímu papíru a víčko s destičkou opět zasuneme a zašroubujeme do nádoby a vše vložíme do přepravního obalu. Inkubaci provedeme dle návodu výrobce nebo dle předchozích instrukcí. Po inkubaci se destička porovná se škálou porostů na fotografiích na přiloženém letáku anebo se kolonie přesně spočítají a počet CFU se přepočte na 1 cm<sup>2</sup> nebo na 100 cm<sup>2</sup> plochy. V přiloženém letáku jsou stanoveny i kritické hodnoty počtů mikrobů. Při 10<sup>2</sup> CFU je hodnocena kontaminace povrchu jako mírná (slight), při 10<sup>3</sup> CFU jako průměrná (moderate) a při 10<sup>4</sup> CFU jako silná (heavy). Místo kontaktních souprav, které jsou velmi drahé, můžeme použít takzvané kontaktní agary na Petriho miskách, které jsou běžně vyráběny např. společností LMS Jaroměř, ČR. Počty KTJ na plotně spočítáme a přepočteme na 1 cm<sup>2</sup> nebo na 100 cm<sup>2</sup> zkoumané plochy.

### 6.3. Praktické výstupy pro chovatele a odbornou veřejnost

Chovy skotu můžeme rozdělit podle jejich zaměření na chovy určené k masné produkci a chovy k produkci mléčné. Dle našich zkušeností se masné chovy nepotýkají s tak velkými problémy jako ty mléčné díky rozdílné technologii chovu a rovněž výživě. U masných chovů je velká část produkce realizována pastevním způsobem a zvířata jsou tak podstatně silnější a imunitně odolnější vůči různým inzultům a jsou také otužilejší. Chov zvířat ve venkovním prostředí má také tu výhodu, že zde nedochází ke koncentraci tak velkého množství mikroorganismů na malé ploše, jako je tomu u stájového chovu. U masného skotu se můžeme setkávat především s onemocněními končetin a onemocnění očí (infekční keratokonjunktivitida neboli IKKS), u stájové produkce také s respiračními problémy a méně často i s metabolickými onemocněními a vzácně i s intoxikacemi. U dojeného skotu je situace poněkud odlišná. Do hry vstupuje v první řadě mléčná žláza, která je nejslabším článkem zvířat z hlediska možné infekce a je z veterinárního hlediska takzvaným „*locus minoris resistentiae*“, tedy nejslabším článkem zdraví zvířete. Občas bývají u dojeného skotu zaznamenávána metabolická onemocnění,

jakými jsou acidóza, alkalóza nebo ketóza. Z dalších problémů se u dojeného skotu můžeme setkat s poporodními infekcemi pohlavního aparátu, respiračními nebo průjmovými onemocněními a to především u telat a mladého skotu. U dospělého skotu bývají zažívací problémy spojeny se závažnými onemocněními, jakými jsou paratuberkulóza, bovinní virová diarrhoea (BVD) nebo vzácně salmonelóza. V některých případech bývají problémem i onemocnění pohybového aparátu, zejména paznehtů a kůže, měkkých tkání a kostí distálních (dolních) částí končetin. Z toho můžeme odvodit, jaká preventivní a profylaktická opatření bychom měli volit:

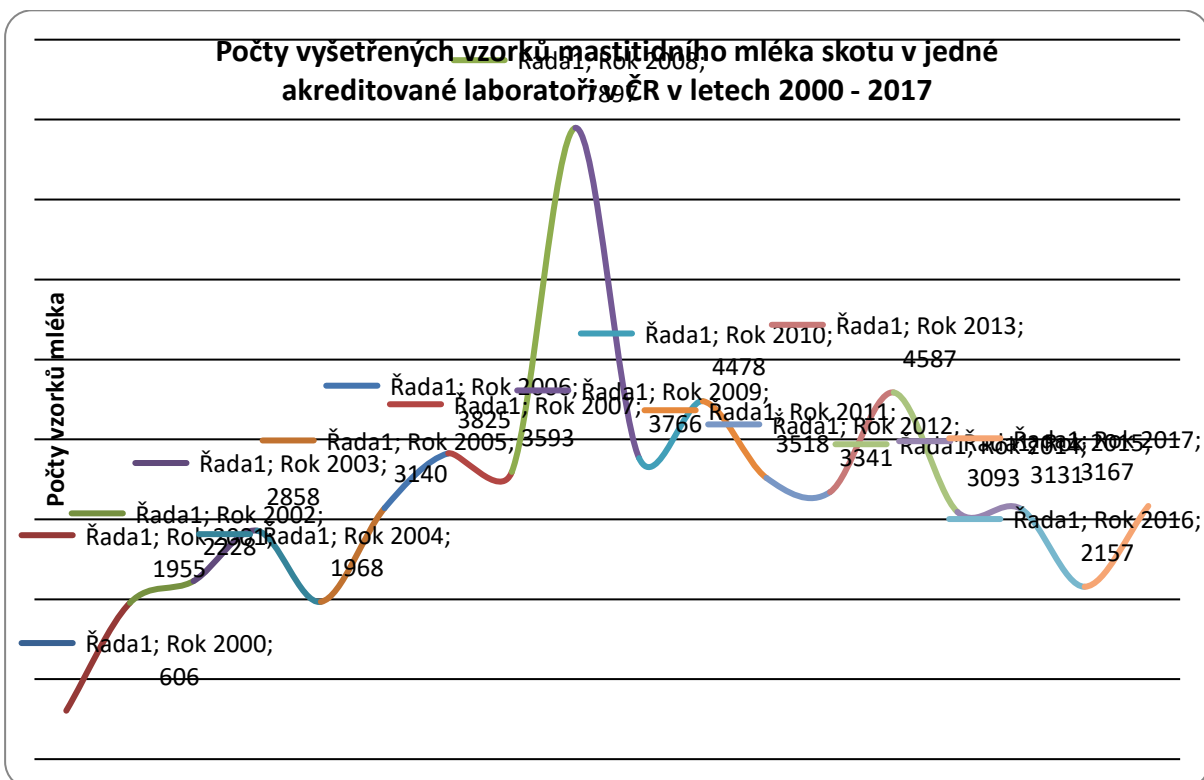
- Mikrobiologická kontrola kvality mléka a diagnostika onemocnění mléčné žlázy
- Mikrobiologické testy účinnosti dezinfekce mléčné žlázy
- Mikrobiologická kontrola prostředí stáje a dojírny
- Mikrobiologická vyšetření telat se zdravotními problémy
- Mikrobiologická diagnostika problémů s pohybovým aparátem
- Metabolické testy v případě zdravotních problémů

### **6.3.1. Mikrobiologická kontrola kvality mléka a diagnostika onemocnění mléčné žlázy**

Za tímto účelem byla věnována velká pozornost naší publikace právě mléčné žláze. Laboratorní část této publikace je pro chovatele nejspíše trochu abstraktní a neuchopitelná a tak se mohou ptát, jak předchozí informace dát do kontextu s chovatelskými problémy a jak veškeré informace využít v praxi. Tato část naší publikace byla původně zpracována pro chovatele skotu v rámci námi řešeného projektu č. QK22020292. Uvedené metodiky měly být používány k ověřování účinnosti dezinfekčních přípravků sloužících k ošetření vemene dojníc před a po dojení a také k mikrobiologickému monitoringu povrchu vemene, prostředí a zařízení stájí, které mohou mít vliv na hygienu a kvalitu získávaného mléka. Tyto postupy čerpaly z českých státních norem (ČSN), metod publikovaných v zahraničních odborných časopisech a na jejich základě byly vytvořeny i vlastní metodiky. Důsledné udržování hygieny ve stájích a na dojárně mohou mít dopad na zdraví zvířat a tím i ekonomiku chovu, zdravá zvířata nevyžadují antibiotickou intervenci a ruku v ruce s tím nedochází ke kontaminaci životního prostředí zbytky antimikrobních látek a nedochází k tvorbě a šíření bakteriálních kmenů odolných vůči těmto látkám jak ve zvířecí, tak v lidské populaci i v prostředí, ve kterém žijeme, ale o tom již byla zmínka v Úvodu.

