



FUNKČNÍ VZOREK

**Postup pro detailní charakterizaci
významných bakteriálních původců
onemocnění hospodářských zvířat
ve formě sbírkových položek deponovaných
ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů
(CAPM)**

**MVDr. Markéta Reichelová
Mgr. Tereza Gelbíčová, Ph.D.
MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D.
Mgr. Markéta Procházková
doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.**

**5515
2017**

Funkční vzorek

5515/2017

**Postup pro detailní charakterizaci významných
bakteriálních původců onemocnění hospodářských
zvířat ve formě sbírkových položek deponovaných ve
Sbírce zoopatogenních mikroorganismů (CAPM)**

MVDr. Markéta Reichelová
Mgr. Tereza Gelbíčová, Ph.D.
MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D.
Mgr. Markéta Procházková
doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.

2017

ISBN 978-80-88233-29-9

Funkční vzorek

Postup pro detailní charakterizaci významných bakteriálních původců onemocnění hospodářských zvířat ve formě sbírkových položek deponovaných ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů (CAPM)

Autoři

**MVDr. Markéta Reichelová
Mgr. Tereza Gelbíčová, Ph.D.
MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D.
Mgr. Markéta Procházková
doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.**

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, číslo projektu QJ1630210 Certifikovaná kolekce referenčních kmenů virových a bakteriálních patogenů pro diagnostiku významných onemocnění skotu, prasat, ovcí, koz, koní, drůbeže, králíků, ryb a včel s ohledem na udržitelnost chovu cenných domácích plemen hospodářských zvířat.

Metodický postup Funkčního vzorku je určen pouze pro vnitřní potřebu bakteriologické laboratoře Sbírky zoopatogenních mikroorganismů (CAPM).

OBSAH

1.	Úvod.....	3
2.	Cíl metodiky funkčního vzorku.....	3
3.	Vlastní popis funkčního vzorku.....	3
3.1	Přehled postupů pro kultivaci bakteriálních kmenů.....	3
3.2	Přehled postupů pro stanovení biochemické aktivity bakteriálních kmenů.....	4
3.3	Přehled postupů pro identifikaci bakteriálních kmenů metodou MALDI-TOF MS...	5
3.4	Přehled postupů pro stanovení citlivosti bakteriálních kmenů k antimikrobiálním látkám.....	6
3.5	Přehled dalších postupů specifických pro charakterizaci pouze některých bakteriálních kmenů.....	6
3.5.1	Kmeny <i>Campylobacter jejuni</i>	6
3.5.2	Kmeny <i>Clostridium perfringens</i>	6
3.5.3	Kmeny <i>Escherichia coli</i>	6
3.5.4	Kmeny <i>Listeria monocytogenes</i>	7
3.5.5	Kmeny <i>Salmonella enterica</i>	7
3.5.6	Kmeny <i>Staphylococcus aureus</i>	7
3.5.7	Kmeny <i>Streptococcus</i> sp.....	7
3.5.8	Kmeny <i>Yersinia enterocolitica</i>	7
3.6	Přehled provedené charakterizace bakteriálních kmenů.....	8
3.7	Seznam použité literatury.....	16
4.	Srovnání novosti postupů.....	18
5.	Uplatnění funkčního vzorku.....	18
6.	Ekonomické aspekty.....	19
7.	Dedikace.....	19

1. ÚVOD

Kvalita služeb poskytovaných Sbírkou zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) VÚVeL Brno je závislá zejména na kvalitě bakteriálních kmenů dodávaných koncovým uživatelům. Tyto kmeny jsou využívány především v oblasti veterinární diagnostiky a výzkumu. Proto je pro jejich uživatele zcela zásadní, aby zároveň s dodanými kmeny získali co nejvíce údajů, např. o antigenní struktuře, faktorech virulence nebo o citlivosti k antibiotikům. Podrobná charakteristika bakteriálních kmenů významně přispěje také ke zvýšení biologické bezpečnosti při nakládání s těmito patogeny.

2. CÍL METODIKY FUNKČNÍHO VZORKU

Cílem metodiky funkčního vzorku je příprava bakteriálních kmenů významných původců onemocnění hospodářských zvířat. Bakteriální kmeny budou opatřeny podrobnými informacemi o jejich vlastnostech. Fyzicky se bude jednat převážně o lyofilizáty ve skleněných ampulích. Součástí funkčního vzorku je metodický postup, specifikovaný v tomto textu, který vede k získání charakterizovaných kmenů. Vysoká kvalita distribuovaných kmenů patogenních bakterií představuje významné zvýšení úrovně v diagnostice infekčních onemocnění hospodářských zvířat.

3. VLASTNÍ POPIS FUNKČNÍHO VZORKU

3.1 PŘEHLED POSTUPŮ PRO KULTIVACI BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ

Bakterie byly kultivovány na živných půdách (Tabulka č. 1) dle interních postupů, které nejsou součástí funkčního vzorku. Kultivační média byla ve většině případů připravována přímo na pracovišti Sbírky zoopatogenních mikroorganismů (CAPM).

