

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

DIPLOMOVÁ PRÁCE

OLOMOUC 2018

Bc. Ondřej Chaloupka

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium rezistence vybraných mikroorganismů
k antimikrobiálním látkám**

Diplomová práce

Bc. ONDŘEJ CHALOUPKA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.

Čestně prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci s názvem „Studium rezistence vybraných mikroorganismů k antimikrobiálním látkám“ zpracoval samostatně pod vedením pana MVDr. Jaroslava Bzdila, Ph.D. na Státním veterinárním ústavu v Olomouci, s využitím literatury uvedené v závěru této práce.

.....
v Olomouci dne

.....
Bc. Ondřej CHALOUPKA

SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá studiem rezistence vybraných rodů a druhů mikroorganismů k antimikrobním látkám. Konkrétně se jednalo o *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Candida* sp. Cílem teoretické části této práce bylo popsat studované mikroorganismy z hlediska jejich prevalence a antimikrobiální rezistence s ohledem na aktuálně dostupnou vědeckou literaturu. Cílem experimentální části této práce bylo zmapovat stav antimikrobiální rezistence ve veterinární sféře moravského a slezského regionu České republiky v letech 2007–2017. Studované mikroorganismy byly izolovány z klinických a patologických vzorků doručených na Státní veterinární ústav Olomouc v průběhu let 2007–2017. K vytvoření přehledu byla použita vlastní naměřená data zahrnující celkem 175 vyšetřených mikrobiálních kmenů (25 kmenů od každého ze sedmi studovaných mikroorganismů) a současně také data archivovaná na Státním veterinárním ústavu Olomouc. Všechny mikroorganismy byly nejprve kultivovány a izolovány z doručeného biologického materiálu, následně identifikovány pomocí *matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight* hmotnostní spektrometrie, a nakonec otestována jejich citlivost k antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou. Zjištěné poklesy či nárůsty citlivostí k antimikrobiálním látkám byly statisticky zhodnoceny pomocí testu dobré shody (chí kvadrát test). V práci byly popsány změny v prevalenci a změny antimikrobiálních citlivostí u studovaných mikrobů. Nejvíce prevalentním mikrobem byla *E. coli* ($7,02 \pm 1,90$ %) a *S. aureus* ($3,55 \pm 2,40$ %), ostatní mikroby se vyskytovaly s prevalencí v rozmezí hodnot 0,10–1,34 %. Nejvýraznější změna v prevalenci ve sledovaném období nastala u *S. aureus*, kde pokles v roce 2017 oproti roku 2007 činil $5,18 \pm 2,40$ %. Nejzajímavějšími fakty souvisejícími s citlivostmi k antibiotikům byla nízká citlivost k tetracyklinu (38,48–71,67 %) u 4 studovaných bakterií, dále pak vysoká citlivost ke chloramfenikolu (69,11–100 %) a k amoxicilin/klavulanu (70,77–98,16 %) u 5 studovaných bakterií. U studovaného rodu kvasinek *Candida* sp. byla pozorována vysoká citlivost pouze k nystatinu, pimaricinu a ciklopiroxolaminu (89,91–100 %). Na druhou stranu obecně nízkou citlivost vykazovaly kmeny *Candida* sp. k ostatním deseti použitým antimykotikům (25,76–49,41 %). Jako poslední byly v práci porovnány údaje antimikrobiálních citlivostí za rok 2017 pocházející z malého (25) a velkého (100–1000) souboru dat (testovaných mikrobiálních kmenů), díky čemuž se potvrdilo, že údaje citlivostí k antimikrobiálním látkám spočítané na základě malého souboru dat jsou poměrně málo spolehlivé (odchylka oproti velkému souboru dat v rozmezí 4,23–16,23 %).

SUMMARY

This diploma thesis deals with the study of antimicrobial resistance in selected microbial genera and species, namely *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Candida* sp. Aim of thesis' theoretical part was to describe studied microorganisms in relation to their prevalence and antimicrobial resistance using the information currently available in the scientific literature. Aim of thesis' experimental part was to map out the state of antimicrobial resistance situation in the veterinary sphere of the Moravian and Silesian region of the Czech Republic over the years 2007–2017. Studied microorganisms were isolated from clinical and pathological samples delivered to the State Veterinary Institute Olomouc over the years 2007–2017. Own measured data comprising of 175 examined microbial strains (25 strains from each of the seven studied microorganisms) along with the data archived at the State Veterinary Institute Olomouc were used to create this overview. All microorganisms were at first cultivated and isolated from the delivered biological material and then identified using the *matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight* mass spectrometry. Antimicrobial susceptibility testing of these microorganisms was carried out by the disc diffusion method in the end. Recorded decreases and increases in susceptibility to antimicrobials were statistically evaluated using the Chi-square test. Changes in the prevalence and changes in the antimicrobial susceptibility of the studied microbes were described in the thesis. The most prevalent microbes were *E. coli* ($7,02 \pm 1,90$ %) and *S. aureus* ($3,55 \pm 2,40$ %) while the other microbes were occurring with the prevalence in range of values 0,10–1,34 %. The most significant change in the prevalence in the reference period occurred with *S. aureus*, whose prevalence decreased by $5,18 \pm 2,40$ % in 2017 when compared to 2007. The most interesting facts concerning the susceptibility to antibiotic were a rather low sensitivity to tetracycline (38,48–71,67 %) in 4 studied bacteria and a rather high sensitivity to chloramphenicol (69,11–100 %) and amoxicillin/clavulan (70,77–98,16 %) in 5 studied bacteria. High sensitivity of the studied genera of yeast *Candida* sp. was observed to nystatin, pimaricin a ciklopiroxolamin (89,91–100 %). On the other hand, a generally low sensitivity to the other 10 used antimycotics was observed in the tested strains of *Candida* sp. (25,76–49,41 %). In this thesis's conclusion there was a comparison of 2017 antimicrobial susceptibility data coming from a small (25) and big (100–1000) data file (tested microbial strains). It was confirmed that the antimicrobial susceptibility data calculated from a small data file are relatively unreliable (deviation from the big data file in range 4,23–16,23 %).

*Věnováno mé babičce Vlastě Zichové,
která mne vždy v mých studiích maximálně podporovala.*

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli, panu MVDr. Jaroslavu Bzdilovi, Ph.D. za jeho odborné vedení mé práce, lidský a vstřícný přístup při řešení nastolených problémů a cenné praktické rady, které by člověk v literatuře hledal jen s velkými obtížemi. Dále bych rád poděkoval své rodině a všem mým přátelům za jejich podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu mých studií.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE.....	3
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	4
3.1	Charakteristika <i>Escherichia coli</i>	4
3.1.1	Klasifikace a typizace <i>E. coli</i>	4
3.1.2	Patogenita a klinický význam <i>E. coli</i>	4
3.1.3	Citlivost <i>E. coli</i> k antibiotikům.....	5
3.2	Charakteristika <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
3.2.1	Klasifikace a typizace <i>P. aeruginosa</i>	6
3.2.2	Patogenita a klinický význam <i>P. aeruginosa</i>	6
3.2.3	Citlivost <i>P. aeruginosa</i> k antibiotikům.....	6
3.3	Charakteristika <i>Salmonella</i> sp.	7
3.3.1	Klasifikace a typizace <i>Salmonella</i> sp.	7
3.3.2	Patogenita a klinický význam <i>Salmonella</i> sp.	7
3.3.3	Citlivost <i>Salmonella</i> sp. k antibiotikům.....	7
3.4	Charakteristika <i>Klebsiella</i> sp.	8
3.4.1	Klasifikace a typizace <i>Klebsiella</i> sp.	8
3.4.2	Patogenita a klinický význam <i>Klebsiella</i> sp.	8
3.4.3	Citlivost <i>Klebsiella pneumoniae</i> k antibiotikům.....	8
3.5	Charakteristika <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.5.1	Klasifikace a typizace <i>S. aureus</i>	9
3.5.2	Patogenita a klinický význam <i>S. aureus</i>	9
3.5.3	Citlivost <i>S. aureus</i> k antibiotikům.....	10
3.6	Charakteristika <i>Enterococcus faecalis</i>	10
3.6.1	Klasifikace a typizace <i>E. faecalis</i>	10
3.6.2	Patogenita a klinický význam <i>E. faecalis</i>	11
3.6.3	Citlivost <i>E. faecalis</i> k antibiotikům v Evropě.....	11
3.7	Charakteristika <i>Candida</i> sp.....	11
3.7.1	Klasifikace a typizace <i>Candida</i> sp.....	11
3.7.2	Patogenita a klinický význam <i>Candida</i> sp.....	11
3.7.3	Citlivost <i>Candida</i> sp. k antimykotikům.....	12
4	MATERIÁL A METODY.....	15
4.1	Biologický materiál.....	15
4.2	Chemikálie a roztoky.....	15
4.3	Kultivační půdy.....	15
4.4	Přístroje.....	15
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	17
4.5.1	Kultivace a izolace mikrobiálních kmenů z klinického a patologického materiálu.....	17
4.5.2	Identifikace a biologická klasifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS.....	19
4.5.3	Stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou.....	20

4.5.4	Statistické hodnocení výsledků stanovování citlivosti k antimikrobiálním látkám	22
5	VÝSLEDKY	23
5.1	Vyhodnocení změn v prevalencích vybraných mikrobů v letech 2007–2017	23
5.2	Vyhodnocení změn v antimikrobiálních citlivostech vybraných mikrobů v letech 2007–2017	28
5.3	Vyhodnocení spolehlivosti údajů antimikrobiální citlivosti stanovených na základě malého a velkého souboru dat	40
6	DISKUZE	41
7	ZÁVĚR	45
8	LITERATURA	47
9	PŘÍLOHY	50

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

σ	průměr
Δ	rozdíl
AMC	amoxicilin/klavulan
AST	<i>antimicrobial susceptibility testing</i>
ATB	antibiotikum
ATM	antimykotikum
C	chloramfenikol
CFP	cefoperazon
CN	gentamicin
CRE	<i>carbapenem-resistant Enterobacteriaceae</i>
CT	kolistin
DA	klindamycin
DAEC	difúzně-adherentní <i>E. coli</i>
E	erytromycin
EA	Endův agar
EAEC	enteroadherentní <i>E. coli</i>
EARS-NET	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance Network</i>
EDW	Edwardsův agar
EHEC	enterohemoragická <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>E. coli</i>
ENR	enrofloxacin
EPEC	enteropatogenní <i>E. coli</i>
ESBL	<i>Enterobacteriaceae</i> produkující široké spektrum betalaktamáz
ETEC	enterotoxigenní <i>E. coli</i>
EUCAST	<i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
IMI	imipenem
KA	krevní agar
KF	cefalotin
LT	termolabilní toxin <i>E. coli</i>
MALDI-TOF MS	<i>mass assisted laser desorption/ionisation – time of flight mass spectrometry</i>
MEM	meropenem
MHA	Mueller-Hinton agar
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
MRSA	<i>methicilin-resistant Staphylococcus aureus</i>
OXA	oxacilin
PRL	piperacilin
R kmen	mikrobiální kmen rezistentní k dané antimikrobiální látce
RPM	<i>revolutions per minute</i>
S kmen	mikrobiální kmen senzitivní (citlivý) k dané antimikrobiální látce
SA	Sabouraud agar
ST	termostabilní toxin <i>E. coli</i>
STEC	Shiga-like toxinogenní <i>E. coli</i>
SVÚ Olomouc	Státní veterinární ústav Olomouc
SXT	kotrimoxazol
T	tetracyklin
VAN	vankomycin
VRE	<i>vancomycin-resistant Enterococci</i>
WHO	<i>world health organisation</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 01:** Makrofotografie kolonií *E. coli* narostlých na Endově agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *E. coli* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)..... **12**
- Obrázek 02:** Makrofotografie kolonií *P. aeruginosa* narostlých na krevním agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *P. aeruginosa* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)..... **13**
- Obrázek 03:** Makrofotografie kolonií *Salmonella* Enteritidis narostlých na krevním agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *S. Enteritidis* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)..... **13**
- Obrázek 04:** Makrofotografie kolonií *K. pneumoniae* narostlých na krevním agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *K. oxytoca* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo) **13**
- Obrázek 05:** Makrofotografie kolonií *S. aureus* narostlých na krevním agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *S. aureus* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo) **14**
- Obrázek 06:** Makrofotografie kolonií *E. faecalis* narostlých na Slanetz-Bartley agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *E. faecalis* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)..... **14**
- Obrázek 07:** Makrofotografie kolonií *C. albicans* narostlých na Sabouraud agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *C. albicans* při zvětšení 400× barvených podle Grama (vpravo) **14**
- Obrázek 03:** Schéma roztěru suspenze po povrchu plotny s agarem při stanovování citlivosti k antibiotikům .. **21**

SEZNAM TABULEK

Tabulka 01: Sada antibiotik, které byly použity k testaci citlivosti vybraných bakteriálních kmenů	16
Tabulka 02: Sada antimykotik, které byly použity k testaci citlivosti vybraných kmenů kvasinek	16
Tabulka 03: Interpretace hodnot MALDI skóre v software MALDI Biotyper	20
Tabulka 04: Citlivost testovaných kmenů <i>E. coli</i> (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	32
Tabulka 05: Citlivost testovaných kmenů <i>P. aeruginosa</i> (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	33
Tabulka 06: Citlivost testovaných kmenů <i>Salmonella</i> sp. (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	34
Tabulka 07: Citlivost testovaných kmenů <i>Klebsiella</i> sp. (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	35
Tabulka 08: Citlivost testovaných kmenů <i>S. aureus</i> (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	36
Tabulka 09: Citlivost testovaných kmenů <i>E. faecalis</i> (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017 ..	37
Tabulka 10: Citlivost testovaných kmenů <i>Candida</i> sp. k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017.....	38
Tabulka 11: Citlivost testovaných kmenů <i>Candida</i> sp. k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017 (pokračování)	39

SEZNAM GRAFŮ

Graf 01:	Změny v prevalenci zachycených kmenů <i>E. coli</i> ve vzorcích SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence <i>E. coli</i> v letech 2007–2017 (v %)	25
Graf 02:	Změny v prevalenci zachycených kmenů <i>P. aeruginosa</i> ve vzorcích SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence <i>P. aeruginosa</i> v letech 2007–2017 (v %)	26
Graf 03:	Změny v prevalenci zachycených kmenů <i>Salmonella</i> sp. ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence <i>Salmonella</i> sp. v letech 2007–2017 (v %)	26
Graf 04:	Změny v prevalenci zachycených kmenů <i>Klebsiella</i> sp. ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence <i>Klebsiella</i> sp. v letech 2007–2017 (v %).....	26
Graf 05:	Změny v prevalenci zachycených kmenů <i>S. aureus</i> ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence <i>S. aureus</i> v letech 2007–2017 (v %).....	27
Graf 06:	Změny v prevalenci zachycených kmenů <i>E. faecalis</i> ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence <i>E. faecalis</i> v letech 2007–2017 (v %).....	27
Graf 07:	Změny v prevalenci zachycených kmenů <i>Candida</i> sp. ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence <i>Candida</i> sp. v letech 2007–2017 (v %)	27
Graf 08:	Citlivost testovaných kmenů <i>E. coli</i> (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	32
Graf 09:	Citlivost testovaných kmenů <i>P. aeruginosa</i> (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	33
Graf 10:	Citlivost testovaných kmenů <i>Salmonella</i> sp. (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	34
Graf 11:	Citlivost testovaných kmenů <i>Klebsiella</i> sp. (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	35
Graf 12:	Citlivost testovaných kmenů <i>S. aureus</i> (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017	36
Graf 13:	Citlivost testovaných kmenů <i>E. faecalis</i> (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017 ..	37
Graf 14:	Citlivost testovaných kmenů <i>Candida</i> sp. k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017.....	38
Graf 15:	Citlivost testovaných kmenů <i>Candida</i> sp. k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017 (pokračování)	39

1 ÚVOD

Stále častější výskyt mikroorganismů rezistentních vůči různým antimikrobiálním látkám představuje jeden z nejvýznamnějších globálních problémů, kterému lidstvo v současné době čelí. Lidé i zvířata se jako evolučně mladší eukaryotické organismy museli vyrovnat s tím, že z hlediska počtu jednotlivců, rychlosti reprodukce a schopnosti adaptace vůči stále se měnícím vnějším podmínkám na této planetě jednoznačně dominují prokaryotické mikroorganismy. Tyto mikroorganismy mohou mít na lidi i zvířata pozitivní (např. střevní bakterie napomáhající trávení) i negativní vliv (např. patogenní mikroorganismy způsobující onemocnění). Potřeba vyšších živočichů regulovat počty a typy mikroorganismů přítomných v jejich těle zřejmě vyústila v evoluci imunitního systému jakožto účinné bariéry proti agresivnímu mikrobiálnímu okolnímu prostředí.

Imunitní systém však není v tomto ohledu všemocný, protože mikrobiální infekce představovaly a stále představují velký problém zejm. u dětí či seniorů, u lidí s imunodeficity a jinými podružnými komplikacemi nebo u onkologických pacientů po chemoterapii. Zlomový okamžik přišel v roce 1928, kdy Alexander Fleming pozoruhodnou náhodou objevil penicilin (Fleming, 1929; Wong, 2003), který byl po dalším výzkumu (Chain et Florey, 1940) aplikován během druhé světové války jako první antibiotikum. Použití antibiotika ovšem vyvolává stres u exponované populace mikroorganismů, což postupně vede k selekci a šíření mutantů, kteří získali rezistenci proti tomuto antibiotiku. Proto se velice brzy po druhé světové válce začaly vyskytovat první případy rezistencí.

Hlavních příčin vzniku rezistencí vůči antimikrobiálním látkám je v současné době hned několik. Bylo prokázáno spojení mezi mírou užívání daného přípravku a rychlostí vzniku rezistence k tomuto přípravku (Goossens, 2009). Dále bylo prokázáno, že nesprávné a nadbytečné předepisování antimikrobiálních přípravků lékaři také vede k rozvoji rezistence (Andreatos et al., 2018). Intenzivní využívání antimikrobiálních látek v zemědělství k prevenci i terapii také vede k postupné propagaci rezistentních kmenů (Bzdil et Chaloupka, 2017). Své nezastupitelné místo na poli vzniku nových rezistencí má také volná dostupnost a distribuce antimikrobiálních látek v některých zemích (Bin Nafisah et al., 2017).

Podle světové zdravotnické organizace (*world health organisation*, zkr. WHO) v současnosti mezi nejvíce nebezpečné rezistentní kmeny patří methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (zkr. MRSA), vankomycin-rezistentní enterokoky (zkr. VRE, např. *Enterococcus faecalis* nebo *Enterococcus faecium*), karbapenem-rezistentní *Enterobacteriaceae* (zkr. CRE, např. *Escherichia coli* nebo *Klebsiella pneumoniae*), ESBL (*extended spectrum betalactamase*) produkující *Enterobacteriaceae*, rezistentní *Streptococcus pneumoniae*, rezistentní *Mycobacterium tuberculosis* nebo rezistentní *Pseudomonas aeruginosa*. Ventola, 2015, za potenciálně nebezpečnou označuje také rezistentní *Neisseria gonorrhoeae*.

Otázkou zůstává, jakým způsobem by se lidstvo mělo snažit problém antimikrobiální rezistence řešit. Je zřejmé, že k účinnému řešení situace nebo alespoň ke zpomalení ztráty citlivosti k antimikrobiálním látkám je zapotřebí vysokého stupně spolupráce a integrace pověřených autorit napříč zeměmi celého světa. Jestli se spíše vydat poněkud přirozenější cestou a pomocí různých rekombinantních aj. technologií se snažit dovést náš imunitní systém k dokonalosti anebo pokračovat ve (zřejmě předem prohrané) „válce ve zbrojení“ ve snaze získat „ultimátní“ antimikrobiální látku, ke které se již nebudou u mikroorganismů tvořit rezistence. Existují zřejmě i jiné přístupy, ale základní dogma by mělo být následující:

K mikrobiomu naší planety je potřeba přistupovat s maximálním respektem a lidstvo by se mělo snažit zodpovědně řešit ty dílčí problémy, které v současné době řešit lze. Mezi řešitelné problémy patří např.: Zvýšení zmíněné integrace na poli antimikrobiální politiky, zavedení přísné regulace volně dostupných antimikrobiálních látek v zemích, kde tomu tak doposud není, zlepšování čistoty chovatelských prostor a zavádění takových norem a standardů pro chov, aby se zvířata nemusely preventivně léčit antibiotiky, hledání alternativních metod léčby mikrobiálních infekcí, využití genového inženýrství k posílení imunitního systému zvířat a člověka anebo zkrátka tlumení nevhodného a nepotřebného předepisování antimikrobiálních látek jak v humánní, tak ve veterinární sféře.

2 CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá problematikou rezistence k antimikrobiálním látkám u těchto sedmi mikroorganismů: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Candida* sp.

Cílem teoretické části, která zahrnuje kapitolu **LITERÁRNÍ PŘEHLED**, bylo s pomocí aktuálně dostupné vědecké literatury shrnout dosavadní poznatky o biologii výše uvedených sedmi studovaných mikroorganismů, zejm. pak o jejich klasifikaci a typizaci, jejich patogenitě ve veterinární a humánní sféře, jejich známých genech rezistence, jejich mechanismech antimikrobiální rezistence, a nakonec také o jejich současně hlášené citlivosti k vybraným antimikrobiálním látkám.

Cílem experimentální části, která je popsána v rámci kapitol **MATERIÁL A METODIKA**, **VÝSLEDKY** a **DISKUZE**, bylo vytvořit přehled stavu antimikrobiální rezistence ve veterinární sféře moravského a slezského regionu České republiky v letech 2007–2017. Tento přehled byl sestaven s využitím vlastních naměřených dat sestávajících ze stanovených citlivostí k vybrané sadě antibiotik či antimykotik celkem u 175 mikrobiálních kmenů (25 kmenů od každého studovaného mikroba), a dále s využitím archivovaných dat Státního veterinárního ústavu Olomouc (dále jen zkr. SVÚ Olomouc), na kterém byla diplomová práce vypracována. Dílčí experimentální cíle byly následující:

- (1.) Popsat změny prevalence v letech 2007–2017 u výše uvedených sedmi studovaných mikrobů ve vzorcích spádové oblasti SVÚ Olomouc.
- (2.) Popsat a statisticky zhodnotit změny v citlivostech k vybraným antimikrobiálním látkám v letech 2007–2017 u výše uvedených sedmi studovaných mikrobů ve vzorcích spádové oblasti SVÚ Olomouc.
- (3.) Porovnat údaje antimikrobiálních citlivostí výše zmíněných mikrobů získané vlastním měřením (malý soubor dat) s údaji SVÚ Olomouc naměřenými za rok 2017 (velký soubor dat). Tímto způsobem ověřit, jestli k získání důvěryhodného údaje antimikrobiální citlivosti stačí stanovit citlivost pouze u 25 kmenů jednoho mikroorganismu.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika *Escherichia coli*

3.1.1 Klasifikace a typizace *E. coli*

Bakterii *Escherichia coli* v roce 1885 objevil a roku 1886 popsal rakouský lékař Theodor von Escherich. Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní nesporeující a pohyblivé mikroorganismy, jejichž buňky mají tyčinkovitý tvar a jsou dlouhé 2–3 µm a tlusté 0,5–0,8 µm. *E. coli* náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*. Genom *E. coli* je uložen v 1 prokaryotickém cirkulárním chromozómu o velikosti asi 4,6 milionů bází párů. Je dobře kultivovatelná na většině mikrobiologických půd. Z hlediska biochemických testů je *E. coli* kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní, ureáza-negativní a převažuje u ní fermentativní typ metabolismu. Imunologicky nejzajímavější strukturami jsou u *E. coli* „tělové“ O-antigeny (specifické části polysacharidového řetězce lipopolysacharidu vnější membrány), „biččkové“ a „fimbriální“ H-antigeny (polymerizované proteiny flageliny) anebo „kapsulární“ polysacharidové a polypeptidické K-antigeny (Votava, 2005).