Podívejme se na některá fakta, která jasně ukazují, že hygiena je alfou i omegou každého úspěšného chovu zvířat a jako příklad vezměme mikrobiologickou kvalitu mléka. Po roce 1989 došlo v České republice k naprostému kolapsu v mikrobiologických kontrolách mléka, ve státní sféře zanikly funkce takzvaných laktologů, kteří dohlíželi na zdraví mléčné žlázy a byli jakýmisi garanty mikrobiologické nezávadnosti a kvality získávaného mléka. Tito lidé začali být považováni za zbytečné, jejich místa v rámci úspor byla zrušena a veškeré laboratorní analýzy mléka v porevoluční euforii byly velmi omezeny. Na to navazovalo snížení počtu vyšetřovaných vzorků mléka spojené s jistými ekonomickými úsporami a většina chovatelů začala zapomínat na staré rčení, že prevence je lepší než léčba. Desetiletí nečinnosti přineslo

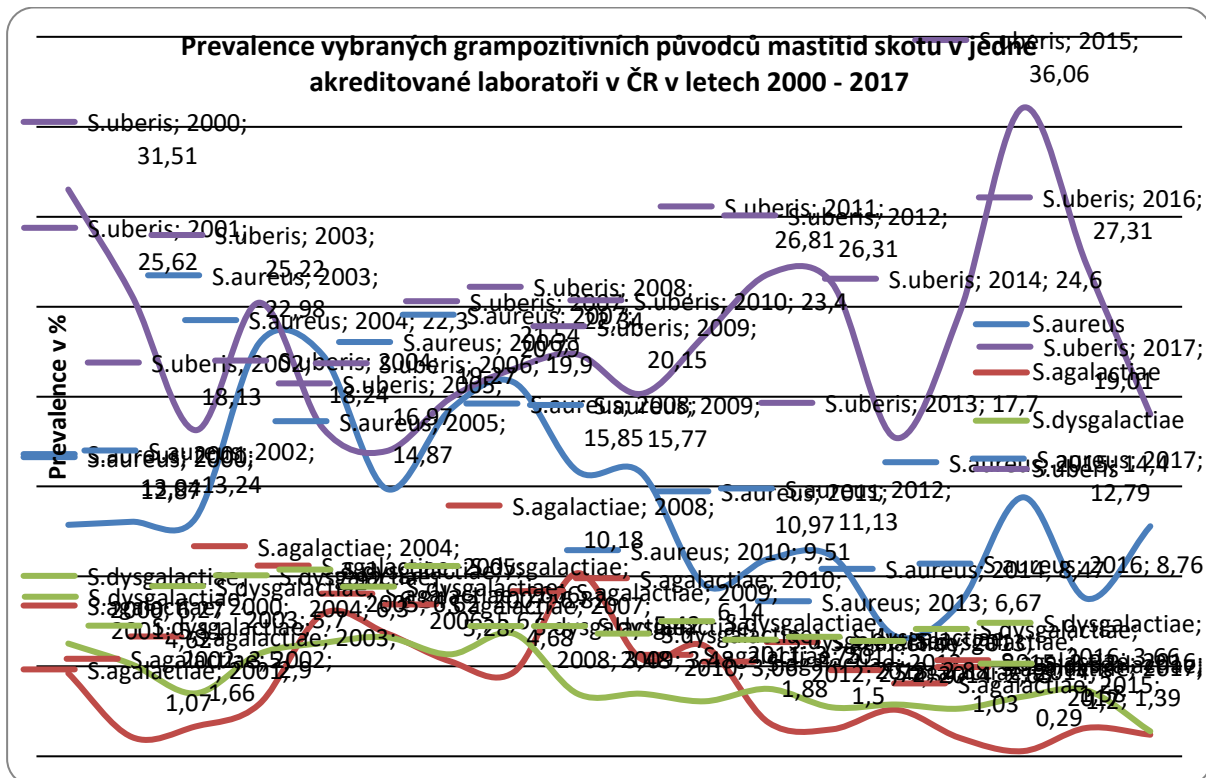
své trpké plody. Došlo k výraznému nárůstu výskytu takzvaných primárních patogenů mléčné žlázy, jako jsou *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus*, tedy zlatého stafylokoka a v důsledku nižších hygienických nároků rovněž i patogenů environmentálních, tedy těch, které pocházejí z prostředí, jako jsou *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella/Raoultella* spp. a také dnes obávaný *Streptococcus uberis*. Chovatele i veterináře tak čekala velmi studená sprcha, léta těžké práce a sbírání zkušeností v zahraničí. Teprve se vstupem do nového milénia se začala situace stabilizovat, chovatelé i praktičtí veterinární lékaři pochopili, že bez přesné a přísně stanovených hygienických mantinelů, bez laboratorních analýz při zvyšující se užitkovosti dojnic to zkrátka nepůjde. Připomeňme, že dojnice, která před rokem 1989 za laktaci vyprodukovala 2500 litrů mléka, byla velmi výkonnou, zasloužilou a považovanou matkou a dojnice, která se dožila 5. laktace rovněž.



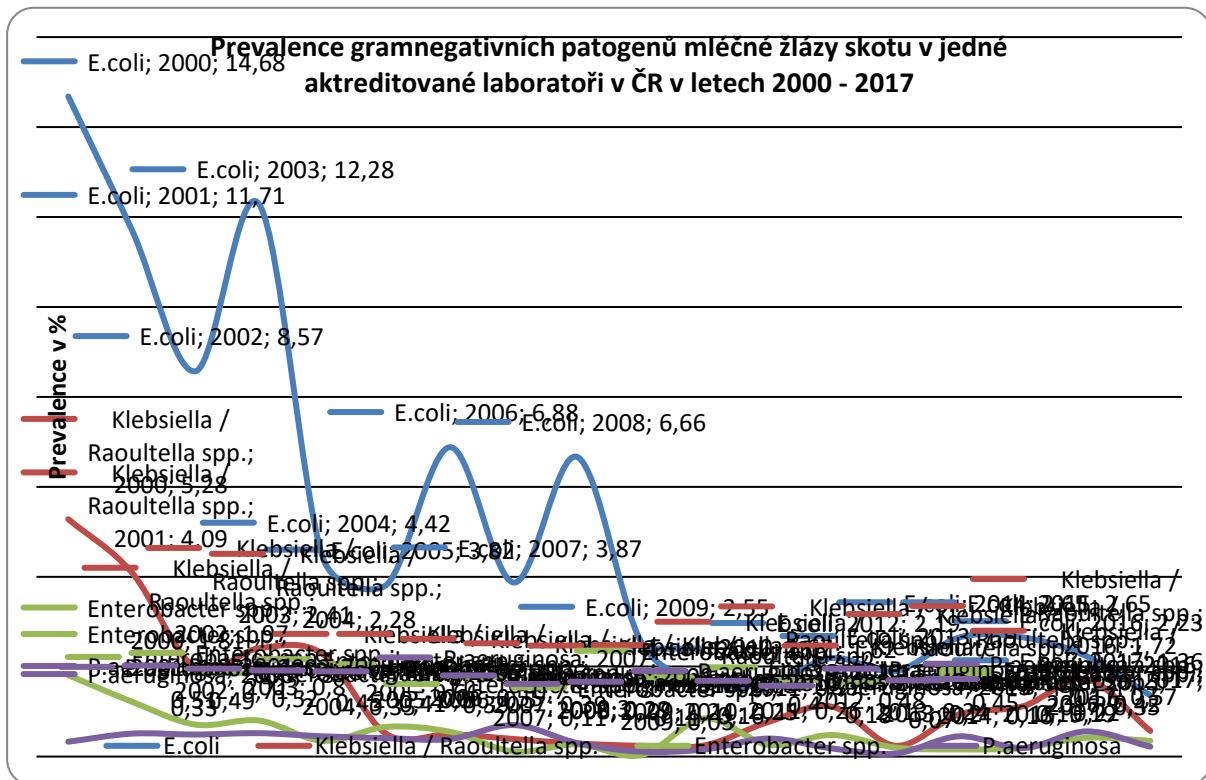
**Graf 1:** *Počty vyšetřených vzorků mastitidního mléka skotu v jedné akreditované laboratoři v ČR v letech 2000 - 2017. Po roce 2000 je markantní nárůst počtu vzorků, který graduje po roce 2004, kdy ČR vstoupila do EU a přijala nové hygienické standardy v prvovýrobě mléka. Po roce 2013 je patrný úbytek vzorků způsobený zřejmě nástupem stájové mikrobiologické diagnostiky (autor: j. Bzdil).*

