



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Betahemolytické streptokoky u zvířat a lidí**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: **Bc. Tereza Miksteinová**  
Studijní program: B1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.  
Termín odevzdání práce: 2020

## Bibliografická identifikace

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora: | Bc. Tereza Miksteinová   |
| Název práce:             | Betahemolytické streptokoky u zvířat a lidí  |
| Typ práce:               | Diplomová  |
| Pracoviště:              | Státní veterinární ústav Olomouc   |
| Vedoucí práce:           | MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.  |
| Rok obhajoby práce:      | 2020   |
| Abstrakt:                | Diplomová práce je zaměřena na betahemolytické streptokoky vyskytující se u zvířat a lidí. V teoretické části této práce byla zpracována literární rešerše zabývající se jednotlivými druhy betahemolytických streptokoků, jejich výskytem napříč živočišnými druhy, lidmi a jejich orgánovými systémy. Dále byla zpracována problematika globálně stoupající rezistence k antimikrobiální léčbě tohoto rodu mikroorganismů. V experimentální části byly zpracovány data hodnotící prevalenci výskytu a citlivosti betahemolytických streptokoků k antimikrobiálním látkám v období let 2013-2018 ve veterinární sféře. Dále byl vyhodnocen výskyt stejné skupiny streptokoků izolovaných z humánních hostitelů v letech 2013-2018. Izolace probíhala pomocí standardních selektivních mikrobiologických postupů a identifikace pomocí MALDI-TOF-MS na Státním veterinárním ústavu Olomouc, i na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. |
| Klíčová slova:           | <i>Streptococcus</i> sp., betahemolytické streptokoky, antimikrobiální citlivost, rezistence, humánní a veterinární medicína   |
| Počet stran:             | 75   |
| Počet příloh:            | 3  |
| Jazyk:                   | Český  |

## Bibliographical identification

Author's first name and surname: Tereza Miksteinová

Title of thesis: Beta-haemolytical streptococci in animals and humans

Type of thesis: Master

Department: Special Microbiology of State Veterinary Institute  
Olomouc

Supervisor: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: This master thesis is focused on the beta-haemolytic streptococci occurring in animals and humans. The theoretical part summarizes knowledge about the beta-haemolytic streptococci, their occurrence in animal species, humans and their organ systems. The global problem of increasing antibiotic resistance was covered as well. The experimental part consists of prevalence of occurrence and antimicrobial susceptibility of beta-haemolytic streptococci in the period of years 2013-2018 in animals. The identic group of microorganisms was evaluated in the human hosts as well. The isolation of microorganims had been done by routine microbiological procedures. The identification had been done by MALDI-TOF-MS and at The State Veterinary Institute and at The Microbiology Department at the Medical Faculty of Palacký University.

Keywords: *Streptococcus* sp., beta-haemolytical streptococci, antimicrobial susceptibility, resistance, human and veterinary medicine

Number of pages: 75

Number of appendices: 3

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury, a že data použitá při konstrukci této práce byla poskytnuta s laskavým svolením ředitele SVÚ Olomouc a také Ústavem mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

V Olomouci dne 11.5.2020

Bc. Tereza Miksteinová

## Poděkování

Ráda bych zde poděkovala svému vedoucímu diplomové práce MVDr. Jaroslavu Bzdilovi, Ph.D. za jeho cenné rady, odborné vedení, trpělivost a motivaci nejen při práci v laboratoři, ale i při konzultacích a sepisování této práce. Děkuji také Státnímu veterinárnímu ústavu v Olomouci za umožnění provádění výzkumu právě pod jeho záštitou a za poskytnutí dat použitých v této práci. Mé poslední poděkování patří RNDr. Lucii Janovské, Ph.D. z Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého za poskytnutí materiálu a cenné rady.

## Obsah

|  |    |
|--|----|
| Seznam použitých zkratk.....   | 8  |
| 1 Úvod do problematiky a cíle práce.....   | 11 |
| 2 Diferenciace streptokoků.....  | 11 |
| 2.1 Dle typu hemolýzy .....  | 12 |
| 2.2 Klasifikace dle Lancefieldové.....   | 13 |
| 2.2.1 Streptokoky skupiny A.....   | 13 |
| 2.2.2 Streptokoky skupiny B.....   | 14 |
| 2.2.3 Streptokoky skupiny C (GCS) .....  | 14 |
| 2.2.4 Streptokoky skupiny G (GGS) .....  | 15 |
| 2.2.5 Streptokoky skupiny D (Enterokoky) .....   | 15 |
| 2.2.1 Streptokoky skupiny F .....  | 15 |
| 3 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....  | 16 |
| 3.1 Historie.....  | 16 |
| 3.2 Taxonomie a identifikace.....  | 16 |
| 3.3 Toxiny a faktory virulence .....   | 16 |
| 3.4 Fyziologie a patogenita .....  | 17 |
| 3.5 Antibiotická citlivost a rezistence .....  | 18 |
| 4 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....  | 19 |
| 4.1 Historie.....  | 19 |
| 4.2 Fyziologie a patogenita .....  | 19 |
| 4.3 Regulační faktory patogeneze .....   | 20 |
| 4.3.1 Faktory virulence .....  | 20 |
| 4.3.2 Rezistence k antimikrobiálním peptidům hostitele .....                             | 21 |
| 4.4 Antibiotická citlivost a rezistence .....  | 21 |
| 5 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> .....  | 22 |
| 5.1 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> (SDSE) .....               | 22 |
| 5.2 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i> (SDSD).....               | 23 |
| 6 <i>Streptococcus canis</i> .....   | 23 |
| 6.1 Historie.....  | 23 |
| 6.2 Fyziologie a patogenita .....  | 23 |
| 6.3 Virulenční faktory .....   | 24 |
| 7 <i>Streptococcus equi</i> .....  | 24 |
| 7.1 <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> ( <i>S. zooepidemicus</i> )..... | 24 |
| 7.2 <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i> ( <i>S. equi</i> ).....                   | 25 |
| 8 <i>Streptococcus anginosus</i> skupina.....  | 25 |
| 9 <i>Streptococcus porcinus</i> .....  | 26 |
| 10 <i>Streptococcus iniae</i> .....  | 26 |
| 11 <i>Streptococcus phoaciae</i> .....   | 27 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 12      | <i>Streptococcus didelphis</i> .....  | 27 |
| 13      | Antibiotika.....  | 27 |
| 13.1    | Historie, současnost a budoucnost vývoje antibiotik .....   | 28 |
| 13.2    | Antibiotika využívaná pro léčbu streptokokových infekcí.....  | 28 |
| 13.2.1  | Peniciliny.....   | 29 |
| 13.2.2  | Cefalosporiny .....   | 30 |
| 13.2.3  | Karbapenemy .....   | 30 |
| 13.2.4  | Aminoglykosidy.....   | 31 |
| 13.2.5  | Glykopeptidy.....   | 31 |
| 13.2.6  | Chinolony .....   | 31 |
| 13.2.7  | Polypeptidy .....   | 32 |
| 13.2.8  | Amfenikoly .....  | 32 |
| 13.2.9  | Linkosamidy.....  | 32 |
| 13.2.10 | Makrolidy .....   | 32 |
| 13.2.11 | Tetracykliny .....  | 33 |
| 14      | Materiál a metody.....  | 35 |
| 14.1    | Biologický materiál.....  | 35 |
| 14.2    | Chemikálie a roztoky .....  | 35 |
| 14.3    | Kultivační půdy.....  | 35 |
| 14.4    | Přístroje a další materiál.....   | 35 |
| 14.5    | Metody vyhodnocování.....   | 36 |
| 14.5.1  | Kultivace a identifikace bakterií z rodu <i>Streptococcus</i> .....   | 36 |
| 14.5.2  | Druhová identifikace bakterií metodou MALDI-TOF MS .....  | 38 |
| 14.5.3  | Stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám diskovou difuzní<br>metodou .....                           | 38 |
| 15      | Výsledky.....   | 40 |
| 15.1    | Změny prevalencí výskytu betahemolytických streptokoků u animálních hostitelů....                                   | 40 |
| 15.2    | Změny antimikrobiálních citlivostí betahemolytických streptokoků u animálních<br>pacientů v letech 2013-2018 .....  | 45 |
| 15.3    | Porovnání spolehlivosti antimikrobiálních citlivostí stanovených na základě velkého a<br>malého seskupení dat ..... | 48 |
| 15.4    | Vyhodnocení změn prevalencí betahemolytických streptokoků z humánních hostitelů..<br>.....                          | 52 |
| 16      | Diskuse .....   | 58 |
| 17      | Závěr.....  | 63 |
| 18      | Seznam literatury.....  | 65 |
| 19      | Přílohy .....   | 75 |

## Seznam použitých zkratek

|           |   |
|-----------|---|
| AMC       | Amoxycilin klavulanát                                     |
| AMI       | Amikacin  |
| AMP       | Ampicilin   |
| AMPs      | Antimikrobiální peptidy                                   |
| AMR       | Antimikrobiální rezistence                                |
| ASO/STLS  | Anti-streptolysin   |
| BA        | Bacitracin  |
| CEF       | Cefalotin   |
| CHL       | Chloramfenikol  |
| CLI       | Klindamycin   |
| COT       | Kotrimoxazol  |
| EDW       | Edwardsův agar  |
| ENR       | Enrofloxacin  |
| ERY       | Erytromycin   |
| FQ        | Fluorochinony   |
| GAS       | Skupina A streptokoků                                     |
| GBS       | Skupina B streptokoků                                     |
| GCS       | Skupina C streptokoků                                     |
| GEN       | Gentamicin  |
| HK        | Histidin kináza   |
| IS        | Imunitní systém   |
| MIC       | Minimální inhibiční koncentrace                           |
| MRSA      | Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>       |
| PBP       | Penicilin vazebný protein (Penicillin Binding Protein)    |
| PI        | Pyogenní infekce  |
| ROS       | Reaktivní sloučeniny kyslíku                              |
| RR        | Regulátor odpovědi  |
| SDSE      | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> spp. <i>equisimilis</i> |
| SLO       | Streptolysin O  |
| SLS       | Streptolysin S  |
| SMG       | <i>Streptococcus milleri</i> group                        |
| SOF       | Serum opacity factor                                      |
| Spe       | Streptokokové pyrogenní exotoxiny                         |
| STLS/ ASO | Anti-streptolysin   |
| STS       | Signální transdukční systém                               |
| TCS       | Dvoukomponentový systém                                   |



TET

Tetracyklin

VP test

Voges-Proskauerův test

# **Teoretická část**

## 1 Úvod do problematiky a cíle práce

Rod *Streptococcus* (ze dvou řeckých slov *streptos* = řetěz, *kokhos* = kulovitý) náleží do čeledi *Streptococcales* (Carroll a kol., 2013). Jedná se o fakultativně anaerobní grampozitivní mikroorganismy, které se dělí do několika skupin na základě svých rozmanitých vlastností. Pro klinické mikrobiology je užitečné dělení streptokoků dle hemolýzy. Takto jsou rozeznávány hemolýzy alfa, beta a gama. Další často užívanou klasifikací je sérologické rozdělení dle Lancefieldové na základě specifických antigenů do skupin A-H a K-U. Avšak zanedbatelnými způsoby rozdělení nejsou ani použití biochemických reakcí, nebo rozdělení dle antigenní specifity kapsulárních polysacharidů.

Rod *Streptococcus* má široké rozšíření napříč humánní i veterinární sférou (Facklam, 2002; Ferretti, 2016; Reglinski, 2015). Mnohé druhy jsou oportunními příslušníky fyziologické mikroflóry sliznic lidí i zvířat, avšak vyskytují se i obligátně patogenní druhy způsobující lokalizované hnisavé infekce, invazivní až toxická onemocnění, která často zanechávají trvalé následky v hostitelském organismu. Důležité je zdůraznit, že výskyt a případná patogenita konkrétních druhů streptokoků se liší v závislosti na druhu i na hostiteli. Klíčovým prostředkem pro boj s patogenními streptokoky je antibiotická léčba, která se stává stále komplikovanější díky stoupajícím rezistencím. Na vzniku rezistentních, popřípadě multirezistentních mikroorganismů se z velké části podílí i globálně nadměrné užívání širokospektrálních antibiotik.

Z celého rodu streptokoků se tato diplomová práce zabývá pouze betahemolytickými streptokoky, mezi které v humánní medicíně patří především druhy *S. pyogenes* a *S. agalactiae* (Reglinski, 2015). Dále jsou pro člověka patogenní *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *S. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* a jednotlivé kmeny *S. anginosus*, dále *S. equi* spp. *zooepidemicus*, *S. canis*, *S. porcinus* a *S. iniae*, které jsou zejména zvířecími patogeny, ale mohou způsobit onemocnění i u lidí. Mezi čistě animální patogeny se řadí *S. equi* spp. *equi*, *S. phoaciae* a *S. didelphis*.

### Cíle práce:

- Vypracování literární rešerše na téma betahemolytické streptokoky u zvířat a lidí
- Změna prevalence výskytu a citlivosti na antimikrobiální látky jednotlivých druhů betahemolytických streptokoků izolovaných na Státním veterinárním ústavu v Olomouci
- Porovnání citlivosti na antimikrobiální látky mezi malým a velkým seskupením dat
- Změna prevalence výskytu jednotlivých druhů betahemolytických streptokoků izolovaných na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého

## 2 Diferenciace streptokoků

Klasifikace streptokoků je založena na sérii pozorování a experimentů v průběhu více než jednoho století. Nabízí se čtyři hlavní způsoby diferenciace.

## 2.1 Dle typu hemolýzy

V praxi je nejvýznamnějším typem dělení dle hemolýzy, kterou mikroorganismy vytvářejí během kultivace na krevním agaru. Krevní agar byl poprvé představen v roce 1903 Hugem Schotmullerem, kdy byly na agaru pozorovány dva typy hemolýzy (Becker, 1916; Reglinski, 2015; Schotmuller, 1903). První formou byla čirá zóna okolo kolonie, a první druh streptokoka tak byl pojmenován *Streptococcus haemolyticus*. Druhou formou byla zelenkavá drobná zóna v okolí kolonie, která byla označena podle prvního streptokoka, který tuto hemolýzu tvořil. Byl nazván *Streptococcus viridans* (dnes *Aerococcus viridans*). O pár let později byly streptokoky rozděleny na základě hemolýzy do tří skupin, tohle rozdělení je používáno až do současnosti. Dnes tedy streptokoky dělíme na streptokoky s hemolýzou typu alfa, beta nebo gama (Tab. 1).

Hemolýza je jev, kdy dochází činností hemolysinu k destrukci červených krvinek a hemoglobin se uvolňuje do okolního média, nebo je metabolizován. Řada streptokoků je schopná hemolyzovat červené krvinky *in vitro* v různých formách (Obr. 1).

**Tab. 1:** Rozdělení streptokoků dle typu hemolýzy.  $\alpha$  - alfahemolytické streptokoky;  $\gamma$  - gamahemolytické/ nonhemolytické streptokoky, upraveno dle (Chhatwal, 2017).

| Betahemolytické streptokoky  |  | Nonbetahemolytické streptokoky                              |  |
|--|--|---|--|
|  |  | Viridující streptokoky                                      |  |
| <i>S. pyogenes</i>   | <i>S. pneumoniae</i> <sup><math>\alpha</math></sup>  | Mutans group <sup><math>\alpha,\gamma</math></sup>          | Salivarius group <sup><math>\alpha,\gamma</math></sup> |
| <i>S. agalactiae</i>   | <i>S. suis</i> <sup><math>\alpha,\gamma</math></sup> | <i>S. mutans</i>  | <i>S. salivarius</i>                                   |
| <i>S. canis</i>  |  | <i>S. sobrinus</i>  | <i>S. thermophilus</i>                                 |
| <i>S. porcinus</i>   | Bovis group <sup><math>\gamma</math></sup>           | <i>S. rattii</i>  | <i>S. vestibularis</i>                                 |
| <i>S. iniae</i>  | <i>S. bovis</i>                                      | <i>S. cricetus</i>  |  |
| <i>S. phocae</i>   | <i>S. equinus</i>                                    |   | Mitis group <sup><math>\alpha,\gamma</math></sup>      |
| <i>S. didelphis</i>  | <i>S. gallolyticus</i>                               | Anginosus group <sup><math>\alpha,\beta,\gamma</math></sup> | <i>S. oralis</i>                                       |
| <i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i> <sup><math>\alpha</math></sup> |  | <i>S. anginosus</i>   | <i>S. mitis</i>  |
| <i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i>                                 |  | <i>S. constellatus</i>                                      | <i>S. cristatus</i>                                    |
| <i>S. equi</i> ssp. <i>equi</i>  |  | <i>S. intermedius</i>                                       | <i>S. gordonii</i>                                     |
| <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>                                     |  |   | <i>S. sanguinis</i>                                    |
| <i>S. anginosus</i> group ( <i>S. milleri</i> )                                |  |   | <i>S. parasanguinis</i>                                |
|  |  |   | <i>S. infantis</i>                                     |

Alfahemolytické streptokoky mají za důsledek nekompletní neboli částečnou lýzi erytrocytů s redukcí hemoglobinu za tvorby zeleného pigmentu (verdoglobinu). Bakterie z této skupiny produkují také peroxid vodíku, který způsobuje oxidaci hemoglobinu za produkce jeho hnědavého derivátu methemoglobinu.

Betahemolytické bakterie způsobují destrukci erytrocytů a odbarvení agaru v okolí porostu (Carroll a kol., 2013; Reglinski, 2015). Pokud dojde zároveň i k úplnému projasnění půdy v okolí kolonií, označujeme tento typ hemolýzy jako úplnou. V případě, že je půda v zóně hemolýzy zakalená, nazývá se tato betahemolýza jako neúplná. Exotoxin Streptolysin, který je zodpovědný za

lýzi membrán erytrocytů a také destrukci dalších různých typů buněk, se dělí na dva typy. Streptolysin O (SLO) je oxygen-labilním typem, který zodpovídá za viditelnou hloubkovou hemolýzu na plotnách krevního agaru. SLO je nejvíce secernovaný skupinou A streptokoků (GAS) a také druhem *S. dysgalactiae*. V reakci na vzniklý SLO vzniká v lidském těle protilátka anti-streptolysin O (ASO, STLS) (Wessels, 2005). Sérologické měření titru ASO je vhodným indikátorem post-infekčních syndromů akutní revmatické horečky nebo streptokokové glomerulonefritidy (Steer a kol., 2009). Druhým typem přítomného exotoxinu je oxygen-stabilní Streptolysin S (SLS) o velikosti 2,8 kDa. SLS způsobuje vznik hemolytických zón v okolí kolonií na povrchu ploten s krevním agarem a podílí se na patogenezi inhibicí imunitní odpovědi hostitelského organismu během prvotní fáze infekce.

Ostatní streptokoky netvoří hemolýzu, krevní agar tedy zůstává v okolí jejich kolonií beze změny barvy. Tyto mikroorganismy jsou označovány jako nonhemolytické neboli gamahemolytické. V této skupině se vyskytují především streptokoci orální, kteří jsou součástí orální fyziologické flóry a horních cest dýchacích.



**Obr. 1: Typy hemolýzy u streptokoků na krevním agaru, foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.** Popis obrázků zleva: alfa-hemolýza způsobena činností *S. pneumoniae*, beta-hemolýza způsobená *S. canis*, gamahemolýza způsobená enterokoky.

## 2.2 Klasifikace dle Lancefieldové

Jedná se o sérologické rozdělení beta-hemolytických streptokoků na základě specifických antigenů do skupin A-H a K-U (Lancefield, 1928). V následujícím výčtu budou zmíněny pouze skupiny s nejčastějším výskytem (Tab. 2).

### 2.2.1 Streptokoky skupiny A

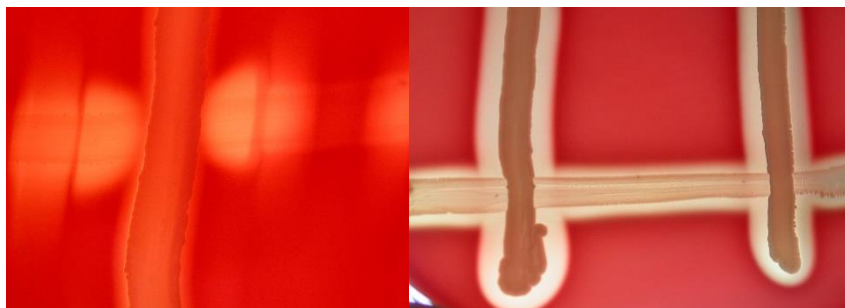
Identifikace této skupiny je potvrzena přítomností antigenem skupiny A v buněčné stěně bakterie (Murray a kol., 2003). Hlavním představitelem této skupiny je *Streptococcus pyogenes* (GAS), jehož všechny poddruhy obsahují antigen skupiny A. Antigen A je vysoce konzervovaný povrchově exprimovaný polysacharid, který je tvořen především N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminem, který je navázán na řetězec polyramnosy (Reglinski, 2015). Avšak tento antigen se může vyskytovat i napříč jinými druhy (*S. anginosus*, *S. dysgalactiae ssp. equisimilis*). Bakterie z této skupiny vyvolávají tzv. Group A specific streptococcal infections. Na krevním agaru *S. pyogenes* rostou jako malé, kulovité kolonie

o velikosti 0,5 cm v průměru s typickou širokou betahemolýzou v jejím okolí o velikosti 1 cm v průměru.

Bacitracinový test citlivosti se používá k odlišení GAS od dalších grampozitivních bakterií. Bacitracin (BA) je polypeptidové antibiotikum ovlivňující syntézu peptidoglykanu v buněčné stěně. Principem testu je použití antimikrobiálních disků BA o malé koncentraci (0,04 U2) na agarové plotně. GAS bakterie jsou tímto malým množstvím inhibovány, jsou citlivé, ostatní betahemolytické streptokoky jsou často rezistentní (Ferreti, 2016).

### 2.2.2 Streptokoky skupiny B

Skupina B (GBS) dle Lancefieldové je také známa jako *Streptococcus agalactiae* (Carroll a kol., 2013). Obdobně jako u předešlé skupiny je identifikace potvrzena přítomností antigenů skupiny B v buněčné stěně streptokoka. Antigeny skupiny B jsou přítomny pouze u výše zmíněného druhu, *S. agalactiae*, a proto je toto pojmenování synonymem pro celou skupinu. Už vizuálně jsou streptokoky této skupiny rozlišitelné od skupiny A, jejich typická hemolýza přesahuje velikost kolonie jen o 1-2 mm v průměru. Streptokoky skupiny B mají schopnost hydrolyzovat hippurát sodný a dávají pozitivní reakci CAMP testu. CAMP je akronymem pro Christie, Atkins, Munch-Peterson, kteří objevili výše zmíněný jev (Phillips, 1980). Tento test slouží k identifikaci betahemolytických streptokoků skupiny B na základě produkce CAMP faktoru, který zvětšuje plochu hemolýzy tvořenou  $\beta$ -hemolysinem bakterie *Staphylococcus aureus*. V přítomnosti *S. agalactiae* (GBS) dojde k synergnímu účinku CAMP faktoru a  $\beta$ -hemolysinu, které se projevuje projasněním agarů ve tvaru mašličky v místě interakce (Obr. 2).



**Obr. 2: CAMP test (foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Phd.).** Popis obrázku zleva: pozitivní reakce, lze vidět tvar mašličky (motýla) v místě interakce s betatoxinem *S. aureus*; negativní reakce.

### 2.2.3 Streptokoky skupiny C (GCS)

Pro zástupce této skupiny není jednoznačný identifikační test. Za typického zástupce se považuje *Streptococcus equi* a všechny jeho poddruhy (Harrington, 2002). Jednotliví zástupci této skupiny se často zároveň řadí i do skupiny G. Jedním z důvodů je, že žádný ze streptokoků není identifikován pouze na základě exprimovaných antigenů skupiny C nebo G (Wessels, 2020). Dalším důvodem jsou změny v taxonomii organismů v průběhu let. Na začátku 30. let minulého století byl zařazen *S. equisimilis* jako betahemolytický streptokok do skupiny C, obdobně jako *S. dysgalactiae* izolovaný z krav. V 80. letech byly na základě studií DNA homologií určeny oba druhy. Roku 1996 byly tyto

druhy na základě DNA analýzy rozděleny do dvou poddruhů – *S. dysgalactiae ssp. equisimilis* (SDSE), patřící do skupiny C a G a *S. dysgalactiae ssp. dysgalactiae*, který přísluší do skupiny C a L dle Lancefieldové (Vandamme, 1996).

#### 2.2.4 Streptokoky skupiny G (GGS)

Skupina těchto organismů nemá žádné specifické taxonomické označení, obecně se nazývají Streptokoky skupiny G dle Lancefieldové (GGS). Vzhledem k provázanosti s GCS je ve výčetním seznamu vložena GGC bezprostředně za ni. Do GGS se z části řadí *S. dysgalactiae ssp. equisimilis* (viz 2.2.3 a 5.1). Jediným zástupcem obsahující pouze antigeny skupiny G je *Streptococcus canis*, který se vyskytuje především u psů, ale byl mapován i u jiných vyšších organismů (skot, kočky i lidé) jako patogen (Lacave a kol., 2016).

#### 2.2.5 Streptokoky skupiny D (Enterokoky)

Velké množství streptokoků z této skupiny bylo reklasifikováno a přemístěno do rodu *Enterococcus* (Köhler, 2007). Například původní *Streptococcus faecalis* byl přejmenován na *Enterococcus faecalis*. Poslední dva druhy spadající do skupiny D jsou *Streptococcus bovis* a současně splynuly v jeden druh, a to *Streptococcus equinus*.

#### 2.2.1 Streptokoky skupiny F

Poprvé byla tato skupina popsána roku 1934 jako „minute haemolytic streptococci“ (Stratton, 2018). V literatuře je možné se setkat s různými synonymními označeními pro tuto skupinu např. *Streptococcus milleri* group (SMG), nebo *Streptococcus anginosus* group (SAG) (Baracco, 2019).

**Tab. 2: Identifikace betahemolytických streptokoků.** Zařazení kmenů do skupin a reakce na biochemické testy. Bac, reakce na bacitracin, citlivý (+), rezistentní (-); NaCl, růst kolonií při koncentraci 6,5 % NaCl; PYR, pyrrolidonylarylmidasová reakce; CAMP, CAMP reakce; VP, Voges-Proskauerova reakce; Hip, hydrolyza hippurátu; Arg, hydrolyza argininu; Esc, hydrolyza eskulinu; Sbl, Tre, Rib, schopnost fermentace sorbitolu, trehalosy a ribosy; Škr, hydrolyza škrobu. +, pozitivní reakce; - negativní reakce; v, variabilní reakce; x, neaplikovatelné. Upraveno dle: Facklam, 2002; Murray, 2003; Reglinski, 2015.

| Kmen  | Skupinadle Lancefieldové | Bac | NaCl | PYR | CAMP | VP | Hip | Arg | Esc | Sbl | Tre | Rib | Škr |
|---|--------------------------|-----|------|-----|------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>S. pyogenes</i>                                | A                        | +   | +    | +   | -    | -  | -   | +   | v   | -   | x   | -   | -   |
| <i>S. agalactiae</i>                              | B                        | -   | +    | -   | +    | -  | +   | +   | -   | -   | x   | x   | -   |
| <i>S. dysgalactiae</i>                            |                          |     |      |     |      |    |     |     |     |     |     |     |     |
| ssp. <i>dysgalactiae</i>                          | C, L                     | -   | +    | -   | -    | -  | -   | +   | v   | v   | +   | +   | -   |
| ssp. <i>equisimilis</i>                           | A, C, G                  | v   | +    | -   | -    | -  | -   | +   | v   | -   | +   | +   | v   |
| <i>S. canis</i>                                   | G                        | -   | +    |     | v    | -  | -   | +   | +   | -   | v   | x   | -   |
| <i>S. equi</i>                                    |                          |     |      |     |      |    |     |     |     |     |     |     |     |
| ssp. <i>equi</i>                                  | C                        | -   | +    | -   | -    | -  | -   | +   | v   | -   | -   | x   | +   |
| ssp. <i>zooepidemicus</i>                         | C                        | -   | +    | -   | -    | -  | -   | +   | v   | +   | v   | x   | +   |
| <i>S. anginosus</i> skupina ( <i>S. milleri</i> ) | A, C, G, F, -            | -   | -    | -   | -    | +  | -   | +   | +   | -   | +   | x   | -   |
| <i>S. porcinus</i>                                | E, P, U, V, -            | -   | +    | +   | +    | -  | v   | +   | +   | +   | +   | +   | -   |
| <i>S. iniae</i>                                   | -                        | -   |      | +   | +    | -  | -   | -   | +   | -   | x   | x   | +   |
| <i>S. phoaciae</i>                                | C, F, -                  | +   | +    | -   | -    | -  | -   | -   | -   | -   | -   | x   | -   |
| <i>S. didelphis</i>                               | -                        | -   |      | -   | -    | -  | -   | +   | -   | -   | +   | x   | -   |

Zástupci této skupiny jsou velmi variabilní v produkci hemolýzy, tvoří všechny tři typy. Jejich kolonie jsou drobné, v průměru menší než 0,5 mm. *Streptococcus anginosus* reaguje s antigeny skupiny A, C, F a G, avšak největší množství kmenů reaguje pouze s antigenem skupiny F. Kmeny z této skupiny mají, jakožto jediné betahemolytické kmeny, pozitivní reakci na Voges-Proskauerův test (VP test) (Barry, 1967). Dalšími zástupci této skupiny jsou *S. intermedius* a *S. constellatus*.

### **3 Streptococcus pyogenes**

#### **3.1 Historie**

První identifikovaná streptokoková infekce je datována k roku 1864, kdy rakouský chirurg Theodor Billroth popsal výskyt drobných organismů (Kettenkokken) u erysipelu a infikovaných ran (Billroth, 1874; Ferreti 2016). Tyto organismy pozoroval v párovém nebo řetězovém uspořádání. Průlomový objev a vstup streptokoků do historie nastal v roce 1879, kdy Louis Pasteur izoloval mikroorganismy z dělohy a krve ženy trpící poporodní horečkou (Pasteur, 1879). Následně dokázal, že tato bakterie je zodpovědná za onemocnění s největší mortalitou u rodiček a novorozenců té doby. O pár let později, roku 1884, izoloval Griedrich J. Rosenbach bakterii z hnisavé léze a zdokonalil pojmenování druhu na *Streptococcus pyogenes* (Rosenbach, 1884). Výzkumy následujících let nevykazovaly odchylky ve vlastnostech těchto streptokoků izolovaných z různých chorob, tak bylo ustanoveno jednotné druhové pojmenování *Streptococcus pyogenes*, namísto individuálních druhových názvů *pyogenes*, *eryspaltis*, *scarlatinae*, a *puerperalis* (Evans, 1936).