3.1.2 Patogenita a klinický význam *E. coli*

E. coli kolonizuje střevo obratlovců jako součást běžné střevní mikroflóry, kde vůči svému hostiteli nejčastěji vystupuje jako komenzál, saprofyt a částečně i symbiont, ale v určitých případech se z ní může stát také patogen. Mimo střevo je *E. coli* patogenní vždy a uvnitř střeva dochází u *E. coli* k patogenezi pouze pokud je příslušný kmen vybaven faktory virulence. Na základě těchto faktorů virulence rozdělujeme patogenní *E. coli* do několika skupin (Mirhoseini *et al.*, 2018):

EPEC (zkr. *enterotoxigenic E. coli*) patří k jednomu z nejvýznamnějších bakteriálních původců průjmových onemocnění v rozvojových zemích. Jsou hlášeny infekce lidí, psů, prasat a přežvýkavců (Mainil, 2013). Těmito kmeny *E. coli* jsou také nejčastěji infikováni ti, kteří trpí tzv. cestovatelským průjmem. Průjem způsobený EPEC může být mírný až velmi závažný s rizikem rozsáhlé dehydratace. Obvykle je nákaza EPEC doprovázena bolestmi břicha, nevolnostmi, zvracením a méně zřídka také horečkou a bolestmi hlavy (Qadri *et al.*, 2005). EPEC produkuje dva hlavní typy virulentních faktorů – enterotoxin LT (tepelně labilní) a enterotoxin ST (tepelně stabilní). Oba dva mají za následek zvýšenou sekreci vody epiteliálními buňkami do lumen střeva (Sánchez *et Holmgren*, 2005).

EIEC (zkr. *enteroinvasive E. coli*) kmeny jsou díky faktorům invazivity schopny invadovat do sliznic střeva, čímž mohou způsobit pro tento kmen typické krvavé průjmy (Mainil, 2013). Jsou hlášeny infekce lidí a primátů (Mainil, 2013).

EAdEC (zkr. *enteroadherent E. coli*) neboli EAaggEC (zkr. *enteroaggregative E. coli*) kmeny vyvolávají průjmová onemocnění u lidí (Mainil, 2013) a jsou specifické svým genem *aggR* a vysokou schopností adherovat na proteiny extracelulární matrix střevního epitelia, konkrétně na fibronectin,

laminin a kolagen IV (Harrington *et al.*, 2006). Zvláštním případem EAEC jsou kmeny DAEC (zkr. *diffusely adherent E. coli*), které infikují lidi i zvířata a jsou specifické produkcí afimbriálních adhezínů. DAEC způsobují průjemy, infekce močových cest a díky schopno difúzní adherence k buňkám mohou snadno přejít i v bakteriémii až sepsi (Mainil, 2013).

EPEC (zkr. *enteropathogenic E. coli*) napadají všechny savce (Mainil, 2013) a jsou také schopny rozsáhlé adherence na střevní buňky díky genu *eae*, jehož produktem je protein vnější membrány zvaný intimin (Magdy *et al.*, 2015). Stejně jako i u předchozích patogenních kmenů *E. coli* je i u EPEC hlavním problémem způsobený průjem.

EHEC (zkr. *enterohemorrhagic E. coli*) kmeny jsou rozšířené v industrializovaných zemích a přenášeny zejm. kontaminovanými potravinami či vodou. Napadají člověka a skot (Mainil, 2013). Specifikem na poli faktorů virulence je u těchto kmenů produkce Shiga-like toxinu, díky čemuž se někdy nazývají STEC (zkr. *shiga-like toxicogenic E. coli*). Jejich původní název EHEC vychází z krvácení do střeva, které vyvolávají. Krvavé průjemy (hemoragické kolitidy) ovšem bývají pouze začátkem infekce, jelikož v průběhu onemocnění dochází k rozšíření infekce i mimo střevo a vzniku tzv. hemolyticko-uremického syndromu, který může vyústit až v selhání ledvin (Hartland *et Leong*, 2013).

UPEC (zkr. *uropathogenic E. coli*) kmeny napadají urogenitální trakt člověka i zvířat (Mainil, 2013) a produkují mnoho faktorů virulence, např. různé adheziny a toxiny, proteázy nebo komponenty utvářející ochranné bakteriální pouzdro (Shakhatreh *et al.*, 2018). Někdy se vyčleňuje ještě jedna skupina kmenů *E. coli* zvaná NTEC (zkr. *necrotoxicogenic E. coli*), která je známa produkcí cytotoxických nekrotizujících faktorů CNF1 a CNF2, které způsobují nekrózu na kůži králíků a smrt myši (Orden *et al.*, 1999).

3.1.3 Citlivost *E. coli* k antibiotikům

Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí (zkr. ECDC, *european centre for disease prevention and control*) v rámci svého programu EARS-Net (zkr. *european antimicrobial resistance surveillance network*) uvádí následující antimikrobní rezistence u *E. coli* v roce 2016 pro Českou republiku: **55,1 %** z 3055 testovaných izolátů rezistentních k aminopenicilinům, **27,6 %** z 3061 testovaných izolátů rezistentních k fluorochinolonům, **15,1 %** z 3061 testovaných izolátů rezistentních k cefalosporinům třetí generace, **12,2 %** z 3061 testovaných izolátů rezistentních k aminoglykosidům a **0 %** z 1483 testovaných izolátů rezistentních ke karbapenemům. Pro srovnání jsou dále uvedeny i následující zjištěné rezistence *E. coli* pocházející ze stejné databáze pro Belgii a Bulharsko.

V Belgii byly u *E. coli* za rok 2016 naměřeny následující antimikrobní rezistence: **58,0 %** z 3736 testovaných izolátů rezistentních k aminopenicilinům, **24,5 %** z 3854 testovaných izolátů rezistentních k fluorochinolonům, **10,5 %** z 3737 testovaných izolátů rezistentních k cefalosporinům

třetí generace, **8,4 %** z 3499 testovaných izolátů rezistentních k aminoglykosidům a **0,1 %** z 3845 testovaných izolátů rezistentních ke karbapenemům.

Naopak v Bulharsku byly u *E. coli* za rok 2016 naměřeny tyto antimikrobní rezistence: **78,0 %** z 186 testovaných izolátů rezistentních k aminopenicilinům, **42,2 %** z 237 testovaných izolátů rezistentních k fluorochinolonům, **41,6 %** z 238 testovaných izolátů rezistentních k cefalosporinům třetí generace, **34,8 %** z 210 testovaných izolátů rezistentních k aminoglykosidům a **1,0 %** z 411 testovaných izolátů rezistentních ke karbapenemům.

3.2 Charakteristika *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.1 Klasifikace a typizace *P. aeruginosa*

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* jsou gramnegativní fakultativně anaerobní nesporeující a pohyblivé mikroorganismy, jejichž buňky mají tyčinkovitý tvar. *P. aeruginosa* náleží do čeledi *Pseudomonaceae*. Genom *P. aeruginosa* je uložen v 1 prokaryotickém cirkulárním chromozómu o velikosti asi 5,2–7 milionů bází párů. Je dobře kultivovatelná na většině mikrobiologických půd se specifickou tvorbou nejčastěji zelených pigmentů (pyocyanin, pyoverdin, fluorescein). Z hlediska biochemických testů je *P. aeruginosa* kataláza-pozitivní, oxidáza-pozitivní, ureáza-pozitivní a převažuje u ní fermentativní typ metabolismu. *P. aeruginosa* má somatické, bičíkové i fimbriální antigeny (Votava, 2005).

3.2.2 Patogenita a klinický význam *P. aeruginosa*

P. aeruginosa je oportunistickým patogenem lidí i zvířat, přičemž specifikem u tohoto mikroba je střídání dvou životních stylů, z nichž první představuje existenci ve formě volných buněk způsobujících spíše akutní infekce, kdežto druhý představuje existenci ve formě usedlých buněk (někdy tvořících biofilmy) způsobujících spíše chronické infekce (Valentini *et al.*, 2018). Infekce mohou být lokalizovány např. na kůži, v uších a očích, v srdci nebo v močových a dýchacích cestách (Gellatly *et Hancock*, 2013). Problém představuje *P. aeruginosa* zejm. v nemocničním prostředí, ve které je součástí tzv. nozokomiálních nákaz.

3.2.3 Citlivost *P. aeruginosa* k antibiotikům

ECDC v rámci svého programu [EARS-Net](#) uvádí následující antimikrobní rezistence u *P. aeruginosa* v roce 2016 pro Českou republiku: **25,3 %** z 458 testovaných izolátů rezistentních k piperacilinu/tazobaktamu, **34,7 %** z 464 testovaných izolátů rezistentních k fluorochinolonům, **18,8 %** z 464 testovaných izolátů rezistentních k aminoglykosidům, **8,8 %** z 464 testovaných izolátů rezistentních ke karbapenemům. Pro srovnání jsou dále uvedeny i následující zjištěné rezistence *P. aeruginosa* pocházející ze stejné databáze pro Belgie a Bulharsko.

V Belgii byly u *P. aeruginosa* za rok 2016 naměřeny následující antimikrobní rezistence: **9,7 %** z 318 testovaných izolátů rezistentních k piperacilinu/tazobaktamu, **14,5 %** z 366 testovaných izolátů rezistentních k fluorochinolonům, **11,0 %** z 327 testovaných izolátů rezistentních k aminoglykosidům, **9,6 %** z 365 testovaných izolátů rezistentních ke karbapenemům.

Naopak v Bulharsku byly u *P. aeruginosa* za rok 2016 naměřeny tyto antimikrobní rezistence: **40,0 %** z 55 testovaných izolátů rezistentních k piperacilinu/tazobaktamu, **35,7 %** z 56 testovaných izolátů rezistentních k fluorochinolonům, **48,7 %** z 39 testovaných izolátů rezistentních k aminoglykosidům a **30,4 %** z 56 testovaných izolátů rezistentních ke karbapenemům.

3.3 Charakteristika *Salmonella* sp.

3.3.1 Klasifikace a typizace *Salmonella* sp.

Bakterii *Salmonella* sp. v roce 1885 objevil Theobald Smith. Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní nesporulující a pohyblivé mikroorganismy, jejichž buňky mají tyčinkovitý tvar a jsou dlouhé 2–5 µm a tlusté 0,7–1,5 µm (Fàbrega et Vila, 2013). *Salmonella* sp. náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*. Genom *Salmonella* sp. je uložen v 1 prokaryotickém cirkulárním chromozómu o velikosti asi 4,5 milionů bází párů (McClelland et al., 2004). Z hlediska biochemie je *Salmonella* sp. kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní, ureáza-negativní a dobře roste v přítomnosti sloučenin selenu, čehož se využívá při selektivní kultivaci. *Salmonella* sp. produkuje „tělní“ O-antigeny a „bičkové“ H-antigeny (Votava, 2005).

3.3.2 Patogenita a klinický význam *Salmonella* sp.

Rod *Salmonella* zahrnuje dva druhy *Salmonella bongori* a *Salmonella enterica*, která se dále dělí do 6 poddruhů (např. *Salmonella enterica* ssp. *enterica*) a ty se dále dělí do tzv. sérovarů (sérotypů) na základě výše uvedené antigenního O/H složení. Sérovar *Salmonella enterica* spp. *enterica* Typhi způsobuje primárně u lidí břišní tyfus (Wain et al., 2015), který se projevuje vysokými septickými horečkami, bolestí břicha a hlavy, růžovými skvrnami na těle a nevolnostmi, kdežto sérovary *Salmonella enterica* spp. *enterica* Paratyphi A až C způsobují paratyfus, který se břišnímu tyfu podobá, ale mívá mírnější průběh. V případě zoonotických nákaz, např. *Salmonella enterica* spp. *enterica* Typhimurium mluvíme o tzv. salmonelózách, které se nejčastěji projevují jako průjemová onemocnění bez komplikací. Problémy mohou nastat v případě zapojení faktorů virulence, které jsou lokalizovány v tzv. „salmonelových ostrovech patogenity“ (Marcus et al., 2000).

3.3.3 Citlivost *Salmonella* sp. k antibiotikům

ECDC v rámci svého programu [EARS-Net](#) neuvádí žádná ohledně antimikrobní rezistence u *Salmonella* sp. v roce 2016 pro Českou republiku ani pro jiné země EU. V literatuře se nachází různé zmínky, např. Luo et al., 2018, ve svém výzkumu v rámci Číny následující antimikrobní rezistence:

ampicilin (**57,69 %**), kanamycin (**53,85 %**) a tetracyklin (**40,38 %**). Dále např. [Nhung et al., 2018](#), uvádí v rámci Vietnamu vysoké rezistence k chinolonům (**52,2 %**) a β -laktamům (**49,6 %**) a na druhé straně nízké rezistence vůči cefalosporinům třetí generace (**4,4 %**) a aminoglykosidům (**0,8 %**). Z České republiky popisuje stav antimikrobiální rezistence u *Salmonella* sp. v brněnské čističce odpadních vod [Masaříková et al., 2016](#) takto: nejčastější byla rezistence k tetracyklinu (**24 %**, 9 z 38 testovaných), ampicilinu a streptomycinu (oba **21%**, 8 z 38 testovaných) a k sulfonamidům (**18 %**, 7 z 38 testovaných).

3.4 Charakteristika *Klebsiella* sp.

3.4.1 Klasifikace a typizace *Klebsiella* sp.

Bakterii *Klebsiella* sp. v roce 1883 objevil Carl Friedländer. Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní nesporulující a nepohyblivé mikroorganismy, jejichž buňky mají tyčinkovitý tvar. *Klebsiella* sp. náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*. Genom *Klebsiella* sp. je uložen v 1 prokaryotickém cirkulárním chromozómu o velikosti asi 5,6 milionů bází párů. Z hlediska biochemie je *Klebsiella* sp. kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní, ureáza-pozitivní. *Klebsiella* sp. produkuje antigeny utvářející pouzdro a O-antigeny ([Votava, 2005](#)).

3.4.2 Patogenita a klinický význam *Klebsiella* sp.

Klebsiella sp. se může vyskytovat jako komenzál ve střevě obratlovců, v poslední době se ale mnohem více uplatňuje jako oportunní patogen i v rámci nebezpečných nozokomiálních nákaz. Mezi hlavní patogenní druhy patří *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca*. V poslední době se navíc stále zvyšuje podíl kmenů *Klebsiella* sp. produkujících široké spektrum betalaktamázy, tzv. ESBL (zkr. *extended spectrum betalactamases*), které jim poskytují rezistenci k širokému spektru betalaktamových antibiotik ([Podschun et Ullmann, 1998](#)). Je u nich velké riziko vzniku infekcí močových a dýchacích cest až systémových sepsí ([Bagley, 1985](#)). Nejvíce rizikové jsou infekce *K. pneumoniae* pro malé děti, seniory a imunokompromitované jedince ([Wyres et Holt, 2016](#)).

3.4.3 Citlivost *Klebsiella pneumoniae* k antibiotikům

ECDC v rámci svého programu [EARS-Net](#) uvádí následující antimikrobní rezistence u *K. pneumoniae* v roce 2016 pro Českou republiku: **0,0 %** z 1096 testovaných izolátů rezistentních ke karbapenemům, **50,5 %** z 1384 testovaných izolátů rezistentních k fluorochinolonům, **51,8 %** z 1384 testovaných izolátů rezistentních k cefalosporinům třetí generace a **47,1 %** z 1385 testovaných izolátů rezistentních k aminoglykosidům. Pro srovnání jsou dále uvedeny i následující zjištěné rezistence *K. pneumoniae* pocházející ze stejné databáze pro Belgie a Bulharsko.

V Belgii byly u *K. pneumoniae* za rok 2016 naměřeny následující antimikrobní rezistence: **2,4 %** z 669 testovaných izolátů rezistentních ke karbapenemům, **23,6 %** z 669 testovaných izolátů

rezistentních k fluorochinolonům, **22,9 %** z 669 testovaných izolátů rezistentních k cefalosporinům třetí generace a **13,8 %** z 637 testovaných izolátů rezistentních k aminoglykosidům.

Naopak v Bulharsku byly u *K. pneumoniae* za rok 2016 naměřeny tyto antimikrobní rezistence: **4,4 %** z 159 testovaných izolátů rezistentních ke karbapenemům, **55,6 %** z 160 testovaných izolátů rezistentních k fluorochinolonům, **72,5 %** z 160 testovaných izolátů rezistentních k cefalosporinům třetí generace a **64,4 %** z 135 testovaných izolátů rezistentních k aminoglykosidům.

3.5 Charakteristika *Staphylococcus aureus*

3.5.1 Klasifikace a typizace *S. aureus*

Staphylococcus aureus jsou grampozitivní fakultativně anaerobní nesporeující a nepohyblivé oválné koky o průměru přibližně 1 μm významný v humánní i veterinární klinické sféře, ve které patří např. mezi patogeny mléčné žlázy skotu (Bzdil *et* Chaloupka, 2017). *S. aureus* patří do čeledi *Staphylococcaceae*. Jedná se o oportunistický patogen a přibližně u třetiny lidské populace bezpříznakově kolonizuje nosní sliznice, podpaží, rozkrok a okolí rektu (Tong *et al.*, 2015). Genom *S. aureus* je uložen v 1 prokaryotickém cirkulárním chromozómu o velikosti asi 2,7 milionu bází párů. Z hlediska biochemie je *S. aureus* kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní, ureáza-pozitivní. *S. aureus* tvoří řadu významných antigenů, např. kyselinu teichoovou, protein A, stafylokokový peptidoglykan (murein) a v některých případech také kapsulární antigeny (Votava, 2005).

3.5.2 Patogenita a klinický význam *S. aureus*

Porušením kožního povrchu např. díky poranění může dojít k zanesení *S. aureus* do rány. Infekce se primárně rozvíjí ve formě celulitidy nebo folikulitidy v podkožní tkáni, ale sekundárně může *S. aureus* způsobovat i osteomyelitidu, pneumonii, bakteriální endokarditidu, bakteriémií až sepsi. Typicky se infekce *S. aureus* projevuje hnisavým zánětem a abscesem (Kobayashi *et al.*, 2015). U zvířat jsou obvykle hlášeny výskyty *S. aureus* u domácích i užitkových zvířat (Aires-de-Sousa, 2017). U zvířat se infekce rozvíjí podobným způsobem, ale nejběžnějšími komplikacemi jsou dermatitidy, kdežto závažnější osteomyelitidy či endokarditidy jsou hlášeny jen zřídka vzhledem ke krátké době života zvířat (Peton *et* Le Loir, 2014). Největší riziko ve veterinární sféře představuje *S. aureus* v ohrožení kvality chovného produktu jako jsou vajíčka u drůbeže, maso u prasat anebo mléko u skotu, u kterého mluvíme o tzv. mastitidě, což je onemocnění mléčné žlázy.

Závažnost stafylokokových infekcí spočívá v mnoha faktorech virulence, kterými *S. aureus* disponuje. Mezi povrchové faktory virulence zařazujeme zejm. protein A, který stafylokoka chrání před složkami humorální imunity a vázanou koagulázu neboli *clumping factor A*, která prostřednictvím přeměny fibrinogenu na fibrin vyvolává srážení plazmy a shlukování stafylokoků. Mimo povrchové faktory dále stafylokoky do svého okolí sekretují extracelulární patogenní enzymy a toxiny.

Nejzmiňovanějšími enzymy *S. aureus* bývá volná koaguláza s obdobnou funkcí jako výše zmíněná vázaná koaguláza, dále hyaluronidáza a neuraminidáza umožňující snadnější šíření ve tkáních vlivem narušování mezibuněčných struktur a v neposlední řadě také různé bakteriální lipázy, které usnadňují šíření stafylokoků v podkoží a v mazových a mléčných žlázách. Některé kmeny *S. aureus* produkují toxiny, z nichž nejvýznamnější jsou hemoliziny typu α , β , γ i δ a dále leukocidiny včetně Pantonova-Valentinova leukocidinu usmrcujícího neutrofilů a makrofágy. Stafylokokové enterotoxiny jsou významné hlavně kvůli jejich vysoké termostabilitě a odolnosti vůči trávicímu aparátu. Společně s enterotoxiny může toxin syndromu toxického šoku 1 (TSST-1) vyvolávat otravy z potravin včetně otravy ze stafylokokem kontaminovaného mléka (Bien *et al.*, 2011).

3.5.3 Citlivost *S. aureus* k antibiotikům

ECDC v rámci svého programu EARS-Net uvádí antimikrobní rezistence u *S. aureus* v roce 2016 pro Českou republiku pouze k methicilinu (oxacilinu): 13,9 % rezistentních z 1887 testovaných izolátů. Pro srovnání jsou dále uvedeny i následující zjištěné rezistence *S. aureus* pocházející ze stejné databáze pro Belgie a Bulharsko. V Belgii bylo u *S. aureus* za rok 2016 zjištěno 12,2 % rezistentních z 1364 testovaných izolátů. V Bulharsku bylo u *S. aureus* za rok 2016 zjištěno 14,3 % rezistentních z 231 testovaných izolátů.

Dále např. Wang *et al.*, 2016 uvádí alarmující situaci testování citlivosti kmenů *S. aureus* izolovaných z celkově 327 vzorků mléka ve své studii z Číny. Kmeny byly v tomto případě rezistentní k sulfomethoxazolu (100 %), penicilinu G (94,3 %), ampicilinu (94,3 %), erythromycinu (68,6 %), azithromycinu (68,6 %), klindamycinu (25,7 %), amoxicilinu (11,4 %) a k tetracyklinu (5,7 %). Všechny byly ale zároveň citlivé např. k oxacilinu (100 %), cefalotinu (100 %), neomycinu (100 %) nebo chloramfenikolu (100 %). Další studie pochází z Rumunska, ve které Bouari *et al.*, 2016 uvádí rezistenci mastitidních kmenů *S. aureus* k penicilinu G a tetracyklinu a na druhé straně citlivost k enrofloxacinu a amoxicilin/klavulanu.

3.6 Charakteristika *Enterococcus faecalis*

3.6.1 Klasifikace a typizace *E. faecalis*

E. faecalis jsou grampozitivní fakultativně anaerobní nesporulující a nepohyblivé oválné koky. *E. faecalis* náleží do čeledi *Enterococcaceae*. Genom *E. faecalis* je uložen v 1 prokaryotickém cirkulárním chromozómu o velikosti asi 3,2 milionů bází párů. Z hlediska biochemie je *E. faecalis* kataláza-negativní, oxidáza-negativní a ureáza negativní. *E. faecalis* produkuje společný skupinový antigen D, kterým je kyselina glycerol-teichoová v buněčné stěně (Votava, 2005).

3.6.2 Patogenita a klinický význam *E. faecalis*

E. faecalis je běžnou součástí střevní mikroflóry, ale zároveň vystupuje jako oportunistický patogen. U lidí může způsobovat infekce močových cest nebo nebezpečnou endokarditidu, septické stavy či meningitidu. Některé kmeny *E. faecalis* jsou hemolytické a v případě infekce tak přinášejí další komplikace (Huycke *et al.*, 1991). *E. faecalis* také často bývá původcem problémů spojených s infekcí zubního kořenového kanálku (Stuart *et al.*, 2006).

3.6.3 Citlivost *E. faecalis* k antibiotikům v Evropě

ECDC v rámci svého programu EARS-Net uvádí následující antimikrobní rezistence u *E. faecalis* v roce 2016 pro Českou republiku: **1,2 %** z 515 testovaných izolátů rezistentních k aminopenicilinům, **0 %** z 514 testovaných izolátů rezistentních k vankomycinu a **37,1 %** z 515 testovaných izolátů rezistentních ke gentamicinu. Pro srovnání jsou dále uvedeny i následující zjištěné rezistence *E. faecalis* pocházející ze stejné databáze pro Belgii a Bulharsko.

V Belgii byly u *E. faecalis* za rok 2016 naměřeny následující antimikrobní rezistence: **0,4 %** z 461 testovaných izolátů rezistentních k aminopenicilinům, **0 %** z 463 testovaných izolátů rezistentních k vankomycinu a **19,8 %** z 328 testovaných izolátů rezistentních ke gentamicinu.

Naopak v Bulharsku byly u *E. faecalis* za rok 2016 naměřeny tyto antimikrobní rezistence: **6,1 %** z 114 testovaných izolátů rezistentních k aminopenicilinům, **1,8 %** z 109 testovaných izolátů rezistentních k vankomycinu a **46,9 %** z 98 testovaných izolátů rezistentních ke gentamicinu.