Je obecně známo, že dnes je u dojnic věk 5 let věkem průměrným a průměrná dojivost vysoce přesahuje 8000 litrů za laktaci a to při krmení senážemi, silážemi, senem a trochou jádra, což je možné považovat za zázrak. Vraťme se však k mikrobiologické kvalitě mléka a k mastitidám. Již v devadesátých letech se objevují v našich chovech dojného skotu první sofistikované dipy k ošetření struků a hygiena dojení se začíná zlepšovat, v novém tisíciletí nastupuje éra robotického dojení. V roce 2004 vstupuje Česká republika do Evropské unie (EU) a požadavky na kvalitu mléka a jeho prvovýrobu dále stoupají. Do hry dále vstupuje takzvaná stájová diagnostika původců mastitid. Podívejme se na následující grafy, které ukazují vývoj počtů

laboratorně vyšetřovaných vzorků mléka a dokumentují výskyt jednotlivých skupin původců mastitid v průběhu 18 let od počátku nového tisíciletí. Na křivce **Grafu 1** lze pozorovat 3 zlomové okamžiky. Po roce 2000 je markantní nárůst počtu vzorků, který graduje po roce 2004, kdy ČR vstoupila do EU a přijala nové hygienické standardy v prvovýrobě mléka. Po roce 2013 je naopak patrný úbytek vzorků způsobený zřejmě nástupem stájové mikrobiologické diagnostiky. Ten se však v dalších letech již stabilizoval. **Graf 2** ukazuje pokles prevalence grampozitivních patogenů, tedy procenta pozitivních nálezů z celkového počtu vyšetřených vzorků. U *S. aureus*, *S. agalactiae* a *S. dysgalactiae* je patrný pokles prevalence ve sledovaném období, zatímco *S. uberis* stále osciluje mezi 16,97 % a 36,6 %. *S. uberis* se tak v dnešní době stává poměrně obávaným environmentálním (prostředovým) původcem mastitid u skotu, což může být dáno jeho schopností tvořit odolná pouzdra a takzvaný biofilm, který umožňuje tomuto mikroorganismu snadno přežít v prostředí stáje i na povrchu těla zvířete a propůjčuje původci i zvýšenou rezistenci k antimikrobním látkám i biocidům.



**Graf 2:** Prevalence vybraných grampozitivních původců mastitid skotu v jedné akreditované laboratoři v ČR v letech 2000 - 2017. U *S. aureus*, *S. agalactiae* a *S. dysgalactiae* je patrný pokles prevalence ve sledovaném období, *S. uberis* stále osciluje mezi 16,97% a 36,6% (autor: J. Bzdil).



**Graf 3:** Prevalence gramnegativních patogenů mléčné žlázy skotu v jedné akreditované laboratoři v ČR v letech 2000 - 2017. Ve všech případech můžeme sledovat pokles prevalence s výjimkou *P. aeruginosa* (autor: J. Bzdil).

**Graf 3** pak ukazuje strmý pokles prevalence většiny gramnegativních původců s výjimkou *P. aeruginosa*, jehož význam v patogenezi mastitid je však zanedbatelný a indikuje spíše narušení imunitních bariér zvířete. Proto doporučujeme chovatelům zavedení pravidelné mikrobiologické kontroly mléčné žlázy a mléka. Každý chov by měl postupně projít preventivní mikrobiologickou kontrolou vzorků mléka všech zvířat alespoň jedenkrát, lépe dvakrát ročně. Posílat do laboratoře je možné čtvrtkové vzorky, půlové nebo směsné ze všech čtvrtí vemene najednou. Vzorky půlové nebo směsné mají tu nevýhodu, že se častěji kontaminují a výsledky vyšetření jsou pak nepoužitelná. U zachycených kmenů mikrobů je třeba pravidelně monitorovat citlivost vůči antimikrobním látkám a podle citlivostí pak provádět pravidelnou rotaci těchto medikamentů, pokud je nutné je používat. Pravidla odběru vzorků mléka byla publikována v odborných časopisech několikrát a odběry by měl zvládnout i dobře instruovaný chovatel sám (Bzdil 2003; Bzdil 2012).

Velmi dobrými pomocnými prostředky kontroly mikrobiologické kontaminace mléka je stájová kultivace, která je určena pro rychlou a orientační kontrolu mikrobiomu vemene a jeho změn. Nález je však vždy ověřovat odborníky prostřednictvím fundovaných laboratorních vyšetření.

### 6.3.2. Mikrobiologické testy účinnosti dezinfekce mléčné žlázy

Další otázkou je spektrum účinnosti dezinfekčních prostředků (biocidů) určených k ošetření vemene před a po dojení a distribuovaných ve formě takzvaných dipů. Mnozí chovatelé se diví,

že po určité době používání jakoby některé dipy přestávaly účinkovat. Tento fenomén může mít několik důvodů. Mezi ně patří skladování používaných prostředků v nevhodných podmínkách, ztráta účinnosti v důsledku prošlé expirace biocidu, chybné ředění před použitím, dlouhá doba od ředění nebo smíchání jednotlivých složek prostředku nebo nevhodný způsob aplikace. V úvahu přichází i vznik rezistence některých mikroorganismů vůči účinným látkám, které jsou v dipech obsaženy. Tyto případy jsou již v literatuře popsány (Köjljalg et al. 2002). Krom toho bychom měli brát v úvahu také spektrum účinnosti účinných látek obsažených v dipech. Například Fitzpatrick et al. (2021a) prokázali při testování 96 různých biocidů, že skupina přípravků obsahujících chlordioxid (oxid chloričitý) vykazovala největší zóny inhibice u tří testovaných bakteriálních kmenů *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* a *Escherichia coli*, zatímco individuální biocidní produkt obsahující kombinaci kyseliny mléčné a peroxidu vodíku nejlépe působil pouze u kmenů *S. aureus* a *S. uberis*. Jiný konkrétní produkt ze skupiny preparátů na bázi oxidu chloričitého pak vykazoval největší zóny inhibice u kmenů *E. coli*. Je proto nezbytné občas namátkově kontrolovat ošetřovatele, jak prostředky ředí a jakým způsobem je používají a pravidelně je v tomto směru proškolovat. Mnoho chovatelů také neví, že je třeba provádět pravidelně i takzvanou rotaci (obměnu) používaných prostředků, abychom zabránili případnému vzniku rezistencí mikrobů. Dobrým zvykem je obměňovat tyto prostředky jedenkrát za dva měsíce. Nestačí však změnit jen výrobce a název prostředku, je třeba změnit především účinnou látku. Po dalších dvou měsících je možné se vrátit zpátky k původnímu dipu a v rotaci následně pokračovat za další dva měsíce. Podrobně jsou kontroly účinnosti biocidů realizovány prostřednictvím metodik uvedených v kapitolách 6.1. a 6.2.