#### **3.2 Taxonomie a identifikace**

Na základě taxonomického zařazení, které bylo zmíněno výše, *S. pyogenes* spadá mezi GAS (Bessen, 2009; Reglinski, 2015). Izoláty GAS jsou dále rozděleny na základě antigenních struktur na povrchu M proteinu. M protein je hlavním faktorem virulence *S. pyogenes*. K dnešní době je známo přes 80 imunologicky odlišných sérotypů. Modernizace zařízení využívá k typizaci technologie sekvenování, kdy je sekvenován 5' konec M proteinu (*emm*) genu. Dalším pomocníkem při serotypizaci jsou typy T a SOF (Serum opacity factor).

Identifikace GAS může být dosaženo několika způsoby. Navzdory vzrůstající dostupnosti kitů detekujících povrchové antigeny streptokoků, zůstává zlatým standardem kultivace a zařazení do skupiny dle Lancefieldové. Identifikace se provádí podle hemolytických vlastností na krevním agaru a pozitivní reakce na BA test citlivosti.

#### **3.3 Toxiny a faktory virulence**

Buňky *S. pyogenes* produkují více než 20 exotoxinů, které se podílejí na vzniku infekce a hrají důležitou roli především v pozdních fázích infekce, např. při vzniku syndromu toxického šoku (viz 3.4) (Carroll a kol., 2013; Reglinski, 2015). Nejvýznamnější z těchto toxinů jsou následující příklady:



**M protein** jakožto hlavní virulenční faktor, který je přítomný ve všech GAS izolátech. V návaznosti na něj, existují v buněčné stěně GAS další proteiny, které slouží k obraně před protilátkovou odpovědí. Tyto streptokokové ochranné antigeny (*angl. The streptococcal protective antigens*) (SPA) se spolupodílejí na blokaci likvidace infekce způsobené GAS pomocí fagocytózy.

**Streptokinasa (fibrolysin)** je produkován vícero zástupci skupiny A betahemolytických streptokoků. Důsledkem činnosti těchto bakterií dochází k transformaci plasminogenu na plasmin. Plasmin, jakožto aktivní proteolytický enzym, zpracovává fibrin a jiné proteiny a dovoluje bakterii rozpustit krevní sraženinu. Působí na komplementový systém, uvolňuje chemotaktické faktory a aktivuje kininové systémy, které napomáhají šíření streptokokové infekce ve tkáni.

**Deoxyribonukleasa** degraduje deoxyribonukleovou kyselinu z rozpadajících se buněk. Jsou známy čtyři její typy A, B, C a D. Směs streptokinasy a deoxyribonukleasy slouží k enzymatickému odstranění infikované tkáně, díky čemuž je výrazně zlepšen mimo jiné i účinek antibiotické léčby.

**Hyaluronidasy** jsou antigenní a specifické enzymy, které štěpí kyselinu hyaluronovou a usnadňují vstup streptokoků tkáni. Bezprostředně po infekci jsou tyto antigeny detekovatelné v séru.

**Pyrogenní exotoxiny** jsou produkovány *S. pyogenes*. Jedná se o tři antigenně odlišné streptokokové pyrogenní exotoxiny (Spe) A, B a C (Papageorgiou, 1999). Streptokokové pyrogenní toxiny jsou spojovány se syndromem toxického šoku a spálou. Nejvíce prostudovaným exotoxinem je superantigen SpeA, který vyvolává zánět nespecifickou aktivací imunitní odpovědi (především T lymfocyty) a zajišťuje produkci zánětlivých cytokinů. SpeB je silná proteáza zasahující do procesu fagocytózy. SpeC je kódován fágem a podílí se také na syndromu toxického šoku. Funkce hemolysinů byla zmíněna už výše (viz 2.1)

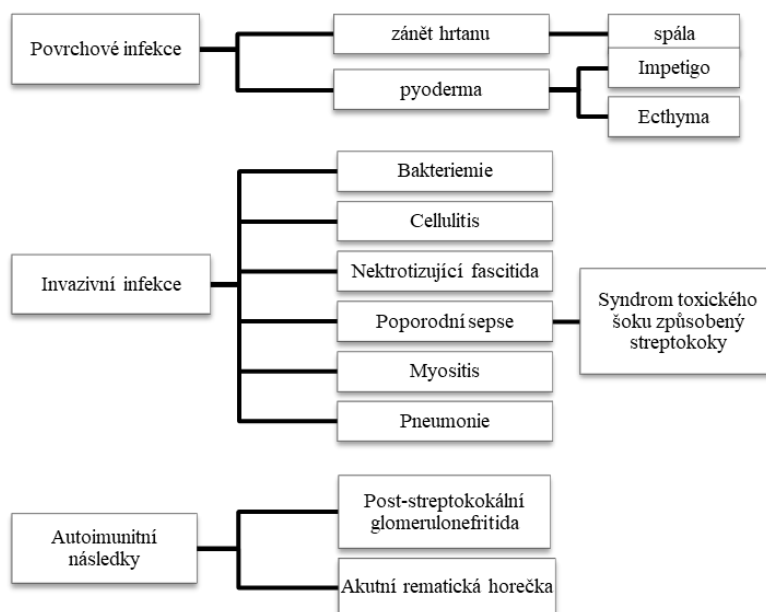
### 3.4 Fyziologie a patogenita

GAS organismy jsou schopny přetrvávat *ex vivo* pouze limitovanou dobu (Bessen, 2009; Reglinski, 2015). *Streptococcus pyogenes* je sice živoucím organismem, avšak jeho ekologická nika je velmi limitovaná. *Streptococcus pyogenes* se humánně šíří přímo z hostitele kapénkovou infekcí nebo přímým kontaktem s hostitelem (Spickler, 2005). Především u malých dětí je typické bezpříznakové nosičství. K bakteriálnímu přenosu mezi člověkem a zvířetem dochází velmi zřídka. Zoonotická nákaza je téměř vyloučena.

Z těchto důvodů je znám především jako patogen člověka, avšak byly pozorovány případy jeho patogenity u animálních hostitelů: skotu, ovcí, králíků, psů a koček (Falck, 1997; Spickler, 2005; Sprot, 2012; Vela a kol., 2017). Případ u ovce byl ojedinělý, patogen byl izolován z kožního abscesu. Patogenní GAS byly u králíků izolovány např. z pneumonií, kožních onemocnění, abscesů i metritid. U psů a koček se vždy jednalo o záněty spojivek, v těchto případech se vyskytoval patogen obvykle

i u majitelů zvířat. *S. pyogenes* může být do těla skotu zavlečen díky špatným hygienickým návykům dojičů při dojení, mohou tak být i příčinou vzniku mastitid.

U člověka *S. pyogenes* způsobuje obvykle záněty hrtanu a kožní onemocnění (Chhatwal, 2017). Povrchové streptokokové infekce jsou nepříliš závažná onemocnění, obdobně jako zánět hrtanu. Daleko závažnější onemocnění s větší úmrtností jsou invazivní infekce a autoimunitní onemocnění, které se v porovnání s povrchovými infekcemi, vyskytují u lidí ve značně menší míře. Invazivní onemocnění bývají důsledkem poškození hlubokých tkání hostitele a mohou způsobovat závažné důsledky, jako je např. syndrom toxického šoku (Obr. 3).



Obr. 3: Rozdělení onemocnění způsobených GAS, upraveno dle (Reglinski, 2015).

### 3.5 Antibiotická citlivost a rezistence

První volbou při léčení respiračních onemocnění způsobených GAS jsou  $\beta$ -laktamová antibiotika, zejména peniciliny (Bessen, 2009; Horn a kol, 1998 Lu a kol, 2017). Rezistence k  $\beta$ -laktamům není u *S. pyogenes* častá, zřejmě kvůli nepřítomnosti plasmidu obsahující gen  $\beta$ -laktamasu, nebo díky mutacím proteinů v buněčné stěně, které způsobují menší afinitu bakteriální buňky k penicilinu. V případě hypersensitivity pacienta na  $\beta$ -laktamy, opakujícího se onemocnění nebo selhání předchozí léčby bývají alternativně pro léčbu použity makrolidy a linkosamidy, avšak i rezistence k těmto antibiotikům v průběhu let rapidně vzrůstá (Ayer a kol., 2007; Silva-Costa, 2015). Celosvětově je prokázána korelace mezi konzumací makrolidů a rezistencí *S. pyogenes*. Exemplárním případem je tříletá studie z Pittsburgu, kde 100% izolátů *S.pyogenes* bylo citlivých na makrolidy, avšak po 3 letech stoupla i rezistence k makrolidům na 48%, vždy se jednalo o M6 izoláty (Facklam, 2002). Některé z těchto izolátů byly také rezistentní k fluorochinolonům.

Po dobu sedmi let probíhala v Číně rozsáhlá studie zabývající se antibiotickou rezistencí *S. pyogenes*. Ve většině případů byly kmeny citlivé k penicilinu, ampicilinu, cefotaximu

a vankomycinu, avšak z velké části byly rezistentní k erytromycinu, klindamycinu a tetracyklinu (Lu, 2017).

## **4 *Streptococcus agalactiae***

### **4.1 Historie**

Jak už bylo zmíněno výše, *Streptococcus agalactiae* je jako jediným zástupcem GBS (Dermer, 2004; Nocard, 1887). Tato grampozitivní bakterie byla poprvé popsána v roce 1887 při izolaci z mastitidy skotu. Až do roku 1938 nebyly považovány tyto mikroby za lidské patogeny, než bylo zjištěno, že způsobují onemocnění novorozenců (Fry, 1938). V historii byl rozdělen na základě kapsulárních polysacharidů do devíti sérotypů (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII), desátý sérotyp (IX) byl přidán v roce 2007 (Edwards, 2015; Slotved 2007). Prevalence a distribuce sérotypů se liší dle geografických regionů, etnického obyvatelstva a klinických projevů (Kapatai a kol., 2017). Jednotlivé sérotypy se liší virulentním potenciálem. Například sérotyp III je silně spojený právě s onemocněními novorozenců.

### **4.2 Fyziologie a patogenita**

V průběhu posledních desetiletí se staly patogenem, který způsobuje závažné zdravotní potíže především u novorozenců (Brochet, 2006; Raabe, 2019). Mimo to je komenzálním organismem rozšířeným v lidském organismu, bývá izolován z koncové části gastrointestinálního traktu (GIT), z močopohlavního ústrojí a výjimečně i z horní části respiračního traktu.

Nejběžnější invazivní onemocnění způsobené BGS u dospělých jsou nespecificky lokalizované bakteriemie, které mohou vést u vážnějších případů k endokarditidám (Eskandarian, 2013; Jacson, 2005). Ve 26-45 % případů je mapovaná tzv. polymikrobiální bakteriemie ve společnosti *Staphylococcus aureus* (Edwards, 2015; Sendi, 2008). Mimo jiné tato bakterie způsobuje také záněty kůže a měkkých tkání, které se mohou projevit jako cellulitis, absces, infekce nohou nebo dekubity. Ojedinele byly popsány nekrotizující fasciitida a pyomyositida způsobené *S. agalactiae*.

BGS kolonizují vaginu a rektum u 25 % zdravých žen v porodním věku, u těhotných žen mohou způsobit asymptomatickou bakteriurii, záněty močového traktu, chorioamnionitidu, poporodní endometriózu a bakteriemii (Cho, 2019). Riziko přenosu na dítě vzniká při porodu, kdy může mít za následek závažné infekce jako zánět plic, meningitidu a sepsi novorozenců. V dnešní době lze těmto komplikacím předjet prenatálním vyšetřením výtěru z pochvy. V případě přítomnosti GBS se před porodem aplikují rodičce infuzí antibiotika, nejčastěji ampicilin nebo gentamicin. V současnosti je prevalence invazivních onemocnění způsobených GBS po porodu přibližně 1 z 1000, tedy 0,1 %. V 80. letech minulého století umíralo na následky novorozenecké sepsi 55 % pacientů, avšak vzhledem k dodržování protokolu o prevenci se procento snížilo až na 5 %.

Antigeně odlišný *S. agalactiae* je ve zvířecí říši nejvíce rozšířeným patogenem u skotu (Lyhs, 2016). Vyskytuje na vemenech dojných krav, která jsou současně rezervoárem pro tento kmen a způsobuje mastitidy. Těmto nálezům lze předejít důsledností při dodržování bezpečnostních a desinfekčních protokolů. Ojedinelé případy výskytu byly zaznamenány i u koček, psů, velbloudů, ryb, žab a křečků (Tab. 3) (Ambroski, 1983; Dow 1987; Kornblatt, 1983; Kummeneje, 1975; Lyhs, 2016; Pang, 2017; Robinson, 1966; Younan, 2007).

**Tab. 3: Druhy zvířat, u kterých byla prokázána patogenní přítomnost *Streptococcus agalactiae*.** Historicky byl celosvětově popsán patogenní výskyt u více animálních druhů: skot (1 – Pang, 2017; 2 – Lyhs, 2016;), kočka (3 – Dow, 1987), pes (4 – Kornblatt, 1983), velbloud (5 – Younan, 2007), ryby – Jeleček zlatý (*Notemigonus crysoleucas*) (6- Robinson, 1966), žáby – Skokan volský (*Rana catesbeiana*) (7 – Amroski, 1983) a křečci (8 – Kummeneje, 1975). U každého z vyjmenovaných pacientů způsobovala bakterie odlišná onemocnění.

| Druh zvířete  | Onemocnění  | Lokalita        | Citace |
|---------------|---|-----------------|--------|
| Skot          | mastitida   | celosvětově     | 1, 2   |
| Kočka         | zánět pobřišnice, sepse, placentitida                     | Colorado, USA   | 3      |
| Pes           | septikémie  | -               | 4      |
| Velbloud      | nekróza kůže  | Somálsko        | 5      |
| Jeleček zlatý | léze na dorso-laterální straně těla                       | Arkansas, USA   | 6      |
| Skokan volský | nekrotizující zánět sleziny, hepatitida, renální krvácení | Brazílie        | 7      |
| Křeček        | septikémie, pleuropneumonie                               | Kalifornie, USA | 8      |

### 4.3 Regulační faktory patogenez

#### 4.3.1 Faktory virulence

GBS obsahují nesčetné množství faktorů virulence, které jsou klíčové pro vznik onemocnění (Rajagopal, 2009; Tettelin a kol., 2005). Nejvíce prozkoumanými virulentními faktory jsou toxiny formující póry ( $\beta$ -hemolysin a CAMP faktor) a kapsulární polysacharidy bohaté na sialovou kyselinu (CPS). Deset různých sérotypů bylo zmíněno už výše, avšak na základě genomové analýzy bylo zjištěno, že sérotypy Ia, Ib, II, III a V jsou nejvíce angažovanými v procesu vzniku onemocnění.

Jednou z klíčových vlastností GBS je rychlá adaptace na změny prostředí hostitele, která je zabezpečena dostatečnou expresí faktorů virulence (Tettelin a kol., 2005). Tato exprese je regulovaná signálním transdukčním systémem (STS) a je současně i cílem léčby. Nejběžnějším STS u bakterií je dvoukomponentový systém (TCS), který se skládá z histidin kinázového (HK) membránového receptoru, který rozpoznává externí signály a fosforyluje regulátor odpovědi (RR) v konzervovaném aktivním místě aspartátového residua. V genomu GBS byla zjištěna přítomnost 17-20 TCS, které byly schopny adaptace na vnější podmínky.

GBS kódují také faktory, které zabraňují jejich rozpoznání imunitním systémem (IS) hostitele. V této roli se účastní právě CPS, které zabraňují fagocytóze GBS hostitelským imunitním systémem. Rezistenci k reaktivním sloučeninám kyslíku (ROS) si vyvinula superoxid dismutasa za cílem obrany proti IS. C5a peptidasa je serinová proteáza, která usnadňuje únik IS. Serinová proteasa je schopná rozštěpnout extracelulární matrix fibrinogenu (Harris, 2003).

### 4.3.2 Rezistence k antimikrobiálním peptidům hostitele

Kationové antimikrobiální peptidy (AMP) jsou komponenty vrozené nespecifické imunity bojující proti bakteriálním infekcím (Hancock, 2000). AMP jsou exprimovány epiteliálními buňkami, keratinocyty a leukocyty. Během infekce se přirozeně zvedne hladina AMP v těle hostitele (Peschel, 2002). Nejběžnějším mechanismem rezistence k AMP je snížení náboje na povrchu buňky.

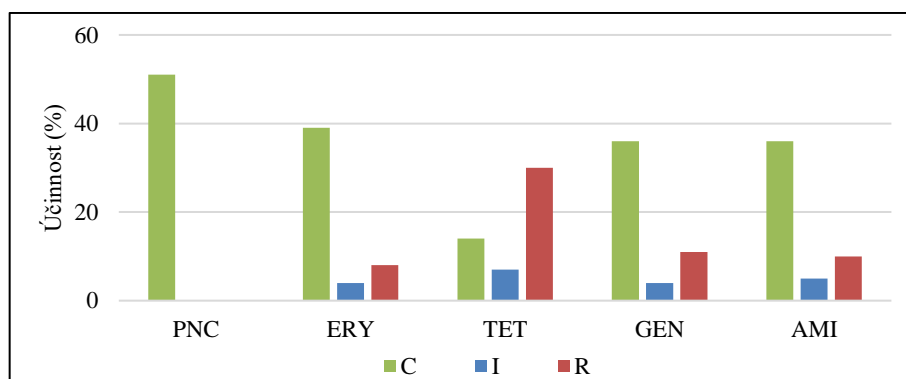
Penicilin vazebné proteiny (PBP) jsou zapojeny v biosyntéze peptidoglykanu a jsou místem, kde účinkují  $\beta$ -laktamová antibiotika (Zapun, 2008). Pili jsou malé přívěšky na povrchu buňky, které se účastní na rezistenci k AMP a podílejí se na adhezenci, tedy uchycení patogenu na hostitelské buňce (Dramsi a kol., 2006).

### 4.4 Antibiotická citlivost a rezistence

*Streptococcus agalactiae* je považován za citlivý *in vitro* k penicilinu. Snížená citlivost k penicilinové léčbě byla detekována u izolátů v Japonsku, ačkoliv penicilin G je nadále používán jako lék první volby při léčbě invazivních onemocnění (Seki, 2015).

Obecně jsou GBS citlivé k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům (ampicilin, karbapenemy a cefalosporiny první, druhé a třetí generace), samozřejmě účinnost jednotlivých antimikrobiálních látek se liší v závislosti na sérotypu (Hawkins, 2017; Hays, 2016; Kimura, 2005; Park, 2014; Piccinelli, 2015; Wehbeh, 2005). V případě alergie na  $\beta$ -laktamovou antibiotickou řadu jsou alternativně používána antibiotika – klindamycin, erytromycin, fluorochinolony a vankomycin. V mnoha studiích v průběhu let bylo zjištěno, že rezistence ke klindamycinu, erytromycinu a fluorochinolonom narůstají, dokonce i rezistence k vankomycinu byla už klinicky potvrzena.

Obdobná odezva na antibiotickou léčbu se uvádí u zvířat (Gao, 2012). První volbou antimikrobní léčby jsou analogicky využity peniciliny. V případě alergické reakce, nebo toxického šoku jsou další volbou antibiotika erytromycin, tetracyklin, gentamicin a amikacin. Účinnost těchto antibiotik při léčbě mastitid byla detailně prozkoumána v roce 2012 (Obr. 4).



**Obr. 4:** Graf účinnosti pěti antibiotik na 51 izolátů *Streptococcus agalactiae* získaných ze skotu, upraveno dle (Gao a spol., 2012). PNC (penicilin), ERY (erytromycin), TET (tetracyklin), GEN (gentamicin), AMI (amikacin). C (citlivý), I (intermediální), R (rezistentní).

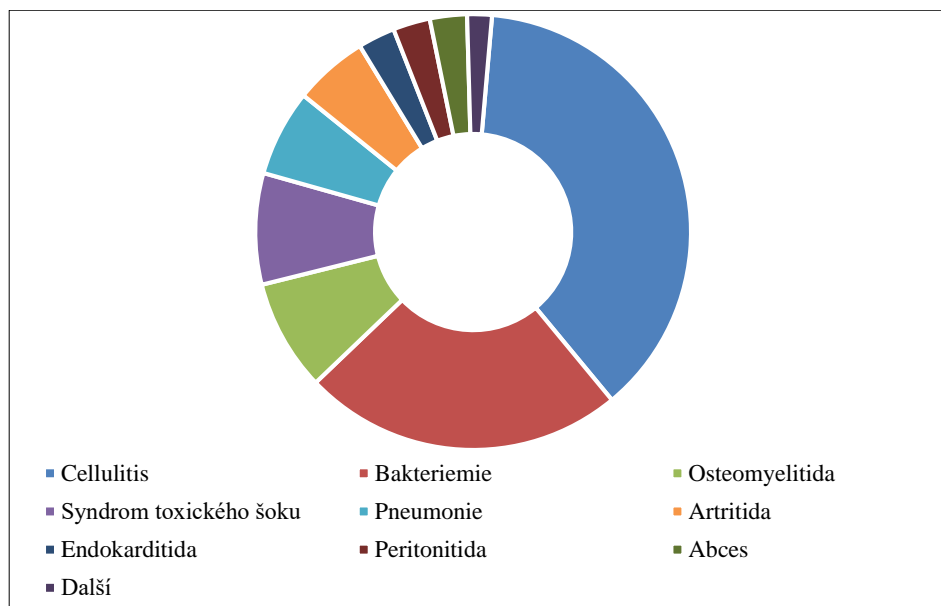
## 5 *Streptococcus dysgalactiae*

Pojmenování *Streptococcus dysgalactiae* bylo prvně použito v roce 1932 při popisování veterinárního patogenu, který způsoboval mastitidy u hovězího dobytka (Dienhofer, 1932; Jensen, 2012). V roce 1936 byl objeven lidský patogen *Streptococcus equisimilis* (Frost, 1940), který také patří mezi GCS. Bohužel z nejasných důvodů nebyly oba názvy zařazeny do Seznamu schválených bakteriálních názvů (The Approved List of Bacterial Names) v roce 1980 (Skerman, 1980). K nápravě došlo o tři roky později, kdy byla provedena revize doprovázená druhovým zařazením DNA-DNA hybridizací a studiem laktát dehydrogenasy. Největší změna v nomenklatuře byla provedena roku 1996, kdy byl kmen *S. dysgalactiae* na základě chemotaxonomických a fenotypických vlastností rozdělen do dvou podkmenů: *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, užívaný pro humánní izoláty, druhým podkmenem byl potom *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* pro animální izoláty (Garvie, 1983; Vandame, 1996).

### 5.1 *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* (SDSE)

SDSE je jedním podkmenem *Streptococcus dysgalactiae*, obsahuje antigeny skupiny C, G, L a výjimečně A (Rantala, 2014; Takahashi, 2011). V minulosti byl považován za nepatogenní mikroorganismus kolonizující horní cesty dýchací, gastrointestinální trakt a ženské pohlavní cesty (Brandt, 2009). Ačkoliv novější studie objasnily fylogenetickou podobnost se *S. pyogenes*, sdílení stejných genů virulence a produkci obdobného spektra infekcí jako jsou tonsilitidy, povrchové kožní infekce a invazivní infekce (Jensen, 2012). Dle americké studie, kdy byly u pacientů mapovány invazivní onemocnění SDSE se nejvíce projevvalo právě jako cellulitis (41 %), dále jako bakteriemie (26 %), osteomyelitida a syndrom toxického šoku (9 %), pneumonie (7 %) artritida (6 %) a další. Bakteriémie způsobené BGS jsou typické pro starší jedince nad 65 let, naopak u dětí se vyskytují jen zřídka (Obr. 5) (Ekelund, 2005).

*S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis* je citlivý na penicilin a další  $\beta$ -laktamová antibiotika (Rantala, 2014). První volbou léčby je Penicilin G, v případě alergie na penicilin je možné použít cefalosporiny druhé a třetí generace, vankomycin a klindamycin. Naopak byla prokázána rezistence na makrolidy v mnoha státech, stejně jako rezistence na erytromycin v 29 % případů v USA. Vyskytovala se také 4 % rezistence na klindamycin a téměř 1 % rezistentních kmenů k fluorochinolonům (Broyles a kol., 2009). V případě výskytu život ohrožujících infekcích se aplikuje synergní kombinace aminoglykosidů a penicilinu.



**Obr. 5: Graf rozložení invazivních onemocnění způsobených kmenem *Streptococcus dysgalactiae* spp. *equisimilis* u lidí, upraveno dle (Broyles 2009).** Studie byla provedena na 212 pacientech, u některých způsoboval SDSE více typů onemocnění. Procentuální zastoupení jednotlivých onemocnění: cellulitis (41 %), bakteriémie (26 %), osteomyelitida (9 %), syndrom toxického šoku (9 %), pneumonie (7 %), artritida (6 %), endokarditida (3 %), peritonitida (3 %), abscesy (3 %) a další onemocnění (empyema, nekróza fascií, meningitida, apendicitida) (2 %).

## 5.2 *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* (SDSD)

SDSD je jedním z poddruhů *Streptococcus dysgalactiae*, který obsahuje antigeny skupiny C (Alves-Barroco, 2019). Jejich přírodním rezervoárem jsou zvířata jako skot a ovce. Převážně způsobují mastitidu skotu a hnisavou artritidu u jehňat, výjimečně způsobují onemocnění u člověka.

## 6 *Streptococcus canis*

### 6.1 Historie

Pojmenování streptokokových kmenů spadajících do skupiny G bylo vždy obtížné a zmatečné. Pojem *Streptococcus canis* bylo poprvé použito v roce 1937 při izolaci kmene ze psiho klinického vzorku a ten byl zařazen do skupiny C dle Lancefieldové, ačkoliv tento kmen vykazoval charakteristickou schopnost fermentace uhlohydrátů, která je typická pro animální kmeny skupiny G (Stafseth, 1937). Od té doby označovali v běžné veterinární praxi izoláty ze psů jako *Streptococcus canis* a zařazovali je mezi GGS (Buxton, 1977).

### 6.2 Fyziologie a patogenita

Tento kmen se vyskytuje především na kůži, horních cestách dýchacích a na pohlavní soustavě psů a v menší míře i u koček (Morrow 2016; Pinho, 2019). *Streptococcus canis* je také známým patogenem těchto zvířecích druhů, který způsobuje kožní a urogenitální infekce, záněty zvukovodu, pneumonii, endokarditidu, septickou artritidu, septikémii, nekrózu fascií a syndrom toxického šoku. Přítomnost *S. canis* byla pozorována i u hospodářských zvířat, např. ve formě mastitid skotu, dále u divokých koček, norků, myší, krys a lišek, a také u vodních savců jako ploutvonožců a vyder.

*S. canis* je také dobře známé zoonotické agens, které u lidí způsobuje infekce kůže a měkkých tkání, bakteriemie a endokarditidy.

### 6.3 Virulenční faktory

Genotypické charakterizace dokázaly příbuznost s dalšími betahemolytickými streptokoky: *Streptococcus pyogenes* (GAS) a *Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis* (SDSE), které spolu sdílí mnoho virulenčních faktorů odpovídajících za patogenitu u lidí (Pinho, 2019; Richards, 2012). M protein kódovaný *emm* genem, který se vyskytuje u GAS a SDSE, nebyl u *S. canis* identifikován nicméně v jeho genomu byla potvrzena přítomnost proteinu podobného M-proteinu, kódovaného *scm* genem, který je pro tento kmen charakteristickým virulenčním faktorem (Yang, 2010). Tento protein byl poprvé popsán v roce 2010 a pojmenován SPASc (*angl. Streptococcal protective antigen of Streptococcus canis*).

Testy citlivosti v České republice v roce 2007 prokázaly, že *S. canis* je citlivý na penicilin G a ampicilin (Lysková, 2007). Nižší citlivost k vankomycinu, klindamycinu, chloramfenikolu a erytromycinu vykazovalo 86 - 90,7 % všech izolátů. Nejvyšší míra rezistence byla pozorována k tetracyklinu (29,8 %). V rámci průzkumu bylo vyšetřeno 394 izolátů. Studie provedená ve Francii ve stejném roce vykazovala senzitivitu k penicilinu G, kromě 7 % izolátů s intermediální odezvou. Všechny izoláty byly citlivé k pristinamycinu a glykopeptidům (Galpérine, 2007). Jeden z kmenů byl rezistentní na gentamicin, taktéž jeden izolát byl rezistentní k rifampinu. Avšak největší míru rezistence (40,7 %) vykazovaly izoláty u tetracyklinu. Studie z roku 2012 prováděná na 30 izolátech prokázala rezistenci ke streptomycinu v 58,6 % případech, tetracyklinu (44,8 %), sulfamethoxazol-trimethoprimu (41,4 %) a spiramycinu (31 %) (Javed, 2016; Milani, 2012).

## 7 *Streptococcus equi*

Již z názvu vyplývá, že tento bakteriální kmen se nejčastěji vyskytuje u koní. Osidluje převážně horní cesty dýchací a způsobuje respirační onemocnění. Tento kmen se běžně přenáší mezi zvířaty, ale je možný i zoonotický přenos na člověka.

### 7.1 *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*)

*Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* je považován na základě DNA hybridizačních studií za předka *Streptococcus equi ssp. equi* (Javed, 2016). Jakožto předchůdce je spojován s rozmanitým spektrem infekcí napříč různými animálními druhy včetně koní, skotu, prasat, ovcí a psů (Pelkonen a kol., 2013). Ovšem s největší frekvencí tento oportunní patogen způsobuje pneumonii, pleuropneumonii koní a endometriózu u klisen (Rasmussen, 2013). Zároveň je zoonotickým patogenem pro osoby, které jsou v kontaktu s koňmi, nebo jiným dobyt看kem. Způsobenými infekcemi jsou právě glomerulonefritida, revmatická horečka, která je především typická pro *S. pyogenes*, dále meningitida a hnisavá artritida (Eyre, 2010; Friedrichs, 2010).



*S. zooepidemicus* sdílí více než 98 % DNA sekvence homologní s *S. equi* a z více než 80 % je homologní DNA i se *S. pyogenes*, největším humánním patogenem ze skupiny streptokoků (Holden a kol., 2009). I přesto, že je považován za oportunního patogena, sdílí důležité faktory virulence s oběma výše zmíněnými druhy, např. M-protein, superantigeny a kapsuli hyaluronové kyseliny u určitých kmenů. U druhu *S. zooepidemicus* je lékem první volby standardně penicilin, u kterého prozatím nebylo dosaženo alarmujících hodnot rezistence (Boyle a kol., 2018). Dále je prokázána citlivost na amoxycilin, rifampicin a streptomycin (Javed, 2016).