Tabulka č. 1: Kultivace bakterií

Druh	Kultivační médium
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	COLUMBIA BLOOD AGAR
<i>Bacillus cereus</i>	NUTRIENT AGAR No. 2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	NUTRIENT AGAR No. 2
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	BRAIN HEART INFUSION AGAR WITH BLOOD, VL AGAR
<i>Brucella</i> sp.	BRUCELLA AGAR WITH HORSE SERUM
<i>Campylobacter fetus</i> spp.	COLUMBIA BLOOD AGAR, BLOOD FREE CAMPYLOBACTER SELECTIVITY AGAR BASE

<i>Campylobacter jejuni</i>	COLUMBIA BLOOD AGAR, BLOOD FREE CAMPYLOBACTER SELECTIVITY AGAR BASE
<i>Clostridium botulinum</i>	VL AGAR
<i>Clostridium perfringens</i>	VL AGAR
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	BLOOD AGAR BASE No. 2
<i>Escherichia coli</i>	NUTRIENT AGAR No. 2
<i>Francisella tularensis</i>	CYSTINE HEART AGAR BASE WITH HAEMOGLOBIN
<i>Haemophilus parasuis</i>	HAEMOPHILUS MEDIUM
<i>Listeria monocytogenes</i>	BLOOD AGAR BASE No. 2
<i>Mannheimia haemolytica</i>	BLOOD AGAR BASE No. 2
<i>Mycobacterium avium</i>	MYCOBACTERIUM MEDIUM, LOWENSTEIN- JENSEN MEDIUM
<i>Paenibacillus larvae</i>	MYPGP AGAR, BLOOD AGAR BASE No. 2
<i>Pasteurella multocida</i>	NUTRIENT AGAR No. 2, BLOOD AGAR BASE No. 2
<i>Rhodococcus equi</i>	BLOOD AGAR BASE No. 2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	NUTRIENT AGAR No. 2
<i>Staphylococcus aureus</i>	NUTRIENT AGAR No. 2
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	BLOOD AGAR BASE No. 2
<i>Streptococcus</i> sp.	BLOOD AGAR BASE No. 2
<i>Taylorella equigenitalis</i>	CHOCOLATE AGAR, HAEMOPHILUS MEDIUM
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NUTRIENT AGAR No. 2
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	BLOOD AGAR BASE No. 2

3.2 PŘEHLED POSTUPŮ PRO STANOVENÍ BIOCHEMICKÉ AKTIVITY BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ

Ke stanovení biochemické aktivity v širším měřítku a následné identifikaci bakteriálních kmenů byly použity komerčně vyráběné sestavy testů (Erba Lachema, ČR; bioMérieux, Francie; Microgen Bioproducts, Anglie) včetně celé škály dodatkových testů. Pokud to bylo možné, byl každý bakteriální kmen identifikován pomocí testů od dvou různých výrobců. Soupravy byly použity doporučeným postupem podle instrukcí výrobce a odečítání testů bylo provedeno manuálně. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu TNW verze 7.0 (Erba Lachema), použitím internetového identifikačního programu *apiweb* (<https://apiweb.biomerieux.com>) nebo programem MID verze 1.2.5.26 (Microgen).

Použité soupravy testů

Erba Lachema:

NEFERMtest 24

ANAEROTest 23

STREPTOTest 24

STAPHYTest 24

ENTEROTest 24 N

bioMérieux:

API NH

API 50 CHB/E

API 20 NE
API 20 E
API Campy
API 20 A
API 20 Strep
API Staph
API Coryne
API Listeria
API ZYM

Microgen Bioproducts:
Microgen Bacillus-ID
Microgen Listeria-ID
Microgen GN-ID (GN A + GN B)

Některé druhy bakterií nejsou do identifikačních schémat zařazeny, např. z důvodu nízké biochemické aktivity, a proto nemohly být těmito soupravami testovány. Jednalo se o kmeny *Francisella tularensis* a *Mycobacterium avium*.

3.3 PŘEHLED POSTUPŮ PRO IDENTIFIKACI BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ METODOU MALDI-TOF MS

Metoda MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*: hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem) byla v nedávné době zavedena do rutinní mikrobiologické diagnostiky. Metodou lze identifikovat mikroorganismy (bakterie, kvasinky a plísňe) nejen dle rodu, ale také na druhové úrovni a v některých případech i na úrovni poddruhů. Proces identifikace je založen na analýze ribosomálních a dalších proteinů obsažených v buňce. Peptidy a bílkoviny jsou touto metodou analyzovány prostřednictvím detekce vzniklých iontů, které jsou v průletovém analyzátoru separovány na základě poměru m/z (hmotnost/náboj). Získané hmotnostní spektrum, v tomto případě proteinový profil analyzovaného mikroorganismu, je pomocí specifického softwaru porovnán s databází proteinových profilů referenčních kmenů mikroorganismů obsažených v knihovně spekter. Výstupem srovnávacího algoritmu je identifikace mikroorganismu s přiřazenou hodnotou skóre, která vyjadřuje míru shody získaného a referenčního proteinového profilu.