Pokud se v chovu zvyšuje nebo stagnuje počet infekčních mastitid, je třeba provést odběr vzorků mléka, ty je potřeba nechat vyšetřit akreditovanou laboratoří a nechat stanovit i citlivost k antimikrobním látkám a provést komplexní šetření v chovu ve spolupráci s veterinárním lékařem. Jednou ze součástí šetření by mohlo být právě i laboratorní vyšetření účinnosti používaného dezinfekčního prostředku, nicméně **je potřeba se předem domluvit s laboratoří**, zda je schopna takovou analýzu provést, kolik vzorků je možné najednou zpracovat a domluvit se předem i na ceně vyšetření. To je také jedním z důvodů, proč čtenářům předkládáme tuto publikaci a její laboratorní část, která je návodem nejen pro ty, kteří budou provádět odběry vzorků, nýbrž i pro participující laboratoře. Laboratorní vyšetření účinnosti je dobré kromě referenčních kmenů provést také na kmenech, které byly nejčastěji izolovány v chovu samotném, abychom se přesvědčili, zda nedošlo ke vzniku stájevé rezistence. Mnozí chovatelé se nás občas dotazují, zda mohou vzorky k vyšetření odebírat sami. Samozřejmě, že to možné je, ale je nezbytné absolvovat proškolení a znát pravidla asepse, tedy sterilního odběru a balení vzorků, dále pravidel popisování vzorků, jejich transportu a také správného vyplnění žádanek. Většinou však vzorky odebírají veterinární lékaři, kteří jsou pro tuto činnost vzdělaní a kteří mohou navrhnout i efektivní řešení daného problému. Formuláře žádanek (objednávek) laboratorního vyšetření lze u každé slušné laboratoře najít na jejích internetových stránkách, případně na stránkách SVS Praha (viz Objednávka laboratorního vyšetření - vzor 1 nebo 2) (SVS Praha, 2024).

### 6.3.3. Mikrobiologická kontrola prostředí stáje a dojírny

Kontrola prostředí stájí a dojírny se provádí spíše jen v případech přetrvávajících problémů s kontagiózními (nakažlivými) mastitidami, nebo v případě neúměrného nárůstu mastitid neznámého původu a to s pomocí otisků či stěrů. Pátrat po přítomnosti původců mastitid tak můžeme i zde, nevyjímaje dojící zařízení. Lze provádět i porovnání počtů mikroorganismů před a po provedené dezinfekci a výsledky porovnávat. Metodiky jsou uvedeny v kapitole 6.2.3.1 - 6.2.3.4. Možné je provést i smyv z používaných látkových utěrek nebo mycích hub. Je obecně známo, že ty jsou téměř vždy bohatým zdrojem nejrozličnějších mikroorganismů. Takovéto materiály lze připravit nebo částečně zpracovat přímo na místě odběru za podmínek aseptiky. Materiál se vloží do sterilní nádoby a zalije se přesným množstvím fyziologického roztoku nebo pufrované peptonové vody podle toho, jaká vyšetření chceme provést. Materiál musí být zcela ponořen v tekutině. Nádobu uzavřeme víčkem, důkladně promícháme sterilním nástrojem (např. špachtlí, kovovou nebo plastovou tyčinkou atd. a necháme stát při pokojové teplotě asi 10 minut. Po této době materiál z nádoby vyjmeme sterilní pinzetou a před jeho vytažením z něj vytlačíme co nejvíce tekutiny. Výluh pak odešleme do laboratoře při transportní teplotě +4°C. Vyšetření se provede kvalitativním nebo kvantitativním způsobem v souladu s kapitolou 6.2.3.1. Výluh v tlumivé peptonové vodě používáme jen v případě detekce salmonel. Suspenze je důkladně promíchána a inkubována při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu  $18 \pm 2$  hod. Následně se provede selektivní pomnožení na semisolidní agar dle Rappaport - Vassiliadise (MSRV) po dobu  $24 \pm 3$  hod při  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Pipetou se pak odebere 0,1 ml inkubované PPV u stěny vzorkovnice z povrchové vrstvy tekutiny a naočkují se 3 jednotlivé kapky na povrch plotny ( $\varnothing$  140 mm), nebo po 1 kapce na 2 plotny ( $\varnothing$  90 – 100 mm). Plotny s MSRV se inkubují víčkem nahoru. Pozitivní nárůst se projeví zónou růstu a zákalem půdy s jasným okrajem. V případě, že je MSRV po  $24 \pm 3$  hodinách negativní, prodlužuje se inkubace o dalších  $24 \pm 3$  hodiny a teprve pak se přikročí k vyočkování na pevné půdy z okraje zákalu na MSRV na XLD a 1 další selektivní půdu dle vlastního výběru. Půdy musí být předeřhřaty na pokojovou teplotu a musí mít zavadlý povrch. Z okraje růstové zóny na MSRV se odebere kličkou (obj. 10  $\mu\text{l}$ ) z hloubky agaru materiál a naočkuje se obvyklým způsobem na povrch obou selektivních půd. Pokud není patrná zóna, odebere se materiál přímo z inokulovaného bodu. Agarové selektivní půdy se inkubují při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu  $24 \pm 3$  hodiny. Pozor na kolonie atypické (laktózopozitivní, bez sirovodíku, nebo v R-fázi růstu!). Diagnostika rodu, druhu a serovaru probíhá molekulárně (MALDI-TOF, PCR), biochemicky testy pro *Enterobacteriaceae* a sérologicky s pomocí O a H sér. Výsledky kultivací mohou být vyjádřeny kvalitativně (mikroorganismus je nebo není přítomen) nebo semikvantitativně na jeden až čtyři křížky podle intenzity nárůstu (kritéria hodnocení ukazuje opět **Tabulka 2**).

Je obecně známo, že mnozí z původců onemocnění mají schopnost tvořit takzvaný biofilm a udržovat svou populaci ve stáji i v extrémních podmínkách a dokonce i při používání velmi účinných dezinfekčních prostředků zahřátých na teplotu 60 - 80°C. Zvláštní součástí kontroly kvality prostředí chovu by mělo patřit také průběžné vyšetřování drobných domácích i volně žijících hlodavců na pastvinách. Tito drobní hlodavci mohou být rezervoáry a přenašeči nejrozličnějších onemocnění, jako jsou salmonelóza, leptospiróza, jersinióza a dalších. V chovech na území ČR bývají často detekovány především protilátky proti různým serovarům leptospir. U pastevního skotu bychom rádi připomněli, že volně žijící hlodavci bývají také hostiteli a přenašeči zoonotických nákaz (přenositelných ze zvířat na člověka), jako jsou brucelóza nebo

tularémie. Z vlastní zkušenosti můžeme uvést případ chovatele z jižní Moravy, který si v době kalamitního výskytu hraboše polního (*Microtus arvalis*) nechal z vlastní iniciativy vyšetřit 10 odchycených hlodavců z pastvin, kde choval pastevní skot a u šesti z těchto hlodavců byla zachycena z orgánů *Brucella suis* (prevalence 60%), která je snadno přenosná i na člověka.

#### 6.3.4. Mikrobiologická vyšetření telat se zdravotními problémy

Vyšetření telat a mladého skotu vycházejí z nejčastějších onemocnění těchto kategorií zvířat. Onemocnění bývají lokalizována nejčastěji v respiračním (dýchacím) aparátu a v trávicím traktu. Vyšetření respiračního traktu je založeno na klinickém vyšetření zvířete a odběru vzorků k laboratornímu vyšetření. K laboratorním analýzám se odebírají například výtěry z dutiny nosní, nosohltanu, sputum nebo bronchioalveolární laváže (BAL). Z nejčastějších původců respiračních onemocnění telat a mladého skotu lze jmenovat především *Pasteurella multocida*, *Hitophilus somni*, *Mycoplasma* spp., případně různé druhy virů. Při onemocnění trávicího traktu se po klinickém vyšetření a posouzení anamnestických dat nejčastěji za účelem laboratorní diagnostiky odebírají rektální výtěry nebo čerstvý trus a vyšetření je zaměřováno nejčastěji na *Salmonella* spp., patogenní kmeny *E. coli*, *Yersinia* spp., *Clostridium* spp. případně viry nebo parazity. V případě anaerobních infekcí způsobených například *Clostridium* spp. je indikováno anaerobní vyšetření výtěrů z konečníku nebo lépe trusu. Vyšetření je dobré provést kvantitativním způsobem a určit i počet klostridií v 1 g materiálu. Izolované původce je třeba i specifikovat například molekulárně biologickými metodami. Z našich zkušeností vyplývá, že vyšší počet CFU původce než 1000 na 1 g trusu a přítomnost faktorů virulence může být indikací k antimikrobní léčbě. Z parazitů bývají často diagnostikována kryptosporidia, giardie nebo kokcidie. Výše uvedená vyšetření a odběr materiálů by měl provádět veterinární lékař, který v souladu s anamnézou a klinickým obrazem přesně specifikuje zaměření a metodu laboratorního vyšetření. Preventivní vyšetření se provádějí nejspíše v období nepříznivé epizootologické situace nebo před transportem.