## 7.2 *Streptococcus equi* ssp. *equi* (*S. equi*)

Druhým podkmenem je *S. equi* ssp. *equi*. Tento podkmen je oportunní komenzál horních cest dýchacích koní, který podobně jako jeho předchůdce sdílí více než 80 % homologní sekvence DNA se *Streptococcus pyogenes* (Holden, 2009). *Streptococcus equi* ssp. *equi* je zodpovědný za onemocnění hřiběcí nákazou (lat. *adenitis equorum*, angl. *strangles*), akutní nakažlivé onemocnění horních cest dýchacích hřibat, které je charakterizováno pyrexii, hlenohnisavou nasorrhoeou a vznikem abscesů v mandibulárních a retrofaryngeálních mizních uzlinách (White, 2006). *S. equi* je šířen kapénkami nosem, ústy nebo kontaminovanou vodou užitou perorálně. Zajímavostí je, že *S. equi* nepřetrvává pouze na mandlích koní, ale ve výjimečných případech napadá i jiné zvířecí druhy (Ladlow, 2006).

Tak jako mnoho jiných bakterií si i *S. equi* vyvinul velmi sofistikovaný systém pro ochranu před imunitní odpovědí svého hostitele. Vytváří řadu antifagocytárních faktorů, které jsou tvořeny větší vrstvou kyseliny hyaluronové na povrchu bakterie a tím se začnou podobat tkáním svého hostitele. Vyprodukovaná vrstva je v porovnání se *S. zooepidemicus* podstatně silnější.

Citlivost k antimikrobikům je u *S. equi* analogická jako u výše zmíněného předchůdce. Citlivost byla prokázána vůči amoxycilinu, rifampicinu a streptomycinu (Javed, 2016). Avšak antibiotiky první volby jsou peniciliny (Boyle, 2018).

## 8 *Streptococcus anginosus* skupina

Skupina *Streptococcus anginosus* (též známá jako *S. milleri* skupina) je velmi různorodá skupina převážně viridujících streptokoků, do které spadají tři druhy: *S. anginosus*, *S. intermedius* a *S. constellatus*. Druh *S. anginosus* je rozdělen na dva poddruhy: *S. anginosus* ssp. *anginosus* a *S. anginosus* ssp. *whileyi*. Druh *S. constellatus* se dále dělí na tři poddruhy: *S. constellatus* ssp. *constellatus*, *S. constellatus* ssp. *viborgensis* a *S. constellatus* ssp. *pharyngis* (Ruoff, 1988). Tito streptokoci byli poprvé popsáni v roce 1956 při izolaci z dentálního abscesu a byli pojmenováni *Streptococcus milleri* (Guthof, 1956). Obecně mají velmi variabilní produkci hemolýzy (alfa, beta a gamma) i různorodou přítomnost různých antigenů dle Lancefieldové. Označení betahemolytické streptokoky lze použít téměř pro 40 % zástupců *S. constellatus*, a 12 % *S. anginosus* zatímco v případě *S. intermedius* vykazuje betahemolytické vlastnosti pouze 7 % izolátů (Whiley, 1990).

Betahemolytické kmeny *S. constellatus* typicky reagují s protilátkami serologické skupiny F dle Lancefieldové. Pro zbylé kmeny jsou typické protilátky třídy A, C, F a G, avšak kmeny obsahující antigeny skupiny G mohou vykazovat reakci i s jinými aglutinačními séry.

*Streptococcus anginosus* group (SAG) jsou u člověka nejčastější patogenní druhy způsobující pyogenní infekce (PI) s různými klinickými projevy jako např. abscesy, empyémem (nahromadění hnisu v dutinách) nebo infekce v místě chirurgického zákroku (Kobo, 2017). Ve veterinární sféře byla reportována pyodermie (hnis v hlubokých vrstvách kůže) u psa způsobena bakterií *S. constellatus* (De Martino, 2012). Mimo tento ojedinělý výskyt nebyl v dostupné literatuře nalezen jiný záznam. Citlivost na antibiotika v rámci SAG skupiny nevykazuje žádných významných rozdílů u různých izolátů. Byla prokázána citlivost na vankomycin (100 % kmenů), cefepim (100 %), ceftriaxon (100 %) ampicilin (93 %), penicilin (90 %), klindamycin (87 %) a azitromycin (60 % kmenů).

## 9 *Streptococcus porcinus*

*Streptococcus porcinus* byl zařazen do skupiny betahemolytických streptokoků v roce 1984 (Collins, 1984; Duarte, 2005). Tento druh spadá do sérologických skupin E, P, U a V dle Lancefieldové. Jakožto patogenní kmen je s nejčastěji izolovaný z prasat, u kterých způsobuje endokarditidy, sepse, lymfadenitidy a spontánní potraty. Asymptomatická zvířata mohou přenášet organismy na nosní sliznici a na mandlích až po dobu 21 měsíců od počáteční expozice patogenem. *S. porcinus* není striktně animálním patogenem, způsobuje onemocnění i u lidí. V největší míře způsobuje infekce urogenitálního traktu žen, ale byl izolován i z povrchových ran a krve.

Na základě 16 S ribosomálního RNA genového sekvenování byly prokázány rozdíly mezi izoláty *S. porcinus* získanými z lidského a animálního zdroje, ačkoliv dle biochemických testů byly identické (Bekal, 2006). Humánní izoláty byly geneticky unikátní a z toho důvodu se začalo používat pojmenování *S. pseudoporcinus*.

Většina izolátů *S. porcinus* je citlivá na běžně dostupná antibiotika, kromě tetracyklinu, který se ukázal být jako rezistentním v 62 % případů (Duarte, 2005).

## 10 *Streptococcus iniae*

*S. iniae* byl prvně zaznamenán v roce 1976 u sladkovodního delfína (*Inia geoffrensis*), kde způsoboval podkožní abscesy (Pier, 1976). Od té doby byl tento druh zaznamenán jako původce epizootických onemocnění nejen u sladkovodních delfínů, ale i u různých druhů ryb v jezírkách, sádkách a akváriích (Facklam, 2002; Weinstein, 1997). Tento kmen způsobuje také zoonotické nákazy přenosné z ryb na člověka, které se projevují ve formě kožních zánětů, především na horních končetinách. Prvním lékem volby je penicilin, avšak lze použít i erytromycin, kloxacilin nebo cefalexin.

## 11 *Streptococcus phoacae*

*S. phoacae* je jedním ze tří kmenů betahemolytických streptokoků, které byly izolované pouze z animálních zdrojů (Avendaño-Herrera, 2011). Ačkoliv byl *S. phoacae* z počátku zařazen mezi příslušníky skupiny bakterií způsobující streptokokózy v teplých vodách, později bylo toto tvrzení vyvráceno díky izolaci *S. phoacae* z Lososa obecného (*Salmo salar*) při teplotě vody nižší než 10 °C, což zajistilo geografické rozšíření tohoto patogena (Yañez, 2013). Obvykle způsobuje pneumonie a respirační infekce napříč všemi druhy tuleňů, především u Tuleň obecného (*Phoca vitulina*). Infikované ryby trpí exoftalmem a akumulací hnisu a hemoragické tekutiny v okolí očí a také kožními abscesy.

Ve starší studii bylo pro omezení mortality způsobené *S. phoacae* využito orálních antibiotik oxytetracyklinu, erytromycinu a florfenikolu (Romalde, 2008). Tato antibiotika v průběhu *in vitro* testů byla účinná, avšak při aplikaci na rybích sádkách měla účinnost pouze omezenou. V současnosti je pro léčbu u ryb používáno šest antibiotik a to erytromycin, oxytetracyklin, florfenikol, amoxicilin, flumequin a kyselina oxolinová.

## 12 *Streptococcus didelphis*

*S. didelphis* je dalším ze zástupců epizootických streptokoků, u člověka se nevyskytuje (Facklam, 2002; Rurangirwa, 2000). Ve zvířecí říši byl izolován pouze z Vačice virginické (*Didelphis virginiana*). *S. didelphis* je velmi citlivý na antibiotickou léčbu standartně používanými antibiotiky včetně amikacinu, ampicilinu, klindamycinu, erytromycinu, tetracyklinu a dalších antibiotik.

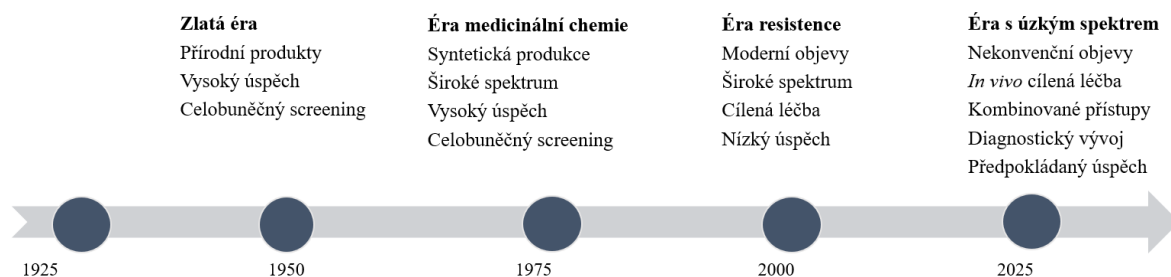
## 13 Antibiotika

Antibiotika jsou látky přírodního, syntetického nebo semisyntetického původu s bakteriostatickými nebo baktericidními účinky. V širším slova smyslu se k nim řadí i další antimikrobiální látky (chemoterapeutika) (Eades, 2017). Množství těchto látek je používáno k léčbě klinických infekcí asociovaných s grampozitivními streptokoky. Avšak alarmujícím problémem dnešní doby se stává antimikrobiální rezistence (AMR) a vyvstává potřeba nových antimikrobiálních látek s širšími spektry účinnosti a farmakokinetickými profily. V poslední době vzbuzují globálně obavy také multirezistentní bakterie. Obecně ve skupině grampozitivních bakterií je mnohdy detekován například meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), který stojí za množstvím komunitních i nemocničních infekcí (Johnson, 2005).

Strategií pro zamezení vzniku dalších multirezistentních kmenů, šíření infekcí a zvýšení účinnosti antimikrobiálních látek je mnoho. Z jejich výčtu lze jmenovat například zamezení nadužívání antibiotik, vyvinutí nových léčiv, ambulantní antimikrobiální terapie (angl. Outpatient Antimicrobial Therapy, OPAT) nebo jen obyčejné zefektivnění testování antimikrobiálních citlivostí (Barr, 2013).

### 13.1 Historie, současnost a budoucnost vývoje antibiotik

Objev prvního antibiotika penicilinu byla vlastně náhoda (Brown, 2016; Fleming, 1929). V roce 1929 se podařilo Alexandru Flemingovi vykultivovat tzv. modrou plíseň, které měla baktericidní účinky vůči grampozitivním bakteriím. Teprve v roce 1935 se podařilo vyrobit první vzorek čistého penicilinu a k provedení experimentů za cílem prokázání jeho účinku (Obr. 6).



**Obr. 6: Model objevu a vývoje antibiotických léčiv, upraveno dle (Brown, 2016).** Časová osa vývoje antibiotik a záznam klíčových období. Začátek Zlaté éry ke konci 30. let 20. století je následován Érou medicínální chemie, kterou vystřídala Éra bakteriální rezistence typická pro současnou dobu. Výhledově je očekávána Éra antimikrobik s úzkým spektrem účinku.

Bezprostředně po penicilinu následovala izolace streptomycinu v roce 1943 (Brown, 2016). Těmito objevy byla nastartována revoluční Zlatá éra antibiotik. V polovině 60. let došlo ke vzniku nové éry, Éry medicínální chemie. Vývoj se soustředil na syntézu analogů přírodních antibiotik, která vedla ke zlepšení aplikace antibiotik, snížení jejich dávek, a tím i k zamezení rezistence bakterií k těmto látkám. Tato éra byla z tehdejšího pohledu plná zázraků, které v dnešní době považujeme za samozřejmost. Avšak tato samozřejmost se začala vytrácet s nástupem Éry bakteriální rezistence. Řešením problému tohoto období by mohl být nástup Éry antibiotik s úzkým spektrem účinku. Pro toto období bude klíčové pracovat na principu personalizované medicíny (léčba pacienta tzv. na míru) a využití antimikrobik s užším spektrem účinnosti a omezením necíleného vlivu na přirozený mikrobiom hostitele, což by mohlo vést k zastavení stále se zvyšující antimikrobní rezistence.

Začátkem roku 2020 přišla skupina amerických vědců s dalším možným řešením problému narůstající rezistence (Stokes a kol., 2020). Byla vytvořena umělá inteligence, která je schopná definovat algoritmus predikce molekul s antibakteriální aktivitou na základě syntézy informací z databáze léčiv a chemických knihoven. V rámci této predikce byla studovaná kolekce více než 107 milionů sloučenin a byla identifikována sloučenina Halicin jako širokospektrální baktericidní antibiotikum s výjimečnou účinností *in vivo*. Dalším možným směrem vědeckého výzkumu je zaměření se právě na již výše zmíněnou personalizovanou léčbu.

### 13.2 Antibiotika využívaná pro léčbu streptokokových infekcí

Jak už bylo v předešlých kapitolách zmíněno, první volbou léčby streptokokových onemocnění jsou penicilinová antibiotika (Ferreti, 2016). Avšak v případě alergie, nebo rezistence k této řadě

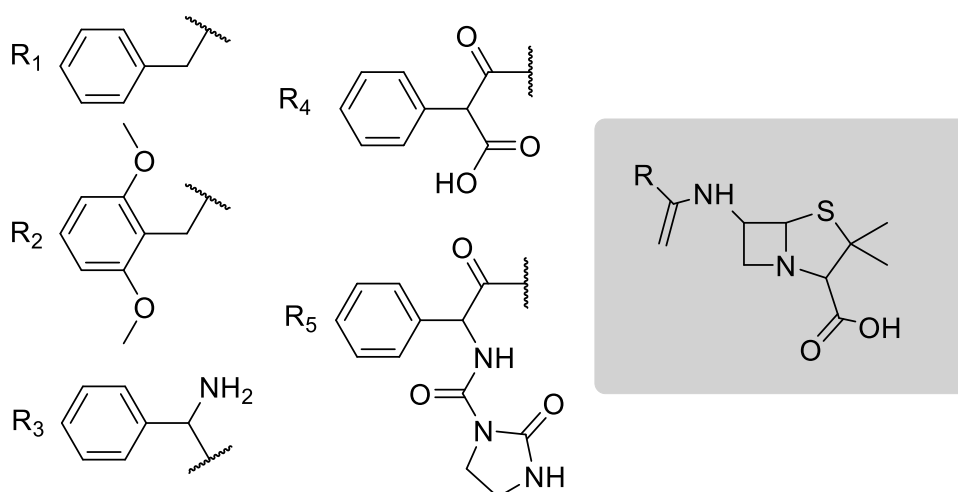
$\beta$ -laktamových antibiotik lze k léčbě použít jiná antibiotika (Tab. 1), v závislosti na výskytu kmene *Streptococcus*.

**Tab. 4: Obecné rozdělení antibiotik používaných pro léčbu streptokokových infekcí.** Tato antibiotika se primárně dělí na dvě skupiny – baktericidní a bakteriostatické. Označení (\*) - chemoterapeutika

| Baktericidní   | Bakteriostatické                      |
|--|---------------------------------------|
| Aminoglykosidy (amikacin, gentamicin)                    | Amfenikoly (chloramfenikol)           |
| $\beta$ -laktamy (penicilin, cefalosporiny, karbapenemy) | Linkosamidy (klindamycin, linkomycin) |
| Glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin)                   | Makrolidy (erytromycin, azithromycin) |
| Polypeptidy (bacitracin)                                 | Tetracykliny                          |
| Chinolony*   | Trimethoprim*                         |
| Rifampicin   |                                       |

### 13.2.1 Peniciliny

Peniciliny se řadí mezi  $\beta$ -laktamová antibiotika s baktericidním účinkem. Název této skupiny antibiotik je odvozen od plísně Štětíčkovce žlutavého (*Penicillium notatum*) (Lobanovska, 2017). Z chemického pohledu se jedná o organickou bicyklickou molekulu, která se na základě postranního řetězce dělí na peniciliny jednotlivých generací (Obr. 7).



**Obr. 7: Chemické struktury jednotlivých generací penicilinu, upraveno dle (Lobanovska, 2017).** Napravo struktura bicyklické molekuly penicilinu, znak (R) označuje jednotlivé postranní řetězce. R1 – Penicilin G, první generace; R2 – Meticilin, druhá generace, R3 – Ampicilin, třetí generace; R4 – Karbencilin, čtvrtá generace; R5 – Azlocilin, čtvrtá generace.

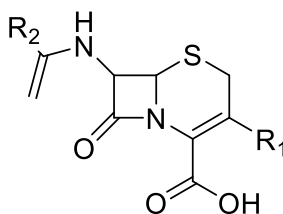
Mechanismus účinku penicilinových antibiotik cílí na esenciální strukturu buněčné stěny grampozitivních bakterií tvořenou peptidoglykanem, která zajišťuje tvar, integritu a ochranu bakteriální buňky před vnějšími vlivy (Lobanovska, 2017). Peptidoglykan je neustále syntetizován a remodelován do formy peptidové dvojvrstvy za aktivity enzymů transpeptidas, též známých jako Penicillin-Binding Proteins (PBP). Penicilinová antibiotika způsobují inhibici syntézy buněčné stěny ireverzibilním navázáním penicilinu do aktivního místa transpeptidas. Buňka bez sebeobnovy peptidoglykanu tak podléhá lýzi, které navíc zajišťuje neschopnost vzniku rezistence streptokoků k tomuto antibiotiku.

V dnešní době je 80-90 % lidské populace považováno za alergické na peniciliny, přesto však většina pacientů je schopná léčbu těmito antibiotiky tolerovat (Patterson, 2020). Následkem této skutečnosti je akcentováno snížení nadužívání širokospektrálních antibiotik a omezení rezistence mikroorganismů vůči antimikrobikům. Pouhých 10 % pacientů má alergii na peniciliny v pravém slova smyslu.

### 13.2.2 Cefalosporiny

Cefalosporiny jsou antibiotika, která se na základě svých vlastností dělí do pěti generací (Harrison, 2008). Jejich spektrum využití je velmi široké, cílí proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Při léčbě streptokokových infekcí jsou používány nejčastěji cefalosporiny první (cefalotin, cefalexin), druhé (cefuroxim), třetí (ceftibuten, cefotaxim) a čtvrté (cefepim) generace (Obr. 8).

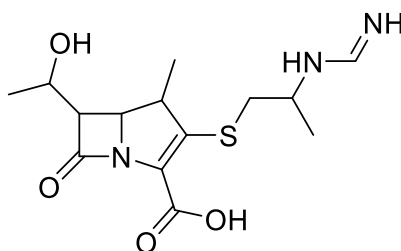
Vzhledem k tomu, že obdobně jako peniciliny spadají cefalosporiny do skupiny  $\beta$ -laktamových antibiotik, je princip jejich účinku analogický jako u penicilinů (viz 13.2.1). Avšak mechanismů vzniku antibiotické rezistence vůči cefalosporinům je více (Munita, 2016). Nejtypičtějším z nich je destrukce struktury  $\beta$ -laktamového kruhu enzymem  $\beta$ -laktamasou, dále změna vazebného místa pro antibiotikum, eflux antibiotika z buňky nebo snížená permeabilita membrány.



**Obr. 8: Chemická struktura jádra cefalosporinů.** V pozicích R1 a R2 jsou následně připojovány postranní řetězce, které jsou typické pro jednotlivé generace cefalosporinů.

### 13.2.3 Karbapenemy

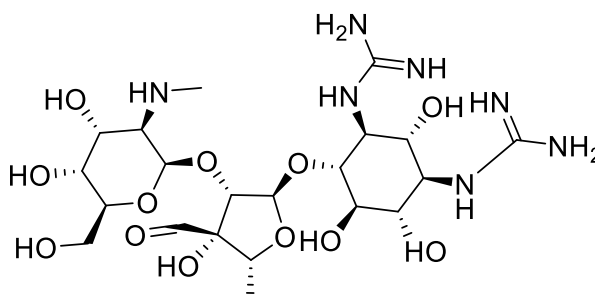
Dalším zástupcem  $\beta$ -laktamových antibiotik jsou karbapenemy (Hawkey, 2012). Karbapenemy jsou oproti jiným léčivům z této skupiny odolnější vůči  $\beta$ -laktamasám a z toho důvodu mají i širší spektrum účinku. Tato mimořádně účinná antibiotika se používají především pro léčbu multirezistentních bakteriálních infekcí u lidí (Obr. 9).



**Obr. 9: Chemická struktura karbapenemu.**

### 13.2.4 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy jsou přírodní nebo semisyntetická antibiotika odvozena od aktinobakterií (Krause, 2016). Mezi zástupce aminoglykosidů patří streptomycin, amikacin, neomycin, gentamicin atd. (Obr. 10). V době jejich objevu byly často užívány při antibakteriálních léčbách, avšak v 80. letech byly nahrazeny cefalosporiny, karbapenemy nebo fluorochinolony, především z důvodu stoupající rezistence. Bylo zjištěno, že aminoglykosidy mají synergní účinek s jinými antibiotiky, čemuž je připisován jistý potenciál pro budoucí zlepšení dávkování a užívání těchto antibiotik vůči multirezistentním bakteriím. Tohoto účinku se běžně využívá ve veterinární praxi právě v kombinaci s peniciliny. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici syntézy proteinu navázáním se do A-místa 16 S ribosomální RNA 30 S ribosomu (Kotra, 2000).



Obr. 10: Struktura streptomycinu, zástupce skupiny aminoglykosidů.

### 13.2.5 Glykopeptidy

Glykopeptidy jsou přírodní nebo semisyntetická antibiotika, která jsou až poslední volbou léčby při život ohrožujících infekcích člověka (Binda, 2014). Při léčbě streptokokových infekcí se v humánní medicíně využívá především vankomycin a teikoplanin. Ve veterinární medicíně není tento typ antibiotik využíván (Pyörälä, 2009). Antimikrobiální spektra účinnosti vůči grampozitivním bakteriím u těchto dvou látek jsou porovnatelná, avšak teikoplanin ukazuje větší antimikrobní potenciál především vůči izolátům rodu *Streptococcus*.

### 13.2.6 Chinolony

Chinolony a fluorochinolony (FQ) reprezentují skupinu syntetických antibiotik, tzv. chemoterapeutika (Kurtböke, 2017). Tyto látky lze rozdělit do čtyř generací, z nichž první generace je označovaná jako nefluorované chinolony (I. kyselina nalidixová, kyselina oxolinová), zbylé tři generace jsou označovány jako fluorochinolony (II. ciprofloxacin; III. enrofloxacin, ofloxacin, IV. sparfloxacin). Obecně tyto látky způsobují zablokování DNA gyrazy u grampozitivních bakterií. Na základě svých vlastností jsou považovány za látky se širokým spektrem účinku, které jsou atraktivní alternativou při léčbě pacientů hypersenzitivních na  $\beta$ -laktamová antibiotika. Avšak díky tomuto nadužívání byl zaznamenán celosvětový nárůst snížené citlivosti k těmto antibiotikům, především u kmenů *S. pyogenes* a *S. agalactiae* (Hays, 2016; Neemuchwala, 2016; Shen 2018).

Ve veterinární medicíně je obecně známá skutečnost vzniku rezistence chinolonů a jiných skupin antibiotik, při jejich plošné a opakované aplikaci (Sárközy, 2001).

### **13.2.7 Polypeptidy**

Bacitracin je zástupcem polypeptidů používaných pro léčbu streptokokových infekcí (Bennett, 2015). Tohle antibiotikum je produkováno mikroorganismem *Bacillus subtilis*, obdobně jako polymyxinová antibiotika jinými bacily (polymyxin E, kolistin). Poslední dvě jmenované látky však mají účinnost jen vůči gramnegativním bakteriím. Bacitracin je často používán v kombinaci s polymyxiny k rozšíření spektra účinku. V průběhu posledních let byl zaznamenán i nárůst rezistentních kmenů vůči bacitracinu (Pires a kol. 2009).

### **13.2.8 Amfenikoly**

Amfenikoly jsou skupina antibiotik s fenylypropanoidní strukturou. Jejich bakteriostatický účinek spočívá v blokaci enzymu peptidyl transferasy na 50 S ribosomu patogenu (Ficai, 2017). Zástupcem této skupiny antibiotik je chloramfenikol a florfenikol, které mají široké spektrum účinku napříč grampozitivními, gramnegativními i multiresistentními bakteriemi. Často je využíván při léčbě očních infekcí u lidí a u malých zvířat (Maddison, 2008).

### **13.2.9 Linkosamidy**

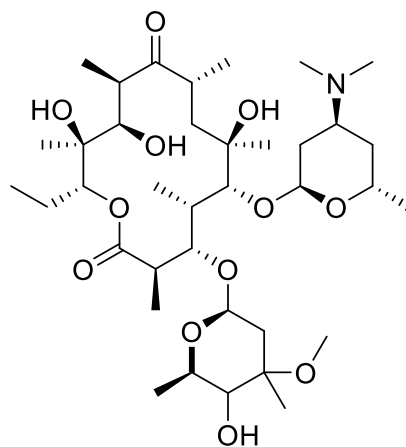
Původní linkosamidové antibiotikum linkomycin, byl v průběhu let nahrazen svým lépe vstřebatelným derivátem klindamycinem (Greenwood, 2012). Linkosamidy svým účinkem působí na 50 S ribozomální podjednotku, obdobně jako amfenikoly a makrolidy a jsou používány pro léčbu infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi. Hojně jsou využívány jako alternativa k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům v případě hypersensitivity pacienta (Dowd, 2017).

### **13.2.10 Makrolidy**

Makrolidy zastupují obsáhlou skupinu antibiotik produkovanou některými zástupci rodu *Streptomyces* a příbuznými druhy. Jsou složeny z makrocyclického laktonového kruhu s cukernými substituenty (Greenwood a kol., 2012). Jejich účinku se využívá především při léčbě streptokokových, stafylokokových a dalších infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi. Z řad makrolidů stojí za zmínku především erytromycin, klaritromycin a azitromycin (Obr. 11).

První případ rezistence k erytromycinu byl publikován v roce 1955, od té doby rezistence celosvětově roste (Ilakkiya, 2015). Dnes se procenta rezistentních GAS pohybují v rozmezí 5-40 %, s největším výskytem v Asii, o něco nižší rezistence jsou zaznamenávána v Evropě a USA (Abraham, 2018).





Obr. 11: Struktura erytromycinu, zástupce makrolidů.

### 13.2.11 Tetracykliny

Tetracykliny byly jedním z prvních používaných širokospektrých antibiotik (Kurtböke, 2017). První objevenou látkou byl chlortetracyklin v roce 1948. Tato antibiotika hrála významnou roli v léčbě intracelulárních patogenů i při léčbě Lymeské boreliózy. V důsledku zvyšující se rezistence, způsobené efluxem antibiotika, byla připravena druhá generace semisyntetických tetracyklinů (minocyklin a doxycyklin). Tato rezistence vůči tetracyklinu a dimethylchlortetracyklinu byla pozorována už v roce 1960 (Roberts a kol., 1960). Avšak bakterie si prozřetelně vyvinuly nový mechanismus rezistence, a to rezistenci založenou na ribosomální protekci. Tato skutečnost vedla v roce 2005 k produkci třetí generace tetracyklinů (tigecyklinu).

I přes omezené používání tetracyklinů při léčbě GAS infekcí jsou celosvětově reportovány zvyšující se počty případů rezistence (Abraham, 2018). Pravděpodobnou příčinou by mohlo být intenzivní používání tetracyklinu pro léčbu různých humánních a veterinárních infekcí, jeho přítomnosti v potravě zvířat a následným přenosem genů ze zvířat na člověka. Nejnovější studie z roku 2018 ukazuje rezistenci GAS až v 58 %, která je na první pohled alarmující v porovnáním se starší studií z roku 2007, kdy rezistence vykazovala hodnotu 38 % (Ayer a kol., 2007).

# **Experimentální část**

## 14 Materiál a metody

### 14.1 Biologický materiál

V průběhu zpracování experimentální části této práce byly využity terénní mikrobiální kultury  $\beta$ -hemolytických streptokoků izolovaných na SVÚ Olomouc z klinického a patologického veterinárního materiálu. Dále bylo využito záznamů o záchytu  $\beta$ -hemolytických streptokoků ze SVÚ Olomouc a Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

### 14.2 Chemikálie a roztoky

V experimentální části této práce byl využit následující materiál: sada disků s antibiotiky (Oxoid Czech, Brno, CZ) (Tab. 5), 0,9% fyziologický roztok s 1 % glukózy (Trios, Praha, CZ), destilovaná voda nejvyšší kvality (Merck, Darmstadt, DE), absolutní etanol (Merck, Darmstadt, DE), kyselina trifluoroctová (Merck, Darmstadt, DE), kyselina mravenčí (Merck, Darmstadt, DE) a základní matrice kyselina skořicová (Bruker Daltoniks, Bremen, DE).

**Tab. 5: Sada použitých antibiotik použitých pro testování citlivost vybraných bakteriálních kmenů.** Hodnoty inhibičních zón vychází z norem EUCAST a SOP BAK 10/03 pro bakterie. R – rezistentní, S – citlivé.

| Antibiotikum           | Kód | Koncentrace<br>[ $\mu$ g/disk] | inhibiční zóny    |                   |
|------------------------|-----|--------------------------------|-------------------|-------------------|
|                        |     |                                | u R kmenů<br>[mm] | u S kmenů<br>[mm] |
| chloramfenikol         | CHF | 30                             | 19                | 19                |
| tetracyklin            | TTC | 30                             | 20                | 23                |
| erytromycin            | ERY | 15                             | 18                | 21                |
| gentamicin             | GEN | 10                             | 12                | 15                |
| klindamycin            | DA  | 2                              | 17                | 17                |
| cefalotin              | CLT | 30                             | 18                | 18                |
| enrofloxacin           | ENR | 5                              | 16                | 20                |
| amoxicillin klavulanát | AMC | 30                             | 18                | 18                |
| ampicilin              | AMP | 10                             | 18                | 18                |
| bacitracin             | BA  | 10                             | 16                | 20                |

### 14.3 Kultivační půdy

Pro kultivaci mikroorganismů byly použity následující půdy: Edwardsův agar (EDW), krevní agar (MPKA), masopeptonový bujón (MPB), Mueller-Hinton agar s 5 % ovčí krve (KMHA), pro kultivaci kvasinek a plísní byl paralelně použit Sabouraudův agar (vše Trios, Praha, CZ).

### 14.4 Přístroje a další materiál

Izolace a identifikace jednotlivých kmenů a zjištění jejich citlivosti k antibiotikům byly zprostředkovány s pomocí následujících přístrojů: termostat BT120 (Ecom, Polná, CZ), mikroskop LABOPHOT 2 (Nikon, JP), hmotnostní analyzátor Microflex LT a ovládací software MALDI-TOF MS Biotyper (Bruker Daltoniks, Bremen, DE), vatové tampony, centrifuga EBA 20 (Hettich,

Tuttlingen, DE), turbidimetr Densi-La-Meter II (Erbba, Lachema, Brno, CZ), dispenzor disků s antimikrobiálními látkami (Oxoid Czech, Brno, CZ).

