



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Doporučené postupy diagnostiky, antibiotické léčby
a prevence onemocnění prasat způsobených
bakteriemi *Streptococcus suis***

**MVDr. Nedbalcová Kateřina, Ph.D.
MVDr. Kucharovičová Ivana
MVDr. Zouharová Monika, Ph.D.
MVDr. Matiašková Katarína, Ph.D.
MVDr. Švejnová Marie
MVDr. Brychta Marek
Mgr. Šimek Bronislav
Mgr. Plodková Hana
Mgr. Pecka Tomáš
Mgr. Králová Natálie
MVDr. Matiašovic Ján, Ph.D.**

Doporučené postupy diagnostiky, antibiotické léčby a prevence onemocnění prasat způsobených bakteriemi *Streptococcus suis*

Nedbalcová Kateřina, VÚVeL., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Kucharovičová Ivana, SVÚ Jihlava, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

Zouharová Monika, VÚVeL., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Matiašková Katarína, VÚVeL., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Švejdová Marie, SVÚ Jihlava, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

Brychta Marek, SVÚ Jihlava, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

Šimek Bronislav, SVÚ Jihlava, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

Plodková Hana, SVÚ Jihlava, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

Pecka Tomáš, SVÚ Jihlava, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

Králová Natálie, VÚVeL., Hudcova 296/70, 621 00 Brno; Ústav experimentální biologie, PřF
MU, Kamenice 5, 625 00 Brno

Matiašovic Ján, VÚVeL., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Metodika byla vypracována v rámci řešení projektů Ministerstva zemědělství a Národní agentury pro zemědělský výzkum, čísla projektů QK1810193 a RO0518.

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

SVS/2022/151473-G

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Doporučené postupy diagnostiky, antibiotické léčby a prevence onemocnění prasat způsobených bakteriemi *Streptococcus suis***

Autor / autoři: Nedbalcová K., Kucharovičová I., Zouharová M., Matiašková K., Švejdrová M., Brychta M., Šimek B., Plodková H., Pecka T., Králová N. a Matiašovic J.

Název organizace/cí: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno
Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

Místo vydání: Brno

Rok vydání: 2022

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu Ministerstva zemědělství RO0518 a Národní agentury pro zemědělský výzkum č. QK1810193.

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

V Praze, dne 28. 11. 2022.

MVDr. Zbyněk Semerád

ústřední ředitel Státní veterinární správy

Dokument je podepsán elektronickým podpisem	
Podpisující:	MVDr. Petr Šatran Ph.D.
Organizace, OJ:	Státní veterinární správa
Sériové č. cert.:	22710606
Vydavatel cert.:	PostSignum Qualified CA 4
Datum a čas:	28.11.2022 14:45:51
Dřívod:	
Misto:	

Podpis/elektronický podpis zástupce
odborného útvaru státní správy
v zastoupení

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe:

V dne

Mgr. Jan Radoš

Digitální podpis:
30.11.2022 14:30

Podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky Odboru precizního
zemědělství, výzkumu a vzdělávání

I) Cíl metodiky

Cílem metodiky je vypracování doporučených harmonizovaných metod vzorkování, vyšetření a interpretace výsledků rezistence/citlivosti a následné léčby pro onemocnění prasat způsobených bakteriemi *Streptococcus suis*. Uplatnění doporučených postupů v praxi přispěje nejen ke snížení ekonomických nákladů chovatelů z důvodu účinných opatření proti vzplanutí onemocnění nebo zvolení účinné léčby v případě, že onemocnění v chovu již propuklo, ale také povede k plnění cílů Národního antibiotického programu ČR v oblasti uvažlivého používání antibiotik a předcházení nebo omezení šíření rezistencí bakteriálních populací k antibiotikům.

II) Vlastní popis metodiky

Předkládaná metodika představuje komplexní postup pro diagnostiku, léčbu a prevenci infekcí prasat způsobených *S. suis* od odběru klinických vzorků z nemocných prasat k bakteriologickému vyšetření a stanovení citlivosti/rezistence izolátů *S. suis* k antibiotikům, až po interpretaci výsledků a z ní vycházející následnou doporučenou léčbu antibiotiky. Zabývá se také možnostmi prevence vzniku onemocnění.

Onemocnění způsobená *S. suis* jsou v současnosti celosvětově jedním z největších ekonomických problémů v chovech prasat. Ačkoli je *S. suis* primárně považován za původce infekcí prasat, stále častěji je identifikován jako zoonotický agens odpovědný za závažné infekce v humánní medicíně. Případy infekce u lidí jsou však spíše sporadické a jsou obvykle způsobeny přenosem *S. suis* z kontaminovaných zvířat nebo produktů z vepřového masa na člověka, buď kožními lézemi, nebo orální cestou (Goyette-Desjardins a kol. 2014).

Za nejčastější a nejvýznamnější klinické projevy onemocnění u prasat jsou považovány meningitida a septikémie, ale *S. suis* může také způsobit například endokarditidu, pneumonii, artritidu, polyserositidu nebo vaginitidu. K léčbě infekcí *S. suis* se používají antibiotika (Staats a kol. 1997). Vzhledem k tomu, že příznaky onemocnění prasat způsobených *S. suis* nemají jednotné a charakteristické klinické symptomy, je nutné vždy před zahájením léčby pečlivě a přesně identifikovat původce onemocnění, aby následná antibiotická léčba byla účinná (Verela a kol. 2013; Devi a kol. 2017; Yongkiettrakoul a kol. 2019). Nevhodné nebo

nedbalé používání antimikrobiálních látek k léčbě infekcí jak v humánní, tak i ve veterinární medicíně může vést k rozvoji a šíření rezistence původců onemocnění k antibiotikům, což se v posledních letech stalo celosvětovým problémem. Rezistence k antibiotikům významně zvyšují riziko terapeutického selhání. Z toho důvodu je v současnosti mnoha národními a mezinárodními politickými programy podporován monitoring antibiotických rezistencí. Pro sledování antibiotických rezistencí je za metodu zlatého standardu považováno stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) antibiotik (El Garch a kol. 2016).

Kmeny *S. suis* nejsou antigenně jednotné. Na základě rozdílů definovaných u kapsulárních polysacharidů (CPS) bylo postupně popsáno 35 různých sérotypů (1-34 a 1/2) (Perch a kol. 1983; Gottschalk a kol. 1989; Gottschalk a kol. 1991; Higgins a kol. 1995). Některé sérotypy byly později na základě jejich genomové analýzy klasifikovány jako jiné bakteriální druhy. Proto v současné době rozlišujeme pouze 29 sérotypů *S. suis*. Původní sérotypy 20, 22, 26, 32, 33 a 34 jsou buď označovány jako jiný druh nebo dříve jako *S. suis*-like kmeny (Okura a kol. 2014).

Za zlatý standard pro sérotypizaci jsou stále považovány sérologické metody – aglutinační nebo koaglutinační testy s použitím sérotypově specifických antisér a původně se používaly i pro sérotypizaci *S. suis*. Postupem času byly vyvinuty sérotypizační metody PCR založené na detekci genů kódujících produkci CPS jednotlivých sérotypů, aby se usnadnilo určení 29 sérotypů u *S. suis*. Sérotypy 2 a 1/2 však, podobně jako sérotypy 1 a 14, nelze od sebe jednoznačně odlišit, protože při sérologickém stanovení i při provádění specifických sérotypizačních PCR vzájemně zkříženě reagují. Rozlišit tyto zkříženě reagující sérotypy je však velmi důležité, protože právě sérotypy 2 a 14 jsou spojeny s lidským onemocněním. Doposud jedinou dostupnou metodou, která dokáže odlišit tyto sérotypy díky přítomnosti polymorfismu v genu *cpsK* bylo celogenomové sekvenování (Athey a kol. 2016). Bohužel, tato metoda není vhodná pro rutinní testování, protože je náročná na vybavení a je poměrně drahá. Nedávno byla na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně vyvinuta jednoduchá a rychlá metoda PCR-RFLP pro odlišení sérotypu 2 *S. suis* od sérotypu 1/2 a sérotypu 1 od sérotypu 14, která je vhodná i pro rutinní diagnostiku (certifikovaná metodika Matiašovic a kol. 2020; publikace Matiašovic a kol. 2020).

II a) Epidemiologie, patogeneze

Prevalence morbidity a mortality infekcí *S. suis* v chovech prasat je v různých chovech odlišná. Morbidity onemocnění může být méně než 1 % nebo převyšuje až 50 %, ale obvykle se pohybuje kolem 5 %. Ve většině případů se infekce projeví jen u některých zvířat v chovu a trvá několik týdnů. Pokud je včas zahájena účinná léčba, dochází k úhynům postižených zvířat jen zřídka, ale pokud jsou zvířata neléčená, může se mortalita onemocnění pohybovat až kolem 20 %. Většinou se infekce objevuje u selat po odstavu, ve věku 4 až 12 týdnů, nejčastěji kolem 6. týdne, ale může postihnout prasata ve všech věkových kategoriích.

Zdrojem infekce v chovu jsou obvykle prasnice. *S. suis* přítomný v děloze nebo v pochvě březích prasnic může kolonizovat selata před porodem, v průběhu porodu nebo těsně po něm. Po porodu jsou selata krátce chráněna mateřskými protilátkami, a proto se infekce většinou projeví až po odstavu vlivem stresových faktorů působících na selata v tomto období. Pasivně chráněná selata také v době odstavu působí jako zdroj infekce pro selata od zdravých matek. *S. suis* je přítomen ve stájovém prostředí, nachází se ve výkalech infikovaných zvířat, ale může kontaminovat i vodu nebo prach. U selat po odstavu se infekce přenáší nasální nebo orální cestou. K rozvoji onemocnění *S. suis*, stejně jako u mnoha dalších bakteriálních infekcí, dochází po předchozí kolonizaci zvířat vlivem různých predispozičních stresových faktorů, jako jsou špatné zoohygienické podmínky v chovu, špatná ventilace, přesuny a transport zvířat, náhlé změny počasí a mnohé další. Přenos infekce mezi chovy probíhá většinou prostřednictvím kontaminovaných předmětů, oblečení a pomůcek pracovníků, kteří přišli do styku s nemocnými, ale i zdravými zvířaty. Jako vektor mohou působit hmyz nebo hlodavci, i když pravděpodobnost tohoto přenosu není vysoká. V ohniscích nákazy *S. suis* se často objevují koinfekce virem prasečího reprodukčního a respiračního syndromu prasat nebo jiných virových či bakteriálních patogenů.

II b) Klinické příznaky a postmortální nálezy

Klinické příznaky infekce *S. suis* se obvykle liší v závislosti na patogenezi onemocnění (Staats a kol. 1997). V perakutním stádiu onemocnění může nastat náhlý úhyn bez zjevných klinických příznaků, v akutní fázi onemocnění jsou klinické příznaky zprvu nespecifické, vysokou horečku provází deprese, nechutenství a malátnost. Později můžeme podle místa

manifestace infekce pozorovat ataxii, nekoordinovanost pohybů, třes, opistotonus, slepotu, ztrátu sluchu, „pádlování“ končetinami, křeče nebo ochrnutí v případě postižení CNS (nejčastějším projevem onemocnění jsou meningitidy), dušnost u případů endokarditid (častěji u starších věkových kategorií zvířat), kulhání nebo neochotu k pohybu u artritid, u březích prasnic může dojít k potratům. Někdy můžeme pozorovat i ztížené dýchání, cyanózu nebo jiné respirační potíže, které obvykle provázejí pneumonie, ale role *S. suis* jako primárního původce pneumonií bez spolupůsobení jiného infekčního agens dosud nebyla potvrzena. Akutní stádium onemocnění může končit úhynem (v případě neexistující nebo špatné léčby je mortalita až 20 %), uzdravením nemocných zvířat nebo může přejít v chronickou formu onemocnění, projevující se především pohybovými obtížemi, nechutenstvím, ale i respiračními komplikacemi. V některých případech může dojít i k vymizení klinických příznaků a z původně nemocných zvířat se stanou subkliničtí nosiči.

Nálezy při pitvě odpovídají místu klinické manifestace a průběhu infekce. V případech meningitid nacházíme zánětlivé změny na mozku, prokrvení mozkových cév nebo přítomnost purulentního exsudátu, artritidy provází zmnožení a zakalení kloubní tekutiny v postižených kloubech. Pokud je onemocnění celkové, nacházíme makroskopické léze na vnitřních orgánech (plíce, játra, slezina), přítomnost purulentního exsudátu v dutině hrudní i břišní, který je později organizován ve fibrin. Diferenciálně diagnosticky je třeba odlišit především Glässerovu chorobu, kterou způsobuje *Glaesserella parasuis* s velmi podobnými patologicko-anatomickými projevy.

II c) Odběr vzorků k laboratornímu vyšetření

Odběr klinických vzorků se provádí *in vivo* nebo *post mortem*. Místo odběru vzorků je zvoleno podle klinických příznaků onemocnění. *In vivo* je možné provést u respiračních obtíží nasální výtěr, případně výtěr dutiny ústní a mandlí, u enterálních příznaků se odebírají vzorky trusu nebo rektální výtěry. V případě dermatitid stíráme postižené místo. *Post mortem* se odebírají změněné části postižených orgánů: mozek, plíce, slezina, játra, ledviny, vzorky kloubní tekutiny, vzorky exsudátu v dutině břišní a hrudní, fibrinové nálepy z povrchu orgánů a stěry pohrudnice a pobřišnice.

Odebrané klinické vzorky se po odběru uloží do chladicího boxu a co nejrychleji, nejpozději však do 24 hodin, se dopraví do laboratoře k dalšímu zpracování. Stěry je nutné uchovávat a

transportovat na tamponech s transportním médiem z důvodu krátkodobého přežívání bakterií ve vnějším prostředí. Jestliže není možné klinický materiál přepravit do laboratoře během 24 hodin po odběru, je nutné vzorky zamrazit a do laboratoře je dopravit v tomto stavu.

II d) Izolace a identifikace *Streptococcus suis*

Odebrané vzorky se zpracují běžnými a dostupnými základními bakteriologickými kultivačními postupy a metodami – kultivací stěrů a výtěrů nebo klinického a sekčního materiálu na krevním agaru. Obvyklá doba inkubace primokultur je 22 - 24 hodin, při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Při podezření na nález kolonií *S. suis* se suspektní kolonie izolují na krevním agaru, pro lepší a rychlejší růst může kultivace probíhat v mikroaerofilní atmosféře 22 – 24 hodin při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Po získání čisté bakteriální kultury následuje identifikace patogenu, pro kterou je doporučeno využití metody MALDI – TOF (Matrix Asisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) provedení standartního biochemického vyšetření komerčním testem, např. STREPTOTESTEM 24 (ERBA LACHEMA, ČR) a mikroskopického vyšetření (barvení dle Gramma). Souběžně a pro úplnost je doporučeno provedení rychlé sklíčkové latex aglutinace všech izolátů pomocí dostupných komerčních kitů. Ověření správnosti druhové identifikace a odlišení kmenů *S. suis* od *S. suis*-like se provádí detekcí *recN* genu (recombination/repair protein gene) metodou PCR.

II e) Sérotypizace

Pro stanovení sérotypu *S. suis* se provádí multiplex PCR (Kerdsin a kol. 2014) ve čtyřech samostatných PCR reakcích. Použité primery cílí na následující geny: (i) geny glykosyltransferázy *cps1J*, *cps14J*, *cps1/2J*, *cps2J*, *cps3J*, *cps7H*, *cps9H*, *cps16K*, *cps21N*, *cps23I* a *cps24L*; (ii) geny transportéru *cps3K*, *cps4M* a *cps5N* kapsulární polysacharidové repetice; (iii) gen *cps4N* UDP-glukózadehydrogenázy; (iv) geny polymerázy oligosacharidové repetitivní jednotky *cps6I*, *cps10M*, *cps11N*, *cps12J*, *cps13L*, *cps15K*, *cps17O*, *cps18N*, *cps19L*, *cps25M*, *cps27K*, *cps28L*, *cps29L* a *cps310I*; (v) gen N-acetylmannosaminytransferázy *cps8H*; a (vi) gen *cps25N* pro glycerofosfotransferázu. Použité primery jsou popsány v tabulce 1.

Tabulka 1: Primery pro multiplex PCR na stanovení sérotypů *S. suis*

Sérotyp	Sekvence (5'→3')	Geny	Velikost PCR produktu (bp)
1 a 14	F: AATCATGGAATAAAGCGGAGTACAG	<i>cps1J, cps14J</i>	550
	R: ACAATTGATACGTCAAAATCCTCACC		
2 a 1/2	F: GATTTGTCGGGAGGGTACTTG	<i>cps2J, cps1/2J</i>	450
	R: TAAATAATATGCCACTGTAGCGTCTC		
3	F: TGGGAGAAGGCAGAAAGTACGAGA	<i>cps3J–cps3K</i>	1273
	R: ACCCCCAGAAGAGCCGAAGGA		
4	F: ACTTGAGTTGTCGGAGTAGTGCT	<i>cps4M–cps4N</i>	783
	R: ACCGCGATGGATAGGCCGAC		
5	F: TGATGGCGGAGTTTGGGTCGC	<i>cps5N</i>	166
	R: CGTAACAACCGCCCCAGCCG		
6	F: TACGGTCTCCCTTGCCTGTA	<i>cps6I</i>	325
	R: AACTCAGCTAGTGCTCCACG		
7	F: GATGATTTATGGCACCCGAGTAAGC	<i>cps7H</i>	150
	R: AGTCACAATTGCTGGTCCTGACACC		
8	F: ATGGGCGTTGGCGGGAGTTT	<i>cps8H</i>	320
	R: TTACGGCCCCCATCACGCTG		
9	F: GGGATGATTGCTCGACAGAT	<i>cps9H</i>	300
	R: CCGAAGTATCTGGGCTACTG		
10	F: TTACGAGGGGATTCTGGGGT	<i>cps10M</i>	153
	R: CGGGACAACAGATGGAACCT		
11	F: TACAGTGCTTGCAGCCCTAC	<i>cps11N</i>	896
	R: CGACTTGTCGTGCCCTGAT		
12	F: TGTGGCGATAGGACAACAGG	<i>cps12J</i>	209
	R: ACCAAGAAGTTTCCGCCTGA		
13	F: CTGGTGCTGCAATTTGCTT	<i>cps13L</i>	1135
	R: GCAGACTAGCTGCAGTTCCA		
15	F: GCAAGAAAGCTTCCGGATGGA	<i>cps15K</i>	274

	R: CAAGAGAGTGTGCAACCCCA		
16	F: TGGAGGAGCATCTACAGCTCGGAAT	<i>cps16K</i>	202
	R: TTTGTTTGCTGGAATCTCAGGCACC		
17	F: ACTTGGGTTGGAATGGCGAA	<i>cps17O</i>	906
	R: ACCACCGAAAGTCAGGTCAC		
18	F: CGGGGCAGTCTTACTCATGG	<i>cps18N</i>	432
	R: ATGACAGCGAAACGGACAGA		
19	F: AGCAGGGTTGCGTATGGCGG	<i>cps19L</i>	1024
	R: ACAAGCACCAGCAAAGACCGCA		
21	F: GGTGGCAAGGAGAGCAAAGT	<i>cps21N</i>	325
	R: ACATGGTAAGCCATTGCTGGA		
23	F: TGCTCAACAAACGCAGCAAA	<i>cps23I</i>	454
	R: TGA CTGGTACATCTGCAGCC		
24	F: ACCCGGAAAAACCAGGAGTT	<i>cps24L</i>	500
	R: ACCAATCAATGCCAAGCGAC		
25	F: GGAGGAGCTGCGGGCTCATA	<i>cps25M– cps25N</i>	1211
	R: TGGCCACAACCTGGATGCGTT		
27	F: CTACGCCAATCGAAGCCAGA	<i>cps27K</i>	506
	R: CCAGTAAGAAGCCTGTGCGCA		
28	F: GGACTTCGGTACCTTAGCGT	<i>cps28L</i>	865
	R: CTCCAGCACATTCCCGTACC		
29	F: GTGCGGGCGTTATTTTTGGT	<i>cps29L</i>	435
	R: AGCCTTGCAACCCATTTCCT		
30	F: CTTTAATTGCTTGCGCCCGT	<i>cps30I</i>	170
	R: ATTCGGGCTACCCATTGCAG		
31	F: GGAGTGCTCTATGCCACCTT	<i>cps31L</i>	550
	R: GCATTGCCCCTACAGCAAAC		
Všechny	F: CTACAAACAGCTCTCTTCT	<i>recN</i>	336
	R: ACAACAGCCAATTTCATGGCGTGATT		

První PCR reakce zahrnuje primery pro sérotypy 1+14, 2+1/2, 3, 7, 9, 11, 14, 16 a druhově specifický gen *recN*, který byl přidán pro ověření identifikace *S. suis*, protože není amplifikován v sérotypech (20, 22, 26, 32, 33 a 34), a proto byly nedávno po reklasifikaci vyloučeny z druhu *S. suis*. Druhá reakce zahrnovala primery pro sérotypy 4, 5, 8, 12, 18, 19, 24 a 25, třetí primery pro sérotypy 6, 10, 13, 15, 17, 23 a 31 a čtvrtá primery pro sérotypy 21, 27, 28, 29 a 30.

Několik kolonií čisté bakteriální kultury se resuspenduje v 50 µl sterilní destilované vody. Následuje inkubace po dobu 10 minut při 100 °C a centrifugace po dobu 10 minut při 10 000 x g. Supernatant se použije v PCR reakci jako templát DNA. PCR test se provádí ve 20 µl reakční směsi, která obsahuje: 10 µl HotStarTaq Plus Master Mix 2× (Qiagen), 1 µL primerů (konečná koncentrace 0,2 µM), 2 µL koncentráту CoralLoad 10× (Qiagen), 4 µl vody bez DNázy a 2 µl DNA. PCR program se nastaví následovně: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 5 minut, následovalo 30 cyklů denaturace při 94 °C po dobu 30 s, žíhání při 59 °C po dobu 90 s, prodlužování při 70 °C po dobu 90 s a konečné prodloužení 72 °C po dobu 8 minut.

Elektroforéza probíhá na 2% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem a s následnou vizualizací pod UV světlem. Velikosti produktů PCR se srovnávají se standardem velikosti molekul (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder; Thermo Fisher Scientific). V každé PCR reakci musí být zahrnuty referenční kmeny *S. suis* jako kontrola.

Všechny terénní vzorky identifikované metodou multiplex PCR detekující geny pro syntézu kapsulárních polysacharidů jako sérotyp 1/2 nebo 2 a sérotyp 1 nebo 14 byly dále testovány pomocí PCR-RFLP (Matiašovic a kol. 2020) identifikující substituci na nukleotidu 483 genu *cpsK*.

Použité primery:

cpsK-F 5'-GTTGCTGGTTATGATAGGGTAG-3'

cpsK-R2 5'-AAGCTTCTTTTGCTGTTTGCTC-3'

PCR je prováděna s využitím kitu Taq mastermix PPP (TopBio) v celkovém objemu 10 µl. PCR program je nastaven následovně: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 5 minut následovaná 30 cykly při 95 °C po dobu 15 sekund, 53 °C po dobu 30 sekund a 72 °C po

dobu 30 sekund. Konečné prodloužení bylo 72 °C po dobu 10 minut. Pět mikrolitrů výsledného 486 bp produktu se štěpí 10 U BstNI restriční endonukleázy v celkovém objemu 20 ul. Elektroforéza probíhá na 2% agarózový gel obarveném SimplySafe s následnou vizualizací pod UV světlem. Velikosti produktů PCR se srovnávají se standardem velikosti molekul (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder; Thermo Fisher Scientific). V každé PCR reakci musí být zahrnutý referenční kmeny *S. suis* jako kontrola.

V případě přítomnosti nukleotidu G na nukleotidové pozici 483 genu *cpsK* (sérotypy 2 a 14), odpovídající nukleotidu 139 produktu PCR, je produkt PCR rozštěpen BstNI na dva fragmenty: 139 a 347 bp. V případě nukleotidu C nebo T na nukleotidové pozici 483 genu *cpsK* (sérotypy 1/2 a 1), odpovídající nukleotidu 139 produktu PCR, není produkt PCR rozštěpen a výsledkem je jediný fragment o velikosti 486 bp.

Počet a procentuální zastoupení jednotlivých sérotypů *S. suis* z České republiky, které byly sérotypizovány v letech 2018 – 2022 v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum ukazuje tabulka 2.

Tabulka 2: Prevalence sérotypů *S. suis* v chovech v ČR v letech 2018 – 2022 (n = 506)

Sérotyp	Počet izolátů						%
	2018	2019	2020	2021	2022	2018 - 2022	
s.1	5	3	3	8	3	22	4,3
s.1/2	11	11	12	10	10	54	10,7
s.2	7	4	7	14	11	43	8,5
s.3	4	6	6	7	0	23	4,5
s.4	8	8	3	7	2	28	5,5
s.5	3	1	2	2	0	8	1,6
s.6	0	0	0	0	0	0	0
s.7	5	9	21	35	13	83	16,4
s.8	2	3	10	9	5	29	5,7
s.9	8	3	11	10	7	39	7,7
s.10	0	0	0	1	2	3	0,6
s.11	1	1	0	1	0	3	0,6
s.12	0	1	5	2	0	8	1,6
s.13	0	0	0	0	0	0	0
s.14	0	1	0	1	1	3	0,6
s.15	1	2	0	3	3	9	1,8
s.16	1	4	0	7	5	17	3,4

s.17	0	0	0	0	0	0	0
s.18	0	0	0	0	0	0	0
s.19	3	1	0	0	1	5	1
s.20	0	0	0	0	0	0	0
s.21	6	1	1	1	0	9	1,8
s.22	0	0	0	0	0	0	0
s.23	0	0	2	2	0	4	0,8
s.24	0	0	0	0	0	0	0
s.25	0	0	0	0	0	0	0
s.26	0	0	0	0	0	0	0
s.27	0	0	0	0	0	0	0
s.28	1	1	0	0	0	2	0,4
s.29	5	6	0	4	3	18	3,6
s.30	0	0	0	0	0	0	0
s.31	3	2	1	8	3	17	3,4
s.32	0	0	0	0	0	0	0
s.33	0	0	0	0	0	0	0
s.34	0	0	0	0	0	0	0
NT	20	18	13	21	7	79	15,6
Celkem	94	86	97	153	76	506	

II f) Stanovení citlivosti k antibiotikům

Vyšetření citlivosti/rezistence k antibiotikům se provádí stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) mikrodiluční metodou (Nedbalcová a kol. 2018, funkční vzorek) a následným zařazením izolátů do kategorií citlivosti: citlivý – intermediární – rezistentní na základě klinických breakpointů. MIC se stanovují použitím doporučených diagnostických souprav vyrobených na pracovišti autorů ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně (Nedbalcová a kol. 2018, ověřená technologie). Složení diagnostického setu a interpretační kritéria zjištěných MIC jsou přehledně uvedeny v Tabulce 3. Na mikrotitrační destičce s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H) jsou ve sloupcích dvojkové ředící řady dvanácti navržených antimikrobiálních látek, u jedenácti antimikrobiálních látek (sloupce 1-11) je na destičce 8 ředění (řádky A-H) a u jedné antimikrobiální látky (sloupec 12) je 7 ředění (řádky B-H) a v řádku A je jamka s médiem bez antimikrobiální látky sloužící jako pozitivní kontrola růstu testovaných bakterií. Počáteční koncentrace jednotlivých antimikrobiálních látek na destičce jsou rozdílné a jsou voleny tak, aby hodnoty MIC vyšetřovaných bakterií pokud možno zahrnovaly rozmezí breakpointů citlivosti/rezistence

podle závazných mezinárodních metodik CLSI, EUCAST a CA-SFM a rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů povinně testovaných v rámci kontroly kvality. Jako růstové médium je použit Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB) s 5 % lyzované koňské krve. Pomocí setu jsou stanovovány MIC pro antibiotika, která jsou běžně používána k léčbě infekcí bakteriálního původu prasat, i když některá z nich nejsou pro léčbu infekcí *S. suis* nejvhodnější a jejich citlivosti nebo rezistence jsou sledovány spíše z epidemiologických důvodů.

Tabulka 3: Set pro stanovení MIC u kmenů *Streptococcus suis* (koncentrace antimikrobik jsou uvedeny v mg/l)

PEN	AMP	AMC*	EFT	ENR	FFC	CLI	TIA	TIL	TUL	TET	SXT**
4	4	32	16	8	64	16	32	128	128	32	PKR
2	2	16	8	4	32	8	16	64	64	16	4
1	1	8	4	2	16	4	8	32	32	8	2
0,5	0,5	4	2	1	8	2	4	16	16	4	1
0,25	0,25	2	1	0,5	4	1	2	8	8	2	0,5
0,125	0,125	1	0,5	0,25	2	0,5	1	4	4	1	0,25
0,06	0,06	0,5	0,25	0,125	1	0,25	0,5	2	2	0,5	0,125
0,03	0,03	0,25	0,125	0,06	0,5	0,125	0,25	1	1	0,25	0,06

citlivý; intermediární; rezistentní

PEN = penicilin; AMP = ampicilin; AMC = amoxicilin/kyselina klavulanová (2/1); EFT = ceftiofur; ENR = enrofloxacin; FFC = florfenikol; CLI = klindamycin; TIA = tiamulin; TIL = tilmikosin; TUL = tulathromycin; TET = tetracyklin; SXT = trimethoprim/sulfamethoxazol (1/19); PKR = pozitivní kontrola růstu

*koncentrace v tabulce jsou uvedeny pro amoxicilin; **koncentrace v tabulce jsou uvedeny pro trimethoprim

Výroba diagnostického setu a stanovení MIC se provádí v souladu s mezinárodně uznávanými metodikami pro stanovení citlivosti/rezistence veterinárních patogenů vydanými v dokumentech CLSI. K vyhodnocení výsledků jsou použity klinické breakpointy uvedené v CLSI dokumentu VET01S pro *S. suis* (pro penicilin, ampicilin, ceftiofur, enrofloxacin, florfenikol a tetracyklin). Pro ostatní antibiotika nejsou breakpointy pro *S. suis* definovány, proto jsou derivovány z jiných dostupných interpretačních kritérií – dle CLSI dokumentu VET01S pro kombinaci trimethoprimu se sulamethoxazolem a pro klindamycin z humánních breakpointů, pro kombinaci amoxicilinu s kyselinou klavulanovou z breakpointů stanovených pro kočky a pro tilmikosin a tulathromycin jsou breakpointy derivovány z breakpointů pro izoláty *Pasteurella multocida* z prasat. Při posuzování výsledků interpretovaných dle převzatých kritérií je třeba brát v úvahu, že pro prasata nemusí být interpretace výsledků zcela přesná, a pro predikci léčebné účinnosti antibiotika je důležité zhodnocení MIC a farmakokinetických vlastností jednotlivých antibiotik. Pro vyhodnocení testování citlivosti

izolátů *S. suis* k tiamulinu jsou použity breakpointy, které byly dříve publikovány v odborné literatuře. Kontrola kvality vyšetření byla hodnocena paralelním stanovením MIC kontrolního referenčního kmene *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. U referenčního kmene je stanovené rozmezí hodnot, ve kterém musí být MIC pro jednotlivá antibiotika v destičce, aby byl výsledek testu platný. Pokud se hodnoty u některého antibiotika liší, je nutné test opakovat. Rozmezí hodnot MIC u referenčního kmene je vyznačeno v tabulce 4 šedou barvou. U enrofloxacinu a tilmikosinu není rozmezí hodnot MIC vyznačeno, protože u těchto antibiotik není rozmezí MIC u referenčního kmene *S. pneumoniae* ATCC 49619 stanoveno.

Tabulka 4: Rozmezí MIC u *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 pro kontrolu kvality

PEN	AMP	AMC*	EFT	ENR	FFC	CLI	TIA	TIL	TUL	TET	SXT**
4	4	32	16	8	64	16	32	128	128	32	PKR
2	2	16	8	4	32	8	16	64	64	16	4
1	1	8	4	2	16	4	8	32	32	8	2
0,5	0,5	4	2	1	8	2	4	16	16	4	1
0,25	0,25	2	1	0,5	4	1	2	8	8	2	0,5
0,125	0,125	1	0,5	0,25	2	0,5	1	4	4	1	0,25
0,06	0,06	0,5	0,25	0,125	1	0,25	0,5	2	2	0,5	0,125
0,03	0,03	0,25	0,125	0,06	0,5	0,125	0,25	1	1	0,25	0,06
≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤	≤

PEN = penicilin; AMP = ampicilin; AMC = amoxicilin/kyselina klavulanová (2/1); EFT = ceftiofur; ENR = enrofloxacin; FFC = florfenikol; CLI = klindamycin; TIA = tiamulin; TIL = tilmikosin; TUL = tulathromycin; TET = tetracyklin; SXT = trimethoprim/sulfamethoxazol (1/19); PKR = pozitivní kontrola růstu

*koncentrace v tabulce jsou uvedeny pro amoxicilin; **koncentrace v tabulce jsou uvedeny pro trimethoprim

Provedení testu – příprava inokula

Bakteriologickou kličkou se odebere 3 – 5 bakteriálních kolonií kultivovaných na neselektivním agarovém médiu (inkubovaných při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 18 h – 24 h (pokud není požadován delší čas inkubace) do sterilního bujónu nebo fyziologického roztoku. Denzita suspenze se bujónem nebo fyziologickým roztokem upraví na zákal 0,5 McFarlanda, který na fotometru (vlnová délka 625 nm, kyveta s optickou dráhou 1 cm) odpovídá absorbanci 0,08 – 0,13 nebo je možné použít jiný vhodný ověřený nefelometr nebo denzitu alternativně vyhodnotit vizuálně podle zákalového standardu McFarland. Bakteriální suspenze o denzitě 0,5 McFarlanda (odpovídá 5×10^8 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922) se dále naředí na finální koncentraci inokula v jamce mikrotitrační desky 5×10^5 CFU.

Příklad postupu:

1 ml inokula o denzitě 0,5 MCFarlanda se naředí 9 ml sterilního fyziologického roztoku (odpovídá 5×10^7 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922), po přenesení 5 μ l takto naředěného inokula do jamky mikrotitrační desky s obsahem 100 μ l bujónu je dosažena finální koncentrace inokula v jamce 5×10^5 CFU.

Naočkování mikrotitračních destiček

Rozmražené mikrotitrační destičky se musí naočkovat do 15 min. po standardizaci suspenze inokula. Do každé jamky destičky obsahující 100 μ l zředěné antimikrobiální látky v bujónu se přidá maximálně 5 μ l suspenze zředěného inokula. (Multikanálovou pipetou přesně 5 μ l nebo inokulátorem – ježkem).

Okamžitě po naočkování se ověří skutečná denzita inokula. Z jamky pozitivní kontroly růstu se odebere 10 μ l bakteriální suspenze, která se následně zředí v 10 ml bujónu nebo fyziologickém roztoku. Z tohoto ředění se přenesou 100 μ l kultury na vhodnou agarovou půdu, která se inkubuje přes noc. Zkouška se považuje za vyhovující, pokud na agarové půdě vyrostou 20 – 80 kolonií.

Ověření bakteriální čistoty: Z jamky bez antimikrobiální látky (pozice 12A na destičce) se odebere 100 μ l, které se kultivují na neselektivním agarovém médiu při 34 – 37 °C po dobu 18 – 24 hodin.

Před inkubací se mikrotitrační destičky uzavřou těsnícím víčkem nebo lepicí fólií.

Inkubace mikrotitračních destiček

Naočkované destičky musí být vloženy do inkubátoru do 15 minut po inokulaci. Pokud se pro testovaný bakteriální druh neuvádí jinak, mikrotitrační destičky pro růstově nenáročné mikroorganismy se inkubují aerobně při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 18 – 20 hodin.

Odečítání výsledků

Výsledky se odečítají po dosažení dostatečného nárůstu mikroorganismu (usazenina nebo zřetelný zákal) a po ověření bakteriální čistoty a příslušné koncentrace inokula. Zjištěná hodnota MIC představuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která plně inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu.

II g) Doporučené postupy antibiotické léčby

Pro úspěšnost terapie je nejdůležitější včasné zahájení parenterální léčby nemocných prasat vhodnými antimikrobiálními látkami. Je třeba nezapomenout, že je antibiotickou léčbu zapotřebí kombinovat s dobrou zoohygienickou praxí – zejména je důležitá čistota prostředí a vybavení stájí, správné větrání a dostatek prostoru pro zvířata. Léky volby jsou penicilinová antibiotika, především širokospektrální β -laktamy – benzylpenicillin, ampicilin a amoxicilin (antibiotika 1. volby). Tato antibiotika by měla být podávána v pitné vodě v medikovaném krmivu minimálně 5 dní.

I když jsou peniciliny obecně proti infekcím *S. suis* účinné, jsou publikovány práce, ve kterých je poukazováno na záchyt rezistentních kmenů k těmto antimikrobiálním látkám (Varela a kol. 2013, El Garch a kol. 2016, Devi a kol. 2017, Yongkiettrakul a kol. 2019, Tan a kol. 2020). Rezistence jsou nacházeny v různé míře, většinou mezi 0 – 25 %. Proto platí, že antimikrobiální léčba by měla být aplikována až po stanovení citlivostí nebo rezistencí aktuálního izolátu v chovu k antimikrobiálním látkám. K léčbě infekcí *S. suis* dále přichází v úvahu použití ko-trimoxazolu, amoxicilinu v kombinaci s klavulanovou kyselinou, florfenicolu, doxycyklin (antibiotika 2. volby) lze použít i antimikrobiální látky z kategorie „B – omezte“ (dle kategorizace Evropské lékové agentury) – enrofloxacin a cefalosporiny (antibiotika 3. volby). Antibiotika kategorie B jsou kriticky významná v humánní medicíně a u zvířat by měla být použita pouze tehdy, když terapie antibiotiky 1. nebo 2. volby selže a měla by být použita důsledně na základě potvrzení citlivosti původce onemocnění k antibiotiku, o kterém se uvažuje pro léčbu.

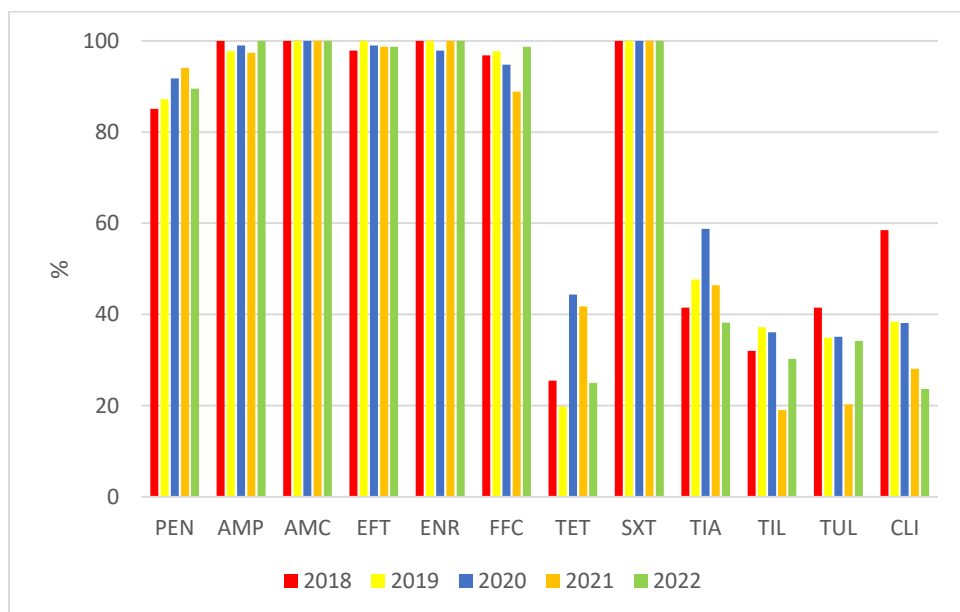
V následujícím grafu 1 jsou znázorněny profily citlivosti a rezistence izolátů *S. suis* pocházejících z chovů prasat v České republice ze sledování, které probíhalo v letech 2018 – 2022 v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum s akronymem STREPTOPIG. V grafu 2 je vyznačené procento citlivých izolátů k jednotlivým testovaným antibiotikům v jednotlivých letech (Nedbalcova a kol. 2022).

Graf 1: Procentuální zastoupení citlivých, intermediárních a rezistentních izolátů *S. suis* z ČR k vybraným antibiotikům v letech 2018 – 2022 (n – 506)



PEN = penicilin; AMP = ampicilin; AMC = amoxicilin/kyselina klavulanová; EFT = ceftiofur; ENR = enrofloxacin; FFC = florfenikol; CLI = klindamycin; TET = tetracyklin; SXT = trimethoprim/sulfamethoxazol; TIA = tiamulin; TIL = tilmikosin; TUL = tulathromycin

Graf 2: Procenta citlivých izolátů *S. suis* z ČR v letech 2018 (n = 94), 2019 (n = 86), 2020 (n = 97), 2021 (n = 153) a 2022 (n = 86) k vybraným antibiotikům



PEN = penicilin; AMP = ampicilin; AMC = amoxicilin/kyselina klavulanová; EFT = ceftiofur; ENR = enrofloxacin; FFC = florfenikol; CLI = klindamycin; TET = tetracyklin; SXT = trimethoprim/sulfamethoxazol; TIA = tiamulin; TIL = tilmikosin; TUL = tulathromycin

II h) Preventivní opatření

Je potřebné dbát především na zoohygienické podmínky - vyhovující klimatizaci a podmínky v chovu, minimalizaci stresových faktorů a sledovat stav zvířat v chovu (identifikovat první příznaky onemocnění u individuálních zvířat) z důvodu nutnosti ošetření i dalších zvířat, která přišla s infekčním agens do kontaktu. Vhodné jsou tzv. „all in/all out“ systémy chovu s velmi pečlivou mechanickou očištěnou a dezinfekcí (včetně vyschnutí povrchů) před naskladněním do jednotlivých ustájení.

Cestou ke snížení infekčního tlaku *S. suis*, zvláště když je v současnosti snaha omezit používání antibiotik u hospodářských zvířat, by mohla být vakcinace. Navození ochranné imunity proti streptokokovým infekcím je bohužel poměrně obtížný úkol. Vzhledem k průběhu interakce streptokokových patogenů s imunitním systémem savců se zdá být klíčové zajistit dostatečnou protilátkovou odpověď proti kapsulárnímu polysacharidu, aby se zabránilo závažnému klinickému výsledku infekce. Bohužel, přes značný ekonomický a klinický význam *S. suis* není vakcína pro prevenci onemocnění u prasat dosud komerčně dostupná, s výjimkou autogenních vakcín, avšak použití autogenních vakcín vyrobených z izolátů, vyvolávajících onemocnění na farmách, je omezené z legislativních i praktických důvodů.

Při vakcinaci se uplatňují různá vakcinační schémata, mohou být vakcinována pouze selata nebo jsou vakcinovány prasnice před porodem s následnou vakcinací selat v různě doporučených intervalech.

III) Srovnání „novosti postupů“

Dosud pro léčbu infekcí prasat způsobených *S. suis* nebyly v ČR vypracovány žádné doporučené postupy diagnostiky, antibiotické léčby a prevence. V metodice jsou popsány nové a originální postupy izolace, identifikace a typizace původce onemocnění, včetně doporučených postupů antibiotické léčby onemocnění, které vychází z aktuálního stavu rezistencí *S. suis* v ČR a z literárních rešerší nejnovějších publikovaných informací.

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika má sloužit veterinárním lékařům a diagnostickým veterinárním laboratořím pro účel konzultace možné léčby infekcí způsobených *S. suis* u prasat. Předepsání konkrétního léčiva veterinárním lékařem k léčbě konkrétního onemocnění se odvíjí od stanovení správné diagnózy a zvážení klinického stavu zvířat.

Uplatnění metodiky se projeví ve zkvalitnění terapie infekcí hospodářských zvířat bakteriálního původu, zlepšením zdravotní situace v chovech hospodářských zvířat a v dlouhodobém horizontu může přispět k omezení nadužívání antibiotik ve veterinární medicíně a tím omezit šíření nežádoucích rezistencí bakteriálních populací k antibiotikům.

V) Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou minimální, metody izolace, identifikace, typizace a testování antimikrobiálních rezistencí je u jiných bakteriálních původců onemocnění zvířat ve veterinárních diagnostických laboratořích běžně prováděno a je cenově dostupné. Zavedení postupů nevyžaduje náklady na nové vybavení laboratoří.

Ekonomický přínos uplatňování doporučených léčebných postupů je významný pro chovatele hospodářských zvířat, kterým se zlepšením zdravotní situace v chovu sníží náklady na léčbu nemocných zvířat a zvýší ekonomické výnosy v důsledku produkce kvalitních surovin.

VI) Seznam použité a související literatury

Athey, T.B., Teatero, S., Lacouture, S., Takamatsu, D., Gottschalk, M., Fittipaldi, N. Determining *Streptococcus suis* serotype from short-read whole-genome sequencing data. BMC Microbiol. 2016, 16, 162.

Devi, M., Dutta, J.B., Rajkhowa, S., Kalita, D., Saikia, G.K., Das, B.C., Hazarika, R.A., Mahato, G. Prevalence of multiple drug resistant *Streptococcus suis* in and around Guwahati. India Vet. World 2017, 10, 556–561.

El Garch, F., de Jong, A., Simjee, S., Moyaert, H., Klein, U., Ludwig, C., Marion, H., Haag-Diergarten, S., Richard-Mazet, A., Thomas, V., et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe. 2009–2012: VetPath results. *Vet. Microbiol.* 2016, 194, 11–22.

Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Mittal, K.R., Henrichsen, J. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 2633–2635.

Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Beaudoin, M., Henrichsen, J. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 2590–2594.

Goyette-Desjardins, G., Auger, J.P., Xu, J., Segura, M., Gottschalk, M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerg. Microb. Infect.* 2014, 3, e45.

Higgins, R., Gottschalk, M., Boudreau, M., Lebrun, A., Henrichsen, J. Description of six new capsular types (29–34) of *Streptococcus suis*. *J. Vet. Diagn. Investig.* 1995, 7, 405–406.

Kerdsin, A., Akeda, Y.; Hatrongjit, R., Detchawna, U., Sekizaki, T., Hamada, S., Gottschalk, M., Oishi, K. *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR. *J. Med. Microbiol.* 2014, 63, 824–830.

Nedbalcova, K., Kucharovicova, I., Zouharova, M., Matiaskova, K., Kralova, N., Brychta, M., Simek, B., Pecha, T., Plodkova, H., Matiasovic, J. Resistance of *Streptococcus suis* isolates from the Czech Republic during 2018 – 2022. *Antibiotics* 2022, 11, 1214.

Okura, M., Lachance, C., Osaki, M., Sekizaki, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Nakagawa, I., Hamada, S., Rossignol, C., Gottschalk, M., et al. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52, 1714–1719.

Perch, B., Pedersen, K.B., Heinrichsen, J. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: Six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 1983, 17, 993–996.

Staats, J.J., Feder, I., Okwumabua, O., Chengappa, M.M. *Streptococcus suis*: Past and present. *Vet. Res. Commun.* 1997, 21, 381–407.

Tan, M.F., Tan, J., Zeng, Y.B., Li, H.Q., Yang, Q., Zhou, R. Antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of *Streptococcus suis* isolated from clinically healthy pigs from 2017 to 2019 in Jiangchi Province, China. *J. Appl. Microbiol.* 2020, 130, 797–806.

Varela, N.P., Gadbois, P., Thibault, C., Gottschalk, M., Dick, P., Wilson, J. Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. *Anim. Health Res. Rev.* 2013, 14, 68–77.

Yongkiettrakul, S., Maneerat, K., Arechanajan, B., Malila, Y., Srimanote, P., Gottschalk, M., Visessanguan, W. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs, asymptomatic pigs, and human patients in Thailand. *BMC Vet. Res.* 2019, 15, 5.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice / Výstupy z originální práce

Nedbalcová, K., Zouharová, M., Brychta, M., Kucharovičová, I. 2018. Set ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u *Streptococcus suis*. Funkční vzorek 4595/2018. Vydal Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. v roce 2018, ISBN 978-80-88233-31-2.

Nedbalcová, K., Zouharová, M., Brychta, M., Kucharovičová, I.: Výroba setu ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek u *Streptococcus suis*. Ověřená technologie 4903/2018, ISBN 978-80-88233-34-3, VÚVeL Brno, 2018.

Nedbalcová, K., Zouharová, M. Sérotypizace terénních izolátů *Streptococcus suis* pocházejících z chovů. *Veterinářství* 2019;69(12): 854-857.

Nedbalcová, K., Kucharovičová, I., Zouharová, M., Švejsová, M., Brychta, M., Matiašovic, J. Výsledky sledování rezistencí izolátů *Streptococcus suis* k antimikrobikům v roce 2019, *Veterinářství* 2/2020

Nedbalcová, K., Kucharovičová, I., Brychta, M., Šimek, B., Zouharová, M., Matiašková, K., Matiašovic, J. Rezistence izolátů *Streptococcus suis* k antimikrobikům v ČR v roce 2020. *Veterinářství* 2021;71(2):68-72.

Nedbalcová, K., Kucharovičová, I., Brychta, M., Zouharová, M., Matiašková, K., Matiašovic, J. Rezistence izolátů *Streptococcus suis* k antibiotikům v ČR v roce 2021. *Veterinářství* 2022;72(2): 88-91.

Nedbalcová, K., Zouharová, M., Matiašovic, J., Švejdová, M., Brychta, M., Šimek, B., Kucharovičová, I. Aktuální výskyt rezistencí *Streptococcus suis* k antimikrobiálním látkám v chovech prasat v ČR. *Veterinářství* 2019;69(3):174-182.

Nedbalcova, K., Kucharovicova, I., Zouharova, M., Matiaszkova, K., Kralova, N., Brychta, M., Simek, B., Pecha, T., Plodkova, H., Matiasovic, J. Resistance of *Streptococcus suis* isolates from the Czech Republic during 2018 – 2022. *Antibiotics* 2022, 11, 1214.

Matiasovic, J., Zouharova, M., Nedbalcova, K., Kralova, N., Matiaszkova, K., Simek, B., Kucharovicova, I., Gottschalk, M. Resolution of *Streptococcus suis* serotypes 1/2 versus 2 and 1 versus 14 by PCR-Restriction fragment length polymorphism method. *J Clin Microbiol* 2020, 58:e00480-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00480-20>.

Matiašovic, J.; Nedbalcová, K.; Žižlavský, M.; Fleischer, P.; Pokludová, L.; Kellnerová, D.; Nechvátalová, K.; Šimek, B.; Czanderlová, L.; Zouharová, M.; Bernardy, J.; Králová, N.; Šlosárková, S. *Streptococcus suis* Isolates—Serotypes and Susceptibility to Antimicrobials in Terms of Their Use on Selected Repopulated Czech Pig Farms. *Pathogens* 2021, 10, 1314.<https://doi.org/10.3390/pathogens10101314>

Matiašovic, J., Zouharová, M., Nedbalcová, K., Králová, N., Matiašková, K., Šimek, B., Kucharovičová, I. Metoda PCR-RFLP pro rozlišení sérotypu 1/2 *Streptococcus suis* od sérotypu 2 a sérotypu 1 od sérotypu 14. Vydal Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. v roku 2020, ISBN 978-80-88233-87-9 Certifikovaná metodika

Zouharova, M., Nedbalcova, K., Slama, P., Bzdil, J., Masarikova, M., Matiasovic, J. 2022. Occurrence of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine mastitis. *Vet Med-Czech* 67, 123–130.

OPONENTI:

1. doc. Ing. Petr Sláma, Ph.D., MENDELU Brno
2. MVDr. Tomáš Jarosil, Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy

Dedikace:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství RO0518 a Národní agentury pro zemědělský výzkum č. QK1810193 s názvem: Moderní metody diagnostiky, terapie a prevence infekcí *Streptococcus suis* jako nástroj pro sestavování cílených kontrolních programů v chovech prasat.



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