Chovatele je třeba upozornit, že trávicí problémy u malých telat mohou být zapříčiněny také způsobem krmení. Připomeňme, že napájení novorozených telat mlékem by mělo probíhat asi každé 2 hodiny. Pokud jsou zvířata napájena méně často, může se stát, že dojde následně k takzvanému „přepití“ a velké množství přijatého mléka najednou se ve slezu promění ve velkou sraženinu, která zabrání pasáži žaludečního obsahu dále trávicím traktem. Obsah žaludku pak rychle podléhá mikrobiálnímu rozkladu a následně dochází k septikémii a toxémii zvířete (tedy samootravě), které končí úhynem. Telata, kterým se podaří přežít, mívají pak mnohdy problémy s imunitním systémem, obzvláště pokud k nesprávnému krmení dochází v prvních 14 dnech po narození. Podobný problém může být vyvolán i napájením mlékem, které má nízkou teplotu. Obzvláště pro dobu dovolených a svátků, kdy si ošetřovatelé snaží ušetřit čas pro sebe, jsou tyto problémy typické. Je proto velmi žádoucí provádět namátkové kontroly ošetřovatelů a rovněž pravidelná školení na toto téma.

#### 6.3.5. Mikrobiologická diagnostika problémů s pohybovým aparátem

Tato onemocnění se mohou objevit v chovech, kde se neprovádí údržba paznehtů, nebo tam, kde je prováděna chybně. Dalším rizikovým faktorem je vlhké prostředí, vlhká hluboká podestýlka, zamokřené pastviny a přítomnost velkého množství anaerobních původců v prostředí. V současných chovech bývá nicméně tento problém méně významný.



Z onemocnění lze jmenovat záněty paznehtní škáry a kůže v meziprstí, méně často jsou to záněty kloubů a šlach v distální části končetin. Příčinou bývají nejčastěji anaerobní mikroorganismy z rodu *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Dichelobacter* spp., *Clostridium* spp. nebo *Staphylococcus aureus* ssp. *anaerobius*. Z aerobních mikroorganismů se setkáváme nejčastěji se *Staphylococcus aureus* nebo hemolytickými streptokoky. Po klinickém vyšetření a zjištění anamnestických údajů by měl veterinární lékař provést důkladné očištění a dezinfekci povrchu patologicky změněného místa, snést části rohové stěny nad patologickou lézí a odebrat z hloubky této léze stěr tamponem, který je třeba umístit do transportní půdy (např. systém Transbak - viz **Obrázek 11**). K anaerobnímu vyšetření je třeba vzorek doručit do laboratoře nejlépe v průběhu 2 hodin po odběru a ihned je zpracovat, protože anaerobní nesporeující mikroorganismy jsou velmi citlivé na přítomnost kyslíku a změny pH.

### 6.3.6. Metabolické testy v případě zdravotních problémů

Metabolické testy jsou indikovány v případě vyššího výskytu aseptických mastitid, při poklesu doживosti nebo plodnosti zvířat a je třeba je zaměřit na diagnostiku acidóz, alkalóz a ketóz. Přestože je výskyt těchto onemocnění dnes minimalizován úzkostlivou kontrolou a vyvažováním krmné dávky, mohou se tyto poruchy v některých chovech vyskytnout. Odběr materiálu by měl provádět veterinární lékař a pro biochemickou laboratoř by měly být odebrány bachorová tekutina, krev a moč nejméně z 5 - 10 kusů problémových zvířat. Laboratoř by měla vyšetřit pH bachorové tekutiny, krve i moči, dále stanovit v krvi ukazatele jako jsou například parciální tlak O<sub>2</sub>, parciální tlak CO<sub>2</sub>, standardní bikarbonát, base excess, ketony, glukóza, jaterní enzymy a také některé chemické prvky (Ca, P, Na, K), z moči pak navíc takzvaný čistý acidobazický výluček (ČABV), přítomnost ketonů, případně další ukazatele, jako jsou prvky (Ca, P, Na, K). V praxi jsme se v devadesátých letech setkali i chronickými otravami mykotoxiny, které indukovaly vznik aseptických mastitid nebo mastitid vyvolaných environmentálními původci.

## 7. Výpočty hodnot (povrchy a mléčná žláza)

### 7.1. Výpočty hodnot získaných při testech povrchů prostor, zařízení a mléčné žlázy

Při výpočtu CFU bereme v úvahu dva páry číselných hodnot ze dvou po sobě jdoucích ředění. Za číselné hodnoty bereme počty kolonií od 1 do 300 na jedné plotně. Hodnotu z nižšího ředění dosadíme do vzorce:

$$N (\text{CFU v 1 ml}) = \frac{N_1 + N_2}{2} \times D$$

přičemž N je skutečný počet CFU v 1 ml ředidla, do kterého byl proveden smyv nebo vytřepán stěr z daného materiálu/plochy. N<sub>1</sub> je počet CFU z první plotny a N<sub>2</sub> z druhé paralelní plotny nižšího ředění, kde byl počet kolonií číselný ≤ 300 CFU. D je ředění (10<sup>0</sup>, 10<sup>1</sup>.... 10<sup>6</sup>).

Stejným postupem vypočteme hodnotu z vyššího ředění. Obě výsledné hodnoty N z obou ředění sečteme, vydělíme 2 a dekadicky logaritmujeme (např. funkcí LOG v Excelu). Porovnáme hodnoty před dezinfekcí a po dezinfekci. U in vitro experimentů porovnáme hodnoty bez aplikace biocidu a po aplikaci. Pokud má být účinek biocidu přijatelný, musí být

rozdíl před a po dezinfekci 4 – 5 dekadických logaritmů, tedy 4 – 5 lg (viz platné normy ČSN EN a předchozí text).

### 7.1.1. Příklad výpočtu (povrchy a mléčná žláza)

V nultém ředění bylo napočítáno více než 300 CFU, prvním ředění bylo taktéž napočítáno více než 300 CFU, ve druhém ředění bylo na jedné plotně napočítáno 120 CFU, na druhé ve stejném ředění 140 CFU.

$$N \text{ (CFU v 1 ml)} = \frac{120 + 140}{2} \times 100$$

N je tedy 13000 CFU/1 ml pro ředění  $10^2$ .

Ve 3. ředění bylo na první plotně napočítáno 11 CFU a na druhé paralelní plotně 15 CFU.

$$N \text{ (CFU v 1 ml)} = \frac{11 + 15}{2} \times 1000$$

N je tedy opět 13000 CFU v 1 ml v ředění  $10^3$ .

Průměrné hodnoty v obou ředěních sečteme a vydělíme 2. Výsledek je 13000. Toto číslo logaritmujeme dekadickým logaritmem a zaznamenáme do tabulky.

## 7.2. Výpočty hodnot získaných při testech násadových vajec

### 7.2.1. Vysvětlivky a příklad výpočtu kontaminace

A) Z každého vzorku (tj. např. ze skořápky z vejce č. 1) byly udělány 2 ředící řady a to především z důvodu kontroly a replikace výsledků. Takto „zdvojeny“ byly všechny vzorky. První opakování u daného vzorku je tedy ve vzorci interpretováno jako N1 a druhé jako N2.

B) Vzorec v podobě rovnice:

$$KTJ \text{ (CFU vejce)} = \frac{N1 + N2}{2} \cdot D \cdot K$$

C) Stupeň ředění D ve vzorci můžeme uvést číslem, např.  $10^1$  jako 10,  $10^2$  jako 100 atd.

D) Výsledek se logaritmuje pomocí dekadického logaritmu. K výpočtu bývá využita funkce LOG v Excelu.