## **14.5 Metody vyhodnocování**

### **14.5.1 Kultivace a identifikace bakterií z rodu *Streptococcus***

Popsaná metodika vychází ze standardních operačních postupů SOB BAK 8/03, SOP BAK 1/04 používaných na SVÚ Olomouc, dle zpracování MVDr. Jaroslava Bzdila, Ph.D.

Všechn veterinární biologický materiál, který je doručen na SVÚ Olomouc vyžaduje správné zvolení bakteriologické kultivační metody, která je vybírána na základě charakteru materiálu, požadavků lékaře či chovatele, předpisů a norem pro vyšetření materiálu a dle očekávaného výskytu bakterií. Na SVÚ Olomouc jsou vyšetřovány následující klinické materiály: stěry (kůže, ran a hnisu), výtěry (horních cest dýchacích, gastrointestinálního traktu, spojivek, tlamy), trus, moč a mléko.

Kultivace streptokoků byla prováděna v aerobních, nebo mikroaerofilních podmínkách přímo z klinického či patologického materiálu s využitím MPKA a Edwardsové agaru (EDW). Suché materiály byly očkované přímo nebo homogenizovány s malým množstvím fyziologického roztoku v homogenizátoru, nebo ve třecí misce a následně vyočkovány na pevné půdy. Plotny s pevnou půdou se následně inkubovaly při teplotě 37 °C po dobu 18-48 hodin. V případě cíleného vyšetření se zaměřením na streptokoky bylo použito pomnožení v tekutých médiích (Todd-Hewitovův bujón, nebo selektivní bujón (SBM)) s inkubací při 37 °C po dobu 18-24 hodin s následným vyočkováním na MPKA a další pevnou selektivní půdu. Pevné půdy byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 18-48 hodin.

Kultivace tamponových stěrů a tekutin byla provedena přímo tamponem smočeným v klinickém materiálu na pevnou půdu a rozklíčkováním po plotně (MPKA, EDW) 3-4 kličkami. V případě pomnožování materiálu byl tampon zalomen do 10 ml bujónu a důkladně protřepán. Inkubace proběhla aerobně při teplotě 37 °C po dobu 24-48 hodin. Po 24 hodinách bylo provedeno vyočkování z tekutého bujónu na plotny MPKA a EDW. Následovala další inkubace při 37 °C po dobu 18-48 hodin.

Kultivace patologického materiálu, bioptátů, incisí a dalšího materiálu byla prováděna ve formě roztěru, nebo otisku tohoto materiálu a jeho rozklíčkování na povrchu krevního a Edwardsova agaru, popřípadě i do tekutého bujónu. Při pomnožení bylo vloženo do pomnožovací půdy (10 ml) cca 1 g, nebo 1 ml materiálu a důkladně protřepáno. Inkubace byla prováděna ve stejných podmínkách jako kultivace tamponových stěrů.

Kultivace z mléka byla prováděna z důkladně protřepaného vzorku mléka ve zkumavce vyočkováním na MPKA s pomocí kličky, nebo skleněné tyčinky a jeho rozetřením po agaru. Inkubace probíhala anaerobně při teplotě 37 °C po dobu 42-48 hodin. Vzorek mléka byl současně uložen do termostatu a inkubován při stejné teplotě po dobu 18-24 hodin. Po uplynutí inkubace byla

zkumavka s mlékem znovu protřepána a vzorek byl vyočkován na EDW a inkubován aerobně při 37 °C po dobu 18-24 hodin. MPKA a EA pak byly posuzovány současně.

Na krevním agaru rostly  $\beta$ -hemolytické streptokoky ve formě čirých, nebo našedlých kolonií o velikosti 0,25 – 2 mm s typickou hemolýzou. Na Edwardsově agaru rostly podobně s rozdílem tvorby nebo absence eskulinu v podobě šedavého, hnědavého až černého zbarvení agaru. Současně docházelo k potlačení růstu jiných bakterií na tomto agaru.

Při confirmaci streptokoků byly sledovány růstové vlastnosti kmene, negativní produkce katalasy a cytochromooxidasy. Preparát byl obarvený dle Gramma a pod mikroskopem byly pozorovány grampozitivní koky, uspořádané do dvojic nebo řetízků. K zařazení streptokoků do sérologické skupiny došlo na základě reakcí se skupinovými séry, nebo latexovými testy (ITEST STREPTO GROUP, Itest plus, Hradec Králové, ČR). Druhově byly streptokoky typizovány s pomocí komerčních souprav testů (Streptotest 16, API Strepto f. LACHEMA Brno, ČR, BIO-Mérieux Marcy l'Étoile, Francie apod.). Pro upřesnění typizace bylo možno provést CAMP test se *S. aureus*, bacitracinový a optochinový test, nebo průkaz termorezistence kmene. Důležitým krokem je odlišení streptokoků od enterokoků na základě výše zmíněných testů a růstu v bujónu s obsahem 6,5 % NaCl (Trios s.r.o. Praha, ČR). Druhově rozdíly jsou zobrazeny v tabulce (Tab. 6). V případě SVÚ Olomouc však byly typizace prováděny pouze s pomocí molekulární biologické metody MALDI-TOF MS. Tato metoda je na SVÚ Olomouc zavedena od roku 2010.

**Tab. 6: Orientační odlišení streptokoků od enterokoků**, upraveno standardních operačních postupů SOB BAK 8/03, SOP BAK 1/04 používaných na SVÚ Olomouc, dle zpracování MVDr. Jaroslava Bzdila, PhD. MPB – masopeptonový bujón.

| Test                                 | <i>Streptococcus sp.</i> | <i>Enterococcus sp.</i> |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| růst při 45 °C                       | v                        | +                       |
| růst v MPB s 6,5 % NaCl              | -                        | +                       |
| růst na žluč-eskulinovém agaru       | -                        | +                       |
| růst na půdách s penicilinem (2mg/l) | -                        | +                       |
| růst v bujónu s pH 9,6               | -                        | +                       |
| produkce pyrolidonylarylamidasy      | v                        | +                       |
| růst při 10 °C                       | v                        | +                       |

Po ukončení kultivace ploten bylo provedeno vyhodnocení nárůstu bakteriálních kolonií a byly posouzeny růstové vlastnosti jednotlivých porostů. Suspektní kolonie byly následně izolovány a identifikovány pomocí hmotnostního analyzátoru MALDI-TOF MS (*Mass Assisted Laser Desorption/ Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry*). Po identifikaci byly provedeny testy citlivosti k jednotlivým antimikrobiálním látkám za použití antibiotických disků (Tab. 5).

Analogický způsob kultivace a izolace jednotlivých druhů streptokoků byl aplikován i na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Pro zařazení streptokoků do skupin byly využívány sérologické, latexové testy: ITEST STREPTO GROUP (Itest plus, Hradec Králové, ČR) a také CAMP test, pro confirmaci *S. agalactiae*. V případě nutnosti byly typizace

ověřeny také pomocí molekulární biologické metody MALDI-TOF MS, analogicky, jako ve veterinární sféře dle SOP BAK 1/10 (viz 14.5.2).

#### **14.5.2 Druhá identifikace bakterií metodou MALDI-TOF MS**

Popsaná metodika vychází ze standardizovaného protokolu SOP BAK 1/10 využívaného na SVÚ Olomouc, dle zpracování MVDr. Nikoly Štormerové.

Pro identifikaci sledovaných mikroorganismů bylo použito metody MALDI-TOF MS za použití hmotnostního spektrometru Microflex LT a software MALDI TOF Biotyper. MALDI-TOF MS je metoda hmotnostní spektrometrie založena na laserové desorpci a ionizaci vzorku za účasti matrice, s následným měření doby letu excitovaných částic průletovým analyzátozem. Doba letu je přepočítána pomocí kalibračních konstant na hmotnostní jednotky jednotlivých proteinů. Naměřená hmotnostní spektra jsou následně použita pro porovnání s databází známých kalibrovaných mikrobiálních hmotnostních spekter referenčních kmenů v programu MALDI TOF Biotyper. Na základě shody hmotnostních spekter a míry podobnosti je odvozena identifikace testovaného mikroorganismu.

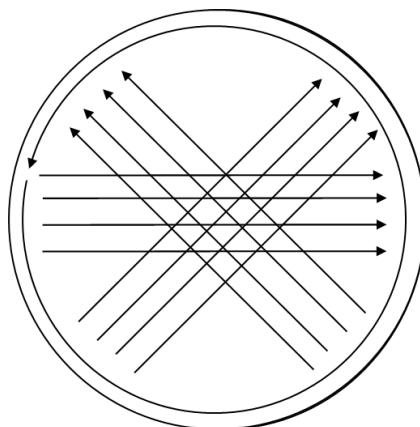
Pracovní postup při identifikaci jednotlivých kmenů pomocí MALDI-TOF MS byl následující. Prvním krokem byla příprava roztoku MALDI matrice. Byl připraven zásobní roztok o složení: acetonitril, destilovaná voda, kyselina trifluoroctová v poměru 50:47,5:2,5. Do mikrozkušavky s komerčně připraveným základem matrice  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) bylo přidáno 250  $\mu$ l zásobního roztoku. Vzniklý roztok byl zvortexován do úplného rozpuštění. Následujícím krokem byla příprava vzorku z čisté mikrobiální kultury, kdy byla odebrána izolovaná kolonie a nanášena v podobě tenkého filmu na terčík MALDI ocelové destičky. Biologický materiál byl následně převrstven 1  $\mu$ l 70% kyseliny mravenčí a po zaschnutí znova převrstven 1  $\mu$ l připraveného roztoku CHCA. Po zaschnutí matrice bylo provedeno vlastní samotné měření hmotnostních spekter pomocí MALDI-TOF MS.

#### **14.5.3 Stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou**

Popsaná metodika vychází ze standardizovaného protokolu SOP BAK 10/03 využívaného na SVÚ Olomouc, dle zpracování MVDr. Jaroslava Bzdila, Ph.D.

Disková difúzní metoda se využívá pro stanovení zóny inhibice růstu kolem disku napuštěného přesně stanoveným množstvím antimikrobiální látky. Dle průměru vzniklé zóny inhibice je provedeno vyhodnocení citlivosti dle tabulek hodnot stanovených experimentálně (EUCAST, CLSI, SOP BAK 10/03 SVÚ Olomouc). Dle průměru zóny je kmen označen jako citlivý (S), rezistentní (R) nebo intermediární (I). Průměr zóny inhibice se liší u jednotlivých testovaných antibiotik v závislosti na jejich koncentraci, na typu použitého agaru a na citlivosti testovaného bakteriálního kmene. Kvalita výsledků závisí na přesném dodržení metodiky postupu.

Pro stanovení antimikrobiální citlivosti bylo nutné testovaný mikrobiální kmen izolovat na plotnu s KMHA. Čistá mikrobiální kultura byla suspendována ve zkumavce s 6 ml fyziologického roztoku s přídavkem 1% glukosy, do které byla přenesena pomocí sterilní tyčinky s vatovým tamponem. Vzniklý zákal ve zkumavce byl změřen na turbidimetru a hodnota byla ustanovena mezi 0,5 – 1° McFarlandovy stupnice. Následně byl proveden roztěr na plotnu pomocí vatového tampónu (Obr. 12). Na vyočkovanou půdu zbavenou vlhkosti byly poté kladeny pomocí dispenzorů disky naplněné antimikrobiální látkou. Inkubace ploten v termostatu probíhala aerobně při 37 °C po dobu 16-24 hodin.

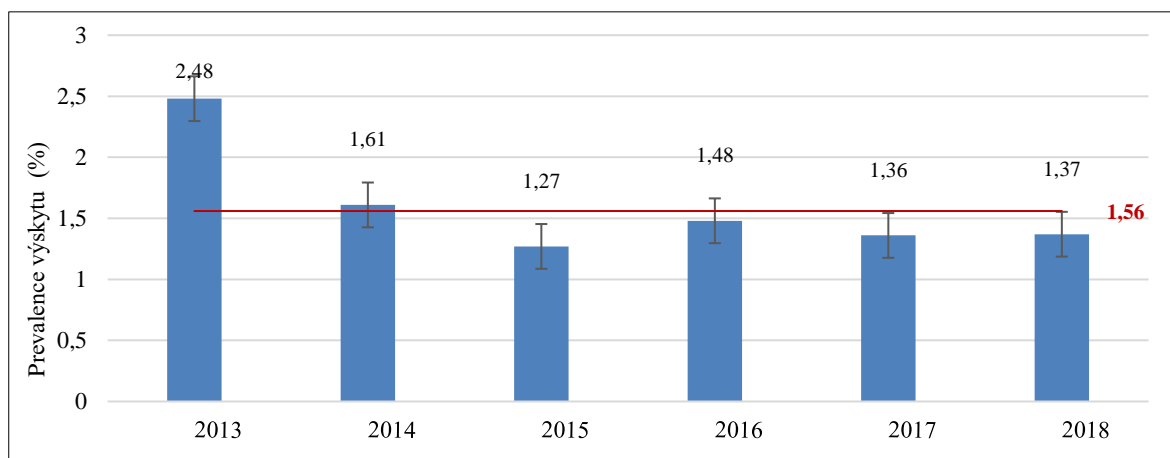


**Obr. 12:** Schéma roztěru mikrobiální suspenze na plotnu KMHA pomocí vatového tamponu.

## 15 Výsledky

### 15.1 Změny prevalencí výskytu betahemolytických streptokoků u animálních hostitelů

Jedním z dílčích výsledků experimentální části této práce bylo vyhodnocení prevalencí výskytu betahemolytických streptokoků během let 2013-2018 ze vzorků spádové oblasti SVÚ Olomouc, která zahrnuje oblasti Moravy, Slezska a východní části Čech. Během let 2013-2018 bylo na SVÚ Olomouc zpracováno a vyšetřeno celkem 123 488 vzorků. V jednotlivých letech sledovaného období byly počty vzorků následující: 17 267 (2013), 18 556 (2014), 22 438 (2015), 22 459 (2016), 22 637 (2017), 20 131 (2018). Z výše uvedených vzorků bylo celkem izolováno 1927 kmenů betahemolytických streptokoků. Z celkového počtu vzorků tak byly betahemolytické streptokoky průměrně izolovány pouze v 1,56 % případů. Změny prevalencí v tomto období jsou znázorněny v následujícím grafu (Obr. 13). Vážený průměr prevalence betahemolytických streptokoků byl při zohlednění směrodatné odchylky ( $\pm 0,41$  %) nadprůměrný v roce 2013 (2,48 %), kdy také dosahoval maximální hodnoty zjištěné prevalence v pozorovaném období, a také v roce 2014 (1,61 %). V následujících letech byly všechny hodnoty podprůměrné 2015 (1,27 %), 2016 (1,48 %), 2017 (1,36 %) a 2018 (1,37 %). Nejvýraznější změny je možné pozorovat mezi lety 2013 a 2014, kdy se prevalence snížila o 0,87 %. V následujících letech hodnoty spíše kolísaly těsně pod hodnotou průměru prevalencí.

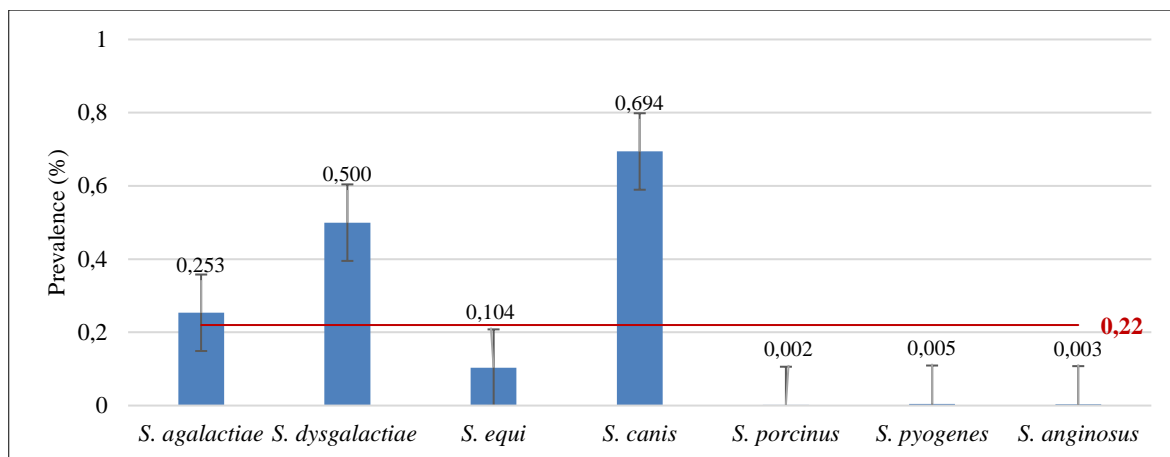


**Obr. 13: Meziroční prevalence výskytu betahemolytických streptokoků u animálních hostitelů během sledovaného období v letech 2013–2018, hodnoty prevalencí uvedeny v procentech (%). Vzorky byly izolovány a identifikovány na SVÚ Olomouc. Červená linie znázorňuje průměrnou hodnotu prevalence (1,56 %) sledovaného období.**

Na SVÚ Olomouc bylo během sledovaného období izolováno a identifikováno sedm druhů streptokoků, které nás zajímají (celkové počty izolátů uvedeny v závorce): *S. agalactiae* (313), *S. dysgalactiae* (617), *S. equi* (128), *S. canis* (857), *S. porcinus* (2), *S. pyogenes* (6) a *S. anginosus* (4). Následující graf (Obr. 14) zobrazuje celkovou prevalenci výskytu všech izolovaných druhů betahemolytických streptokoků z animálních pacientů během sledovaného období v letech 2013-2018. Průměrná hodnota prevalence výskytu těchto druhů z celkového počtu izolovaných a identifikovaných vzorků byla stanovena na 0,22 %. Nadprůměrné hodnoty prevalence celkového



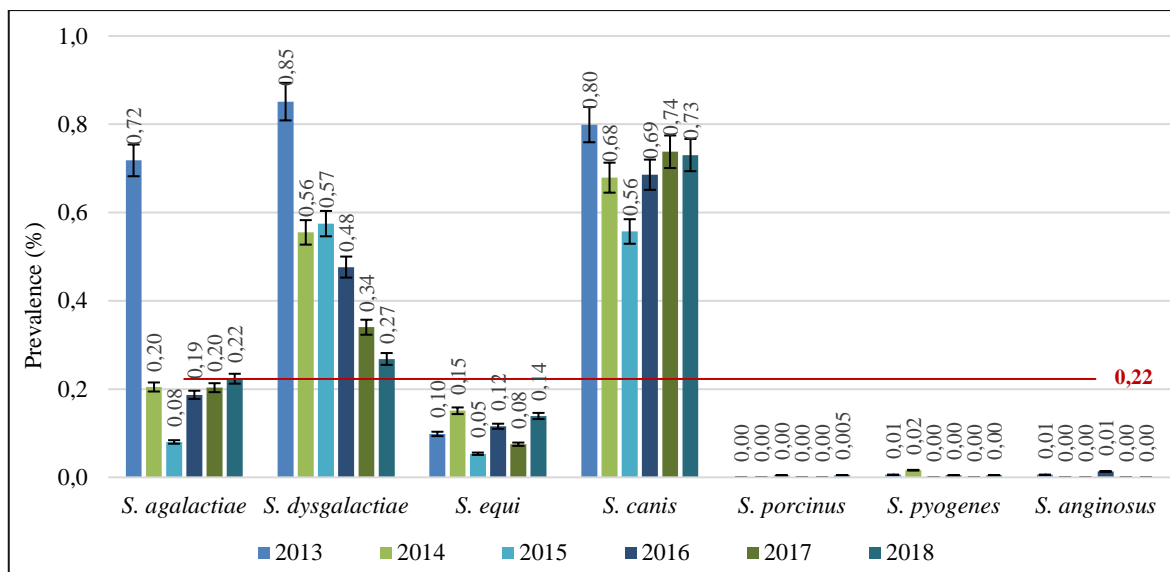
výskytu byly zaznamenány u třech pozorovaných druhů: *S. canis* (0,69 %), *S. dysgalactiae* (0,5 %) a *S. agalactiae* (0,25 %). Ostatní čtyři druhy se vyskytovaly v podstatně menším zastoupení: *S. equi* (0,1 %), *S. porcinus* (0,002 %), *S. pyogenes* (0,005 %) a *S. anginosus* (0,003 %).



**Obr. 14: Celkové prevalence výskytu jednotlivých druhů betahemolytických streptokoků z animálních hostitelů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%).** Vzorky byly izolovány a identifikovány na SVÚ Olomouc. Sledované druhy a celkové množství jejich izolátů *S. agalactiae* (313), *S. dysgalactiae* (oba poddruhy) (617), *S. equi* (128), *S. canis* (857), *S. porcinus* (2), *S. pyogenes* (6) a *S. anginosus* (4).

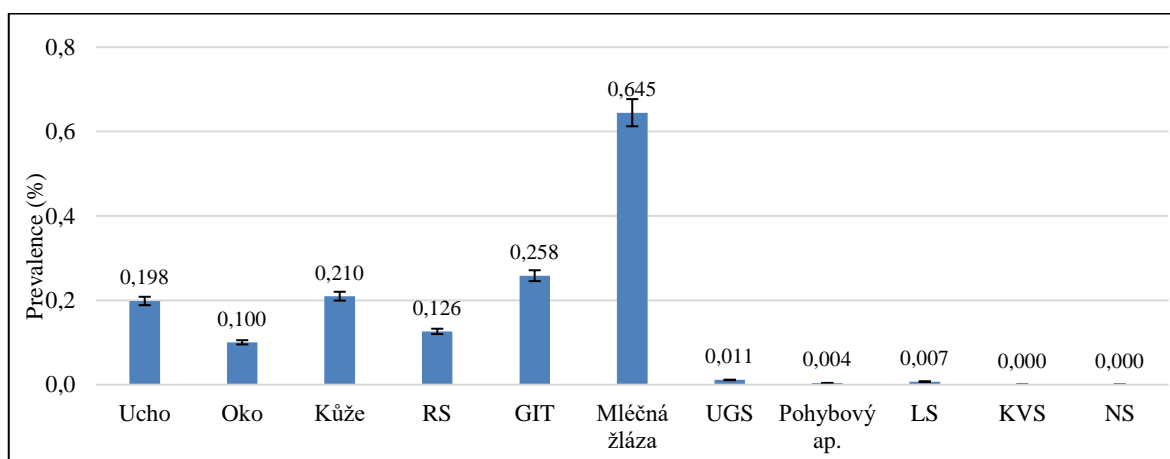
Prevalence výskytu těchto druhů v jednotlivých letech jsou zobrazeny v grafu (Obr. 15). Průměrná hodnota prevalence těchto druhů byla stanovena na 0,22 %, v grafu ji představuje červená linie. Již na první pohled je patrný nadprůměrný výskyt tří ze sledovaných druhů: *S. dysgalactiae*, *S. canis* a v některých letech i *S. agalactiae*. Bezkonkurenčně nejvyšší hodnoty výskytu ve všech sledovaných letech byly zaznamenány u druhu *S. canis*. V roce 2013 bylo dosaženo maximální hodnoty prevalence 0,8 %, následující dva roky hodnoty mírně klesly. V roce 2014 byla prevalence 0,68 %, v roce 2015 pak 0,56 % a poté byl opět pozorován mírný nárůst v letech následujících. V roce 2016 byla hodnota prevalence 0,69 %, v roce 2017 pak 0,74 % a v posledním roce pozorování 2018 pak 0,73 %. Dalším druhem s nadprůměrnými hodnotami výskytu byl *S. dysgalactiae*, u kterého byl pozorován pozvolný pokles výskytu po celou dobu pozorování. V roce 2013 bylo dosaženo hodnoty maximálního výskytu (0,85 %), a od té doby hodnoty prevalence klesaly: 2014 (0,56 %), 2015 (0,57 %), 2016 (0,48 %), 2017 (0,34 %) a 2018 (0,27 %). Během šesti let pozorování došlo až k více než trojnásobnému poklesu prevalence u tohoto druhu. Zástupce GBS vykazoval nadprůměrné hodnoty v prvním roce pozorování (0,72 %), avšak poté hodnoty rapidně klesly až pod stanovenou hodnotu celkového průměru: 2014 (0,2 %), 2015 (0,08 %), 2016 (0,19 %), 2017 (0,2 %). V posledním roce pozorování se hodnota prevalence výskytu rovnala průměru, tedy 0,22 %. Prevalence druhu *S. equi*, do kterého spadají poddruhy *S. equi* ssp. *zooepidemicus* a *S. equi* spp. *equi*, meziročně kolísaly v rozmezí 0,05 – 0,14 %. Všechny jejich hodnoty byly tedy podprůměrné v rámci výskytu všech betahemolytických streptokoků během sledovaného období. Zbylé druhy *S. porcinus*, *S. pyogenes* a *S. anginosus*, byly izolovány pouze v jednotkách případů. Hodnoty prevalence druhu *S. porcinus* se v letech 2013, 2014, 2016 a 2017 rovnaly 0 %, avšak v roce 2014 byla hodnota prevalence u tohoto druhu rovna 0,004 % a v roce 2018 0,005 %. U druhu *S. pyogenes* bylo během tohoto období možné pozorovat následující prevalence: 2013 (0,006 %),

2014 (0,016 %), 2016 (0,004 %), 2018 (0,005 %), naopak v letech 2015 a 2017 byly hodnoty nulové. *S. anginosus* byl pozorován s následujícími hodnotami prevalencí: 2013 (0,006 %) a 2016 (0,013 %), ve zbylých letech (2014, 2015, 2017 a 2018) byly pak hodnoty prevalence nulové.



**Obr. 15: Meziroční prevalence výskytu jednotlivých druhů betahemolytických streptokoků z animálních hostitelů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%).** Vzorky byly izolovány a identifikovány na SVÚ Olomouc. Červená linie znázorňuje průměrnou hodnotu prevalence všech betahemolytických streptokoků u zvířat (0,22 %) sledovaného období. Sledované druhy a celkové množství jejich izolátů *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* (oba poddruhy), *S. equi* (oba poddruhy), *S. canis*, *S. porcinus*, *S. pyogenes* a *S. anginosus*.

Již v teoretické části bylo zmíněno, že betahemolytické streptokoky lze izolovat z různých orgánových soustav. Následující graf (Obr. 16) zobrazuje celkové prevalence výskytu (%) betahemolytických streptokoků v jednotlivých orgánech a orgánových soustavách během sledovaného období let 2013-2018. Orgánová soustava s nejvyšší hodnotou záchytu byla



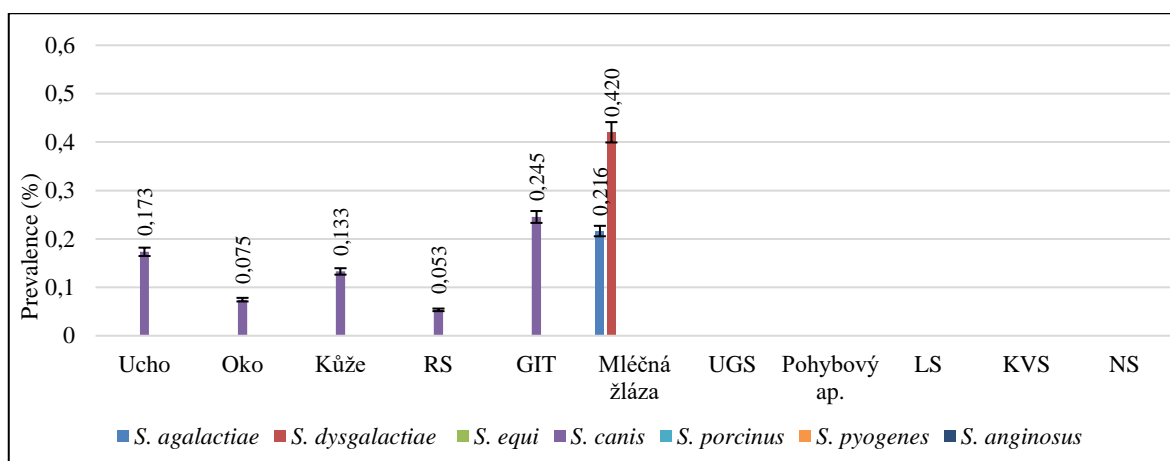
**Obr. 16: Celkové prevalence výskytu skupiny betahemolytických streptokoků v jednotlivých orgánových soustavách.** Izoláty pocházejí z animálních hostitelů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty jsou uvedeny v procentech (%). Vzorky byly izolovány a identifikovány na SVÚ Olomouc. Sledované druhy *S. agalactiae* (GBS), *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. canis*, *S. porcinus*, *S. pyogenes* (GAS) a *S. anginosus* byly izolovány z následujících soustav – Ucho, oko, kůže, respirační trakt (RS), gastrointestinální trakt (GIT), mléčná žláza, urogenitální trakt (UGS), pohybový aparát (PA), lymfatický systém (LS), kardiovaskulární systém (KVS) a nervová soustava (NS).

nepochybně mléčná žláza (0,64 %), další v pořadí byla trojice soustav s prevalenčními hodnotami v obdobném rozmezí hodnot: GIT (0,26 %), kůže (0,21 %) a ucho (0,2 %). V menší míře byly

izolovány kmeny z respiračního traktu (RS) (0,13 %), oka (0,1 %) a také urogenitálního (UGS) a lymfatického systému (LS), obě s identickými hodnotami (0,01 %).

Následující dva grafy jsou nadstavbou předchozího grafu. Tyto dva grafy zobrazují detailně celkové prevalence výskytu jednotlivých sledovaných druhů v orgánových soustavách v průběhu celého sledovaného období 2013-2018. Výsledky byly rozděleny do dvou grafů z důvodu velké variability hodnot prevalencí výskytu. První graf (Obr. 17) zobrazuje prevalence majoritního výskytu streptokoků od hodnoty 0,05 % výše. Zatímco druhý graf (Obr. 18) zobrazuje méně časté prevalence výskytu streptokoků do hodnoty 0,049 %.

V prvním grafu (Obr. 17) je možné pozorovat častý výskyt dominujícího druhu *S. canis* napříč několika orgánovými soustavami: ucho (0,17 %), oko (0,07 %), kůže (0,13 %), RS (0,05 %) a GIT (0,25 %). Již z předchozího grafu vyplynulo, že nejčastěji osidlovanou orgánovou soustavou byla mléčná žláza. V tomto grafu si je možné všimnout, že z velké míry je to dáno přítomností *S. dysgalactiae* (0,42 %) a *S. agalactiae* (0,22 %).

