

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Stafylokoky u domácích savců a jejich citlivost k antimikrobiálním látkám

Bakalářská práce

Denisa Štanclová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením MVDr. Jaroslava Bzdila, Ph.D. s využitím literárních zdrojů, které jsou uvedeny v závěru této práce.

V Olomouci dne

.....

Denisa Štanclová

SOUHRN

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat druhové zastoupení stafylokoků u domácích zvířat a následně popsat jejich změny v prevalenci a zmapovat jejich citlivosti k antimikrobním látkám. Celkový souhrn byl vytvořen s použitím vlastních naměřených údajů spolu s daty uložených na Státním veterinárním ústavu v Olomouci. V průběhu let 2008–2017 bylo na Státním veterinárním ústavu v Olomouci vyšetřeno celkem 60030 vzorků pocházejících z klinického materiálu od koček, psů, skotu, prasat a koní. Z celkového počtu vyšetřených vzorků bylo celkem izolováno 12978 kmenů (prevalence 21,62 %) 27 druhů *Staphylococcus* spp. Stafylokoky byly nejčastěji detekovány ve vzorcích získaných z mléčné žlázy (7745 kmenů; tj. 59,68 % izolátů), kůže (2174 kmenů; tj. 16,75 % izolátů) a z uší (1815 kmenů; tj. 13,99 % izolátů). Materiál byl zpracován běžnými kultivačními metodami a následně byly izoláty identifikovány nejdříve pomocí biochemického testu STAPHYtest 24 a poté metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS. Nejčastěji izolovanými druhy byly *Staphylococcus aureus* (prevalence 9,39 %), *Staphylococcus intermedius* (prevalence 3,31 %), *Staphylococcus chromogenes* (prevalence 2,57 %) a *Staphylococcus pseudointermedius* (prevalence 2,34 %). K nejvýraznější změně v prevalenci došlo u *S. pseudointermedius*, kde byl v roce 2017 oproti roku 2008 zaznamenán její nárůst o 6,32 procentní body. Nakonec byla u izolovaných kmenů stafylokoků stanovena citlivost k antimikrobním látkám pomocí diskové difúzní metody. Nejúčinnějšími antimikrobními látkami byly gentamicin, enrofloxacin a kotrimoxazol s 97,30 %, 97,20 % a 94,60 % citlivých kmenů. Naopak nejnižší účinnost byla stanovena v případě oxacilinu, erytromycinu a ampicilinu s 72,30 %, 68,20 % a 46,00 % citlivých kmenů. U kmenů *S. intermedius* bylo možné pozorovat nízkou citlivost k tetracyklinu, oxacilinu a ampicilinu (20,80–62,10 % citlivých kmenů). Relativně nízká citlivost byla také pozorována u kmenů *S. pseudointermedius* v případě ampicilinu, oxacilinu a chloramfenikolu (41,30–63,70 % citlivých kmenů). Naopak jako nejvíce rezistentní kmeny byly zaznamenány kmeny *S. chromogenes* u oxacilinu, gentamicinu a enrofloxacinu (99,50–100 % citlivých kmenů), a kmeny *S. aureus* v případě gentamicinu, novobiocinu a kotrimoxazolu (96,00–98,70 % citlivých kmenů). Hlavní příčinou narůstající antimikrobní rezistence může být zejména nevhodné používání antibiotik, především slepá aplikace léčiv bez stanovení citlivosti mikroorganismů, nebo aplikace nízkých dávek antimikrobik po krátkou dobu. Narůstající rezistence bakterií na antimikrobní látky může v budoucnosti vést k vyšší morbiditě a mortalitě a přenosu genů rezistence z animálního mikrobiomu do mikrobiomu humánního.

SUMMARY

The aim of this bachelor thesis was to characterise the representation of staphylococci species in domestic animals and their changes in prevalence and to report changes in their susceptibility to antimicrobials. The overall summary was created using measured data together with the data archived at the State Veterinary Institute in Olomouc. A total of 60030 samples from clinical material from cats, dogs, cattle, pigs and horses were examined in the period 2008–2017 at the State Veterinary Institute in Olomouc. Total of 12978 strains (prevalence 21.62 %) of 27 *Staphylococcus* species were isolated. Staphylococci were most often isolated from the mammary gland (7745 of strains = 59.68 % isolates), from the skin (2174 of strains = 16.75 % isolates) and from the ears (1815 of strains = 13.99 % isolates). Samples were processed by standard cultivation methods. All isolated strains were identified using the STAPHYtest 24 biochemical assay followed by molecular method MALDI-TOF. The most prevalent isolated species were *Staphylococcus aureus* (prevalence 9.39 %) *Staphylococcus intermedius* (prevalence 3.31 %), *Staphylococcus chromogenes* (prevalence 2.57 %) and *Staphylococcus pseudointermedius* (prevalence 2.34 %). The most significant change in the prevalence occurred with *S. pseudointermedius*, whose prevalence increased by 6.32 percentage points in 2017 when compared to 2007. Susceptibility to antimicrobials was determined by disc diffusion method. The most effective antimicrobials were gentamicin, enrofloxacin and cotrimoxazole with 97.30 %, 97.20 % and 94.60 % of susceptible strains respectively. The least effective antimicrobials were oxacillin, erythromycin and ampicillin with 72.30 %, 68.20 % and 46.00 % of susceptible strains. Low sensitivity to tetracycline, oxacillin and ampicillin (20.80–62.10 % of susceptible strains) was observed in *S. intermedius* strains. Relatively low sensitivity was observed for ampicillin, oxacillin and chloramphenicol (41.30–63.70 % of susceptible strains) in *S. pseudointermedius* strains. The most resistant of staphylococci strains were *S. chromogenes* for oxacillin, gentamicin and enrofloxacin (99.50–100.00 % of susceptible strains), and *S. aureus* for gentamicin, novobiocin and cotrimoxazole (96.00–98.70 % of susceptible strains). The main cause of increasing antimicrobial resistance can be inappropriate use of antibiotics, in particular blind drug application without the susceptibility testing of microorganisms, or the application of low doses of antimicrobials for a short time. In the future increasing resistance of bacteria to antimicrobials could lead to higher morbidity and mortality of animals and the transfer of resistance genes from animal to human microbiome.

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu MVDr. Jaroslavu Bzdilovi, Ph.D. ze Státního veterinárního ústavu v Olomouci za odborné vedení, ochotu, cenné rady při řešení dané problematiky a za poskytnutí nezbytných dat, která byla použita v této bakalářské práci. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
3.1 Taxonomie stafylokoků.....	3
3.2 Morfologické a fyziologické vlastnosti stafylokoků.....	3
3.3 Složení buněčné stěny	4
3.4 Genetika a genom stafylokoků.....	6
3.5 Kultivace stafylokoků	6
3.5.1 Kultivační podmínky	6
3.5.2 Morfologie kolonií.....	7
3.6 Výskyt stafylokoků	7
3.7 Patogenita stafylokoků	8
3.7.1 Rezistence stafylokoků k antimikrobním látkám	8
3.8 Klinický význam stafylokoků u lidí	9
3.8.1 Klinický význam koagulasa-pozitivních stafylokoků	10
3.8.2 Klinický význam koagulasa-negativních stafylokoků.....	10
3.9 Klinický význam stafylokoků u zvířat	11
3.9.1 Mastitida skotu	11
3.9.2 Exsudativní epidermitis	11
3.9.3 Onemocnění u psů	12
3.10 Metody identifikace stafylokoků.....	12
3.10.1 Biochemické testy.....	12
3.10.2 Identifikace pomocí komerčních souprav.....	13
3.10.3 Genotypové molekulárně biologické metody.....	13
3.10.4 Fenotypové molekulární metody - hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	14
3.11 Rezidua antimikrobních látek ve vodním prostředí	15
4 MATERIÁL A METODY	16
4.1 Biologický materiál	16
4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy.....	16
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	17
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	18
4.4.1 Klinický materiál	18
4.4.2 Kultivace klinického materiálu.....	18
4.4.3 Mikroskopie.....	19
4.4.4 Biochemické testy.....	20
4.4.5 MALDI-TOF MS	22

4.4.6 Stanovení citlivosti k antimikrobním látkám.....	22
5 VÝSLEDKY	24
5.1 Počty vyšetřených klinických vzorků	24
5.2 Vyhodnocení morfologie bakteriálních kolonií	25
5.3 Vyhodnocení biochemických testů	26
5.4 Prevalence Staphylococcus spp. v letech 2008–2017	27
5.5 Citlivosti k antimikrobním látkám	29
5.6 Vyhodnocení získaných údajů získaných v průběhu roku 2018	32
6 DISKUZE	34
7 ZÁVĚR	38
8 LITERATURA	39
9 PŘÍLOHY	44

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMP	ampicilin
ARA	arabinosa
ARG	arginin
ARG	geny rezistence proti antibiotikům (z angl. antibiotic resistance genes)
ATB	antibiotikum
bGA	β -galaktosidasa
bGL	β -glukosidasa
C	chloramfenikol
CEL	cellobiosa
CfA	vázaná koagulasa (z angl. clumping faktor A)
CN	gentamicin
CoNS	koagulasa-negativní stafylokoky (z angl. coagulase-negative staphylococci)
DA	klindamycin
E	erytromycin
EA	Endův agar
EDWA	Edwardsův agar
ENR	enrofloxacin
ESL	eskulin
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FRU	fruktosa
GAL	galaktosa
GLR	β -glukoronidasa
HCCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (z angl. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)
KA	krvní agar
LAC	laktosa
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (z angl. mass assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry)
MAN	mannit
MHA	Mueller-Hinton agar
MLT	maltosa

MNS	mannosa
MPB	masopeptonový bujón
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (z angl., methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
NAG	N-acetyl β -D-glukosamin
NV	novobiocin
ORN	ornitin
OX	oxacilin
OXI	oxidasa
p. b.	procentní bod (z angl. percentage point)
PBP	proteiny vázající penicilin (z angl. penicillin binding protein)
PHS	fosfatasa
PYR	pyrrolidonylarylamidasa
qPCR	kvantitativní real-time PCR (z angl. quantitative polymerase chain reaction)
RAF	rafinosa
rDNA	ribosomální DNA (z angl. ribosomal DNA)
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (z angl. restriction fragment length polymorphism)
RIB	ribosa
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (z angl. ribosomal ribonucleotide acid)
S	Svedbergova podjednotka
SA	Sabouraudův agar
SOR	sorbitol
sp., spp.	druh, druhy (z lat., species)
subsp., ssp.	poddruh (z lat. subspecies)
SUC	sacharosa
SVÚ Olomouc	Státní veterinární ústav Olomouc
SXT	kotrimoxazol
TE	tetracyklin
TRE	trehalosa
URE	ureasa
VPT	acetoin

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1** Struktura peptidoglykanu. NacGlu - N-acetylglukosamin, NacM - kyselina N-acetylmuramová, A - L-alanin; D-Q - D-glutamin, K - L-lysin, D-A - D-alanin, G - L-glycin (převzato a upraveno z Bastos et al., 2010)..... 5
- Obrázek 2** Lokalizace stěnové kyseliny teichoové a lipoteichoové kyseliny v buněčné stěně stafylokoků (převzato a upraveno z Xia et al., 2010)..... 5
- Obrázek 3** Počty vyšetřených vzorků pocházejících z klinického materiálu z koček, psů, skotu, prasat a koní na SVÚ Olomouc ve sledovaném období 2008–2017. 24
- Obrázek 4** Morfologie bakteriálních kolonií. A - růst *S. aureus* na KA, B - mikroskopický preparát *S. aureus* (vpravo) barvený dle Grama při zvětšení 1000x (Foto: J. Bzdil)..... 25
- Obrázek 5** Morfologie bakteriálních kolonií. A - růst *S. chromogenes* na KA, B - mikroskopický preparát *S. chromogenes* barvený dle Grama při zvětšení 1000x (Foto: J. Bzdil)..... 25
- Obrázek 6** Morfologie bakteriálních kolonií. A - růst *S. equorum* na KA, B - mikroskopický preparát *S. equorum* barvený dle Grama při zvětšení 1000x (Foto: J. Bzdil). 25
- Obrázek 7** Výsledek biochemických testů. A - pozitivní katalasový test, B - pozitivní cytochromoxidasový test, C - negativní cytochromoxidasový test (Foto: J. Bzdil)..... 26
- Obrázek 8** Změny v prevalenci *S. aureus* ve vzorcích na SVÚ Olomouc v období 2008–2017. 28
- Obrázek 9** Změny v prevalenci *S. intermedius* ve vzorcích na SVÚ Olomouc v období 2008–2017. 28
- Obrázek 10** Změny v prevalenci *S. chromogenes* ve vzorcích na SVÚ Olomouc v období 2008–2017. 28
- Obrázek 11** Změny v prevalenci *S. pseudointermedius* ve vzorcích na SVÚ Olomouc v období 2008–2017. 29

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Interpretace výsledných reakcí komerční soupravy STAPHYtest 24 (převzato a upraveno z ERBA-Lachema a.s., Brno, ČR).	21
Tabulka 2 Význam hodnot MALDI skóre výsledku MALDI-TOF MS (Štřomerová, 2013). 22	
Tabulka 3 Charakteristika antimikrobních látek použitých k testaci citlivosti bakterií rodu <i>Staphylococcus</i> (EUCAST, 2018).	23
Tabulka 4 Biochemická identifikace vybraných druhů <i>Staphylococcus</i> spp. pomocí komerční soupravy STAPHYtest 24 (Převzato a upraveno z ERBA Lachema a.s., Brno, ČR).	26
Tabulka 5 Citlivost vybraných <i>Staphylococcus</i> spp. izolovaných z domácích zvířat k antimikrobním látkám v období let 2008–2017.	31
Tabulka 6 Citlivost vyšetřených kmenů <i>S. aureus</i> k antimikrobním látkám v období 2008–2018.	31
Tabulka 7 Citlivost vyšetřených kmenů <i>S. intermedius</i> k antimikrobním látkám v období 2008–2018.	31
Tabulka 8 Citlivost vyšetřených kmenů <i>S. chromogenes</i> k antimikrobním látkám v období 2008–2018.	32
Tabulka 9 Citlivost vyšetřených kmenů <i>S. pseudointermedius</i> k antimikrobním látkám v období 2008–2018.	32
Tabulka 10 Citlivost vybraných druhů <i>Staphylococcus</i> spp. izolovaných z domácích zvířat k antimikrobním látkám na základě vlastního pozorování v roce 2018.	33

1 ÚVOD

Rodový název *Staphylococcus* poprvé použil v roce 1883 skotský bakteriolog Alexander Ogston při pozorování v hroznech uspořádaných mikrokoků způsobující záněty. Formální popis rodu *Staphylococcus* pak zavedl o rok později v roce 1884 německý mikrobiolog Friedrich Julius Rosenbach, který stafylokoky rozdělil na dva druhy *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus albus* (Götz *et al.*, 2006).

Stafylokoky jsou na světě nejrozšířenější skupinou bakterií, které jsou součástí normální mikroflóry pokožky kůže a sliznic jak u lidí, tak u zvířat. Avšak při oslabení imunitního systému hostitele mohou pomocí faktorů virulence, kterými bývají vybaveny, způsobovat řadu závažných infekcí, u nichž je nezbytné nasadit antibiotickou léčbu. Nicméně účinnost antibiotik je ohrožena stále rostoucí mikrobiální rezistencí nejen ve zdravotnických zařízeních, ale i ve veterinární sféře a zemědělství. Ke vzniku rezistence k antimikrobním látkám dochází jejich nadměrným užíváním, k němuž přispívají i lékaři díky zbytečně velkým množstvím předepisovaných léků (Nafisah *et al.*, 2017). Podle světové zdravotnické organizace je antimikrobní rezistence stále vážnějším ohrožením globálního veřejného zdraví, které vyžaduje přijmout opatření napříč mocenskými strukturami a společnostmi. Stafylokoky rezistentní vůči antimikrobním látkám bývají izolovány z lidí, zvířat, potravin i z životního prostředí (z vody, půdy a ovzduší). Mohou se šířit mezi lidmi a zvířaty, prostřednictvím potravin živočišného původu, a mezi lidmi navzájem. Špatná kontrola infekcí, nedostatečné hygienické podmínky a nevhodná manipulace s potravinami mohou podporovat šíření rezistentních kmenů mikroorganismů (WHO, ©2019). Mezi nebezpečné rezistentní kmeny stafylokoků patří bezpochyby meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, který byl poprvé identifikován v roce 1961, jen jeden rok po zavedení meticilinu, a od té doby se rozšířily po celém světě (Ventola, 2015). Velkým nebezpečím vzniku mikrobiálních rezistencí je také výskyt širokého spektra antimikrobních látek a jejich metabolitů například v odpadních vodách. Odtud se tato rezidua mohou dostávat do povrchových vod, potravin i pitné vody (Zhang *et al.*, 2009).

2 CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Zpracovat literární rešerši zaměřenou na charakteristiku rodu *Staphylococcus*, zejména na jejich taxonomické zařazení, patogenitu, mechanismus rezistence k antimikrobním látkám a jejich klinický význam v humánní a veterinární sféře.

Experimentální část:

- Zpracovat klinický materiál běžnými kultivačními metodami.
- Identifikovat izoláty *Staphylococcus* spp. pomocí barvení dle Grama.
- Biochemicky a fenotypově identifikovat izoláty *Staphylococcus* spp. pomocí komerční soupravy STAPHYtest 24 s dodatkovými testy na detekci katalasy, plasmakoagulasy a cytochromoxidasy, a metody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.
- Popsat a statisticky vyhodnotit změny v prevalenci v období 2008–2017 u 4 nejfrekventovanějších druhů *Staphylococcus* spp. izolovaných na Státním veterinárním ústavu Olomouc z klinického materiálu pocházejících z domácích zvířat.
- Popsat a statisticky vyhodnotit změny v antimikrobní citlivosti v období 2008–2017 u 4 nejfrekventovanějších druhů *Staphylococcus* spp. izolovaných na Státním veterinárním ústavu Olomouc z klinického materiálu pocházejících z domácích zvířat.
- Porovnat změny v prevalenci a v antimikrobní citlivosti s výsledky získaných na základě vlastního měření v roce 2018.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Taxonomie stafylokoků

Stafylokoky patří mezi grampozitivní koky, které zahrnují aeroby, fakultativní nebo aerotolerantní anaeroby. V minulosti byly stafylokoky na základě katalasové aktivity a morfologického uspořádání koků děleny do dvou čeledí: *Staphylococcaceae* a *Micrococcaceae*. Rod *Staphylococcus*, spolu s rody *Stomatococcus*, *Planococcus* a *Micrococcus*, původně patřily do čeledi *Micrococcaceae*. Stafylokoky byly sice dle podobné morfologie a stejné katalasové aktivity zaměňovány s mikrokoky, genetické studie však ukázaly, že stafylokoky vykazují větší příbuznost se streptokoky a bacily než mikrokoky (Votava *et al.*, 2003).

Aktuální systém řadí tedy rod *Staphylococcus* do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales* a čeledi *Staphylococcaceae* (Euzéby, 2018). Každý bakteriální rod čeledi *Staphylococcaceae* se dále člení na své druhy a popřípadě poddruhy. Největší zastoupení bakteriálních druhů má rod *Staphylococcus*. Zatímco se v roce 1974 rozlišovaly pouze 3 druhy stafylokoků, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus saprophyticus*, v současnosti existuje 53 druhů, z toho 10 druhů se dělí na dva poddruhy, druh *Staphylococcus petrasii* se člení na 3 poddruhy a *Staphylococcus sciuri* dokonce na 4 poddruhy, a to *Staphylococcus sciuri* subsp. *carnaticus* (subsp., z lat. subspecies), *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *rodentium* a *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri* (Euzéby, 2018; Votava *et al.*, 2003).