E) Hodnoty jsou uvedeny na celou skořápku – vejce byla omývána v roztoku v plastovém sáčku, ze kterého byla následně vyhotovena ředící řada (viz metodika v článku). Pro stanovení mikrobiální kontaminace podskořápečných blan byly blány z vajec odstraněny pomocí sterilní pinzety a vloženy do roztoku. Následný postup byl stejný jako u skořápky. Pro stanovení mikrobiální kontaminace bílku byl využit vnější řídký bílek, který byl odebrán pomocí injekční stříkačky (odebráno bylo vždy 5 ml). Aby byly výsledky co nepřesnější, do studie byla vybrána pouze vejce z hmotností kategorie M.

F) Pokud je na Petriho misce větší počet kolonií než 100 CFU, výsledek je zaznamenán do tabulky jako „n“ (viz **Tabulka 7**).

Skořápka																					
Genotyp	Vejce číslo	E. coli						Enterokoky						CPM							
		Ředění						Ředění						Ředění							
		10 <sup>1</sup>		10 <sup>2</sup>		10 <sup>3</sup>		10 <sup>0</sup>		10 <sup>1</sup>		10 <sup>2</sup>		10 <sup>2</sup>		10 <sup>3</sup>		10 <sup>4</sup>		10 <sup>5</sup>	
		N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2
Počty kolonií	1	n	n	42	60	5	14	1	0	1	0	0	0	n	n	45	46	7	6	1	0
	2	n	n	24	23	3	1	2	2	0	0	0	0	n	n	29	23	3	6	0	2

**Tabulka 7:** Příklad práce s vypočtenými hodnotami při měření kontaminace vajec (upraveno dle Kraus et al. 2021).

### 7.2.2. Pro stanovení mikrobiální kontaminace u prvního vejce pro EC tedy budeme postupovat následovně:

- A) Ředění 1 (10<sup>1</sup>) nám vychází obě Petriho misky přes 100, tudíž máme hodnotu „n“ takže ji nepoužijeme.
- B) U ředění 2 (10<sup>2</sup>) už hodnoty máme – za N1 dosadíme 42, za N2 dosadíme 60 a dle vzorce by nám mělo vyjít 510 000.
- C) U ředění 3 (10<sup>3</sup>) za N1 dosadíme 5 a za N2 dosadíme 14 a mělo by vyjít 950 000.
- D) Získané hodnoty sečteme 510 000 + 950 000 = 1 460 000.
- E) Celkovou hodnotu vydělíme 2 a to z důvodu, že jsme stanovovali 2 ředění (první ředění jsme nepočítali, protože máme v tabulce hodnoty „n“, ale pokud by místo „n“ byly číselné hodnoty, např. 99 a 95, tak je počítáme jako u ředění 2 a 3 a následně bychom v tomto kroku nedělili 2 ale 3. Jednoduše, stanovujeme průměr. Tím pádem se v tomto případě dostáváme na hodnotu 730 000 (1 460 000 : 2).
- F) Jako poslední krok tedy zadáme dekadický logaritmus (pomocí funkce LOG v Excelu) výsledku LOG 730 000 = 5,86332, což je tedy naše finální hodnota pro první vejce, pro kontaminaci skořápky EC.

### 7.2.3. Statistické vyhodnocení výsledků

Počty mikroorganismů z jednotlivých materiálů z vajec z podestýlky a z vajec z hnízd jsou zaznamenávány průběžně do tabulek a statisticky jsou porovnány hodnoty pro materiály z vajec z podestýlky a z hnízd a s pomocí výpočtů je vytvořen závěr, zda se počty mikroorganismů statisticky průkazně v obou skupinách materiálů liší. Podobně jsou

porovnány nálezy z kadaverů rodičů, podestýlky, stěrů z prostředí, stěrů z hnízd, aby bylo možné udělat syntézu informací a vysledovat souvislosti. Porovnájí se dále hodnoty uniformity a klinický stav kuřat nalíhnutých z vajec z podestýlky a z hnízd, pokud to je možné a chov je následně pravidelně pozorován. Zaznamenávají jsou jakékoliv zdravotní problémy a případné aplikace různých látek, jako jsou vitaminy, minerály, okyselovadla a především antimikrobika včetně antikokcidik, která mohou mít také antibakteriální účinky. Je vhodné s pomocí genotypizace popsat u jednotlivých druhů (rodů nebo skupin) mikroorganismů mechanismy rezistencí, resp. geny pro ně. Pokud to jde, měly by být popsány všechny faktory s možnou interferencí a ovlivněním pokusu, například charakteristika chovu, typy podestýlky, stáří hejna nosnic, plemeno nosnic, celkově charakteristika farmy i stran používaných dezinfekčních prostředků, kvalita napájecí vody (fekální znečištění!).

## 8. Závěr

Naše publikace byla původně určena chovatelům mléčného skotu a drůbeže a laboratořím, které poskytují těmto chovům servis za účelem kontroly hygieny dojení a zoohygieny. V průběhu jejího zpracování se však ukázalo, že by mohla stejně dobře posloužit i jiným zemědělským provozům, chovatelům ovcí, koz, koní, prasat, zvířat v zájmových chovech, výrobcům potravin a některým průmyslovým provozům ke stejnému účelu. Domníváme se, že by stejně dobře mohla posloužit i středním odborným školám, univerzitám a vědeckým pracovištím a dokonce i humánním laboratořím, nemocnicím a dalším subjektům.

První část této práce zabývající se testováním mikrobiologické zátěže prostor podniků produkcí násadových vajec a kuřata nastínila ucelený systém hygienické kontroly těchto zařízení. Žádná předchozí publikace takovéto informace doposud neposkytla. Jak již bylo řečeno, nízká kvalita násadových vajec a následně i kuřat je hlavní příčinou zdravotních problémů a následných ztrát v drůbežářské praxi.

V druhé části práce se nám podařilo zjednodušit některé metody testování mikrobiologické zátěže povrchů stanovené ČSN EN normami a vytvořit i své vlastní metodické postupy například pro testování měkkých porézních povrchů. V rámci našeho projektu zabývajícího se hygienou mléčné žlázy se nám v testech účinnosti dezinfekčních látek používaných na dezinfekci vemene v průběhu dojení (mamárních biocidů, dipů) dobře osvědčila diluční plotnová metoda MIC, zatímco publikované mikrodiluční metody stanovení MIC a disková difúzní metoda se ukázaly jako problematické.

Domníváme se, že důsledné dodržování pravidel zoohygieny a hygieny dojení i zoohygieny ve všech chovech zvířat může udržet v dobré kondici jejich imunitní systém, účinně snížit výskyt onemocnění a následně snížit množství aplikovaných antimikrobních terapeutik. To se následně může odrazit i na ekonomických úsporách, zvýšení konkurenceschopnosti zemědělských podniků a v neposlední řadě i na zdraví lidské populace a ekosystému. Věříme, že naše publikace by mohla v některých ohledech přispět také k ukončení staletí trvající „války se Zemí“ (Šmajš a Herafilm, 2023).

V souvislosti s účinnými látkami obsaženými v dezinfekčních prostředcích chceme apelovat na vědecká pracoviště a společnosti, která se zabývají antimikrobními látkami a vznikem mikrobiálních rezistencí vůči nim, aby se pokusila stanovit a veřejně publikovat oficiální

referenční hodnoty minimálních inhibičních koncentrací a/nebo inhibičních zón těchto látek podobně, jako je tomu v případě antibiotik. Na jejich základě by bylo možné porovnávat údaje a predikovat, kdy a v jakých koncentracích budou tyto látky ještě účinné a kdy ne. Pak by bylo možné také porovnávat zjištěné hodnoty, identifikovat rezistentní kmeny mikroorganismů, definovat genomický podklad těchto rezistencí, zabývat se mechanismy jejich vzniku a šíření a také zkoumat souvislosti mezi antimikrobní rezistencí a rezistencí vůči dezinfekčním prostředkům.