K identifikaci bakterií pomocí MALDI-TOF MS analýzy byly použity čerstvě narostlé bakteriální kultury. Pro zajištění kvalitních výsledků byly vzorky připraveny extrakčními metodami dle manuálu společnosti Bruker (extrakce pomocí kyseliny trifluoroctové byla použita u sporulátů a extrakce pomocí ethanolu, kyseliny mravenčí a acetonitrilu u ostatních bakterií, u mykobakterií navíc s použitím silikonových kuliček). U vysoce patogenních mikroorganismů zařazených do rizikové skupiny 3 předcházela extrakci tepelná inaktivace bakteriální kultury. Připravené vzorky byly nanесeny na spoty kovové desky (1 μ l). Ve stejném objemu byl nanесen proteinový standard Bruker Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics, Německo), který se používá pro kalibraci přístroje před začátkem měření. Zaschlé vzorky včetně proteinového standardu byly překryty matricovým roztokem (1 μ l HCCA) a ponechány na vzduchu, aby matrice zkrystalizovala. Identifikace byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru Autoflex speed MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Německo) a

komerčními databázemi MALDI Biotyper (Compass Library a Security Relevant Library verze 1.0, Bruker Daltonics, Německo).

3.4 PŘEHLED POSTUPŮ PRO STANOVENÍ CITLIVOSTI BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM

Jako antimikrobiální látky (AML) se označují léčiva používaná k profylaxi či terapii infekčních onemocnění. Rezistence mikroorganismů k AML je dnes celosvětově jedním z největších problémů nejen v humánní, ale i veterinární praxi.

Citlivost/rezistence vybraných bakteriálních kmenů k AML byla stanovena diskovou difúzní metodou a/nebo mikrodiluční metodou, kterou byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace (MIC) vybraných antimikrobiálních látek.

Disková difúzní metoda byla použita pro vyšetření citlivosti k antimikrobiálním látkám u kmenů *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* a *Staphylococcus aureus*. Vyhodnocení bylo provedeno dle kritérií Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017) a Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2017).

Hodnoty MIC jednotlivých antimikrobiálních látek bakteriálních kmenů byly stanoveny pomocí originálních setů vyrobených přímo ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. Zastoupení AML v jednotlivých setech bylo zvoleno podle druhu vyšetřovaných patogenů (G-, G+ nebo VSP - veterinárně specifický patogen). Vyhodnocení odečtených hodnot MIC bylo provedeno dle kritérií CLSI (2015a, b), EUCAST (2016) a CA-SFM (2014).

3.5 PŘEHLED DALŠÍCH POSTUPŮ SPECIFICKÝCH PRO CHARAKTERIZACI POUZE NĚKTERÝCH BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ

3.5.1 KMENY *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

Při genotypové charakterizaci kmenů *Campylobacter jejuni* byla použita metoda MLST (Multilocus Sequence Typing) pro sledování jejich fylogenetické příbuznosti (Dingle et al., 2001).

3.5.2 KMENY *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Metoda multiplex PCR byla použita pro stanovení genů (*cpa*, *cpb*, *cpe*, *etx*, *iap*, *cpb2*) zodpovědných za produkci toxinů (Baums et al., 2004).

3.5.3 KMENY *ESCHERICHIA COLI*

Sérotypizace metodou pomalé aglutinace

U izolátů *Escherichia coli* byla provedena typizace somatického O-antigenu pomalou aglutinací s řadou 70 různých O-antisér (Salajka et al., 1992).

Metody detekce EPEC, STEC a ETEC kmenů

Byla sledována přítomnost genů pro produkci termostabilních (STa) a termolabilních enterotoxinů (LT), Shiga toxinů 1 a 2 a vybrané adhezenční faktory (Paton et al., 1998; Scheutz et al., 2012; Alexa et al., 1997).

U kmenů pocházejících z drůbeže a člověka byla sledována metodou PCR přítomnost souboru genů *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* a *iutA*, které se vyskytují u *E. coli* vysoce patogenních pro drůbež (APEC) (Johnsona et al., 2008).

3.5.4 KMENY *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Sérotypizace

Sérotyp byl určen metodou sklíčkové aglutinace za použití komerčně dostupných antisér (Denka Seiken, Japonsko) v kombinaci s metodou multiplex PCR (Doumith et al., 2004) s použitím PPP polymerázy (Top-Bio, ČR) a primerů syntetizovaných firmou Generi Biotech (ČR).

3.5.5 KMENY *SALMONELLA ENTERICA*

Sérotypizace

Sérotyp byl určen metodou sklíčkové aglutinace se somatickými a bičíkovými antiséry (BioRad, Francie; SSI Diagnostica, Dánsko; Denka Seiken, Japonsko). Antigenní schéma bylo vyhodnoceno dle dokumentu Grimont et al., 2007.

Fágová typizace

U kmenů sérotypu Enteritidis a Typhimurium byla provedena fágová typizace podle protokolu HPA Colindale Londýn (Anderson et al., 1977; Ward et al., 1987).