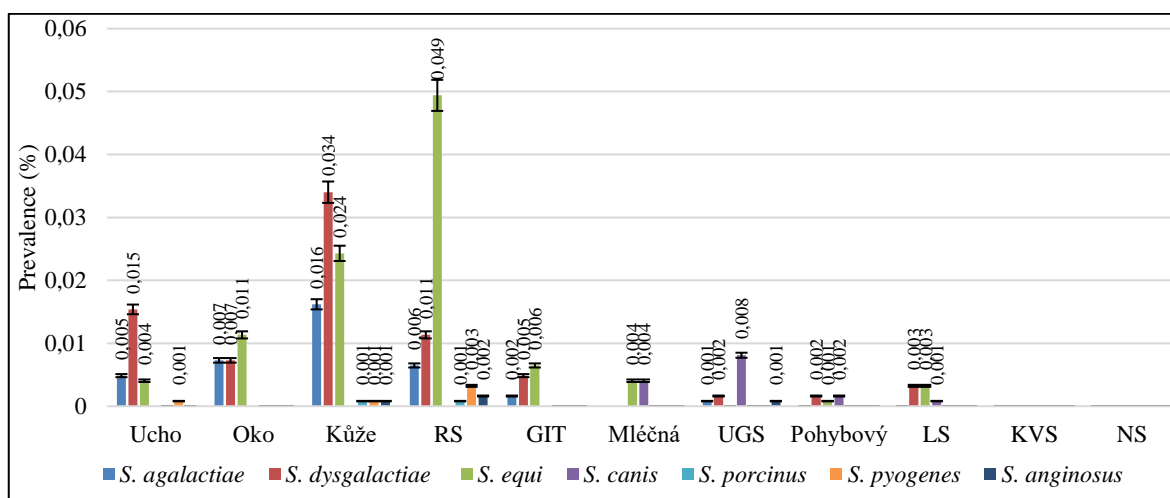


**Obr. 17:** Celkové prevalence výskytu jednotlivých majoritních druhů betahemolytických streptokoků v jednotlivých orgánových soustavách. Izoláty pocházejí z animálních hostitelů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%). Zobrazeny jsou pouze izoláty s hodnotami prevalence >0,05 %. Vzorokly byly izolovány a identifikovány na SVÚ Olomouc. Sledované druhy *S. agalactiae*, *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. canis*, *S. porcinius*, *S. pyogenes* a *S. anginosus* byly izolovány z následujících soustav – Ucho, oko, kůže, respirační trakt (RS), gastrointestinální trakt (GIT), mléčná žláza, urogenitální trakt (UGS), pohybový aparát, lymfatický systém (LS), kardiovaskulární systém (KVS) a nervová soustava (NS).

V následujícím grafu (Obr. 18) si lze všimnout, že v uchu se nejčastěji vyskytovaly kromě *S. canis* i druhy *S. dysgalactiae* (0,015 %), *S. agalactiae* (0,005 %), *S. equi* (0,004 %) a minoritně *S. pyogenes* (0,001 %). Velmi podobné druhové složení bylo shledáno i v oku: *S. equi* (0,011 %), *S. dysgalactiae* (0,07 %) a *S. agalactiae* (0,007 %). Kůži mimo častého výskytu *S. canis*, patrného v předchozím grafu, osidlovaly také druhy *S. dysgalactiae* (0,034 %), *S. equi* (0,024 %) a *S. agalactiae* (0,016 %). Minoritně se vyskytovaly také druhy *S. porcinius*, *S. pyogenes* a také *S. anginosus* (0,001 %). Respirační soustava je nejčastěji atakována kmeny *S. canis* (Obr. 17), *S. equi* (0,049 %), *S. dysgalactiae* (0,011 %), *S. agalactiae* (0,006 %) a v malé míře i zbylými druhy v rozmezí (0,001-0,003 %). V gastrointestinálním traktu bývají detekovány druhy *S. equi*,

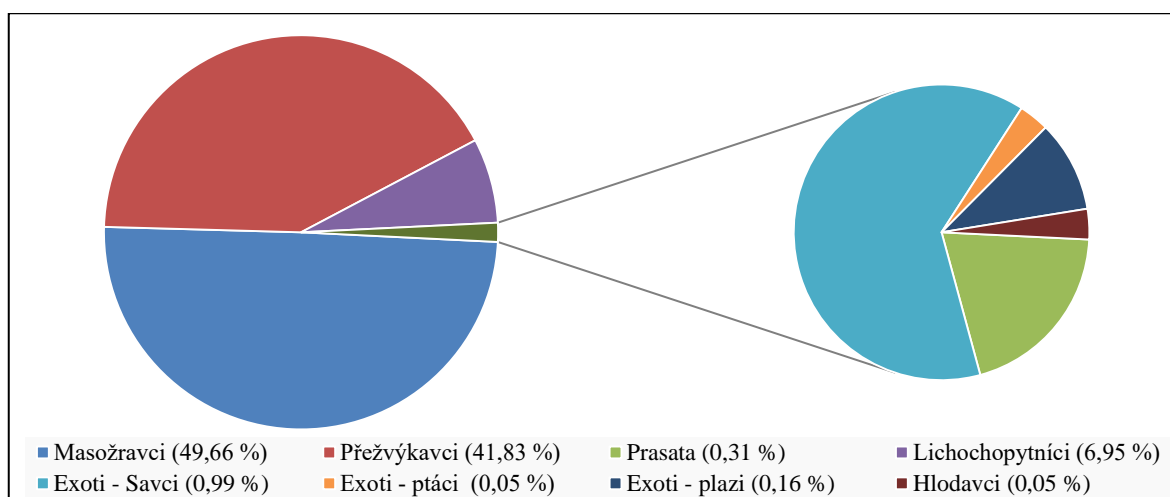
*S. dysgalactiae* a *S. agalactiae* v rozmezí (0,002 – 0,006 %). Ve mléčné žláze byly minoritně detekovány druhy *S. canis* a *S. equi* (0,004 %).

Z následujících orgánových soustav byly betahemolytické streptokoky izolovány pouze ojediněle. V urogenitálním traktu byly detekovány druhy *S. canis* (0,008 %), *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* a *S. anginosus* v rozmezí (0,001-0,002 %). Z pohybového aparátu byly izolovány druhy *S. dysgalactiae*, *S. equi* a *S. canis* v rozmezí (0,001-0,002 %). V lymfatickém systému se vykytovaly *S. dysgalactiae*, *S. equi* a *S. canis* s hodnotami prevalence výskytu (0,001-0,003 %). Z kardiovaskulárního a nervového systému nebyly izolovány žádné druhy betahemolytických streptokoků.



**Obr. 18:** Celkové prevalence výskytu jednotlivých minoritních druhů betahemolytických streptokoků v jednotlivých orgánových soustavách. Izoláty pocházejí z animálních hostitelů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%). Zobrazeny jsou pouze izoláty s hodnotami prevalence <0,049 %. Vzorčky byly izolovány a identifikovány na SVÚ Olomouc. Sledované druhy (*S. agalactiae* (GBS), *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. canis*, *S. porcinius*, *S. pyogenes* (GAS) a *S. anginosus*) byly izolovány z následujících soustav – Ucho, oko, kůže, respirační trakt (RS), gastrointestinální trakt (GIT), mléčná žláza, urogenitální trakt (UGS), pohybový aparát, lymfatický systém (LS), kardiovaskulární systém (KVS) a nervová soustava (NS).

V grafu (Obr. 19) je zobrazeno procentuální zastoupení betahemolytických streptokoků z celkového počtu izolátů u jednotlivých skupin zvířat během pozorovaného období v letech 2013-2018. V největším zastoupení se tato skupina mikroorganismů vyskytovala u masožravců (49,66 %), přežvýkavců (41,83 %) a lichokopytníků (6,95 %). V podstatně menším procentuálním zastoupení se betahemolytické streptokoky vyskytovaly u prasat (0,31 %), exotických zvířat v rozmezí (0,05-0,99 %) a hlodavců (0,05 %).

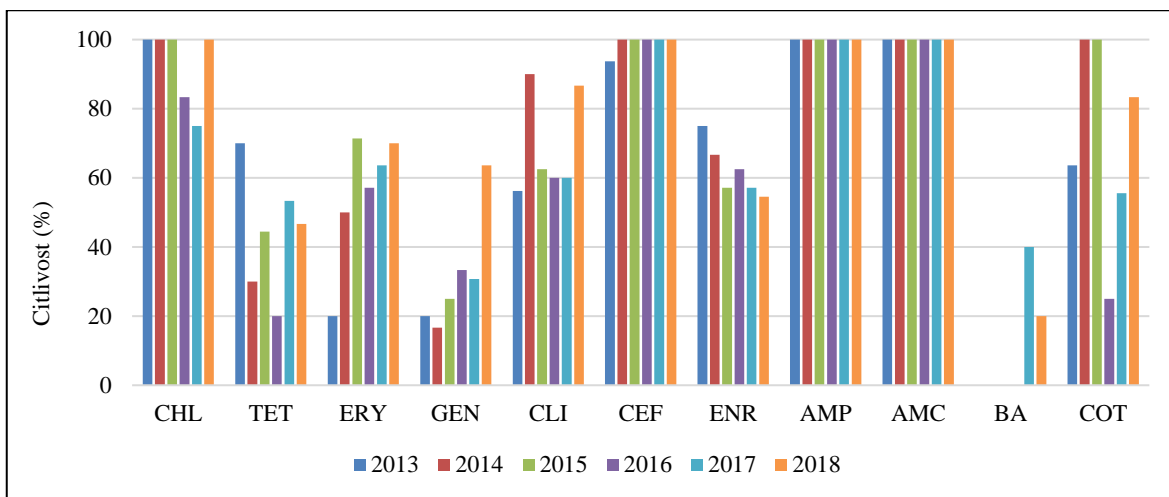


**Obr. 19: Procentuální zastoupení beta-hemolytických streptokoků u jednotlivých skupin zvířat během let 2013-2018, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, uvedeno v procentech (%).** Levá část grafu zobrazuje masožravce, přezvýkavce a lichokopytníky, zatímco v pravé části grafu jsou zobrazeny skupiny zvířat s nižšími hodnotami prevalence jako jsou exotičtí savci, ptáci, plazi, hlodavci a prasata.

## 15.2 Změny antimikrobiálních citlivostí beta-hemolytických streptokoků u animálních pacientů v letech 2013-2018

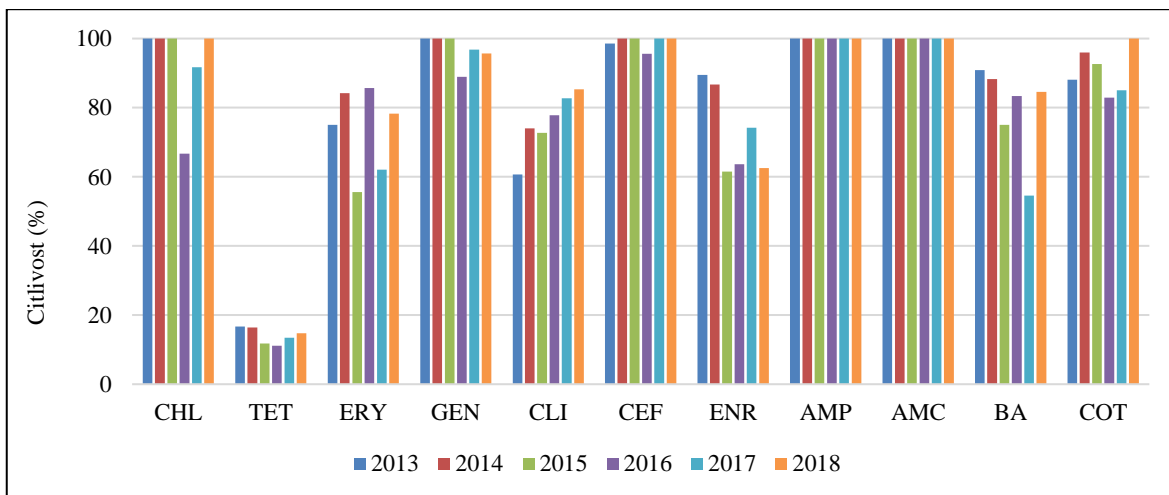
Následující skupina grafů (Obr. 20 - Obr. 23) zobrazuje výsledky citlivosti k antimikrobním látkám u konkrétních druhů beta-hemolytických streptokoků v letech 2013-2018, izolovaných ze zvířat na SVÚ Olomouc. Ve všech případech se jedná o vyjádření citlivosti (%) jednotlivých testovaných kmenů k těmto antibiotikům: chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxicilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA) a kotrimoxazol (COT).

V prvním grafu (Obr. 20) je zobrazena citlivost (%) z celkového počtu testovaných kmenů druhu *S. agalactiae* k jednotlivým antibiotikům v pozorovaném období 2013-2018. V tomto období bylo zachyceno celkem 627 izolátů *S. agalactiae*, ze kterých 445 vykazovalo citlivost k následujícím antibiotickým látkám. Celkově tedy bylo 70,9 % izolátů citlivých k antimikrobikům. Všechny izoláty byly citlivé k ampicilinu a amoxicilin klavulanátu. Izoláty *S. agalactiae* vykazovaly také stoprocentní citlivost k cefalotinu, s výjimkou roku 2013, kdy byla hodnota citlivosti 94 %. Nejnižší citlivost vykazovaly izoláty *S. agalactiae* k bacitracinu, během let 2013-2016 byly všechny testované izoláty rezistentní. Avšak v následujících dvou letech byla prokázána citlivost k tomuto antibiotiku, 40% v roce 2017 a 20% v roce 2018.



**Obr. 20: Citlivost *S. agalactiae* k antibiotickým látkám v letech 2013-2018, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, zobrazeno v procentech (%).** Chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxicilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA), kotrimoxazol (COT).

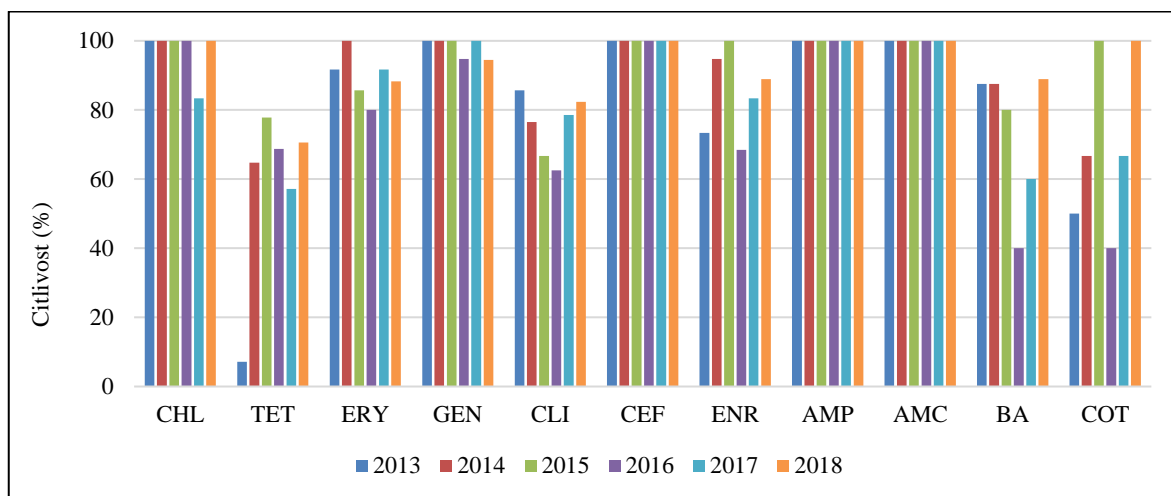
Citlivost (%) *S. dysgalactiae* k jednotlivým antibiotikům je zobrazena v následujícím grafu (Obr. 21). Celkem bylo testováno 2191 izolátů tohoto druhu, ze kterých bylo 1749 citlivých k antibiotikům, což značí 82,5 % účinnost. Stejně jako u předchozího druhu byly všechny izoláty citlivé k ampicilinu a amoxicilin klavulanátu. Citlivost ke klindamycinu se meziročně zvyšovala z počátečních 60 % až na 85 % citlivých izolátů za rok. Citlivosti ke gentamicinu a kotrimoxazolu kolísaly v rozmezí 83–100 % po dobu všech sledovaných let. Viditelně nejnižší citlivost byla prokázána u tetracyklinu, kdy bylo pouze 11-16 % izolátů citlivých ve sledovaném období.



**Obr. 21: Citlivost *S. dysgalactiae* k antibiotickým látkám v letech 2013-2018, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, zobrazeno v procentech (%).** Chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxicilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA), kotrimoxazol (COT).

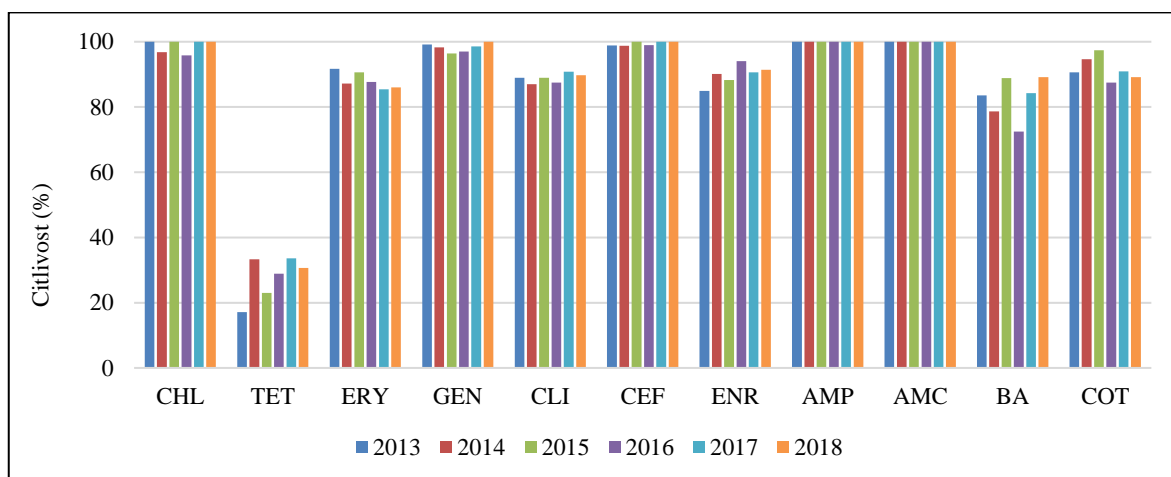
V následujícím grafu (Obr. 22) je vyobrazena citlivost (%) izolátů druhu *S. equi* k jednotlivým antibiotikům v pozorovaném období let 2013-2018. V tomto období bylo zachyceno 801 izolátů *S. equi*, ze kterých byla v 698 případech testována citlivost k antibiotikům (87,1 % kmenů). Všechny izoláty byly citlivé k cefalotinu, ampicilinu a amoxicilin klavulanátu v celém období pozorování. V případě gentamicinu se jednalo o citlivosti v rozmezí 94-100 %. U chloramfenikolu byla citlivost

100 % s výjimkou roku 2017, kdy byla jen 83 %. Nejnižší citlivost byla zaznamenána opět u tetracyklinu (7-77 %).



**Obr. 22: Citlivost *S. equi* k antibiotickým látkám v letech 2013-2018, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, zobrazeno v procentech (%).** Chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxycilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA), kotrimoxazol (COT).

V následujícím grafu (Obr. 23) z této skupiny je vyobrazena citlivost (%) izolátů u izolátů druhu *S. canis* k jednotlivým antibiotikům v pozorovaném období 2013-2018. V tomto období bylo zachyceno 6274 izolátů *S. canis*, ze kterých 5468 bylo testováno v testech citlivosti k následujícím antibiotikům. Celkově bylo tedy citlivost k antimikrobním látkám testována u 87,2 % izolátů tohoto druhu. Všechny izoláty byly citlivé k ampicilinu a amoxycilin klavulanátu. Vysoké hodnoty citlivosti v rozmezí 95-100 % byly zjištěny v případě chloramfenikolu, gentamicinu a cefalotinu. Nejmenší citlivost k antibiotiku byla pozorována u tetracyklinu, kdy se meziroční citlivosti pohybovaly v rozmezí 16-33 %.

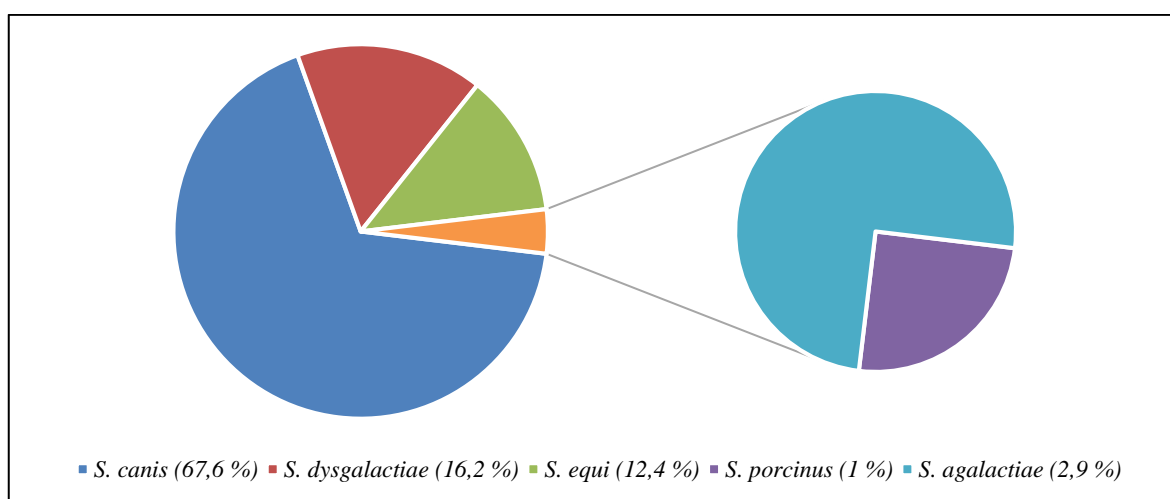


**Obr. 23: Citlivost *S. canis* k antibiotickým látkám v letech 2013-2018, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, zobrazeno v procentech (%).** Chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxycilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA), kotrimoxazol (COT).

### 15.3 Porovnání spolehlivosti antimikrobiálních citlivostí stanovených na základě velkého a malého seskupení dat

Tato kapitola je současně poslední částí zabývající izoláty z animálních pacientů. V rámci této části bylo izolováno a identifikováno 105 vzorků betahemolytických streptokoků z animálních pacientů v období 10/2018-02/2019. Stanovení citlivosti těchto izolátů bylo provedeno samostatně a nezávisle na rutinním provozu laboratoře mikrobiologie na SVÚ Olomouc. Vyhodnocená data byla následně použita pro porovnání důvěryhodnosti a správnosti na základě velkého a malého seskupení dat.

V grafu níže (Obr. 24) je zobrazeno procentuální zastoupení izolovaných kmenů v období 10/2018-02/2019. V největším zastoupení se vyskytoval druh *S. canis* (67,6 %), který byl následován druhy *S. dysgalactiae* (16,2 %) a *S. equi* (12,4 %). V menší míře se vyskytovaly izoláty druhů *S. agalactiae* (2,9 %) a *S. porcinus* (1 %).

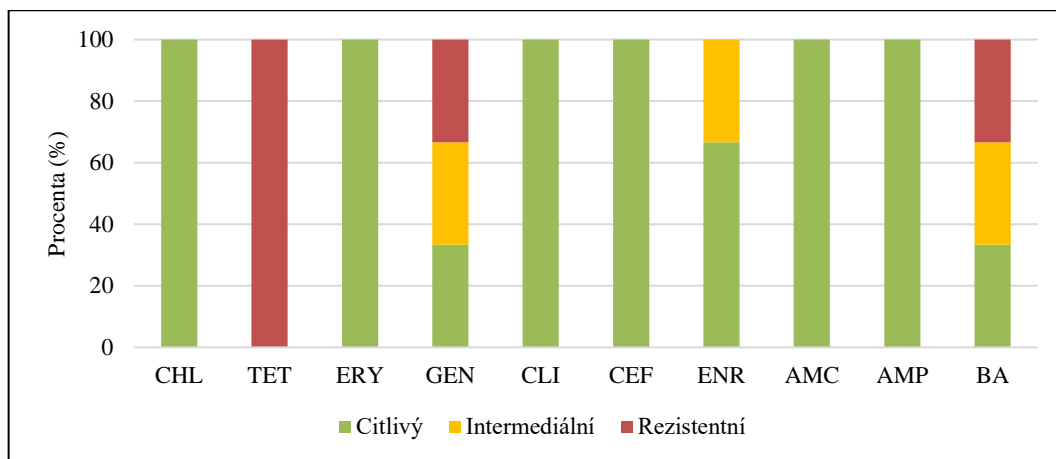


**Obr. 24:** Graf zobrazující procentuální zastoupení betahemolytických streptokoků izolovaných a identifikovaných z animálních hostitelů v období 10/2018-02/2019 na SVÚ Olomouc, hodnoty procentuálního zastoupení jsou vyobrazeny v procentech (%). V levé části grafu: *S. canis* (67,6 %), *S. dysgalactiae* (16,2 %), *S. equi* (12,4 %), *S. agalactiae* (2,9 %) a *S. porcinus* (1 %).

U všech izolátů byly provedeny testy citlivosti k antibiotikům a vyhodnoceny dle hodnot uvedených v tabulce (Tab. 5). Graficky zpracované výsledky pro jednotlivé druhy lze vidět v grafech níže (Obr.25-29).

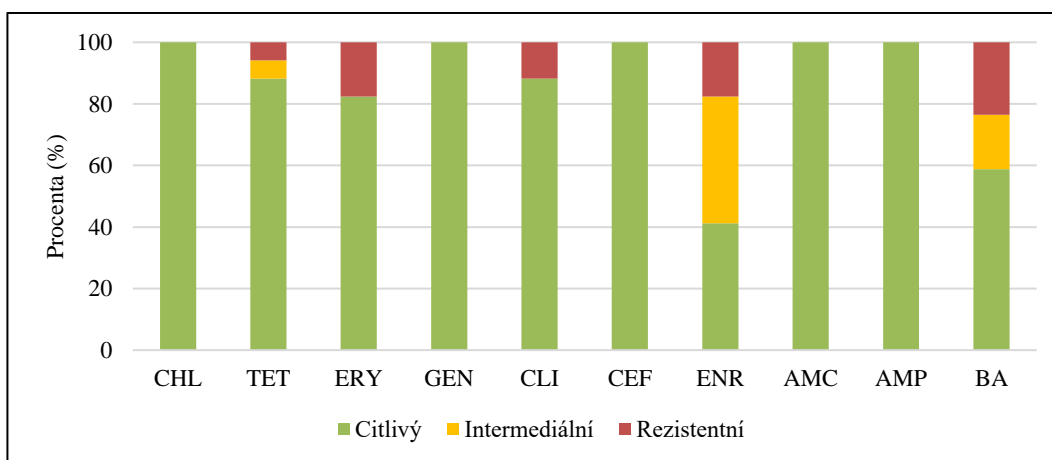
V prvním grafu (Obr. 25) je zobrazena citlivost *S. agalactiae* k antibiotikům. V pozorovaném období byly zaznamenány 3 izoláty tohoto druhu, z nichž všechny byly citlivé k chloramfenikolu, erytromycinu, klindamycinu, cefalotinu, ampicilinu a amoxycilin klavulanátu. Rezistence u všech izolátů byla prokázána u tetracyklinu. Citlivost, rezistence i intermediarita byla ve stejných poměrech zaznamenána u zbylých dvou antibiotik gentamicinu a bacitracinu.





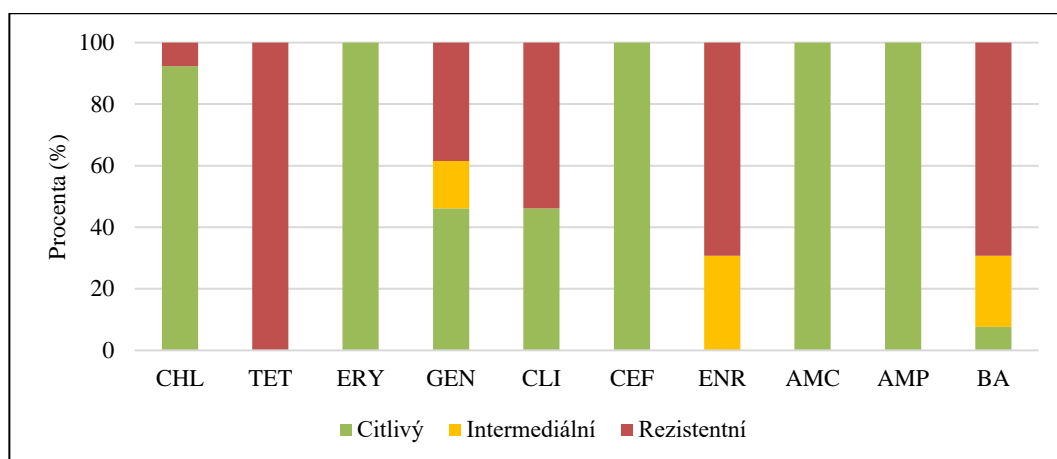
**Obr. 25: Citlivost *S. agalactiae* k antibiotickým látkám, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, zobrazeno v procentech (%).** Chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxycilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA).

Ve druhém grafu (Obr. 26) je zobrazena citlivost *S. dysgalactiae* k antibiotikům. V pozorovaném období bylo zaznamenáno 17 izolátů tohoto druhu, z nichž všechny byly citlivé k chloramfenikolu, gentamicinu, ampicilinu a amoxycilin klavulanátu. K enrofloxacinu bylo citlivých pouze 41,2 % izolátů, stejné množství vykazovalo intermediální reakci a 17,6 % bylo rezistentních. K bacitracinu bylo citlivých pouze 58,8 % izolátů, zbytek vykazoval intermediaritu (17,7 %) nebo rezistenci (23,5 %).



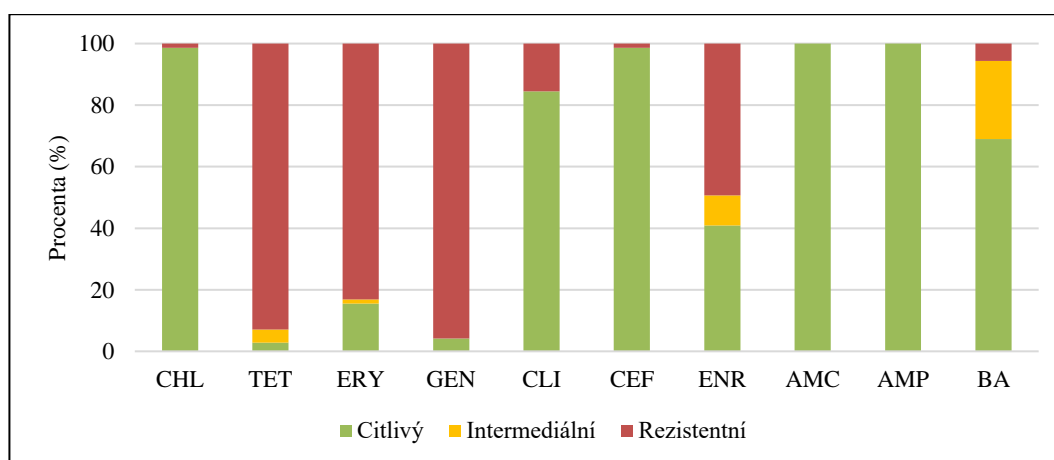
**Obr. 26: Citlivost *S. dysgalactiae* k antibiotickým látkám, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, zobrazeno v procentech (%).** Chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxycilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA).