3.2 Morfologické a fyziologické vlastnosti stafylokoků

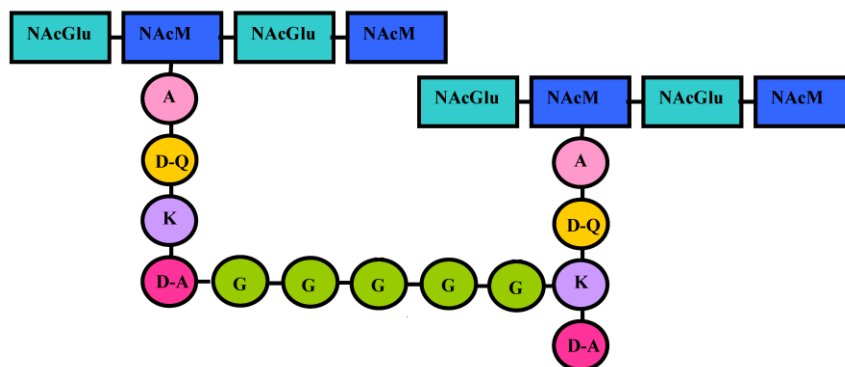
Stafylokoky jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující a většinou neopouzdržené koky o velikosti přibližně 0,5–1,5 μm , uspořádané jednotlivě, po dvojicích, ve čtveřicích nebo nejčastěji v nepravidelných shlucích, které připomínají tvar hroznů (Götz *et al.*, 2006). Stafylokoky jsou až na výjimky fakultativně anaerobní, katalasa pozitivní a oxidasa negativní (Votava *et al.*, 2003). Na základě schopnosti produkce enzymu plasmakoagulasy lze tyto bakterie dělit na koagulasa pozitivní či negativní (Votava *et al.*, 2003). Pouze dva druhy *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* a *Staphylococcus saccharolyticus* jsou anaerobní a katalasa negativní, zatímco druhy *Staphylococcus fleuretii*, *Staphylococcus lentus*, *S. sciuri* a *Staphylococcus vitulinus* jsou zástupci oxidasa pozitivních stafylokoků (Götz *et al.*, 2006; Kwok *et al.*, 2003). Stafylokoky jsou odolné vůči podmínkám zevního prostředí, jsou stabilní vůči vyschnutí, zahřívání při teplotě 60 °C. Co se týká dezinfekčních prostředků, jsou odolné

vůči fenolu, sloučeninám rtuti, ale v přítomnosti 5–10% NaCl se množí. K lysostafinu, nitrofuranu a furazolidinu jsou citlivé, na druhé straně jsou rezistentní k lysozymu, erytromycinu a bacitracinu (Götz *et al.*, 2006; Votava *et al.*, 2003).

Stafylokoky jsou rovněž schopny tvořit biofilm, což je strukturované mikrobiální společenství protkané vodními kanálky uložené v mezibuněčné hmotě tvořené polysacharidy mikrobiálního původu přichycené k povrchu (Kvasničková *et al.*, 2016). Stafylokoky jsou v podobě biofilmu schopné adherovat na povrchy cizích těles, zejména u pacientů se zavedenými chirurgickými implantáty. Biofilm chrání stafylokoky proti okolním nepříznivým vlivům bakteriofágům, vyschnutí, antibiotikům, hostitelským imunologickým reakcím a dezinfekčním činidlům (Beneš, 2009; Votava *et al.*, 2003). Stafylokoky mohou toto společenství vytvářet na mnoha površích, jako jsou vodní a půdní prostředí, zdravotnické prostředky, fragmenty mrtvé i živé tkáně (Donlan, 2002).

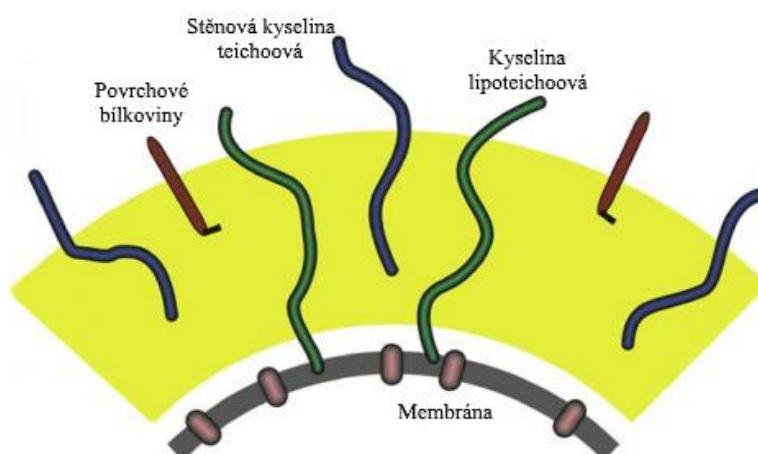
3.3 Složení buněčné stěny

Buněčná stěna stafylokoků a obecně všech grampozitivních bakterií se skládá z peptidoglykanu, kyseliny teichoové a proteinu A (Votava *et al.*, 2003). Peptidoglykan nacházející se na vnější straně cytoplazmatické membrány je heteropolymer, jehož základem jsou lineární glykanové řetězce zesíťované krátkými peptidy (Heijenoort, 2001). Cukernou složku tvoří střídající se zbytky N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové spojenými přes β -1,4 glykosidické vazby. K N-acetylmuramové kyselině se připojují peptidové skupiny sestávající se z krátkých peptidových podjednotek složených z L-alaninu, D-alaninu, kyseliny D-glutamové a L-lysinu, které jsou napříč propojené pentaglycinovými můstky (Obrázek 1) (Bastos *et al.*, 2010). Peptidoglykan zabezpečuje integritu buněk, udržuje definovaný tvar buňky, stimuluje u stafylokoků uvolňování cytokininů z makrofágů, aktivaci komplementu a shlukování trombocytů (Heijenoort, 2001; Vollmer *et al.*, 2008; Votava *et al.*, 2003).



Obrázek 1 Struktura peptidoglykanu. NAcGlu - N-acetylglukosamin, NAcM - kyselina N-acetylmuramová, A - L-alanin; D-Q - D-glutamin, K - L-lysin, D-A - D-alanin, G - L-glycin (převzato a upraveno z Bastos *et al.*, 2010).

Kyselina teichoová je hlavní povrchový antigen složený z opakujících se polyol-fosfátových podjednotek, jako je ribitol-fosfát nebo glycerol-fosfát. Kyselina teichoová zahrnuje jak stěnovou kyselinu teichoovou, která se připojuje k peptidoglykanu přes fosfodiesterové vazby na 6-OH kyseliny N-acetylmuramové, tak lipoteichoovou kyselinu, která je připojena k cytoplazmatické membráně přes glykolipidovou kotvu (Obrázek 2). Kyselina teichoová nejen chrání buňky před stresem z okolního prostředí, kontroluje aktivitu enzymů a koncentraci kationtů v buněčném obalu, ale především se uplatňuje v prvním kroku tvorby biofilmu (Xia *et al.*, 2010). Významnou proteinovou součástí buněčné stěny stafylokoků tvoří protein A, který se váže na peptidoglykan přímo, nebo se váže na tetrapeptidovou část peptidoglykanu. Protein A nespecificky reaguje s Fc-fragmentem imunoglobulinů, čímž chrání stafylokoky před opsonizací neboli jejich obklopením látkami, které zvyšují účinnost fagocytózy (Votava *et al.*, 2003).



Obrázek 2 Lokalizace stěnové kyseliny teichoové a lipoteichoové kyseliny v buněčné stěně stafylokoků (převzato a upraveno z Xia *et al.*, 2010).

3.4 Genetika a genom stafylokoků

Genom stafylokoků se skládá z jednoho cirkulárního chromozomu o velikosti 2000–3000 kb a souboru variabilních doplňkových genetických prvků, jako jsou bakteriofágy, plazmidy a mobilní genetické elementy. Kromě chromozomální genetické informace obsahují stafylokoky taktéž extrachromozomální genetickou informaci ve formě nekonjugativních plazmidů, které se do recipientní buňky přenášejí prostřednictvím transformace nebo transdukce (Malachowa *et DeLeo*, 2010; Młynarczyk *et al.*, 1998).

Plazmidy jsou autoreplikující DNA molekuly, na nichž jsou umístěné i geny rezistence k antibiotikům (Młynarczyk *et al.*, 1998). Většina přirozeně se vyskytujících kmenů stafylokoků obsahují jeden nebo více plazmidů, které po vstupu do bakteriálního hostitele zůstávají v podobě volné cirkulární DNA, nebo se linearizují a integrují do chromozomu (Malachowa *et DeLeo*, 2010; Młynarczyk *et al.*, 1998). V chromozomech nebo v plazmidech se nacházejí mobilní genetické elementy neboli fragmenty DNA kódující různé determinanty virulence a rezistence. Mobilní genetické elementy fungují jako prostředník přenosu genetické informace mezi bakteriemi, a navíc ovlivňují plasticitu genomu, což umožňuje stafylokokům se přizpůsobit okolnímu prostředí. Rozmanitost a vývoj stafylokoků nejvíce ovlivňují bakteriofágy. Nejpočetnější skupinu fágů tvoří temperované bakteriofágy, které sice způsobují po infekci lýzu bakteriálních buněk, ale především tvoří s hostitelskou buňkou dlouhodobý vztah, čímž se DNA fága integruje do stafylokokového genomu jako profág (Goerke *et al.*, 2009; Malachowa *et DeLeo*, 2010).

3.5 Kultivace stafylokoků

3.5.1 Kultivační podmínky

Stafylokoky jsou mikroorganismy, jež nevyžadují speciální kultivační podmínky. Dobře rostou na běžných kultivačních půdách v rozsáhlém rozmezí teplot 7–46 °C při pH 4,2–9,3. Naočkované kultivační půdy se většinou inkubují za aerobních podmínek v termostatu při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin (Votava *et al.*, 2003). Existují však kmeny stafylokoků, které rostou i při nižší kultivační teplotě. Příkladem může být *Staphylococcus equorum* preferující kultivační teplotu 25 °C (Place *et al.*, 2003).

Kultivační média

Prvotní kultivace stafylokoků se provádí na krevním agaru (KA), masopeptonovém agaru, trypton-sojovém agaru, brain-heart infusion agaru nebo P-agaru (Götz *et al.*, 2006, Kloos *et al.*, 1974). Při kultivaci stafylokoků se využívá jejich schopnosti růst na médiích a půdách

s vysokým obsahem chloridu sodného, eventuálně jejich rezistence ke kolistinu a kyselině nalidixové, proto se k jejich izolaci nejčastěji používá krevní agar s 5% ovčí krve, obyčejný nebo thioglykolátový bujon (Bzdil, 2003a; Votava *et al.*, 2003). K zachycení stafylokoků z kontaminovaných nebo fekálních vzorků se používají selektivní agary, například Schleifer-Krämer agar, lipase-salt-mannitol agar, agar s fenylethylalkoholem, manitolový slaný agar nebo Columbia CNA agar (Götz *et al.*, 2006). Pro detekci koagulasa-pozitivních stafylokoků v potravinách lze přímo použít Baird-Parker agar obsahující tellurit a králičí plazmový fibrinogen, nebo Braid-Parker agar bez vaječného žloutku, ke kterému byl přidán temperovaný agar s plazmovým fibrinogenem z vepřového masa (Boothby *et al.*, 1979; Hauschild *et al.*, 1979).

3.5.2 Morfologie kolonií

Většina stafylokoků vytváří na KA ploché, neprůhledné, kruhové, různě pigmentované kolonie rovných okrajů (Bzdil, 2003a). Pigment kolonií bývá většinou smetanový, krémový, nažloutlý až naoranžovělý. Většina koagulasa-negativních stafylokoků (CoNS, z angl. coagulase-negative staphylococci) nebývá pigmentována, avšak *Staphylococcus pasteurii* a *Staphylococcus xylosus* vytvářejí kolonie jasně žluté (Votava *et al.*, 2003). Stafylokoky kolem kolonie produkují různě velikou a různě výraznou hemolýzou způsobenou α , β nebo δ -hemolysinem, k jejímuž stanovení se nejčastěji používá KA (Votava *et al.*, 2003). Kmeny *S. aureus* a *Staphylococcus pseudointermedius* produkují jak α -hemolysin, tak β -hemolysin. Mezi nehemolytické kmeny patří například *Staphylococcus hyicus* (Quinn *et al.*, 2011).

3.6 Výskyt stafylokoků

Zástupci rodu *Staphylococcus* jsou v důsledku celosvětového rozšíření a své adaptability hlavní skupinou bakterií, které jako komenzálové primárně obývají pokožku a kožní žlázy lidí, savců a ptáků jako součást normální mikroflóry (Götz *et al.*, 2006). Mohou se také nacházet na sliznicích horních cest dýchacích a dolního urogenitálního traktu, v krevním řečišti, mléčných žlázách, ale také přechodně v zažívacím traktu, kde mohou působit jako infekční agens (Quinn *et al.*, 2011). Stafylokoky bývají izolovány sporadicky i z různých zdrojů životního prostředí, jako je půda, plážový písek, mořská voda, povrch rostlin, krmiva, potraviny (maso, mléčné výrobky), oblečení, koberce, ložní prádlo, nábytek, povrchy kuchyňského náčiní a další (Götz *et al.*, 2006). Klinicky nejvýznamnějším druhem stafylokoků je bezpochybně *S. aureus*, který u zvířat a lidí nejčastěji osidluje nosní sliznice a kůži (Quinn *et al.*, 2011). Ostatní koagulasa-pozitivní stafylokoky, například

S. pseudintermedius a *Staphylococcus delphini*, byly popsány jako oportunní patogeny u koní (Stull *et al.*, 2014). Důležitým zástupcem koagulasa-pozitivních stafylokoků je *Staphylococcus chromogenes* jako patogen mastitid u skotu (Pyörälä *et Taponen*, 2009).

3.7 Patogenita stafylokoků

Buňky stafylokoků jsou vybaveny velkým množstvím faktorů virulence, které se podílí na jejich rozšíření v tkáních a tvorbě patologických změn v hostiteli (Quinn *et al.*, 2011). Faktory virulence se dělí na faktory celulární a extracelulární. Mezi celulární faktory patří peptidoglykan, protein A, pouzdro a vázaná koagulasa (ClfA, z angl. clumping factor A). ClfA je protein vázající fibrinogen nacházející se na buněčném povrchu stafylokoků. ClfA je také receptorem pro fibrinogen, na něhož se ClfA váže a přeměňuje ho na fibrin, čímž vyvolává shlukování buněk stafylokoků (Votava *et al.*, 2003).

Kromě celulárních faktorů, stafylokoky produkují také extracelulární toxiny a enzymy (katalasa, hyaluronidasa, lipasy, nukleasy, fibrinolyzin, β -laktamasa), které zodpovídají za toxinózy. Významnými toxiny jsou cytolysiny, enterotoxiny, toxin syndromu toxického šoku a exfoliativní toxin. Cytolysiny poškozují povrchovou buněčnou membránu a patří k nim leukocidin a hemolysiny typu α , β , γ a δ (Votava *et al.*, 2003). Pantonův-Valentinův leukocidin je nejznámějším typem leukocidinu u stafylokoků, který způsobuje destrukci monocytů, makrofágů a polymorfonukleárních buněk hostitelského organismu (Supersac *et al.*, 1993).

Enterotoxiny v lidské populaci způsobují otravy potravinami projevující se zvracením a průjmy a mohou se také účastnit typu infekcí s následky šoku u lidí i zvířat (Marrack *et Kappler*, 1990; Votava *et al.*, 2003). Exfoliativní toxiny jsou proteasy, které rozpouštějí mukopolysacharidovou matrix v kožní epidermis (Votava *et al.*, 2003). Stafylokoky nejčastěji produkují jeden nebo dva imunologicky od sebe odlišné exfoliativní toxiny označené jako exfoliativní toxin A (ETA) nebo B (ETB) (Lee *et al.*, 1987).

3.7.1 Rezistence stafylokoků k antimikrobním látkám

Stafylokoky prokázaly jedinečnou schopnost rychle získávat rezistenci na každé nové antibiotikum (ATB) počínaje penicilinem, meticilinem a konče linezolidem a daptomycinem. U stafylokoků se může antibiotická rezistence vyskytovat buď přirozeně (primární rezistence), nebo u nich vzniká v průběhu nebo následkem předchozí antibiotické léčby (sekundární rezistence). Tento proces je zprostředkován jednak procesem náhodné mutace a selekce vlivem antibiotického tlaku, jednak horizontálním přenosem genů pomocí plazmidu

nebo transpozonů (Votava, 2005). Mechanismus rezistence zahrnuje změnu cílové struktury, metabolismu, ovlivnění transportu ATB a produkci bakteriálních enzymů.

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA, z angl. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) mají dva mechanismy rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům. Jedním z nich je produkce extracelulárního enzymu β -laktamasy schopného hydrolyzovat β -laktamový kruh antibiotika. Druhý mechanismus zahrnuje expresi proteinového receptoru penicilin 2a (PBP, z angl. penicillin binding protein), což je pozměněný druh PBP, který má sníženou afinitu ke všem β -laktamům. β -laktamasa je kódována *blaZ* genem a PBP 2a chromozomálním genem *mecA* (Brakstad *et Maeland*, 1997).

Kmeny MRSA se postupně staly rezistentní i na řadu dalších ATB, kterými jsou především makrolidy, aminoglykosidy, tetracykliny, chloramfenikol, fluorochinolony a rifampicin (Votava *et al.*, 2003). Na základě epidemiologických a genetických charakteristik lze kmeny MRSA rozdělit do dvou skupin: nemocniční MRSA, které se vyskytují převážně u pacientů, kteří podstoupili nedávnou hospitalizaci nebo chirurgický zákrok, dialýzu, dlouhodobý pobyt v pečovatelském zařízení, a komunitní MRSA (Karpíšková *et al.*, 2009; Millar *et al.*, 2007).

Antibiotická léčba

Stafylokoková léčba je převážně spojena s aplikací ATB. Při menším rozsahu stafylokových infekcí lze lokálně použít roztoky a antibiotické masti obsahující mupirocin (Bactroban), kyselinu fusidovou (Fucidin), bacitracin a neomycin (Framykoin) (Bartoňová, 2014). V léčbě akutních stafylokokových infekcí lze použít celou řadu antibiotik, ale v současné době dochází k stále většímu nárůstu rezistence, proto je nezbytné hledat neustále nové možnosti. U MRSA je možné aplikovat peniciliny (oxacilin, meticilin), makrolidy, linkomyciny, glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin), rifampiciny a chinolony. Novějšími cílenými ATB jsou cefalosporiny IV. generace, linezolid a streptograminy. U těžkých infekcí se musí antibiotika podávat ve vysoké dávce po dobu několika týdnů (Vrbová, 2004).

3.8 Klinický význam stafylokoků u lidí

Stafylokoky způsobují infekce endogenního nebo exogenního původu. Mnoho infekcí je oportunních a je spojováno s traumaty, imunosupresemi, interkurentními parazitárními a plísňovými infekcemi, alergickými stavy a endokrinními a metabolickými poruchami.

Za většinu těchto infekcí jsou zodpovědné koagulasa-pozitivní stafylokoky, ale i některé kmeny CoNS s nízkou virulencí jsou schopny způsobovat řadu onemocnění (Quinn *et al.*, 2011).

3.8.1 Klinický význam koagulasa-pozitivních stafylokoků

Původcem většiny stafylokokových infekcí je *S. aureus*, který jako nozokomiální patogen stále představuje hlavní příčinu úmrtí (Götz *et al.*, 2006). *S. aureus* nejčastěji způsobuje hnisavá onemocnění kůže neboli pyodermie, mezi něž patří zejména impetigo, folikulitida, furunkl. Dále způsobuje osteomyelitidu, endokarditidu, bakteriemií, která může vést až k těžkému systémovému onemocnění neboli sepsi (Votava *et al.*, 2003). Epidemiologicky významný je také zánět mléčné žlázy (mastitida) u kojících žen při nedostatečném vyprazdňování prsu (Spencer, 2008; Votava *et al.*, 2003). Stafylokoky rovněž způsobují infekce respiračního traktu. Kromě běžných zánětů vedlejších nosních dutin a plic *S. aureus* vyvolává také pneumonie (Beneš, 2009).