3.5.6 KMENY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

K druhové confirmaci byla využita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) založená na detekci fragmentu SA 442 specifického pro bakterie *S. aureus* o velikosti 108 bp (Martineau et al., 1998). Všechny izoláty určené jako *S. aureus* byly metodou PCR testovány na přítomnost genu *mecA* zodpovědného za rezistenci k meticilinu (Oliveira and Lencastre, 2002). U kmene MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) nesoucího gen *mecA* byla dále metodou PCR sledována příslušnost kmene k sekvenčnímu typu ST398 (van Wamel et al., 2010). Detekce polymorfismů v oblasti X genu pro protein A (*spa* typizace) u kmene MRSA byla provedena podle metody uvedené na Ridom SpaServer (<http://www.spaserver.ridom.de/>).

Charakteristika všech izolátů *S. aureus* byla provedena na základě PCR detekce genů *sea* až *sej* kódujících příslušné enterotoxiny (Monday and Bohach, 1999; Løvseth et al., 2004), genu *tst* kódujícího toxin syndromu toxického šoku (Mehrotra et al., 2000), genu *pvl* kódujícího Pantonův-Valentinův leukocidin (Lina et al., 1999) a dále genů *eta* a *etb* kódujících exfoliatiny typu ETA a ETB (Hososaka et al., 2007).

3.5.7 KMENY *STREPTOCOCCUS SP.*

K určení sérologických skupin A, B, C, G a F β -hemolytických streptokoků byla použita latexaglutinační diagnostická souprava ITEST STREPTO GROUP (Itest plus, ČR).

3.5.8 KMENY *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Sérotyp byl určen metodu sklíčkové aglutinace za použití komerčně dostupných antisér (Itest plus, ČR a Denka Seiken, Japonsko).

3.6 PŘEHLED PROVEDENÉ CHARAKTERIZACE BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ

***Actinobacillus pleuropneumoniae* CAPM 5869**

Identifikace: biochemickou soupravou API NH a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ampicilinu, ceftiofuru, tulathromycinu, tilmikosinu, tiamulinu, enrofloxacinu, florfenikolu, doxycyklinu a tildipirosinu; intermediární k penicilinu a tetracyklinu; rezistentní ke spektinomycinu

***Actinobacillus pleuropneumoniae* CAPM 5870**

Identifikace: biochemickou soupravou API NH a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ampicilinu, ceftiofuru, tulathromycinu, tilmikosinu, tiamulinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, doxycyklinu a tildipirosinu; intermediární k penicilinu; rezistentní ke spektinomycinu

***Bacillus cereus* CAPM 5631**

Identifikace: biochemickými soupravami Microgen Bacillus-ID, API 50 CHB/E a pomocí MALDI-TOF MS

***Bordetella bronchiseptica* CAPM 5956**

Identifikace: biochemickými soupravami NEFERMtest 24, API 20 NE a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k tulathromycinu, tilmikosinu, tetracyklinu, florfenikolu, doxycyklinu a tildipirosinu; intermediární k enrofloxacinu; rezistentní k penicilinu, ampicilinu, ceftiofuru, tiamulinu a spektinomycinu

***Bordetella bronchiseptica* CAPM 6082**

Identifikace: biochemickými soupravami NEFERMtest 24, API 20 NE a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k tulathromycinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, spektinomycinu a doxycyklinu; rezistentní k penicilinu, ampicilinu, ceftiofuru, tilmikosinu, tiamulinu, florfenikolu a tildipirosinu

***Brachyspira hyodysenteriae* CAPM 6063**

Identifikace: pomocí PCR s druhově specifickými primery (Atyeo et al., 1999) a na základě celogenomové sekvenace

***Brachyspira hyodysenteriae* CAPM 6163**

Identifikace: pomocí PCR s druhově specifickými primery (Atyeo et al., 1999) a na základě celogenomové sekvenace

***Brucella melitensis* CAPM 5659**

Identifikace: biochemickou soupravou API 20 E (pouze rodová identifikace) a pomocí MALDI-TOF MS

***Campylobacter fetus* subsp. *fetus* CAPM 5682**

Identifikace: biochemickou soupravou API Campy a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k erytromycinu

***Campylobacter fetus* subsp. *fetus* CAPM 5683**

Identifikace: biochemickou soupravou API Campy a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k erytromycinu

***Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* CAPM 5681**

Identifikace: biochemickou soupravou API Campy a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k erytromycinu

***Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* CAPM 5994**

Identifikace: biochemickou soupravou API Campy a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k erytromycinu

***Campylobacter jejuni* CAPM 6314**

Identifikace: biochemickou soupravou API Campy a pomocí MALDI-TOF MS

Určení poddruhu metodou multiplex PCR (Miller et al., 2007): *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

Typizace metodou MLST: sekvenční typ 4163, klonální komplex 692

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k amoxicilinu/kyselině klavulanové, gentamycinu, erytromycinu a ciprofloxacinu, rezistentní k ampicilinu a tetracyklinu

***Campylobacter jejuni* CAPM 6318**

Identifikace: biochemickou soupravou API Campy a pomocí MALDI-TOF MS

Určení poddruhu metodou multiplex PCR (Miller et al., 2007): *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