Následující graf (Obr. 27) zobrazuje citlivosti *S. equi* k antibiotikům. Ve sledovaném období bylo zaznamenáno 13 izolátů, z nichž všechny byly citlivé k cefalotinu, ampicilinu a amoxycilin klavulanátu. Naopak rezistence k tetracyklinu se projevila u všech izolátů. V případě bacitracinu bylo 69,2 % izolátů rezistentních, 23 % intermediálních a pouze 7,7 % izolátů citlivých.



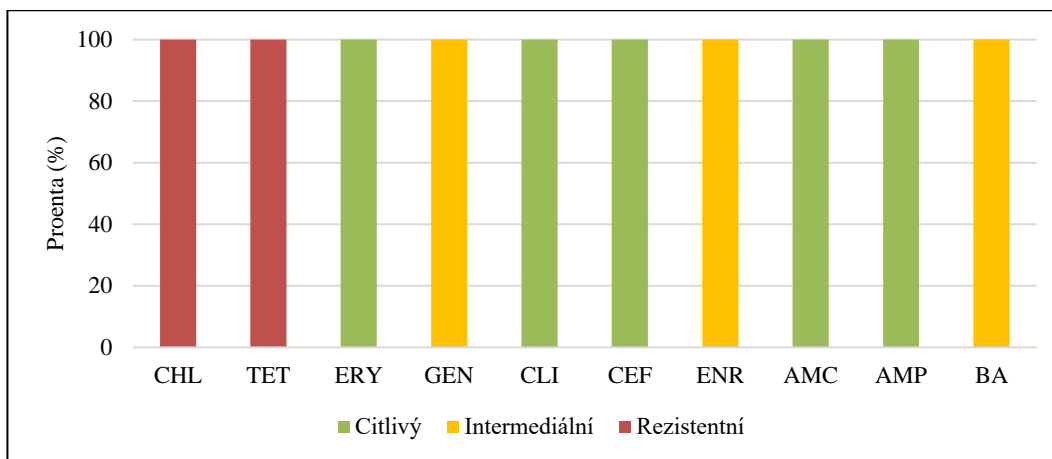
**Obr. 27:** Citlivost *S. equi* k antibiotickým látkám, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, zobrazeno v procentech (%). Chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxycilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA).

V následujícím grafu (Obr. 28) je zobrazena citlivost *S. canis* k antibiotikům. V pozorovaném období bylo zaznamenáno 71 izolátů tohoto druhu, z nichž všechny byly citlivé k ampicilinu a amoxycilin klavulanátu (100 %). Téměř stoprocentní citlivost byla zaznamenána i k chloramfenikolu (98,6 %) a cefalotinu (98,6 %). Velké množství izolátů mělo nízkou citlivost ke gentamicinu (4,2 %), tetracyklinu (7,04 %) a erytromycinu (16,9 %). Několik izolátů bylo vykazovalo intermediaritu u antibiotika, což znamená, že se rozměry zón pohybovaly mezi hodnotami citlivosti a rezistence.



**Obr. 28:** Citlivost *S. canis* k antibiotickým látkám, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, zobrazeno v procentech (%). Chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxycilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA).

Posledním izolovaným druhem v rámci tohoto období byl *S. porcinius* (Obr, 29), který byl zachycen pouze jako jediný izolát. Citlivost vykazoval k erytromycinu, klindamycinu, cefalotinu, ampicilinu a amoxycilin klavulanátu (vše 100 %). Intermediární zóny byly zjištěny u gentamicinu, enrofloxacinu a bacitracinu (vše 100 %). Rezistence byla prokázána u chloramfenikolu a tetracyklinu (vše 100 %). Tento graf nebyl zahrnut do porovnávání s velkým souborem vzhledem k nedostačujícímu množství dat z velkého datového souboru.

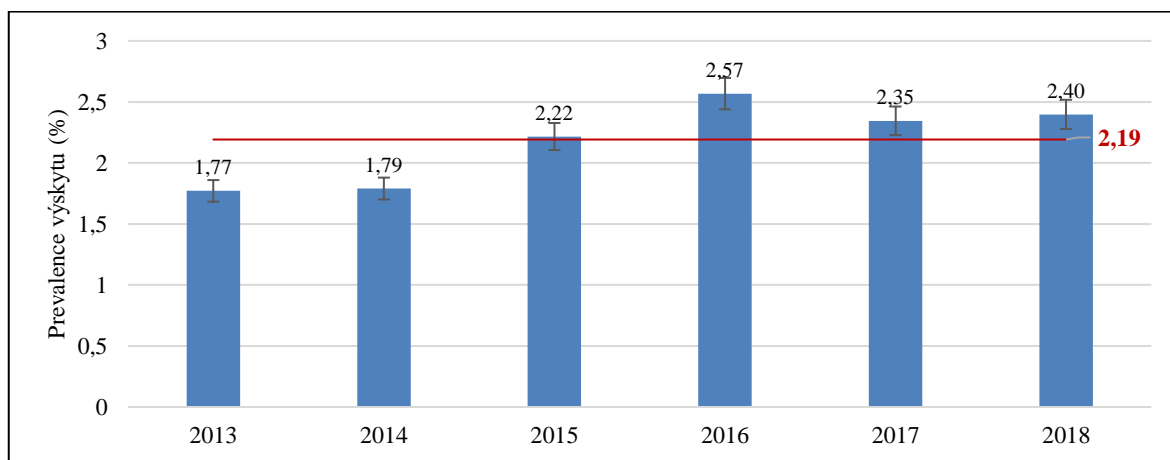


**Obr. 29: Citlivost *S. porcinus* k antibiotickým látkám, izolovaných a identifikovaných na SVÚ Olomouc, zobrazeno v procentech (%).** Chloramfenikol (CHL), tetracyklin (TET), erytromycin (ERY), gentamicin (GEN), klindamycin (CLI), cefalotin (CEF), enrofloxacin (ENR), ampicilin (AMP), amoxicilin klavulanát (AMC), bacitracin (BA).

## 15.4 Vyhodnocení změn prevalencí betahemolytických streptokoků z humánních hostitelů

V této podkapitole jsou zobrazeny prevalence výskytu betahemolytických streptokoků během let 2013-2018 z humánních hostitelů. Data a vzorky byly získány z Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého s laskavým svolením RNDr. Lucie Janovské, Ph.D.

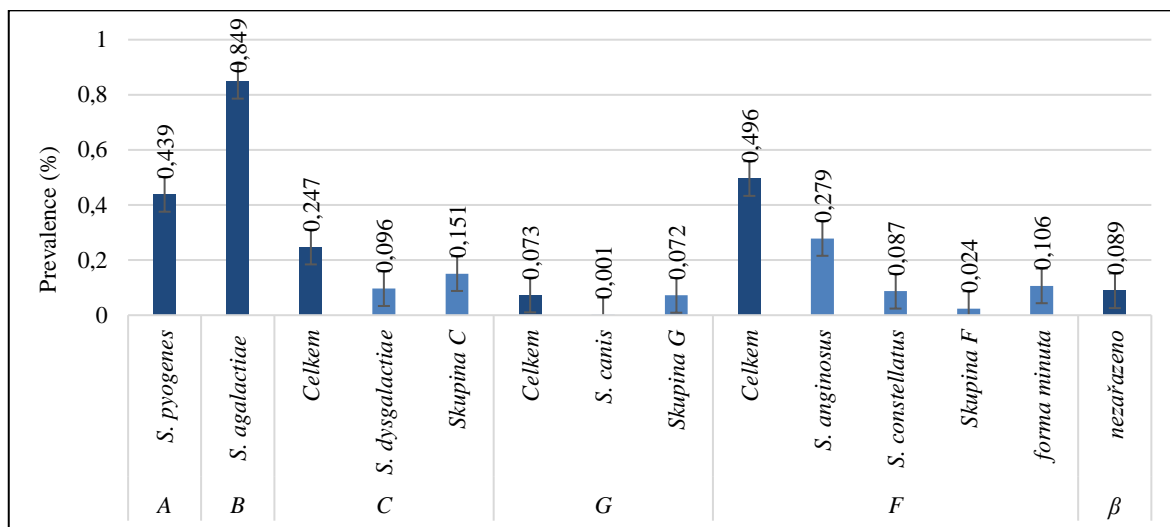
Během let 2013-2018 bylo na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého zpracováno a vyšetřeno celkem 405 696 klinických vzorků. V jednotlivých letech sledovaného období byly počty vzorků následující: 63 186 (rok 2013), 65 243 (rok 2014), 68 347 (rok 2015), 79 367 (rok 2016), 68 392 (rok 2017), 70 151 (rok 2018). Z výše uvedených vzorků bylo celkem izolováno 8895 kmenů betahemolytických streptokoků. Změny prevalencí jejich výskytu v tomto období jsou znázorněny v následujícím grafu (Obr. 30). Z celkového počtu vyšetřených vzorků se betahemolytické streptokoky v meziročním průměru vyskytovaly ve 2,19 % případů. Vážený průměr prevalence betahemolytických streptokoků byl při zohlednění směrodatné odchylky ( $\pm 0,3$  %) nadprůměrný v letech 2015 (2,22 %), 2016 (2,57 %), 2017 (2,35 %) a 2018 (2,40 %), kdy maximální hodnoty prevalence bylo dosaženo právě v roce 2016. V prvních dvou letech pozorování byly hodnoty prevalence výskytu podprůměrné 2013 (1,77 %) a 2014 (1,79 %). Nejvýraznější změny je možné pozorovat mezi lety 2014 a 2015, kdy se prevalence zvýšila o 0,43 %. V následujících letech hodnoty spíše kolísaly těsně pod hodnotou průměru prevalence.



**Obr. 30: Meziroční prevalence výskytu betahemolytických streptokoků u humánních pacientů během sledovaného období v letech 2013–2018, hodnoty prevalencí jsou uvedeny v procentech (%). Kmeny byly izolovány a identifikovány na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Červená linie znázorňuje průměrnou hodnotu prevalence (2,19 %) ve sledovaném období.**

Ve sledovaném období 2013-2018 bylo izolováno celkem 8895 izolátů ze skupiny betahemolytických streptokoků (Obr. 31). Vzhledem k tomu, že v humánní medicíně je preferováno řazení dle skupin Lancefieldové, byly kmeny zájmu rozřazeny do následujících skupin s uvedenými prevalencemi (%): skupina A – *S. pyogenes* (0,439 %), skupina B – *S. agalactiae* (0,849 %), skupina C (0,247 %) – *S. dysgalactiae* (0,096 %) a blíže nespecifikované kmeny (0,151 %), skupina G (0,073 %) – *S. canis* (0,001 %) a ostatní kmeny skupiny G (0,072 %), skupina F (0,496 %) – *S. anginosus*

(0,279 %), *S. constellatus* (0,087 %), forma minuta (0,106 %) a blíže neurčené izoláty skupiny F (0,024 %). Dále bylo izolováno 360 izolátů (0,089 %) betahemolytických streptokoků, které nebyly blíže určeny ani zařazeny do skupin dle Lancefieldové. Avšak vzhledem k zastoupenému množství byly zahrnuty do statistiky. Tmavě zvýrazněné sloupce jsou celkové součty izolátů jednotlivých skupin dle Lancefieldové, se kterými bude pracováno dále do detailů.



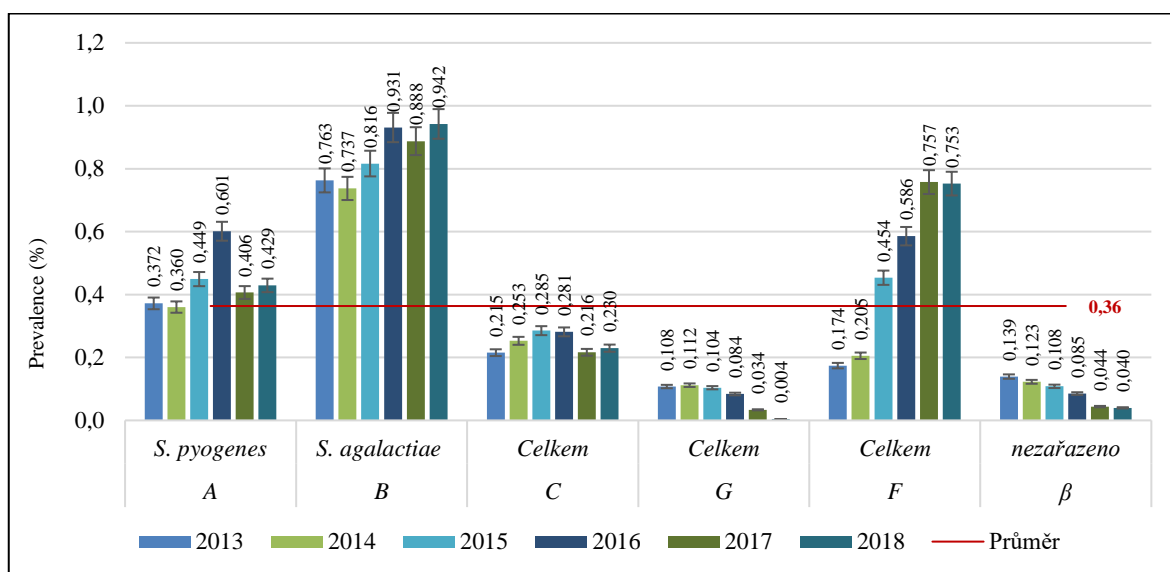
**Obr. 31: Prevalence zastoupení betahemolytických streptokoků v období let 2013-2018, izolovaných z humánních pacientů.** Vzorky byly izolovány a identifikovány na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Všechny vzorky byly rozděleny a zařazeny do skupin dle Lancefieldové následovně, v závorce jsou uvedeny hodnoty prevalence v procentech (%): skupina A – *S. pyogenes* (0,439 %), skupina B – *S. agalactiae* (0,849 %), skupina C (0,247 %) – *S. dysgalactiae* (0,096 %) a blíže nespécifikované kmeny (0,151 %), skupina G (0,073 %) – *S. canis* (0,001 %) a ostatní kmeny skupiny G (0,072 %), skupina F (0,496 %) – *S. anginosus* (0,279 %), *S. constellatus* (0,087 %), forma minuta (0,106 %) a blíže neurčené kmeny (0,024 %). Dále bylo izolováno 360 izolátů (0,089 %). Tmavě jsou zvýrazněné sloupce jednotlivých skupin, které odpovídají celkové prevalenci dané skupiny.

Prevalence výskytu těchto druhů, potažmo skupin betahemolytických streptokoků v jednotlivých letech jsou zobrazeny v grafu níže (Obr. 32). Průměrná hodnota výskytu prevalence těchto druhů byla stanovena na 0,31 %, kterou v grafu představuje červená linie. Nadprůměrný výskyt ve všech letech výzkumu byl zaznamenán u dvou skupin sledovaných streptokoků – GAS a GBS. S nejvyššími hodnotami prevalence se vyskytovaly izoláty GBS, u kterých bylo možné pozorovat trend pozvolného nárůstu prevalence s mírnou odchylkou v roce 2017. Během šesti let pozorování se prevalence GBS zvýšila z hodnoty 0,763 % na hodnotu 0,942 %, kdy hodnota maximální prevalence patřila právě roku 2018. Pro GAS se meziroční hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,372 % až 0,601 %, kdy maximální hodnoty prevalence byly zaznamenány v roce 2016 (0,601 %).

S vysokými hodnotami prevalence se také vyskytovaly izoláty spadající do skupiny F, avšak během sledovaného období se počet izolátů zvětšil o více než čtyřnásobek. Od roku 2013 (0,174 %) byl pozorován prudký nárůst až do roku 2017 (0,757 %), hodnota prevalence výskytu v posledním roce pozorování byla pouze o tisícinu nižší (0,753 %).

Ostatní izoláty spadající do skupin C, G a další nezařazené betahemolytické streptokoky se vyskytovaly v podprůměrném množství. Izoláty skupiny C se pohybovaly s hodnotami výskytu

v rozmezí 0,215 - 0,285 %, s maximem v roce 2015. U skupiny G a nezařazených beta-hemolytických streptokoků byl pozorován pozvolný meziroční pokles.

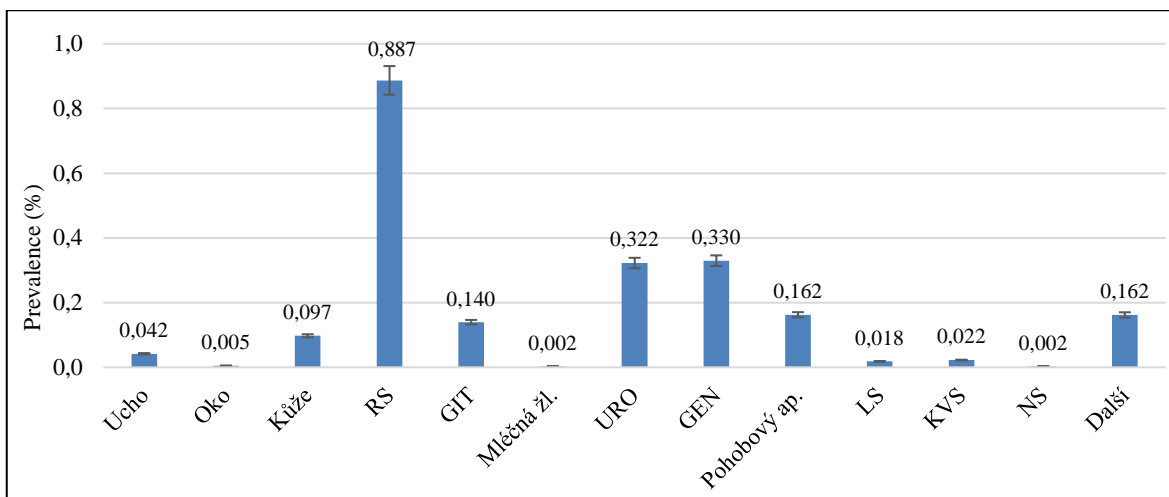


**Obr. 32: Meziroční prevalence výskytu jednotlivých druhů beta-hemolytických streptokoků z humánních pacientů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%).** Vzorky byly izolovány a identifikovány na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Červená linka znázorňuje průměrnou hodnotu prevalence (0,31 %) sledovaného období. Sledované druhy a celkové množství jejich izolátů GAS, GBS, Skupina C, Skupina G, Skupina F a nezařazené beta-hemolytické streptokoky.

Humánní streptokoky se vyskytují napříč různými orgánovými soustavami, stejně jako jejich animální analogy (Obr. 33). Jejich spektrum výskytu je široké, co se týče rozsahu hodnot prevalence i míst výskytu. Na rozdíl od animálních výsledků byla v animální statistice skupina urogenitálních izolátů rozdělena na dvě samostatné skupiny urologické a genitální soustavy.

V rámci zařazování izolátů bylo nutné generalizovat místa výskytu do jednotlivých skupin, následující přehled je zobrazuje: **Ucho; Oko** - spojivky; **Kůže** - tvář, nehet, čelo, impetigo, pitva kůže; **RS (respirační soustava)** - stěra a výtěr dutiny nosní, tkáň, nosohltan, pitva nosohltanu, sekret dutin, stěra a výtěr krku, bronchoalveolární laváž, punkce hrudníku, tracheotomická kanyla; **GIT (gastrointestinální soustava)** - dutina ústní, jazyk, jícn, žluč, dutina břišní (punktát, hnis a stěra sliznice), peritoneum, appendix, konečník, stolice; **Mléčná žláza; URO (urologická soustava)** - moč, uretra; **GEN (genitální soustava)** - skrotum, vulva, pochva, penis, ejakulát a plodová voda; **Pohybový aparát** - punktáty dolní a horní končetiny, kloubní náhrady, rány, pahýl, bércový vřed; **LS (lymfatická soustava)** - mandle, punktát mandlí; sekret dutin; **KVS (kardiovaskulární soustava)** - hemokultura; **NS (nervová soustava)** - pitva mozku, likvor, punktát hlava; **Další** - hnis, absces, jehla, pitva bez udání lokace, punktát, tkáň, biopsie, endosekret.

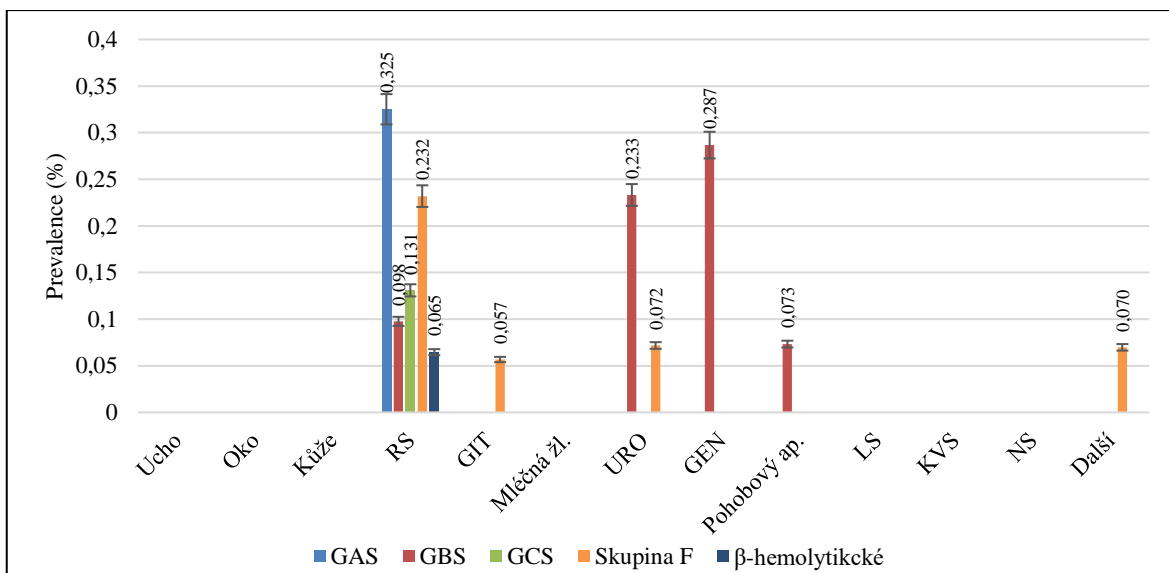
V grafu (Obr. 33) lze vidět, že největší záchyty beta-hemolytických streptokoků byly z respirační soustavy (0,887 %). Následovaly soustavy urologická (0,322 %) a genitální (0,33 %), které dohromady jako urogenitální soustava dosahovaly prevalence (0,652 %). Další v pořadí byly nezařazené izoláty (0,162 %), gastrointestinální trakt (0,14 %), kůže (0,097 %) a ucho (0,042 %).



**Obr. 33:** Celkové prevalence výskytu skupiny betahemolytických streptokoků v jednotlivých orgánových soustavách. Izoláty humánních pacientů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%). Vzorky byly izolovány a identifikovány na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Orgánové soustavy – Ucho, oko, kůže, respirační trakt (RS), gastrointestinální trakt (GIT), mléčná žláza, urologická soustava (URO), genitální trakt (UGS), pohybový aparát (Pohybová ap.), lymfatický systém (LS), kardiovaskulární systém (KVS), nervová soustava (NS) a další blíže nelokalizované izoláty.

Následující dva grafy jsou detailním zpracováním předchozího grafu. Výsledky byly rozděleny do dvou grafů z důvodu velké variability hodnot prevalencí výskytu. První graf (Obr. 34) zobrazuje prevalence dominantních druhů s výskytem od hodnoty 0,05 % výše. Zatímco druhý graf (Obr. 35) zobrazuje prevalence výskytu méně častých druhů do hodnoty 0,049 %.

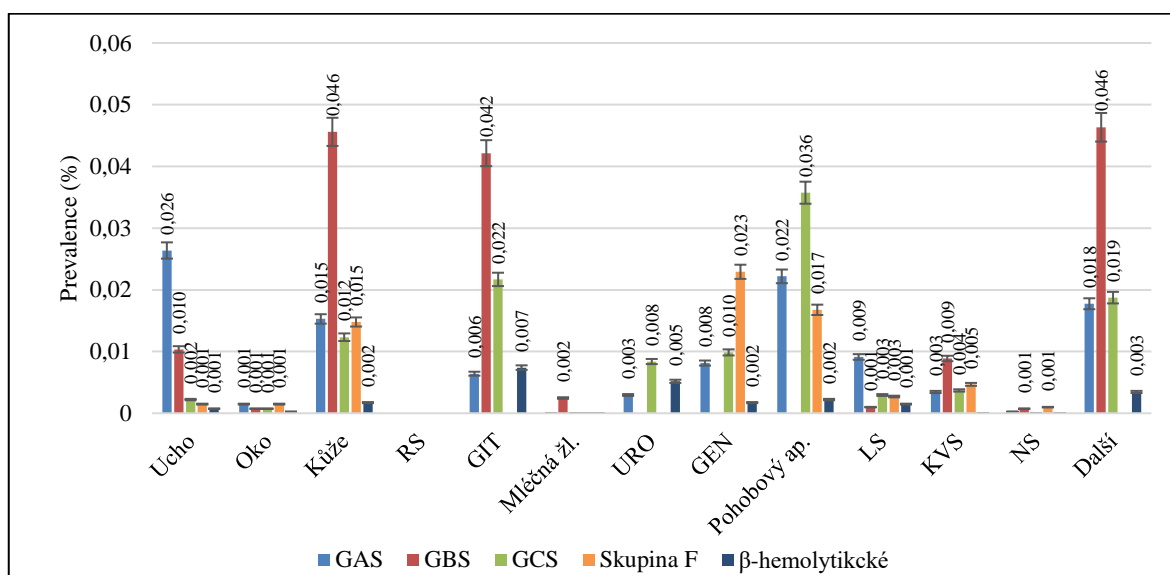
V prvním grafu (Obr. 34) je možné pozorovat častý výskyt hned pěti skupin v respiračním traktu: GAS (0,325 %), GBS (0,098 %), GCS (0,131 %), skupina F (0,232 %) a ostatních betahemolytických streptokoků (0,065 %).



**Obr. 34:** Celkové prevalence výskytu jednotlivých druhů betahemolytických streptokoků v jednotlivých orgánových soustavách. Izoláty humánních pacientů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%). Zobrazeny jsou pouze izoláty s hodnotami prevalence >0,05 %. Vzorky byly izolovány a identifikovány na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Orgánové soustavy – Ucho, oko, kůže, respirační trakt (RS), gastrointestinální trakt (GIT), mléčná žláza, urologická soustava (URO), genitální trakt (UGS), pohybový aparát (Pohybová ap.), lymfatický systém (LS), kardiovaskulární systém (KVS), nervová soustava (NS) a další blíže nelokalizované izoláty.

V gastrointestinální soustavě se vyskytovaly ve větším množství pouze izoláty patřící do skupiny F (0,057 %). V urologické soustavě se ve velkém množství vyskytovaly izoláty GBS (0,233 %) a skupiny F (0,072 %), obdobné záznamy byly i u genitální soustavy: izoláty GBS (0,287 %). V urogenitální soustavě se dohromady vyskytovaly izoláty GBS o celkové prevalenci 0,52 %. Izoláty skupiny F (0,07 %) se dále vyskytovaly ve vyšším množství také v dalších blíže nespecifikovaných orgánových soustavách.

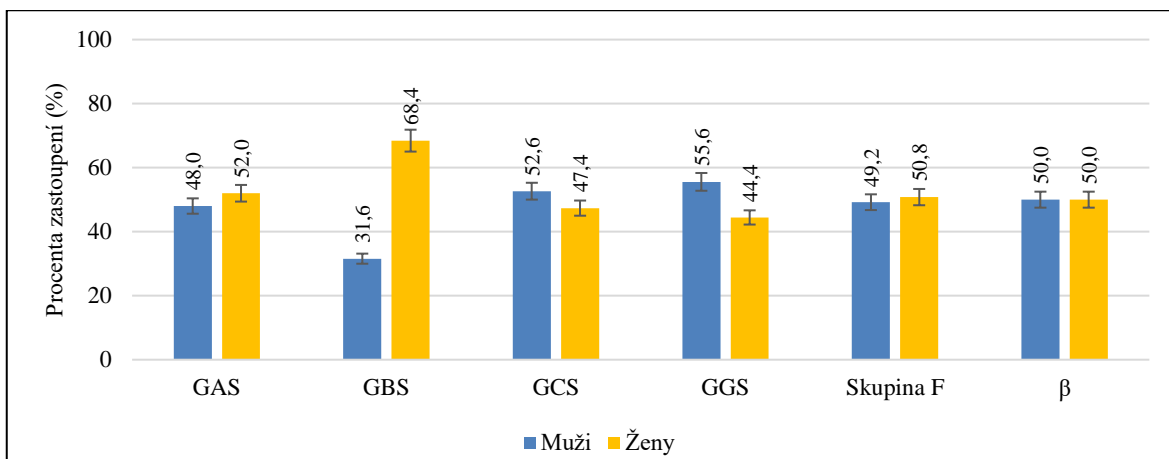
Ve druhém z těchto detailních grafů (Obr. 35) jsou vyobrazeny izoláty s hodnotami prevalence <0,049 %. Nejvyšších hodnot dosahuje opět GBS a to hned v několika orgánových soustavách: kůže (0,046 %), gastrointestinální trakt (0,042 %) a také v blíže neurčených materiálech (sloupec další) (0,046 %). Za zmínku také stojí přítomnost GGS v respirační soustavě (0,036 %), GAS v uchu (0,026 %), nebo přítomnost GCS v pohybovém aparátu (0,036 %). Zbylé hodnoty prevalence výskytu byly menší než 0,023 %.



**Obr. 35: soustavách. Izoláty humánních pacientů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%). Zobrazeny jsou pouze izoláty s hodnotami prevalence <0,049 %.** Vzorky byly izolovány a identifikovány na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Orgánové soustavy – Ucho, oko, kůže, respirační trakt (RS), gastrointestinální trakt (GIT), mléčná žláza, urologická soustava (URO), genitální trakt (UGS), pohybový aparát (Pohybová ap.), lymfatický systém (LS), kardiovaskulární systém (KVS), nervová soustava (NS) a další blíže nelokalizované izoláty.