Stafylokoky produkující exfoliatin (ET-A, ET-B) mohou u kojenců a malých dětí vyvolat stafylokokový syndrom opařené kůže neboli Ritterův syndrom, který je provázen poškozením celkového stavu dítěte a horečnatými stavy. Působením exfoliatinu dochází ke vzniku puchýřů až rozsáhlých bul (Bartoňová, 2014). Dalším onemocněním způsobeným stafylokokovými toxiny, zejména toxinem syndromu toxického šoku a enterotoxiny, je syndrom toxického šoku. Nejvíce ohroženou skupinou představují ženy používající vysoce nasáklé tampony (Bartoňová, 2014). *S. aureus* může také vyvolávat enterotoxikózu neboli otravu z potravin typu sekaná, bramborový salát, smetanové omáčky, krémové zmrzliny či zákusky. Stafylokoky se v jídle množí a začnou produkovat termostabilní enterotoxin, přičemž stafylokok je varem zničen, jeho enterotoxin však nikoli (Beneš, 2009; Votava *et al.*, 2003).

3.8.2 Klinický význam koagulasa-negativních stafylokoků

Většina infekcí způsobených CoNS jsou nozokomiálního původu (Mack *et al.*, 2005). Nejčastějšími infekcemi vyvolané CoNS jsou infekce spjaté s implantovanými či zavedenými pomůckami. Nejdůležitějšími infekcemi jsou bakteriémie a endokarditidy (Votava *et al.*, 2003). CoNS také zodpovídají za infekce kloubních protéz, implantovaných kardiostimulátorů, silikonových mamárních implantátů a penilních protéz. Dále způsobují záněty pobřišnice (peritonitidy) spojenou s peritoneálními dialyzačními krátery či osteomyelitidy v souvislosti se zavedenými šrouby. Mezi CoNS způsobující osteomyelitidy, peritonitidy, endokarditidy, infekce operačních ran patří *S. epidermidis*

a *Staphylococcus haemolyticus* (Votava *et al.*, 2003). Posledním typem infekcí, kde se uplatňují CoNS, jsou infekce močového měchýře, které se vyskytují zejména u mladých sexuálně aktivních žen. Jejimi hlavními původci jsou *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* a *S. sciuri* (Beneš, 2009; Votava *et al.*, 2003).

3.9 Klinický význam stafylokoků u zvířat

Stafylokoky jsou taktéž důležitými oportunními patogeny u zvířat. Hlavními představiteli způsobující u zvířat onemocnění jsou *S. aureus* a *S. pseudointermedius*, avšak existují další významné druhy stafylokoků, které se jako patogeny uplatňují ve veterinární sféře. Důležitá onemocnění domácích zvířat způsobená stafylokoky zahrnuje mastitidu, exsudativní epidermitis, pyodermie a otitis externa (Quinn *et al.*, 2011).

3.9.1 Mastitida skotu

Mastitidy neboli infekce mléčné žlázy jsou obvykle způsobené *S. aureus*, který vyvolává všechny typy zánětů od katarálních přes abscedující až po těžké gangrenózní, které mohou končit fatálně a mohou postihnout jak vývodnou, tak i žláznatou část mléčné žlázy (Bzdil, 2012). Mastitidy lze také klasifikovat jako klinické a subklinické. Klinická mastitida je charakterizována náhlým nástupem, otokem a zarudnutím vemene, změnami mléčné kompozice a vzhledu, sníženou a pozměněnou sekrecí mléka. U subklinické mastitidy nejsou žádné viditelné změny vemena ani mléka, avšak produkce mléka klesá a počet somatických buněk se zvyšuje (Khan *et Khan*, 2006).

Prevalence mastitid je na celosvětové úrovni odlišná. Například brazilská studie (2016) ve své studii uvádí prevalenci skotu 72,97 %, přičemž ze všech izolovaných mikroorganismů bylo 21,62 % klasifikováno jako *S. aureus* (Casanova *et al.*, 2016). Další studie z Etiopie (2016) testovala 529 laktajících krav náhodně vybraných z 95 stád, přičemž celková prevalence u skotu činila 62,6 %. Cílem studie bylo také izolovat *S. aureus*, který byl nakonec detekován v 51,2 % kultivovaných vzorků mléka (Abebe *et al.*, 2016). Naproti tomu český autor Bzdil (2012) se ve své práci zabýval prevalencí vybraných patogenů mléčné žlázy skotu v 41 okresech České republiky v období let 2000–2010. Ve sledovaném období zjistil, že průměrná prevalence u *S. aureus* činila 16,41 %.

3.9.2 Exsudativní epidermitis

S. hyicus produkuje exfoliativní toxiny, který způsobuje exsudativní epidermitis vyskytující se celosvětově převážně u selat do 3 měsíců věku. *S. hyicus*, nejčastěji izolovaný z vaginální sliznice a kůže zdravých prasnic, se na kůži selat dostává pravděpodobně pomocí malých

odřenin, jako jsou zranění z kousnutí. Exsudativní epidermitis se vyznačuje nadměrnou mazovou sekrecí, exfoliací a exsudací na povrchu kůže. Míra úmrtnosti se pohybuje mezi 20–100 %, avšak u těžce postižených vrhů může dosáhnout až 90 % (Quinn *et al.*, 2011).

3.9.3 Onemocnění u psů

Pyodermie představují skupinu problematických kožních onemocnění u psů. Převážně se jedná o záněty kůže sekundárního charakteru. Velkým problémem je potřeba psů se škrábat v důsledku svědění, což značně komplikuje hojení a může dojít k rozvoji dalších infikujících se kožních změn. Mezi nejvýznamnější původce kožních onemocnění u psů patří *Staphylococcus intermedius*, *S. aureus* a *S. hyicus*. Z hlediska procentuálního zastoupení je *S. intermedius* přítomen v 97 % případů, *S. aureus* v 2,5 % a *S. hyicus* v 0,5 % případů výskytu pyodermie. K přenosu stafylokoků dochází zejména olizováním vlastního konečníku a genitálií (Špruček, 2006).

Otitis externa neboli zánět zevního zvukovodu je další onemocnění psů, jejímiž původci mohou být mimo jiné i stafylokoky. Studie z roku 2010 testovala 65 vzorků odebraných z neléčených dospělých psů trpících příznaky otitis externa. Z celkového počtu vzorků byly stafylokoky detekovány ve 44 odebraných vzorků, přičemž CoNS představovaly 61,3 % všech izolátů. Z CoNS se nejčastěji vyskytoval *S. epidermidis* (25 %), *Staphylococcus simulans* (15,9 %), *S. haemolyticus* (11,4 %), *S. saprophyticus* (9,1 %) a z koagulasa-pozitivních stafylokoků byl s největší frekvencí přítomen *S. aureus* (25 %) a *S. intermedius* (13,6 %) (Lilenbaum *et al.*, 2000).

3.10 Metody identifikace stafylokoků

3.10.1 Biochemické testy

Základem biochemické identifikace je série biochemických testů, jejichž princip je založen na skutečnosti, že každý druh bakterie produkuje jinou sestavu enzymů. Patří sem například průkaz aktivity katalasy, koagulasy, oxidasy, ureasy, dekarboxylasy, lyzinu, fosfatasy, hemolyzinů, produkce sirovodíku, indolu, redukce dusičnanů, produkce aerobních kyselin z fruktosy, xylosy, arabinosy, ribosy, maltosy, laktosy, sacharosy, trehalosy, mannitolu a xylosy, citlivost na lysostafin, lysozym, novobiocin a další antimikrobní látky. Jednotlivé reakce se provádí ve zkumavkách nebo na diagnostických půdách. Výsledkem je řada pozitivních a negativních reakcí, které nám umožní stafylokoky identifikovat (Kloos *et Schleifer*, 1975).

3.10.2 Identifikace pomocí komerčních souprav

Identifikace pomocí biochemických testů je časově i materiálově náročná, proto diagnostické laboratoře pro identifikaci stafylokoků využívají komerční testovací soupravy (Vytrásová *et* Bílková, 2014). Jednou z nich je STAPHYtest 24, který slouží nejen k odlišení stafylokoků od mikrokoků, ale především pro definitivní identifikaci druhů rodu *Staphylococcus* izolovaných z klinických materiálů. Souprava umožňuje pomocí 24 biochemických testů provést 40 vyšetření a vizuální i přístrojové vyhodnocení. STAPHYtest 24 však neumožňuje průkaz koagulasy a průkaz rezistence k novobiocinu. Identifikaci lze dle doporučení vyhodnocovacího softwaru doplnit testy VPtest pro detekci acetoinu, PYRAtest pro detekci pyrrolidonylarylamidasu, případně OXItest pro detekci oxidasy dodávanými ve formě diagnostických proužků (ERBA Lachema a.s., Brno, ČR).

3.10.3 Genotypové molekulárně biologické metody

Molekulárně-biologické metody, jejichž základem je DNA, se používají pro identifikaci izolátů na úrovni druhů a poddruhů. Poskytují reprodukovatelné výsledky, jsou rychlé, nevyžadují *in vitro* kultivaci, tudíž umožňují identifikaci náročných organismů (Štěpán *et al.*, 2004). Molekulárně-biologické metody lze rozdělit na metody přímé a nepřímé. Nepřímé metody lze potom rozdělit metody bez amplifikace DNA a s amplifikací DNA.

Přímou metodou detekující polymorfismus DNA sekvence je sekvenování DNA. Jedná se o nejcitlivější metodu s nejvyšší diskriminační silou (Štěpán *et al.*, 2004). Pro studium evoluce a taxonomii stafylokoků se používá analýza nukleotidové sekvence genu 16S ribosomální DNA (rDNA, z angl. ribosomal DNA). Je však možno využít také sekvence genů *sodA* nebo *hsp60*. Sekvenční analýza ukázala, že *sodA* gen má oproti 16S rDNA vyšší divergenci, a navíc gen *sodA* představuje vysoce diskriminační cílovou sekvenci pro diferenciaci blízké příbuzných bakteriálních druhů (Poyart *et al.*, 2001).

Jednou z používaných metod probíhající bez amplifikace DNA je polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP, z angl. restriction fragment length polymorphism) založenou na štěpení izolované celkové DNA restrikčními endonukleasami za vzniku fragmentů s jejich následným oddělením agarózovou gelovou elektroforézou a vizualizací barvením ethidium bromidem (Haertl *et* Bandlow, 1990; Štěpán *et al.*, 2004). Alternativou metody RFLP je ribotypizace, která slouží k typizaci stafylokoků na základě srovnání fragmentů genů kódující 16S, 5S a 23S ribosomální ribonukleová kyselina (rRNA, z angl. ribosomal ribonucleotide acid). Ribotypizace je velmi stabilní metoda, která je vhodná

pro identifikaci druhů a poddruhů v rodu *Staphylococcus* (De Buyser *et al.*, 1992; Štěpán *et al.*, 2004).

Metody probíhající s amplifikací DNA jsou založené na PCR, které umožňují rychlou diferenciaci a identifikaci kultivovaných mikroorganismů. Existuje velké množství typů PCR. Jednou z možností je genově specifická PCR umožňující identifikaci druhů stafylokoků a jejich genotypů (Štěpán *et al.*, 2004). *S. aureus* může být identifikován pomocí genu *nuc* kódujícího termostabilní nukleasu, která degraduje jak DNA, tak RNA (Brakstad *et al.*, 1992). Dalším markerem pro stanovení *S. aureus* je gen kódující 16S RNA nebo gen *femA* nezbytný pro rezistenci na meticilin (Štěpán *et al.*, 2004). Další modifikací PCR je multiplexní PCR, jejíž výhodou je schopnost amplifikovat více genů v jedné reakční směsi najednou. Multiplexní PCR slouží například k detekci genů kódující adhezní proteiny, toxiny nebo odolnost proti antibiotikům (Štěpán *et al.*, 2004). Rychlou alternativou je kvantitativní real-time PCR, která poskytuje velmi přesnou a reprodukovatelnou kvantifikaci genových kopií (Heid *et al.*, 1996).

3.10.4 Fenotypové molekulární metody - hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie je fenotypová molekulární metoda založená na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli a jejich kvantitativní detekci (Marvin *et al.*, 2003). Nejrozšířenější metodou pro druhovou, případně rodovou identifikaci stafylokoků je hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS, z angl. mass assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry), která byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, avšak nyní se využívá i pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek (Havliš, 1999; Štřomerová, 2013). MALDI-TOF MS je založena na ionizaci molekul ribozomálních peptidů pomocí krátkých laserových impulzů. Ionty jsou poté na krátkou vzdálenost urychleny silným elektrickým polem a vstupují do vakua v trubici detektoru, kde se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem (Havliš, 1999; Marvin *et al.*, 2003). Ve vakuové trubici detektoru se měří doba letu částice, která se poté pomocí kalibračních konstant přepočítá na hmotnostní jednotky jednotlivých proteinů, ze kterých následně počítačový software vytvoří hmotnostní spektra, která jsou poté porovnávána s databází známých mikrobiálních hmotnostních spekter. Míra podobnosti se statisticky zpracovává a vyhodnocení vyústí v identifikaci testovaného mikroorganismu (Štřomerová, 2013).

3.11 Rezidua antimikrobních látek ve vodním prostředí

Antibiotika se používají v humánní medicíně, ale také ve veterinární medicíně a v zemědělství, zejména jako prevence a léčba infekcí zvířat, popřípadě jako podpora růstu hospodářských zvířat (Martinez, 2009). Spotřeba ATB na celém světě se odhaduje na stovky tisíc tun ročně (Puckowski *et al.*, 2016). Například v USA se pro léčbu lidí ročně spotřebuje přibližně 22700 tun antibiotik a 11200 tun antibiotik se ročně spotřebuje pro neterapeutické účely, především pro podporu růstu skotu, prasat a drůbeže (Kummerer, 2009). Toto intenzivní používání vede k jejich kontinuálnímu uvolňování do životního prostředí (Rizzo *et al.*, 2013).

Rezidua antibiotik v životním prostředí mohou podporovat selekci genů rezistentních k antibiotikům (ARG, z angl. antibiotic resistance genes) a bakterií rezistentních vůči antibiotikům, které představují jeden z největších problémů veřejného zdraví na světě (Rizzo *et al.*, 2013). ARG byly nalezeny v mikroorganismech distribuovaných v nemocničních odpadních vodách, v odpadních vodách živočišné výroby, v čistírnách odpadních vod, povrchových vodách, podzemních vodách, a dokonce i v pitné vodě, přičemž odpadní vody v nemocnicích a chovu zvířat jsou hlavními zdroji distribuce ARG do životního prostředí (Wellington *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009). Nejčastěji detekovatelnými antibiotiky v odpadních vodách jsou tetracykliny, které se zde vyskytují v koncentraci 0,15–0,97 µg/l, avšak byly detekovány i koncentrace 2,37 µg/l (Daghrir *et Drogui*, 2013). Dalšími antibiotiky přítomnými v životním prostředí mohou být peniciliny, makrolidy, aminoglykosidy, fluorochinolony nebo sulfonamidy, které jsou v životním prostředí sice detekovány ve stopových koncentracích (ng/l nebo µg/l), ovšem i takto nízké koncentrace představují velké nebezpečí (Białk-Bielińska *et al.*, 2001; Puckowski *et al.*, 2016).

Li *et al.* (2016) detekovali početnost a rozmanitost antibiotik (tetracykliny, sulfonamidy, chinolony) a ARG ve vzorcích odpadních vod z 5 nemocnic v Xinjiang v Číně a zjistili, že celková koncentrace testovaných antibiotik se pohybovala v rozmezí 363,4–753,3 ng/l pro tetracykliny, 285,5–634,9 ng/l pro sulfonamidy a 1355,8–1922,4 ng/l pro chinolony. Další studie z roku 2004 zjišťovala přítomnost ciprofloxacinu, ofloxacinu, sulfametoxazolu a trimetoprimu ve vzorcích odpadních vod odebraných ve 3 amerických státech. Příslušné koncentrace činily 100–160 ng/l pro ciprofloxacin, 205–305 ng/l pro ofloxacin, 395–575 ng/l pro sulfametoxazol a 40–705 ng/l pro trimetoprim (Renew *et Huang*, 2004).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- Mikrobiální kultury druhů *Staphylococcus* spp. izolovaných na SVÚ Olomouc z klinického materiálu domácích zvířat s příznaky onemocnění
- Referenční kmeny *S. aureus* (ATCC 25923) a *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova Univerzita, Brno, ČR)

4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy

Použité chemikálie a roztoky

- Acetonitril (kat. číslo 75-05-08; Merck, Darmstadt, Německo)
- Absolutní etanol (kat. číslo 64-17-5; Merck, Darmstadt, Německo)
- Destilovaná voda nejvyšší kvality (Merck, Darmstadt, Německo)
- Fyziologický roztok s 1 % glukosy pro testaci citlivosti k ATB (Trios, Praha, ČR)
- 0,9% NaCl fyziologický roztok s 1 % glukosy (Trios, Praha, ČR)
- Kyselina mravenčí (kat. číslo 64-18-6; Merck, Darmstadt, Německo)
- Kyselina trifluoroctová (kat. číslo 76-05-1; Merck, Darmstadt, Německo)
- Matrix HCCA, portioned (kat. číslo 8255344; Bruker Daltonics, Bremen, Německo)

Použité soupravy

- OXItest (ERBA-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, ČR)
- PYRAtest (ERBA-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, ČR)
- Sada disků s antimikrobními látkami (Oxoid Czech, Brno, ČR)
- STAPHYtest 24 (ERBA-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, ČR)
- VPtest (ERBA-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, ČR)

Kultivační půdy

- Edwardsův agar pro detekci streptokoků (Trios, Praha, ČR)
- Endův agar pro detekci gramnegativních mikrobů (Trios, Praha, ČR)
- Krevní agar pro izolaci a kultivaci mikrobů (Trios, Praha, ČR)
- Masopeptonový bujón k pomnožení mikroorganismů (Trios, Praha, ČR)
- Mueller-Hinton agar k testaci antimikrobní citlivosti (Trios, Praha, ČR)
- Sabouraudův agar pro detekci kvasinek, plísní a řas (Trios, Praha, ČR)

- Xylosa-lyzin-deoxycholátový agar pro detekci čeledi *Enterobacteriaceae* (Trios, Praha, ČR)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Německo)
- Dispenzor disků s antimikrobní látkou (Oxoid Czech, Brno, ČR)
- Hmotnostní analyzátor Microflex LT (Bruker Daltoniks, Bremen, Německo)
- Ovládací software MALDI-TOF MS Biotyper (Bruker Daltoniks, Bremen, Německo)
- Termostat BT120 (Ecom, Polná, ČR)
- Třepačka MS2 Minishaker (IKA, Staufen, Německo)
- Turbidimetr Densi-La-Meter II (Erba Lachema, Brno, ČR)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Klinický materiál

Laboratorní diagnostika zástupců rodu *Staphylococcus* byla provedena v mikrobiologické laboratoři na Státním veterinárním ústavu Olomouc (dále jen zkr. SVÚ Olomouc). Pro studii této bakalářské práce byl použit soubor stafylokoků, který byl izolován na SVÚ Olomouc z klinického materiálu domácích zvířat s příznaky onemocnění. Vzorky byly odebírány v průběhu tří měsíců (březen-květen 2018) a jednalo se zejména o stěry z kůže a ran, výtěry z nosu, ucha, krku, spojivek, tlamy, dále o vzorky mléka, trusu, moče a krve.

4.4.2 Kultivace klinického materiálu

Kultivace mléka

Kultivace mléka byla provedena ponořením bakteriologické kličky o objemu 0,02 ml asi 2 cm pod hladinu mléka. Kapka mléka, která se zachytila na kličce, byla přenesena a následně rozetřena po plotně s krevním agarem (KA). Naočkované plotny byly inkubovány v termostatu při 36–37,5 °C po dobu 42–48 hodin. Současně byly vzorky mléka po inokulaci na KA inkubovány v kultivačních sterilních zkumavkách při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin. Po uplynutí doby inkubace byly vzorky mléka vyočkovány na plotny s Edwardsovým agarem (EDWA) a následně inkubovány při 36–37,5 °C po dobu dalších 18–24 hodin (Bzdil, 2003a).