3.7 Charakteristika *Candida* sp.

3.7.1 Klasifikace a typizace *Candida* sp.

Candida sp. je kvasinka spadající do čeledi *Saccharomycetaceae* a do oddělení vřeckovýtrusných hub (*Ascomycota*). Podle Grama se barví pozitivně. Genom *C. albicans* je uložen v 8 lineárních chromozómech o velikosti asi 14,4 milionů bází párů (Braunsdorf *et LeibundGut-Landmann*, 2018). Je dobře kultivovatelná na krevním agaru a na Sabouraudově agaru, ve kterém se využívá schopnosti *Candida* sp. přežít i za nižšího pH (Votava, 2005).

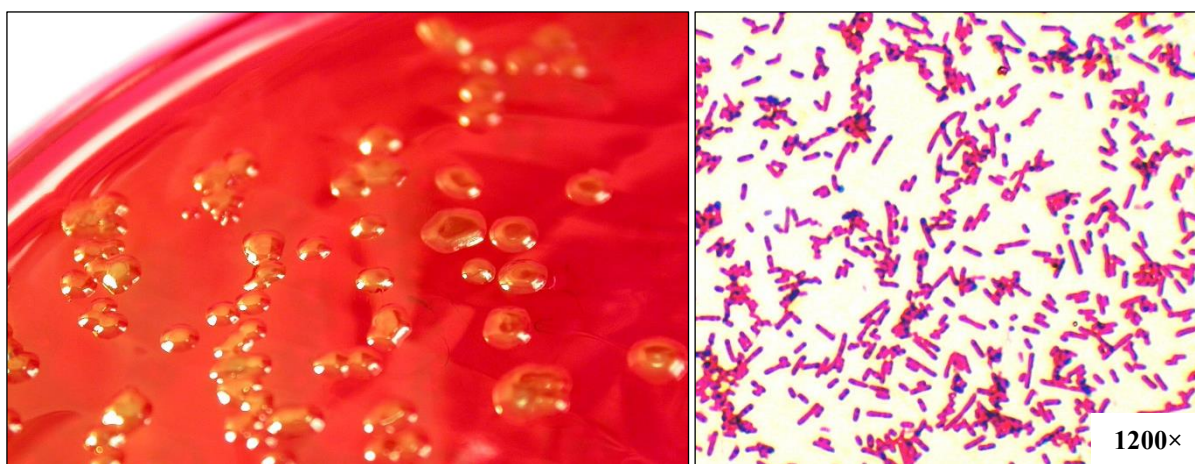
3.7.2 Patogenita a klinický význam *Candida* sp.

Z hlediska patogenity je nejvýznamnějším druhem *Candida albicans*, dále potom *Candida parapsilosis* a *Candida tropicalis*. *C. albicans* je oportunně patogenním mikroblem, který za normálních podmínek kolonizuje velkou část lidské populace. U imunokompromitovaných jedinců či u jedinců, u kterých je normální mikroflóra změněna např. probíhající antibiotickou léčbou může *C. albicans* vyvolávat rozsáhlé infekce, kdy je schopna se z víceméně neškodného jednobuněčného stádia přeměnit v mnohobuněčné pseudohyfální stádium. Tomuto onemocnění se říká kandidóza (Pfaller *et Diekema*,

2007), přičemž pokud se kandidóza vyskytuje na jazyku či ústních sliznicích, říká se tomuto příznaku moučnivka (*soor*). Přeměnu metabolismu z jednobuněčné formy na mnohobuněčnou formu může ovládat změna živin dostupných na daném místě (Miramón *et al.*, 2017). Ke kandidóze je citlivá i většina zvířat, např. ptáci, koně, prasata i kočky. Genetická příbuznost mezi kmeny *C. albicans* izolovanými od zvířat a od lidí avšak není příliš známa (Edelmann *et al.*, 2005).

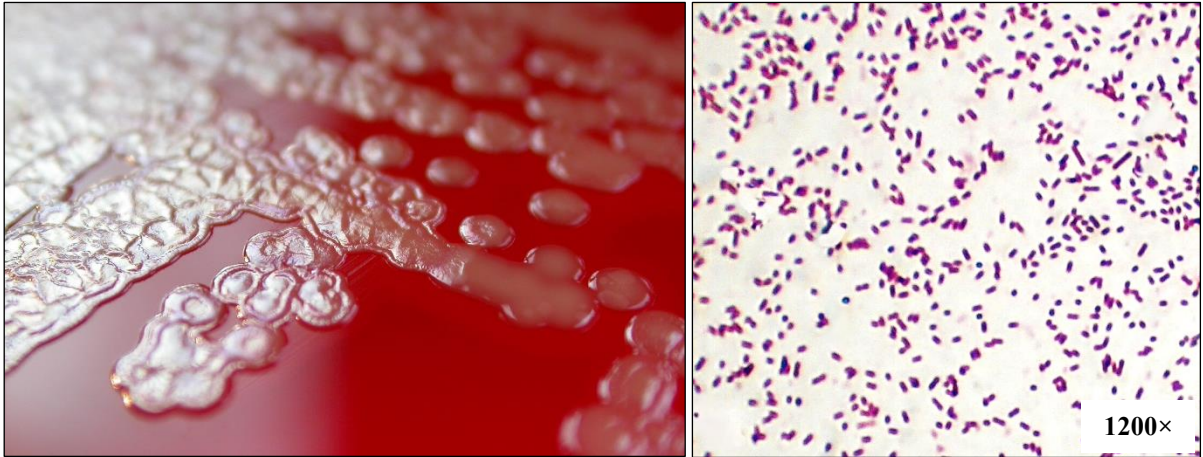
3.7.3 Citlivost *Candida* sp. k antimykotikům

Narůstající rezistence k antimykotikům u různých kmenů *Candida* sp. je dalším znepokojujícím důkazem prohlubující se antimikrobiální krize. Např. Morace *et al.*, 2014 uvádí narůstající antimikrobní rezistence u *Candida* sp. k imidazolům (např. mikonazol, ketokonazol), triazolům (např. flukonazol, itraconazol, vorikonazol), 5-fluorocytosinu a polyenům (např. amfotericin B a nystatin).



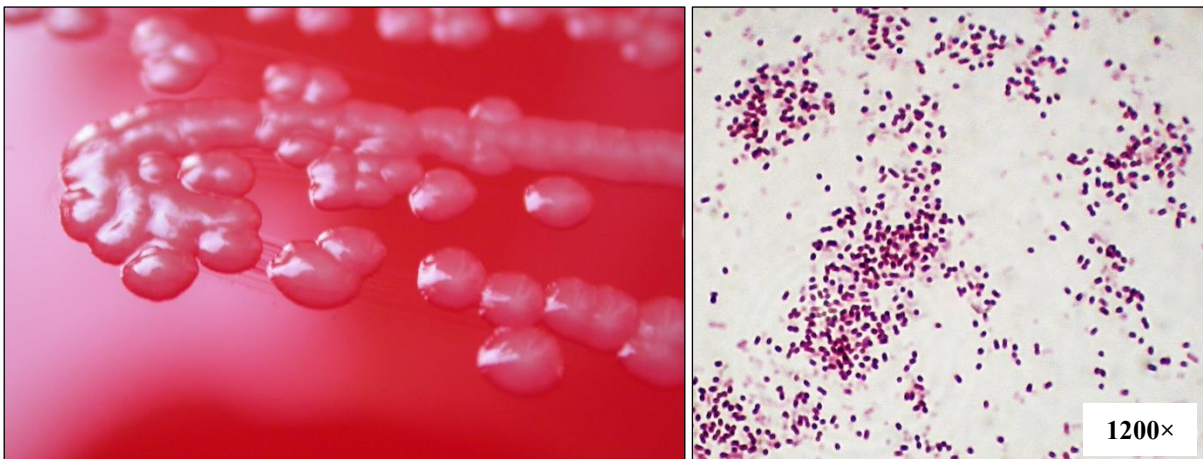
Obrázek 1 – Makrofotografie kolonií *E. coli* narostlých na Endově agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *E. coli* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)

Foto: Jaroslav Bzdil



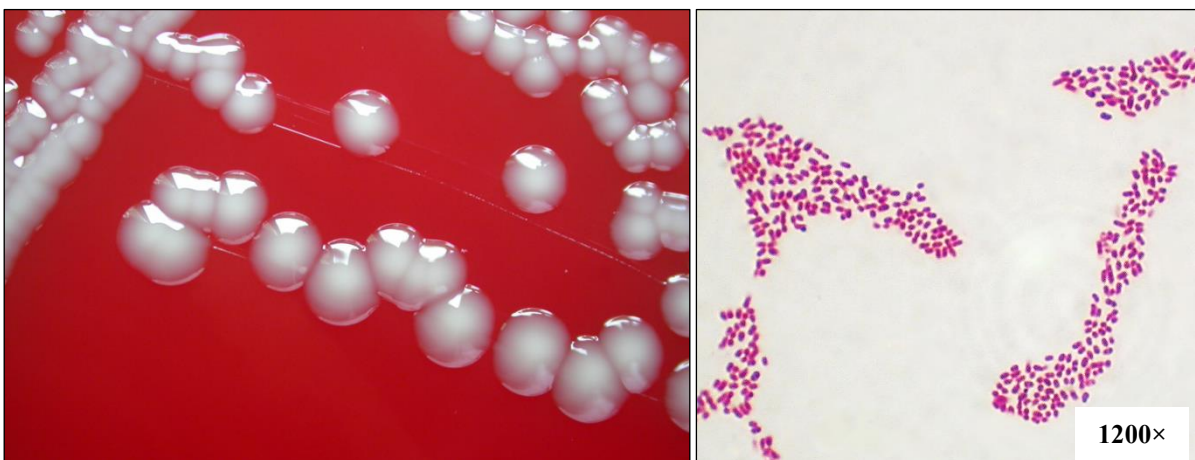
Obrázek 2 – Makrofotografie kolonií *P. aeruginosa* narostlých na krevním agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *P. aeruginosa* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)

Foto: Jaroslav Bzdil



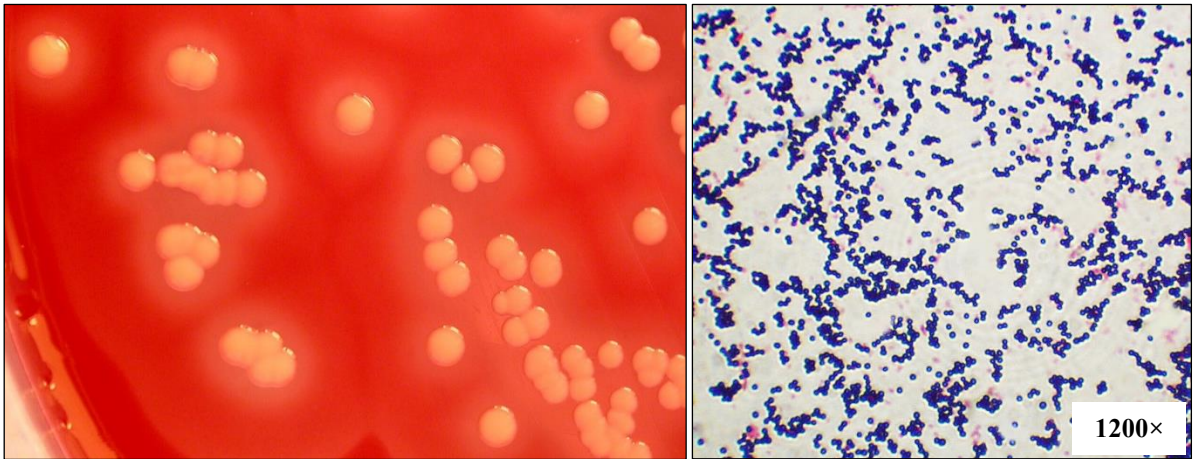
Obrázek 3 – Makrofotografie kolonií *Salmonella* Enteritidis narostlých na krevním agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *S. Enteritidis* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)

Foto: Jaroslav Bzdil



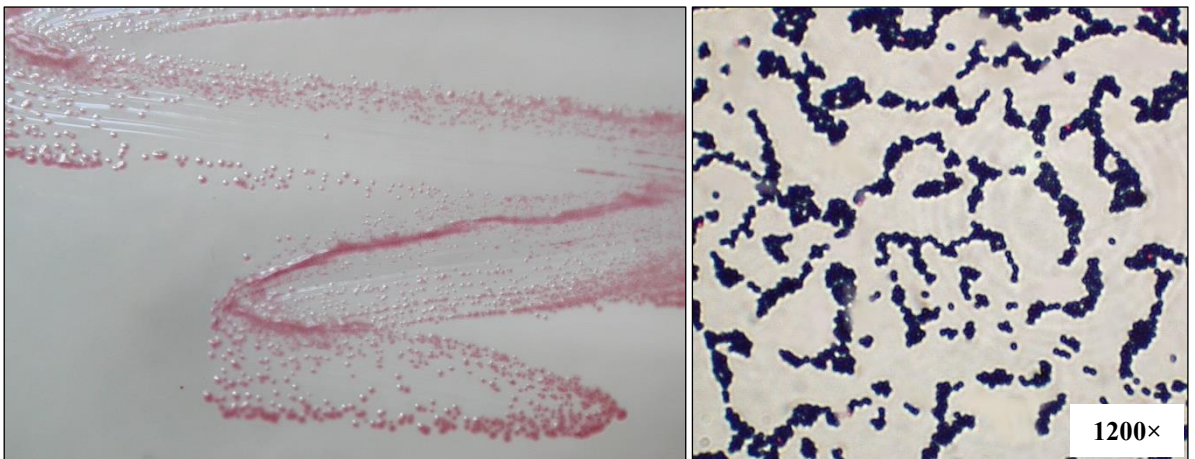
Obrázek 4 – Makrofotografie kolonií *K. pneumoniae* narostlých na krevním agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *K. oxytoca* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)

Foto: Jaroslav Bzdil



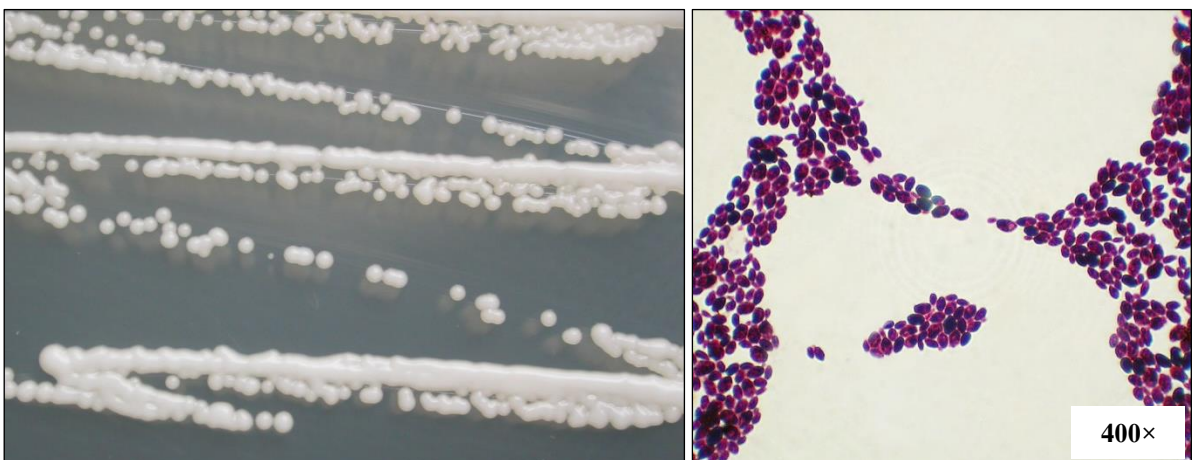
Obrázek 5 – Makrofotografie kolonií *S. aureus* narostlých na krevním agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *S. aureus* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)

Foto: Jaroslav Bzdil



Obrázek 6 – Makrofotografie kolonií *E. faecalis* narostlých na Slanetz-Bartley agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *E. faecalis* při zvětšení 1200× barvených podle Grama (vpravo)

Foto: Jaroslav Bzdil



Obrázek 7 – Makrofotografie kolonií *C. albicans* narostlých na Sabouraud agaru (vlevo) a mikrofotografie buněk *C. albicans* při zvětšení 400× barvených podle Grama (vpravo)

Foto: Jaroslav Bzdil

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- terénní mikrobiální kultury *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *E. faecalis* a *Candida* sp. izolované na SVÚ Olomouc z veterinárního (klinického nebo patologického) materiálu
- referenční mikrobiální kultury *S. aureus* (ATCC25923), *E. coli* (ATCC25922), *P. aeruginosa* (ATCC27853), *C. albicans* (ATCC90028), *C. glabrata* (CCY26-20-1) a *C. pseudotropicalis* (CCY29-8-11) dodané z České sbírky mikroorganismů, Masarykova Univerzita, Brno

4.2 Chemikálie a roztoky

- sada disků s antibiotiky (Oxoid Czech, Brno, CZ) – viz **Tabulka 1**
- sada disků s antimykotiky (Itest Plus, Hradec Králové, CZ) – viz **Tabulka 2**
- 0,9% NaCl fyziologický roztok s 1 % glukózy (Trios, Praha, CZ)
- destilovaná voda nejvyšší kvality (Merck, Darmstadt, DE)
- absolutní ethanol (Merck, Darmstadt, DE)
- acetonitril (Merck, Darmstadt, DE)
- kyselina mravenčí (Merck, Darmstadt, DE)
- kyselina trifluoroctová (Merck, Darmstadt, DE)
- základ matrice – kyselina skořicová (Bruker Daltoniks, Bremen, DE)

4.3 Kultivační půdy

- Mueller-Hinton agar, dále jen zkr. MHA (Trios, Praha, CZ)
- Sabouraudův agar, dále jen zkr. SA (Trios, Praha, CZ)
- krevní agar, dále jen zkr. KA (Trios, Praha, CZ)
- Endův agar, dále jen zkr. EA (Trios, Praha, CZ)
- Edwardsův agar, dále jen zkr. EDW (Trios, Praha, CZ)
- masopeptonový bujón, dále jen zkr. MPB (Trios, Praha, CZ)
- pufrovaná peptonová voda, dále jen zkr. PPV (Trios, Praha, CZ)
- *modified semi-solid Rappaport Vassiliadis* agar, dále jen zkr. MSR/V (Trios, Praha, CZ)
- xylóza-lyzin-deoxycholátový agar, dále jen zkr. XLD (Trios, Praha, CZ)
- diagnostická O a H séra (SIFIN, Berlin, DE)

4.4 Přístroje

- dispensor disků s antimikrobiální látkou (Oxoid Czech, Brno, CZ)

- turbidimetr Densi-La-Meter II (Erba Lachema, Brno, CZ)
- termostat BT120 (Ecom, Polná, CZ)
- centrifuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, DE)
- třepačka MS2 Minishaker (IKA, Staufen, DE)
- mikroskop LABOPHOT 2 (Nikon, JP)
- hmotnostní analyzátor Microflex LT (Bruker Daltoniks, Bremen, DE)
+ ovládací software MALDI Biotyper (Bruker Daltoniks, Bremen, DE)

Tabulka 1 – Sada antibiotik, které byly použity k testaci citlivosti vybraných bakteriálních kmenů

Antibiotikum	Kód	Koncentrace [µg/disk]	Specifita	∅ inhibiční zóny u R kmenů [mm]*	∅ inhibiční zóny S kmenů [mm]*
cefalotin	KF	30		12	18
enrofloxacin	ENR	5		16	20
amoxicilin + klavulan	AMC	20 + 10	G- G+	13 19	18 20
chloramfenikol	C	30		12	18
tetracyklin	T	30		14	19
erytromycin	E	15		13	23
gentamicin	CN	10		12	15
klindamycin	DA	2		14	21
kolistin	CT	10		9	10
cefoperazon	CFP	75		15	21
kotrimoxazol	SXT	25		10	16
piperacilin	PRL	100	<i>P. aeruginosa</i>	17	18
oxacilin	OX	1		19	20
vankomycin	VA	30		9	12
imipenem	IMI	10		16	22
meropenem	MEM	10		16	22

Tabulka 2 – Sada antimykotik, které byly použity k testaci citlivosti vybraných kmenů kvasinek

Antimykotikum	Kód	Koncentrace [µg/disk]	∅ inhibiční zóny u R kmenů [mm]*	∅ inhibiční zóny u S kmenů [mm]*
nystatin	NYS	50	15	16
amfotericin B	AMB	50	10	11
pimaricin	PIM	50	10	11
5-fluorocytosin	5-FC	5	20	21
itrakonazol	ITR	30	10	11
ketokonazol	KET	30	20	21
klotrimazol	KLO	30	20	21
mikonazol	MIK	30	20	21
flukonazol	FLU	25	15	16
ekonazol	EKO	30	20	21
bifonazol	BIF	30	10	11
ciklopiroxolamin	CIK	30	10	11
vorikonazol	VOR	1	16	17

* Vychází z interní normy SVÚ Olomouc a norem EUCAST pro [bakterie](#) a [houby](#) (viz literatura).

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1 Kultivace a izolace mikrobiálních kmenů z klinického a patologického materiálu

Poznámka: Popis této metodiky vychází ze standardizovaného operačního postupu **BAK č. 01/04** využívaném na SVÚ Olomouc, jehož zpracovatelem je **MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.** Tento dokument je interní a neveřejný, proto je níže uveden pouze výpis postupů, které byly použity v rámci vypracovávání experimentální části této diplomové práce.

Každý klinický nebo patologický veterinární biomateriál doručený na SVÚ Olomouc vyžaduje díky své specifitě různé přístupy ke zvolení vhodné bakteriologické kultivační metody. Rozhodovat se můžeme na základě (a) charakteru samotného materiálu, (b) požadavků veterinárního lékaře či chovatele na sledovanou skupinu mikroorganismů, (c) předpisů a norem, které přesně stanovují, jakým způsobem daný materiál vyšetřovat anebo (d) dle mikroorganismů, jejichž přítomnost u daného materiálu očekáváme. Na SVÚ Olomouc se nejvíce vyšetřují následující klinické materiály: mléko, stěry (z kůže, ran, hnisu, punktátů aj.), výtěry (z nosu, krku, zobáku, spojivek, tlamy, popř. dalších sliznic), trus, moč a krev. Nejčastěji vyšetřovaným patologickým materiálem na SVÚ Olomouc jsou orgány zvířat (např. srdce, plíce, játra, slezina, ledviny, část tenkého střeva, mozek, svaly atd.).

Kultivace z mléka byly provedeny ponořením mikrobiologické kličky asi 2 cm pod hladinu mléka doručeného ve sterilní zkumavce a kapka ulpělá na kličce byla rozetřena po plotnách s KA, které necháme inkubovat při 36–37,5 °C po dobu 42–48 hodin. Zkumavky se zbylým mlékem byly navíc samy vloženy do termostatu a ponechány inkubovat při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin a po uplynutí této doby byly mléka stejným způsobem vyočkována na plotny s EDW, které byly opět inkubovány při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin.

Kultivace ze stěrů (z kůže, ran, hnisu, punktátů aj.) a výtěrů (z nosu, krku, zobáku, spojivek, tlamy, popř. dalších sliznic) byly provedeny přímým přenesením materiálu na stěrovém tampónu na KA a EA. Dále byl tampón zalomen a umístěn do zkumavky s MPB, který byl poté pečlivě protřepán. Plotny s agary i zkumavky s MPB byly inkubovány v termostatu při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin. Po pomnožení byly zkumavky s MPB vyočkovány na KA a opět inkubovány ve stejných podmínkách a shodné teplotě po dobu 18–24 hodin.

Kultivace z trusu byly provedeny homogenizací trusu ve fyziologickém roztoku s 1 % glukóza anebo v MPB a dále přenesením vzniklé suspenze mikrobiologickou kličkou na plotny s KA, EA a XLD agarem. Plotny byly inkubovány v termostatu při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin až 5 dní podle potřeby.

Při kultivaci z moči byla doručená moč nejprve centrifugována cca 10 minut při 2500–3000 otáčkách za minutu (dále jen zkr. RPM – *revolutions per minute*) supernatant z větší části slit a z menší části smíchan se vzniklým sedimentem. Kapka této suspenze byla posléze vyočkována na KA a EA

a inkubována při 36–37,5 °C po dobu 24–48 hodin. Zbytek suspenze byl přidán do 10 ml MPB a ponechán inkubovat při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin a následně vyočkován na plotnu s KA, která byla opět inkubována při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin.