## 9. Přílohy

### Složení pracovních roztoků a půd:

#### A) Sterilní univerzální inaktivační roztok (neutralizační roztok):

lecitin (sojový, nejčistší)	3 g
polysorbát 80 (Tween 80)	30 ml
thiosíran sodný	5 g
L-histidin	1 g
fosfátový pufr pH 7,2 ± 0,2	10 ml
destilovaná voda	ad 1000 ml

Po dobu 20 minut autoklávovat při 121°C!

#### B) Inaktivační roztoky pro jednotlivé dezinfekční látky:

a) chlor uvolňující látky	0,5 % thiosíran sodný
b) oxidující látky	0,7 % thiosíran sodný
c) organické Zn látky	3,0 % tween 80
	3,0 % lecitin
	0,1 % cysteinu
d) aldehydy	0,1 % l-histidinu
e) těžké kovy org. nebo anorg. vázané	3,0 % tween 80
	0,1 % cysteinu
f) fenol a jeho deriváty	1,0 % tween 80
g) KAS a amfotenzidy	3,0 % tween 80
h) chlorhexidin	0,3 % lecitin

#### C) Zředovací (ředící) roztok:

trypton, pankreatický hydrolyzát kaseinu	1 g
NaCl	8,5 g
Destilovaná voda	ad 1000 ml

Sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut, pH po sterilizaci musí být na hodnotách 7,2 ± 0,2.

#### D) Roztok pro imitaci nízkého organického znečištění povrchů v humánní sféře (interferenční roztok):

bovinní albumin frakce V pro mikrobiologii	3 g
--	-----

zředovací nebo fyziologický roztok 1000 ml

Sterilizuje se membránovou filtrací. Konečná koncentrace albuminu v testovací směsi musí být 0,3 g/l.

E) Roztok pro imitaci nižšího organického znečištění ve veterinární sféře v testování přípravků určených k dezinfekci povrchů a struků před dojením (interferenční roztok):

bovinní albumin frakce V pro mikrobiologii	30 g
zředovací nebo fyziologický roztok	1000 ml

Sterilizuje se membránovou filtrací. Konečná koncentrace albuminu v testovací směsi musí být 3 g/l.

F) Roztok pro imitaci vyššího organického znečištění povrchů v humánní sféře (interferenční roztok):

bovinní albumin frakce V pro mikrobiologii	30 g
zředovací nebo fyziologický roztok	970 ml

Sterilizuje se membránovou filtrací. Konečná koncentrace albuminu v testovací směsi musí být 0,3 g/l. Pak se přidá 30 ml sterilních ovčích erytrocytů. Konečná koncentrace albuminu v testovací směsi musí být 3 g/l a erytrocytů 3 ml/l.

G) Roztok pro imitaci organického znečištění ve veterinární sféře při testování přípravků k dezinfekci struků po dojení (interferenční roztok) :

sušené mléko bez antimikrobik a přísad	100 g
destilovaná voda	1000 ml

Sterilizuje se 5 minut v autoklávu při 121°C. Konečná koncentrace mléčného pudru v testovací směsi musí být 10 g/l.

H) Roztok pro imitaci vyššího organického znečištění povrchů ve veterinární sféře (interferenční roztok):

kvasničný extrakt	50 g
destilovaná voda	150 ml

Ingredience promísíme ve volumetrické lahvi a po opadnutí pěny doplníme destilovanou vodou po značku na lahvi. Autoklávujeme 15 minut při 121°C. Po vychladnutí na 20°C odebereme 25 ml této suspenze do volumetrické lahve o objemu 50 ml, přidáme 10 ml destilované vody a přidáme 5 g bovineho albuminu frakce V, promícháme a počkáme, až spadne pěna. Přidáme destilovanou vodu po značku na lahvi. Sterilizujeme membránovou filtrací. Konečná koncentrace kvasničného extraktu a albuminu v testovací směsi musí být po 10 g/l.

I) Roztok pro imitaci organického znečištění porézních povrchů ve veterinární sféře (interferenční roztok):

bovinní albumin frakce V pro mikrobiologii	0,6 g
sterilní destilovaná voda	90 ml

Vše rozpustíme ve volumetrické lahvi o objemu 100 ml a po rozpuštění dolijeme po značku 100 ml destilovanou sterilní vodou. Sterilizujeme membránovou filtrací. Finální koncentrace albuminu v testech by měla být 3 g/l.

J) Trypton sojový bujón (TSB):

je dodáván výrobcí půd ve zkumavkách nebo lahvičkách

trypton, pankreatický hydrolyzát kaseinu	17 g
sojový pepton, papainový hydrolyzát sojové moučky	3 g
NaCl	5 g
Hydrogen fosforečnan draselný	2,5 g
Glukóza	2,5 g
destilovaná voda	ad 1000 ml

Sterilizujeme v autoklávu 15 minut při 121 °C. Výsledné pH při 20°C by mělo být  $7,3 \pm 0,2$ . Mícháme se stejným množstvím neutralizačního roztoku.

K) Trypton sojový agar (TSA):

je dodáván výrobcí mikrobiologických půd na plotnách

trypton, pankreatický hydrolyzát kaseinu	15 g
sojový pepton, papainový hydrolyzát sojové moučky	5 g
NaCl	5 g
agar	15 g
destilovaná voda	ad 1000 ml

Sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut, výsledné pH musí být  $7,2 \pm 0,2$ .

L) Fyziologický roztok s peptonem

pepton	1 g
NaCl	9 g
Destilovaná voda	ad 1000 ml

Sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut, pH po sterilizaci musí být na hodnotách  $7,2 \pm 0,2$ .

M) Tvrdá voda

Roztok A:

MgCl <sub>2</sub>	19,84 g
CaCl <sub>2</sub>	46,24 g

Obě látky se rozpustí v menším množství vody a doplní do 1000 ml a roztok se sterilizuje membránovou filtrací nebo autoklávováním. Užívá se nejdéle 1 měsíc, uchová se v chladničce.

Roztok B:

NaHCO <sub>3</sub>	35,2 g
--------------------	--------

Vše se rozpustí v menším množství vody a dolije se do 1000 ml, sterilizuje se membránovou filtrací. Užívá se nejdéle 1 týden, uchová se v chladničce.

Do 600 až 700 ml vody se přidá 6 ml roztoku A a 8 ml roztoku B a dolije se do 1000 ml vodou, dobře se promíchá. pH se upraví na  $7,0 \pm 0,2$  s pomocí HCl nebo NaOH. Vznikne finální tvrdá voda.

## 10. Seznam zkratek

APW	Andrade Peptone Water
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bronchioalveolární laváž
BPW	Buffered Peptone Water
BVD	Bovinní virová diarrhoea
°C	Stupeň Celsia
CAPM	Collection of Animal Pathogenic Microorganisms při VÚVL Brno
CCM	Czech Collection of Microorganisms při Masarykově univerzitě Brno
CFU	Colony Forming Units
CNCTC	Czech National Collection of Type Cultures
CPM	Celkový počet mikroorganismů
ČR	Česká republika
ČSN	Česká státní norma
ENT	Enterokoky
EC	<i>Escherichia coli</i>
EN	Evropská norma
EU	Evropská unie
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GDPR	General Data Protection Regulation
JDK	Jednodenní kuře
KAS	Kvarterní amoniové sloučeniny
KTJ	Kolonie tvořící jednotka
i. e.	Tedy
IKKS	Infekční keratokonjunktivitida skotu
<i>In vitro</i>	V laboratorních podmínkách
<i>In vivo</i>	V terénních podmínkách
JDK	Jednodenní kuřata
l	litr
LOG, lg	Dekadický logaritmus
LMS s.r.o.	LabMediaServis s.r.o. Jaroměř, výrobce mikrobiologických půd
MALDI-TOF MS Spectrometry	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
MBC	Minimum Bactericidal Concentration



MHA	Mueller-Hinton Agar
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
mg	miligram
µg	mikrogram
ml	mililitr
µl	mikrolitr
MPKA	Masopeptonový krevní agar
MRD	Maximum Recovery Diluent
MSRV	Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis
např.	Například
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCH	Produkční chov
pH	Koncentrace vodíkových iontů, kyselost
PPV	Pufrovaná peptonová voda
RCH	Rodičovský chov
RK	Referenční kmen
RLM	Rapid´L .mono agar
TNM	Total Number of Microorganisms (celkový počet mikroorganismů)
TSA	Trypton sójový agar
TSB	Trypton sójový bujón
sec	sekunda, vteřina
SOP	Standardní operační postup
UCH	Užitkový chov
UV záření	Ultrafialové záření
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate agar
Zn látky	Organické sloučeniny zinku

## 11. Reference

BZDIL, Jaroslav. *Mikrobiologické metody vyšetření klinických, patologických a environmentálních materiálů. Standardní operační postup SOP 01/21, Ptácy s.r.o. Valašská Bystřice, Česká republika, 2021. s. 1-11. (interní dokument, nepublikováno).*

BZDIL, Jaroslav. Slovo k odběru vorků mléka k bakteriologickému vyšetření, *Náš chov*, vol. 63 (2003), no. 3, s. 28-29.