Kultivace stěrů a výtěrů

Vzorky stěrů a výtěrů byly kultivovány sterilním tampónem na plotny s KA a Endovým agarem (EA). Tampón byl následně vytřepán do zkumavky s masopeptonovým bujónem (MPB) s jejím následným protřepáním. Plotny a zkumavky s MPB byly inkubovány při 36–37,5 °C po dobu 18–24 hodin. Inkubovaný MPB byl pak vyočkován na plotnu s KA a opět za stejných podmínek inkubován dalších 24 hodin (Bzdil, 2003a).

Kultivace trusu

Trus byl nejprve homogenizován v homogenizátoru nebo rozpuštěn ve fyziologickém roztoku s 1% glukosou či v MPB. Vzniklá suspenze byla bakteriologickou kličkou nakultivována na plotny s KA, EA a xylosa-lyzin-deoxycholátovým agarem (XLD). Naočkované plotny byly následně inkubovány v termostatu při 36–37,5 °C po dobu 48 hodin až 5 dnů v případě potřeby (Bzdil, 2003a).

Kultivace moči

Vzorek moči byl nejprve centrifugován 10 minut při 2500–3000 otáčkách za minutu. Supernatant byl z větší části slit a kapka sedimentu odebrána pipetou byla nakultivována na povrch ploten s KA, EA a Sabouraudovým agarem (SA). Plotny s KA a EA byly inkubovány 18–24 hodin při teplotě 36–37,5 °C a plotny s SA při 20–22 °C po dobu 24–48 hodin. Zbylý sediment byl přidán do zkumavky s MPB a inkubován 18–24 hodin při 36–37,5 °C. Po uplynulé době byl inkubovaný MPB následně vyočkován na plotnu s KA a opět inkubován při teplotě 36–37,5 °C dalších 18–24 hodin (Bzdil, 2003a).

Kultivace krve

Vzorek nesražené krve byl centrifugován 10 minut při 2500–3000 otáčkách za minutu a po opálení ústí zkumavky byla sterilní pipetou odsáta krevní plazma. Zkumavka s erytrocyty byla do ½, nebo ¾ doplněna sterilním MPB a uzavřena. Hemokultura byla inkubována 48 hodin při teplotě 36–37,5 °C. Po uplynutí doby inkubace byla z pomnožené hemokultury pipetou odebrána její kapka, která byla poté nakultivována na povrch ploten s KA, EA a SA. Naočkované plotny s KA a EA byly inkubovány 24–48 hodin při teplotě 36–37,5 °C a plotny s SA při 20–22 °C po dobu 48–120 hodin (Bzdil, 2003a).

4.4.3 Mikroskopie

Mikroskopický vzhled bakteriální kultury byl pozorován po obarvení preparátu dle Grama. Na čisté podložní sklíčko byla v kapce fyziologického roztoku suspendována část bakteriální kolonie odebraná z čisté bakteriální kultury inkubované 24 hodin při teplotě 36–37,5 °C. Po zaschnutí byl připravený preparát zafixován plamenem a převrstven čerstvě přefiltrovaným roztokem krystalové violeti po dobu 15–30 sekund. Po uplynulé době bylo barvivo slito a opláchnuto destilovanou vodou. Preparát byl poté ponořen do Lugolova roztoku na dobu 15–30 sekund, následovalo opět slití barviva a krátký oplach destilovanou vodou. Dále byl preparát odbarven etanolem po dobu 15 sekund, dokud preparát pouštěl barvivo, a poté byl opět opláchnutý destilovanou vodou. Nakonec byl preparát dobarven safraninem po dobu 60 sekund, opláchnutý destilovanou vodou a osušen mezi filtračními papíry. Obarvený preparát byl pozorován imerzím objektivem v mikroskopu při zvětšení 1000x (Vytrásová *et* Bílková, 2014).

4.4.4 Biochemické testy

Kmeny stafylokoků izolované na pevných půdách byly kromě morfologických, mikroskopických a makroskopických znaků identifikovány pomocí biochemických testů. Byl použit test k detekci katalasy, plasmakoagulasy a cytochromoxidasy.

Detekce katalasy

Katalasový test využívá přítomnost enzymu katalasy, který redukuje peroxid vodíku na molekulární kyslík a vodu. Detekce tvorby katalasy byla provedena přidáním 3% roztoku peroxidu vodíku k bakteriální kolonii rozetřené na podložním sklíčku (Vyřasová *et* Bílková, 2014).

Detekce plasmakoagulasy

Přítomnost plasmakoagulasy byla testována ve zkumavce s 0,3–0,5 ml králičí plazmy, ke které byla přidána zkoumaná bakteriální kolonie. Vzniklá směs byla důkladně promíchána a inkubována v termostatu při teplotě při 37 ± 1 °C po dobu 4–24 hodin v případě potřeby (Quinn *et al.*, 2011; Votava *et al.* 2003; Vyřasová *et* Bílková, 2014).

Detekce cytochromoxidasy

Pro detekci oxidasy se používá OXItest dodávaný ve formě diagnostických proužků naimpregnované tetramethyl-p-fenylendiamino-dihydrochloridem, který je oxidován železem. Oxidasový test slouží ke zjištění přítomnosti cytochromu *c*, a tím i produkci enzymu oxidasy vyšetřovaného mikroorganismu. Test na přítomnost oxidasy byl proveden pomocí bakteriologické kličky, kterou byly z čisté bakteriální kultury, kultivované 24 hodin při teplotě 36–37,5 °C, odebrány 1–2 bakteriální kolonie a naneseny do impregnované zóny diagnostického proužku. Barevná reakce byla odečtena ihned po provedení reakce (Vyřasová *et* Bílková, 2014).

STAPHYtest 24

Pro cílenou identifikaci druhů rodu *Staphylococcus* izolovaných z klinického materiálu byla použita souprava STAPHYtest 24, která byla ještě doplněna testy k detekci acetoinu a pyrrolidonylarylamidasy. Z čisté 24 hodinové kultury byla ve fyziologickém roztoku připravena suspenze, která byla důkladně homogenizována. Zákal suspenze odpovídal 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Do jamek trojstipu dělené mikrotitrační destičky bylo přidáno 100 µl připravené suspenze a k jamkám H (test pro ureasu), G (test pro arginin) a F (test pro ornitin) prvního řádku bylo přidáno po dvou kapkách parafinového oleje. Rámeček panelu s naočkovánými řadami byl vložen do inkubačního sáčku a inkubován

v termostatu při teplotě 37 °C±1 °C po dobu 20–24 hodin. Identifikace byla vyhodnocena pomocí identifikačního programu TNW. Při identifikaci bylo nutné kulturu posuzovat komplexně, bylo potřeba brát v úvahu původ izolátu, charakter kolonií, pigmentaci, hemolýzu a další znaky. Interpretaci výsledných reakcí uvádí Tabulka 1 (ERBA Lachema a.s., Brno, ČR).

Tabulka 1 Interpretace výsledných reakcí komerční soupravy STAPHYtest 24 (převzato a upraveno z ERBA-Lachema a.s., Brno, ČR).

Sloupec	Test	Zkratka testu	Pozitivní reakce	Negativní reakce
Řádek 1				
H	Ureasa	URE	Červenofialová, oranžočervená	Žlutá, světle oranžová
G	Arginin	ARG	Červenofialová, červená	Žlutá, světle oranžová
F	Ornitin	ORN	Červenofialová, červená	Žlutá, světle oranžová
E	β-Galaktosidasa	bGA	Žlutá, světle žlutá	Bezbarvá, zákal suspenze
D	β-Glukoronidasa	GLR	Žlutá, světle žlutá	Bezbarvá, zákal suspenze
C	β-Glukosidasa	bGL	Žlutá, světle žlutá	Bezbarvá, zákal suspenze
B	Fosfatasa	PHS	Žlutá, světle žlutá	Bezbarvá, zákal suspenze
A	Eskulin	ESL	Černá, tmavě hnědá	Bezbarvá, světle hnědá
Řádek 2				
H	N-acetyl β-D-glukosamin	NAG	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
G	Galaktosa	GAL	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
F	Sacharosa	SUC	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
E	Trehalosa	TRE	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
D	Mannit	MAN	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
C	Maltosa	MLT	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
B	Xylosa	XYL	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
A	Mannosa	MNS	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
Řádek 3				
H	Laktosa	LAC	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
G	Sorbitol	SOR	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
F	Ribosa	RIB	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
E	Fruktosa	FRU	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
D	Cellobiosa	CEL	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
C	Arabinosa	ARA	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
B	Raffinosa	RAF	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
A	Xylitol	XOL	Žlutá, žlutohnědá	Fialová, hnědofialová
	Acetoin	VPT	Červená, růžová	Bezbarvá, mírně narůžovělá
Dodatkové testy	Pyrrolidonylarylamidasa	PYR	Červenooranžová	Žlutá
	Oxidasa	OXI	Modrá	Bezbarvá

4.4.5 MALDI-TOF MS

Pro druhovou identifikaci stafylokoků byla použita metoda MALDI-TOF MS za využití hmotnostního analyzátoru Microflex LT řízeném softwarem MALDI-TOF MS Biotyper.

Příprava vzorku

Na terčík ocelové MALDI destičky bylo pomocí dřevěného párátko nebo inokulační kličky rozetřeno poměrně malé množství čisté bakteriální kultury (ideálně část jednotlivé kolonie). Po nanesení vzorku na MALDI destičku byl každý terčík se vzorkem převrstven 1 µl roztoku HCCA matrice. Destička byla ponechána k zaschnutí při laboratorní teplotě. Dále byl vzorek připraven k identifikaci (Štomerová, 2013).

Vlastní analýza a interpretace výsledků

Po zaschnutí byla MALDI destička vložena do hmotnostního analyzátoru Microflex LT, který změřil hmotnostní spektra. Takto naměřená hmotnostní spektra byla následně zpracována prostřednictvím softwaru MALDI-TOF MS Biotyper, který identifikoval mikroorganismy na úrovni rodu a druhu pomocí skóre, jehož význam popisuje Tabulka 2 (Štomerová, 2013).

Tabulka 2 Význam hodnot MALDI skóre výsledku MALDI-TOF MS (Štomerová, 2013).

Rozsah hodnoty skóre	Popis	Symbol	Barva
2,300–3,000	Vysoká pravděpodobnost druhové identifikace	+++	Zelená
2,000–2,299	S jistotou identifikován rod, pravděpodobně druh	++	Zelená
1,700–1,999	Pravděpodobná identifikace na úrovni rodu	+	Žlutá
0,000–1,699	Nespolehlivá identifikace	-	Červená

4.4.6 Stanovení citlivosti k antimikrobním látkám

U 102 izolovaných kmenů stafylokoků byla citlivost k antimikrobním látkám stanovena diskovou difúzní metodou s použitím pevné půdy Mueller-Hinton agar (MHA) a antibiotických disků obsahující ampicilin (10 µg), oxacilin (1 µg), chloramfenikol (30 µg), tetracyklin (30 µg), erytromycin (15 µg), klindamycin (30 µg), gentamicin (10 µg), novobiocin (30 µg), enrofloxacin (5 µg) a kotrimoxazol (25 µg).

Nejdříve bylo sterilním vatovým tampónem nabráno dostatečné množství bakteriálních kolonií, které byly následně suspendovány a důkladně promíchány ve fyziologickém roztoku s 1% glukosou. Zákal roztoku byl porovnán s McFarlandovou stupnicí, přičemž požadovaný rozsah byl v rozmezí 0,6–1,0 McFarlanda. Následně byla suspenze bakterií vatovým tampónem naočkována na plotnu s MHA pomocí křížového roztěru ve 3 směrech svírající úhel 60° a inokulace byla ukončena obtažením suspenze

po okrajích plotny. Poté bylo na plotny pomocí dispenzoru a sterilní jehly umístěno 10 papírových disků nasycenými testovanými antibiotiky tak, aby jejich středy byly od sebe vzdáleny zhruba 25 mm. Takto připravené plotny byly inkubovány v termostatu při 36 ± 1 °C po dobu 16–24 hodin. Po uplynutí doby inkubace byly pomocí posuvného měřítka změřeny v mm průměry inhibičních zón kolem antibiotických disků, a tyto průměry byly poté srovnány s průměry minimálních inhibičních zón dle doporučení EUCASTU (Tabulka 3). K ověření kvality půd a disků byly použity referenční kmeny *S. aureus* (ATCC 25923) a *E. coli* (ATCC 25922) (Bzdil, 2003b).

Tabulka 3 Charakteristika antimikrobních látek použitých k testaci citlivosti bakterií rodu *Staphylococcus* (EUCAST, 2018).

Antibiotikum	Zkratka	Sycení disku [μ g]	Průměr inhibiční zóny pro kategorii [mm]		
			Rezistentní \leq	Intermediární	Citlivý \geq
Ampicilin	AMP	10	28	-	29
Enrofloxacin	ENR	5	16	17–20	21
Erytromycin	E	15	18	19–20	21
Gentamicin (<i>S. aureus</i>)	CN	10	17	-	18
Gentamicin (CoNS)	CN	10	21	20	22
Chloramfenikol	C	30	17	-	18
Klindamycin	DA	30	19	20–21	22
kotrimoxazol	SXT	25	14	15–16	17
Novobiocin	NV	30	15	16–20	21
Oxacilin	OX	10	10	11–12	13

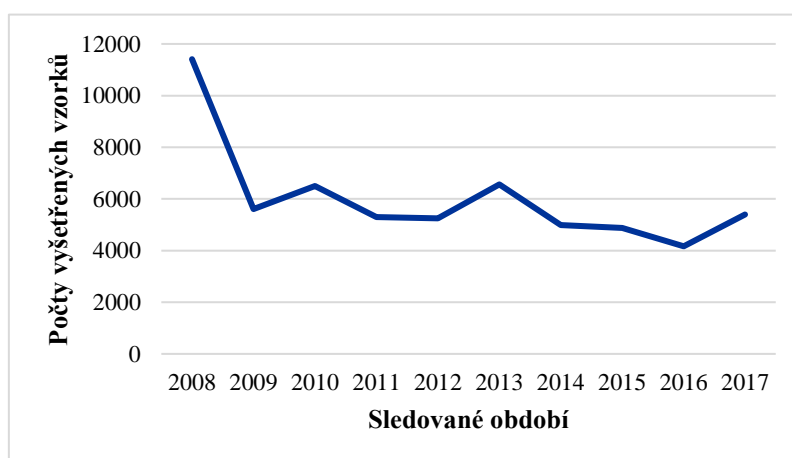
5 VÝSLEDKY

5.1 Počty vyšetřených klinických vzorků

V průběhu let 2008–2017 bylo na SVÚ Olomouc vyšetřeno celkem 60030 vzorků pocházejících z klinického materiálu vyskytujících se u koček, psů, skotu, prasat a koní. Počty vyšetřených vzorků v jednotlivých letech jsou následující: 11409 (2008), 5601 (2009), 6499 (2010), 5291 (2011), 5249 (2012), 6556 (2013), 4983 (2014), 4881 (2015), 4165 (2016) a 5396 (2017). Podrobný přehled počtu kmenů *Staphylococcus* spp. dokumentuje Příloha 1, naopak vývoj počtu vyšetřených vzorků znázorňuje Obrázek 3.

Z celkového počtu vyšetřených vzorků pocházelo 2638 vzorků z koček, ze psů 12310, ze skotu 41603, z prasat 2676 a z koní 803. Z těchto vzorků bylo zachyceno dohromady 12978 kmenů 27 druhů *Staphylococcus* spp., přičemž z koček jich bylo izolováno celkem 498 (tj. 3,83 % kmenů), ze psů 4300 (tj. 33,14 % kmenů), ze skotu 7864 (tj. 60,60 % kmenů), z prasat 36 (tj. 0,28 % kmenů) a z koní 278 (tj. 2,14 % kmenů). Podrobný přehled počtu kmenů stafylokoků izolovaných z koček, psů, skotu, prasat a koní ukazuje Příloha 2.

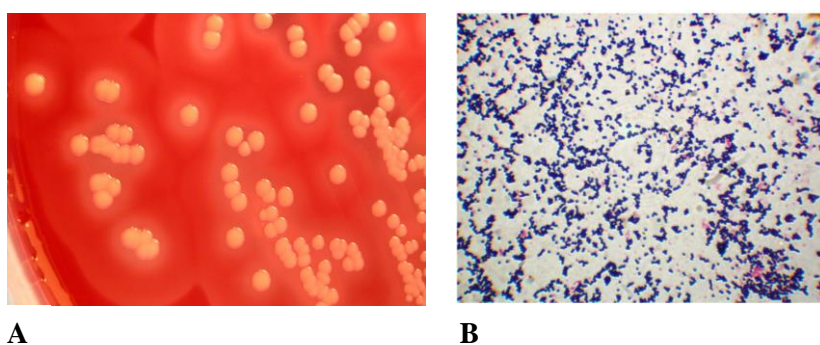
Příloha 3 dokumentuje podrobný přehled druhového zastoupení *Staphylococcus* spp. v jednotlivých orgánech a orgánových systémech domácích zvířat. Nejvíce pozitivních nálezů bylo zaznamenáno ve vzorcích získaných z mléčné žlázy (7745 kmenů; tj. 59,68 % izolátů), kůže (2174 kmenů; tj. 16,75 % izolátů), uší (1815 kmenů; tj. 13,99 % izolátů), respiračního systému (554 kmenů; tj. 4,27 % izolátů), očí (399 kmenů; tj. 3,07 % izolátů) a trávicího systému (210 kmenů; tj. 1,62 % izolátů). Stafylokoky byly naopak nejméně zachyceny ve vzorcích získaných z urogenitálního (49 kmenů; tj. 0,38 % izolátů), pohybového (19 kmenů; tj. 0,15 % izolátů), lymfatického (11 kmenů, tj. 0,08 % izolátů), cirkulačního (1 kmen; tj. 0,01 % izolátů) a nervového systému (1 kmen; tj. 0,01 % izolátů).



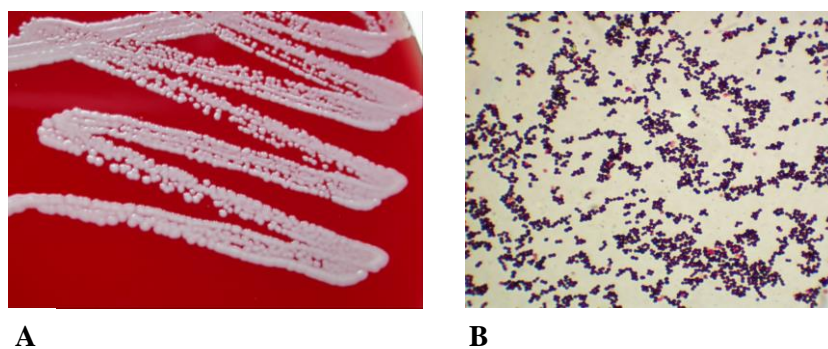
Obrázek 3 Počty vyšetřených vzorků pocházejících z klinického materiálu z koček, psů, skotu, prasat a koní na SVÚ Olomouc ve sledovaném období 2008–2017.

5.2 Vyhodnocení morfologie bakteriálních kolonií

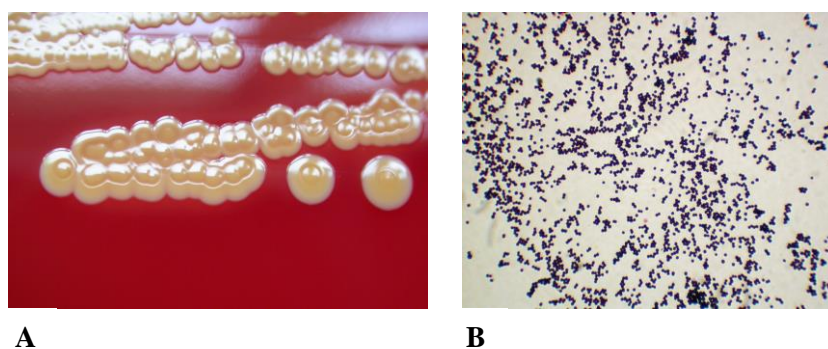
Po 24 hodinové inkubaci byla hodnocena makroskopická morfologie vyrostlých bakteriálních kolonií, jejichž morfologie odpovídala kmenům rodu *Staphylococcus*. Kolonie stafylokoků byly na krevním agaru 3–4 mm velké, většinou vypouklé, kulaté, lesklé s mírně zvlněným nebo celistvým okrajem. Většina kmenů také tvořila různě zbarvený pigment, který byl převážně bělavý, žlutý až naoranžovělý. Na krevním agaru bylo možné pozorovat hemolýzu. Po obarvení dle Grama byl hodnocen mikroskopický vzhled kmenů rodu *Staphylococcus*. Stafylokoky bylo možné v mikroskopu pozorovat jako modrofialově zbarvené koky uspořádané jednotlivé, po dvojicích nebo v nepravidelných shlucích (Obrázek 4–Obrázek 6).