Při kultivaci z krve byla nesražená krev nejprve centrifugována cca 10 minut při 2500–3000 RPM, poté bylo ústí zkumavky opáleno a pomocí sterilní pipety odsáta krevní plazma. Vzniklý sediment byl ve zkumavce doplněn asi do poloviny objemu zkumavky sterilním MPB a zkumavka uzavřena. Takto upravená hemokultura byla inkubována při 36–37,5 °C po dobu 48 hodin. Poté byla pipetou odebrána kapka pomnožené hemokultury co nejbližší místu rozhraní bujónu a sedimentu a tato kapka byla rozetřena na plotny s KA a EA. Plotny byly inkubovány při 36–37,5 °C po dobu 24–48 hodin.

Pro kultivace z orgánů zvířat bylo nejprve nutno během pitvy zajistit pomocí pinzety, nože či nůžek samotné orgány, které byly rozloženy na kovová plata tak, aby se vzájemně nekontaminovaly odtékajícím tkáňovým mokem. Na povrchu byly tyto orgány opáleny a dále s pomocí pinzety a nůžek bylo z hloubky orgánu vystříhnout blok tkáně krychlového tvaru o hraně asi 1–2 cm. Tímto blokem bylo provedeno rozetření na plotny s KA, EA. V případě velmi hustého mikrobiálního růstu bylo provedeno vějířovité rozetření jednoho „otisku“ tkáňového bločku pomocí mikrobiologické kličky. Posléze byly plotny s agary inkubovány při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin.

Pro kultivaci kvasinek byl použit stejný způsob jako pro výše uvedené příslušné typy materiálů s tím rozdílem, že se materiál roztíral či vyočkovával na plotny se SA, přičemž plotny byly inkubovány v termostatu při 20–22 °C po dobu 24–48 hodin.

V případě kultivace rodu *Salmonella* sp. bylo potřeba provést selektivní diagnostickou metodu s použitím MSR/V média. (1.) Nejprve bylo provedeno předpomnožení v PPV při 37±1 °C po dobu 18±2 hodin. V případě vyšetření trusu bylo mícháno 25 g trusu s 225 ml PPV nebo 50 g prachu s 200 ml přehřáté PPV. V případě vyšetření podložek ze dna líhňařských lísek byl materiál vložen do 1 litru přehřáté PPV a lehce promíchán – k vzorku menšímu než 25 g byla přidána přehřátá PPV v poměru 1:10 a následně inkubováno (inkubovaná PPV se nesmí protřepávat!). Pokud docházelo k přerůstání vzorků saprofytickou mikroflórou, byl vzorek v PPV pomnožován kratší dobu asi 4–6 hodin. Po předpomnožení v PPV bylo u všech typů vzorků pokračováno selektivním pomnožením na MRSV, a to dvakrát po dobu 24±3 hodin při 41,5±1 °C. (2.) Plotny s MSR/V byly před použitím osušeny na povrchu v termostatu s odkrytým víčkem. Pipetou byla dále odebráno 0,1 ml inkubované PPV u stěny vzorkovnice z povrchové vrstvy tekutiny a naočkovány 3 jednotlivé kapky na povrch plotny (Ø 140 mm), nebo po 1 kapce na 2 plotny (Ø 90–100 mm). Tam, kde byl jeden vzorek inkubován ve 2 nádobách s PPV, je možno sloučit po 1 ml tekutiny z každé nádoby a ze směsi těchto 2 ml po důkladném promíchání odebrat po 0,1 ml na MSR/V výše uvedeným způsobem. Plotny s MSR/V byly inkubovány víčkem nahoru. Pozitivní nárůst se projevil zónou růstu a zákalem půdy s jasným okrajem. V případě, že byla MSR/V po 24±3 hodinách negativní, prodloužila se inkubace o dalších 24±3 hodin

a teprve pak se pokračovalo (3.) vyočkováním dvakrát po 24 hodinách z MSRVR na XLD a 1 další selektivní půdu dle vlastního výběru. Půdy byly předeřhřaty na pokojovou teplotu a jejich povrch byl vysušen. Z okraje růstové zóny v MSRVR byl kličkou odebrán (objem 10 μ l) materiál z hloubky agarů a naočkován obvyklým způsobem na povrch obou selektivních půd. Pokud nebyla patrná zóna, odebral se materiál přímo z inokulovaného bodu. Agarové selektivní půdy byly inkubovány při 37 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Diagnostika rodu, druhu a sérovaru *Salmonella* sp. probíhala molekulárně (MALDI-TOF nebo PCR), biochemicky pomocí testů pro *Enterobacteriaceae* a sérologicky s pomocí O a H sér.

Ve všech uvedených případech kultivace bylo po uplynutí doby inkubace ploten provedeno vyhodnocení nárůstu bakteriálních kolonií a byly posouzeny růstové vlastnosti porostů (barva, pach, lesk, tvar, průsvitnost, pigment, opalescence, hemolýza atd.). Podezřelé kolonie, které narostly na kultivačních půdách byly následně izolovány a identifikovány pomocí *mass assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry* (dále jen zkr. MALDI-TOF MS). Po identifikaci byl proveden test citlivosti k antimikrobním látkám s použitím MHA nebo SA a antibiotických, resp. antimykotických disků.

4.5.2 Identifikace a biologická klasifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS

Poznámka: Popis této metodiky vychází ze standardizovaných operačních postupů BAK č. 01/10 a BAK č. 02/10 využívaných na SVÚ Olomouc, jejichž zpracovatelem je MVDr. Nikola Štromerová. Tyto dokumenty jsou interní a neveřejné, proto je níže uveden pouze výtah postupů, které byly použity v rámci vypracování experimentální části této diplomové práce.

Pro identifikaci mikroorganismů se na SVÚ Olomouc používá metoda MALDI-TOF MS s využitím hmotnostního analyzátoru Microflex LT, který (zjednodušeně řečeno) měří dobu letu ribozomálních proteinů uvolněných z mikroorganismu ve vakuované trubici od doby zásahu laserem po dobu přistání těchto částic na detektor. Doba letu jednotlivých částic se pomocí kalibračních konstant přepočítává na hmotnostní jednotky příslušných proteinů, ze kterých se následně pomocí software MALDI Biotyper automaticky vytvoří hmotnostní spektra. Ta jsou dále použita k identifikaci mikroorganismů, během které se naměřená spektra testované mikrobiální kultury porovnávají s databází známých hmotnostních spekter různých mikrobů. Míra podobnosti se statisticky zpracovává a její konečné vyhodnocení ústí v identifikaci testovaného mikroorganismu.

Prvním krokem při identifikaci mikrobů pomocí MALDI-TOF MS byla příprava roztoku MALDI matrice. Byl připraven zásobní roztok organického rozpouštědla o složení: 50 % acetonitril, 47,5 % destilovaná voda a 2,5 % kyselina trifluoroctová, tj. pro přípravu 1 ml tohoto roztoku bylo v mikrozkuhavce smícháno a důkladně promícháno 500 μ l 100% acetonitrilu, 475 μ l destilované vody a 25 μ l 100% kyseliny trifluoroctové. Do mikrozkuhavky s komerčně připraveným základem matrice (kyselinou skořicovou) bylo přidáno 250 μ l z výše popsaného zásobního roztoku organického

rozpuštědla. Vzniklý roztok bylo dále třeba důkladně promíchat na třepače, dokud se všechny krystaly matrice úplně nerozpustily, což bylo zkontrolováno pohledem proti světlu.

Dalším krokem byla příprava vzorku. Čistá mikrobiální kultura (ideálně izolovaná kolonie) byla pomocí mikrobiologické kličky nebo dřevěného párátko nanášena jako tenký film do jamky na MALDI ocelovou destičku. Mikrobiální kultury byly ve většině případů čerstvé, tj. kultury inkubované v rámci 24–48 hodin a v některých případech několikadenní kultury uložené při laboratorní teplotě. Po nanášení biologického materiálu na MALDI destičku byly jamky s materiálem překryty 1 μ l připraveného roztoku MALDI matrice a ponechány zaschnout.

Posledním krokem bylo měření hmotnostních spekter pomocí hmotnostního analyzátoru Microflex LT a následné vyhodnocení MALDI skóre v software MALDI Biotyper. Interpretaci naměřených hodnot MALDI skóre popisuje **Tabulka 3**.

Tabulka 3 – Interpretace hodnot MALDI skóre v software MALDI Biotyper

MALDI skóre	Symbol	Barva	Popis
2,300–3,000	+++	Zelená	velmi vysoce pravděpodobná identifikace druhu
2,000–2,299	++	Zelená	vysoce pravděpodobná identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu
1,700–1,999	+	Žlutá	pravděpodobná identifikace rodu
0,000–1,699	–	Červená	nespolehlivá identifikace

4.5.3 Stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou

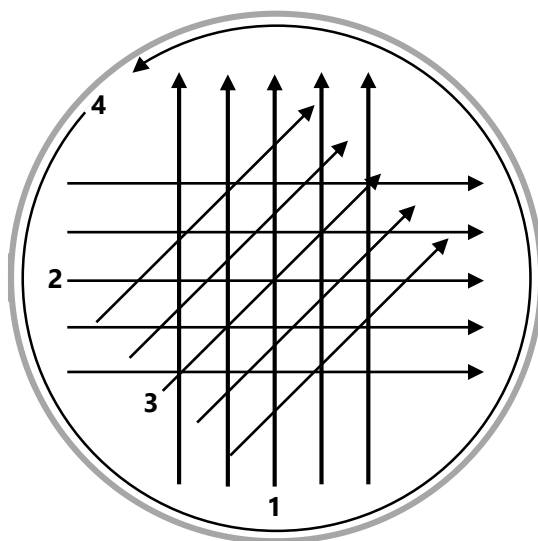
Poznámka: Popis této metodiky vychází ze standardizovaného operačního postupu **BAK č. 10/03** využívaném na SVÚ Olomouc, jehož zpracovatelem je **MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.** Tento dokument je interní a neveřejný, proto je níže uveden pouze výtah postupů, které byly použity v rámci vypracovávání experimentální části této diplomové práce.

Diskovou difúzní metodou stanovujeme zónu inhibice mikrobiálního růstu okolo disku nasyceného antimikrobiální látkou na kultivační půdě. Porovnáním zjištěné velikosti průměru inhibiční zóny se standardizovanými hodnotami následně vyšetřovaný mikrobiální kmen označíme jako citlivý (senzitivní, obvykle značen jako S) anebo rezistentní (obvykle značen jako R) k danému antibiotiku či antimykotiku. V případě nerozhodné hodnoty, kdy je naměřená velikost průměru inhibiční zóny menší než hraniční hodnota citlivosti a zároveň větší než hraniční hodnota rezistence je vyšetřovaný mikrobiální kmen označen jako intermediární (obvykle značen jako I).

Po kultivaci mikroorganismů z biologického materiálu doručeného na SVÚ Olomouc a jejich následné identifikaci metodou MALDI-TOF MS bylo provedeno stanovení citlivosti k vybraným antibiotikům (viz **Tabulka 1**) a antimykotikům (viz **Tabulka 2**) u 175 mikrobiálních

kmenů, mezi kterými bylo vždy 25 zástupců jednoho z těchto mikrobů: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *S. faecalis* a *Candida* sp.

Pro stanovení antimikrobiální citlivosti byla připravena mikrobiální kultura přeočkováním na MHA tak, aby vznikl souvislý mikrobiální nárůst po celé ploše agaru. Toho bylo dosaženo přenesením konkrétní mikrobiální kolonie na sterilní tyčinku s vatovým tampónem a jejím ponořením do zkumavky se 6 ml fyziologického roztoku s 1 % glukózy. Ve zkumavce se tak vyvinul zákal, který představoval koncentraci mikrobiální suspenze. Zákal byl připraven tak, aby jeho hodnota odpovídala číslu 0,5 podle McFarlandovy stupnice, přičemž tato hodnota byla kontrolována měřením na turbidimetru. Následně byl v případě bakterií proveden roztěr na plotnu s agarem – vatovým tampónem byla plotna naočkována ve čtyřech směrech (viz **Obrázek 8**). V případě kvasinek byl proveden rozliv na plotnu s agarem – celých 6 ml kvasinkové suspenze bylo rozlito na povrch agaru a jemným nakláněním plotny byla suspenze rovnoměrně rozprostřena, přičemž zhruba po 30 sekundách byla zbývající suspenze odsáta sterilní pipetou. Na vyočkovanou mikrobiální kulturu byly poté pomocí dispenzorů přidány disky napuštěné antimikrobiální látkou. Takto připravené plotny byly inkubovány při 36–37,5 °C po dobu 16–24 hodin a následně vyhodnoceny změřením průměru inhibičních zón pomocí posuvného měřítka.



Obrázek 8 – Schéma roztěru suspenze po povrchu plotny s agarem při stanovování citlivosti k antibiotikům

Poznámka: Čísla označují jednotlivé kroky a směry při inokulaci. *Ilustrace:* Ondřej Chaloupka.

Metoda stanovování citlivosti k antimikrobním látkám se na SVÚ Olomouc pravidelně validuje. K ověření správnosti funkce disků se 1× za 14 dní stanoví citlivost referenčních kmenů *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 90028, *C. pseudotropicalis* CCY26-20-1 a *C. glabrata* CCY29-8-11. Stejně testy se provádějí u každé nově nakoupené šarže MHA a antibiotických či antimykotických disků.

4.5.4 Statistické hodnocení výsledků stanovování citlivosti k antimikrobiálním látkám

Ke stanovení statistické významnosti naměřených výsledků citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám v letech 2007–2017 byl použit test dobré shody (chí kvadrát test). Matematický postup odpovídal uvedené literatuře (Perla *et* Carifio, 2005) s tím rozdílem, že při výpočtu testové statistiky nebyla použita Yatesova korekce kontinuity, protože hodnoty četností v kontingenční tabulce byly v řádu stovek. Byly stanoveny dvě hypotézy, které byly pomocí tohoto testu ověřovány.

Nulová hypotéza (H_0) říká, že mezi naměřenou hodnotou citlivosti daného mikrobiálního druhu k jednomu vybranému antibiotiku za jeden vybraný rok **nedošlo** k významnému a statisticky průkaznému poklesu či nárůstu citlivosti oproti průměru za poslední tři roky.

Alternativní hypotéza (H_1) naopak říká, že mezi naměřenou hodnotou citlivosti daného mikrobiálního druhu k jednomu vybranému antibiotiku za jeden vybraný rok **došlo** k významnému a statisticky průkaznému poklesu či nárůstu citlivosti oproti průměru za poslední tři roky.

Byla zvolena 5% hladina významnosti ($\alpha = 0,05$) a pozorovány dvě kategorie (rezistentní kmeny a senzitivní kmeny, $n = 2$), takže počet stupňů volnosti byl roven jedné ($\nu = n - 1 = 1$). Nulovou hypotézu zamítáme v případě, že spočítaná hodnota testové statistiky odpovídající hodnotě skóre chí kvadrát (χ^2) je větší nebo rovna kritické hodnotě $t_{1;0,05} = 3,841$ (Linda *et* Kubanová, 2004). Platí tedy, že H_0 zamítáme a H_1 přijímáme, pokud $\chi^2 \geq t_{1;0,05}$. Naopak H_0 přijímáme a H_1 zamítáme, pokud $\chi^2 < t_{1;0,05}$.

Hodnotu testové statistiky neboli skóre chí kvadrát počítáme pomocí standardního vzorce:

$$\chi^2 = \frac{(R_s - R_o)^2}{R_o} + \frac{(S_s - S_o)^2}{S_o}$$

V tomto vzorci symbolizují „skutečné“ hodnoty R_s a S_s počet mikrobiálních kmenů (jednoho biologického druhu) rezistentních, resp. senzitivních k dané antimikrobiální látce za vybraný rok a „očekávané“ hodnoty R_o a S_o značí průměr počtů mikrobiálních kmenů (jednoho biologického druhu) rezistentních, resp. senzitivních k dané antimikrobiální látce za předcházející 3 roky.

5 VÝSLEDKY

5.1 Vyhodnocení změn v prevalencích vybraných mikroobů v letech 2007–2017

Na Státním veterinárním ústavu Olomouc (dále jen zkr. SVÚ Olomouc) se zpracovávají veterinární vzorky klinického i patologického původu a s využitím standardizovaných operačních postupů jsou z těchto biologických materiálů izolovány a kultivovány mikroorganismy, které jsou dále taxonomicky klasifikovány pomocí *matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight mass spectrometry* (dále jen zkr. MALDI-TOF MS). Veškerá získaná data jsou posléze archivována v interním informačním systému, ze kterého byly čerpány údaje i pro tuto diplomovou práci. Celý laboratorní postup práce vedoucí k zachycení a identifikaci daného mikroorganismu je podrobně popsán v rámci metodiky (viz **Kapitola 4**).

Jedním z dílčích cílů experimentální části této diplomové práce bylo popsat změny prevalence v letech 2007–2017 u mikroorganismů *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *E. faecalis* a *Candida* sp. ve vzorcích spádové oblasti SVÚ Olomouc, která zahrnuje oblast Moravy a Slezska České republiky.

Na SVÚ Olomouc byly v období 2007–2017 vyšetřeny následující počty vzorků: 13 377 (2007), 18 743 (2008), 15 790 (2009), 16 903 (2010), 14 792 (2011), 15 779 (2012), 17 874 (2013), 19 234 (2014), 23 072 (2015), 23 098 (2016) a 23 322 (2017). Prostřednictvím výše zmíněných celkových počtů vyšetřených vzorků a počtu zachycených kmenů daného mikrobiálního druhu byly pro každý rok stanoveny prevalence. Stručný přehled veškerých dat souvisejících s prevalencí vybraných mikroobů v letech 2007–2017 souhrnně dokumentuje **Příloha 1**, naopak podrobný popis vývoje prevalence jednotlivých mikroorganismů v období 2007–2017 prezentují **Graf 1–Graf 7** dále.

U těchto grafů je na ose *x* vždy barevným sloupcem znázorněn podíl počtu pozitivních vzorků (pro výskyt daného mikroorganismu) a celkového počtu všech vzorků, tedy údaj prevalence tohoto mikroorganismu za konkrétní rok. Osa *y* představuje stupnici popisující velikost této prevalence za daný rok a je na ní také vynesena černá přímka znázorňující vážený průměr prevalence studovaného mikroba za celé období 2007–2017, jehož hodnota je uvedena ve žlutém poli vpravo. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku prevalence mikroba za daný rok a svým rozpětím určují, zdali údaj prevalence mikroba v daném roce i s přihlédnutím na směrodatnou odchylku jednoznačně přesáhl či vůbec nedosáhl na hodnotu váženého průměru prevalence tohoto mikroba. Hodnoty prevalence jsou uvedeny v %.

Změny v prevalenci *E. coli* ve vzorcích SVÚ Olomouc v období let 2007–2017 nejlépe popisuje **Graf 1**. Vážený průměr prevalence *E. coli* ve vzorcích na SVÚ Olomouc za období 2007–2017 činí 7,02 %. Tento vážený průměr prevalence *E. coli* byl při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 1,9$ %) přesáhnut v letech 2011 (8,76 %, tj. max. zjištěná prevalence), 2007 (8,03 %) a 2012 (8,56 %). Váženého

průměru prevalence *E. coli* naopak nebylo dosaženo ani při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 1,9\%$) v letech 2015 (5,11 %, tj. min. zjištěná prevalence) a 2016 (5,49 %). Prevalence *E. coli* od roku 2007 do roku 2009 pozvolna klesala, ale od roku 2010 začala náhle narůstat. V roce 2011 dosáhla prevalence *E. coli* svého maxima a od té doby do roku 2015 opět mírně klesala. Od roku 2016 prevalence *E. coli* opět pozvolna narůstala.

Změny v prevalenci *P. aeruginosa* ve vzorcích SVÚ Olomouc v období let 2007–2017 nejlépe popisuje **Graf 2**. Vážený průměr prevalence *P. aeruginosa* ve vzorcích na SVÚ Olomouc za období 2007–2017 činí 0,67 %. Tento vážený průměr prevalence *P. aeruginosa* byl při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,14\%$) přesáhnut v letech 2007 (0,89 %, tj. max. zjištěná prevalence) a 2011 (0,87 %). Váženého průměru prevalence *P. aeruginosa* naopak nebylo dosaženo ani při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,14\%$) v roce 2015 (0,42 %, tj. min. zjištěná prevalence). Prevalence *P. aeruginosa* do roku 2015 s výjimkou roku 2011 pozvolna klesala. V roce 2016 byl u *P. aeruginosa* zaznamenán nárůst prevalence, ale v roce 2017 prevalence opět mírně klesla.

Změny v prevalenci *Salmonella* sp. ve vzorcích SVÚ Olomouc v období let 2007–2017 nejlépe popisuje **Graf 3**. Vážený průměr prevalence *Salmonella* sp. ve vzorcích na SVÚ Olomouc za období 2007–2017 činí 0,88 %. Tento vážený průměr prevalence *Salmonella* sp. byl při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,46\%$) přesáhnut v letech 2011 (1,69 %, tj. max. zjištěná prevalence), 2007 (1,50 %) a 2009 (1,44 %). Váženého průměru prevalence *Salmonella* sp. naopak nebylo dosaženo ani při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,46\%$) v roce 2015 (0,36 %, tj. min. zjištěná prevalence). Prevalence *Salmonella* sp. vykazovala mezi lety 2007 až 2010 střídavý nárůst a pokles až do roku 2011, kdy dosáhla svého maxima. Od roku 2011 prevalence *Salmonella* sp. prudce klesala až do roku 2016, kdy se prevalence opět mírně zvýšila.

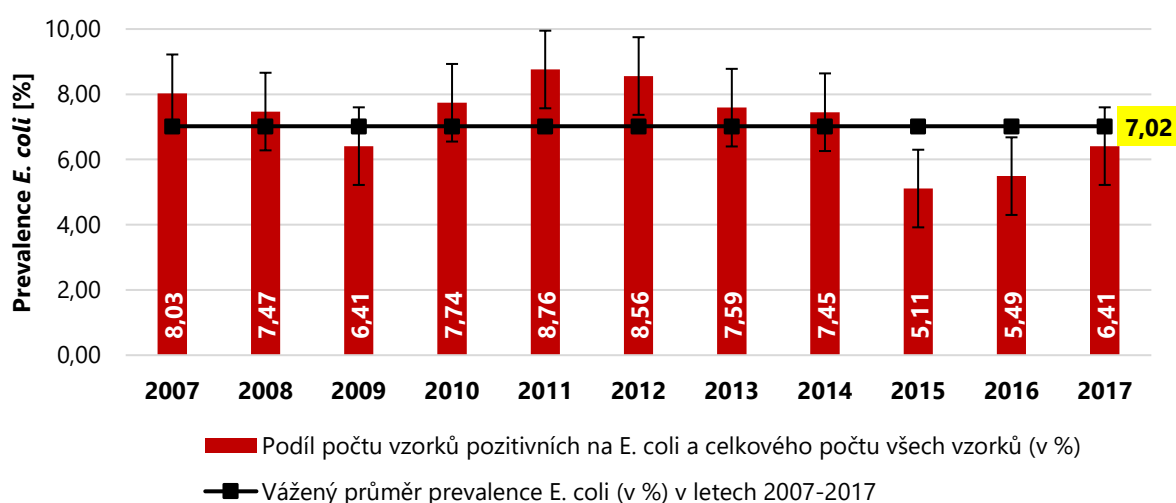
Změny v prevalenci *Klebsiella* sp. ve vzorcích SVÚ Olomouc v období let 2007–2017 nejlépe popisuje **Graf 4**. Vážený průměr prevalence *Klebsiella* sp. ve vzorcích na SVÚ Olomouc za období 2007–2017 činí 0,57 %. Tento vážený průměr prevalence *Klebsiella* sp. byl při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,14\%$) přesáhnut v letech 2007 (0,90 %, tj. max. zjištěná prevalence), 2011 (0,76 %) a 2012 (0,75 %). Ve všech ostatních letech bylo váženého průměru prevalence *Klebsiella* sp. při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,14\%$) dosaženo. V roce 2017 činila prevalence *Klebsiella* sp. 0,36 %, tj. min. zjištěná prevalence. Prevalence *Klebsiella* sp. dosáhla svého maxima v roce 2007, ale v roce 2008 prudce poklesla. Od roku 2009 až do roku 2011 prevalence *Klebsiella* sp. mírně narůstala, avšak od roku 2012 opět pozvolna klesala s výjimkou mírného nárůstu v roce 2016.