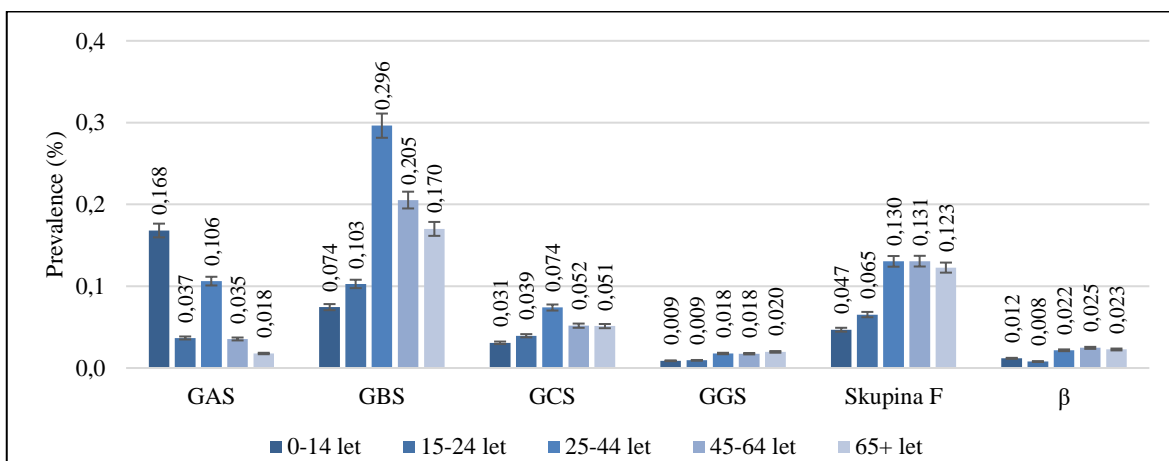
Následující graf (Obr. 36) zobrazuje procentuální zastoupení (%) jednotlivých skupin betahemolytických streptokoků napříč pohlavími u humánních pacientů. Procenta byla ve všech případech vypočítána vždy v rámci jedné skupiny, tj. počet izolátů získaných u muže/ženy, vydělený jednou setinou celkového počtu izolátů jedné skupiny. U následujících skupin bylo zastoupení mezi pohlavími vyrovnané  $\pm 2,5$  %: GAS, CGS, skupina F a ostatní betahemolytické streptokoky. Naopak značný rozdíl ve výskytu bylo možné pozorovat u *S. agalactiae* (GBS), kdy u žen se vyskytoval v procentuálním zastoupení 68,4 %, zatímco u mužů s hodnotami 31,6 %.





**Obr. 36: Procentuální zastoupení betaheolytických streptokoků u mužů a žen. Izoláty humánních pacientů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%).** Vzorky byly izolovány a identifikovány na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. GAS (*S. pyogenes*), GBS (*S. agalactiae*), GCS (Skupina C streptokoci), GGS (Skupina G streptokoci), β (ostatní, blíže nezařazené betaheolytické streptokoky).

Poslední graf (Obr. 37) zobrazuje prevalence zastoupení (%) jednotlivých skupin betaheolytických streptokoků napříč věkovými skupinami humánních pacientů. Pacienti byli rozděleny do pěti skupin dle věku: 0-14 let, 15-24 let, 25-44 let, 45-64 let, 65+ let. *S. pyogenes* (GAS) byl nejčastěji izolován u dětí ve věku 0-14 let (0,168 %) a také u věkové skupiny 25-44 let (0,106 %). *S. agalactiae* (GBS) se nejčastěji vyskytovaly v izolátech věkové skupiny 25-44 let (0,296 %). Tato věková skupina byla také nejčastějším místem výskytu pro GCS (0,074 %). Největší množství izolátů skupiny F spadalo do věkové skupiny 45-64 let, stejně jako u ostatních betaheolytických streptokoků (0,022 %) a GGS (0,02 %).



**Obr. 37: Prevalence věkového zastoupení pacientů betaheolytických streptokoků u humánních pacientů během sledovaného období v letech 2013-2018, hodnoty uvedeny v procentech (%).** Vzorky byly izolovány a identifikovány na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Pacienti byli rozděleni do pěti skupin dle věku: 0-14 let, 15-24 let, 25-44 let, 45-64 let, 65+ let

## 16 Diskuse

V rámci experimentální části této diplomové práce byly na základě experimentálních a statistických postupů získány výsledky, dle kterých bylo možné vytvořit ucelený přehled informací týkající se problematiky betahemolytických streptokoků vyskytujících se u zvířat a lidí. Experimentální část byla složena ze čtyř částí, kdy první část měla za cíl zjistit změny prevalence betahemolytických streptokoků v letech 2013-2018 u animálních pacientů. Druhou částí bylo popsat a zhodnotit změny antimikrobiální citlivosti výše uvedených mikrobů u animálních pacientů v letech 2013-2018 a třetím cílem bylo zhodnotit spolehlivost údajů mikrobiální citlivosti porovnáním velkého a malého seskupení dat. Poslední čtvrtá část se zabývala změnami prevalence betahemolytických streptokoků u humánních pacientů v letech 2013-2018. Výsledky získané z veterinární a humánní sféry byly porovnány.

Prevalence je základní epidemiologická veličina, která v mikrobiologii představuje podíl počtu jedinců s pozitivním nálezem konkrétního mikroorganismu z celkového počtu všech jedinců sledované populace, vztažené k určitému časovému období. Významné změny prevalencí mikroorganismů v populaci mohou vést k preventivním a terapeutickým opatřením a také k volbě správné léčby animálních i humánních pacientů.

Zjištěné hodnoty prevalence výskytu betahemolytických streptokoků u animálních pacientů během let 2013-2018 v této práci jsou zobrazeny v grafech (Obr. 13-15). Nálezy všech betahemolytických streptokoků u zvířat vykazovaly průměrnou hodnotu  $1,56 \pm 0,41$  %, kdy maximální hodnoty prevalence bylo dosaženo v roce 2013 (2,48 %). Dále byly určeny prevalence výskytu zastoupení sedmi pozorovaných druhů betahemolytických streptokoků (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. canis*, *S. equi*, *S. porcinus*, *S. pyogenes* a *S. anginosus*), jejichž průměrná hodnota prevalence byla 0,22 %. V největší míře se vyskytoval dle očekávání druh *S. canis* (0,694 %), jakožto mikrob často kolonizující kůži, respirační i urogenitální trakt (Pinho, 2019) a také druh *S. dysgalactiae* (0,5 %), veterinární patogen způsobující mastitidy nejen u hovězího dobytka (Jensen, 2012). Meziroční hodnoty prevalence u všech sedmi druhů byly následující: u druhu *S. dysgalactiae* byl pozorován klesající trend výskytu během celého sledovaného období 2013 (0,85 %), 2014 (0,56 %), 2015 (0,57 %), 2016 (0,48 %), 2017 (0,34 %) a 2018 (0,27 %), což s největší pravděpodobností souvisí se zlepšením hygieny ve veterinární sféře, především v oblasti získávání mléka. Hodnoty prevalence výskytu *S. agalactiae* meziročně také rapidně klesly, lze tedy stanovit stejný závěr jako v případě *S. dysgalactiae*. U druhu *S. canis* hodnoty oscilovaly v rozmezí 0,56-0,8 %, obdobně jako u *S. equi* (0,1-0,5 %), lze tedy považovat výskyt těchto druhů u zvířat za ustálený.

V rámci výskytu betahemolytických streptokoků v orgánových soustavách zvířat bylo na základě literární rešerše předpokládáno, že největší prevalence bude právě u izolátů z kůže (Reglinski, 2015), avšak na základě našich výsledků v grafech (Obr. 16-18), jasně dominuje výskyt izolátů v mléčné žláze (0,645 %), ze které byly majoritně izolovány dva druhy *S. dysgalactiae* (0,42 %) a *S. agalactiae*

(0,22 %). Dalšími často napadanými orgánovými soustavami byly gastrointestinální (0,258 %), kůže (0,21 %), ucho (0,198 %) a respirační trakt (0,126 %) a oko (0,1 %), ve kterých měl majoritní zastoupení také *S. canis* s následujícími hodnotami prevalence: gastrointestinální trakt (0,245 %), kůže (0,133 %), ucho (0,173 %), respirační trakt (0,053 %) a oko (0,075 %). Zajímavým faktem bylo spektrum betahemolytických streptokoků u jednotlivých skupin zvířat. Téměř poloviční procentuální zastoupení betahemolytických streptokoků (49,66 % kmenů) měli masožravci, dále přežvýkavci (41,83 %) a lichokopytníci (6,95 %), v minoritním zastoupení se vyskytovaly u exotických druhů savců, ptáků i plazů, popřípadě u hlodavců (0,05-0,90 %).

Druhým cílem bylo zjistit změny v citlivosti k antimikrobiálním látkám u konkrétních druhů streptokoků v letech 2013-2018 (Obr. 20-23). V rámci experimentální části byla testována citlivost k 11 antibiotikům: chloramfenikolu, tetracyklinu, erytromycinu, gentamicinu, klindamycinu, cefalotinu, enrofloxacinu, ampicilinu, amoxycilin klavulanátu, bacitracinu a u velkého seskupení dat i kotrimoxazolu u čtyř nejčastěji vyskytujících se druhů (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equi* a *S. canis*). Antimikrobiální citlivost je nepřímo úměrná antimikrobiální rezistenci. Pro porovnávání těchto hodnot bylo v experimentální části práce použito procentuální vyjádření.

Druh *S. agalactiae* vykazoval ze všech čtyř blíže zkoumaných druhů nejvíce různorodé výsledky testů citlivosti. U 3 antibiotik byla vyhodnocena citlivost v rozmezí 97-100 % (cefalotin, ampicilin, amoxycilin klavulanát). S výjimkou roku 2017 byla velmi dobrá citlivost pozorována i u chloramfenikol (75-100 %). Pozvolný pokles citlivosti byl zaznamenán u enrofloxacinu (55-67 %). Velmi nevyrovnané meziroční výsledky citlivosti vykazovaly další 4 antibiotika (tetracyklin, erytromycin, gentamicin a bacitracin). U následujícího sledovaného druhu *S. dysgalactiae* byl pozorován pokles citlivostí ke 3 testovaným antibiotikům (tetracyklin, enrofloxacin, bacitracin), přičemž nejnižší hodnoty citlivosti byly pozorovány u tetracyklinu (11,1-16,6 %). Tato účinná látka by mohla být vzhledem k vysokým hodnotám rezistence z medicínského hlediska u výše uvedeného druhu považována za nevhodnou k léčbě. Nárůst citlivostí byl pozorován u 2 antibiotik, u klindamycinu (60,67-85,29 %) a kotrimoxazolu (88,13-100 %). Velmi dobrá citlivost 90-100 % byla pozorována u gentamicinu, cefalotinu, ampicilinu a amoxycilin klavulanátu. Izoláty *S. equi* vykazovaly ve sledovaném období pokles citlivosti ke 3 antibiotikům (erytromycinu (88,2-91,6 %), gentamicinu (94,4-100 %) a klindamycinu (82,3-85,7 %). Velmi dobrou citlivost (90-100 %) po celou dobu testování vykazovaly izoláty tohoto druhu ke 4 antibiotikům (gentamicin, cefalotin, ampicilin a amoxycilin klavulanát). Hodnoty citlivosti u zbylých antibiotik kolísaly. Nutno zmínit, že nejvyšší hodnoty rezistence byly pozorovány opět u tetracyklinu (27-93 %). U izolátů druhu *S. canis* byly velmi vyrovnané citlivosti pro jednotlivá antibiotika v rámci let 2013-2018. Meziroční změny citlivostí kolísaly u testovaných antibiotik v rozmezí 0-16 %. *S. canis* byl v 96-100 % případů citlivý k následujícím 5 antibiotikům: chloramfenikolu, gentamicinu, cefalotinu, ampicilinu a amoxycilin klavulanátu. Nejnižší hodnoty citlivosti byly opět pozorovány u tetracyklinu (17,11-33,33 %) a bacitracinu (72,46-89,13 %). Statisticky významné nárůsty a poklesy

antimikrobiální citlivosti mohou vést k úpravě terapeutických programů, i zavedení optimálních preventivních opatření. Antibiotika s výrazným poklesem citlivosti bývají v praxi vyřazována a nahrazována jinými antibiotiky s cílem snížení výskytu častých rezistentních kmenů. Využití neúčinného antibiotika je rizikové z důvodu zatížení organismu pacienta a vzniku nových rezistencí u jiných druhů mikroorganismů.

Třetím cílem této diplomové práce bylo zhodnocení spolehlivosti údajů mikrobiální citlivosti porovnáním velkého a malého seskupení dat. Pro analýzu malého počtu dat bylo izolováno v období 10/2018-02/2019 celkem 105 izolátů betahemolytických streptokoků s převažujícím procentuálním zastoupením *S. canis* (67,6 %), *S. dysgalactiae* (16,2 %), *S. equi* (12,4 %), *S. agalactiae* (2,9 %) a *S. porcinus* (1 %). U izolátů *S. agalactiae* byla prokázána 100% citlivost k 6 antibiotikům (chlormafenikol, erytromycin, klindamycin, cefalotin, ampicilin a amoxycilin klavulanát), naopak tetracyklin vykazoval vysokou rezistenci (100 %). U dvou antibiotik (bacitracin, gentamicin) byla zaznamenána citlivost (33,3 %), rezistence (33,3 %) a intermediarita (33,3 %) ve stejných poměrech. Tetracyklin, gentamicin i bacitracin jsou tedy pro potenciální léčbu infekcí způsobených těmito streptokoky z medicínského hlediska nepříliš vhodná. U *S. dysgalactiae* byla prokázána 100% citlivost k 5 antibiotikům (chlormafenikol, erytromycin, cefalotin, ampicilin, amoxycilin klavulanát). Překvapivým zjištěním bylo, že 88 % izolátů tohoto druhu bylo citlivých na tetracyklin. Z medicínského hlediska byly jako nevhodná léčiva v případě tohoto druhu streptokoka označena enrofloxacin (citlivost 41,18 %) a bacitracin (citlivost 58,82 %). U izolátů *S. equi* byla zaznamenána stoprocentní citlivost ke 4 antibiotikům (erytromycin, cefalotin, ampicilin, amoxycilin klavulanát). Zcela nevhodné pro léčbu onemocnění způsobených tímto druhem jsou antimikrobní látky tetracyklin (rezistence 100 %), enrofloxacin (rezistence 69,23 %, intermediarita 30,77 %) a bacitracin (citlivost pouze v 7,69 %). Izoláty druhu *S. canis* vykazovaly ze 100 % citlivost ke 2 antibiotikům (ampicilin, amoxycilin klavulanát), velmi dobrá citlivost byla pozorována také u chloramfenikolu (98,59 %), klindamycinu (84,51 %) a cefalotinu (98,59 %). Vzhledem k vysokým hodnotám rezistence, či intermediarity by z medicínského hlediska mohla být označena 4 antibiotika jako nevhodná pro potenciální léčbu (tetracyklin (rezistence 92,96 %, intermediarita 4,23 %), erytromycin (rezistence 83,1 %, intermediarita 1,41 %), gentamicin (rezistence 95,7 %) a enrofloxacin (rezistence 59,3 %, intermediarita 9,86 %).

Obecně platí pravidlo, že čím větší soubor dat (počet vzorků, počet izolovaných kmenů, počet mikrobiálních kmenů testovaných na antimikrobní citlivost) je použit pro danou statistiku, tím větší pravděpodobnost, že výsledky reprezentují skutečný stav ve zkoumané populaci. Na základě získaných výsledků malého a velkého souboru dat bylo možné porovnat výsledky mikrobiální citlivosti k daným antibiotikům. V našem měření se údaje antimikrobiálních citlivostí spočítané z malého souboru dat (105 izolátů) lišily u jednotlivých testovaných druhů o následující hodnoty: *S. dysgalactiae* (6,44 %), *S. agalactiae* (4,49 %), *S. equi* (26,89 %), *S. canis* (25,71 %). Na základě

těchto rozdílů lze tvrdit, že antimikrobiální citlivost spočítána pouze na základě malého počtu mikroorganismů není spolehlivým údajem v porovnání s velkou skupinou dat (Chaloupka, 2019).

V humánní sféře byl analyzován datový soubor ze stejného období (Obr. 30-32), ovšem počet zpracovaných vzorků byl trojnásobný na pracovišti Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého oproti Státnímu veterinárnímu ústavu Olomouc. Průměrná hodnota prevalence výskytu všech betahemolytických streptokoků ( $2,19 \pm 0,3$  %) byla o 0,63 % vyšší než u animálních pacientů. Maximální hodnoty prevalence bylo dosaženo v roce 2016 (2,57 %). V humánní sféře je preferováno zařazování streptokoků do skupin dle Lancefieldové (Skupina A - *S. pyogenes*; skupina B - *S. agalactiae*; C - *S. dysgalactiae*; skupina G - *S. canis*; skupina F – *S. anginosus*, *S. constellatus*, forma minuta). Na základě tohoto rozřazení bylo možné pozorovat v grafu následující výsledky. Dominantní hodnotu představovala prevalence výskytu *S. agalactiae* (0,849 %), která byla téměř dvojnásobná v porovnání s hodnotami výskytu ostatních druhů. Vysoké hodnoty prevalence byly u tohoto druhu očekávány především kvůli jeho častému výskytu v porodních cestách žen a neonatálních infekcích (Brochet, 2006; Raabe, 2019). Pro porovnání se tento druh v animální sféře vyskytoval s hodnotami prevalence 3x nižšími (0,253 %). Druh *S. pyogenes* se vyskytoval v podstatně vyšší míře (0,439 %) u humánních pacientů v porovnání s animálními (0,005 %). Bylo tak potvrzeno, že tento druh je převážně humánním patogenem, avšak není vyloučen zoonotický přenos (Spickler, 2005). Naopak izoláty skupiny G dle Lancefieldové, do které spadá *S. canis*, se v humánní sféře vyskytovaly v minoritním množství (0,073 %) oproti animální sféře (0,694 %). Streptokoky skupiny F se u humánních pacientů vyskytovaly také hojně (0,496 %), naopak u animálních pacientů nebyl po dobu šesti let potvrzen ani jeden izolát z této skupiny. Toto zjištění koreluje s informacemi shrnutými v teoretické části této práce, doposud byl v odborné literatuře prokázán pouze ojedinělý výskyt *S. constellatus* u zvířete (pes) (De Martino, 2012). U skupiny C byly prokázány nižší hodnoty prevalence výskytu (0,096 %), do které patří i *S. dysgalactiae*. Naopak u zvířat byl tento druh zastoupen častěji (0,5 %) než v humánní sféře. Poslední z výše zmíněných grafů zobrazuje meziroční hodnoty prevalence výskytu jednotlivých druhů u humánních pacientů, u kterých si lze všimnout vzrůstajícího trendu u dvou skupin betahemolytických streptokoků – GBS (*S. agalactiae*) 2013 (0,763 %) až 2018 (0,942 %), a skupiny F 2013 (0,174 %) až 2018 (0,753 %). Naopak klesající trend hodnot byl zaznamenán v humánní sféře u skupiny G (0,108-0,004 %) a skupiny blíže nezařazených betahemolytických streptokoků (0,139-0,04 %). U skupiny blíže nezařazených streptokoků může pokles značit zdokonalení identifikačních postupů během daného časového úseku. Výskyt více méně konstantních hodnot si lze všimnout u izolátů skupiny A (2013 (0,372 %), 2014 (0,36 %), 2015 (0,449 %), 2016 (0,601 %), 2017 (0,406 %), 2018 (0,429 %)), a také u skupiny C (2013 (0,215 %), 2014 (0,253 %), 2015 (0,285 %), 2016 (0,281 %), 2017 (0,216 %), 2018 (0,23 %)). Jediný výkyv prevalence byl zaznamenán v roce 2016 u *S. pyogenes* (GAS), který se promítl i v hodnotách prevalence výskytu betahemolytických pacientů jako celku, kdy právě v roce 2016 bylo dosaženo maximálních hodnot (2,57 %).

V rámci výskytu betahemolytických streptokoků v orgánových soustavách lidí (Obr.33-35) byl na základě literární rešerše předpokládán majoritní výskyt v urologické soustavě, genitálním a respiračním traktu (Dermer, 2004; Chhatwal, 2017). Tato hypotéza byla potvrzena majoritním výskytem betahemolytických streptokoků v respiračním traktu (0,887 %), urologické soustavě (0,322 %) a genitálním traktu (0,33 %). Což ukazuje diametrální rozdíl mezi místy lokalizace u humánních a animálních izolátů. Výše zmíněné orgánové soustavy byly s největší měrou osidlovány právě izoláty GBS a skupinou F.

Zajímavým pozorováním bylo také procentuální zastoupení jednotlivých druhů betahemolytických streptokoků u mužů a žen (Obr. 36). Největší rozdíl byl pozorovatelný u *S. agalactiae* (muži 31,6 %, ženy 68,4 %), což je dáno častým výskytem tohoto druhu u žen, rodiček (Raabe, 2019). Tento fakt byl ověřen i při zobrazení prevalence věkového zastoupení pacientů (Obr. 37), kdy největší zastoupení GBS byl pozorován u žen produktivního věku z věkové skupiny 25-44 let (0,296 %), z celkové hodnoty prevalence 0,849 % tohoto druhu. Naopak mírná převaha výskytu těchto mikroorganismů u mužů byla pozorovaná u skupiny C (52,6 %) a skupiny G (55,6 %). Při detailním zaměření se na věkové zastoupení pacientů si lze všimnout, že 0,168 % z celkového počtu izolovaných GAS (0,439 %) pocházela z pacientů ve věku 0-14 let (Raabe, 2019; Spickler, 2005). Naopak kmeny skupiny F s celkovou hodnotou prevalence (0,496 %) napadaly spíše starší věkové skupiny 25-44 let (0,13 %), 45-64 let (0,131 %) a 65+ let (0,123 %).

## 17 Závěr

Diplomová práce se zabývala betahemolytickými streptokoky vyskytujícími se u zvířat a lidí. V teoretické části této práce byla zpracována literární rešerše zabývající se jednotlivými druhy betahemolytických streptokoků, jejich výskytem napříč živočišnými druhy, lidmi a jejich orgánovými soustavami. V teoretické části byla zpracována také problematika globálně stoupajících rezistencí k antibiotikům u této skupiny mikroorganismů.

V experimentální části byla zpracována data hodnotící dynamiku změn prevalence výskytu a změn v citlivosti k antimikrobiálním látkám u betahemolytických streptokoků v období let 2013-2018 u animálních pacientů, izolovaných a identifikovaných na Státním veterinárním ústavu Olomouc. Dále byla analyzována stejná skupina streptokoků z humánních hostitelů v letech 2013-2018, izolovaných a identifikovaných na Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

U humánních pacientů bylo ve sledovaném období vyšetřeno 3,29x více klinických vzorků a byl zde zaznamenán 4,64x vyšší záchyt kmenů betahemolytických streptokoků než u zvířat. Maximální hodnoty výskytu betahemolytických streptokoků bylo u zvířat dosaženo v roce 2013, zatímco u lidí v roce 2016. Mezi nejvíce zastoupené druhy betahemolytických streptokoků se v animální říši řadily druhy *S. canis*, *S. dysgalactiae* a *S. agalactiae*. Současně u druhu *S. dysgalactiae* došlo k největším změnám v meziročních hodnotách prevalence, kdy se hodnoty prevalence výskytu snížely až o třetinu původní hodnoty. U humánních pacientů byla skladba nejhojněji izolovaných betahemolytických druhů odlišná, nejvíce zastoupenými druhy byly *S. agalactiae*, kmeny skupiny F a *S. pyogenes*.

Míra výskytu betahemolytických streptokoků v orgánových soustavách humánních a animálních pacientů nekorelovala. U animálních pacientů byly s největšími hodnotami prevalence osidlovány mléčná žláza, gastrointestinální trakt a kůže. Naopak u humánních pacientů byly izoláty betahemolytických streptokoků nejčastěji získávány z respiračního, urogenitálního a genitálního traktu. Betahemolytické streptokoky byly častěji izolovány u pacientů ženského pohlaví. Věk pacientů napadnutých betahemolytickými streptokoky se lišil v závislosti na skupině daného kmene. Izoláty druhu *S. pyogenes* byly nejčastěji izolovány z pacientů ve věku 0-14 let, *S. agalactiae* dominoval u pacientů ve věku 25-44 let, zatímco skupina F byla ve velké míře izolována u pacientů ve věku 25+ let.

Výsledky antimikrobiální citlivosti betahemolytických streptokoků ve vzorcích SVÚ Olomouc v období 2013-2018 poukázaly na následující fakta. Prvním a značně znepokojujícím závěrem byla rezistence bakterií k tetracyklinu, který je jedním z nejčastěji využívaných antibiotik nejen ve veterinární medicíně, a také bacitracinu, především u druhů *S. agalactiae* a *S. equi*. Na druhou stranu, velmi uspokojivý výsledek byl pozorován při studiu citlivosti betahemolytických streptokoků k ampicilinu, amoxicilin klavulanátu a chloramfenikolu.

Na základě velkého rozmezí rozdílů (4,49-26,89 %) mezi údaji o antimikrobiálních citlivostech mezi malým a velkým souborem dat bylo i zde potvrzeno, že stanovování závěrů na základě dat pouze v malém počtu vzorků je nepřesné. Na základě těchto výsledků lze souhlasit s názorem kolegy Mgr. Ondřeje Chaloupky, které zveřejnil ve své diplomové práci v roce 2018. Pro rozhodování o plošných aplikacích antimikrobiálních látek v humánní i veterinární praxi by tedy mělo být preferováno hodnocení velkých souborů dat.



## 18 Seznam literatury

- Abraham T., Sistla S. (2018) Trends in antimicrobial resistance patterns of Group A streptococci, molecular basis and implications. *Indian J. Med. Microbiol.*, **36**, 186-191.
- Alves-Barroco C., Roma-Rodrigues C., Raposo L. R., Brás C., Diniz M., Caço J., Costa P. M., Santos-Sanches, I., Fernandes A. R. (2019) *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolated from milk of the bovine udder as emerging pathogens: In vitro and in vivo infection of human cells and zebrafish as biological models. *MicrobiologyOpen*, **8**, e00623.
- Ambroski R. L., Snider T. G., Thune R. L., Culley D. D. (1983) A non-hemolytic, group B streptococcus infection cultured bullfrogs, *Rana catesbeina*, in Brazil. *Wildlife Dis.*, **19**, 180-184.
- Avendaño-Herrera R., Molina A., Magarinos B., Toranzo A., Smith P. (2011) Estimation of epidemiological cut-off values for disk diffusion susceptibility test data for *Streptococcus phocae*. *Aquacult.*, **314**, 44-48.
- Ayer V., Tewodros W., Manoharan A., Skariah S., Feng L., Bessen D. E. (2007) Tetracycline resistance in group A streptococci: Emergence on a global scale and influence on multiple-drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 1865-1868.
- Bennett J. E., Blaser M. J., Dolin R. (2015) Mandell, Douglas, Bennett's Principles and practice of infectious diseases 8th edition, pp. 452-462, Elsevier Saunders, Philadelphia, PA.
- Baracco G. J. (2019) Infections Caused by Group C and G Streptococcus (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and others): Epidemiological and Clinical Aspects. *Microbiol. Spectr.*, **7**, 1-11.
- Barr D.A., Seaton R.A. (2013) Outpatient parenteral antimicrobial therapy (OPAT) and the general physician. *Clin. Med. (Lond.)*, **13**, 495-499.
- Barry A. L., Feeney K. L. (1967) Two Quick Methods for Voges-Proskauer Test. *Appl. Microbiol.*, **15**, 1138-1141.
- Becker W. C. (1916) The necessity of a standard blood-agar plate for the determination of hemolysis by streptococci. *J. Infect. Dis.*, **19**, 754-759.
- Bekal S., Gaudreau C., Laurence R. A., Simoneau E., Raynal L. (2006) *Streptococcus pseudoporcinus* sp. nov., a novel species isolated from the genitourinary tract of women. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2584-2586.
- Bessen D. E. (2009) Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*, *Infect. Genet. Evol.*, **9**, 581-593.
- Billroth T. (1874) Untersuchungen über die Vegetationsformen von Coccobacteria septica und der Antheil, welchen sie an der Entstehung und Verbreitung der accidentellen Wundkrankheiten haben, pp. 1-238, G. Reimer, Berlin.
- Binda E., Marinelli F., Marcone G. L. (2014) Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. *Antibiot.*, **3**, 572-594.

- Boyle A. G., Timoney J. F., Newton J. R., Hines M. T., Waller A. S., B. R. Buchanan (2018) *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of stranglers – revised consensus statement. *J. Vet. Intern. Med.*, **32**, 633-647.
- Brandt C. M., Spellerberg B. (2009) Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. *Clin. Infect. Dis.*, **49**, 766-772.
- Brochet M., Couve E., Zouine M., Vallaeys T., Rusniok C., Lamy M., Buchrieser C., Trieu-Cuot P., Kunst F., Poyart C., Glaser P. (2006) Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microb. Infec.*, **8**, 1227-1243.
- Brown E., Wright G. (2016) Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, **529**, 336-343.
- Broyles L. N., Van Beneden C., Beall B., Facklam R., Shewmaker P. L., Malpiedi P., Daily P., Reingold A., Farley M. M. (2009) Population-based study of invasive disease due to beta-hemolytic streptococci of groups other than A and B. *Clin. Infect. Dis.*, **15**, 706-712.
- Buxton A., Fraser G. (1977) Animal microbiology, pp. 169. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Carroll K. C., Butel J. S., Morse S. A., Mietzner T. A. (2013) Jawetz, Melnick & Adelsberg's Medical Microbiology 27th Edition, pp. 213-230, McGraw-Hill Education, USA.
- Chhatwal G.S., Graham R. (2017) International Encyclopedia of Public Health, pp. 87-97, Elsevier Inc.
- Cho C., Tang Y., Chen Y., Wang S., Yang Y., Wang T., Yeh C., Wu K., Jeng M. (2019) Group B Streptococcal infection in neonates and colonization in pregnant women: An epidemiological retrospective analysis. *J. Microbiol. Immunol. Infec.*, **52**, 265-272.
- Collins M. D., Farrow J. A., Katic V., Kandler O. (1984) Taxonomic studies on streptococci of serological groups E, P, U, and V: description of *Streptococcus porcinus* sp., nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**, 402-413.
- De Martino L., Nizza S., De Martinis C., Manzillo V. F., Iovane V., Paciello O., Pagnini U. (2012) *Streptococcus constellatus* – associated pyoderma in a dog. *J. Med. Microbiol.*, **61**, 438-442.
- Dermer P., Lee C., Eggert J., Few B. (2004) A History of Neonatal Group B Streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States, *J. Pediatr. Nurs.*, **19**, 257-363.
- Diernhofer K. (1932) Aesculinbouillon als holfsmittel fur die differenzierung von euter und milchstreptokokken bei massenuntersuchungen. *Milchwirtsch. Forsch.* **13**, 368-374.
- Dow S. W., Jones R. L., Thomas T.N., Linn K. A., Hamilton H.B. (1987) Group B streptococcal infection in two cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **190**, 71-72.
- Dowd F. J., Jonsons B.S., Mariorri A. J. (2017) Pharmacology and therapeutics for dentistry (seventh edition), pp. 457-487, Mosby, USA.
- Dramsi S., Caliot E., Bonne I., Guadagnini S., Prévost M.C., Kojadinovic M., Lalioui L., Poyart C., Trieu-Cuot P. (2006) Assembly and role of pili in Group B Streptococci. *Mol. Microbiol.*, **60**, 1401-1413.