Obrázek 4 Morfologie bakteriálních kolonií. A - růst *S. aureus* na KA, B - mikroskopický preparát *S. aureus* (vpravo) barvený dle Grama při zvětšení 1000x (Foto: J. Bzdil).



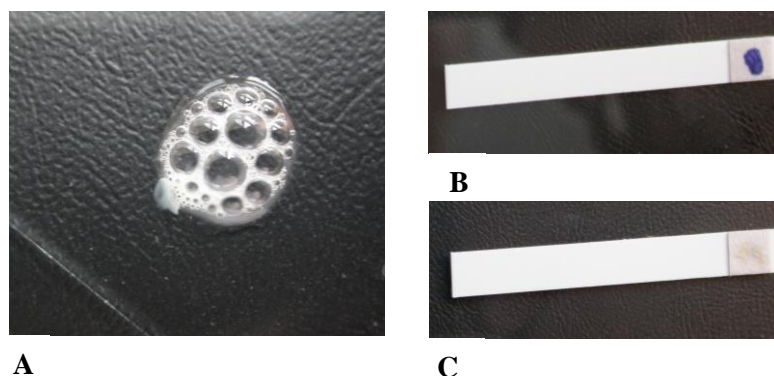
Obrázek 5 Morfologie bakteriálních kolonií. A - růst *S. chromogenes* na KA, B - mikroskopický preparát *S. chromogenes* barvený dle Grama při zvětšení 1000x (Foto: J. Bzdil).



Obrázek 6 Morfologie bakteriálních kolonií. A - růst *S. equorum* na KA, B - mikroskopický preparát *S. equorum* barvený dle Grama při zvětšení 1000x (Foto: J. Bzdil).

5.3 Vyhodnocení biochemických testů

Druhy rodu *Staphylococcus* byly identifikovány pomocí komerční soupravy STAPHYtest 24 s doplňujícími biochemickými testy detekující produkci katalasy, plasmakoagulasy a cytochromoxidasy. Pozitivní test na tvorbu katalasy byl prokázán uvolňováním bublinek kyslíku a tvorba sraženiny ve zkumavce indikovala přítomnost plasmakoagulasy. Pozitivní test na detekci cytochromoxidasy by byl prokázán tvorbou modrého i světle modrého zbarvení zóny diagnostického proužku, avšak v našem případě byl test negativní, jelikož zóna diagnostického proužku byla bezbarvá (Obrázek 7). Na základě těchto biochemických testů byly stafylokoky hodnoceny jako katalasa pozitivní a až na výjimky oxidasa negativní. Podle přítomnosti plasmakoagulasy se stafylokoky pak dělí na koagulasa-pozitivní a koagulasa-negativní. Celková identifikace druhů rodu *Staphylococcus* pomocí STAPHYtest 24 byla vyhodnocena pomocí identifikačního programu TNW. Výsledek identifikace 3 nejfrekventovanějších druhů stafylokoků izolovaných z klinických vzorků vyšetřených v období 2008–2017 dokumentuje Tabulka 4.



Obrázek 7 Výsledek biochemických testů. A - pozitivní katalasový test, B - pozitivní cytochromoxidasový test, C - negativní cytochromoxidasový test (Foto: J. Bzdil).

Tabulka 4 Biochemická identifikace vybraných druhů *Staphylococcus* spp. pomocí komerční soupravy STAPHYtest 24 (Převzato a upraveno z ERBA Lachema a.s., Brno, ČR).

<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. chromogenes</i>
Diferenciální znak				Diferenciální znak				Diferenciální znak			
URE	+	(+)	+	NAG	+	+	D	LAC	+	(+)	(+)
ARG	+	D	(+)	GAL	+	+	(+)	SOR	-	-	-
ORN	-	-	-	SUC	+	+	+	RIB	D	+	-
bGA	D	+	D	TRE	+	(+)	(+)	FRU	+	+	+
GLR	-	-	-	MAN	+	D	D	CEL	-	-	-
bGL	D	(-)	(-)	MLT	+	D	D	ARA	-	-	-
PHS	+	+	+	XYL	-	-	-	RAF	-	-	-
ESL	-	-	-	MNS	+	+	+	XOL	-	-	-

+ = pozitivní reakce, - = negativní reakce, (-) = většinou negativní reakce, (+) = většinou pozitivní reakce, D = variabilní reakce.

5.4 Prevalence *Staphylococcus* spp. v letech 2008–2017

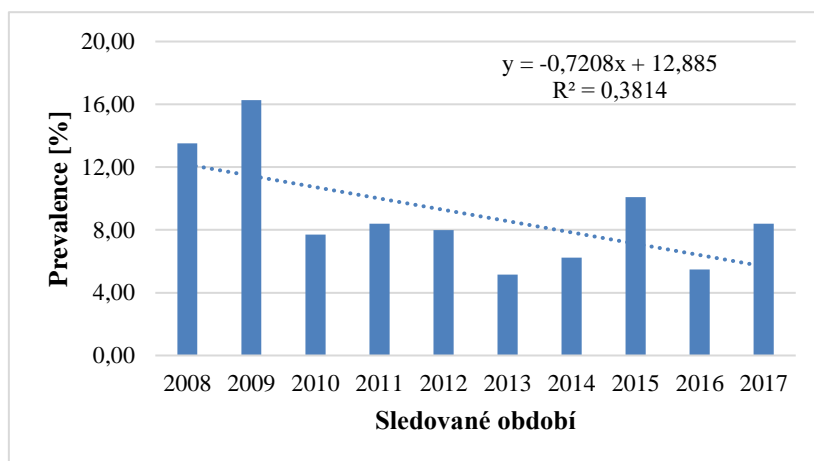
Z celkového počtu vyšetřených vzorků v průběhu let 2008–2017 byly pro každý rok stanoveny prevalence. Prevalence byly vypočítány jako podíl počtu *Staphylococcus* spp. izolovaných ze vzorků v období 1 roku a počtu vyšetřených vzorků za stejné období. Výsledky jsou vyjádřeny v %. U 4 nejfrekventovanějších *Staphylococcus* spp. byla stanovena statistická významnost změn prevalencí v jednotlivých letech 2008–2017 v porovnání s hodnotami za celé sledované období s použitím Z-testu pro porovnání dvou proporcí s 5% zvolenou hladinou významnosti ($\alpha = 0,05$). Vlastní výpočty byly zpracovány pomocí programu STATISTICA v13. Výsledky dokumentuje Příloha 1. Mezi nejfrekventovanější izolované druhy *Staphylococcus* spp. patřil *S. aureus* (5638 izolátů) s prevalencí 9,39 %, *S. intermedius* (1987 izolátů) s prevalencí 3,31 %, *S. chromogenes* (1543 izolátů) s prevalencí 2,57 %, *S. pseudointermedius* (1403 izolátů) s prevalencí 2,34 %. Podrobný přehled prevalencí jednotlivých druhů stafylokoků v období 2008–2017 souhrnně ukazuje Příloha 1, naopak podrobný popis vývoje prevalencí nejfrekventovanějších druhů stafylokoků *Staphylococcus* spp. ve vzorcích SVÚ Olomouc dokumentuje Obrázek 8–Obrázek 11, v nichž je taktéž vynesena přímka lineární regrese znázorňující trend vývoje stafylokoků během sledovaných 10 let.

U kmenů *S. aureus* byly zaznamenány následující prevalence: 13,51 % (2008), 16,26 % (2009), 7,71 % (2010), 8,39 % (2011), 7,98 % (2012), 5,16 % (2013), 6,24 % (2014), 10,08 % (2015), 5,47 % (2016), 8,40 % (2017). Z přímky lineární regrese byl vyhodnocen klesající trend vývoje stafylokoků během sledovaných 10 let. Změny v prevalenci kmenů *S. aureus* popisuje Obrázek 8.

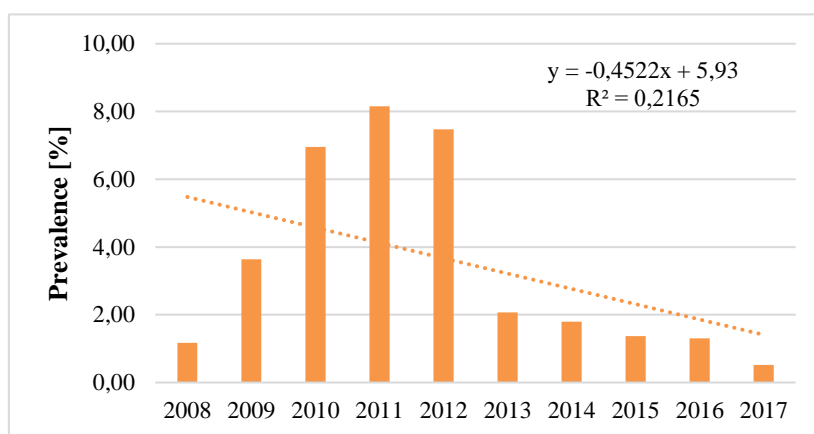
U kmenů *S. intermedius* byly zaznamenány následující prevalence: 1,17 % (2008), 3,64 % (2009), 6,95 % (2010), 8,15 % (2011), 7,47 % (2012), 2,07 % (2013), 1,79 % (2014), 1,37 % (2015), 1,30 % (2016), 0,52 % (2017). Z přímky lineární regrese byl vyhodnocen klesající trend vývoje stafylokoků během sledovaných 10 let. Změny v prevalenci kmenů *S. intermedius* popisuje Obrázek 9.

U kmenů *S. chromogenes* byly zaznamenány následující prevalence: 0,01 % (2008), 0,46 % (2009), 2,02 % (2010), 3,63 % (2011), 3,79 % (2012), 4,59 % (2013), 3,85 % (2014), 4,43 % (2015), 3,72 % (2016), 2,41 % (2017). Z přímky lineární regrese byl vyhodnocen rostoucí trend vývoje prevalence stafylokoků během sledovaných 10 let. Změny v prevalenci kmenů *S. chromogenes* popisuje Obrázek 10.

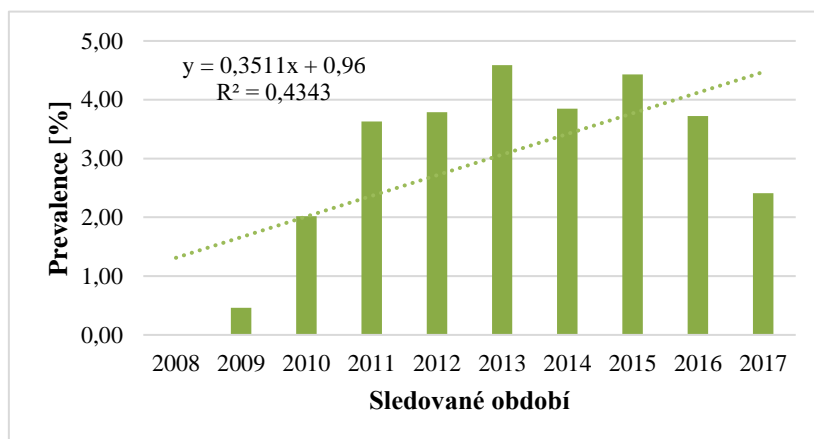
U kmenů *S. pseudointermedius* byly zaznamenány následující prevalence: 0,00 % (2008), 0,00 % (2009), 0,00 % (2010), 0,04 % (2011), 0,04 % (2012), 3,34 % (2013), 5,26 % (2014), 5,39 % (2015), 7,54 % (2016), 6,32 % (2017). Z přímky lineární regrese byl vyhodnocen rostoucí trend vývoje prevalence stafylokoků během sledovaných 10 let. Změny v prevalenci kmenů *S. pseudointermedius* popisuje Obrázek 11.



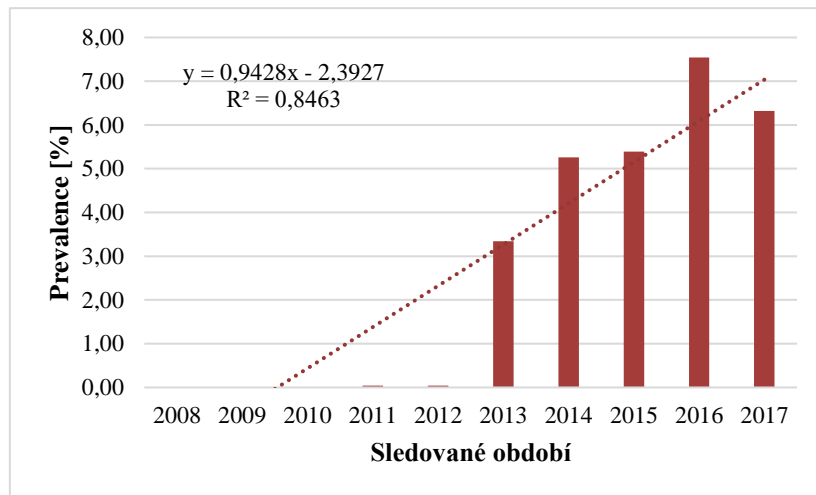
Obrázek 8 Změny v prevalenci *S. aureus* ve vzorcích na SVÚ Olomouc v období 2008–2017.



Obrázek 9 Změny v prevalenci *S. intermedius* ve vzorcích na SVÚ Olomouc v období 2008–2017.



Obrázek 10 Změny v prevalenci *S. chromogenes* ve vzorcích na SVÚ Olomouc v období 2008–2017.



Obrázek 11 Změny v prevalenci *S. pseudointermedius* ve vzorcích na SVÚ Olomouc v období 2008–2017.

5.5 Citlivosti k antimikrobním látkám

Ze sledovaného souboru kmenů stafylokoků pocházejících z domácích zvířat byla u 4 nejfrekventovanějších druhů stafylokoků charakterizována citlivost ke zvolené škále antimikrobních látek (Tabulka 3). Antimikrobní citlivosti byly vypočítány jako procento citlivých kmenů z celkového počtu vyšetřených kmenů stafylokoků. U nejfrekventovanějších *Staphylococcus* spp. byla stanovena statistická významnost změn antimikrobní citlivosti v jednotlivých letech sledovaného období 2008–2017 v porovnání s průměrnými hodnotami antimikrobní citlivosti za předešlé 3 roky pomocí metody Chí kvadrát test dobré shody s 5% zvolenou hladinou významnosti ($\alpha = 0,05$). Vlastní výpočty byly provedeny pomocí vzorce:

$$\chi^2 = \frac{(R_s - R_o)^2}{R_o} + \frac{(C_s - C_o)^2}{C_o},$$

kde R_s a C_s jsou skutečné hodnoty kmenů stafylokoků rezistentních, eventuálně citlivých k testovanému antibiotiku v období 1 roku a R_o a C_o jsou průměrné hodnoty počtu kmenů stafylokoků rezistentních, eventuálně citlivých k testovanému antibiotiku za předešlé 3 roky (Chaloupka, 2018). Matematický postup byl proveden pomocí literatury (Perla *et* Carifio, 2005).

Jako nejvíce citlivé kmeny stafylokoků byly zaznamenány kmeny *S. chromogenes*, u nichž byla 100,00% citlivost určena u 2 z 10 testovaných antibiotik. U kmenů *S. pseudointermedius* byla 100,00% citlivost stanovena u 1 z 10 testovaných antibiotik. Naproti tomu u kmenů *S. aureus* a *S. intermedius* nebyla 100,00% citlivost zaznamenána u žádné testované antimikrobní látky. Z testovaných kmenů stafylokoků bylo nejvíce citlivých v případě gentamicinu s 97,30 % citlivých kmenů, enrofloxacinu s 97,20 % citlivých kmenů

a kotrimoxazolu s 94,60 % citlivých kmenů. Nejnižší antimikrobní citlivost byla stanovena k ampicilinu s 46,00 % citlivých kmenů, erytromycinu s 68,20 % citlivých kmenů a tetracyklinu se 73,00 % citlivých kmenů. Podrobné údaje ukazuje Tabulka 5. Pro všechny vybrané druhy stafylokoků byly pro každý rok v průběhu let 2008–2017 v podobě tabulek zaznamenány průběhy citlivostí k antimikrobním látkám (Tabulka 6–Tabulka 9).

U kmenů *S. aureus* byla nejvyšší průměrná citlivost zaznamenána v případě kotrimoxazolu (98,70 %), novobiocinu (96,70 %), gentamicinu (96,00 %) a enrofloxacinu (95,50 %). Poměrně vysoká průměrná citlivost byla zaznamenána u chloramfenikolu (87,30 %), oxacilinu (86,80 %), klindamycinu (86,60 %), erytromycinu (77,00 %) a tetracyklinu (72,30 %). Oproti tomu nejnižší průměrná citlivost byla stanovena k ampicilinu (40,00 %). Statisticky bylo hodnoceno celkem 80 údajů antimikrobní citlivosti, přičemž z nich nebylo možné statisticky prokázat 22 údajů (tj. 27,50 %). Změny v antimikrobní citlivosti kmenů *S. aureus* vyjadřuje Tabulka 6.

U kmenů *S. intermedius* byla nejvyšší průměrná citlivost zaznamenána v případě enrofloxacinu (97,00 %), gentamicinu (96,90 %) a kotrimoxazolu (89,00 %) a chloramfenikolu (73,60 %). Nižší průměrná citlivost byla stanovena k novobiocinu (66,70 %), erytromycinu (64,60 %), klindamycinu (64,60 %) a tetracyklinu (62,10 %). Naopak nejnižší průměrná citlivost byla stanovena k oxacilinu (52,10 %) a ampicilinu (20,80 %). Statisticky bylo hodnoceno celkem 62 údajů antimikrobní citlivosti, přičemž z nich nebylo možné statisticky prokázat 7 údajů (tj. 11,29 %). Změny v antimikrobní citlivosti kmenů *S. intermedius* vyjadřuje Tabulka 7.

Kmeny *S. chromogenes* vykazovaly poměrně vysokou průměrnou citlivost ke všem testovaným antibiotikům, nicméně nejvyšší průměrná citlivost byla zaznamenána v případě enrofloxacinu (100,00 %), gentamicinu (100,00 %), oxacilinu (99,50 %) a kotrimoxazolu (99,30 %). Vysoká průměrná citlivost byla zaznamenána také u klindamycinu (92,70 %), tetracyklinu (91,40 %), chloramfenikolu (89,60 %) a ampicilinu (81,70 %). Nejnižší průměrná citlivost byla naopak stanovena k erytromycinu (74,10 %). Statisticky bylo hodnoceno celkem 53 údajů antimikrobní citlivosti, přičemž z nich nebylo možné statisticky prokázat 20 údajů (tj. 37,74 %). Změny v antimikrobní citlivosti kmenů *S. chromogenes* vyjadřuje Tabulka 8.

U kmenů *S. pseudointermedius* byla nejvyšší průměrná citlivost zaznamenána k novobiocinu (100,00 %), přestože jeho citlivost byla testována pouze v letech 2014, 2016 a 2017. Další nejvyšší průměrná citlivost byla zaznamenána v případě gentamicinu (96,30 %), enrofloxacinu (96,20 %) a kotrimoxazolu (91,40 %). Nižší průměrná citlivost byla stanovena k tetracyklinu (66,00 %), chloramfenikolu (63,70 %), klindamycinu (57,80 %) a erytromycinu

(57,20 %). Statisticky bylo hodnoceno celkem 40 údajů antimikrobní citlivosti, přičemž z nich nebylo možné statisticky prokázat 4 údaje (tj. 10,00 %). Změny v antimikrobní citlivosti kmenů *S. pseudintermedius* vyjadřuje Tabulka 9.