Typizace metodou MLST: nový sekvenční typ

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k amoxicilinu/kyselině klavulanové, gentamycinu, erytromycinu, ciprofloxacinu a tetracyklinu, intermediární k ampicilinu

***Campylobacter jejuni* CAPM 6368**

Identifikace: biochemickou soupravou API Campy a pomocí MALDI-TOF MS

Určení poddruhu metodou multiplex PCR (Miller et al., 2007): *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

Typizace metodou MLST: sekvenční typ 22, klonální komplex 22

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ampicilinu, amoxicilinu/kyselině klavulanové, gentamycinu, erytromycinu, ciprofloxacinu a tetracyklinu

***Clostridium botulinum* CAPM 5950**

Identifikace: biochemickými soupravami ANAEROTest 23, API 20 A a pomocí MALDI-TOF MS

***Clostridium perfringens* CAPM 5744**

Identifikace: biochemickými soupravami ANAEROTest 23, API 20 A a pomocí MALDI-TOF MS

Detekce genů pro produkci toxinů: *cpa* +, *cpb2* + (typ A), *cpb* -, *cpe* -, *etx* -, *iap* -

***Clostridium perfringens* CAPM 5872**

Identifikace: biochemickými soupravami ANAEROTest 23, API 20 A a pomocí MALDI-TOF MS

Detekce genů pro produkci toxinů: *cpa* + (typ A), *cpb* -, *cpe* -, *etx* -, *iap* -, *cpb2* -

***Erysipelothrix rhusiopathiae* CAPM 5014**

Identifikace: biochemickou soupravou API Coryne a pomocí MALDI-TOF MS

***Erysipelothrix rhusiopathiae* CAPM 5073**

Identifikace: biochemickou soupravou API Coryne a pomocí MALDI-TOF MS

***Escherichia coli* CAPM 5933**

Identifikace: biochemickými soupravami ENTEROtest 24 N, API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Sérotypizace (určení O-antigenu): O157

Detekce genů pro enterotoxiny, Shiga toxiny a vybrané adheziny: LT +, F4

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ampicilinu, cefotaximu, ceftiofuru, cefchinomu, cefalotinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, kolistinu, marbofloxacinu, apramycinu, doxycyklinu, gentamicinu a amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou

***Escherichia coli* CAPM 6101**

Identifikace: biochemickými soupravami ENTEROtest 24 N, API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Sérotypizace (určení O-antigenu): O1

Detekce genů pro enterotoxiny, Shiga toxiny a vybrané adheziny: -

Detekce genů vyskytujících se u APEC kmenů: *iroN* +, *ompT* +, *hlyF* +, *iss* +, *iutA* + (APEC +)

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ampicilinu, cefotaximu, ceftiofuru, cefchinomu, cefalotinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, kolistinu, marbofloxacinu, apramycinu, doxycyklinu, gentamicinu a amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou

***Escherichia coli* CAPM 6417**

Identifikace: biochemickými soupravami ENTEROtest 24 N, API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Sérotypizace (určení O-antigenu): O2

Detekce genů pro enterotoxiny, Shiga toxiny a vybrané adheziny: -

Detekce genů vyskytujících se u APEC kmenů: *iroN* +, *ompT* +, *hlyF* +, *iss* +, *iutA* + (APEC +)

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ampicilinu, cefotaximu, ceftiofuru, cefchinomu, cefalotinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, kolistinu, marbofloxacinu, apramycinu, doxycyklinu, gentamicinu a amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou

***Francisella tularensis* CAPM 5151**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

Určení poddruhu metodou PCR (Broekhuijsen et al., 2003): *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*

***Francisella tularensis* CAPM 5600**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

Určení poddruhu metodou PCR (Broekhuijsen et al., 2003): *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*

***Haemophilus parasuis* CAPM 5751**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení biochemických vlastností: biochemickou soupravou API NH

***Haemophilus parasuis* CAPM 6276**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení biochemických vlastností: biochemickou soupravou API NH

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ampicilinu, ceftiofuru, tulathromycinu, tilmikosinu, tiamulinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, spektinomycinu, doxycyklinu a tildipirosinu

***Listeria monocytogenes* CAPM 5168**

Identifikace: biochemickými soupravami Microgen Listeria-ID, API Listeria a pomocí MALDI-TOF MS

Sérotypizace: sérotyp 1/2a

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, gentamicinu, meropenemu, tetracyklinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu a ampicilinu, rezistentní k erytromycinu

***Listeria monocytogenes* CAPM 5580**

Identifikace: biochemickými soupravami Microgen Listeria-ID, API Listeria a pomocí MALDI-TOF MS

Sérotypizace: sérotyp 4b

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, erytromycinu, gentamicinu, meropenemu, tetracyklinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu a ampicilinu

***Mannheimia haemolytica* CAPM 5141**

Identifikace: biochemickými soupravami Microgen GN-ID (GN A+GN B), API 20 NE, API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ampicilinu, ceftiofuru, tulathromycinu, tilmikosinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, spektinomycinu, doxycyklinu, tildipirosinu a gamithromycinu