BZDIL J.: Informace k odběrům vzorků mléka k bakteriologickému vyšetření. *Veterinářství*, vol. 62(2012), no. 1, s. 48-49.

ČSN EN 1040:2006. *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku dezinfekčních přípravků a antiseptik – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1).*

ČSN EN 14349:2013. *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní povrchová zkouška ke stanovení baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v oblasti veterinární péče na neporézních površích, bez mechanického působení – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2, stupeň 2).*

ČSN EN 13727+A2:2016. *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení baktericidní aktivity v oblasti zdravotnictví - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2 / stupeň 1).*

ČSN EN 1656:2020. *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška v suspenzi pro hodnocení baktericidní aktivity chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných ve veterinární oblasti – Zkušební metody a požadavky (fáze 2 / stupeň 1).*

ČSN EN 16437+A1:2020. *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní povrchová zkouška ke stanovení baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v oblasti veterinární péče na porézních površích, bez mechanického působení – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2, stupeň 2).*

ČSN ISO 690:2022. *Bibliografické citace*

ENGLMAIEROVÁ, Michaela; TUMOVÁ, Eva; CHARVÁTOVÁ, Vlasta a SKŘIVAN, Miloš. Effects of laying hens housing system on laying performance, egg quality characteristics, and egg microbial contamination. *Czech Journal of Animal Science*, vol. 59(2014), no. 8, s. 345-352. ISSN 1212-1819.

HASSELMANN, Chris. EUCAST (2000) Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 6 (2000), no. 5, s. 1-7. eISSN 1469-0691.

FITZPATRICK, Sarah Rose; GARVEY, Mary; JORDAN, Kieran; FLYNN, Jim; O'BRIEN Bernadette a GLEESON David. Screening commercial teat disinfectants against bacteria isolated from bovine milk using disk diffusion. *Veterinary World*, 12 (2019), no. 5, s. 629-637. ISSN 0972-8988.

FITZPATRICK, Sarah Rose; GARVEY, Mary; FLYNN, Jim; O'BRIEN Bernadette a GLEESON David. Evaluating the effectiveness of commercial teat disinfectant products sold in Ireland using the disc diffusion method. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, vol. 60 (2021a), no. 1, s. 78-90. ISSN 0791-6833.

FITZPATRICK, Sarah Rose; GARVEY, Mary; FLYNN, Jim; O'BRIEN Bernadette a GLEESON David. The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. *Irish Veterinary Journal*, vol. 74 (2021b), no. 1, s. 1-12. eISSN 2046-0481.

CHOTIGARPA, Rinrada; LAMPANG, Kannika Na; PIKULKAEW, Surachai; OKONOGI, Siriporn; SILMAN, Pirote a MEKTRIRAT, Raktham. Antiseptic effect of natural teat dip containing lactic acid against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary World*, vol. 12 (2019), no. 3, s. 397-401. ISSN 0972-8988.

KÖLJALG, Siiri; NAABER, Paul a MIKELSAAR, Marika. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *Journal of Hospital Infection*, vol. 51(2002), no. 2, s. 106-113. ISSN 0195-6701.

KRAUS, Adam; ZITA, Lukáš; KRUNT, Ondřej; CHODOVÁ, Darina; OKROUHLÁ, Monika a KRAWCZYK, Jozefa. Do the differences in egg contamination, penetration, and resistance against microorganisms among the hen genotypes exist? *Annals of Animal Science*, vol. 22 (2021), no. 2, s. 561-574. ISSN 2300-8733.

KRUNT, Ondřej; ZITA, Lukáš; KRAUS, Adam; OKROUHLÁ, Monika., CHODOVÁ, Darina a STUPKA, Roman. Guinea fowl (*Numida meleagris*) eggs and free range housing: A convenient alternative to laying hens' eggs in terms of food safety? *Poultry Science*, vol. 100 (2021), no. 4: 101006. eISSN 1525-3171.

NICOLETTI, Giuseppe; BOGHOSSIAN, Vivian; GUREVITCH, F; BORLAND, Robert a MORGENROTH, Peter. The antimicrobial activity in vitro of chlorhexidine, a mixture of isothiazolinones ('Kathon' CG) and cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). *Journal of Hospital Infections*, vol. 23 (1993), no. 2, s. 87–111. ISSN 0195-6701.

SCHWENKER, Julia Anna; SCHOTTE, Ulrich a HÖLZEL, Christna Susanne. Minimum inhibitory concentrations of chlorhexidine and lactic acid-based teat disinfectants: An intervention trial assessing bacterial selection and susceptibility. *Journal of Dairy Science*, vol. 105 (2022), no. 1, s. 734–747. ISSN 0022-0302.

SUNDHEIM, Gunhild a LANGSRUD, Solveig. Natural and acquired resistance of bacteria associated with food processing environments to disinfectant containing an extract from grapefruit seeds. *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 36 (1995), no. 3-4, s. 441–448. ISSN 0964-8305.

SVOBODOVÁ, Jana; TŮMOVÁ, Eva; POPELÁŘOVÁ, Eva a CHODOVÁ, Darina. Effect of light colour on egg production and egg contamination. *Czech Journal of Animal Science*, vol. 60 (2015), no. 12, s. 550-556. ISSN 1212-1819.

STÁTNÍ VETERINÁRNÍ SPRÁVA PRAHA, *Formuláře ke stažení, Objednávky laboratorních vyšetření - Metodika kontroly zdraví zvířat a vakcinace - Objednávka laboratorního vyšetření*

vzorku - vzor č. 1 a 2. Online. Dostupné z: [Objednávky laboratorních vyšetření – Metodika kontroly zdraví zvířat a vakcinace – Státní veterinární správa \(svscr.cz\)](https://svscr.cz). [citováno 2024-09-18].

ŠKALOUD, Jiří a POKLUDOVÁ, Lucie. *Laboratorní hodnocení účinnosti dezinfekce - veterinárních biocidů a biocidů pro zemědělské a potravinářské provozy. Standardní operační postup Ústavu státní kontroly veterinárních biopreparátů a léčiv Brno, Česká republika, 2008, s. 1-7. (interní dokument, nepublikováno).*

ŠMAJS, J. a HERAFILM (2023). *Válka se Zemí*. Online. In: Česká televize - i-vysílání 2024 Dostupné z: <https://www.ceskatelevize.cz/porady/16239015256-valka-se-zemi/>. [citováno 2024-09-15].

**Název: Hygiena chovu drůbeže a skotu, testování antimikrobního účinku biocidů (dezinfekčních přípravků) ve veterinární sféře**

**Autoři:** MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D., doc. MVDr. Soňa Šlosárková, Ph.D., doc. MVDr. Alena Pechová, CSc., MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D., MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D., MVDr. Vladimír Sládeček, MVDr. David Šenk, Ph.D., MVDr. Petr Stolář, MVDr. Matěj Petr

**Vydavatel:** Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno  
ZS ČR

**Rok vydání:** 2024 (první vydání)

**ISBN:** 978-80-7672-061-9

**AUTORSKÁ PRÁVA:** Žádná část této publikace nesmí být kopírována nebo reprodukována bez písemného svolení autorů.