Tabulka 5 Citlivost vybraných *Staphylococcus* spp. izolovaných z domácích zvířat k antimikrobním látkám v období let 2008–2017.

Antibiotikum	C	T	AMP	OX	E	DA	CN	NV	ENR	SXT
<i>Staphylococcus</i> spp.										
<i>S. aureus</i>	87,30	72,30	40,00	86,80	77,00	86,60	96,00	96,70	95,50	98,70
<i>S. intermedius</i>	73,60	62,10	20,80	52,10	64,60	64,60	96,90	66,70	97,00	89,00
<i>S. chromogenes</i>	89,60	91,40	81,70	99,50	74,10	92,70	100,00	96,30	100,00	99,30
<i>S. pseudintermedius</i>	63,70	66,00	41,30	50,90	57,20	57,80	96,30	100,00	96,20	91,40
Celkem citlivost [%]	78,60	73,00	46,00	72,30	68,20	75,40	97,30	89,90	97,20	94,60

100,00 - všechny kmeny byly citlivé; NT - antimikrobní citlivost nebyla testována.

Tabulka 6 Citlivost vyšetřených kmenů *S. aureus* k antimikrobním látkám v období 2008–2018.

% citlivých kmenů za rok	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Antibiotikum											
C	68,20	67,20	90,90	87,50	96,80	91,70	92,10	85,20	100,00	93,00	100,00
T	65,20	63,40	85,40	73,90	82,60	67,00	71,00	65,70	63,60	85,00	71,43
AMP	42,50	46,80	51,10	45,10	46,20	34,30	44,30	28,20	22,00	39,10	47,62
OX	98,50	98,00	94,70	95,40	94,10	80,00	87,70	67,50	69,60	82,40	85,71
E	64,60	62,60	87,10	78,80	80,00	80,00	78,60	63,60	94,40	80,70	85,71
DA	79,00	74,00	92,30	85,70	89,90	88,90	90,00	82,10	92,20	91,50	66,67
CN	98,50	98,00	95,80	100,00	100,00	93,80	95,50	97,10	87,80	93,10	100,00
NV	98,50	91,90	98,70	95,40	95,50	100,00	94,80	97,00	95,00	100,00	100,00
ENR	98,60	96,30	97,10	98,30	97,90	94,40	98,00	89,50	90,50	94,20	95,24
SXT	99,30	100,00	97,60	100,00	100,00	98,40	95,00	97,10	100,00	100,00	100,00

Statistický významný meziroční pokles antimikrobní citlivosti; statisticky nehodnotitelný údaj; statisticky neprůkazná změna antimikrobní citlivosti v porovnání s průměrem citlivosti za předešlé 3 roky při 5% zvolené míře spolehlivosti; NT - antimikrobní citlivost nebyla testována; 2018 - údaje antimikrobní citlivosti spočítané na základě vyšetřených 21 vzorků.

Tabulka 7 Citlivost vyšetřených kmenů *S. intermedius* k antimikrobním látkám v období 2008–2018.

% citlivých kmenů za rok	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Antibiotikum											
C	74,60	74,00	67,80	70,20	67,50	64,70	66,30	79,30	76,20	95,80	50,00
T	56,80	64,90	59,30	61,40	62,50	57,50	65,90	65,10	72,00	55,60	100,00
AMP	45,50	54,20	16,70	14,30	15,00	12,50	0,00	0,00	0,00	50,00	0,00
OX	NT	100,00	NT	NT	0,00	12,50	NT	100,00	100,00	0,00	83,33
E	65,50	64,60	63,60	63,80	65,20	57,30	61,00	66,10	58,30	80,80	33,33
DA	67,70	69,60	66,00	63,50	63,10	53,20	54,80	73,80	60,40	74,10	33,33
CN	98,50	97,40	97,10	96,20	96,20	96,20	98,90	95,50	96,10	96,40	83,33
NV	NT	100,00	NT	NT	0,00	NT	NT	NT	NT	100,00	100,00
ENR	98,50	98,40	99,00	98,20	97,80	96,90	97,70	98,40	96,00	89,30	83,33
SXT	100,00	100,00	95,00	94,60	79,16	87,50	100,00	100,00	100,00	33,30	83,33

Statistický významný meziroční pokles antimikrobní citlivosti; statisticky nehodnotitelný údaj; statisticky neprůkazná změna antimikrobní citlivosti v porovnání s průměrem citlivosti za předešlé 3 roky při 5% zvolené míře spolehlivosti; NT - antimikrobní citlivost nebyla testována; 2018 - údaje antimikrobní citlivosti spočítané na základě vyšetřených 6 vzorků.

Tabulka 8 Citlivost vyšetřených kmenů *S. chromogenes* k antimikrobním látkám v období 2008–2018.

% citlivých kmenů za rok	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Antibiotikum											
C	NT	NT	100,00	50,00	66,70	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
T	100,00	100,00	97,40	84,80	91,80	83,90	90,00	92,90	85,30	88,10	100,00
AMP	100,00	85,70	84,20	90,90	71,70	78,30	80,00	80,00	71,90	74,40	77,78
OX	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	97,80	97,40	100,00	100,00	100,00
E	NT	NT	100,00	50,00	25,00	50,00	75,00	100,00	100,00	92,60	100,00
DA	100,00	100,00	97,40	91,30	87,80	95,10	84,00	92,90	97,10	81,00	88,89
CN	NT	NT	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	88,89
NV	100,00	100,00	97,40	97,70	97,80	94,90	91,30	95,00	93,50	95,00	100,00
ENR	NT	NT	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
SXT	100,00	100,00	100,00	97,70	100,00	100,00	97,90	97,50	100,00	100,00	100,00

Statistický významný meziroční pokles antimikrobní citlivosti; statisticky neohodnotitelný údaj; statisticky neprůkazná změna antimikrobní citlivosti v porovnání s průměrem citlivosti za předešlé 3 roky při 5% zvolené míře spolehlivosti; NT - antimikrobní citlivost nebyla testována; 2018 - údaje antimikrobní citlivosti spočítané na základě vyšetřených 9 vzorků.

Tabulka 9 Citlivost vyšetřených kmenů *S. pseudointermedius* k antimikrobním látkám v období 2008–2018.

% citlivých kmenů za rok	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Antibiotikum											
C	NT	NT	NT	100,00	0,00	63,00	72,90	69,20	71,00	70,00	66,70
T	NT	NT	NT	50,00	100,00	69,30	62,90	59,40	58,90	61,80	63,90
AMP	NT	NT	NT	14,30	NT	68,80	41,70	46,70	42,90	33,30	5,60
OX	NT	NT	NT	NT	NT	50,00	20,00	91,80	61,50	31,30	86,10
E	NT	NT	NT	100,00	0,00	57,10	62,60	58,80	63,20	58,70	63,90
DA	NT	NT	NT	100,00	0,00	58,10	62,10	62,10	61,80	60,70	63,90
CN	NT	NT	NT	100,00	100,00	96,60	94,00	94,90	94,70	93,60	83,30
NV	NT	NT	NT	NT	NT	NT	100,00	NT	100,00	100,00	97,20
ENR	NT	NT	NT	100,00	100,00	96,10	95,20	95,10	94,30	92,60	86,10
SXT	NT	NT	NT	NT	100,00	90,00	82,60	100,00	88,00	87,50	91,70

Statistický významný meziroční pokles antimikrobní citlivosti; statisticky neohodnotitelný údaj; statisticky neprůkazná změna antimikrobní citlivosti v porovnání s průměrem citlivosti za předešlé 3 roky při 5% zvolené míře spolehlivosti; NT - antimikrobní citlivost nebyla testována; 2018 - údaje antimikrobní citlivosti spočítané na základě vyšetřených 36 vzorků.

5.6 Vyhodnocení získaných údajů získaných v průběhu roku 2018

V rámci této bakalářské práce byly v průběhu 3 měsíců (březen-květen) v roce 2018 testovány kmeny stafylokoků izolované na SVÚ Olomouc z klinického materiálu koček, psů, skotu, prasat a koní. Celkem bylo vyšetřeno 727 vzorků, z nichž 45 vzorků bylo získáno z koček, 197 ze psů, ze skotu 455, z prasat 8 a z koní 22. Z těchto vzorků bylo zachyceno dohromady 102 kmenů 14 druhů *Staphylococcus* spp., přičemž z koček jich bylo izolováno 10 (tj. 10 % kmenů), ze psů 50 (tj. 49,02 % kmenů), ze skotu 38 (tj. 37,25 % kmenů), z koní 4 (tj. 3,92 % kmenů), z prasat nebyl izolován žádný druh stafylokoka. Podrobný přehled počtu kmenů stafylokoků v roce 2018 ukazuje Příloha 4. Testované stafylokoky byly nejčastěji

detekovány ve vzorcích získaných z mléčné žlázy (37 kmenů; tj. 36,27 % izolátů), kůže (28 kmenů; tj. 27,45 % izolátů), uší (20 kmenů; tj. 19,61 % izolátů). Naopak nejméně zachycených stafylokoků bylo ve vzorcích získaných z očí (6 kmenů; tj. 5,88 % izolátů), respiračního systému (6 kmenů; tj. 5,88 % izolátů), urogenitálního (3 kmeny; tj. 2,94 % izolátů) a pohybového (1 kmen; tj. 0,98 % izolátů). Podrobný přehled druhového zastoupení druhů stafylokoků v jednotlivých orgánech a orgánových systémech v roce 2018 dokumentuje Příloha 5.

Z celkového počtu vyšetřených vzorků v roce 2018 byly opět stanoveny prevalence, přičemž mezi nejfrekventovanější izolované druhy *Staphylococcus* spp. patřil *S. pseudintermedius* (36 izolátů) s prevalencí 4,95 %, *S. aureus* (21 izolátů) s prevalencí 2,89 %, *S. chromogenes* (9 izolátů) s prevalencí 1,24 % a *S. haemolyticus* (8 izolátů) s prevalencí 1,10 %. Podrobný přehled počtu kmenů a prevalencí *Staphylococcus* spp. v roce 2018 ukazuje Příloha 4.

U 4 nejfrekventovanějších druhů stafylokoků byla opět charakterizována citlivost k antimikrobním látkám. Jako nejvíce citlivé kmeny stafylokoků byly zaznamenány kmeny *S. haemolyticus*, u nichž byla 100,00% citlivost určena u 8 z 10 testovaných antibiotik. Mezi citlivé kmeny byly zařazeny také *S. chromogenes* se 100,00% citlivostí u 7 z 10 testovaných antibiotik a kmeny *S. aureus* se 100,00% citlivostí u 4 z 10 testovaných antibiotik. Naopak kmeny *S. pseudintermedius* nevykazovaly 100,00% citlivost k žádnému testovanému antibiotiku. Nejvyšší antimikrobní citlivost byla zaznamenána v případě novobiocinu s 99,30 % citlivých kmenů, kotrimoxazolu s 97,90 % citlivých kmenů, enrofloxacinu s 95,30 % citlivých kmenů. Nejnižší antimikrobní citlivost byla stanovena k ampicilinu s 45,30 % citlivých kmenů stafylokoků. Podrobné údaje ukazuje Tabulka 10. Průběhy citlivostí k antimikrobním látkám pro vybrané *Staphylococcus* spp. v roce 2018 dokumentuje Tabulka 6–Tabulka 9.

Tabulka 10 Citlivost vybraných druhů *Staphylococcus* spp. izolovaných z domácích zvířat k antimikrobním látkám na základě vlastního pozorování v roce 2018.

Antibiotikum	C	T	AMP	OX	E	DA	CN	NV	ENR	SXT
<i>Staphylococcus</i> spp.										
<i>S. aureus</i>	100,00	71,43	47,62	85,71	85,71	66,67	100,00	100,00	95,24	100,00
<i>S. chromogenes</i>	100,00	100,00	77,78	100,00	100,00	88,89	88,89	100,00	100,00	100,00
<i>S. pseudintermedius</i>	66,70	63,90	5,60	86,10	63,90	63,90	83,30	97,20	86,10	91,70
<i>S. haemolyticus</i>	100,00	100,00	50,00	100,00	100,00	87,50	100,00	100,00	100,00	100,00
Celkem citlivost [%]	91,70	83,80	45,30	93,00	87,40	76,70	93,00	99,30	95,30	97,90

100,00 - všechny kmeny byly citlivé; NT - antimikrobní citlivost nebyla testována.

6 DISKUZE

Během 10 let můžeme sledovat relativně výrazné změny ve vývoji počtu vyšetřených klinických vzorků. Na Obrázku 3 lze vidět pokles počtu vyšetřených klinických vzorků v tomto období. V roce 2008 bylo vyšetřeno 11409 vzorků, nicméně v roce 2009 došlo k výraznému poklesu na 5601 vzorků. V roce 2010 byl zaznamenán opět nárůst na 6499 vzorků, na druhou stranu rok 2011 a 2012 jsou ve znamení poklesu na 5291 (2011) a 5249 (2012) vyšetřených vzorků. Za rok 2013 bylo již vyšetřeno 6556 vzorků. Nicméně v následujících letech 2014, 2015 a 2016 došlo opět k poklesu na 4983 (2014), 4881 (2015), 4165 (2016), zatímco v roce 2017 byl zaznamenán nárůst na 5396 vzorků. Důvodem poklesu počtu vyšetřených klinických vzorků může být pokles počtu hospodářských zvířat, lepší zoohygienické podmínky, výživa a veterinární péče v chovech, což má za následek zlepšení zdravotního stavu zvířat a snížení jejich morbidit. Zajímavé je také druhové zastoupení *Staphylococcus* spp. v jednotlivých orgánech a orgánových systémech domácích zvířat. Z Přílohy 3 vyplývá, že stafylokoky byly nejvíce izolovány ve vzorcích získaných z mléčné žlázy, uší, kůže, respiračního a trávicího traktu, což může být dáno větší expozicí těchto orgánů infekčnímu agens. Naopak ve vzorcích získaných z urogenitálního, pohybového, cirkulačního, lymfatického a nervového aparátu byly zaznamenány mnohem nižší nálezy.

Jedním z cílů experimentální části této bakalářské práce bylo popsat změny v prevalenci u *Staphylococcus* spp. v průběhu let 2008–2017 a získané údaje porovnat s výsledky získaných na základě vlastního měření během 3 měsíců (březen–květen) v roce 2018. Při porovnání obou sad výsledných prevalencí musíme vzít na vědomí, že prevalence v roce 2018 byly získány z mnohem menšího počtu vyšetřených vzorků než v období 2008–2017. Nejvyšší průměrná prevalence během 2008–2017 byla zaznamenána v případě *S. aureus* (9,39 %), vysoká průměrná prevalence byla také u *S. intermedius* (3,31 %), *S. chromogenes* (2,57 %) a *S. pseudointermedius* (2,34 %). V roce 2018 byla na základě vlastního měření stanovena nejvyšší průměrná prevalence u *S. pseudointermedius* (4,95 %), vysoká průměrná prevalence byla také v případě *S. aureus* (2,89 %), *S. chromogenes* (1,24 %) a *S. haemolyticus* (1,10 %). Pomocí Z-testu pro porovnání dvou proporcí byla statistická významnost změn prevalencí v jednotlivých letech sledovaného období 2008–2017 v porovnání s hodnotami za celé sledované období potvrzena v případě *S. aureus* (rok 2008, 2009, 2013, 2016), *S. intermedius* (rok 2010, 2011, 2012) a *S. pseudointermedius* (rok 2014, 2015, 2016, 2017). Nejvyšší průměrná prevalence během 2008–2017 byla zaznamenána

v případě *S. aureus* (9,39 %), vysoká průměrná prevalence byla také u *S. intermedius* (3,31 %), *S. chromogenes* (2,57 %) a *S. pseudointermedius* (2,34 %).

Ve vzorcích klinického materiálu pocházejících z koček, psů, skotu, prasat a koní byl nejčastěji izolovaným stafylokokem *S. aureus* (5638 izolátů), jehož pozitivní nálezy byly nejvíce zaznamenány ve vzorcích získaných z mléčné žlázy (4650 kmenů, tj. 82,48 % izolátů). *S. aureus* je jedním z hlavních původců bovinních mastitid, jejichž příčinou bývá především špatná úroveň hygieny dojení způsobená zejména lajdáckým přístupem samotných ošetřovatelů, kteří nepoužívají při práci ochranné pomůcky, jako jsou gumové rukavice, neprovádí správně sanitaci vemene před a po dojení (Zootechnika, ©2019). Mnou zjištěná průměrná prevalence *S. aureus* nekoreluje s údaji uváděnými v literatuře. Například ve srovnání s Brazílií, která uvádí prevalenci *S. aureus* 21,62 %, je mnou zjištěná průměrná prevalence (9,39 %) téměř o více než polovinu nižší (Casanova *et al.*, 2016). V porovnání s norskými údaji (44,30 %) jsou mé údaje dokonce na čtyřnásobně nižší úrovni (Waage *et al.*, 1999). Pozoruhodného kolísání prevalence *S. aureus* si můžeme taktéž všimnout ve sledovaném období 2008–2017 v rámci této bakalářské práce. Zatímco prevalence mezi lety 2008–2013 vykazovala setrvalý pokles, v roce 2014 došlo k nárůstu prevalence o 1,08 procentní body (dále jen zkr. p. b.) a v následujícím roce 2015 k jejímu dalšímu vzrůstu až o 3,84 p. b. V roce 2016 opět nastal pokles, nicméně v následujícím roce 2017 byl zaznamenán opět nárůst (Obrázek 8). Jestliže porovnáme průměrnou prevalenci *S. aureus* v období 2008–2017 (9,39 %) s prevalencí zjištěnou na základě vlastního měření v roce 2018 (2,89 %), můžeme shledávat pokles dokonce o 6,50 p. b, což může být dáno zlepšením úrovně hygieny ve veterinární sféře a použitím moderních technologií pro kontrolu mléčné žlázy při dojení, nicméně je také třeba počítat s nižším počtem vzorků mléka v mnou sledovaném období 3 měsíců v roce 2018, což ukazuje na jistý sezónní výskyt mastitid skotu způsobených *S. aureus* (Bzdil *et al.*, 2017). Velmi zajímavé jsou údaje o změnách prevalencí kmenů *S. intermedius* a *S. pseudointermedius* v období 2008–2017. *S. intermedius* a *S. pseudointermedius* jsou nejčastějšími patogeny psů, jejichž pozitivní nálezy byly zaznamenány především ve vzorcích získaných z kůže (846 kmenů, tj. 42,58 % izolátů a 564 kmenů, tj. 40,20 % izolátů). Bzdil *et al.* (2019) ve své studii zjistil, že *S. pseudointermedius* a *S. intermedius* se u psů vyskytují s prevalencí 22,30 % a 5,90 %, já však pro *S. pseudointermedius* zaznamenala nižší hodnotu prevalence (11,50 %), ale v případě *S. intermedius* jsem detekovala téměř třikrát vyšší hodnotu prevalence (15,65 %). Na Obrázku 9 lze u kmenů *S. intermedius* pozorovat od roku 2008 výrazný nárůst prevalence až do roku 2011, kdy dosáhla svého maxima 8,15 %. Mezi lety 2011–2013 nastal její prudký pokles

až o 6,08 p. b. a od následujícího roku 2014 pozvolna klesala až do roku 2017. Naopak prevalence kmenů *S. pseudointermedius* vykazovala mezi lety 2008–2012 podstatě zanedbatelnou hodnotu, v letech 2013–2016 došlo opět k velmi razantnímu nárůstu až o 7,50 p. b., nicméně v následujícím roce 2017 nastal její opětovný pokles (Obrázek 11). V případě porovnání Obrázku 9 a Obrázku 11 můžeme konstatovat, že prevalence *S. intermedius* do roku 2013 narůstala, pak nastal její prudký pokles, a prevalence *S. pseudointermedius* byla do roku 2012 téměř nulová, nicméně od následujícího roku 2013 došlo k jejímu prudkému nárůstu. Na základě porovnání průměrné prevalence *S. intermedius* a *S. pseudointermedius* v období 2008–2017 (3,31 % a 2,43 %) s údaji zjištěnými v roce 2018 (0,83 % a 4,95 %) můžeme taktéž konstatovat pokles o 2,48 p. b v případě *S. intermedius* a nárůst o 2,52 p. b. v případě *S. pseudointermedius*. Tyto náhlé změny v prevalenci mohou být s největší pravděpodobností dány změnou v taxonomii obou druhů stafylokoků. Rok 2010–2011 lze označit jako hraniční rok, kdy fylogenetická analýza pomocí molekulárně-biologických studií dokázala genetickou variabilitu kmenů *S. intermedius*, což vedlo k novému taxonomickému přehodnocení *S. intermedius*. Tento druh se tak rozdělil do dvou nových druhů, a to *S. intermedius* a *S. pseudointermedius* (Sasaki *et al.*, 2007).