Změny v prevalenci *S. aureus* ve vzorcích SVÚ Olomouc v období let 2007–2017 nejlépe popisuje **Graf 5**. Vážený průměr prevalence *S. aureus* ve vzorcích na SVÚ Olomouc za období 2007–2017 činí 3,55 %. Tento vážený průměr prevalence *S. aureus* byl při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 2,40\%$) přesáhnut v letech 2008 (8,41 %, tj. max. zjištěná prevalence) a 2007 (7,38 %). Ve všech

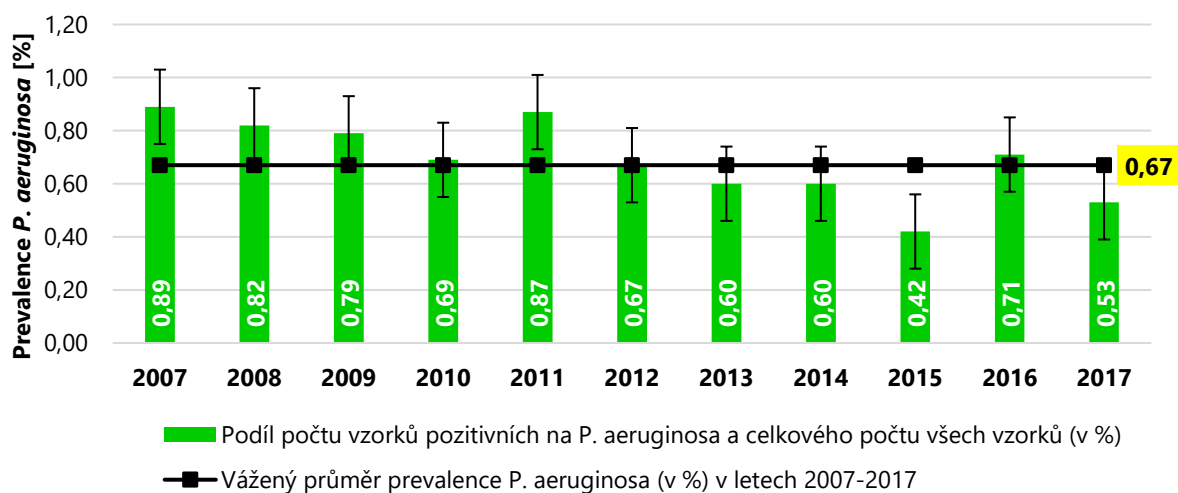
ostatních letech bylo váženého průměru prevalence *S. aureus* při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 2,40$ %) dosaženo. V roce 2016 činila prevalence *S. aureus* 1,62 %, tj. min. zjištěná prevalence. Prevalence *S. aureus* byla do roku 2008 poměrně vysoká, ale od roku 2009 postupně klesala.

Změny v prevalenci *E. faecalis* ve vzorcích SVÚ Olomouc v období let 2007–2017 nejlépe popisuje **Graf 6**. Vážený průměr prevalence *E. faecalis* ve vzorcích na SVÚ Olomouc za období 2007–2017 činí 0,71 %. Tento vážený průměr prevalence *E. faecalis* byl při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,28$ %) přesáhnut v letech 2008 (1,22 %, tj. max. zjištěná prevalence), 2007 (0,99 %) a 2011 (1,07 %) a 2012 (0,75 %). Váženého průměru prevalence *E. faecalis* naopak nebylo dosaženo ani při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,28$ %) v roce 2015 (0,33 %, tj. min. zjištěná prevalence). Prevalence *E. faecalis* byla do roku 2008 poměrně vysoká, ale v roce 2009 meziročně významně klesla. Od roku 2010 do roku 2011 prevalence *E. faecalis* opět narůstala, ale od roku 2012 opět pozvolna klesala. V roce 2016 a 2017 zaznamenala prevalence *E. faecalis* mírný nárůst.

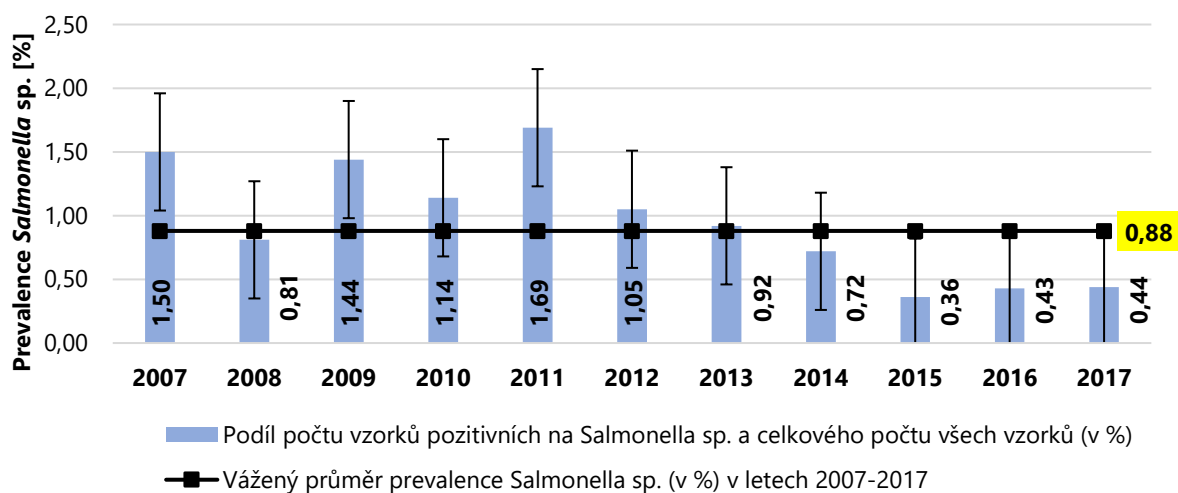
Změny v prevalenci *Candida* sp. ve vzorcích SVÚ Olomouc v období let 2007–2017 nejlépe popisuje **Graf 7**. Vážený průměr prevalence *Candida* sp. ve vzorcích na SVÚ Olomouc za období 2007–2017 činí 0,24 %. Tento vážený průměr prevalence *Candida* sp. byl při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,14$ %) přesáhnut v letech 2010 (0,46 %, tj. max. zjištěná prevalence) a 2012 (0,40 %). Ve všech ostatních letech bylo váženého průměru prevalence *Candida* sp. při zohlednění směrodatné odchylky ($\pm 0,14$ %) dosaženo. V roce 2008 činila prevalence *Candida* sp. 0,10 %, tj. min. zjištěná prevalence. Prevalence *Candida* sp. byla v letech 2007 a 2008 víceméně stejně nízká, ale od roku 2009 do roku 2010 došlo k razantnímu nárůstu prevalence. Od roku 2011 do roku 2016 prevalence *Candida* sp. pozvolna klesala s výjimkou roku 2012. V roce 2017 byla prevalence *Candida* sp. oproti roku 2016 o něco vyšší.



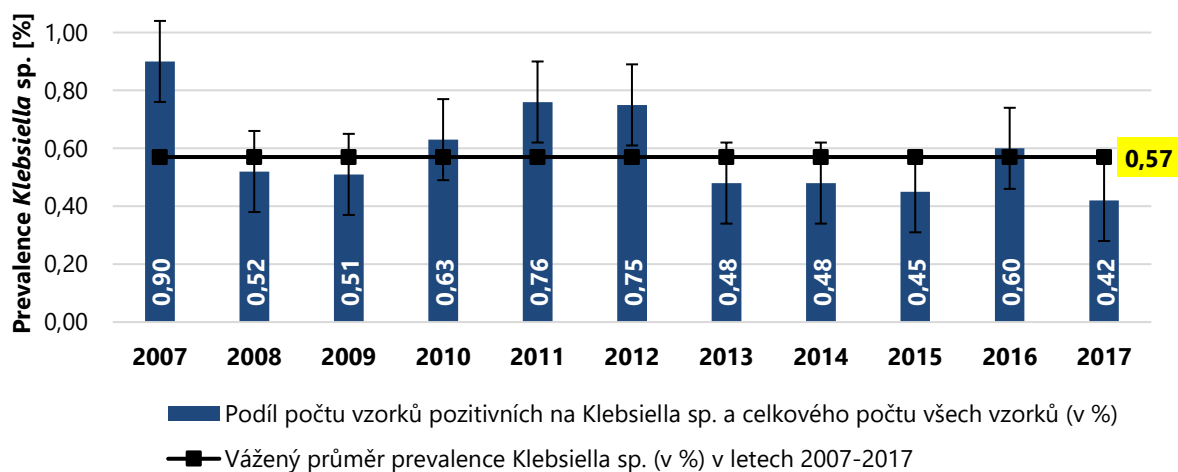
Graf 1 – Změny v prevalenci zachycených kmenů *E. coli* ve vzorcích SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence *E. coli* v letech 2007–2017 (v %)



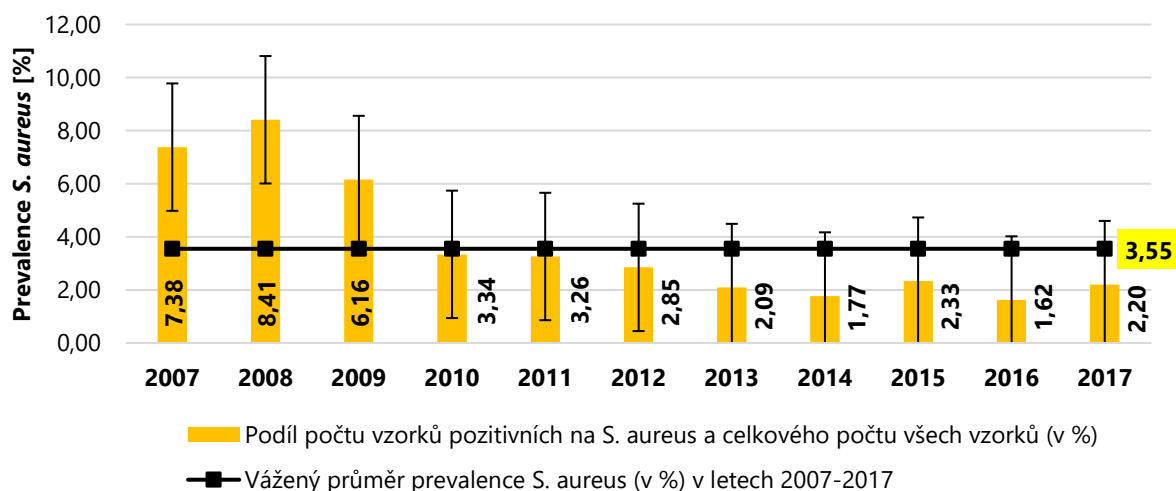
Graf 2 – Změny v prevalenci zachycených kmenů *P. aeruginosa* ve vzorcích SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence *P. aeruginosa* v letech 2007–2017 (v %)



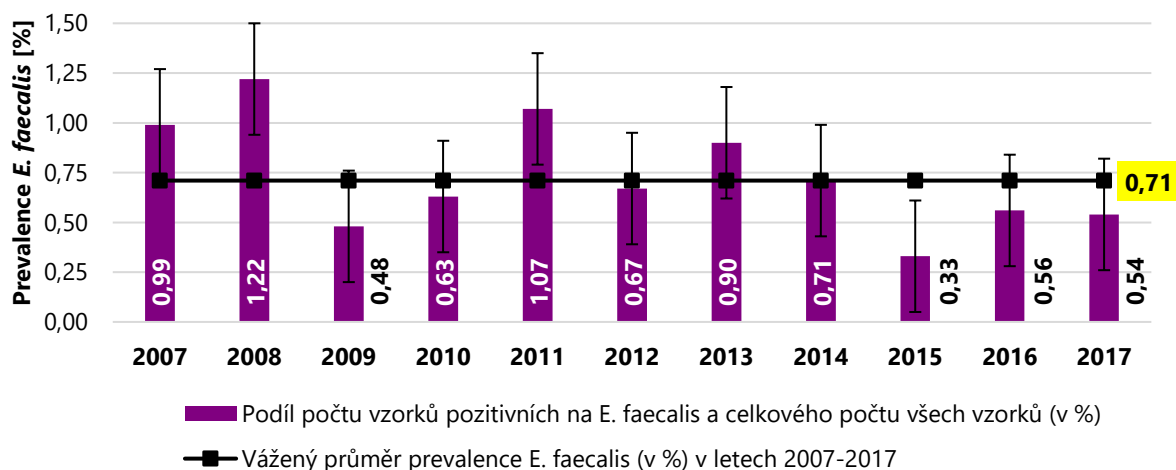
Graf 3 – Změny v prevalenci zachycených kmenů *Salmonella* sp. ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence *Salmonella* sp. v letech 2007–2017 (v %)



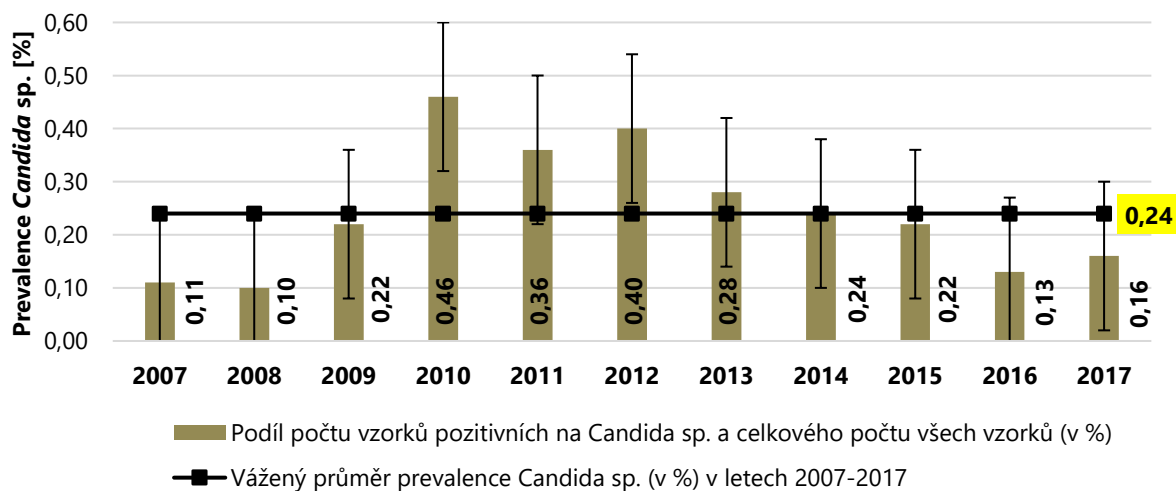
Graf 4 – Změny v prevalenci zachycených kmenů *Klebsiella* sp. ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence *Klebsiella* sp. v letech 2007–2017 (v %)



Graf 5 – Změny v prevalenci zachycených kmenů *S. aureus* ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence *S. aureus* v letech 2007–2017 (v %)



Graf 6 – Změny v prevalenci zachycených kmenů *E. faecalis* ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence *E. faecalis* v letech 2007–2017 (v %)



Graf 7 – Změny v prevalenci zachycených kmenů *Candida* sp. ve vzorcích na SVÚ Olomouc oproti váženému průměru prevalence *Candida* sp. v letech 2007–2017 (v %)

Z výše uvedených grafů plyne závěr, že v letech 2007–2017 byly ve vzorcích spádové oblasti SVÚ Olomouc na základě svého váženého průměru prevalence nejvíce zastoupenými mikroorganismy *Escherichia coli* ($7,02 \pm 1,19$ %) a *Staphylococcus aureus* ($3,55 \pm 2,40$ %). U ostatních mikroorganismů dosahovaly vážené průměry prevalence v letech 2007–2017 hodnot do 1,34 % konkrétně v tomto sestupném pořadí: *Salmonella* sp. ($0,88 \pm 0,46$ %), *Enterococcus faecalis* ($0,71 \pm 0,28$ %), *Pseudomonas aeruginosa* ($0,67 \pm 0,14$ %), *Klebsiella* sp. ($0,57 \pm 0,14$ %), *Candida* sp. ($0,24 \pm 0,14$ %).

Nejvýraznější změna prevalence nastala v letech 2007–2017 u *S. aureus*, jehož prevalence mezi léty 2007 a 2017 klesla o $5,18 \pm 2,40$ %. Další výrazný pokles téměř o dvě třetiny nastal v prevalenci *Salmonella* sp., kde rozdíl v roce 2017 oproti roku 2007 činí $1,06 \pm 0,46$ %. Naopak vysoce prevalentní zůstává *E. coli*, u které je prevalence z roku 2017 oproti roku 2007 menší pouze o pouhých $1,62 \pm 1,19$ %. U ostatních mikroorganismů (*E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* sp. a *Candida* sp.) se prevalence drží vcelku stabilně okolo 0,50 % a byly zaznamenány spíše mírné odchylky od příslušných vážených průměrů prevalence těchto mikrobů.

5.2 Vyhodnocení změn v antimikrobiálních citlivostech vybraných mikrobů v letech 2007–2017

Na SVÚ Olomouc se u zachycených mikroorganismů stanovují mimo prevalence také citlivosti k antimikrobiálním látkám (*antimicrobial susceptibility testing*, zkr. AST). Data popisující antimikrobiálně-citlivostní profil daného mikroba jsou následně předána zpět zadavatelům laboratorního vyšetření (např. ambulantní veterináři, soukromí zemědělci a farmáři atd.), kteří by je měli využít pro zvolení vhodného antibiotika či antimykotika určenému k prevenci či terapii. Stejně jako údaje o prevalencích se data antimikrobiálních citlivostí na SVÚ Olomouc pečlivě archivují a při vhodných příležitostech anonymně publikují a statisticky vyhodnocují, čímž je zajištěna informovanost odborné společnosti o změnách v citlivostech k antimikrobiálním látkám ve spádové oblasti SVÚ Olomouc.

Antimikrobiální citlivost se u zachycených mikrobů na SVÚ Olomouc stanovuje v některých případech kvantitativně jako minimální inhibiční koncentrace antimikrobiální látky diluční metodou (*minimal inhibitory concentration*, zkr. MIC), zejména pak při monitoringu citlivostí, který je nařizen orgánům státní veterinární správy ze zákona (Zákon 166/99 Sb. ve znění pozdějších předpisů). Jinak se plošně využívá semikvantitativní přístup ve formě diskové difúzní metody, kdy je antimikrobiální citlivost stanovena jako průměr inhibiční zóny antimikrobiální látky. Laboratorní postup práce zaměřený na testování pomocí diskové difúzní metody je opět detailně charakterizován v rámci metodiky (viz **Kapitola 4**).

Dalším z dílčích cílů experimentální části této diplomové práce bylo popsat a statisticky zhodnotit změny v citlivostech k vybraným antimikrobiálním látkám v letech 2007–2017 u mikrobů *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *E. faecalis* a *Candida* sp. ve vzorcích spádové oblasti SVÚ Olomouc, která zahrnuje oblast Moravy a Slezska České republiky.

Stejně jako u údajů o prevalencích vycházejí data o antimikrobiálních citlivostech ze vzorků klinického a patologického veterinárního biomateriálu, které byly na SVÚ Olomouc vyšetřeny v období 2007–2017. Celkové počty vyšetřených vzorků v každém roce byly následující: 13 377 (2007), 18 743 (2008), 15 790 (2009), 16 903 (2010), 14 792 (2011), 15 779 (2012), 17 874 (2013), 19 234 (2014), 23 072 (2015), 23 098 (2016) a 23 322 (2017). Počty pozitivních vzorků (pro výskyt studovaného mikroba) přehledně shrnuje **Příloha 1**. Z pozitivních vzorků byly izolovány konkrétní bakteriální či kvasinkové kmeny, u kterých byla posléze otestována citlivost k vybrané sadě antimikrobiálních látek. O antimikrobiální citlivosti nebo naopak rezistenci v případě diskové difúzní metody rozhoduje průměr růstové inhibiční zóny, která se objeví na kultivační plotně okolo disku napuštěného antimikrobiální látkou. Tímto způsobem byly pro každý rok stanoveny antimikrobiální citlivosti jednotlivých mikrobiálních druhů, které jsou shrnuty ve formě přehledných grafů a tabulek (tzv. antibiogramy) uvedených dále – viz **Graf 8–Graf 15**, resp. **Tabulka 4–Tabulka 11**.

U těchto grafů jsou na ose *x* vyneseny jednotlivé antimikrobiální látky včetně sycení disku (koncentrace antibiotika či antimykotika v μg), přičemž u každé antimikrobiální látky je uvedeno 11 sloupců různé intenzity jedné barvy (např. červená u *E. coli*), které představují antimikrobiální citlivost za období 2007–2017 a 1 šedý černě ohraničený sloupec, který představuje antimikrobiální citlivost pouze za rok 2017 spočítanou na základě 25 vzorků (tedy podstatně menšího souboru dat než u „regulérního“ sloupce za rok 2017, viz **Kapitola 5.3**). Osa *y* vyjadřuje rozsah antimikrobiální citlivosti (0 až 100 %) v jednotlivých letech spočítanou jako % citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů studovaného mikrobiálního druhu. Hodnoty antimikrobiálních citlivostí jsou uvedeny v % a některé z nich jsou zbarveny červeně, což značí, že tento konkrétní údaj antimikrobiální citlivosti neprošel testem hodnotícím statistickou průkaznost poklesu či nárůstu antimikrobiální citlivosti za daný rok oproti průměru antimikrobiální citlivosti za předcházející tři roky (viz **Kapitola 4.5.4**).

Antimikrobiální citlivost kmenů *E. coli* ve vzorcích SVÚ Olomouc a její proměny v období 2007–2017 vystihuje **Graf 8**. Vysokou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *E. coli* k enrofloxacinu (80,43 %), chloramfenikolu (86,78 %), gentamicinu (93,27 %) a kolistinu (92,62 %). Naopak nízkou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *E. coli* k cefalotinu (33,49 %). K erytromycinu (0,59 %) a klindamycinu (0,15 %) je *E. coli* přirozeně rezistentní. U všech antibiotik vyjma chloramfenikolu byl u kmenů *E. coli* v období 2007–2017 zaznamenán pozvolně klesající vývoj antimikrobiální citlivosti. Alarmující je zejm. pokles v citlivosti *E. coli* k tetracyklinu z 94,10 % (2007) na 49,00 % (2017), avšak zajímavý je také nárůst v citlivosti *E. coli* k chloramfenikolu z 76,50 % (2007) na 89,10 % (2017). Statisticky neprůkazných údajů bylo 9 (tj. 11,11 %) z celkových 81 statisticky hodnocených údajů.

Antimikrobiální citlivost kmenů *P. aeruginosa* ve vzorcích SVÚ Olomouc a její proměny v období 2007–2017 vystihuje **Graf 9**. Vysokou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *P. aeruginosa* k piperacilinu (96,17 %), gentamicinu (85,20 %), cefoperazonu

(87,43 %) a kolistinu (92,92 %). Naopak nízkou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *P. aeruginosa* k enrofloxacinu (41,21 %). Ke kotrimoxazolu (1,46 %) je *P. aeruginosa* přirozeně rezistentní. Citlivost k imipenemu a meropenemu nebyla v letech 2007–2017 na SVÚ Olomouc plošně testována, avšak v rámci této diplomové práce byla stanovena citlivost u 25 kmenů *P. aeruginosa* k oběma zmíněným antibiotikům, přičemž všechny kmeny byly citlivé. U gentamicinu, cefoperazonu, kolistinu i enrofloxacinu byla u kmenů *P. aeruginosa* v období 2007–2017 pozorována pozvolně narůstající antimikrobiální citlivost. Nejvýznačnější nárůst nastal v citlivosti *P. aeruginosa* ke gentamicinu z 54,10 % (2007) na 91,90 % (2016) a k enrofloxacinu z 20,90 % (2007) na 47,80 % (2016). Statisticky neprůkazných údajů bylo 32 (tj. 59,26 %) z celkových 54 statisticky hodnocených údajů.