***Mannheimia haemolytica* CAPM 6174**

Identifikace: biochemickými soupravami Microgen GN-ID (GN A+GN B), API 20 NE, API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ampicilinu, ceftiofuru, tulathromycinu, tilmikosinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, spektinomycinu, doxycyklinu, tildipirosinu a gamithromycinu

***Mycobacterium avium* CAPM 5889**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

***Paenibacillus larvae* CAPM 5680**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení biochemických vlastností: biochemickou soupravou API 50 CHB/E

***Paenibacillus larvae* CAPM 5875**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení biochemických vlastností: biochemickou soupravou API 50 CHB/E

***Pasteurella multocida* CAPM 6077**

Identifikace: biochemickými soupravami API 20 NE, API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ampicilinu, ceftiofuru, tulathromycinu, tilmikosinu, tiamulinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, spektinomycinu, doxycyklinu a tildipirosinu

***Pasteurella multocida* CAPM 6431**

Identifikace: biochemickými soupravami API 20 NE, API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ampicilinu, ceftiofuru, tulathromycinu, tilmikosinu, tiamulinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, spektinomycinu, doxycyklinu a tildipirosinu

***Rhodococcus equi* CAPM 6281**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení biochemických vlastností: biochemickou soupravou API Coryne

***Rhodococcus equi* CAPM 6312**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení biochemických vlastností: biochemickou soupravou API Coryne

***Salmonella enterica* subsp. *enterica* CAPM 5456**

Identifikace: biochemickými soupravami ENTEROtest 24 N, API 20 E a pouze rodová ID pomocí MALDI-TOF MS

Sérotypizace: sérovar Enteritidis s antigenní strukturou 1,9,12:g,m:-

Fágová typizace: fágový typ 4b

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k cefotaximu, ceftiofuru, cefchinomu, cefalotinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, kolistinu, marbofloxacinu, apramycinu, doxycyklinu a gentamicinu; rezistentní k ampicilinu a amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou

***Salmonella enterica* subsp. *enterica* CAPM 6324**

Identifikace: biochemickými soupravami ENTEROtest 24 N, API 20 E a pouze rodová ID pomocí MALDI-TOF MS

Sérotypizace: sérovar Typhimurium s antigenní strukturou 1,4,[5],12:i:1,2

Fágová typizace: fágový typ DT141

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ampicilinu, cefotaximu, ceftiofuru, cefchinomu, cefalotinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, kolistinu, marbofloxacinu, apramycinu, doxycyklinu, gentamicinu a amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou

***Staphylococcus aureus* CAPM 5970**

Identifikace: biochemickými soupravami STAPHYtest 24 (určen i poddruh - *S. aureus* subsp. *aureus*), API Staph a pomocí MALDI-TOF MS

Ověření druhové identifikace metodou PCR: detekce DNA fragmentu SA 442 specifického *pro S. aureus*

Detekce genu rezistence k methicilinu: *mecA* -

Detekce genů kódujících enterotoxiny (*sea* - *sej*): *sec* +, ostatní -

Detekce dalších genů kódujících produkci toxinů: *pvl* -, *eta* - a *etb* -, *tst* -

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ceftiofuru, erytromycinu, klindamycinu, gentamicinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, enrofloxacinu, florfenikolu, rifampicinu, cefoxitinu a oxacilinu; rezistentní k tetracyklinu

Staphylococcus aureus CAPM 6565

Identifikace: biochemickými soupravami STAPHYtest 24 (určen i poddruh - *S. aureus* subsp. *aureus*), API Staph a pomocí MALDI-TOF MS

Ověření druhové identifikace metodou PCR: detekce DNA fragmentu SA 442 specifického *pro S. aureus*

Detekce genu rezistence k methicilinu: *mecA* + (MRSA kmen)

Stanovení sekvenčního typu: ST398

Spa typizace: *spa* typ t011

Detekce genů kódujících enterotoxiny (*sea* - *sej*): *sea* až *sej* -

Detekce dalších genů kódujících produkci toxinů: *pvl* -, *eta* - a *etb* -, *tst* -

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k erytromycinu, klindamycinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, florfenikolu a rifampicinu; rezistentní k penicilinu, ceftiofuru, gentamicinu, enrofloxacinu, tetracyklinu, cefoxitinu a oxacilinu

Staphylococcus aureus subsp. anaerobius CAPM 6559

Identifikace: biochemickými soupravami STAPHYtest 24 (potvrzeno zařazení do poddruhu), API Staph a pomocí MALDI-TOF MS

Ověření druhové identifikace metodou PCR: detekce DNA fragmentu SA 442 specifického *pro S. aureus*

Detekce genu rezistence k methicilinu: *mecA* -

Detekce genů kódujících enterotoxiny (*sea* - *sej*): *sea* až *sej* -

Detekce dalších genů kódujících produkci toxinů: *pvl* -, *eta* - a *etb* -, *tst* -

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ceftiofuru, erytromycinu, klindamycinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, enrofloxacinu, tetracyklinu, florfenikolu, rifampicinu, cefoxitinu a oxacilinu; rezistentní k penicilinu a gentamicinu