- Duarte R., Barros R., Facklam R. R., Teixeira L. (2005) Phenotypic and genotypic characteristics of *Streptococcus porcinus* isolated from human sources. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4592-4601.
- Eades C., Hughes S., Heard K., Moore L. (2017) Antimicrobial therapies for Gram-positive infections. *Clinical. Pharmacist.*, 9, online.
- Edwards M. S., Baker C. J. (2015) *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus), In Bennett JEDR, Blaser MJ (ed), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, p 2340–2348. Updated Edition, 8th ed Saunders, Philadelphia, USA.
- Ekelund K., Skinhøj P., Madsen J., Konradsen H. B. (2005) Invasive group A, B, C and G streptococcal infections in Denmark 1999–2002: epidemiological and clinical aspects. *Clin. Microbiol. Infect.*, **11**, 569-576.
- Eskandarian N., Neela V., Ismail Z., Puzi S. M., Hamat R. A., Desa M. N., Nordin S.A. (2013) Group B streptococcal bacteremia in a major teaching hospital in Malaysia: a case series of eighteen patients. *Int. J. Infect. Dis.*, **17**, 777–780.
- Evans A. C. (1936) Studies on Hemolytic Streptococci. II. *Streptococcus pyogenes*, *J. Microbiol.*, **31**, 611-624.
- Eyre D.W., Kenkre J. S., Bowler I., McBride S. (2010) *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* meningitis – a case report and review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **29**, 1459-1463.
- Facklam R. (2002) What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *CMR*, **15**, 613-630.
- Ficai A., Grumezescu A. M. (2017) Nanostructures for antimicrobial therapy, pp 1-22. Elsevier, Amsterdam, NL.
- Ferreti J. J., Stevends D.L., Fischetti V.A. (2016) *Streptococcus pyogenes*: Basic Biology to Clinical Manifestations, pp. 1-26, Oklahoma City (OK), University of Oklahoma Health Sciences Center.
- Falck G. (1997) Group a Streptococci in Household Pets' Eyes – a Source of Infection in Humans?. *Scand. J. Infect. Dis.*, **29**, 469-471.
- Fleming A. (1929) On the bacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.*, **10**, 226-236.
- Friedrichs J., Hungerer S., Werle R., Militz M., Bühren V. (2010) Human bacterial arthritis caused by *Streptococcus zooepidemicus*: report of a case. *Int. J. Infect. Dis.*, **14S**, e223-235.
- Frost W.D., Engelbrecht M.A. (1940) The streptococci: their descriptions, classification, and distribution, with special reference to those in milk, pp. 1-172. Willdof Book Company, Illinois, USA.
- Fry R.M. (1938) Fatal Infections by Haemolytic Streptococcus Group B. *Lancet*, **1**, 199–201.
- Galpérine T., Cazorla C., Blanchard E., Boineau F., Ragnaud J. M., Neau D. (2007) *Streptococcus canis* infections in humans: retrospective study of 54 patients. *J Infect.*, **55**, 23–26.

- Garvie E. I., Farrow J. A. E., Bramley A. J. (1983) *Streptococcus dysgalactiae* (Dienhofer) nom. Rev. Int. J. Syst. Evol. Micr., **33**, 404-405.
- Gao J., Yu F., Luo L., He J., Hou R., Zhang H., Li S., Su J., Han B. (2012) Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. *Vet. J.*, **3**, 423-424.
- Greenwood D., Barer M., Slack R., Irving W. (2012) *Meical Microbiology* 18th edition, pp. 54-68, Churchill Livingstone, USA.
- Guthof O. (1956) Pathogenic strains of *Streptococcus viridans*; streptococci found in dental abscesses and infiltrates in the region of the oral cavity. *Zentralbl. Bakteriol. Orig.*, **166**, 553-564.
- Hancock R. E., Diamond G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends. Microbiol.*, **8**, 402-410.
- Harrington D., Sutcliffe I., Chanter N. (2002) The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. *Microbes Infect.*, **4**, 501-510.
- Harris T. O., Shelver D.W., Bohnsack J.F., Rubens C.E. (2003) A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J. Clin. Invest.* **111**, 61-70.
- Harrison C. J., Bratcher D. (2008) Cephalosporins: a review. *Pediatr. Rev.*, **29**, 264-267.
- Hawkey P. M., Livermore D. M. (2012) Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ*, **344**, 1-7.
- Hawkins P.A., Law C. S., Metcalf B. J., Chochua S., Jackson D. M., Westblade L. F., Jerris R., Beall B.W., McGee L. (2017) Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins in *Streptococcus agalactiae* isolates from the USA. *J. Antimicrob. Chemother.*, **72**, 1886-1892.
- Hays C., Louis M., Dmytruk N., Touak G., Trieu-Cuot P., Poyart C., Tazi A. (2016) Changing epidemiology of group B *Streptococcus* susceptibility to fluoroquinolones and aminoglycosides in France. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **60**, 7424-7430.
- Holden M. T. G., Heather Z., Paillot R., Steward K. F., Webb K., Ainslie F., Jourdan T., Bason N., Holdroyd N., Mungall K., Quail M., Sanders M., Simmonds M., Willey D., Brooks K., Aanensen D., Spratt B., Jolley K., Maiden M. C. J., Kehoe M., Chanter N., Bentley S. D., Robinson C., Maskell D., Parkhill J., Waller A. (2009) Genomic Evidence for the Evolution of *Streptococcus equi*: Host Restriction, Increased Virulence, and Genetic Exchange with Human Pathogens. *PLOS Pathog.*, **5**, 1-14.
- Horn D., Zabriskie J., Austrian R., Cleary P., Ferretti J., Fischetti V., Gotschlich E., Kaplan E., McCarty M., Opal S., Roberts R., Tomasz A., Wachtfogel Y. (1998) Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin?. *Clin. Infect. Dis.*, **26**, 1341-1345.
- Chaloupka O. (2018) Studium rezistence vybraných mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Olomouc, 2018. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
- Ilakkiya A., Parveen S., Kumar C. N., Swathi S., (2015) Macrolide resistance in *Streptococcus* species. *J. Pharm. Bioallied Sci.*, **7**, S26-S31.

- Jackson L. A., Hilsdon R., Farley M.M., Harrison L.H., Reingold A.L., Plikaytis B.D., Wenger J.D., Schuchat A. (1995) Risk factors for group B streptococcal disease in adults. *Ann. Intern. Med.*, **123**, 415–420.
- Javed R., Taku A. K., Gangil R., Sharma R. K. (2016) Molecular characterization of virulence genes of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in equines. *Vet. World*, **9**, 875-881.
- Jensen A., Kilian M. (2012) Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 113-126.
- Johnson A. P., Pearson A., Duckworth G. (2005) Surveillance and epidemiology of MRSA bacteremia in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**, 455-462.
- Kapatai G., Patel D., Efstratiou A., Chalker V. J. (2017) Comparison of molecular serotyping approaches of *Streptococcus agalactiae* from genomic sequences. *BMC Genom.*, **18**, 1-11.
- Kimura K., Nishiyama Y., Shimizu S., Wachino J., Matsui M., Suzuki S., Yamane K., Shibayama K., Arakawa Y. (2013) Screening for group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in clinical isolates obtained between 1977 and 2005. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **66**, 222-225.
- Kobo O., Nikola S., Geffen Y., Paul M. (2017) The pyogenic potential of the different *Streptococcus anginosus* group bacterial species: retrospective cohort study. *Epidemiol. Infect.*, **145**, 3065-3069.
- Kornblatt A.N., Adams R.L., Barthold S.W., Cameron G.A. (1983) Canine neonatal deaths associated with group B streptococcal septicemia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **15**, 700-701.
- Kotra L. P., Haddad J., Mobashery S. (2000) Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **44**, 3249-3256.
- Köhler W. (2007) The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, **297**, 133-150.
- Kummeneje K., Nasbakken T., Mikkelsen T. (1975) *Streptococcus agalactiae* infection in hamster. *Acta. Vet. Scand.*, **16**, 665-556.
- Kurtböke I. (2017) Microbial resources from functional existence in nature to applications, pp. 149-165, Elsevier, London, UK.
- Krause K. M., Serio A. W., Kane T. R., Connolly L. E. (2016) Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, 1-18.
- Lacave G., Coutard A., Troché G., Augusto S., Pons S., Zuber B., Laurent V., Amara M., Couzon B., Bédos J. P., Pangon B., Grimaldi D. (2016) Endocarditis caused by *Streptococcus canis*: an emerging zoonosis?. *Infection*, **44**, 111-114.
- Ladlow J. Scase T., Waller A. (2006) Canine strangles case reveals a new host susceptible to infection with *Streptococcus equi*. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2664-2665.
- Lancefield R. C. (1928) The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*: demonstration of a type-specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*, *J. Exp. Med.*, **47**, 91–103.

- Lobanovska M., Pilla G. (2017) Penicillin's Discovery and antibiotic resistance: lesson for the future?. *Yale J. Bio. Med.*, **90**, 135-145.
- Lu B., Fang Y., Fan Y., Chen X., Wang J., Zeng J., Li Y., Zhang Z., Huang L., Li H., Li D., Zhu F., Cui Y., Wang D. (2017) High Prevalence of Macrolide-resistance and Molecular Characterization of *Streptococcus pyogenes* Isolates Circulating in China from 2009 to 2016. *Front. Microbiol.*, **8**, 1-10.
- Lyhs U., Kulkas L., Katholm J., Waller K. P., Saha K., Tomusk R. J., Zadoks R. N. (2016) Serotype IV in humans and cattle, Northern Europe, *Emerg. Infect. Dis.*, **22**, 2097-2103.
- Lysková P., Vydržalová M., Mazurová J. (2007). Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, **54**, 559–563.
- Maddison J., Page S., Church D. (2008) Small Animal Clinical Pharmacology 2nd edition, pp 148-185, Elsevier Saunders, Edinburg, SCT.
- Milani C., Corrà M., Drigo M., Rota A. (2012) Antimicrobial resistance in bacteria from breeding dogs housed in kennels with differing neonatal mortality and use of antibiotics. *Theriogenology*. **78**, 1321-1328.
- Morrow B., McNatt R., Joyce L., McBride S., Morgan D., Tressler C., Mellits C. (2016) Highly pathogenic beta-hemolytic streptococcal infections in cats from an institutionalized hoarding facility and a multi-species comparison. *J. Feline Med. Surg.*, **18**, 318-327.
- Munita J. M., Arias C. A. (2016) Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.*, **4**, 1-37.
- Murray, P.R., Baron, E. J., Jorgensen, J.J., Tenover, M.A. and Tenover, R.H. (2003) Manual of Clinical Microbiology, 8th edition, p. 1-2310. ASM Press, Washington DC, USA.
- Neemuchwala S., Teatero S., Patel S. N., Fittipaldi N. (2016) Fluoroquinolone resistance among clonal complex 1 group B *Streptococcus* strains. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, **2016**, 1-5-
- Nocard M., Mollereau R. (1887) Sur une mammite contagieuse des vaches laitières, *Ann. Inst. Pasteur*, **1**,109.
- Pang M., Sun L., He Tao., Bao H., Zhang L., Zhou Y., Zhang H., Wei R., Liu Y., Wang R. (2017) Molecular and virulence characterization of highly prevalent *Streptococcus agalactiae* circulated in bovine dairy herds. *Vet. Res.*, **48**, 1-12.
- Papageorgiou A. C., Collins C. M., Gutman D. M., Kline J. B., Brien S. M. O., Tranter H. S., Acharya K. R. (1999) Structural basis for the recognition of superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin A (SpeA1) by MHC class II molecules and T-cell receptors, *EMBO J.*, **18**, 9-21.
- Park S. Y., Park Y., Chung J. W., Huh, H.J., Chae S. L., Kim Y. A., Lee S. S. (2014) Group B streptococcal bacteremia in non-pregnant adults: results from two Korean centers. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1785-1790.
- Pasteur L. (1879) Septicémie puérpérale. *Bull. Acad. Méd. Paris.*, **8**, 271–274.
- Patterson R. A., Stankewicz H.A. (2020) Penicillin Allergy. *Stat.Pearls*. [Internet].

- Piccinelli G., Gargiulo F., Corbellini S., Ravizzola G., Bonganti C., Caruso A., De Francesco M. A. (2015) Emergence of the first levofloxacin-resistant strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Italy. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **59**, 2466-2469.
- Pier G., Madin S. (1976) *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**, 545-553.
- Pinho M. D., Foster G., Pomba C., Machado M. P., Baily J. L., Kuiken T., Melo-Cristino J., Ramirez M., The Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections (2019) *Streptococcus canis* are a single population infecting multiple animal hosts despite the diversity of the universally present M-like Protein SCM. *Front. Microbiol.*, **10**, 1-10.
- Pires R., Rolo D., Mato R., Almeida J. F., Johansson C., Henriques-Normak B., Morais A., Brito-Avo A., Goncalo-Marques J., Santos-Sanches I. (2009) Resistance to bacitracin in *Streptococcus pyogenes* from oropharyngeal colonization and noninvasive infections in Portugal was caused by two clones of distinct virulence genotypes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **296**, 235-240.
- Pelkonen S., Lindahl S. B., Suomala P., Karhukorpi J., Vuorinen S., Koivula I., Väisänen T., Pentikäinen J., Autio T., Tuuminen T. (2013) Transmission of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection from horses to humans. *Emerg. Infect. Dis.*, **19**, 1041–1048.
- Peschel A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides?. *Trends. Microbiol.*, **10**, 179–186.
- Philips E.A., Tapsall J.W. and Smith D.D. (1980) Rapid Tube CAMP Test for Identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield Group B). *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 135-137.
- Pyörälä S., Greko C., Pomba M. C. M. F. (2009) Use of glycopeptides in veterinary medicine., *Vet. Rec.*, **165**, 19-22.
- Raabe V. N., Shane A. L. (2019) Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*), *Microbes. Infect.*, **7**, 3-7.
- Rajagopal L. (2009) Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol.*, **4**, 201-221.
- Rantala S. (2014) *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* bacteremia: an emerging infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **8**, 1303-1310.
- Rasmussen C. D., Haugaard M., Petersen M., Nielsen J., Pedersen H., Bojesen A. (2013) *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from equine infectious endometritis belong to a distinct genetic group. *Vet. Res.*, **44**, 1-8.
- Reglinski M., Sriskandan S. (2015) *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition), pp. 675-716, Elsevier, London, UK.
- Richards V. P., Zadoks R. N., Bitar P. D. P., Lefebure T., Lang P., Werner B., Tikofsky L., Moroni P., Stanhope M. (2012) Genome characterization and population genetic structure of the zoonotic pathogen. *Streptococcus canis*. *BMC Microbiol.*, **12**, 1-16.

- Roberts, C. E., Perry, D. M., Kuharic, H. A., Kirby W. M. M. (1960) Critical comparison of demethylchlorotetracycline and tetracycline: in vitro activity, serum concentrations, and effect of binding, *AMA Arch. Int. Med.*, **34**, 131-132.
- Robinson J. A., Meyer F. P. (1966) Streptococcal fish pathogen. *J. Bacteriol.*, **92**, 512.
- Romalde J., Ravelo C., Valdés I., Magarinos B., Fuente E., San Martín C., Avendaño-Herrera R., Toranzo A. (2008) *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. *Vet. Microbiol.*, **130**, 198-207.
- Rosenbach F. J. (1884) Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen, pp. 21-25, J. F. Bergmann, Weisbaden.
- Ruoff K. L. (1988) *Streptococcus anginosus* ("*Streptococcus milleri*"): the unrecognized pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1**, 102-108.
- Rurangirwa F., Teitzel C., Cui J., French D. McDonough P., Besser T. (2000) *Streptococcus didelphis* sp. nov., a streptococcus with marked catalase activity isolated from opossums (*Didelphis virginiana*) with suppurative dermatitis. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, **50**, 759-765.
- Sárközy G. (2001) Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Vet. Med.*, **46**, 257-274.
- Schottmuller H. (1903) Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. *MMW.* **50**, 848– 853, 909-912.
- Seki T., Kimura K., Reid M. E., Miyazaki A., Banno H., Jin W., Wachino J., Yamada K., Arakawa Y. (2015) High isolation rate of MDR group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 2725–2728.
- Sendi P., Johansson L., Norrby-Teglunf A. (2008) Invasive Group B Streptococcal disease in non-pregnant adults, *Infection*, **2**, 100-111.
- Silva-Costa C., Friães A., Ramirez M., Mello-Cristino J. (2015) Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*: prevalence and treatment strategies. *Expert. Rev. Anti-Infe.*, **13**, 615-628.
- Shen Y., Cai J., Davies M. R., Zhang C., Gao K., Qiao D., Jiang H., Yao W., Li Y., Zeng M. Chen M. (2018) Identification and characterization of fluoroquinolone non-susceptible *Streptococcus pyogenes* clones harboring tetracycline and macrolide resistance in Shanghai, China. *Front. Microbiol.*, **9**, 1-10.
- Skerman V. B. D., McGowan V., Sneath P. H. A. (1980) Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, **30**, 225-420.
- Slotved H.C., Kong F., Lambertsen L., Sauer S., Gilbert G. L. (2007) Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* Serotype. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2929–2936.
- Spickler A. R. (2005) Streptococcosis. *CFSPH*, **5**, 1-11.
- Sprot H., Efstratiou A., Hubble M., Morgan M. (2012) Man's best friend? first report of prosthetic joint infection with *Streptococcus pyogenes* from a canine source. *J. Infect.*, **64**, 625-627.
- Stafseth H. J., Thompson W., Neu L. (1937) Streptococci infections in dogs. I. "Acid milk," arthritis, and post vaccination abscesses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **90**, 769-781.

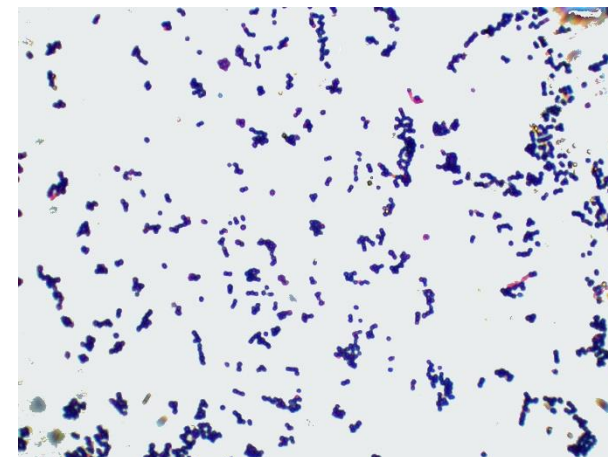


- Stratton C.W. (2018) Zpráva společnosti UpToDate (aktualizováno 22.5.2018): Infections due to the Streptococcus anginosus (Streptococcus milleri) group <https://www.uptodate.com/contents/infections-due-to-the-streptococcus-anginosus-streptococcus-milleri-group#H3>; Staženo 4.5.2020.
- Steer A., Vidmar S., Rikita R., Kado J., Batzloff M., Jenney A. W. J., Carlin J. B., Carapetis J. R. (2009) Normal ranges of streptococcal antibody titers are similar whether streptococci are endemic to the setting or not. *Clin. Vaccine Immunol.*, **16**, 172-175.
- Stokes J., Yang K., Swanson K., Jaakkola T., Barzilay R., Collins J. (2020) A deep learning approach to antibiotic Discovery. *Cell*, **180**, 688-702.
- Takahashi T., Ubukata K., Watanabe H. (2011) Invasive infection caused by Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis: characteristics of strains and clinical features. *J. Infect. Chemother.*, **17**, 1-10.
- Tettelin H., Masignani V., Cieslewicz M. J., Donati C., Medini D., Ward N., Angiuoli S., Crabtree J., Jones A., Durkin S. A., Deboy R., Davidsen T., Mora M., Scarselli M., Ros M. I., Peterson J., Hauser C., Sundaram J., Madupu R., Brinkac L., Dodson R. J., Rosovitz J., Sullivan S., Daugherty S. C., Haft D. H., Selengut J., Gwinn M., Zhou L., Khouri H., Radune D., Dimitrov G., Watkins K., O'Connor K., Smith S., Utterback T., White O., Rubens C., Grandi G., Madoff L., Kasper D., Telford J., Wessels M., Rappuoli R., Fraser C.M. (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of Streptococcus agalactiae: Implications for the microbial ‘pan-genome’. *PNAS*, **102**, 13950-13955.
- Vandamme P., Pot B., Falsen E., Kersters K., Devriese L. A. (1996) Taxonomic study of lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **46**, 774-781.
- Vela A. I., Sáez-Nieto J., Chacón G., Domínguez L., Fernández-Garayzábal (2017) Characterization of Streptococcus pyogenes from Animal Clinical Specimens, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, **23**, 2011-2016.
- Wehbeh W., Rojas-Diaz R., Li X., Mariano N., Grenner L., Segal-Maurer S., Tommasulo B., Drlica K., Urban C., Rahal J. J. (2005) Fluoroquinolone-resistant Streptococcus agalactiae: epidemiology and mechanism of resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **49**, 2495-2597.
- Weinstein M., Litt M., Kartesz D., Wyper P., Rose D., Coulter M., McGeer A., Facklam R., Ostach C., Willey B. M., Borzyk A., Low D. (1997) Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *N. Engl. Med.*, **337**, 589-594.
- Wessels M.R. (2005) Streptolysin S. *J. Infect. Dis.*, **192**, 13-15.
- Wessels M. R. (2020) Zpráva společnosti UpToDate (aktualizováno 17.4.2020): Group C and group G streptococcal infection. <https://www.uptodate.com/contents/group-c-and-group-g-streptococcal-infection>; Staženo 4.5.2020.

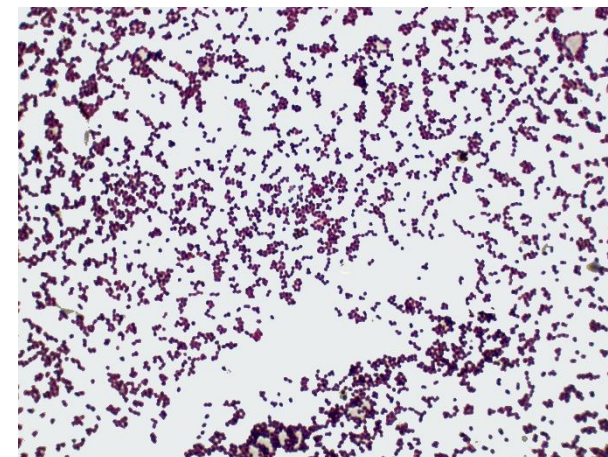
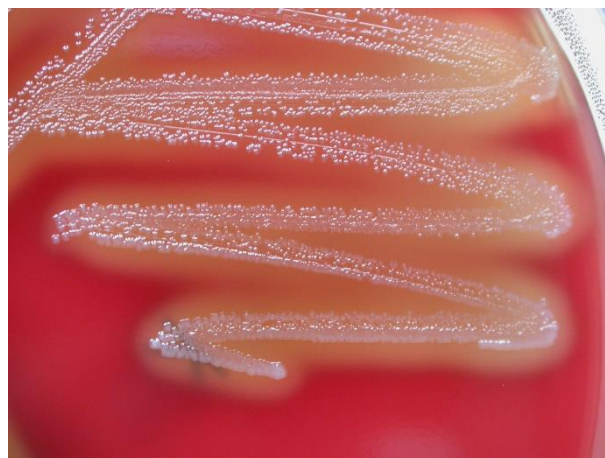
- Whiley R. A., Fraser H., Hardie J. M., Bighton D. (1990) Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the "Streptococcus milleri group". *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1497-1501.
- White S., Yu A. (2006) Equine Dermatology, *AAEP Proceedings.*, **52**, 457-500.
- Yañez A. J., Godoy M. J., Gallardo A., Avendaño-Herrera R. (2013) Identification of *Streptococcus phocae* strains associated with mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) farmed at low temperature in Chile. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, **33**, 59-66.
- Yang J., Liu Y., Xu J., Li B. (2010) Characterization of a new protective antigen of *Streptococcus canis*. *Vet. Res. Commun.* **34**, 413-421.
- Younan M., Borstein S. (2007) Lancefield group B and C streptococci in East African camels (*Camelus dromedarius*). *Vet. Rec.*, **160**, 330-335.
- Zapun A., Contreras-Martel C., Vernet T. (2008) Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 361-385.

## 19 Přílohy

- Obr. 1:** *Streptococcus agalactiae*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.
- Obr. 2:** *Streptococcus canis*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.
- Obr. 3:** *Streptococcus dysgalactiae*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.
- Obr. 4:** *Streptococcus equi*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.
- Obr. 5:** *Streptococcus porcinus*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.
- Obr. 6:** *Streptococcus pyogenes*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.

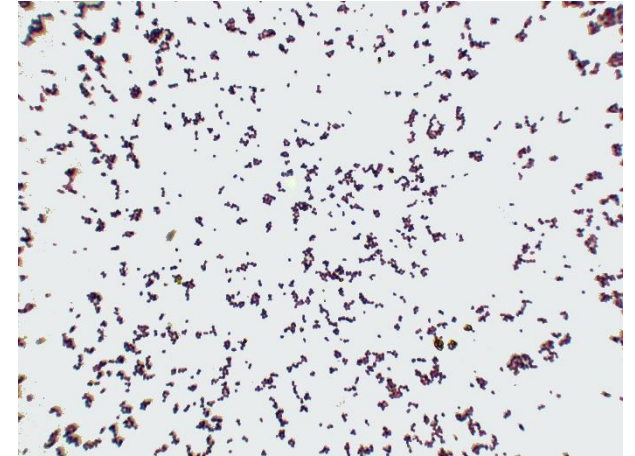
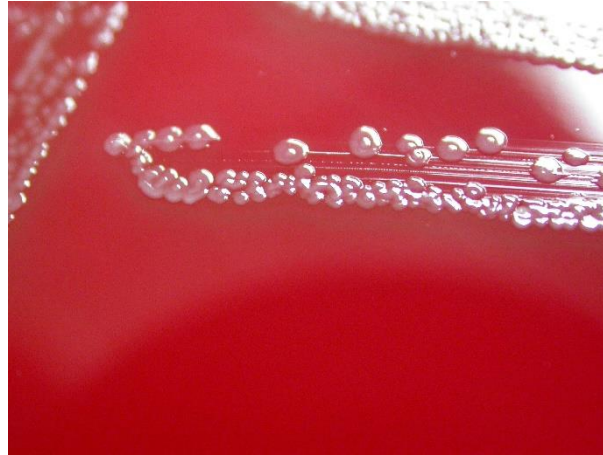


**Obr. 1:** *Streptococcus agalactiae*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.

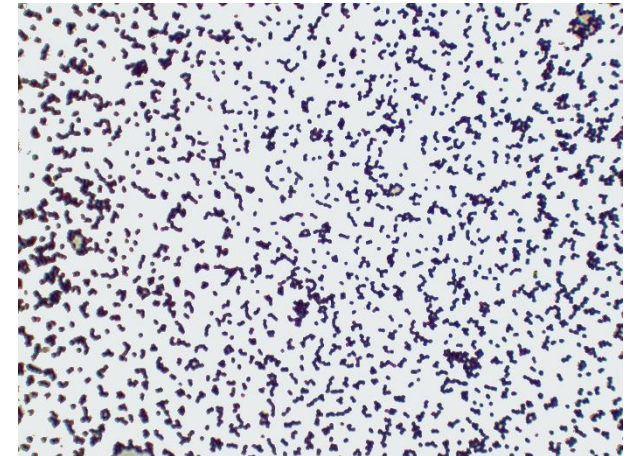


**Obr. 2:** *Streptococcus canis*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.

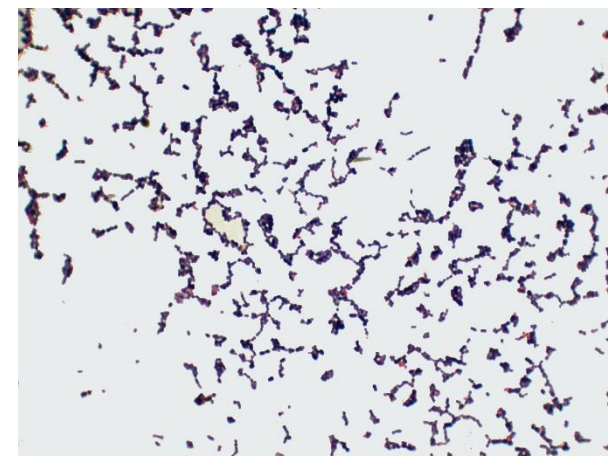




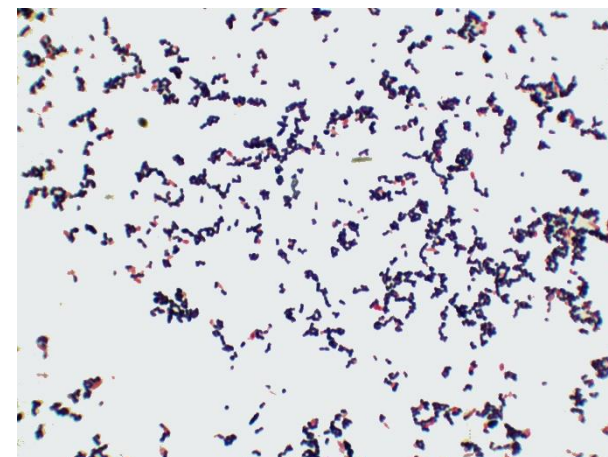
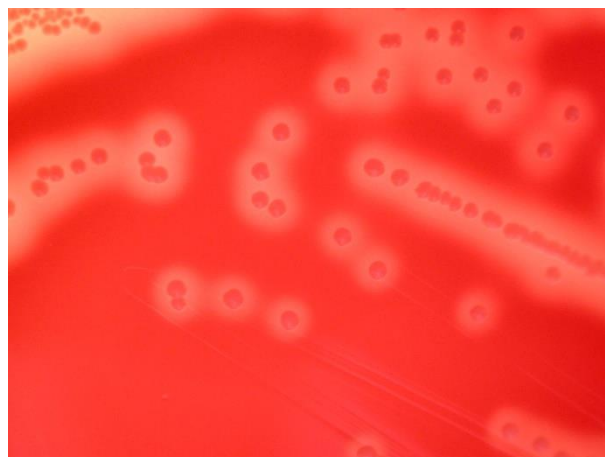
**Obr. 3:** *Streptococcus dysgalactiae*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.



**Obr. 4:** *Streptococcus equi*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.



**Obr. 5:** *Streptococcus porcinus*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií na krevním agaru, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.



**Obr. 6:** *Streptococcus pyogenes*. Popis zleva: makrofotografie krevního agaru, makrofotografie kolonií, mikrofotografie při zvětšení 1200x. Foto: MVDr. Jaroslav Bzdil, Ph.D.