Antimikrobiální citlivost kmenů *Salmonella* sp. ve vzorcích SVÚ Olomouc a její proměny v období 2007–2017 vystihuje **Graf 10**. Vysokou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *Salmonella* sp. k enrofloxacinu (88,42 %), amoxycilin/klavulanu (85,51 %), chloramfenikolu (100,00 %), gentamicinu (97,04 %) a kolistinu (99,40 %). Poměrně nízkou průměrnou antimikrobiální citlivost vykazovaly kmeny *Salmonella* sp. k tetracyklinu (66,07 %). K erytromycinu (0,00 %) a klindamycinu (0,00 %) je *Salmonella* sp. přirozeně rezistentní. Citlivost k cefalotinu byla u kmenů *Salmonella* sp. testována jen v letech 2008, 2009, 2012 a 2017, ve kterých dosahovala 100 % s výjimkou roku 2012, ve kterých byla naměřena pozoruhodná 0% citlivost k cefalotinu. Nejvýznačnější nárůst nastal v citlivosti *Salmonella* sp. k amoxycilin/klavulanu z 67,40 % (2007) na 93,30 % (2016), naopak. Zajímavý je také kolísavý nárůst a pokles u enrofloxacinu, např. 100,00 % (2008) a 75,00 % (2015). Jako problematický se také jeví vývoj citlivosti *Salmonella* sp. k tetracyklinu, např. v roce 2013 pouze 42,90 %. Statisticky neprůkazných údajů bylo 6 (tj. 13,33 %) z celkových 45 statisticky hodnocených údajů.

Antimikrobiální citlivost kmenů *Klebsiella* sp. ve vzorcích SVÚ Olomouc a její proměny v období 2007–2017 vystihuje **Graf 11**. Vysokou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *Klebsiella* sp. k cefalotinu (71,85 %), enrofloxacinu (92,97 %), amoxycilin/klavulanu (79,80 %), chloramfenikolu (92,01 %), tetracyklinu (85,40 %), gentamicinu (96,75 %) a kolistinu (98,04 %). Nízká průměrná antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 u kmenů *Klebsiella* sp. pozorována nebyla s výjimkou erytromycinu (0,00 %) a klindamycinu (0,00 %), ke kterým je *Klebsiella* sp. přirozeně rezistentní. Nejvýznačnější nárůst nastal v citlivosti *Klebsiella* sp. k amoxycilin/klavulanu z 58,30 % (2008) na 89,90 % (2017), naopak spíše kolísavý charakter má vývoj citlivosti k tetracyklinu a cefalotinu. Zajímavý je také pokles z 90,00 % (2011) na 55,80 % (2016) u citlivosti k cefalotinu. Statisticky neprůkazných údajů bylo 23 (tj. 31,94 %) z celkových 72 statisticky hodnocených údajů.

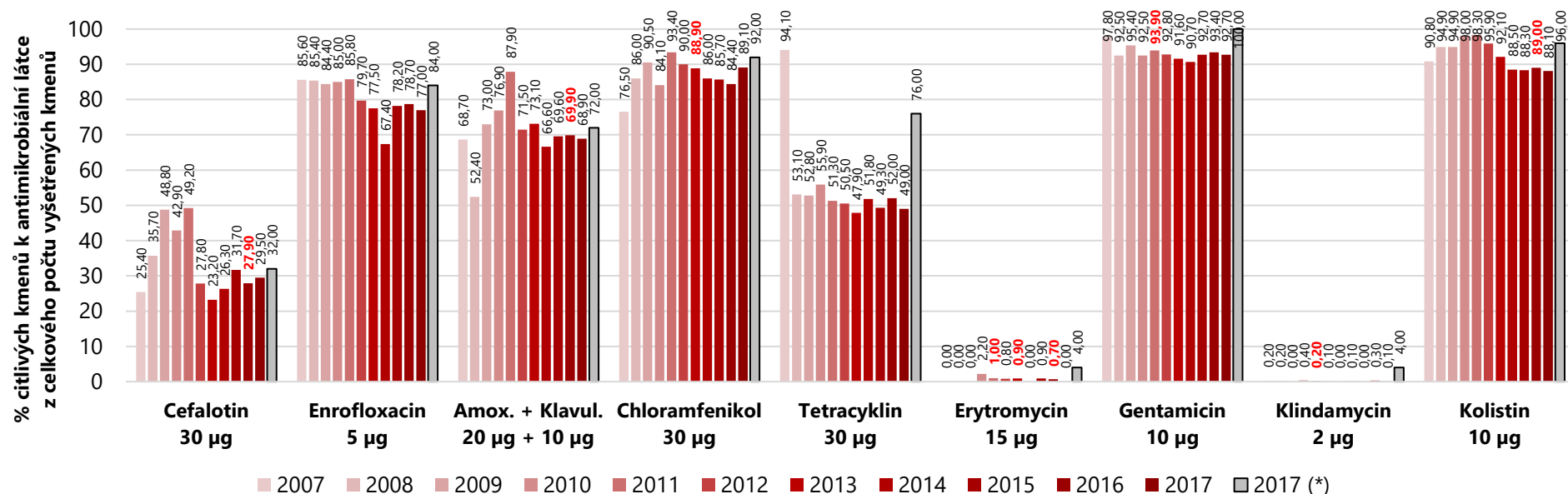
Antimikrobiální citlivost kmenů *S. aureus* ve vzorcích SVÚ Olomouc a její proměny v období 2007–2017 vystihuje **Graf 12**. Vysokou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017

vykazovaly kmeny *S. aureus* k cefalotinu (95,27 %), enrofloxacinu (94,41 %), amoxicilin/klavulanu (90,38 %), chloramfenikolu (85,57 %), gentamicinu (96,26 %), klindamycinu (83,25 %) a oxacilinu (89,65 %). Oproti tomu poměrně nízkou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *S. aureus* k tetracyklinu (71,67 %) a erytromycinu (74,45 %). Nepříjemným je ale fakt, že u všech antibiotik vyjma chloramfenikolu a klindamycinu postupně dochází k pozvolnému poklesu citlivosti. Alarmující je zejm. pokles v citlivosti *S. aureus* k oxacilinu z 97,20 % (2007) na 72,90 % (2016). U citlivostí *S. aureus* byl zaznamenán také nárůst v citlivosti ke chloramfenikolu z 65,00 % (2007) na 94,70 % (2017), a také nárůst citlivosti ke klindamycinu z 73,70 % (2007) na 91,60 % (2017). Statisticky neprůkazných údajů bylo 0 (tj. 0,00 %) z celkových 81 statisticky hodnocených údajů.

Antimikrobiální citlivost kmenů *E. faecalis* ve vzorcích SVÚ Olomouc a její proměny v období 2007–2017 vystihuje **Graf 13**. Vysokou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *E. faecalis* pouze k amoxicilin/klavulanu (98,16 %), chloramfenikolu (69,11 %) a vankomycinu (97,33 %). Naopak nízkou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *E. faecalis* k enrofloxacinu (44,66 %), tetracyklinu (38,48 %), erytromycinu (12,50 %) a gentamicinu (51,98 %). K cefalotinu (5,83 %) a klindamycinu (1,54 %) je *E. faecalis* přirozeně rezistentní. Téměř u všech antibiotik byl zaznamenán pokles v citlivosti kmenů *E. faecalis*, nejvýrazněji potom např. u gentamicinu ze 100,00 % (2007) na 29,10 % (2017). Zajímavým je také nárůst, který nastal v citlivosti *E. faecalis* ke chloramfenikolu z 57,10 % (2007) na 74,20 % (2017). Statisticky neprůkazných údajů bylo 20 (tj. 26,67 %) z celkových 75 statisticky hodnocených údajů.

Antimikrobiální citlivost kmenů *Candida* sp. ve vzorcích SVÚ Olomouc a její proměny v období 2007–2017 vystihuje **Graf 14** a **Graf 15**. Vysokou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *Candida* sp. k nystatinu (89,95 %), amfotericinu B (78,61 %), pimaricinu (89,91 %) a ciklopiroxolaminu (100,00 %). Přibližně střední průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *Candida* sp. k 5-fluorocytosinu (40,51 %), itrakonazolu (46,95 %), ketokonazolu (50,11 %), klotrimazolu (55,04 %), mikonazolu (49,41 %), ekonazolu (60,54 %) a vorikonazolu (47,08 %). Naopak poměrně nízkou průměrnou antimikrobiální citlivost v letech 2007–2017 vykazovaly kmeny *Candida* sp. k flukonazolu (37,18 %) a bifonazolu (25,76 %). U nystatinu, pimaricinu, flukonazolu a bifonazolu byl u kmenů *Candida* sp. v období 2007–2017 pozorován spíše kolísavý vývoj antimikrobiální citlivosti a v případě ketokonazolu byl od roku 2008 zaznamenán dokonce nárůst antimikrobiální citlivosti. Avšak mnohem více zneklidňující je fakt, že u ostatních antimykotik pozorujeme pozvolný pokles citlivosti, např. u 5-fluorocytosinu z 72,70 % (2009) na 29,60 % (2016), u klotrimazolu z 83,30 % (2007) na 41,40 % (2016) nebo u ekonazolu z 97,70 % (2007) na 29,60 % (2016). Statisticky neprůkazných údajů bylo 42 (tj. 40,00 %) z celkových 105 statisticky hodnocených údajů.

Graf 8 – Citlivost testovaných kmenů *E. coli* (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

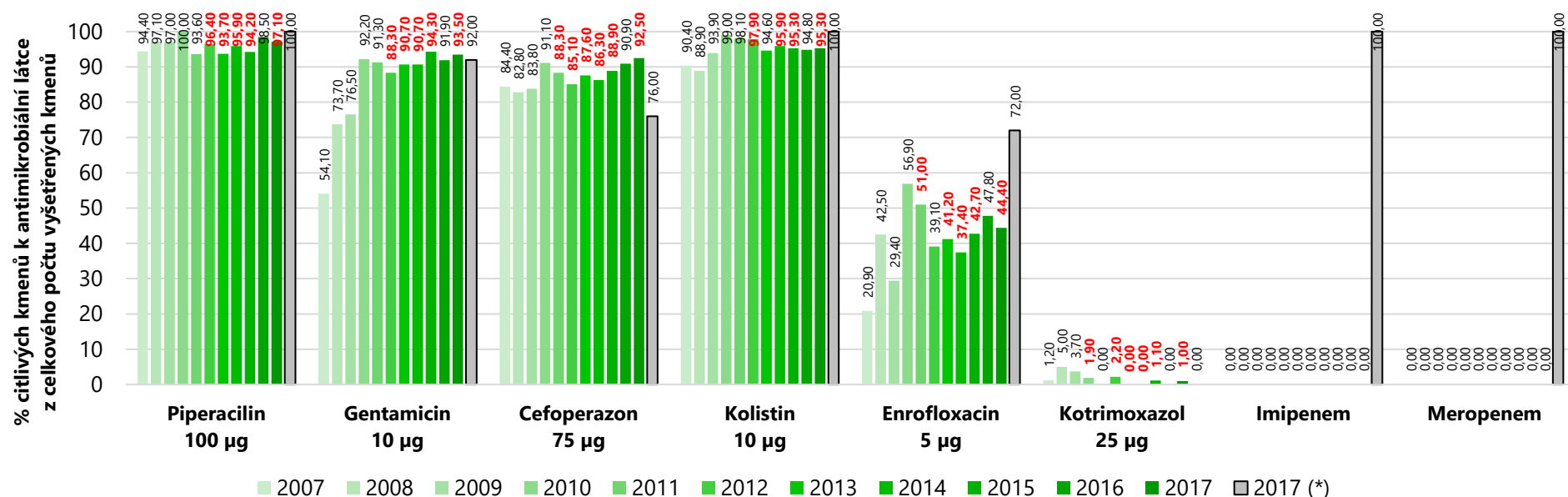


Tabulka 4 – Citlivost testovaných kmenů *E. coli* (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

Antibiotikum	% citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů v jednotlivých letech sledovaného období											
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2017 (*)
Cefalotin	25,40	35,70	48,80	42,90	49,20	27,80	23,20	26,30	31,70	27,90*	29,50	32,00
Enrofloxacin	85,60	85,40	84,40	85,00	85,80	79,70	77,50	67,40	78,20	78,70	77,00	84,00
Amoxicilin/Klavulan	68,70	52,40	73,00	76,90	87,90	71,50	73,10	66,60	69,60	69,90*	68,90	72,00
Chloramfenikol	76,50	86,00	90,50	84,10	93,40	90,00	88,90*	86,00	85,70	84,40	89,10	92,00
Tetracyklin	94,10	53,10	52,80	55,90	51,30	50,50	47,90	51,80	49,30	52,00	49,00	76,00
Erytromycin	0,00	0,00	0,00	2,20	1,00*	0,80	0,90*	0,00	0,90	0,70*	0,00	4,00
Gentamicin	97,80	92,50	95,40	92,50	93,90*	92,80	91,60	90,70	92,70	93,40	92,70	100,00
Klindamycin	0,20	0,20	0,00	0,40	0,20*	0,10	0,00	0,10	0,00	0,30	0,10	4,00
Kolistin	90,80	94,90	94,90	98,00	98,30	95,90	92,10	88,50	88,30	89,00*	88,10	96,00

Legenda: * ... nedošlo ke statisticky průkazné změně citlivosti oproti průměru citlivosti za předcházející 3 roky při 5% míře spolehlivosti; číslo ... statisticky nehodnotitelné; 2017 (*) ... údaje spočítané na základě 25 vzorků; 0,00 ... všechny kmeny byly rezistentní; N/T ... citlivost netestována; číslo ... významný meziroční pokles citlivosti

Graf 9 – Citlivost testovaných kmenů *P. aeruginosa* (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

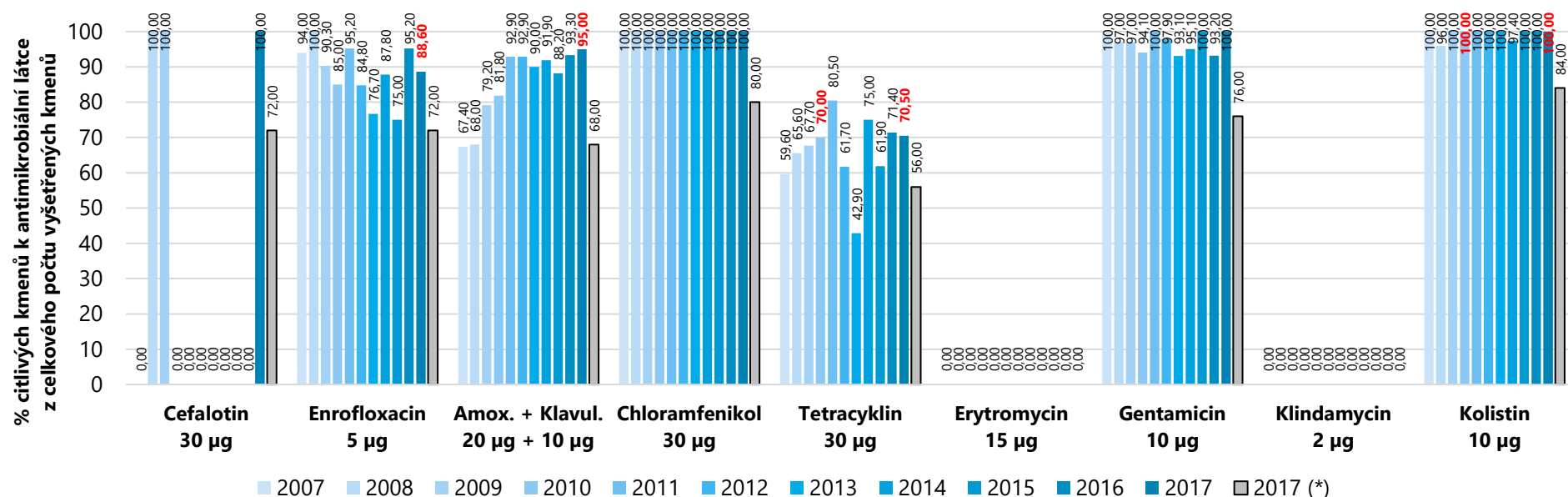


Tabulka 5 – Citlivost testovaných kmenů *P. aeruginosa* (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

Antibiotikum	% citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů v jednotlivých letech sledovaného období											
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2017 (*)
Piperacilin	94,40	97,10	97,00	100,00	93,60	96,40*	93,70*	95,90*	94,20*	98,50	97,10*	100,00
Gentamicin	54,10	73,70	76,50	92,20	91,30	88,30*	90,70*	90,70*	94,30*	91,90	93,50*	92,00
Cefoperazon	84,40	82,80	83,80	91,10	88,30*	85,10*	87,60*	86,30*	88,90*	90,90	92,50*	76,00
Kolistin	90,40	88,90	93,90	99,00	98,10	97,90*	94,60	95,90*	95,30*	94,80	95,30*	100,00
Enrofloxacin	20,90	42,50	29,40	56,90	51,00*	39,10	41,20*	37,40*	42,70*	47,80	44,40*	72,00
Kotrimoxazol	1,20	5,00	3,70	1,90*	0,00	2,20*	0,00*	0,00*	1,10*	0,00	1,00*	0,00
Imipenem	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	100,00
Meropenem	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	100,00

Legenda: * ... nedošlo ke statisticky průkazné změně citlivosti oproti průměru citlivosti za předcházející 3 roky při 5% míře spolehlivosti; číslo ... statisticky nehodnotitelné; 2017 (*) ... údaje spočítané na základě 25 vzorků; 0,00 ... všechny kmeny byly rezistentní; N/T ... citlivost netestována; číslo ... významný meziroční pokles citlivosti

Graf 10 – Citlivost testovaných kmenů *Salmonella* sp. (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

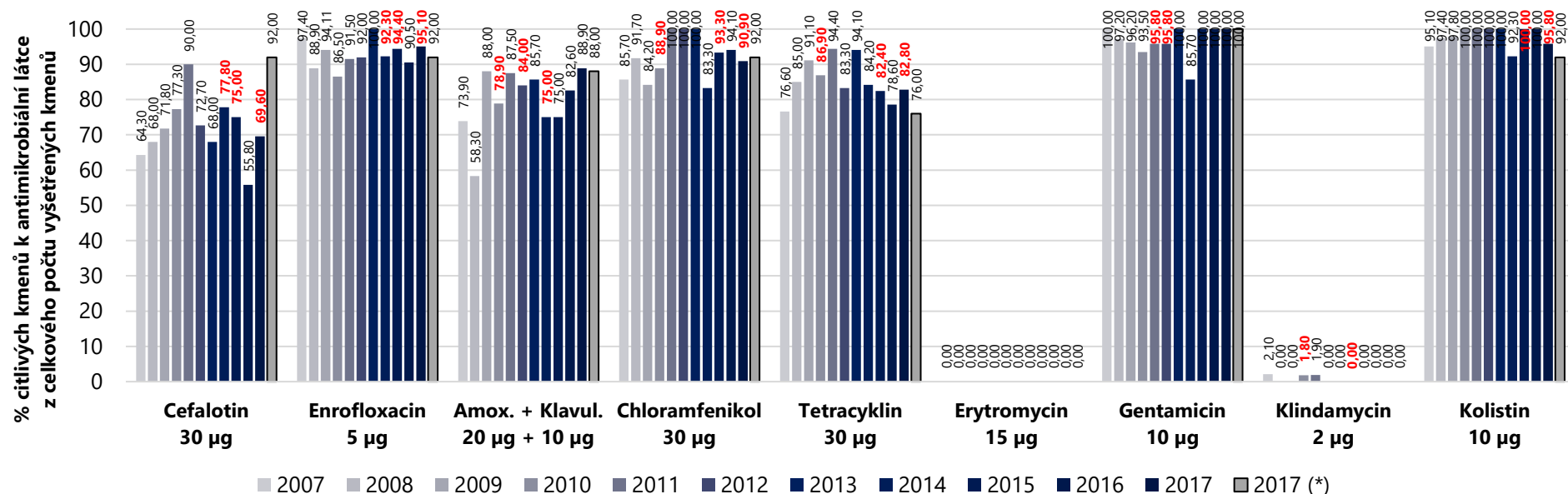


Tabulka 6 – Citlivost testovaných kmenů *Salmonella* sp. (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

Antibiotikum	% citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů v jednotlivých letech sledovaného období											
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2017 (*)
Cefalotin	N/T	100,00	100,00	N/T	N/T	0,00	N/T	N/T	N/T	N/T	100,00	72,00
Enrofloxacin	94,00	100,00	90,30	85,00	95,20	84,80	76,70	87,80	75,00	95,20	88,60*	72,00
Amoxicilin/Klavulan	67,40	68,00	79,20	81,80	92,90	92,90	90,00	91,90	88,20	93,30	95,00*	68,00
Chloramfenikol	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	80,00
Tetracyklin	59,60	65,60	67,70	70,00*	80,50	61,70	42,90	75,00	61,90	71,40	70,50*	56,00
Erytromycin	N/T	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	N/T	N/T	0,00	0,00
Gentamicin	100,00	97,00	97,00	94,10	100,00	97,90	93,10	95,10	100,00	93,20	100,00	76,00
Klindamycin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kolistin	100,00	96,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	97,40	100,00	100,00	100,00	84,00

Legenda: * ... nedošlo ke statisticky průkazné změně citlivosti oproti průměru citlivosti za předcházející 3 roky při 5% míře spolehlivosti; číslo ... statisticky nehodnotitelné; 2017 (*) ... údaje spočítané na základě 25 vzorků; 0,00 ... všechny kmeny byly rezistentní; N/T ... citlivost netestována; číslo ... významný meziroční pokles citlivosti

Graf 11 – Citlivost testovaných kmenů *Klebsiella* sp. (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

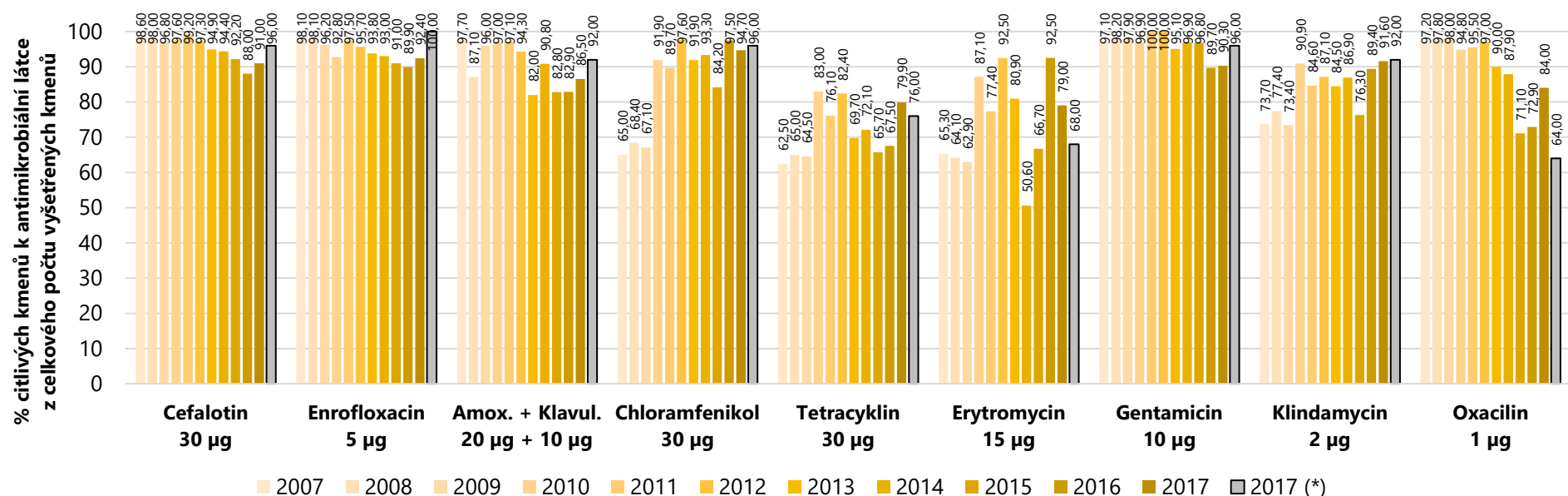


Tabulka 7 – Citlivost testovaných kmenů *Klebsiella* sp. (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