Dalším z cílů experimentální části této bakalářské práce bylo popsat a statisticky zhodnotit změny v citlivostech k vybraným antimikrobním látkám u *Staphylococcus* spp. v období 2008–2017 a získané údaje porovnat s výsledky získaných na základě vlastního měření v roce 2018. Jako v případě vyhodnocení změn prevalencí, i zde bychom měli brát v úvahu, že výsledky antimikrobní citlivosti v roce 2018 byly získány z mnohem menšího počtu vyšetřených vzorků než v období 2008–2017. Nejvyšší průměrná citlivost k testovaným antimikrobním látkám v období 2008–2017 byla zaznamenána v případě gentamicinu (97,30 %) a enrofloxacinu (97,20 %), další vysoká průměrná citlivost byla u kotrimoxazolu (94,60 %), naopak nejnižší průměrné citlivosti bylo dosaženo u erytromycinu (68,20 %) a ampicilinu (46,00 %). Nicméně, já na základě vlastního měření v roce 2018 zjistila nejvyšší průměrnou citlivost v případě novobiocinu (99,30 %) a kotrimoxazolu (97,90 %), avšak enrofloxacin byl s 95,30 % citlivých kmenů třetím antibiotikem s nejvyšší průměrnou citlivostí. Naopak ke gentamicinu jsem zaznamenala o 4,3 % méně citlivých kmenů než v období 2008–2017. Zatímco v období 2008–2017 byly k antimikrobním látkám nejvíce senzitivní kmeny *S. chromogenes* se 100,00% citlivostí u 2 z 10 testovaných antibiotik (gentamicin, enrofloxacin), *S. pseudointermedius* se 100,00% citlivostí u 1 z 10 testovaných antibiotik (novobiocin) (Tabulka 5). Já jsem v roce 2018 mezi nejvíce citlivé kmeny zařadila

S. haemolyticus, *S. chromogenes* a *S. aureus* se 100,00% citlivostí minimálně u 4 z 10 testovaných antibiotik (Tabulka 10).

Rozdíly s literárními údaji můžeme také sledovat v antimikrobní rezistenci pro *S. aureus*. Přestože Wang *et al.* (2016) ve své studii uvádí vyšší rezistenci k ampicilinu (94,30 %), klindamycinu (25,70 %) a erytromycinu (68,60 %), já pro stejné antimikrobní látky zaznamenala nižší průměrné hodnoty rezistence (60,00 %, 13,40 % a 23,00 %). Stejní autoři také detekovali 100,00% citlivost v případě chloramfenikolu, oxacilinu a gentamicinu, já ovšem zjistila pro chloramfenikol 12,70%, pro oxacilin 13,20% a pro gentamicin 4,00% rezistenci. Mé údaje se také liší od údajů ze studie z roku 2017, která detekovala dokonce 31,70% rezistenci k oxacilinu, avšak rezistence ke kotrimoxazolu (0,00 %) a novobiocinu (7,10 %) byla téměř stejná s mými zjištěnými údaji (1,30 % a 3,30 %) (Bzdil *et al.*, 2017). Pokud se podíváme na změny v citlivosti *S. aureus* během 2008–2017, lze konstatovat, že k výrazným změnám nedošlo, jen v případě chloramfenikolu byl pozorován pozoruhodný nárůst, kdy v roce 2017 bylo zachyceno dokonce o 24,8 % více citlivých kmenů než v roce 2008 (Tabulka 6). Také u kmenů *S. pseudointermedius* si můžeme všimnout rozdílů v antimikrobní rezistenci, pokud porovnáme mé zjištěné údaje s daty uváděnými v literatuře. Například studie z roku 2010 uvádí pro kmeny *S. pseudointermedius* vyšší rezistenci v případě tetracyklinu (66,70 %), klindamycinu (98,60 %), erytromycinu (98,60 %) a gentamicinu (99,30 %), já však pro stejná testovaná antibiotika zjistila mnohem nižší procento rezistence (34,00 %, 42,20 %, 42,80 % a 3,7 %) (Ruscher *et al.*, 2010). Změny v antimikrobní citlivosti pro *S. pseudointermedius* můžeme taktéž pozorovat v letech 2008–2017, kdy velmi znepokujícím nárůstem rezistence nastal u chloramfenikolu a klindamycinu, u erytromycinu bylo však v roce 2017 zachyceno dokonce o 41,30 % více rezistentních kmenů než v roce 2011 (Tabulka 9). I u ostatních testovaných stafylokoků si můžeme všimnout změn v antimikrobní rezistenci. Například u kmenů *S. intermedius* bylo proti chloramfenikolu v roce 2017 zachyceno o 21,20 % citlivých než v roce 2008, nicméně velmi zneklidňujícím nárůstem rezistence byl zaznamenán u kotrimoxazolu z 100,00 % (2008) na 33,30 % (2017) a oxacilinu z 0,00 % (2009) na 100,00 % (2017) (Tabulka 7). Nárůst rezistence byl taktéž zaznamenán u *S. chromogenes* v případě ampicilinu z 100,00 % (2008) na 74,40 % (2017) (Tabulka 8).

Antimikrobní rezistence pro svůj nárůst představuje celosvětový problém. Její neustálý nárůst může být pravděpodobně způsoben nesprávným používáním antibiotik, a to zejména jejich nadměrným užíváním jak v zdravotní péči, tak ve veterinární medicíně a v zemědělství, a výskytem jejich reziduí v prostředí, potravinách, vodě a krmivech (Nafisah *et al.*, 2017).

7 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byl charakterizován rod *Staphylococcus*. Byla popsána jejich patogenita, mechanismus rezistence k antimikrobním látkám, a především jejich klinický význam v humánní a veterinární sféře. V experimentální části byly popsány změny v prevalenci a v antimikrobní citlivosti u 4 nejfrekventovanějších druhů *Staphylococcus* spp. izolovaných na SVÚ Olomouc z klinického materiálu pocházejících z domácích zvířat v období 2008–2017. Získané údaje byly následně vyhodnoceny a následně porovnány s výsledky získaných na základě vlastního pozorování v průběhu 3 měsíců (březen–květen) v roce 2018. Z dosažených výsledků vyplývá, že ze 4 nejfrekventovanějších druhů stafylokoků byly nejčastěji izolovány *S. aureus* a *S. intermedius*. V případě antimikrobní citlivosti byly testované kmeny stafylokoků nejméně citlivé k ampicilinu, naopak nejvyšší citlivost byla zaznamenána v případě enrofloxacinu. Narůstající odolnost bakterií na antimikrobní látky může v budoucnosti vést k tomu, že nemoci závislé na antibiotické léčbě se mohou stát nevléčitelnými, což povede k vyšší morbiditě a mortalitě lidí i zvířat. Domnívám se, že problém s antimikrobní rezistencí bude dlouhodobě přetrvávat a bude nadále představovat globální problém, který se těžko podaří eliminovat. Sice se mohou stále vyvíjet novější antibiotika, ale předpokládám, že i na ně si mikroorganismy postupně vytvoří rezistenci. Možností, jak zmírnit míru antimikrobní rezistence může být zlepšení prevence proti infekcím, které mohou být příčinou šíření mikroorganismů rezistentních na antibiotika, nebo naslouchat radám a pokynům světové zdravotnické organizace snažící se zlepšit celkovou kvalitu zdraví a života lidské populace. Za velmi důležité považuji přijetí nových legislativních norem týkajících se výskytu jejich reziduí v prostředí, potravinách, krmivech, odpadních, užitkových i pitných vodách.

8 LITERATURA

- Abebe R., Hatiya H., Abera M., Megersa B., Asmare K. (2016): Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 270.
- Appelbaum P. C. (2007): Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(5), 398-408.
- Bartoňová J. (2014): Bakteriální onemocnění kůže v dětské ambulanci. *Pediatric pro praxi*, 15(4), 206-208.
- Bastos M. do C. de F., Coutinho B. G., Coelho M. L. V. (2010): Lysostaphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals*, 3(4), 1139-1161.
- Beneš J. (2009): Bakteriální infekce. In: *Infekční lékařství*, pp. 192-201, Galén, Brno.
- Białk-Bielińska A., Stolte S., Arning J., Uebers U., Bösch A., Stepnowski P., Matzke M. (2011): Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere*, 85(6), 928-933.
- Boothby J., Genigeorgis C., Fanelli M. J. (1979): Tandem coagulase/thermonuclease agar method for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(2), 298-302.
- Brakstad O. G., Aasbakk K., Maeland J. A. (1992): Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(7), 1654-1660.
- Brakstad O. G., Maeland J. A. (1997): Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS*, 105(1-6), 264-276.
- Bzdil J. (2003a): Kultivace a identifikace bakterií z rodu *Staphylococcus*. In: *Standardní operační postup SOP BAK 7/03*, pp. 1-6, SVÚ, Olomouc.
- Bzdil J. (2003b): Stanovení citlivosti bakterií k antimikrobním látkám diskovou difúzní metodou. In: *Standardní operační postup SOP BAK 10/03*, pp. 1-4, SVÚ, Olomouc.
- Bzdil J. (2012): Prevalence vybraných patogenů mléčné žlázy skotu v letech 2000-2010. *Veterinářství*, 6 (1), 28-32.
- 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.
- Bzdil J., Štanclová D., Toporčák J., Dopitová Š., Axmannová M. (2019): Stafylokoky izolované ze psů a koček a jejich citlivost k antimikrobním látkám. *Veterinářství*; 69(3), 155-160.
- Casanova V. P., Appio J., Kohl E., Michaelsen T. R., Paim D. S., Brunetto T. R., Girardini L. K. (2016): Bovine mastitis: prevalence and antimicrobial susceptibility profile and detection of genes associated with biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(3), 1369-1378.
- Daghrir R., Drogui P. (2013): Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), 209-227.

- De Buyser M. L., Morvan A., Aubert S., Dilasser F., El Solh N. (1992): Evaluation of a ribosomal RNA gene probe for the identification of species and subspecies within the genus *Staphylococcus*. *Microbiology*, 138(5), 889-899.
- Donlan R. M., Costerton J. W. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Goerke C., Pantucek R., Holtfreter S., Schulte B., Zink M., Grumann D., Wolz C. (2009): Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3462-3468.
- Götz F., Bannerman T., Schleifer K. H. (2006): The genera *staphylococcus* and *macrococcus*. In *The prokaryotes*, pp. 5-75, Springer, New York, NY.
- Haertl R., Bandlow G. (1990): Application of small fragment restriction endonuclease analysis (SF-REA) to the epidemiological fingerprinting of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 33(2), 91-96.
- Hauschild A. H. W., Park C. E., Hilsheimer R. (1979): A modified pork plasma agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(9), 1052-1057.
- Havliš J. (1999): Hmotnostní spektrometrie MALDI ToF. *Vesmír*, 78, 448.
- Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
- Heijenoort J. V. (2001): Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, 11(3), 25R-36R.
- Chaloupka O. (2018): Studium rezistence vybraných mikroorganismů k antimikrobním látkám. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Karpíšková R., Štásková Z., Karpíšková S. (2009): Nálezy meticilin rezistentních *Staphylococcus aureus* u zvířat. *Veterinářství*, (1).
- Khan M. Z., Khan, A. (2006): Basic facts of mastitis in dairy animals: A review. *Pakistan Veterinary Journal*, 26(4), 204.
- Kloos W. E., Tornabene T. G., Schleifer K. H. (1974): Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24(1), 79-101.
- Kloos W. E., Schleifer K. H. (1975): Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 1(1), 82-88.
- Kvasničková E., Paldrychová M., Mařátková O., Masák J. (2016): Medicinální aspekty mikrobiálních biofilmů. *Chemické listy*, 110(7), 485-490.
- Kwok A. Y., Chow A. W. (2003): Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Macrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 87-92.
- Lee C. Y., Schmidt J. J., Johnson-Winegar A. D., Spero L., Iandolo J. J. (1987). Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 169(9), 3904-3909.

- Li C., Lu J., Liu J., Zhang G., Tong Y., Ma N. (2016): Exploring the correlations between antibiotics and antibiotic resistance genes in the wastewater treatment plants of hospitals in Xinjiang, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 15111-15121.
- Lilenbaum W., Veras M., Blum E., Souza G. N. (2000): Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Letters in Applied Microbiology*, 31(1), 42-45.
- Mack D., Horstkotte M. A., Rohde H., Knobloch J. K. M. (2005): Coagulase-negative staphylococci. In *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy* (pp. 119-163). CRC Press.
- Malachowa N., DeLeo F. R. (2010): Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and molecular life sciences*, 67(18), 3057-3071.
- Marrack P., Kappler J. (1990): The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, 248(4956), 705-711.
- Martinez J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893-2902.
- Marvin L. F., Roberts M. A., Fay L. B. (2003): Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 337(1-2), 11-21.
- Millar B. C., Prendergast B. D., Moore J. E. (2007): Community-associated MRSA (CA-MRSA): an emerging pathogen in infective endocarditis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(1), 1-7.
- Mlynarczyk A., Mlynarczyk G., Jeljaszewicz J. (1998): The genome of *Staphylococcus aureus*: a review. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 287(4), 277-314.
- Nafisah S. B., Nafesa S. B., 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
- 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.
- Place R. B., Hiestand D., Gallmann H. R., Teuber, M: (2003): *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 30-37.
- Poyart C., Quesne G., Boumaila C., Trieu-Cuot P. (2001): Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4296-4301.
- Příbalový leták STAPHYtest 24 od firmy Erba Lachema s.r.o., Brno, ČR
- Příbalový leták OXItest od firmy Erba Lachema s.r.o., Brno, ČR
- Příbalový leták PYRAtest od firmy Erba Lachema s.r.o., Brno, ČR
- Příbalový leták VPtest od firmy Erba Lachema s.r.o., Brno, ČR
- Puckowski A., Mioduszewska K., Łukaszewicz P., Borecka M., Caban M., Maszkowska J., Stepnowski P. (2016): Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 127, 232-255.
- Pyörälä S., Taponen S. (2009): Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Veterinary microbiology*, 134(1-2), 3-8.

- Quinn P. J., Markey B. K., Leonard F. C., Hartigan P., Fanning S., Fitzpatrick E. I. (2011): Staphylococcus species. In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. (eds), pp. 179–186, John Wiley et Sons.
- Renew J. E., Huang C. H. (2004): Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1042(1-2), 113-121.
- Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M. C., Fatta-Kassinos D. (2013): Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the Total Environment*, 447, 345-360.
- Ruscher C., Lübke-Becker A., Semmler T., Wleklinski C. G., Paasch A., Šoba A., Walther B. (2010): Widespread rapid emergence of a distinct methicillin-and multidrug-resistant Staphylococcus pseudointermedius (MRSP) genetic lineage in Europe. *Veterinary Microbiology*, 144(3-4), 340-346.
- Sasaki T., Kikuchi K., Tanaka Y., Takahashi N., Kamata S., Hiramatsu K. (2007): Reclassification of phenotypically identified Staphylococcus intermedius strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2770-2778.
- Spencer J. P. (2008): Management of mastitis in breastfeeding women. *American Fam Physician*, 78(6), 727-731.
- Stull J. W., Slavić D., Rousseau J., Weese J. S. (2014): Staphylococcus delphini and methicillin-resistant S. pseudointermedius in horses, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 20(3), 485.
- Supersac G., Prevost G., Piemont Y. (1993): Sequencing of leucocidin R from Staphylococcus aureus P83 suggests that staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. *Infection and Immunity*, 61(2), 580-587.
- Štromerová N. (2013): Druhá identifikace bakterií metodou MALDI-TOF. In *Standardní operační postup SOP BAK 1/10*, pp. 1-7, SVÚ, Olomouc.
- Špruček F. (2006): Buněčná a humorální odpověď u hlubokých pyodermií psů a reakce na terapii (klinická studie). Doktorská disertační práce. Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.
- Štěpán J., Pantůček R., Doškař J. (2004): Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbiologica*, 49(4), 353-386.
- Ventola C. L. (2015): The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277.
- Vollmer W., Blanot D., De Pedro M. A. (2008): Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149-167.
- Votava M. (2003): Grampozitivní aerobní a fakultativně anaerobní koky. In: *Lékařská mikrobiologie speciální*, pp. 98-109, Neptun, Brno.
- Votava M. (2005): *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. Neptun, Brno.
- Vytrásová J., Bílková Z. (2014): *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*. Univerzita Pardubice, Chemicko-technologická fakulta.

- Wang D., Zhang L., Zhou X., He Y., Yong C., Shen M., Han B. (2016). Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9560-9569.
- Waage S., Mørk T., Røros A., Aasland D., Hunshamar A., Ødegaard S. A. (1999): Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of dairy science*, 82(4), 712-719.
- Wellington E. M., Boxall A. B., Cross P., Feil E. J., Gaze W. H., Hawkey P. M., Thomas C. M. (2013): The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155-165.
- Xia G., Kohler T., Peschel A. (2010): The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2-3), 148-154.
- Zhang X. X., Zhang T., Fang H. H. (2009): Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 397-414.

Internetové zdroje

- Euzéby J. P. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. [online]. 1997: [cit. 3.9.2018], písmeno S. Dostupné z <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015 [online] [cit. 9.2.2019] Dostupné z http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf
- Vrbová E. Stafylokokové infekce. [online]. 2004. [cit. 9.2.2019] Dostupné z <http://www.edukafarm.cz/c430-stafylokokove-infekce>
- World Health Organization. Antimicrobial resistance. [online]. 2018. [cit. 13.4.2019] Dostupné z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Zootechnika.cz. Mastitidy. [online] 2009. [cit. 14.4.2019] Dostupné z <http://www.zootechnika.cz/clanky/zaklady-chovatelstvi/zoohygiena-a-choroby-hospodarskych-zvirat/choroby-prezvykavcu/mastitidy.html>

9 PŘÍLOHY

Příloha 1 Prevalence *Staphylococcus* spp. ve vyšetřovaných vzorcích na SVÚ Olomouc ve sledovaném období 2008–2018 (%).

Příloha 2 Počty kmenů a prevalence *Staphylococcus* spp. ve vyšetřovaných vzorcích na SVÚ Olomouc ve sledovaném období 2008–2017.

Příloha 3 Druhové zastoupení *Staphylococcus* spp. v jednotlivých orgánech a orgánových systémech u domácích zvířat ve sledovaném období 2008–2017.

Příloha 4 Počty kmenů a prevalence *Staphylococcus* spp. ve vyšetřovaných vzorcích na SVÚ Olomouc u jednotlivých skupin zvířat v roce 2018.

Příloha 5 Druhové zastoupení *Staphylococcus* spp. v jednotlivých orgánech a orgánových systémech u domácích zvířat v roce 2018.

Příloha 1 Prevalence *Staphylococcus* spp. ve vyšetřovaných vzorcích na SVÚ Olomouc ve sledovaném období 2008–2018 (%).

Rok	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>Staphylococcus</i> spp.										
<i>S. aureus</i> *	1541	911	501	444	419	338	311	492	228	453
Prevalence [%]	13,51	16,26	7,71	8,39	7,98	5,16	6,24	10,08	5,47	8,40
<i>S. felis</i>	26	18	14	18	19	31	20	31	39	34
Prevalence [%]	0,23	0,32	0,22	0,34	0,36	0,47	0,40	0,64	0,94	0,63
<i>S. pseudointermedius</i> *	0	0	0	2	2	219	262	263	314	341
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,00	0,04	0,04	3,34	5,26	5,39	7,54	6,32
<i>S. intermedius</i> *	134	204	452	431	392	136	89	67	54	28
Prevalence [%]	1,17	3,64	6,95	8,15	7,47	2,07	1,79	1,37	1,30	0,52
<i>S. lutrae</i> *	0	0	2	2	4	2	9	1	1	3
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,03	0,04	0,08	0,03	0,18	0,02	0,02	0,06
<i>S. delphini</i> *	0	0	0	0	0	0	2	2	8	6
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,04	0,19	0,11
<i>S. epidermidis</i>	5	7	16	47	29	26	33	7	38	44
Prevalence [%]	0,04	0,12	0,25	0,89	0,55	0,40	0,66	0,14	0,91	0,82
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>coagulans</i> *	0	0	2	2	7	10	6	11	16	18
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,03	0,04	0,13	0,15	0,12	0,23	0,38	0,33
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>schleiferi</i>	0	0	0	6	5	11	5	4	9	5
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,00	0,11	0,10	0,17	0,10	0,08	0,22	0,09
<i>S. sciuri</i>	0	2	10	37	16	25	31	38	22	37
Prevalence [%]	0,00	0,04	0,15	0,70	0,30	0,38	0,62	0,79	0,53	0,69
<i>S. succinus</i>	0	0	0	0	1	2	1	1	2	3
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03	0,02	0,02	0,05	0,06
<i>S. warneri</i>	0	1	0	5	5	2	3	2	1	6
Prevalence [%]	0,00	0,02	0,00	0,09	0,10	0,03	0,06	0,04	0,02	0,11
<i>S. xylosus</i>	0	5	25	25	39	99	64	29	89	32
Prevalence [%]	0,00	0,09	0,38	0,47	0,74	1,51	1,28	0,59	2,14	0,59
<i>S. haemolyticus</i>	0	11	34	98	90	121	76	88	100	92
Prevalence [%]	0,00	0,20	0,52	1,85	1,71	1,85	1,53	1,80	2,40	1,70
<i>S. lugdunensis</i> *	0	0	0	2	0	1	0	0	4	2
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00	0,10	0,04
<i>S. simulans</i>	0	0	6	9	3	10	15	26	8	6
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,09	0,17	0,06	0,15	0,30	0,53	0,19	0,11

* druhy *Staphylococcus* spp. produkující plasmakoagulasu; statistický významný pokles prevalence; statisticky neohodnotitelný údaj; statisticky neprůkazná změna prevalence v porovnání s hodnotami prevalencí za celé sledované období předešlé při 5% zvolené míře spolehlivosti.

Příloha 1 Prevalence *Staphylococcus* spp. ve vyšetřovaných vzorcích na SVÚ Olomouc ve sledovaném období 2008–2017 (%) (pokračování).

Rok	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>Staphylococcus</i> spp.										
<i>S. equorum</i>	2	1	1	6	40	11	12	7	7	4
Prevalence [%]	0,02	0,02	0,02	0,11	0,76	0,17	0,24	0,14	0,17	0,07
<i>S. hominis</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
<i>S. cohnii</i> spp. <i>urealyticus</i>	0	0	1	0	0	2	0	1	1	1
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,00	0,02	0,02	0,02
<i>S. chromogenes</i>	1	26	131	192	199	301	192	216	155	130
Prevalence [%]	0,01	0,46	2,02	3,63	3,79	4,59	3,85	4,43	3,72	2,41
<i>S. hyicus</i> *	17	12	11	10	4	4	2	8	1	14
Prevalence [%]	0,15	0,21	0,17	0,19	0,08	0,06	0,04	0,16	0,02	0,26
<i>S. kloosii</i> *	0	0	0	1	0	0	2	0	2	1
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,04	0,00	0,05	0,02
<i>S. lentus</i>	1	1	0	0	0	0	3	0	0	0
Prevalence [%]	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00
<i>S. pasteuri</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
Prevalence [%]	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,02
<i>S. auricularis</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
Prevalence [%]	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,02
<i>S. capitis</i> spp. <i>capitis</i>	0	1	1	6	1	9	4	0	3	0
Prevalence [%]	0,00	0,02	0,02	0,11	0,02	0,14	0,08	0,00	0,07	0,00
<i>S. vitulinus</i>	1	0	0	13	3	1	9	9	3	3
Prevalence [%]	0,01	0,00	0,00	0,25	0,06	0,02	0,18	0,18	0,07	0,06
<i>S. arlettae</i>	2	0	0	3	2	1	0	2	4	1
Prevalence [%]	0,02	0,00	0,00	0,06	0,04	0,02	0,00	0,04	0,10	0,02
Celkový počet vyšetřených vzorků	11409	5601	6499	5291	5249	6556	4983	4881	4165	5396
Počet pozitivních vzorků	1731	1200	1209	1360	1280	1362	1153	1306	1111	1266

* druhy *Staphylococcus* spp. produkující plasmakoagulasu; statistický významný pokles prevalence; statisticky neohodnotitelný údaj; statisticky neprůkazná změna prevalence v porovnání s hodnotami prevalence za celé sledované období předešlé při 5% zvolené míře spolehlivosti.

Příloha 2 Počty kmenů a prevalence *Staphylococcus* spp. ve vyšetřovaných vzorcích na SVÚ Olomouc ve sledovaném období 2008–2017.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Kočka		Pes		Skot		Prase		Kůň		Zvířata celkem	
	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]
<i>S. aureus</i> *	111	4,21	752	6,11	4656	11,19	13	0,49	106	13,2	5638	9,39
<i>S. felis</i>	242	9,17	8	0,06	0	0,00	0	0,00	0	0,00	250	0,42
<i>S. pseudointermedius</i> *	24	0,91	1373	11,15	5	0,01	0	0,00	1	0,12	1403	2,34
<i>S. intermedius</i> *	46	1,74	1927	15,65	4	0,01	0	0,00	10	1,25	1987	3,31
<i>S. lutrae</i> *	1	0,04	16	0,13	6	0,01	0	0,00	1	0,12	24	0,04
<i>S. delphini</i> *	1	0,04	2	0,02	0	0,00	0	0,00	15	1,87	18	0,03
<i>S. epidermidis</i>	9	0,34	41	0,33	200	0,48	0	0,00	2	0,25	252	0,42
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>coagulans</i> *	9	0,34	63	0,51	0	0,00	0	0,00	0	0,00	72	0,12
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>schleiferi</i>	6	0,23	38	0,31	1	0,00	0	0,00	0	0,00	45	0,07
<i>S. sciuri</i>	7	0,27	13	0,11	180	0,43	0	0,00	18	2,24	218	0,36
<i>S. succinus</i>	2	0,08	2	0,02	4	0,01	0	0,00	2	0,25	10	0,02
<i>S. warneri</i>	5	0,19	8	0,06	9	0,02	0	0,00	3	0,37	25	0,04
<i>S. xylosum</i>	3	0,11	5	0,04	385	0,93	0	0,00	14	1,74	407	0,68
<i>S. haemolyticus</i>	15	0,57	24	0,19	661	1,59	3	0,11	7	0,87	710	1,18
<i>S. lugdunensis</i> *	2	0,08	2	0,02	2	0,00	0	0,00	3	0,37	9	0,01
<i>S. simulans</i>	8	0,30	6	0,05	68	0,16	0	0,00	1	0,12	83	0,14
<i>S. equorum</i>	3	0,11	2	0,02	55	0,13	0	0,00	31	3,86	91	0,15
<i>S. hominis</i>	2	0,08	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
<i>S. cohnii</i> spp. <i>urealyticus</i>	1	0,04	1	0,01	2	0,00	0	0,00	2	0,25	6	0,01
<i>S. chromogenes</i>	1	0,04	4	0,03	1519	3,65	4	0,15	15	1,87	1543	2,57
<i>S. hyicus</i> *	0	0,00	1	0,01	59	0,14	15	0,56	8	1,00	83	0,14
<i>S. kloosii</i> *	0	0,00	3	0,02	2	0,00	0	0,00	1	0,12	6	0,01
<i>S. lentus</i>	0	0,00	2	0,02	3	0,01	0	0,00	0	0,00	5	0,01
<i>S. pasteurii</i>	0	0,00	1	0,01	4	0,01	0	0,00	0	0,00	5	0,01
<i>S. auricularis</i>	0	0,00	2	0,02	0	0,00	0	0,00	2	0,25	4	0,01
<i>S. capitis</i> spp. <i>capitis</i>	0	0,00	4	0,03	19	0,05	1	0,04	1	0,12	25	0,04
<i>S. vitulinus</i>	0	0,00	0	0,00	17	0,02	0	0,00	35	4,36	42	0,07
<i>S. arlettae</i>	0	0,00	0	0,00	13	0,03	0	0,00	0	0,00	15	0,02
Celkem kmenů/prevalence	498	18,88	4300	34,93	7864	18,90	36	1,35	278	34,62	12978	21,62
Počet vyš. vzorků	2638		12310		41603		2676		803		60030	

* druhy *Staphylococcus* spp. produkující plasmakoagulasu.

Příloha 3 Druhové zastoupení *Staphylococcus* spp. v jednotlivých orgánech a orgánových systémech u domácích zvířat ve sledovaném období 2008–2017.

Orgán	Ucho (%)	Oko (%)	Kůže (%)	Respirační (%)	Trávicí (%)	Mléčná žláza (%)	Urogenitální (%)	Pohybový (%)	Lymfatický (%)	Cirkulační (%)	Nervová (%)	Celkem izolátů (%)
<i>Staphylococcus</i> spp.												
<i>S. aureus</i> *	280 (4,97)	69 (1,22)	450 (7,98)	144 (2,55)	26 (0,46)	4650 (82,48)	7 (0,12)	4 (0,07)	7 (0,12)	1 (0,02)	0	5638 (100,00)
<i>S. felis</i>	81 (32,40)	49 (19,60)	48 (19,20)	62 (24,80)	9 (3,60)	0	0	1 (0,40)	0	0	0	250 (100,00)
<i>S. pseudointermedius</i> *	561 (39,99)	103 (7,34)	564 (40,20)	85 (6,06)	59 (4,21)	7 (0,50)	17 (1,21)	7 (0,50)	0	0	0	1403 (100,00)
<i>S. intermedius</i> *	759 (38,20)	137 (6,89)	846 (42,58)	127 (6,39)	93 (4,68)	4 (0,20)	14 (0,70)	5 (0,25)	2 (0,10)	0	0	1987 (100,00)
<i>S. lutrae</i> *	3 (12,50)	4 (16,67)	6 (25,00)	3 (12,50)	2 (8,33)	6 (25,00)	0	0	0	0	0	24 (100,00)
<i>S. delphini</i> *	1 (5,56)	2 (11,11)	5 (27,78)	8 (44,44)	1 (5,56)	0	0	0	1 (5,56)	0	0	18 (100,00)
<i>S. epidermidis</i>	11 (4,37)	4 (1,59)	26 (10,32)	3 (1,19)	1 (0,40)	203 (80,56)	1 (0,40)	1 (0,40)	1 (0,40)	0	1 (0,40)	252 (100,00)
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>coagulans</i> *	54 (75,00)	4 (5,56)	10 (13,89)	3 (4,17)	1 (1,39)	0	0	0	0	0	0	72 (100,00)
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>schleiferi</i>	22 (48,89)	4 (8,89)	14 (31,11)	3 (6,67)	0	1 (2,22)	1 (2,22)	0	0	0	0	45 (100,00)
<i>S. sciuri</i>	3 (1,38)	0	26 (11,93)	15 (6,88)	3 (1,38)	171 (78,44)	0	0	0	0	0	218 (100,00)
<i>S. succinus</i>	2 (20,00)	2 (20,00)	2 (20,00)	2 (20,00)	0	2	0	0	0	0	0	10 (100,00)
<i>S. warneri</i>	4 (16,00)	1 (4,00)	10 (40,00)	5 (20,00)	0	5 (20,00)	0	0	0	0	0	25 (100,00)
<i>S. xylosus</i>	0	3 (0,74)	15 (3,69)	6 (1,47)	1 (0,25)	381 (93,61)	1 (0,25)	0	0	0	0	407 (100,00)
<i>S. haemolyticus</i>	10 (1,41)	6 (0,85)	27 (3,80)	9 (1,27)	4 (0,56)	649 (91,41)	5 (0,70)	0	0	0	0	710 (100,00)
<i>S. lugdunensis</i> *	3 (33,33)	1 (11,11)	4 (44,44)	1 (11,11)	0	0	0	0	0	0	0	9 (100,00)
<i>S. simulans</i>	9 (10,84)	0	3 (3,61)	4 (4,82)	0	67 (80,72)	0	0	0	0	0	83 (100,00)
<i>S. equorum</i>	3 (3,30)	2 (2,20)	58 (63,74)	18 (19,78)	7 (7,69)	2 (2,20)	1 (1,10)	0	0	0	0	91 (100,00)
<i>S. hominis</i>	0	1 (50,00)	1 (50,00)	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (100,00)

* druhy *Staphylococcus* spp. produkující plasmakoagulasu.

Příloha 3 Druhové zastoupení *Staphylococcus* spp. v jednotlivých orgánech a orgánových systémech u domácích zvířat ve sledovaném období 2008–2017 (pokračování).

Orgán	Ucho (%)	Oko (%)	Kůže (%)	Respirační (%)	Trávicí (%)	Mléčná žláza (%)	Urogenitální (%)	Polybový (%)	Lymfatický (%)	Cirkulační (%)	Nervová (%)	Celkem izolátů (%)
<i>S. cohnii</i> spp. <i>urealyticus</i>	0	0	0	5 (83,33)	0	1 (16,67)	0	0	0	0	0	6 (100,00)
<i>S. chromogenes</i>	3 (0,19)	4 (0,26)	24 (1,56)	17 (1,10)	0	1493 (96,76)	2 (0,13)	0	0	0	0	1543 (100,00)
<i>S. hyicus</i> *	0	1 (1,20)	21 (25,30)	2 (2,41)	2 (2,41)	56 (67,45)	0	0	0	0	0	83 (100,00)
<i>S. kloosii</i> *	2 (33,33)	1	1 (16,67)	0	0	2 (33,33)	0	0	0	0	0	6 (100)
<i>S. lentus</i>	1 (20,00)	0	1 (20,00)	0	0	3 (60,00)	0	0	0	0	0	5 (100,00)
<i>S. pasteurii</i>	1 (20,00)	0	1 (20,00)	0	0	3 (60,00)	0	0	0	0	0	5 (100,00)
<i>S. auricularis</i>	0	0	1 (25,00)	3 (75,00)	0	0	0	0	0	0	0	4 (100,00)
<i>S. capitis</i> spp. <i>capitis</i>	2 (8,00)	0	4 (16,00)	1 (4,00)	0	18 (72,00)	0	0	0	0	0	25 (100,00)
<i>S. vitulinus</i>	0	1 (2,38)	6 (14,29)	28 (66,67)	1 (2,38)	6 (14,29)	0	0	0	0	0	42 (100,00)
<i>S. arlettae</i>	0	0	0	0	0	15 (100)	0	0	0	0	0	15 (100,00)
Celkem	1815 (13,99)	399 (3,07)	2174 (16,75)	554 (4,27)	210 (1,62)	7745 (59,68)	49 (0,38)	19 (0,15)	11 (0,08)	1 (0,01)	1 (0,01)	12978 (100,00)

* druhy *Staphylococcus* spp. produkující plasmakoagulasu.

Příloha 4 Počty kmenů a prevalence *Staphylococcus* spp. ve vyšetřených vzorcích na SVÚ Olomouc u jednotlivých skupin zvířat v roce 2018.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Kočka		Pes		Skot		Prase		Kůň		Zvířata celkem	
	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]	Počet kmenů	Prevalence [%]
<i>S. aureus</i> *	4	8,89	2	1,02	12	2,64	0	0,00	3	13,64	21	2,89
<i>S. condimenti</i>	0	0,00	1	0,51	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,14
<i>S. epidermidis</i>	0	0,00	0	0,00	5	1,10	0	0,00	0	0,00	5	0,69
<i>S. felis</i> *	6	13,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	0,83
<i>S. haemolyticus</i>	0	0,00	0	0,00	8	1,76	0	0,00	0	0,00	8	1,10
<i>S. chromogenes</i>	0	0,00	1	0,51	7	1,54	0	0,00	1	4,55	9	1,24
<i>S. intermedius</i> *	0	0,00	6	3,05	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	0,83
<i>S. kloosii</i> *	0	0,00	2	1,02	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,28
<i>S. pseudointermedius</i> *	0	0,00	34	17,26	2	0,44	0	0,00	0	0,00	36	4,95
<i>S. sciuri</i> spp. <i>sciuri</i>	0	0,00	1	0,51	2	0,44	0	0,00	0	0,00	3	0,41
<i>S. schleiferi</i> ssp <i>coagulans</i> *	0	0,00	2	1,02	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,28
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>schleiferi</i>	0	0,00	1	0,51	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,14
<i>S. warneri</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,22	0	0,00	0	0,00	1	0,14
<i>S. xylosus</i>	0	0,00	0	0,00	1	0,22	0	0,00	0	0,00	1	0,14
Celkem kmenů/prevalence	10	22,22	50	25,38	38	8,35	0	0,00	4	18,18	102	14,03
Počet vyš. vzorků	45		197		455		8		22		727	

* druhy *Staphylococcus* spp. produkující plasmakoagulasu.

Příloha 5 Druhové zastoupení *Staphylococcus* spp. v jednotlivých orgánech a orgánových systémech u domácích zvířat v roce 2018.

Orgán												
<i>Staphylococcus</i> spp.	Ucho	Oko	Kůže	Respirační	Trávicí	Mléčná žláza	Urogenitální	Pohybový	Lymfatický	Cirkulární	Nervová	Celkem izolátů
<i>S. aureus*</i>	0	2 (9,52)	4 (19,05)	3 (14,29)	0	12 (57,14)	0	0	0	0	0	21 (100)
<i>S. condimenti</i>	0	0	1 (100,00)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	5 (100,00)	0	0	0	0	0	5 (100)
<i>S. felis*</i>	2 (33,33)	0	2 (33,33)	1 (16,67)	0	0	1 (16,67)	0	0	0	0	6 (100)
<i>S. haemolyticus</i>	0	0	0	0	0	8 (100,00)	0	0	0	0	0	8 (100)
<i>S. chromogenes</i>	0	2 (22,22)	1 (11,11)	0	0	6 (66,67)	0	0	0	0	0	9 (100)
<i>S. intermedius*</i>	3 (50,00)	0	1 (16,67)	0	0	0	1 (16,67)	1 (16,67)	0	0	0	6 (100)
<i>S. kloosii*</i>	1 (50,00)	0	0	0	0	0	1 (50,00)	0	0	0	0	2 (100)
<i>S. pseudointermedius*</i>	13 (36,11)	2 (5,56)	17 (47,22)	2 (5,56)	0	2 (5,56)	0	0	0	0	0	36 (100)
<i>S. sciuri</i> spp. <i>sciuri</i>	0	0	0	0	1 (33,33)	2 (66,67)	0	0	0	0	0	3 (100)
<i>S. schleiferi</i> ssp. <i>coagulans*</i>	1 (50,00)	0	1 (50,00)	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (100)
<i>S. schleiferi</i> spp. <i>schleiferi</i>	0	0	1 (100,00)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100)
<i>S. warneri</i>	0	0	0	0	0	1 (100,00)	0	0	0	0	0	1 (100)
<i>S. xylosum</i>	0	0	0	0	0	1 (100,00)	0	0	0	0	0	1 (100)
Celkem	20 (19,61)	6 (5,88)	28 (27,45)	6 (5,88)	1 (0,98)	37 (36,27)	3 (2,94)	1 (0,98)	0	0	0	102 (100)

* druhy *Staphylococcus* spp. produkující plasmakoagulasu.