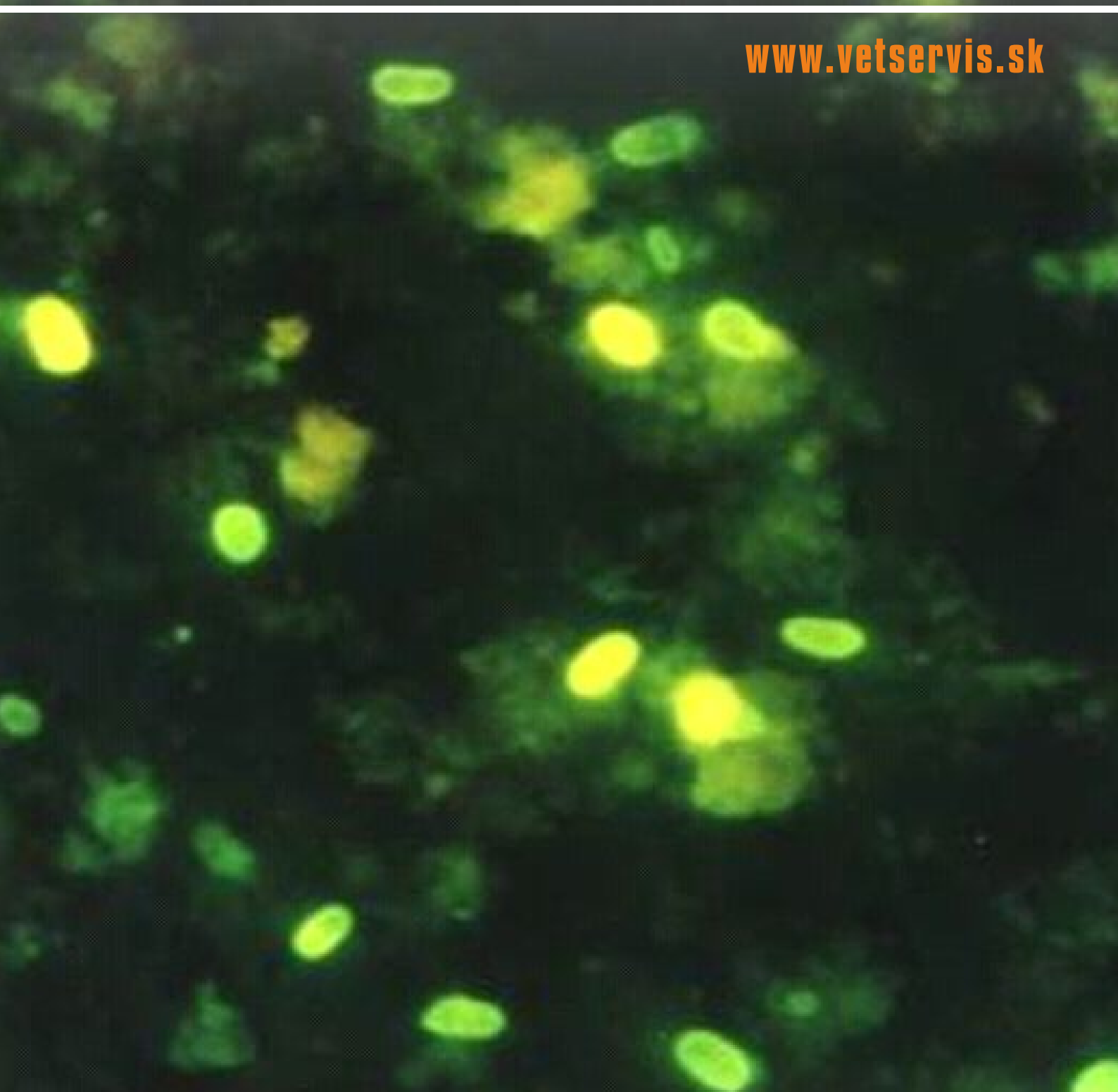


Vetservis spravodajca

Odborný časopis pre veterinárne poradenstvo a diagnostiku 2-2016

www.vetservis.sk



vetServis

Diagnostika encefalitozoonózy • Rezistencia na antibiotiká u koaguláza
negatívnych stafylokokov (CoNS) u ošípaných a drobných cicavcov

Periodicita vydávania - štvrťročník • IČO vydavateľa 36682144 • Dátum vydania - 27.10.2016 • Ročník 17

ISSN 1337-6691

Nedávno som sa stretol s bývalým kolegom a debatovali sme o práci. Nebol prvý ani jediný, kto sa sťažoval na nehoráznú byrokráciu a papierovačky, pre ktoré pomaly ani nemá čas na samotnú prácu, ktorá ho živí. Ale poznáme to všetci: „papier nepustí“.

Je to síce starý problém, no aj tak nadobúdame pocit, že sa stále zhoršuje a byrokracia, ako sa ľudovo hovorí, „bujnie“. Veľavravnou výhovorkou slovenských byrokratov je „lebo Brusel“, ale je to naozaj tak? Možno si spomínate na jedno porekadlo z kultovej českej komédie: „Dej blbci funkci a vymyslí ti lejtstro“. Ak sa poobzeráme, kto a ako dnes poväčšinou dostáva funkcie vo verejnom sektore, asi to nebude ďaleko od pravdy. Existuje však argument o stále rastúcej zložitosti procesov, globalizácii atď., a tie si vyžadujú stále dôkladnejší regulačný systém, ktorý ustráži kvalitu. Ako je ale potom možné, že tu máme mega kauzy ako Volkswagen a emisie, či rôzne potravinové škandály? Lebo papier pustí... A v zložitosti regulácie sa spravidla stráca prehľad aj efektivita. A zmysel. Práve ten zmysel a taktiež účel sa stále menej a menej zohľadňujú v aplikácii litery zákona. Chyba.

Veď to poznáme aj v našom fachu. Horibilná kontrola na začiatku schválení prevádzok a ešte väčšia na výstupe. Tak potom načo je na začiatku? Ktovie. Jedno je však isté. Pred sto rokmi nebolo ani z polovice toľko zákonov a regulácií. Ak si farmár zaumienil, že predá, tak išiel na trh a predal. Ak ošidil, našli si ho. Ak otrávil, už ho možno nenašiel nikto. A preto si každý dvakrát rozmyslel, či bude podvádzať. Všetko malo akýsi väčší zmysel. Dnes nás trápi životná pohoda dobytky, ekologické odpadové hospodárstvo, ale Európu zaplavuje hovädzie z dobytky porázaného v „dobyčích podmienkach“ na zaoceánskych lodiach vypúšťajúcich odpad priamo do mora. Inšpektor sa bojí údeného z pravej udiarne, ale s kludom dá pečiatku na údenie chemické. A podobných paradoxov by sme našli nespočet.

Nie sú pritom žiadne dôkazy, že vybičovaná prísnosť (a zložitosť) predpisov je v priamej úmere s kvalitou. Skôr naopak. Na druhej strane ak sa stratí účelnosť, stratí sa aj zmysel. A preto v minulosti neboli ani väčšie škandály než sú dnes a ani sa neumieralo na salmonelózy či listeriózy. Stačil totiž jednoduchý zákon a takzvaný duch zákona, ktorý každý ctil. Aj vrchnosť aj plebs. A možno to ani nebola vyššia morálka, ale iba obyčajný zdravý sedliacky rozum. Zišiel by sa veru našim úradníkom aj dnes a žilo by sa ľahšie.

V druhom tohtoročnom čísle Spravodajcu nadväzujeme na tému Encefalitozoonóza králikov druhou časťou zaoberajúcou sa diagnostikou tejto choroby. V článku profesora Kmeťa sa môžete dočítať o výsledkoch zaujímavej štúdie génov rezistencie baktérií izolovaných z ošípaných a drobných cicavcov.

Za celý tím spoločnosti VETSERVIS Vám želám príjemné čítanie.

Ivan Holko



vetServis

veterinárna diagnostika a poradenstvo

Z obsahu tohto čísla:

- **str. 3**
Diagnostika encefalitozoonózy (Valenčáková Alexandra)
- **str. 7**
Rezistencia na antibiotiká u koaguláza negatívnych stafylokokov (CoNS) u ošípaných a drobných cicavcov (Vladimír Kmeť, Anna Čuvalová, Štefan Miholics, Michal Stanko)

Diagnostika encefalitozoonózy

Doc. MVDr. Alexandra Valenčáková, PhD.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 04181 Košice, alexandra.valencakova@uvlf.sk

Kedy vyšetrovať materiál na encefalitozoonózu.