Staphylococcus aureus subsp. anaerobius CAPM 6566

Identifikace: biochemickými soupravami STAPHYtest 24 (potvrzeno zařazení do poddruhu), API Staph a pomocí MALDI-TOF MS

Ověření druhové identifikace metodou PCR: detekce DNA fragmentu SA 442 specifického *pro S. aureus*

Detekce genu rezistence k methicilinu: *mecA* -

Detekce genů kódujících enterotoxiny (*sea* - *sej*): *sea* až *sej* -

Detekce dalších genů kódujících produkci toxinů: *pvl* -, *eta* - a *etb* -, *tst* -

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ceftiofuru, erytromycinu, klindamycinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, enrofloxacinu, tetracyklinu, florfenikolu, rifampicinu, cefoxitinu a oxacilinu; rezistentní ke gentamicinu

***Streptococcus agalactiae* CAPM 5534**

Identifikace: biochemickými soupravami STREPTOtest 24, API 20 Strep a pomocí MALDI-TOF MS

Určení sérologické skupiny: skupina B

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ceftiofuru, erytromycinu, klindamycinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, tetracyklinu, florfenikolu a rifampicinu

***Streptococcus agalactiae* CAPM 5668**

Identifikace: biochemickými soupravami STREPTOtest 24, API 20 Strep a pomocí MALDI-TOF MS

Určení sérologické skupiny: skupina B

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ceftiofuru, erytromycinu, klindamycinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, tetracyklinu, florfenikolu a rifampicinu

***Streptococcus dysgalactiae* CAPM 5495**

Identifikace: biochemickými soupravami STREPTOtest 24, API 20 Strep (v obou případech určen i poddruh - *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) a pomocí MALDI-TOF MS

Určení sérologické skupiny: skupina C

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ceftiofuru, erytromycinu, klindamycinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, florfenikolu a rifampicinu; rezistentní k tetracyklinu

***Streptococcus dysgalactiae* CAPM 5548**

Identifikace: biochemickými soupravami STREPTOtest 24, API 20 Strep (v obou případech určen i poddruh - *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*) a pomocí MALDI-TOF MS

Ověření druhové identifikace metodou PCR (Riffon et al., 2001): detekce specifického fragmentu o velikosti 281 bp

Určení sérologické skupiny: skupina C

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ceftiofuru, erytromycinu, klindamycinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu a florfenikolu; intermediární k tetracyklinu a rifampicinu

***Streptococcus equi* subsp. *equi* CAPM 5532**

Identifikace: biochemickými soupravami STREPTOtest 24, API 20 Strep a pomocí MALDI-TOF MS (ve všech případech potvrzeno zařazení do poddruhu)

Určení sérologické skupiny: skupina C

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ceftiofuru, erytromycinu, klindamycinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, tetracyklinu, florfenikolu a rifampicinu

***Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* CAPM 5497**

Identifikace: biochemickými soupravami STREPTOtest 24, API 20 Strep a pomocí MALDI-TOF MS (ve všech případech potvrzeno zařazení do poddruhu)

Určení sérologické skupiny: skupina C

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ceftiofuru, erytromycinu, klindamycinu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, florfenikolu a rifampicinu; intermediární k tetracyklinu

***Streptococcus suis* CAPM 6294**

Identifikace: biochemickými soupravami STREPTOtest 24, API 20 Strep a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ampicilinu, ceftiofuru, tulathromycinu, tilmikosinu, tiamulinu, enrofloxacinu, florfenikolu, spektinomycinu, doxycyklinu a tildipirosinu; rezistentní k tetracyklinu

***Streptococcus suis* CAPM 6295**

Identifikace: biochemickými soupravami STREPTOtest 24, API 20 Strep a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k penicilinu, ampicilinu, ceftiofuru, tulathromycinu, tilmikosinu, tiamulinu, enrofloxacinu, florfenikolu a spektinomycinu; rezistentní k tetracyklinu, doxycyklinu a tildipirosinu

***Taylorella equigenitalis* CAPM 6344**

Identifikace: pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení enzymatické aktivity: soupravou API ZYM

***Yersinia enterocolitica* CAPM 5672**

Identifikace: biochemickými soupravami ENTEROtest 24 N, Microgen GN-ID (GN A+GN B), API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Sérotypizace: sérotyp O:3

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k cefotaximu, ceftiofuru, cefchinomu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, kolistinu, marbofloxacinu, apramycinu, doxycyklinu a gentamicinu; rezistentní k ampicilinu, cefalotinu a amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou

***Yersinia enterocolitica* CAPM 6154**

Identifikace: biochemickými soupravami ENTEROtest 24 N, Microgen GN-ID (GN A+GN B), API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Sérotypizace: sérotyp O:3

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k cefotaximu, ceftiofuru, cefchinomu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, kolistinu, marbofloxacinu, apramycinu, doxycyklinu a gentamicinu; rezistentní k ampicilinu, cefalotinu a amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou

***Yersinia pseudotuberculosis* CAPM 5763**

Identifikace: biochemickými soupravami ENTEROtest 24 N, API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ampicilinu, cefotaximu, ceftiofuru, cefchinomu, cefalotinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu, trimethoprimu/sulfamethoxazolu, marbofloxacinu, apramycinu, doxycyklinu, gentamicinu a amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou; rezistentní ke kolistinu