Antibiotikum	% citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů v jednotlivých letech sledovaného období											
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2017 (*)
Cefalotin	64,30	68,00	71,80	77,30	90,00	72,70	68,00	77,80*	75,00*	55,80	69,60*	92,00
Enrofloxacin	97,40	88,90	94,11	86,50	91,50	92,00	100,00	92,30*	94,40*	90,50	95,10*	92,00
Amoxicilin/Klavulan	73,90	58,30	88,00	78,90*	87,50	84,00*	85,70	75,00	75,00*	82,60	88,90	88,00
Chloramfenikol	85,70	91,70	84,20	88,90*	100,00	100,00	100,00	83,30	93,30*	94,10	90,90*	92,00
Tetracyklin	76,60	85,00	91,10	86,90*	94,40	83,30	94,10	84,20	82,40*	78,60	82,80*	76,00
Erytromycin	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gentamicin	100,00	97,20	96,20	93,50	95,80*	95,80*	100,00	85,70	100,00	100,00	100,00	100,00
Klindamycin	2,10	0,00	0,00	1,80*	1,90	0,00	0,00	0,00*	0,00*	0,00	0,00*	0,00
Kolistin	95,10	97,40	97,80	100,00	100,00	100,00	100,00	92,30	100,00*	100,00	95,80*	92,00

Legenda: * ... nedošlo ke statisticky průkazné změně citlivosti oproti průměru citlivosti za předcházející 3 roky při 5% míře spolehlivosti; číslo ... statisticky nehodnotitelné; 2017 (*) ... údaje spočítané na základě 25 vzorků; 0,00 ... všechny kmeny byly rezistentní; N/T ... citlivost netestována; číslo ... významný meziroční pokles citlivosti

Graf 12 – Citlivost testovaných kmenů *S. aureus* (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

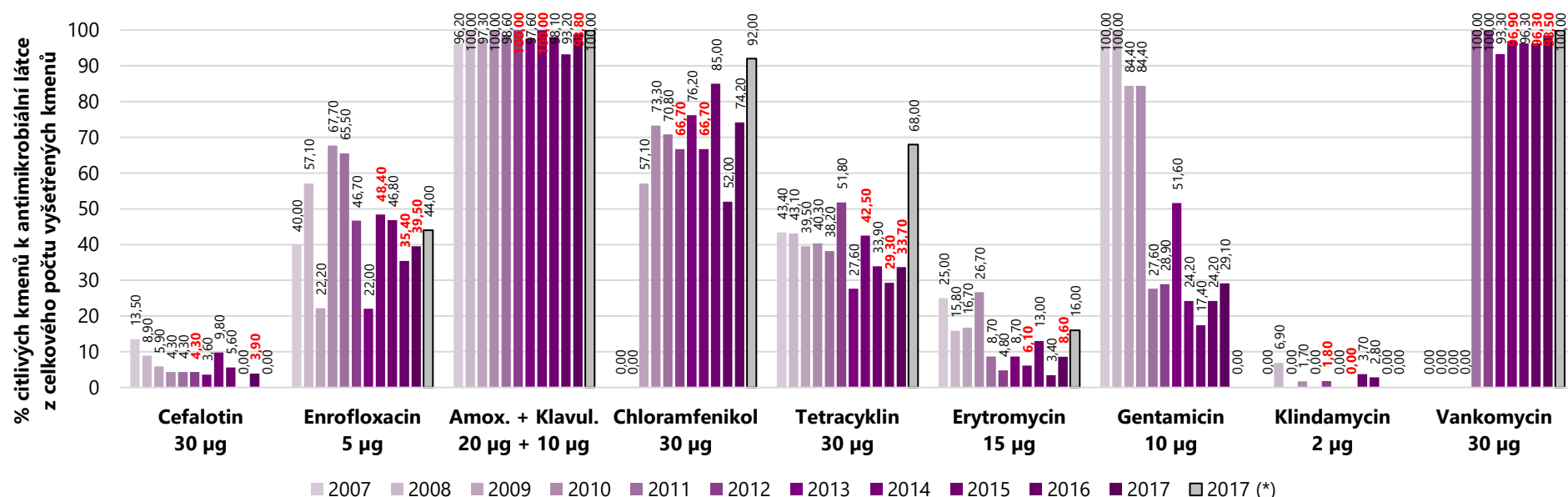


Tabulka 8 – Citlivost testovaných kmenů *S. aureus* (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

Antibiotikum	% citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů v jednotlivých letech sledovaného období											
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2017 (*)
Cefalotin	98,60	98,00	96,80	97,60	99,20	97,30	94,90	94,40	92,20	88,00	91,00	96,00
Enrofloxacin	98,10	98,10	96,20	92,80	97,50	95,70	93,80	93,00	91,00	89,90	92,40	100,00
Amoxicilin/Klavulan	97,70	87,10	96,00	97,00	97,10	94,30	82,00	90,80	82,80	82,90	86,50	92,00
Chloramfenikol	65,00	68,40	67,10	91,90	89,70	97,60	91,90	93,30	84,20	97,50	94,70	96,00
Tetracyklin	62,50	65,00	64,50	83,00	76,10	82,40	69,70	72,10	65,70	67,50	79,90	76,00
Erytromycin	65,30	64,10	62,90	87,10	77,40	92,50	80,90	50,60	66,70	92,50	79,00	68,00
Gentamicin	97,10	98,20	97,90	96,90	100,00	100,00	95,10	96,90	96,80	89,70	90,30	96,00
Klindamycin	73,70	77,40	73,40	90,90	84,60	87,10	84,50	86,90	76,30	89,40	91,60	92,00
Oxacilin	97,20	97,80	98,00	94,80	95,50	97,00	90,00	87,90	71,10	72,90	84,00	64,00

Legenda: * ... nedošlo ke statisticky průkazné změně citlivosti oproti průměru citlivosti za předcházející 3 roky při 5% míře spolehlivosti; číslo ... statisticky nehodnotitelné; 2017 (*) ... údaje spočítané na základě 25 vzorků; 0,00 ... všechny kmeny byly rezistentní; N/T ... citlivost netestována; číslo ... významný meziroční pokles citlivosti

Graf 13 – Citlivost testovaných kmenů *E. faecalis* (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

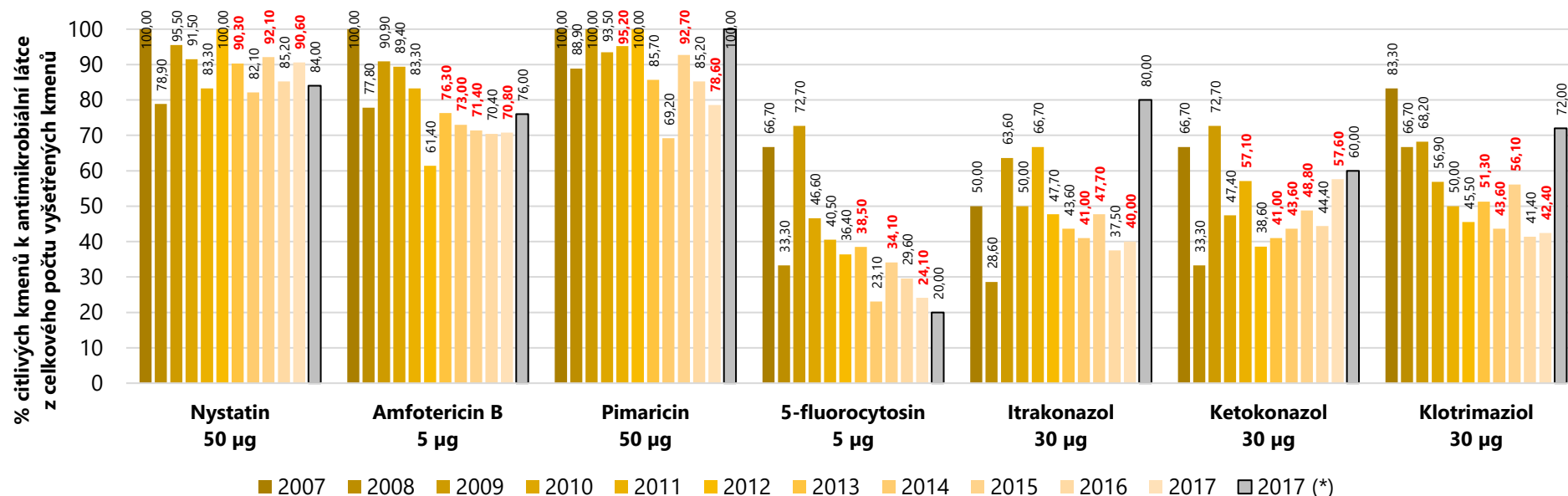


Tabulka 9 – Citlivost testovaných kmenů *E. faecalis* (v %) k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

Antibiotikum	% citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů v jednotlivých letech sledovaného období											
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2017 (*)
Cefalotin	13,50	8,90	5,90	4,30	4,30	4,30*	3,60	9,80	5,60	0,00	3,90*	0,00
Enrofloxacin	40,00	57,10	22,20	67,70	65,50	46,70	22,00	48,40*	46,80	35,40*	39,50*	44,00
Amoxicilin/Klavulan	96,20	100,00	97,30	100,00	98,60	100,00*	97,60	100,00*	98,10	93,20	98,80*	100,00
Chloramfenikol	N/T	N/T	57,10	73,30	70,80	66,70*	76,20	66,70*	85,00	52,00	74,20	92,00
Tetracyklin	43,40	43,10	39,50	40,30	38,20	51,80	27,60	42,50*	33,90	29,30*	33,70*	68,00
Erytromycin	25,00	15,80	16,70	26,70	8,70	4,80	8,70	6,10*	13,00	3,40	8,60*	16,00
Gentamicin	100,00	100,00	84,40	84,40	27,60	28,90	51,60	24,20	17,40	24,20	29,10	0,00
Klindamycin	0,00	6,90	0,00	1,70	0,00	1,80*	0,00	0,00*	3,70	2,80	0,00	0,00
Vankomycin	N/T	N/T	N/T	N/T	100,00	100,00	93,30	96,90*	96,30	96,30*	98,50*	100,00

Legenda: * ... nedošlo ke statisticky průkazné změně citlivosti oproti průměru citlivosti za předcházející 3 roky při 5% míře spolehlivosti; číslo ... statisticky nehodnotitelné; 2017 (*) ... údaje spočítané na základě 25 vzorků; 0,00 ... všechny kmeny byly rezistentní; N/T ... citlivost netestována; číslo ... významný meziroční pokles citlivosti

Graf 14 – Citlivost testovaných kmenů *Candida* sp. k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

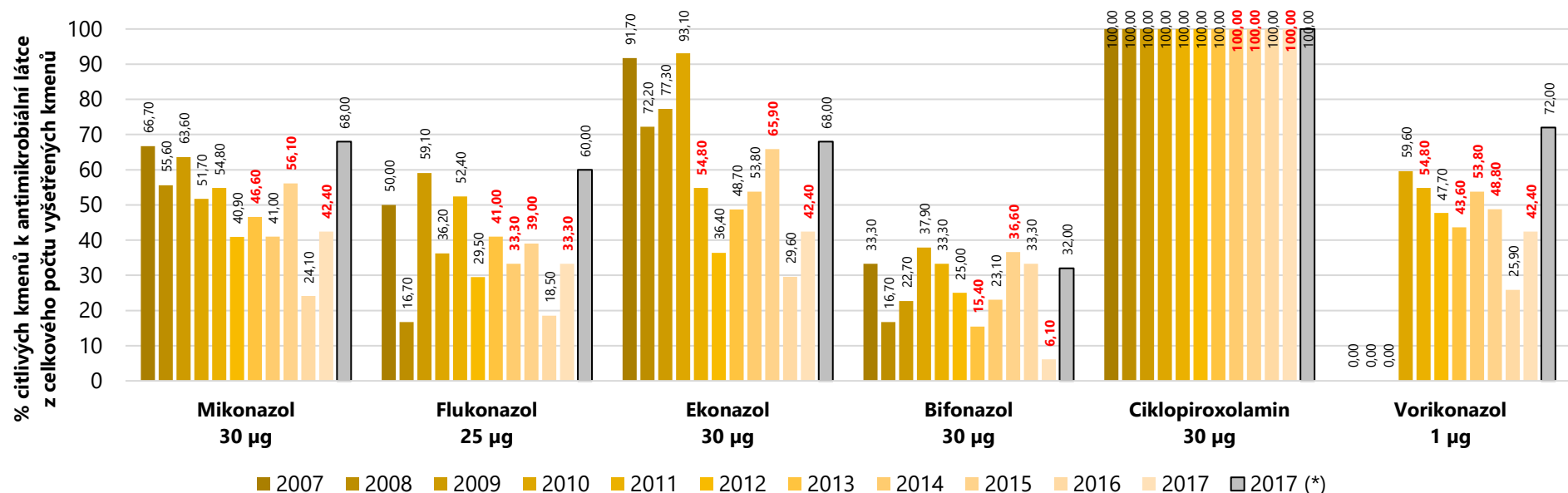


Tabulka 10 – Citlivost testovaných kmenů *Candida* sp. k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017

Antibiotikum	% citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů v jednotlivých letech sledovaného období											
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2017 (*)
Nystatin	100,00	78,90	95,50	91,50	83,30	100,00	90,30*	82,10	92,10*	85,20	90,60*	84,00
Amfotericin B	100,00	77,80	90,90	89,40	83,30	61,40	76,30*	73,00*	71,40*	70,40	70,80*	76,00
Pimaricin	100,00	88,90	100,00	93,50	95,20*	100,00	85,70	69,20	92,70*	85,20	78,60*	100,00
5-fluorocytosin	66,70	33,30	72,70	46,60	40,50	36,40	38,50*	23,10	34,10*	29,60	24,10*	20,00
Itrakonazol	50,00	28,60	63,60	50,00	66,70	47,70	43,60	41,00*	47,70*	37,50	40,00*	80,00
Ketokonazol	66,70	33,30	72,70	47,40	57,10*	38,60	41,00*	43,60*	48,80*	44,40	57,60*	60,00
Klotrimazol	83,30	66,70	68,20	56,90	50,00	45,50	51,30*	43,60*	56,10*	41,40	42,40*	72,00

Legenda: * ... nedošlo ke statisticky průkazné změně citlivosti oproti průměru citlivosti za předcházející 3 roky při 5% míře spolehlivosti; číslo ... statisticky nehodnotitelné; 2017 (*) ... údaje spočítané na základě 25 vzorků; 0,00 ... všechny kmeny byly rezistentní; N/T ... citlivost netestována; číslo ... významný meziroční pokles citlivosti

Graf 15 – Citlivost testovaných kmenů *Candida* sp. k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017 (pokračování)



Tabulka 11 – Citlivost testovaných kmenů *Candida* sp. k antimikrobiálním látkám v období 2007–2017 (pokračování)

Antibiotikum	% citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů v jednotlivých letech sledovaného období											
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2017 (*)
Mikonazol	66,70	55,60	63,60	51,70	54,80*	40,90	46,60*	41,00*	56,10*	24,10	42,40*	68,00
Flukonazol	50,00	16,70	59,10	36,20	52,40	29,50	41,00*	33,30*	39,00*	18,50	33,30*	60,00
Ekonazol	91,70	72,20	77,30	93,10	54,80	36,40	48,70	53,80*	65,90	29,60	42,40*	68,00
Bifonazol	33,30	16,70	22,70	37,90	33,30*	25,00*	15,40	23,10*	36,60	33,30	6,10	32,00
Ciklopiroxolamin	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Vorikonazol	N/T	N/T	N/T	59,60	54,80	47,70	43,60	53,80*	48,80*	25,90	42,40*	72,00

Legenda: * ... nedošlo ke statisticky průkazné změně citlivosti oproti průměru citlivosti za předcházející 3 roky při 5% míře spolehlivosti; číslo ... statisticky nehodnotitelné; 2017 (*) ... údaje spočítané na základě 25 vzorků; 0,00 ... všechny kmeny byly rezistentní; N/T ... citlivost netestována; číslo ... významný meziroční pokles citlivosti

5.3 Vyhodnocení spolehlivosti údajů antimikrobiální citlivosti stanovených na základě malého a velkého souboru dat

Posledním z dílčích cílů experimentální části této práce bylo stanovit s jakou chybou neboli odchylkou naměřeného údaje antimikrobiální citlivosti musíme počítat v případě, že ke stanovení antimikrobiální citlivosti použijeme nízký počet otestovaných mikrobiálních kmenů, tj. malý soubor dat.

V rámci této diplomové práce byla v roce 2017 přímo stanovena antimikrobiální citlivost u 25 kmenů od každého studovaného mikroba (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *E. faecalis*, *Candida* sp., tj. celkově 175 kmenů) pomocí diskové difúzní metody (viz **Kapitola 4.5.3**). Tato stanovení citlivosti prováděl přímo autor práce nezávisle na běžném provozu SVÚ Olomouc, během kterého byla k těmto kmenům (a ke všem ostatním zachyceným kmenům v roce 2017) také stanovena antimikrobiální citlivost. Na základě výsledků těchto stanovení byly spočítány dvě sady obecných antimikrobiálních citlivostí za rok 2017 – jedna sada založená na 25 kmenech a druhá sada založená na podstatně větším souboru dat (v řádech sto až tisíc kmenů). Očekáváme, že obecná antimikrobiální citlivost pro daný druh spočítaná na základě většího souboru dat je důvěryhodnějším údajem. Porovnáním těchto dvou sad obecných antimikrobiálních citlivostí za rok 2017 můžeme získat určité povědomí o chybě měření, se kterou musíme počítat v případě použití malého souboru dat.

S ohledem na průměrný rozdíl mezi údajem antimikrobiální citlivosti za rok 2017 spočítané na základě 25 kmenů a údajem antimikrobiální citlivosti za rok 2017 spočítané na základě velkého počtu kmenů byly seřazeny studované mikroorganismy následovně: *Salmonella* sp. (16,23 %), *Candida* sp. (12,87 %), *E. faecalis* (11,08 %), *P. aeruginosa* (9,03 %), *E. coli* (7,29 %), *S. aureus* (6,71 %) a *Klebsiella* sp. (4,23 %). Z výše uvedeného plyne, že nejpresněji byla zjištěna antimikrobiální citlivost na základě 25 kmenů u *Salmonella* sp., kdy se oproti údaji z velkého souboru lišila pouze o 4,23 %. Naopak nejméně přesné bylo stanovení antimikrobiální citlivosti na základě 25 kmenů u *Salmonella* sp., kde se oproti údaji z velkého souboru dat lišila o 16,23 %. Ovšem nutno podotknout, že v jednotlivých nezprůměrovaných rozdílech v antimikrobiálních citlivostech za rok 2017 se objevovaly i větší rozdíly, např. 34,30 % u itraconazolu (*Candida* sp.) nebo 27,60 % u enrofloxacinu (*P. aeruginosa*). Veškeré údaje spojené s rozdíly v antimikrobiálních citlivostech za rok 2017 shrnuje **Příloha 2** a **Příloha 3**.

6 DISKUZE

V rámci experimentální části této diplomové práce bylo s využitím uvedených experimentálních a statistických postupů (viz **Kapitola 4**) dosaženo výsledků (viz **Kapitola 5**), které posloužily k vytvoření uceleného přehledu informací o stavu prevalence a antimikrobiální rezistence za období 2007–2017 ve veterinární sféře moravského a slezského regionu České republiky u sedmi vybraných mikroorganismů, jmenovitě *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *E. faecalis* a *Candida* sp. Experimentální část zahrnovala tři dílčí cíle, z nichž prvním cílem bylo popsat změny prevalence výše uvedených mikrobů v letech 2007–2017, druhým cílem bylo popsat a statisticky zhodnotit změny v antimikrobiálních citlivostech uvedených mikrobů v letech 2007–2017 a posledním cílem bylo zhodnotit spolehlivost údajů mikrobiální citlivosti při porovnání dat z malých a velkých souborů vstupních dat.

Prevalence je základní epidemiologická a epizootologická veličina, která ve speciální mikrobiologii představuje podíl počtu jedinců s pozitivním nálezem daného mikroorganismu a celkového počtu všech jedinců ve sledované populaci, vztažený na určité časové období. Významné a statisticky prokázané změny v prevalencích určitých mikroorganismů v příslušné populaci mohou např. iniciovat preventivní či terapeutické programy pro nemocná zvířata anebo naopak poskytnout důvod pro ukončení některých terapeutických programů, aby nedocházelo např. ke zbytečnému nadužívání antibiotik, což by mohlo vést právě k rychlejšímu a častějšímu výskytu rezistence vůči antibiotikům. Zjištěné změny v prevalencích mikroorganismů studovaných v této práci popisují **Graf 1–Graf 7**. Z těchto grafů vyplynula průměrná prevalence studovaných mikrobů za období 2007–2017, která byla nejvyšší u *E. coli* ($7,02 \pm 1,19$ %), vysoká u *S. aureus* ($3,55 \pm 2,40$ %) a naopak poměrně nízká (do 1,5 %) u ostatních studovaných mikrobů: *Salmonella* sp. ($0,88 \pm 0,46$ %), *E. faecalis* ($0,71 \pm 0,28$ %), *P. aeruginosa* ($0,67 \pm 0,14$ %), *Klebsiella* sp. ($0,57 \pm 0,14$ %) a *Candida* sp. ($0,24 \pm 0,14$ %). Kromě těchto údajů byly zaznamenány také dva zajímavé klesající trendy prevalence u *S. aureus* a *Salmonella* sp., které s největší pravděpodobností souvisejí s postupným zlepšováním hygieny ve veterinární sféře České republiky a s nasazením eradikačních programů. U ostatních mikrobů zůstávají prevalence víceméně stabilně nízké a nebyly pozorovány výrazné výkyvy oproti dlouhodobému průměru prevalence, což také můžeme připisovat vysokému standardu výroby živočišných produktů.

Antimikrobiální citlivost je nepřímou úměrná antimikrobiální rezistenci a obvykle se uvádí jako absolutní číslo (počet) nebo procento kmenů citlivých, resp. rezistentních vůči nějaké antimikrobiální látce. Jak již bylo podrobně rozebráno v úvodu (viz **Kapitola 1**), problém s narůstající rezistencí patogenních mikroorganismů k antimikrobiálním látkám představuje jedno z největších rizik pro budoucnost lidstva v budoucnosti, neboť mikroekosystém zvířat je provázán s mikroekosystémem lidské populace. Podobně jako u změn v prevalencích mohou významné a statisticky prokázané nárůsty anebo poklesy antimikrobiálních citlivostí vést k úpravě preventivních či terapeutických programů.

Konkrétně lze např. přímo vyřadit antibiotikum, u kterého pozorujeme významný pokles v citlivosti a nahradit jej nějakým jiným antibiotikem a doufat, že postupem času dojde v rámci přirozené obměny mikrobiomu k vymizení nebo alespoň významnému snížení výskytu rezistentních kmenů. Z praktického hlediska se ale na tento přístup k boji s antimikrobiální rezistencí spolehnout nemůžeme. Data o antimikrobiální rezistenci nám ale rozhodně mohou pomoci nevyužívat antimikrobiální látky v případech, ve kterých předem víme, že citlivost k dané antimikrobiální látce je u daného mikroorganismu již na hraně účinnosti. Využití neúčinné antimikrobiální látky (nedosáhnutí terapeutické dávky, vysoká rezistence patogena) je vysoce rizikové, protože dále podporuje vznik nových rezistencí a vede k zatížení léčeného člověka či zvířete antimikrobiální léčbou, která má významné vedlejší účinky zejm. na zažívací trakt a přirozený mikrobiom, kdy dochází k likvidaci saprofytických, komenzálních nebo symbiotických mikroorganismů a tím pádem i k uvolnění „životního prostoru“ pro oportunistické patogenní mikroorganismy. V poslední době se také objevuje stájová diagnostika, kdy si chovatel může sám s využitím volně prodejných produktů stanovovat antimikrobiální citlivosti a na základě toho aplikovat nebo měnit léčbu. Je evidentní, že tyto případy skýtají mnohá rizika daná často zejm. neprofesionálním provedením stájového orientačního antimikrobiálního testu aj. Zjištěné změny antimikrobiálních citlivostí u mikroorganismů studovaných v této práci za období 2007–2017 popisují **Graf 8–Graf 15**. Z těchto grafů vyplynuly následující obecné závěry:

U *E. coli* byl pozorován postupný pokles citlivosti u 6 testovaných antibiotik (cefalotin, enrofloxacin, amoxicilin/klavulan, tetracyklin, gentamicin a kolistin), přičemž nejvýraznější byl pokles citlivosti k tetracyklinu. Zároveň byl u *E. coli* pozorován 1 nárůst citlivosti (ke chloramfenikolu). U *P. aeruginosa* byl pozorován postupný nárůst citlivosti u 4 testovaných antibiotik (gentamicin, cefoperazon, kolistin, enrofloxacin), přičemž nejvýraznější byl nárůst citlivosti ke gentamicinu. Zároveň u *P. aeruginosa* nebyl pozorován žádný výrazný pokles citlivosti u ostatních testovaných antibiotik. U *Salmonella* sp. byl pozorován v jednom případě pokles citlivosti (k enrofloxacinu) a zároveň v dalším případě nárůst citlivosti (k amoxicilin/klavulanu). U *Klebsiella* sp. byl pozorován postupný nárůst citlivosti u 2 testovaných antibiotik (amoxicilin/klavulan, chloramfenikol) a zároveň pokles citlivosti u 2 dalších testovaných antibiotik (cefalotin, tetracyklin). U *S. aureus* byl pozorován postupný nárůst u 2 antibiotik (chloramfenikol, klindamycin) a zároveň pokles u zbývajících 7 testovaných antibiotik (cefalotin, enrofloxacin, amoxicilin/klavulan, tetracyklin, erytromycin, gentamicin, oxacilin). U *E. faecalis* byl pozorován postupný pokles citlivosti u všech testovaných antibiotik kromě chloramfenikolu, u kterého citlivost pozvolna narůstala. U *Candida* sp. bylo pozorováno celkově 7 poklesů citlivosti (mikonazol, ekonazol, vorikonazol, amfotericin B, 5-fluorocytosin, klotrimazol) a pouze 1 nárůst citlivosti (ketokonazol).

V prezentovaném přehledu citlivostí k antibiotikům jsou nejpatrnější vysoké citlivosti k chloramfenikolu a amoxicilin/klavulanu, a naopak nízké citlivosti k tetracyklinu. V případě

chloramfenikolu je vysoká citlivost dána zřejmě tím, že chloramfenikol patří k antibiotikům s indikačním omezením, což znamená, že se v humánní sféře používá jen při léčbě obzvláště závažných infekcí a ve veterinární sféře je jeho používání zcela zakázáno u potravinových zvířat. Nepříjemnou zprávou je ale rozšiřující se rezistence k chloramfenikolovému homologu florfenikolu, který ve veterinární sféře zakázán není. V případě amoxicilin/klavulanu jakožto zástupci penicilinových antibiotik byla citlivost překvapivě vysoká i u *E. faecalis*, který z hlediska počtu poklesů „dopadl“ v přehledu nejhůře. Tato vysoká citlivost je přisuzována přísadce kyseliny klavulanové, která po ireverzibilní vazbě na betalaktamázy brání v inaktivaci betalaktamového kruhu penicilinových antibiotik a je tak účinným nástrojem pro překonání tohoto typu antimikrobiální rezistence.

Přehled citlivostí k antimykotikům u kvasinky *Candida* sp. přinesl spíše negativní závěry, protože u 10 z 13 studovaných antimykotik byla naměřena podstatně nízká citlivost.

V souborech dat statistického hodnocení změn v antimikrobiálních citlivostech se téměř vždy vyskytlo určité procento statisticky neprůkazných údajů, a to 11,11 % (*E. coli*), 52,26 % (*P. aeruginosa*), 13,33 % (*Salmonella* sp.), 31,94 % (*Klebsiella* sp.), 26,67 % (*E. faecalis*) a 40 % (*Candida* sp.). Statisticky neprůkazné údaje se mohly objevit v důsledku tzv. *sampling error* anebo *chance variation* (Perla & Carifio, 2005). U *sampling error* se jedná o „chybu způsobenou vzorkováním“, kdy statistické parametry stanovujeme pouze na základě určitého vzorku (počtu jedinců) namísto analýzy celé populace, která je samozřejmě v případě tohoto typu práce neproveditelná, jelikož nelze otestovat antimikrobiální citlivost u všech existujících mikroorganismů spadajících do veterinární sféry daného regionu. U *chance variation* hovoříme o „náhodné chybě“, která představuje rozdíl mezi náhodnou proměnnou a její očekávanou hodnotou, což v našem případě znamená, že hodnoty (které „neprošly“ statistickým testem) mohly být zvýšeny anebo sníženy právě o hodnotu náhodné chyby. Jediným mikroorganismem, jehož soubor dat neobsahoval žádné statisticky neprůkazné údaje byl *S. aureus*.

Jedním ze základních problémů stanovování obecné antimikrobiální citlivosti u libovolného mikroorganismu je výběr velikosti souboru dat, ze kterého citlivosti počítáme. Samozřejmě platí, že čím větší soubor dat (mikrobiálních kmenů, u kterých je otestována antimikrobiální citlivost) použijeme, tím větší je šance, že naše výsledky reprezentují skutečný stav vývoje dané veličiny ve zkoumané populaci (v případě této diplomové práce se jedná o mikrobiom veterinární sféry Moravy a Slezska České republiky). Tímto se řídí i SVÚ Olomouc, a proto do svých ročních výpočtů antimikrobiálních citlivostí zahrnuje veškeré mikrobiální kmeny daného biologického druhu, které za tento rok zachytí. V reálném světě mohou však nastat situace, ve kterých máme k dispozici pouze omezený soubor, ze kterého musíme udělat závěr. Proto je vhodné vědět, s jakou chybou závěr spočítaný na základě malého souboru dat počítáme. V našem měření se údaje antimikrobiálních citlivostí za rok 2017 spočítané na základě malého a velkého souboru dat lišily o následující hodnoty: *Salmonella* sp. (16,23 %), *Candida* sp. (12,87 %), *E. faecalis* (11,08 %), *P. aeruginosa* (9,03 %), *E. coli* (7,29 %), *S. aureus* (6,71 %) a *Klebsiella* sp. (4,23 %). Z těchto vysokých rozdílů plyne závěr, že antimikrobiální citlivost spočítaná pouze na základě

25 kmenů jednoho mikroorganismu není příliš spolehlivým a důvěryhodným údajem oproti údaji antimikrobiální citlivosti, který je spočítaný na základě většího souboru dat.

7 ZÁVĚR

Diplomová práce se věnovala zpracování přehledu informací o prevalenci a antimikrobiální citlivosti u *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *E. faecalis* a u kvasinek *Candida* sp. v průběhu let 2007–2017 v rámci veterinární sféry moravského a slezského regionu České republiky.

V teoretické části této práce byl splněn cíl popsat současné poznatky o všech sedmi studovaných mikroorganismech s ohledem na antimikrobiální rezistenci. V experimentální části této práce byly také splněny všechny stanovené dílčí cíle: Byla stanovena antimikrobiální citlivost u 175 mikrobiálních kmenů izolovaných z klinického a patologického veterinárního biologického materiálu doručeného na SVÚ Olomouc. Tyto kmeny byly dále klasifikovány (typizovány) prostřednictvím moderní metody MALDI-TOF MS. S využitím archivovaných dat SVÚ Olomouc byly posléze vytvořeny přehledné grafy a tabulky popisující změny v prevalencích a antimikrobiálních citlivostech u studovaných mikroorganismů včetně statistického hodnocení změn antimikrobiálních citlivostí pomocí testu dobré shody (chí kvadrát). Výsledky vlastních pozorování v oblasti antimikrobiálních rezistencí byly navíc nakonec porovnány s dlouhodobě získávanými daty z databáze SVÚ Olomouc. Z této práce nakonec vyplynuly následující závěry:

(1.) Ze sedmi studovaných mikroorganismů se ve vzorcích SVÚ Olomouc za období 2007–2017 nejvíce vyskytovala bakterie *E. coli* s prevalencí $7,02 \pm 1,90$ % a dále *S. aureus* s prevalencí $3,55 \pm 2,40$ %. Ostatních pět studovaných mikroorganismů se ve vzorcích SVÚ Olomouc za období 2007–2017 vyskytovalo s podstatně nižšími prevalencemi, jejichž rozmezí se i při zohlednění směrodatných odchylek pohybovalo mezi 0,10–1,34 %. Nejvýraznější změna v prevalenci za období 2007–2017 nastala u *S. aureus*, kde byl v roce 2017 oproti roku 2007 zaznamenán pokles o $5,18 \pm 2,40$ %. Méně výrazný pokles v prevalenci o velikosti $1,06 \pm 0,46$ % nastal v roce 2017 oproti roku 2007 také u *Salmonella* sp. U ostatních studovaných mikroorganismů k výraznějším změnám v prevalenci i přes mírné oscilace spíše nedocházelo.

(2.) Výsledky šetření stavu citlivosti k antibiotikům u šesti studovaných bakterií ve vzorcích SVÚ Olomouc za období 2007–2017 potvrdily tři zajímavé fakty. Prvním z nich je znepokojující stav citlivosti k tetracyklinu, což je jedno z nejhojněji využívaných antibiotik ve veterinární sféře. U čtyřech z pěti studovaných bakterií byla citlivost k tetracyklinu poměrně nízká, tj. v rozmezí od 38,48–71,67 %. Druhým z nich je naopak uspokojivý stav citlivosti k chloramfenikolu, přičemž používání tohoto antibiotika je ve veterinární sféře již dlouhou dobu zakázáno. U pěti studovaných bakterií byla citlivost k chloramfenikolu poměrně vysoká, tj. v rozmezí od 69,11–100 %. Třetím zajímavým faktem byl taktéž uspokojivý stav citlivosti k amoxicilin/klavulanu, který představoval v našem souboru vybraných antibiotik zástupce

penicilinů. U pěti studovaných bakterií byla citlivost k amoxicilin/klavulanu poměrně vysoká, tj. v rozmezí od 70,77–98,16 %.

(3.) Stav citlivosti k antimykotikům se u studované kvasinky *Candida* sp. ve vzorcích SVÚ Olomouc za období 2007–2017 ukázal být velice alarmující, protože pouze u 3 (nystatin, pimaricin, ciklopiroxolamin) z 13 testovaných antimykotik se objevovaly velmi dobré citlivosti v rozmezí od 89,91–100 %. Nízkou účinnost ostatních antimykotik (zejm. itrakonazol, mikonazol, flukonazol, bifonazol a vorikonazol, včetně 5-fluorocytosinu, který se používá spíše pro léčbu plísňových chorob) dokazovaly naměřené citlivosti v rozmezí od 25,76–49,41 %.

(4.) Vzhledem k vysokým rozdílům (v rozmezí od 4,23–16,23 %) mezi údaji o antimikrobiálních citlivostech spočítaných na základě malého (25 kmenů) a velkého (100–1000 kmenů) souboru dat bylo potvrzeno, že stanovení antimikrobiální citlivosti v mikrobiomu pouze na základě 25 kmenů poskytuje velice nepřesné údaje v porovnání se soubory stovek až tisíců podobných dat za posledních 11 let, které nelze brát v potaz při rozhodování např. o plošné aplikaci a využití dané antimikrobní látky jak ve veterinární, tak i v humánní praxi.

8 LITERATURA

Odborné články

- Aires-de-Sousa, M. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(6), 373–380.
- Andreatos, N., Shehadeh, F., Pliakos, E. E., & Mylonakis, E. (2018). The impact of antibiotic prescription rates on the incidence of MRSA bloodstream infections: a county-level, U.S.-wide analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10(5), 522–526.
- Bagley, S. T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control : IC*, 6(2), 52–8.
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2011). Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of Pathogens*, 2011, 601905.
- Bin Nafisah, S., Bin Nafesa, S., Alamery, A. H., Alhumaid, M. A., AlMuhaidib, H. M., & Al-Eidan, F. A. (2017). Over-the-counter antibiotics in Saudi Arabia, an urgent call for policy makers. *Journal of Infection and Public Health*, 10(5), 522–526.
- Braunsdorf, C., & LeibundGut-Landmann, S. (2018). Modulation of the Fungal-Host Interaction by the Intra-Species Diversity of *C. albicans*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 7(1).
- Bzdil, J., Chaloupka, O., & Bezrouk, Z. (2017). *Staphylococcus aureus* a mastitidy skotu, změny v prevalenci a citlivostech k antimikrobním látkám v letech 2007-2016. *Veterinářství*, 67(6), 466–471.
- Edelmann, A., Krüger, M., & Schmid, J. (2005). Genetic relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6164–6.
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308–41.
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10(3), 226–236.
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159–173.
- Goossens, H. (2009). Antibiotic consumption and link to resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 12–15.
- Harrington, S. M., Dudley, E. G., & Nataro, J. P. (2006). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiology Letters*, 254(1), 12–18.
- Hartland, E. L., & Leong, J. M. (2013). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis, and evolution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 15.
- Huycke, M. M., Spiegel, C. A., & Gilmore, M. S. (1991). Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(8), 1626–34.
- Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., & Sanders, A. G. (1940). Penicillin as a Chemotherapeutic Agent. *The Lancet*, 236(6104), 226–228.
- Kobayashi, S. D., Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *The American Journal of Pathology*, 185(6), 1518–27.
- Luo, Y., Yi, W., Yao, Y., Zhu, N., & Qin, P. (2018). Characteristic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* from gastroenteritis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(4), 251–255.
- Magdy, A., Elhadidy, M., Abd Ellatif, M. E., El Nakeeb, A., Abdallah, E., Thabet, W., ... Farid, M. (2015). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): Does it have a role in colorectal tumorigenesis? A Prospective Cohort Study. *International Journal of Surgery*, 18, 169–173.

- Mainil, J. (2013). Escherichia coli virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1–2), 2–12.
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B. (2000). Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2(2), 145–56.
- Masarikova, M., Manga, I., Cizek, A., Dolejska, M., Oravcova, V., Myskova, P., ... Literak, I. (2016). Salmonella enterica resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012. *Science of The Total Environment*, 542, 102–107.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Clifton, S. W., Latreille, P., Porwollik, S., Sabo, A., ... Wilson, R. K. (2004). Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of Salmonella enterica that cause typhoid. *Nature Genetics*, 36(12), 1268–1274.
- Miramón, P., & Lorenz, M. C. (2017). A feast for Candida: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. *PLoS Pathogens*, 13(2), e1006144.
- Mirhoseini, A., Amani, J., & Nazarian, S. (2018). Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic Escherichia coli and vaccines against it. *Microbial Pathogenesis*, 117, 162–169.
- Morace, G., Perdoni, F., & Borghi, E. (2014). Antifungal drug resistance in Candida species. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 254–259.
- Nhung, N. T., Van, N. T. B., Cuong, N. Van, Duong, T. T. Q., Nhat, T. T., Hang, T. T. T., ... Carrique-Mas, J. (2018). Antimicrobial residues and resistance against critically important antimicrobials in non-typhoidal Salmonella from meat sold at wet markets and supermarkets in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 301–309.
- Orden, J. ., Ruiz-Santa-Quiteria, J. ., Cid, D., García, S., & de la Fuente, R. (1999). Prevalence and characteristics of necrotizing Escherichia coli (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. *Veterinary Microbiology*, 66(4), 265–273.
- Perla, R. J., & Carifio, J. (2005). Use of the Chi-square Test to Determine Significance of Cumulative Antibigram Data. *American Journal of Infectious Diseases*, 1(4), 162–167.
- Peton, V., & Le Loir, Y. (2014). Staphylococcus aureus in veterinary medicine. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 602–615.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133–63.
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589–603.
- Qadri, F., Svennerholm, A.-M., Faruque, A. S. G., & Sack, R. B. (2005). Enterotoxigenic Escherichia coli in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 465–483.
- Sánchez, J., & Holmgren, J. (2005). Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. *Current Opinion in Immunology*, 17(4), 388–398.
- Shakhatreh, M. A. K., Swedan, S. F., Al-Odat, M. A., & Khabour, O. F. (2018). Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) in Jordan: Prevalence of urovirulence genes and antibiotic resistance. *Journal of King Saud University - Science*.
- Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93–98.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G., & Jr. (2015). Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–61.
- Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., & Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa. *Current Opinion in Microbiology*, 41, 15–20.

- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), 277–83.
- von Escherich, T. (1886). *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung* (1st ed.). Stuttgart: F. Enke.
- Wain, J., Hendriksen, R. S., Mikoleit, M. L., Keddy, K. H., & Ochiai, R. L. (2015). Typhoid fever. *The Lancet*, 385(9973), 1136–1145.
- Wong, J. (2003). Dr. Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 10(3), 124–126.
- Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends in Microbiology*, 24(12), 944–956.

Knihy

- Linda, B., & Kubanová, J. (2004). *Statistické tabulky a vzorce* (3rd ed.). Pardubice: Univerzita Pardubice.
- Votava, M. (2005). *Lékařská mikrobiologie speciální* (2nd ed.). Brno: Neptun.

Internetové zdroje

- The European Centre for Disease Prevention and Control: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Clinical Breakpoints [online]. [cit. 2018-04-23]. Dostupné z: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters in bacteria. Version 8.0, 2018 [online]. [cit. 2018-04-23]. Dostupné z: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters in fungi. Version 9.0, 2018 [online]. [cit. 2018-04-23]. Dostupné z: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_9.0_180212.pdf

9 PŘÍLOHY

- Příloha 1:** Prevalence vybraných mikroorganismů (v %) ve vyšetřovaných vzorcích na SVÚ Olomouc v letech 2007–2017 včetně směrodatné odchylky
- Příloha 2:** Rozdíly antimikrobiálních citlivostí (v %) zjištěných v roce 2017 na základě velkého a malého počtu testovaných kmenů uvedených bakterií
- Příloha 3:** Rozdíly antimikrobiálních citlivostí (v %) zjištěných v roce 2017 na základě velkého a malého počtu testovaných kmenů kvasinky *Candida* sp.

Příloha 1 – Prevalence vybraných mikroorganismů (v %) ve vyšetřovaných vzorcích na SVÚ Olomouc v letech 2007–2017 včetně směrodatné odchylky

Studovaný mikroorganismus	Parametr	Rok										
		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
-	Celkový počet vyšetřených vzorků	13377	18743	15790	16903	14792	15779	17874	19234	23072	23098	23322
<i>E. coli</i>	Počet pozitivních vzorků	1074	1401	1012	1309	1296	1350	1357	1432	1178	1268	1495
	Prevalence [%]	8,03	7,47	6,41	7,74	8,76	8,56	7,59	7,45	5,11	5,49	6,41
	Směrodatná odchylka prevalence [%]						±1,90					
<i>P. aeruginosa</i>	Počet pozitivních vzorků	119	153	124	117	129	105	107	115	98	163	124
	Prevalence [%]	0,89	0,82	0,79	0,69	0,87	0,67	0,60	0,60	0,42	0,71	0,53
	Směrodatná odchylka prevalence [%]						±0,14					
<i>Salmonella sp.</i>	Počet pozitivních vzorků	201	152	227	193	250	165	164	139	84	99	102
	Prevalence [%]	1,50	0,81	1,44	1,14	1,69	1,05	0,92	0,72	0,36	0,43	0,44
	Směrodatná odchylka prevalence [%]						±0,46					
<i>Klebsiella sp.</i>	Počet pozitivních vzorků	121	97	80	106	113	118	85	92	104	139	99
	Prevalence [%]	0,90	0,52	0,51	0,63	0,76	0,75	0,48	0,48	0,45	0,60	0,42
	Směrodatná odchylka prevalence [%]						±0,14					
<i>S. aureus</i>	Počet pozitivních vzorků	987	1577	972	564	482	450	373	341	537	374	514
	Prevalence [%]	7,38	8,41	6,16	3,34	3,26	2,85	2,09	1,77	2,33	1,62	2,20
	Směrodatná odchylka prevalence [%]						±2,40					
<i>E. faecalis</i>	Počet pozitivních vzorků	132	228	76	107	158	106	160	136	77	129	126
	Prevalence [%]	0,99	1,22	0,48	0,63	1,07	0,67	0,9	0,71	0,33	0,56	0,54
	Směrodatná odchylka prevalence [%]						±0,28					
<i>Candida sp.</i>	Počet pozitivních vzorků	15	18	34	77	53	63	50	47	50	31	38
	Prevalence [%]	0,11	0,10	0,22	0,46	0,36	0,40	0,28	0,24	0,22	0,13	0,16
	Směrodatná odchylka prevalence [%]						±0,14					

Příloha 2 – Rozdíly antimikrobiálních citlivostí (v %) zjištěných v roce 2017 na základě velkého a malého počtu testovaných kmenů uvedených bakterií

ATB	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>Salmonella sp.</i>			<i>Klebsiella sp.</i>			<i>S. aureus</i>			<i>E. faecalis</i>		
	2017 (1495)	2017 (*)	Δ	2017 (124)	2017 (*)	Δ	2017 (102)	2017 (*)	Δ	2017 (99)	2017 (*)	Δ	2017 (514)	2017 (*)	Δ	2017 (126)	2017 (*)	Δ
KF	29,50	32,00	2,50	-	-	-	100,0	72,00	28,00	69,60	92,00	22,40	91,00	96,00	5,00	3,90	0,00	3,90
ENR	77,00	84,00	7,00	44,40	72,00	27,6	88,60	72,00	16,60	95,10	92,00	3,10	92,40	100,0	7,60	39,50	44,00	4,50
AMC	68,90	72,00	3,10	-	-	-	95,00	68,00	27,00	88,90	88,00	0,90	86,50	92,00	5,50	98,80	100,0	1,20
C	89,10	92,00	2,90	-	-	-	100,0	80,00	20,00	90,90	92,00	1,10	94,70	96,00	1,30	74,20	92,00	17,80
T	49,00	76,00	27,00	-	-	-	70,50	56,00	14,50	82,80	76,00	6,80	79,90	76,00	3,90	33,70	68,00	34,30
E	0,00	4,00	4,00	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	79,00	68,00	11,00	8,60	16,00	7,40
CN	92,70	100,0	7,30	93,50	92,00	1,5	100,0	76,00	24,00	100,0	100,0	0,00	90,30	96,00	5,70	29,10	0,00	29,10
DA	0,10	4,00	3,90	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	91,60	92,00	0,40	0,00	0,00	0,00
CT	88,10	96,00	7,90	95,30	100,0	4,7	100,0	84,00	16,00	95,80	92,00	3,80	-	-	-	-	-	-
CFP	-	-	-	92,50	76,00	16,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SXT	-	-	-	1,00	0,00	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRL	-	-	-	97,10	100,0	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OXA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	84,00	64,00	20,00	-	-	-
VAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98,50	100,0	1,50
IMI	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEM	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
☉ Δ	7,29			9,03			16,23			4,23			6,71			11,08		

Legenda: (☉) Δ ... (průměrný) rozdíl v antimikrobiálních citlivostech za rok 2017 spočítaných na základě velkého a malého souboru dat;
2017 (x) ... antimikrobiální citlivost (v %) na základě *x* testovaných kmenů; **2017 (*)** ... antimikrobiální citlivost (v %) na základě 25 kmenů
ATB ... antibiotikum; **KF** ... cefalotin; **ENR** ... enrofloxacin; **AMC** ... amoxicilin/klavulan; **C** ... chloramfenikol; **T** ... tetracyklin;
E ... erytromycin; **CN** ... gentamicin; **DA** ... klindamycin; **CT** ... kolistin; **CFP** ... cefoperazon; **SXT** ... kotrimoxazol; **PRL** ... piperacilin;
OXA ... oxacilin; **VAN** ... vankomycin; **IMI** ... imipenem; **MEM** ... meropenem

Příloha 3 – Rozdíly antimikrobiálních citlivostí (v %) zjištěných v roce 2017 na základě velkého a malého počtu testovaných kmenů kvasinky *Candida* sp.

ATM	<i>Candida</i> sp.		
	2017 (38)	2017 (*)	Δ
Nystatin	3,90	0,00	3,90
Amfotericin B	39,50	44,00	4,50
Pimaricin	98,80	100,00	1,20
5-fluorocytosin	74,20	92,00	17,80
Itrakonazol	33,70	68,00	34,30
Ketokonazol	8,60	16,00	7,40
Klotrimazol	29,10	0,00	29,10
Mikonazol	3,90	0,00	3,90
Flukonazol	39,50	44,00	4,50
Ekonazol	98,80	100,00	1,20
Bifonazol	74,20	92,00	17,80
Ciklopiroxolamin	33,70	68,00	34,30
Vorikonazol	8,60	16,00	7,40
☉ Δ		12,87	

Legenda: (☉) Δ ... (průměrný) rozdíl v antimikrobiálních citlivostech za rok 2017 spočítaných na základě velkého a malého souboru dat;

2017 (x) ... antimikrobiální citlivost (v %) na základě *x* testovaných kmenů;

2017 (*) ... antimikrobiální citlivost (v %) na základě 25 kmenů

ATM ... antimykotikum