Diagnostika encefalitozoonózy je určená predovšetkým u tých pacientov, kde sa objavia niektoré aj keď nešpecifické klinické príznaky v závislosti od druhu hostiteľa. Pravdepodobnosť infekcie spôsobenej Encephalitozoon cuniculi je samozrejme väčšia u imunodeficitných pacientov, a to nie len u zvierat s vírusovými infekciami postihujúcimi imunitný systém, ale aj u pacientov po chemoterapii, po dlhodobej antibiotickej liečbe, pacientov s vyoperovanou slezinou a pod. U týchto pacientov by sa malo pristúpiť k vyšetreniu na prítomnosť Encephalitozoon spp. pri dlhotrvajúcich nekrvavých vodnatých hnačkách (ošípané, mláďatá mäsožravcov, hlodavce, ľudia), ktoré môžu byť spojené s výrazným úbytkom hmotnosti.

U králikov a zajacov sa pristupuje k diagnostike pri objavení sa nervových príznakov, ako sú vestibulárny syndróm a slabosť končatín. U imunokompetentných pacientov je síce pravdepodobnosť pozitívneho nálezu omnoho nižšia, ale aj napriek tomu by mali byť na Encephalitozoon spp vyšetrení pri vodnatých hnačkách, pri ktorých nebol laboratórne potvrdený iný pôvodca, alebo pri ktorých zlyháva obvyklá terapia napr. antibiotikami, pri poruchách močenia a iných nefrologických zmenách (mäsožravce), ako aj pri nervových poruchách spomínaných vyššie (králik, mláďatá mäsožravcov). Táto infekcia u imunokompetentných pacientov však môže vyústiť do samovyličenia po objavení sa miernych príznakov, ako je to v prípade kryptosporidiózy a izosporózy.

Aký materiál vyšetrovať.

Je dôležité mať na pamäti, že mikrosporídiové spóry sú veľmi rezistentné vo vonkajších podmienkach a môžu ostať infekčné niekoľko rokov, hlavne v prípade, keď sú chránené proti vysušeniu. Vzorky feces alebo duodenálneho obsahu môžu byť predkladané čerstvé alebo konzervované. Akceptovateľné sú aj vzorky biopsie. V prípade diseminovanej infekcie sa na analýzu odporúča moč (čerstvý alebo konzervovaný), ako aj ostatné telesné tekutiny (spútum, tekutina bronchoalveolárnej laváže /BAL/, nazálny sekret, cerebrospinálna tekutina /CSF/, konjunktiválny výplach, korneálne zoškrapy, alebo tkanivo). Čerstvé vzorky by mali byť použité na štúdium patogéna na bunkových kultúrach a na molekulové štúdie. K týmto vzorkám je potrebné pridať vzorku séra na zistenie prítomnosti špecifických protilátok.

Ako vzorky uchovávať a kam ich posielat.

Na Slovensku sa nachádzajú dve špecializované laboratórne pracoviská zaoberajúce sa hlavne molekulovou diagnostikou a analýzou DNA Encephalitozoon spp., (Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF v Košiciach – vzorky zo zvierat a Ústav epidemiológie LF UPJŠ v Košiciach – humánne vzorky). Okrem nich sú v Bratislave a v Košiciach komerčné diagnostické laboratória, ktoré už v súčasnosti dokážu diagnostikovať toto ochorenie prevažne sérologicky alebo pomocou monoklonálnych protilátok, čo záleží na možnostiach zaslania vzorky do týchto laboratórií.

Nefixované vzorky uchovávané v chladničke.

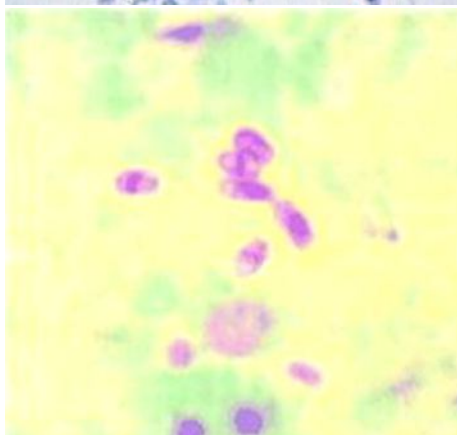
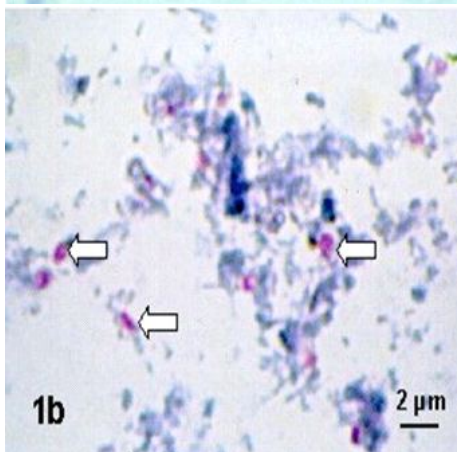
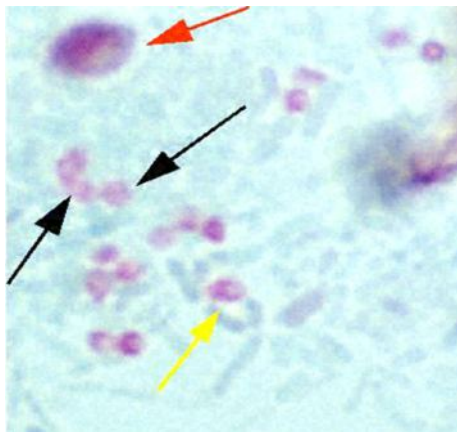
Spóry Encephalitozoon alebo Enterocytozoon spp. sú veľmi odolné a i vo vzorkách stolice (trusu), moču a spúta vydržia živé dlhú dobu. Takto uchovávané vzorky je možné použiť aj pre izoláciu a kultiváciu pôvodcu na bunkových kultúrach, je možné zhotoviť z neho náter, izolovať DNA a identifikovať pôvodcu PCR metódou, alebo prípadne fixovať neskôr ktoroukoľvek metódou. Skladovanie nefixovanej vzorky má samozrejme svoje limity, neskorší nález mikrosporídiových spór môže sťažiť pomnoženie kvasiniek a plesní. Preto je žiaduce obmedziť dobu skladovania, či transportu nefixovaných vzoriek na minimum (2-3 dni), poprípade pridať zmes antibiotík/antimykotík v koncentrácii podľa príbalového letáku (napr. výrobca SIGMA).

Fixácia etanolom.

Najvhodnejšia fixácia pre izoláciu DNA, s následnou amplifikáciou častí génu a ich sekvenáciou. Spočíva v zmiešaní vzorky s alkoholom tak, aby výsledná koncentrácia bola blízko 70-80%.

Fixácia formaldehydom.

Takmer univerzálna fixácia vhodná pre neskoršie farbenie alebo pre následnú koncentráciu spór pre vyšetrenie pomocou elektrónového mikroskopu. Izolácia DNA z takto fixovaných vzoriek je veľmi problematická a kultivácia pôvodcov nemožná. Fixácia spočíva v zmiešaní vzoriek s roztokom formaldehydu tak, aby výsledná koncentrácia bola 4%.



Obr. 1
Modifikované chromotrópne farbiace
metódy (www.images.google.com)



Obr. 2
Vzorka farbená kalkofluorom – modrá
fluorescencia (originál foto)

Modifikované trichrómové farbenie.

Nátery sú pripravené za použitia 10 až 20 ml koncentrovanej vzorky (vzorky stolice alebo moču alebo iných tekutín), ktorá je tenko rozotrená na podložné sklíčko. Je dôležité nezabudnúť pred prípravou náteru odstrediť vzorku pri otáčkach 500 x g. Existujú určité údaje, ktoré uvádzajú, že ošetrovanie vzoriek trusu pomocou 10% KOH (1:1) pred vlastnou prípravou náteru, pri modifikovanej trichrómovej metóde, môže zabezpečiť lepšiu kvalitu náterového preparátu. Vzorky môžu byť čerstvé alebo konzervované. Metódy modifikovaného trichrómového farbenia sú založené na fakte, že penetrácia farbiva do mikrosporidiovkej spóry je veľmi ťažká, preto obsah farbiva v chromotrópnom 2R komponente je väčší, ako bol použitý pri Wheatleyho modifikácii Gomoriho trichrómového farbenia, a tiež doba farbenia je oveľa dlhšia (90 min; Isenberg, 1992; 1995; Rayen a kol., 1993; Weber a kol., 1992).

Niektoré z týchto farbení (Weber-Green modifikované trichrómové farbenie (obr. 1) a Ryan-Blue modifikované trichrómové farbenie sú dostupné komerčne od niekoľkých dodávateľov. Je doporučené použitie pozitívnej kontroly. Detekcia spór si vyžaduje adekvátne osvetlenie a zväčšenie (olejová imerzia, celkové zväčšenie 1000x).

Stena spóry by sa mala ofarbiť na ružovo-červeno, so svetlým vnútrom spóry, s možným horizontálnym alebo diagonálnym pruhovaním, čo reprezentuje polárne vlákno. Pozadie sa javí ako zelené alebo modré, podľa použitej metódy. Môžu sa pri tom ofarbiť aj baktérie, niekoľko kvasinkových buniek a nejaké nečistoty (ofarbené v rôznych odtieňoch ružovej a červenej), avšak tvary a veľkosti týchto artefaktov môžu byť nápomocné pri ich odlíšení od spór.

Výsledky by mali byť oznámené, len ak sú vzorky porovnané s pozitívnou kontrolou a zhodujú sa. Voľba kontrastného farbiva, či už so zelenou alebo anilínovou modrou, závisí na preferencii daného laboratória a nemení farebný výsledok aktuálnych mikrosporidiálnych spór, ktoré sa farbja na ružovo. Navyiac, okrem voľby kontrastného farbiva (zeleného alebo modrého), bolo navrhnutých niekoľko modifikácií originálneho roztoku chromotrópného farbiva, vrátane zmeny v teplote farbiaceho roztoku a čase farbenia.

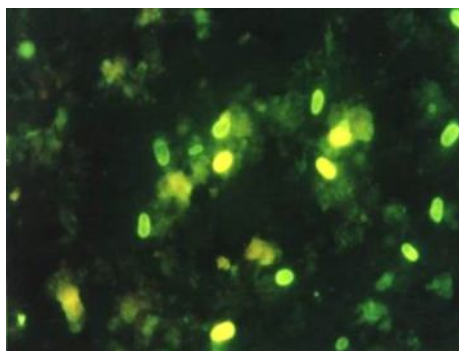
Na základe doterajších pozorovaní je možné konštatovať, že farbenie pri 50 °C 10 min alebo pri 37 °C 30 min. môže zlepšiť detegovateľnosť spór, pozadie obsahuje menej nečistôt a spóry sa farbja intenzívnejšie (Didier a kol., 1995; Garsia a kol., 2001). K dispozícii je tiež rýchla metóda Gram – chromotrópného farbenia za horúca s dobou farbenia 5 min, pričom mikrosporidiové spóry sa farbja tmavo-fialovo oproti blede-zelenému pozadiu (Moura a kol., 1999).

Chemofluorescenčné (opticky zjasňujúce) činidlá.

Chemofluorescenčné (opticky zjasňujúce) činidlá sú zložené organické chemikálie obsahujúce aromatické kruhy v molekulách, ktoré sa vyznačujú dvomi základnými vlastnosťami. Pri krátkovlnnom svetle úplne excitované emitujú svetlo vo viditeľnom spektre a viažu viac alebo menej špecificky určité substráty (Vávra a kol., 1993). Pomocou optických zjasňovačov dochádza k vizualizácii spór vo fluorescenčnom mikroskope a to v dôsledku naviazania optických zjasňovačov na chitín v stene spóry. V závislosti od použitého činidla, ako aj od vlnovej dĺžky, budú steny mikrosporidiovkej spóry fluoreskovať.

Pri použití Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich, Ger) a vlnovej dĺžky 395 – 415 nm (svetlo pri pozorovaní, 455 nm), sa budú spóry javiť ako modrasto-biele alebo tyrkysové oválne útvary (modrá fluorescencia; obr. 2).

Je dôležité si pamätať, že tento typ farbenia je nešpecifický, malé huby a niektoré artefakty prítomné v stolici môžu tiež fluoreskovať. Ak sa však tento prístup použije u vzoriek iných, ako sú vzorky stolice, je oveľa jednoduchšie detegovať a identifikovať mikrosporidiové spóry. Mnoho laboratórií používa pre klinické vzorky jednu z modifikovaných trichrómových farbení, a zároveň aj kalkofluorovú metódu.



Obr. 3
Vzorka farbená Ryluxom – zelená fluorescencia (originál foto)



Obr. 4
Pozitívna reakcia (žlté sfarbenie) testu ELISA

Citlivosť obidvoch metód je relatívne dobrá a malé množstvo spór, ktoré by mohli uniknúť pri modifikovanej trichrómvej metóde, môžu byť zachytené optickými zjasňovačmi. Pri vyšetrovaní iných klinických vzoriek, ako sú vzorky stolice (moč, sputum, odtlačkové preparáty, výplachy oka,...), ktoré obsahujú menej nečistôt a artefaktov je použitie optických zjasňovačov ideálne. Ďalšie optické zjasňovače, ktoré môžu byť použité, zahŕňajú Fungi-Flour a Cellufluor (Sigma-Aldrich, Ger.), Fungiquel A (Medical Diagnostics, Ger.) a Uvitex 2B, Rylux, ktoré nie sú komerčne dostupné. Dostupné sú však u výrobcu práškov na pranie (Ostacolor, ČR), ktoré pri použití excitovaných filtrov 405 – 490 nm, farebným lúčom 510 nm a bariérovým filtrom 550 nm dávajú zelenú fluorescenciu (obr. 3).

To znamená, že spóry ofarbené týmito optickými zjasňovačmi sa budú javiť ako zelené oválne útvary.

Sérologická diagnostika.

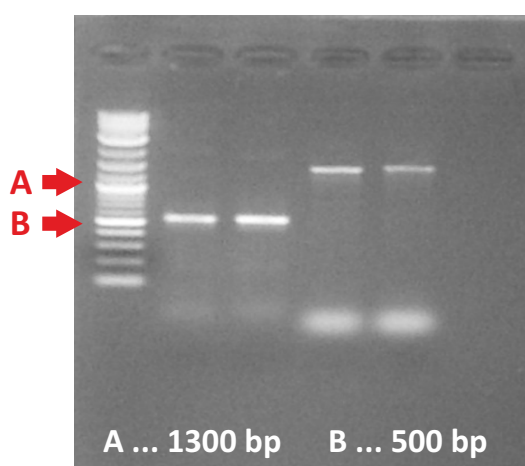
Detekcia protilátok mikrosporidiózy je v súčasnosti jednou z najčastejšie využívaných metód na diagnostiku. Jej nespornou výhodou je rýchlosť a jednoduchosť, ako aj fakt, že vyšetrenie prebieha in vivo a k dôkazu protilátok stačí sérum vyšetrovanej osoby alebo zvierťa (Hollister a Canning, 1987).

Sérologické testy používané na detekciu protilátok na mikrosporídie v sérach zahŕňajú imunofluorescenčný, imunoperoxidázový, enzymatický imunisorbentný test (ELISA, obr. 4) a Western Blot (Chalupský a kol., 1973; Hollister a Canning, 1987; Gannon, 1978; Croppo a kol., 1997).

Citlivosť a špecifickosť týchto metód na detekciu antimikrosporidiových protilátok nie sú známe, pretože neboli publikované žiadne porovnávacie hodnotenia všetkých štyroch metód. Je všeobecne známe, že problémy v sérologickej diagnostike spočívajú najmä v interpretácii výsledkov, pretože u imunosuprimovaných pacientov môže byť odpoveď na antigén nevýrazná, a na druhej strane častokrát sa protilátky diagnostikujú aj u zdravých pacientov, čo môže byť spôsobené krížovou reakciou, pretože niektoré druhy mikrosporidií (patogénne aj nepatogénne) vyvolávajú tvorbu tých istých protilátok. Medzi nevýhody patrí aj nedostupnosť komerčne vyrábaných testov, preto laboratória, ktoré vykonávajú diagnostiku mikrosporidií si musia vyrábať antigén jednotlivých druhov in vitro kultiváciou v bunkových líniiach (Valenčáková a kol., 2002). Navyše *Enterocytozoon bienersi*, ktorý je najčastejšie diagnostikovanou mikrosporidiou v humánnej populácii sa doposiaľ dlhodobo kultivovať nepodarilo.

Monoklonálne protilátky.

Diagnostika mikrosporidiových infekcií je pomerne zložitá, viacstupňová a zdĺhavá hlavne preto, že organizmy sú ťažšie odlišiteľné od baktérií a malých kvasiniek v klinických vzorkách. To znamená, že je potrebné na potvrdenie diagnózy využiť viacero metód. Preto sa v súčasnosti sústreďuje pozornosť na výrobu špecifických monoklonálnych protilátok (Mabs), ktoré by prekonal tieto ťažkosti (Croppo a kol., 1998; Mo, Drancourt, 2002; Moura a kol., 1999). Tieto protilátky sú v rôznych štádiách výskumu a testovania a v súčasnosti sú komerčne dostupné monoklonálne protilátky proti *Encephalitozoon intestinalis* a *Enterocytozoon bienersi* (Thellier a kol., 2004). Vzhľadom na to, že *Enceph. intestinalis* a *Ent. bienersi* sú najdôležitejšie mikrosporidiové patogény ľudí, ich dostupnosť určite zlepši diagnostické schopnosti bežných klinických laboratórií. V tom istom roku kolektív autorov Mo a Drancourt (2004) úspešne vyrobili špecifické Mabs, ktoré môžu byť používané ako špecifický diagnostický reagens identifikujúci *Enceph. cuniculi* v klinických vzorkách od pacientov s mikrosporidiozou, avšak nie sú komerčne dostupné. Určenie mikrosporidiového druhu je z hľadiska diagnostiky a hlavne terapie veľmi významné, pretože určité terapeutické postupy nie sú účinné pri všetkých druhoch mikrosporidií rovnako (Didier a kol., 2005). Napríklad, systémové infekcie spôsobené *Enceph. cuniculi* môžu byť úspešne liečené fumagillinom a albendazolom. Avšak na infekciu spôsobenú druhom *Ent. bienersi* tieto liečivá nezaberajú.



Obr. 5
Pozitívna reakcia PCR (dráha 1- molekulový štandard, dráhy 2,3 - produkt PCR amplifikácie primermi EHEL R a EHEL F (500bp), dráhy 4,5 – produkt PCR amplifikácie primermi 530f a 580r (1280 bp) (originál foto)

Molekulové metódy.

Za ostatné roky sa v diagnostike mikrosporidiózy zdokonalili diagnostické techniky, založené na dôkaze deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) parazita, či už polymerázová reťazová reakcia (PCR) a jej modifikácie, až po genomické analýzy, ktoré slúžia na získanie informácií o molekulových vlastnostiach týchto patogénov. Základom molekulových metód pre diagnostiku ochorenia je amplifikácia príslušného úseku DNA pomocou špecifických primerov, nasledovaná buď restriktčnou analýzou (enzymatickým „nastrihaním“ reťazca DNA), ktorá umožňuje genotypizáciu, alebo sekvenáciou príslušnej časti DNA (prečítaním poradia jednotlivých nukleotidov reťazca DNA). Doteraz bolo publikovaných niekoľko metód na základe PCR na amplifikáciu rôznych oblastí SSU a LSU rRNA génov, ako aj oblasti medzigénových úsekov pre diagnostikovanie a diferenciaciu druhov mikrosporidií, ktoré infikujú ľudí a zvieratá.

V internetovej databáze génovej banky (GenBank) sú k dispozícii génové sekvencie SSU rRNA viacerých mikrosporidií patogénnych pre cicavce – *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Vittaforma corneae* (Mittleider a kol., 2002). Takisto sa podarilo určiť PCR primery pre SSU rRNA gény na identifikáciu mikrosporidií v klinických vzorkách. Touto metódou je možné identifikovať mikrosporidie na druhej úrovni bez ultraštruktúrneho vyšetrenia.

Pre amplifikáciu mikrosporidií z klinických vzoriek sú postačujúce bežné metódy extrakcie pre tkanivové biopsie, korneálne zoškraby, kultivované mikroorganizmy a vzorky moču a trusu. Nevyhnutným predpokladom využitia týchto metód v diagnostike mikrosporidióz je adekvátne vybavenie laboratória a kvalitné know-how. V každom prípade sa však doporučuje fixácia časti vyšetřovaných tkanív v čistom 70% etanole pre prípad potreby izolácie DNA a následnú molekulovú analýzu v referenčných laboratóriách.

Efektívny postup v molekulovej detekcii mikrosporidií v infikovaných vzorkách by mal teda zahŕňať amplifikáciu (namnoženie) špecifického úseku DNA za použitia univerzálnych primerov na amplifikáciu génových sekvencií SSU rRNA štyroch mikrosporidiálnych patogénov, ktoré infikujú ľudí a zvieratá (*Ent. bieneusi*, *E. intestinalis*, *Enceph. cuniculi* a *E. hellem*) a to PMP1a PMP2, 530f a 580r, ktoré po amplifikácii dávajú produkt o molekulovej hmotnosti 1200 – 1500 bp. Potom by mala nasledovať druhová špecifikácia mikrosporidií, ktorá by mala byť určená použitím restriktčných endonukleáz (nastrihaním) alebo sekvenáciou (prečítaním) PCR produktu. Taktiež je možné požiť hybridizáciu amplifikovanej DNA špecifickými DNA sondami alebo spätnú PCR s použitím druhovo špecifických primerov (pre *E. cuniculi* ECUNR a ECUNF, pre *E. intestinalis* SINTR a SINTF, pre *E. hellem* EHEL R a EHEL F, pre *Ent. bieneusi* EBIER a EBIEF; obr 5).

Doporučený postup pri vyšetrení.

Ako screening sa doporučuje použiť vyšetrenie trusu, moča, spúta,... farbením optickými zjasňovačmi (ak laboratórium disponuje fluorescenčným mikroskopom) alebo chromotropným farbením podľa Webera a kol., (1992), pomocou ktorých môžeme vylúčiť negatívne vzorky. Veľmi výhodné je použiť pozitívnu kontrolu (napr. uschované spóry *Encephalitozoon* spp. z bunkovej kultúry alebo starších pozitívnych vzoriek) pre porovnanie veľkosti, odtieňa fluorescence. Spóry *Ent. bieneusi* sú ľahko prehľadnuteľné a je dobré si uvedomiť, že sú ešte menšie ako *Encephalitozoon* spp. Ďalšou z možností je použitie komerčne vyrábanej monoklonálnej protilátky pre vyšetrenie trusu na prítomnosť *E. intestinalis* a *Ent. bieneusi*, ktoré sú síce najčastejšie diagnostikované u ľudí, ale v súčasnosti sa čoraz častejšie objavujú u zvierat a to hlavne zvierat určených na konzumáciu (Danišová a kol., 2015). Avšak v niektorých štádiách infekcie (na začiatku primoinfekcie, keď vylučovanie spór začína až po 6 týždňoch), pri chronickej infekcii (hlavne u králikov, kedy vylučovanie spór je zastavené ale nervové klinické príznaky ešte pretrvávajú) nemusí byť vylučovanie spór exkrementami pravidlom. Preto je potrebné mikroskopické vyšetrenie doplniť sérologickým vyšetrením IFAT pri malom počte vzoriek (do 10) alebo ELISA pri väčšom množstve vyšetřovaných vzoriek, na prítomnosť protilátok proti klinicky významným druhom mikrosporidií.

Ak je prítomnosť mikrosporidií preukázaná, ostáva nám determinovať druh. Umožňuje to predovšetkým transmisívna elektrónová mikroskopia (pokiaľ laboratórium disponuje týmto prístrojom), ktorá však potrebuje úpravu vzoriek fixáciou koncentrovaného sedimentu oxidom osmičelým a následné zmiešanie s tuhnúcim agarom. Alebo spóry koncentrované sedimentáciou sa použijú pre izoláciu DNA a determináciu pomocou molekulových metód. Tie sa veľmi rýchlo zdokonaľujú a umožňujú ľahkú a rýchlu priamu diagnostiku mikrosporidií v truse, moči, spúte s vynechaním predchádzajúcich krokov.

Odporúčania používať bežné, menej citlivé metódy naznačujú, že na diagnostiku mikrosporidiovej infekcie je nutné použiť viacero diagnostických metód, hlavne v prípade, keď sú posudzované vzorky trusu. Keďže mikrosporidióva infekcia často postihuje viaceré orgánové systavy, detekcia organizmu z akejkoľvek klinickej vzorky by mala byť nasledovaná vyšetrením ďalších telesných tkanív a tekutín. U pacientov, u ktorých je predpokladaná diseminovaná infekcia, by mali byť vždy vyšetřené vzorky moča.

Napriek, z praktického hľadiska, zdanlivo marginálnemu charakteru popísanej problematiky sa dá predpokladať, vďaka stúpajúcemu počtu imunosupresívnych pacientov, že mikrosporidióve infekcie sa posunú na významnú priečku záujmu klinickej praxe. Tým sa môže počet pozitívne testovaných pacientov z radov ľudí i zvierat, ako aj počet laboratórií, ktoré túto infekciu budú diagnostikovať výrazne zvýšiť.

Literatúra na vyžiadanie u autora.

Rezistencia na antibiotiká u koaguláza negatívnych stafylokokov (CoNS) u ošípaných a drobných cicavcov

Prof. MVDr. Vladimír Kmeť, DrSc.¹, MVDr. Anna Čuvalová¹, MVDr. Štefan Miholics², Doc. RNDr. Michal Stanko, DrSc.³

¹Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, Košice, kmetv@saske.sk

²Regionálna veterinárna a potravinová správa, Štúrova 5, Komárno, riaditelKN@svpssr.sk

³Parazitologický ústav SAV, Löfflerova 10, Košice, stankom@saske.sk

Abstrakt

Porovnali sme hodnoty hladín MIC90 deviatich antibakteriálnych látok u koaguláza negatívnych stafylokokov (CoNS) izolovaných od ošípaných a od drobných cicavcov. Rezistencia na tetracyklín a aminoglykozidy sa u stafylokokov od drobných cicavcov nevyskytovala. Detekovali sme však gény mecA, ermC, msrA, tetK u CoNS ako u ošípaných, tak aj u drobných cicavcov. Koaguláza negatívne stafylokoky ošípaných a voľne žijúcich drobných cicavcov môžu byť zdrojom rezistencia na antibiotiká pre ľudskú populáciu.

Úvod

Medzi najdôležitejšie mechanizmy rezistencia na antibiotiká zaradil EUCAST (Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti) v decembri 2013 aj MRSA (metecilín rezistentné *Staphylococcus aureus*). Zvlášť nebezpečný je špecifický MRSA klon s tzv. klonálnym komplexom CC398, ktorý sa od roku 2005 vyskytuje ako u ľudí, tak aj u ošípaných (Peeters a kol. 2015).

V poslednej dobe narastá aj význam koaguláza negatívnych stafylokokov (CoNS) ako v humánnej, tak aj vo veterinárnej medicíne. Donedávna boli CoNS považované za apatogénne, avšak metecilín rezistentné (MRCoNS) predstavujú 50-75 % nozokomiálnych izolátov u ľudí (Piette a Verschraegen, 2009). Výskyt MRCoNS u ľudí na Slovensku v rokoch 2010-2015 kolísal v rozmedzí od 51 do 69% (SNARS - slovenská národná databáza rezistencia na antibiotiká).

MRCoNS boli izolované u dobytky a teliat (Fessler a kol., 2010; Haenni a kol., 2011), ošípaných, hydiny, z mäsa (Huber a kol., 2011). U nás popísali výskyt MRCoNS z mäsa bažantov (Regecová a kol., 2014a), z mäsa morských rýb (Regecová a kol., 2014b) a z mäsa divých králikov (Pipová a kol., 2012). Kmene *S. sciuri* a *S. fleurettii* sú považované za prirodzený rezervoár génu *mecA* (Huber a kol., 2011).

Iba nedávno, v roku 2011, sa objavili správy o výskyte nového homológu génu *mecA* (70% identických nukleotidov) pod názvom *mecA* LGA251 (neskôr premenovaný na *mecC*), ktorý fenotypicky sa u *S. aureus* prejavoval citlivosťou na oxacilín, ale rezistenciou na cefoxitín (MSSA). V súčasnosti *mecC* gén bol detekovaný aj u potravinových a spoločenských zvierat, pričom boli zaznamenané aj kmene rezistentné na oxacilín (metecilín). Napr. gén *mecC* u *S. aureus* z dojníc popísali Paterson a kol. (2012). Poľskí autori popísali výskyt nového *mecC* variantu u *Staphylococcus saprophyticus* z piskora (Malyszko a kol., 2014) a podobne Španieli Gomez a kol. (2014) prekvapivo publikovali výskyt génu *mecC* u MRSA izolovaných z hlodavcov druhov *Microtus arvalis* a *Apodemus sylvaticus*.

Rezistencia na makrolidy u stafylokokov je sprostredkovaná dvomi mechanizmami, a to MLSb (makrolid napr. erytromycín, podľa EUCAST aj azitromycín, klaritromycín a roxitromycín), linkozamid napr. linkomycín a klindamycín a streptogramín B napr. quinupristín/dalfopristín) a makrolidovým efluxom. Mechanizmus rezistencia MLSb je kódovaný génmi *ermA*, *ermB*, *ermC* (RNA metylázy), ktoré menia väzobné miesto antibiotika na 23S rRNA a takto spôsobujú rezistenciu na MLSb.

Rozoznávame dva typy fenotypovej expresie MLSb a to inducibilnú MLSb/i a konštitutívnu MLSb/c. Pri konštitutívnom fenotype sú inhibičné zóny alebo minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) erytromycínu a klindamycínu na hodnotách rezistencie. Pri indukovanom fenotype je prítomná rezistencia na erytromycín, ale izolát je citlivý na klindamycín. Na detekciu MLSb/i používame pri diskovej metóde tzv. D-test alebo MIC. Ak je prítomný MLSb/i môžeme terapeuticky aplikovať klindamycín len krátkodobo, inak sa indukuje rezistencia na klindamycín (EUCAST tabuľka break-pointov, verzia 6.0, 2016). Ďalším mechanizmom rezistencie na makrolidy a streptogramíny je makrolidový eflux, kódovaný génom *msrA*.

Najčastejšie sa vyskytujúci mechanizmom rezistencie na aminoglykozidy u stafylokokov je tzv. bifunkčná aminoglykozidy modifikujúca acetyltransferáza/fosfotransferáza kódovaná génom *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, ktorý býva na plazmide alebo na transpozóme. Tento gén kóduje vysokú hladinu rezistencie na gentamicín spolu s rezistenciou na tobramycín, kanamycín a netilmicín (Tenorio a kol., 2001). Vyskytuje sa aj u enterokokov a u nás ho popísala Bujňáková a kol. (2014) u gentamicín rezistentných laktobacilov z trusu hydiny.

Medzi najčastejšie gény rezistencie na tetracyklín u stafylokokov patria *tetK*, *tetL*, *tetM* a *tetO*, pričom *tetM* sa môže vyskytovať aj u gramnegatívnych baktérií. Nedávno bol popísaný cfr gén multirezistencie (kódujúci fenikolovú, linkozamidovú, pleuromutilínovú a streptogramínovú rezistenciu) bol detekovaný u CoNS z ošipáných a kurčiat v Číne (Martineau a kol., 2012).

Cieľom práce bolo porovnať výskyt a mechanizmy rezistencie u CoNS v prírode (drobné cicavce) a u ošipáných.

Materiál

Izolovali sme 30 kmeňov stafylokokov z rektálnych výterov ošipáných (ciciaky, odstavčatá a výkrm) zo západoslovenského regiónu v rokoch 2012-2013. Ďalej sme izolovali aj 32 kmeňov stafylokokov z hlodavcov (*Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*, *Microtus arvalis*) a jedného druhu hmyzožravca (*Sorex araneus*) od júla do októbra 2015 v suburbánných lokalitách neďaleko Košíc, t. zn. z prostredia bez priameho vplyvu človeka (bez selekčného tlaku antibiotík).

Metodika

Mikroorganizmy vo vzorkách trusu a výterov boli pomnožené v peptónovej vode a nasledovne vyočkované na kultivačnú pôdu Manitol Salt Agar. Suspektné kolónie po rozočkovaní boli identifikované na prístroji Maldi Biotyper, štandardnou extrakciou s 70% kyselinou mravčou.

Minimálnu inhibičnú koncentráciu antibiotík (MIC) sme stanovili komerčným humánnym kitom firmy Bel-Miditech (Bratislava), obsahujúcim nasledovné antibiotiká: ampicilín-AMP, ampicilín so sulbaktámom-AMP+IB, oxacilín-OXA, cefoxitín-FOX, piperacilín s tazobaktámom-TZP, erytromycín-ERY, klindamycín-CLI, linezolid-LNZ, rifampicín-RIF, gentamicín-GEN, teikoplanín-TEC, vankomycín-VAN, trimetoprim-TMP, chloramfenikol-CHL,

tigecyklín-TGC, moxifloxacin-MFX, ciprofloxacin-CIP, tetracyklín-TET, kotrimoxazol-COT, nitrofurantoin-NIT. Výsledky MIC boli interpretované podľa EUCAST (tabuľka break-pointov, verzia 6.0. 2016).

Pre vyhodnotenie hladiny rezistencie na antibiotiká sme použili hodnotu MIC₉₀; je definovaná ako najnižšia koncentrácia antibiotika, ktorá potlačí rast 90% testovaných kmeňov daného druhu. Táto hodnota v porovnaní s definovanou hodnotou break-pointu (hranica citlivosti/rezistencie) je dôležitá pre posudzovanie dynamiky vývoja rezistencie kmeňov v danej lokalite.

Meticilínovú rezistenciu sme stanovili interpretovaným odčítaním MIC oxacilínu, ktorá je podľa EUCAST (2016) pre CoNS na úrovni >0,25 mg/L, zatiaľ čo pre *Staph. aureus* a *Staph. lugdunensis* >2mg/L. Pre potvrdenie meticilínovej rezistencie u CoNS sa doporučuje použiť aj diskovú metódu s obsahom 30µg cefoxitínu, pri ktorom má byť priemer inhibičnej zóny menší ako 25 mm. Alternatívou je aj test na tzv. penicilín binding proteíny (PBP2) alebo PCR na dôkaz prítomnosti génu *mecA*.

Použili sme PCR metodiku dôkazu génu *mecA*, ktorá je relatívne lacnejšia ako latexová aglutinácia. Zloženie primerov pre *mecA* je popísané v publikácii Strommenger a kol. (2003), teplota annealingu bola 55°C a PCR produkt mal veľkosť 532 bp. Pre detekciu génu *mecC* sme použili metodiku podľa Cuny a kol. (2011). U stafylokokov podľa ich spektra rezistencie sme pomocou PCR otestovali aj prítomnosť ďalších génov rezistencie: *blaZ*-betalaktamáza (Martineau a kol., 2000), *ermA*-erytromycín a *ermB* (Liu a kol., 2009), *ermC* a *msrA*-makrolidový eflux (Martineau a kol., 2000), *tet(K)* – tetracyklín (Ng a kol., 2001), *dfrD*, *dfrS* a *dfrG* –trimetoprim (Kadlec a, Schwartz, 2009) a *rpoB*-rifampicín (Mick a kol., 2010).

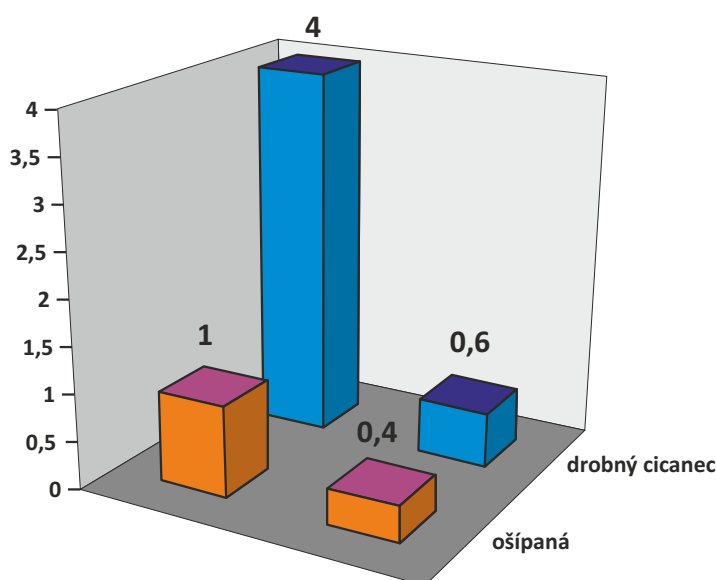


Výsledky a diskusia

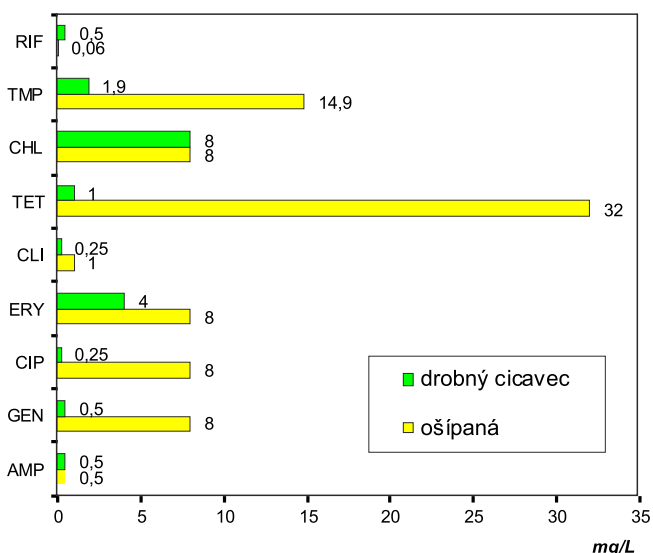
Pomocou Maldi-biotypera sme zaznamenali nasledovné druhy CoNS u oboch skupín zvierat: *Staphylococcus epidermidis*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. hominis*, *Staph. chromogenes*, *Staph. xylosus* a *Staph. warneri*.

Na grafe č.1 sú znázornené priemerné hodnoty MIC90 a MIC (geometrický priemer) oxacilínu u CoNS. U stafylokokov z trusu ošípaných bola MIC90 na úrovni 1 mg/L oxacilínu. Pozoruhodné je zistenie vysokej hladiny MIC90 až 4 mg/L drobných cicavcov (hlodavcov i hmyzožravcov), ktoré sú vlastne bez selekčného tlaku antibiotík, resp. môžu sa dostávať do styku s antibiotikami len nepriamo cez znečistené životné prostredie. Kmene stafylokokov s vyššou MIC oxacilínu obsahovali aj gén *mecA*, ale neobsahovali gén *mecC*.

MIC90 a MICxG oxacilínu stafylokokov



MIC90 antibakteriálnych látok stafylokokov



Porovnanie hladín MIC90 antibakteriálnych látok koaguláza negatívnych stafylokokov je znázornené na Grafe č. 2. Z grafu je zrejmé, že hodnota MIC90 tetracyklínu bola nad hodnotou breakpointu len u kmeňov z ošípaných, a to na úrovni 32 mg/L. Podobne aj gén *tet(K)* bol detekovaný len u stafylokokov od ošípaných. Zaujímavý je fakt, že u drobných cicavcov sa rezistencia na tetracyklín a ani na aminoglykozidy nevyskytovala.

Rezistencia stafylokokov na erytromycín sa vyskytovala aj u drobných cicavcov, hoci vzorky boli odoberané v subúrbánných lokalitách a aj v ochrannom pásme Národného parku Slovenský kras. V prípade erytromycínu stafylokoky mali hodnotu MIC90 na úrovni rezistencie, t. j. 4 mg/L (ošípané-8 mg/L a hlodavce 4 mg/L). Pomocou PCR sme u erytromycín rezistentných stafylokokov detegovali gény *ermC* a *msrA* ako u ošípaných, tak aj u drobných cicavcov. Gény *ermA* a *ermB* neboli detegované. Rezistencia na klindamycín sa vyskytovala u stafylokokov od drobných cicavcov iba u dvoch kmeňov spolu s rezistenciou na erytromycín. U ošípaných bolo 6 kmeňov rezistentných na klindamycín, čomu nasvedčuje aj vyššia hladina MIC90 na úrovni 1mg/L.

Pri chloramfenikole hodnoty MIC 90 boli rovnaké, a to 8 mg/L, čo predstavuje citlivé kmene. Hoci chloramfenikol sa na terapiu už nepoužíva, táto hodnota je iba jedno riedenie pod hladinou rezistencie.

Trimetoprím je silný inhibítor bakteriálnej dihydrofolát reduktázy (DHFR) a v kombinácii so sulfametoxazolom je účinný aj proti MRSA. Rezistencia na trimetoprím môže byť kódovaná plazmidovými *dfrD*, *dfrK*, *dfrG* a *dfrS1* génmi, ktoré sa často vyskytujú práve u stafylokokov z ošípaných (Kadlec a Schwartz, 2009). Gény rezistencie na trimetoprím sme však nedetegovali v našom súbore kmeňov. Zrejme to súvisí s nízkou hladinou MIC90, ktorá u ošípaných dosahovala iba hodnotu 14,9 mg/L (graf č. 2), zatiaľ čo u humánneho MRSA ST 398 s génom *dfrK* mala hodnotu väčšiu ako 250 mg/L (Kadlec a Schwartz, 2009).

Tri kmene stafylokokov izolované z drobných cicavcov boli rezistentné na rifampicín a obsahovali aj gén *rpoB*. Hodnota break-pointu rifampicínu podľa EUCAST (2016) je $\geq 0,5$ mg/L, naše kmene mali hodnotu MIC 1 mg/L. Podľa čínskych autorov Zou a kol. (2013) je hodnota MIC od 2 do 4 mg/L považovaná za nízku. V ich súbore humánnych kmeňov MRSA MIC rifampicínu bola ≥ 8 mg/L. Kmene stafylokokov s nízkou hladinou MIC na rifampicín majú iba jednu mutáciu v géne *rpoB*, zatiaľ čo kmene s vysokou hladinou až dve mutácie, ktoré sa prejavujú substitúciou štyroch aminokyselín. Mutácie v ich súbore kmeňov MRSA sa vyskytli na pozíciách 481His/Asn (95.5%), 466Leu/Ser (87.5%), 477Ala/Asp (6.8%) a 486Ser/Leu (4.5%). Rifampicín sa na terapiu MRSA u ľudí na Slovensku nepoužíva. U drobných cicavcov sme izolovali iba tri kmene MRSA, pričom dva kmene mali nízku MIC rifampicínu 0,5 resp. 1 mg/L.

Podakovanie

Práca vznikla za finančnej podpory projektov APVV-0009-10 a APVV-14-0274.

deuka Dinkelstreu

prémiová podstielka pre králikov,
hlodavcov a hydinu

zmiernuje zápach

ľahko sa kompostuje

bez prachu - vhodná aj pre alergikov

najlepšia kvalita za rozumnú cenu



deuka Dinkelstreu pomáha
rýchlo a efektívne zabezpečiť
dokonalú hygienu pre vašich
domácich miláčikov



**V prípade otázok Vám odpovie
náš zástupca pre Slovensko:**

VETSERVIS s.r.o.
Kalvaria 3, 94901 Nitra
+42 1915986733
deuka www.deuka.sk

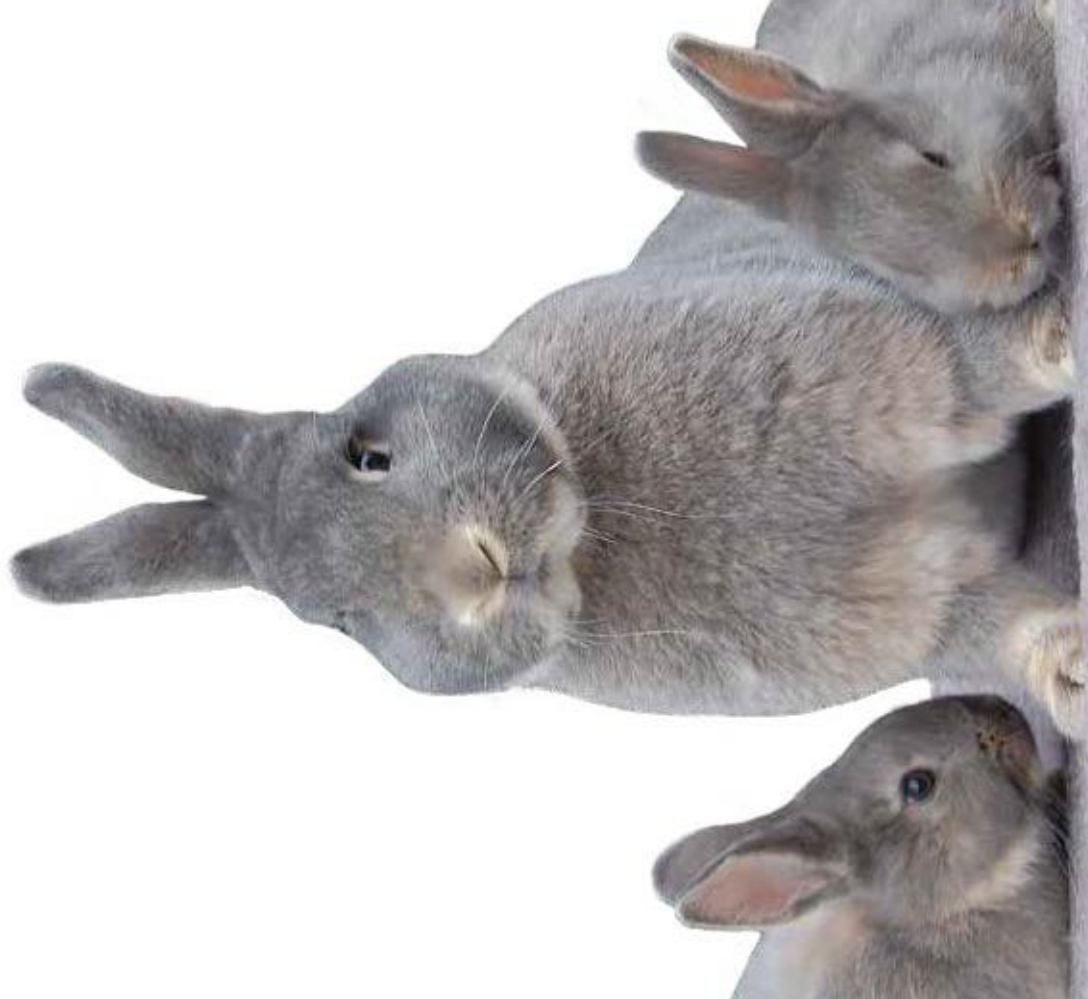
vetServis
laboratórna diagnostika a poradenstvo
www.vetservis.sk

váš deuka predajca

výrobca

Deutsche Tiernahrung Cremer GmbH & Co. KG
Postfach 10 19 45, 40010 Düsseldorf, Nemecko
Phone: +49 (0)211 / 30 34-266
Fax: +49 (0)211 / 30 34-375
E-Mail: deukanin@deutsche-tiernahrung.de
Internet: www.deuka.de
deukanin® – super prémiové krmivo **deuka**

deukanin®
Kaninchenfutter mit System



deukanin®
Kaninchenfutter mit System



Žiadajte u svojich distribútorov.

deukanin®
Kaninchenfutter mit System



0816/617 DP

deukanin - krmivo pre králikov

standard

je univerzálne krmivo pre odchow a výkrm králikov všetkých plemien. deukanin Standard sa dá veľmi vhodne kombinovať s inými krmivami deukanin pre dosiahnutie optimálnej kondície králikov.

basis plus

je základné krmivo pre celý rad plemien u všetkých vekových kategórií so zvýšeným podielom bielkovín. Ide o vyvážené krmivo zabezpečujúce dostatočný prísun všetkých potrebných živín pre rast a reprodukciu králikov, pokiaľ nie sú stanovené osobitné požiadavky na prísun energie.

energie

je krmivo so zvýšeným obsahom energie vhodné najmä pre dojčiacie samice, rastúce mláďatá a veľké plemená králikov. Krmivo zabezpečuje dostatočný príjem energie potrebný pre tvorbu a produkciu materského mlieka v období dojenia. U mladých jedincov veľkých plemien zabezpečuje energiu pre tvorbu a rast svalstva, pevnosť kostry kvalitu srsti.

fit Kräuter & Petersilie

je krmivo obohatené o vitamín C a petzlienuvú vňať. Vitamín C je prírodným antioxidantom a napomáha zvieratám zvládvať stresové situácie počas prípravy na výstavu, samotných výstav, v období plazuťia, párenia a prípravy na chovnú sezónu. Petzlien patrí medzi prírodné stimulanty ruje samíc. Krmivo je veľmi vhodné pre mladé králiky v období rýchleho rastu.

Zwergenfutter

Špeciálne krmivo pre zdrobnené a malé plemená králikov ideálne krmivo s množstvom výhod pre prípravu králikov na výstavu, chov a šport.

Dajte zdrobneným králikom to najlepšie

odporúčaná denná spotreba v g na kg živej hmotnosti (ako kompletne krmivo)

	deukanin standard	deukanin basis plus	deukanin basis** basis mit Cocc.	deukanin energie	deukanin fit Kräuter & Petersilie	deukanin Zwergenfutter	deukanin Nagermüsl	deukanin Naturmix
chovné	30-40	30-35			30-40	30-35		
nízko kotná	35-40	30-40			35-40	30-40		
vysoko kotná		35-45		30-45			špeciálne doplnky	
kojaca		viac		viac			špeciálne doplnky	
menej aktívne	30-40	30-35			30-40	30-35		
aktívne		30-45		30-45			špeciálne doplnky	
fáza udržiavania								
prevencia kocc.			cielené dávkovať*					
pro odchov	30-40	30-35		30-40		30-35		
pre výkrm		viac		viac			špeciálne doplnky	
v období stresu výstavy					30-40			
v príprave na výstavu	35-40	30-40		30-40		30-35	špeciálne doplnky	

*Pri dokrmovaní senom, trávou, mrkvou sa spotreba krmiva zniží až o 50%.

**Všetky potrebné informácie o podávaní sú uvedené na príbalovom letáku. Neodporúča sa podávať celoročné, ale iba počas 6 týždňovej liečebnej kúry 1-2 krát ročne.

Žiadajte u svojich distribútorov.

basis mit Cocc.

je krmivo obohatené o prídatok antikoagulantov určené pre odchow mláďat v období odstavy a začiatku odchovu. Pre dosiahnutie ochrany mláďat pred kokcidiozou je vhodné ho podávať v čistej forme 2 týždne pred plánovaným odstavom až mesiac po odstave.

Nagermüsl

je doplnkový ošutený krmivom v podobe mixu müsli, granúl a rôznych zŕnin. Toto krmivo je obohatené o vitamín C a preto je veľmi vhodné pre mláďatá. Nakoľko má znížený obsah energie a zvýšený obsah tuku je veľmi vhodným doplnkovým krmivom pre prípravu králikov na výstavu. Zároveň je to ideálne doplnkové krmivo pre chov zdrobnených králikov, morčiat a škrečkov.

Naturmix

je novinka, ktorá bola vyrobená z najkvalitnejších komponentov bez prídavku granúl. Ide o diétne krmivo vhodné pre úpravu hmotnosti bez straty kondície a lesku srsti. Krmivo je veľmi vhodné pre králikov v rekonvalescencii po rôznych tráviacich poruchách. Zároveň je to ideálne doplnkové krmivo na ošutenie krmnej dávky pre králikov, morčiat a škrečkov.

zloženie / krmiv:

	standard	basis plus	basis mit Cocc.	energie	fit Kräuter & Petersilie	Zwergenfutter	Nagermüsl	Naturmix
Bielkoviny	%	16,00	17,00	17,00	17,00	16,00	15,00	11,10
Vláknina	%	17,00	17,00	16,00	16,00	17,50	8,90	5,70
Tuk	%	2,60	2,20	3,00	3,10	2,50	5,00	6,60
Vápnik	%	1,00	0,95	1,10	0,85	0,80	0,90	0,10
Fosfor	%	0,50	0,60	0,55	0,60	0,60	0,50	0,30
Sodík	%	0,14	0,20	0,14	0,20	0,14	0,25	0,04
Vitamin A I.E. / kg		10,000	10,000	13,500	10,000	10,000	10,000	---
Vitamin D ₃ I.E. / kg		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	800	---
Vitamin E mg / kg		46	46	50	46	100	120	---
Vitamin C mg / kg	---	---	---	---	500	---	2,000	---

Zdroj: vybrané



Ciele aplikácie HUMAC® Natur AFM Monogastric

- Zníženie úhynu mláďat
- Zlepšenie a udržanie dobrého zdravotného stavu
- Zvýšenie prírastkov a produkcie zvierat
- Zlepšenie využitia (konverzie) krmiva
- Zníženie stresu zvierat vo veľkochovoch

Základným materiálom je Leonardit – prírodná látka s vysokou biologickou účinnosťou, ktorá je technologicky aktivovaná na celkový obsah huminových kyselín nad 65% (m/m) a následne upravená mravčanom vápenatým.

Aplikáciou kŕmnej suroviny HUMAC® Natur AFM Monogastric okrem stabilizácie gastrointestinálnej flóry dodávame i minerálne látky a stopové prvky v chelátovej forme, ktoré sú ľahko využiteľné v organizme zvierat.

Huminové látky pôsobia na živý organizmus ako stimulátor rastu, trávenia a využitia živín, zlepšujú produkčné ukazovatele (intenzita rastu, konverzia krmiva, index efektívnosti výkrmu) a majú dôležitý účinok pri prevencii a terapii mnohých nemocí.

Aplikáciou HUMAC® Natur AFM Monogastric do krmiva predchádzame poruchám zdravia (hlavne hnačkám a ďalším tráviacim poruchám, infekčným a neinfekčným ochoreniam), zabezpečujeme adsorpciu toxínov (mikrobiálnych a plesňových) a pre organizmus iných jedovatých zlúčenín, ktoré sa s nimi následne vylučujú výkalmi z organizmu zvierat.

Pôsobením na pH tráviacej sústavy priaznivo ovplyvňujeme tvorbu enzýmov, vitamínov a činnosť ostatných vnútorných orgánov. Preventívne zabráňujeme rozvoju patogénnej mikroflóry (kokcidie, klostrídie, koliformné mikroorganizmy, salmonely a pod.).

Zlepšujeme mikroklimu v maštali absorpciou hlavne dusíkatých a ostatných látok v plynnej forme, následkom čoho sa podstatne znižujú emisie škodlivých plynov a pachov. Týmto komplexným pôsobením sa znižuje výskyt nemocí a úhynov zvierat, podporuje sa zdravie a tým aj produkcia, čím sa zvyšuje rentabilita chovu.

Technické parametre

Huminové kyseliny v sušine	min. 57 %
Ďalšie látky v sušine	
Fulvonové kyseliny	min. 5 %
Mravčany	3,24 %
Vápnik (Ca)	5,11 %
Horčík (Mg)	4 855 mg/kg
Železo (Fe)	18 094 mg/kg
Meď (Cu)	14,25 mg/kg
Zinok (Zn)	35,15 mg/kg
Mangán (Mn)	135 mg/kg
Kobalt (Co)	1,18 mg/kg
Selén (Se)	1,59 mg/kg
Vanád (V)	40 mg/kg
Molybdén (Mo)	2,57 mg/kg
všetky v prírode sa vyskytujúce stopové prvky v karboxymetylcelulóзовom komplexe organické hmoty	v µg/kg
Vlastnosti	
Veľkosť častíc	do 100 µm
Vlhkosť	max. 15%

Optimalizácia ekonomiky chovu

Huminové kyseliny stimulujú organizmus k zvýšenému príjmu živín, vylučovaniu väčšieho množstva tráviacich štiav a enzýmov, podpore imunity a zlepšeniu celkového zdravotného stavu. Výsledkom je **zrýchlený rast, vyššia produkcia, lepšia imunita a odolnosť voči chorobám.**

Použitie HUMAC® Natur AFM Monogastric v doporučenom dávkovaní môže nahradiť použitie **okysľovadiel, vyvážovačov mykotoxínov, prípravkov proti anémii** (hlavne u prasiat) a prípravkov na zlepšení Welfare.



Dosiahnuté výsledky v chovu monogastrických zvierat

- Zvýšenie denných prírastkov (o 6-8%), skrátenie doby výkrmu
- Zníženie spotreby krmiva na kg prírastku (o 4-7%)
- Zníženie úhynov u mláďat, ale aj u dospelých jedincov (o 40-50%)
- Zvýšenie znášky u nosníc (priemerne o 4%) je výsledkom predĺženia znáškovej krivky, čo je odrazom lepšieho zdravotného stavu nosníc
- Vyššia jatočná výťažnosť
- Vyšší podiel prsnej a stehennej svaloviny u hydiny
- Výrazne lepšie senzorické vlastnosti jatočného mäsa
- Zvýšenie vyrovnanosti stáda
- Zníženie nákladov na antibiotiká a iné lieky
- Výrazne zníženie maštalného zápachu
- Vylúčenie možnosti vzniku mikrobiálnej rezistencie a prítomnosti reziduí cudzorodých látok v živočišných produktoch
- U nosníc mimo zvýšenej produkcie vajec a lepšej liahnivosti sa mierne zvýši hmotnosť vajec, pričom hrúbka škrupiny sa nemení, ale zvýši sa jej pevnosť

Spôsob podávania

HUMAC® Natur AFM Monogastric sa primiešava do krmiva, ktoré môže byť ihneď skrmované. Kŕmna surovina je bez ochranné doby.

Dávkovanie

Ošipané	0,5 – 1,0 % do krmiva
Hydina	0,7 – 1,0 % do krmiva
Domáce zvieratá (psy, mačky)	2 – 3 g / kus / deň, 0,5 % do krmiva

V prípade výskytu hnačkových ochorení doporučujeme 2-3x zvýšiť preventívnu dávku po dobu 5 - 7 dní.

Balenie: 4, 25 kg

Doba použiteľnosti: 24 mesiacov od dátumu výroby pri dodržaní podmienok skladovania.

Registračné číslo krmivárskeho podniku: SK 100900

Vhodný pre použitie v ekologickom poľnohospodárstve

Platnosť katalógového listu od 1. 1. 2015 do 31. 12. 2015