***Yersinia pseudotuberculosis* CAPM 6153**

Identifikace: biochemickými soupravami ENTEROtest 24 N, API 20 E a pomocí MALDI-TOF MS

Stanovení citlivosti k antibiotikům: kmen citlivý k ampicilinu, cefotaximu, ceftiofuru, cefchinomu, cefalotinu, tetracyklinu, enrofloxacinu, florfenikolu,

trimethoprimu/sulfamethoxazolu, marbofloxacinu, apramycinu, doxycyklinu, gentamicinu a amoxicilinu v kombinaci s kyselinou klavulanovou; rezistentní ke kolistinu

3.7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alexa, P., Rychlik, I., Nejezchleb, A., Hamrik, J. (1997): Identification of enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* by PCR and biological methods. *Veterinarní Medicina*, 42, 97-100.

Anderson, E.S., Ward, L.R., Saxe, M.J., de Sa, J.D. (1977): Bacteriophage typing designations of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Hygiene*, 78, 297-300.

Atyeo, R.F., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Suriyaarachichi, D.S., Hampson, D.J.(1999): Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and *nox*-based polymerase chain reaction tests. *Veterinary Microbiology*, 67, 47-60.

Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R. (2004): Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*, 100, 11-16.

Broekhuijsen, M., Larsson, P., Johansson, A., Byström, M., Eriksson, U., Larsson, E., Prior, R.G., Sjöstedt, A., Titball, R.W., Forsman, M. (2003): Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2924-2931.

CA-SFM, 2014. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2014. Lyon, France 2014: 114 pp.

CA-SFM, 2017. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2017. Lyon, France 2017: 127 pp.

CLSI, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement. M 100-S22, vol. 32, No 3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2012: 184 pp.

CLSI, 2015a. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement. M 100-S25, vol. 35, No 1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2015: 236 pp.

CLSI, 2015b. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement 3rd ed. VET01S, vol. 35, No 12. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2015: 117 pp.

Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R.A., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., Bootsma, H.J., Willems, R.J.L., Urwin, R., Maiden, M.C.J. (2001): Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 14-23.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. (2004): Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3819-3822.

EUCAST, 2016. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.

EUCAST, 2017. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0, 2017. <http://www.eucast.org>.

Grimont, P., Weill, F.-X. (2007): Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition. *Online, Institut Pasteur Paris*, 2007, 166 pp.

Hososaka, Y., Hanaki, H., Endo, H., Suzuki, Y., Nagasawa, Z., Otsuka, Y., Nakae, T., Sunakawa, K. (2007): Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 13, 79-86.

Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C., Nolan, L.K. (2008): Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (12), 3987-3996.

Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J. (1999): Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 29, 1128-1132.

Løvseth, A., Loncarevic, S., Berdal, K.G. (2004): Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3869-3872.

Martineau, F., Picard, J.F., Roy, H.P., Oullette, M., Bergeron, M.G. (1998): Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 618-623.

Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M. (2000): Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1032-1035.

Miller, W. G., Parker, C. T., Heath, S., Lastovica, A. J. (2007): Identification of genomic differences between *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *C. jejuni* subsp. *doylei* at the nap locus leads to the development of a *C. jejuni* subspeciation multiplex PCR method. *BMC Microbiology*, 7, 11.

Monday, S.R., Bohach, G.A. (1999): Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3411-3414.

Oliveira, D.C., De Lencastre, H. (2002): Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 2155-2161.

Paton, A.W., Paton, J.C. (1998): Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 598-602.

Ridom SpaServer. Online, <http://www.spaserver.ridom.de/>.

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Duberuil, P., Drolet, M., Lagacé, J. (2001): Development of rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2584-2589.

Salajka, E., Salajkova, Z., Alexa, P., Hornich, M. (1992): Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P2 in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhea in pigs. *Veterinary Microbiology*, 32, 163-175.

Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson S., O'Brien, A.D. (2012): Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 2951-63.

van Wamel, W.J.B., Hansenová Maňásková, S., Verbrugh, H., van Belkum, A. (2010): Short term micro-evolution and PCR-detection of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29, 119-122.

Ward, L.R., de Sa, J.D., Rowe, B. (1987): A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiology and Infection*, 99, 291-294.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

U nově připravených šarží sbírkových kmenů se doposud rutinně neprováděly uvedené postupy pro jejich charakterizaci, s výjimkou stanovení biochemické aktivity u některých druhů bakterií.

Využití navržených postupů výrazně zkvalitní služby poskytované Sbírkou zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) VÚVeL Brno.

5. UPLATNĚNÍ FUNKČNÍHO VZORKU

Funkční vzorek je na pracovišti autorů zaveden. Význam uplatnění funkčního vzorku spočívá ve zlepšení postupů přípravy nových šarží bakteriálních kmenů deponovaných na Sbírce zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) VÚVeL Brno.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V současné době není možná ekonomické aspekty funkčního vzorku určit.

7. DEDIKACE

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, číslo projektu QJ1630210.



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

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz