

**Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická**

**Mikrobiální nálezy při zánětech zevního zvukovodu psů a koček**

**Bc. Petra Kučerová**

**Diplomová práce  
2009**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 3. 5. 2009

Petra Kučerová

Děkuji doc. MVDr. Jaroslavě Mazurové, CSc. za zadání zajímavého tématu diplomové práce. Mgr. Petře Lyskové děkuji za odborné vedení, pozornost, pomoc a čas, který mi během mé práce věnovala.

Rovněž děkuji veterinárním lékařům Veterinární kliniky MVDr. Vladimíra Tluchoře, Veterinární nemocnice Aesculap MVDr. Jiřího Žabky a Veterinární ordinace MVDr. Valentiny Sedláčkové za ochotu při odběru vzorků.

## SOUHRN

Cílem této diplomové práce bylo zjištění výskytu mikroorganismů v zevním zvukovodu zdravých psů a koček a psů a koček s klinickou manifestací OE, včetně stanovení citlivosti izolovaných kmenů na antimikrobiální látky. Součástí této práce bylo také ověření morfologických, růstových a biochemických vlastností *M. pachydermatis*.

Celkem jsme vyšetřili 28 výtěrů ze zevního zvukovodu 17 psů a 5 koček s klinickými příznaky otitis externa. Dále jsme vyšetřili 78 vzorků odebraných od 61 zdravých psů a 15 koček, kteří byli zařazeni jako kontrolní skupina. Z dvou vzorků od psů se zánětlivým onemocněním jsme nevykultivovali žádné mikroorganismy.

Ze zevního zvukovodu psů s otitis externa jsme nejčastěji vykultivovali *Bacillus* sp. (28,2 %), koagulasnegativní stafylokoky (15,4 %), *M. pachydermatis* (15,4 %) a *S. intermedius* (12,8 %). U koček pak dominovaly KNS (60 %) a *M. pachydermatis* (20 %).

V zevním zvukovodu zdravých psů jsme nejčastěji prokázali KNS (37,0 %) a *Bacillus* sp. (34,0 %), u zdravých koček pak KNS (60,9 %).

Všechny kmeny stafylokoků izolovaných ze zevního zvukovodu psů a koček s otitis externa byly citlivé k ampicilin/sulbaktamu a rifampicinu. *Moraxella* sp. byla citlivá k rifampicinu a sulfametazol/trimetoprimu. Ampicilin, chloramfenikol, penicilin G, teikoplanin a vankomycin jsme vyhodnotili jako nejúčinnější proti *Enterococcus faecalis*. *Proteus* sp. byl citlivý k ampicilinu, ampicilin/sulbaktamu, aztreonamu, cefotaximu, chloramfenikolu, gentamicinu, ofloxacinu, piperacilinu a tikarcilinu a *Pseudomonas* sp. k aztreonamu, chloramfenikolu, ciprofloxacinu, gentamicinu, piperacilinu a tikarcilinu.

Všechny kmeny *M. pachydermatis* vykultivované ze zevního zvukovodu psů a koček s otitis externa byly citlivé ciklopiroxolaminu a rezistentní ke klotrimazolu a mikonazolu.

Významný rozdíl v citlivosti kmenů izolovaných ze zdravých psů a koček a psů a koček s otitis externa jsme nezjistili.

*M. pachydermatis* vyrůstala na Sabouraudově i „*Malassezia*“ agaru po 24 h inkubaci při 37 °C. V mikroskopickém preparátu měly všechny kmeny charakteristický lahvovitý tvar. Užití TWEENU 40, 60 a 80 jsme prokázali u všech testovaných kmenů *M. pachydermatis*.

**Klíčová slova:** *M. pachydermatis*, koagulasnegativní stafylokoky, citlivost na antimikrobiální léčiva

## SUMMARY

The aim of the thesis was to determine the composition of microflora of external ear canal of healthy dogs and cats and dogs and cats with otitis externa, including the susceptibility testing. Furthermore, the characteristics of *M. pachydermatis* strains were studied.

The total number 28 swabs taken from external ear canal of 17 dogs and 5 cats with clinical signs of otitis externa were examined. In addition, 78 swabs taken from 61 healthy dogs and 15 cats were included as control group. Two swabs taken from dogs with otitis externa were cultivation negative.

*Bacillus* sp. (28,2 %), coagulase-negative staphylococci (15,4 %), *M. pachydermatis* (15,4 %) a *S. intermedius* (12,8 %) were the most frequent microorganisms isolated from external ear canal of dogs with otitis externa. In cats coagulase-negative staphylococci (60 %) and *M. pachydermatis* (20 %) were found to be most prevalent.

KNS (37,0 %) a *Bacillus* sp. (34,0 %) were the most frequent microorganisms present in external ear canal of healthy dogs. The most common bacteria in healthy cats were KNS (60,9 %)

All staphylococcal strains were susceptible to ampicilin/sulbactam and rifampicin. *Moraxella* sp. was susceptible to rifampicin and sulfametazol/trimethoprim. One *Enterococcus* sp. strain was susceptible to ampicilin, chloramphenicol, penicilin G, teicoplanin and vancomycin was effective. *Proteus* sp. was susceptible to ampicilin, ampicilin/sulbactam, aztreonam, cefotaxim, chloramphenicol, gentamicin, ofloxacin, piperacilin and ticarcilin and *Pseudomonas* sp. to aztreonam, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, piprecilin and ticarcilin. All *M. pachydermatis* strains were susceptible to ciklopiroxolamin and resistant to klotrimazol and miconazol.

Sabouraud and „*Malassezia*“ agar were both sufficient for cultivation of *M. pachydermatis* strains isolated in our study. Characteristic bottle-shaped cells were observed in microscopical preparation. The utilisation of TWEEN 40, 60 and 80 was determined in all *M. pachydermatis* strains.

**Key words:** *M. pachydermatis*, coagulase-negative staphylococci, susceptibility testing

## SEZNAM ZKRATEK

AMB	amfotericin B
AMP	ampicilin
ATM	aztreonam
BIF	bifonazol
C	chloramfenikol
CIK	ciklopiroxolamin
CIP	ciprofloxacín
CN	gentamicin
CTX	cefotaxim
č.š.	číslo šarže
DA	klindamycin
E	erytomycin
EKO	ekonazol
F	nitrofurantoin
FLU	flukonazol
ITR	itrakonazol
KET	ketokonazol
KLO	klotrimazol
KPS	koagulasapozitivní stafylokoky
KNS	koagulasanegativní stafylokoky
<i>M.</i>	<i>Malassezia</i>
MIK	mikonazol
N	nystatin
OE	otitis externa
OFX	ofloxacin
OX	oxacilin
P	penicilin G
PIM	pimaricin

PRL	piperacilin
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
RD	rifampicin
rRNA	ribozomální RNA
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SDA	Sabouraudův dextrozový agar
SGA	Sabouraudův glukozový agar
sp.	druh (z lat. species)
ssp.	poddruh (z lat. subspecies)
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
SAM	ampicilin/sulbaktam
STX	sulfametazol/trimetoprim
TE	tetracyklin
TEC	teikoplanin
TIC	tikarcilin
VA	vankomycin
VMK	vyšší mastné kyseliny

# OBSAH

1 ÚVOD.....	10
1.1 Anatomie a fyziologie zevního zvukovodu psů a koček .....	11
1.2 Otitis externa.....	11
1.2.1 Etiologie OE .....	12
1.2.2 Klinická manifestace OE .....	13
1.2.3 Terapie OE .....	14
1.3 Mikroflóra zevního zvukovodu psů a koček .....	15
1.3.1 Mikroflóra zevního zvukovodu zdravých psů a koček .....	15
1.3.2 Mikroorganismy vyskytující se při otitis externa.....	16
1.4 Testování citlivosti na antimikrobiální léčiva .....	24
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	28
2.1 Materiál.....	28
2.1.1 Vyšetřovaný materiál.....	28
2.1.2 Kultivační média.....	28
2.1.3 Diagnostické sety a testy.....	29
2.1.4 Antibiotické testační disky .....	30
2.1.5 Antimykotické testační disky.....	31
2.1.6 Roztoky, činidla a chemikálie .....	31
2.1.7 Přístroje a pomůcky.....	31
2.2 Pracovní postup .....	32
2.2.1 Primokultivace.....	32
2.2.2 Subkultivace.....	32
2.2.3 Identifikace izolovaných mikroorganismů.....	32
2.2.4 Citlivost na antimikrobiální léčiva .....	36
2.3 Statistické zpracování dat .....	36
3 VÝSLEDKY .....	37
3.1 Ověření růstových vlastností <i>M. pachydermatis</i> .....	37
3.2 Výsledky mikrobiologického vyšetření výtěrů ze zevního zvukovodu.....	37
3.2.1 Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu zdravých psů .....	37
3.2.2 Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu psů s OE.....	38
3.2.3 Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu zdravých koček.....	39
3.2.4 Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu koček s OE .....	40
3.3 Vlastnosti <i>M. pachydermatis</i> .....	41
3.4 Testování citlivosti na antimikrobiální léčiva .....	42
3.4.1 Citlivost bakterií izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých psů a psů s OE .....	42
3.4.2 Citlivost bakterií izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých koček a koček s OE .....	45
3.5 Testování citlivosti izolovaných kvasinek na antimykotika.....	47



3.5.1 Citlivosti kvasinek izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých psů a psů s OE.....	47
3.5.3 Citlivosti kvasinek izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých koček a koček s OE .....	48
3.6 Plemena psů a jejich spojitost se vznikem OE .....	50
4 DISKUZE A ZÁVĚR.....	52
5 PŘÍLOHY .....	60
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	66

# 1 ÚVOD

Otitis externa je zánětlivé onemocnění epitelu zevního zvukovodu, které je častým onemocněním psů, u koček se vyskytuje v menší míře. Často se vyskytuje u jedinců, kteří jsou pro toto onemocnění predisponováni (tvar ušních boltců, vrozené zúžení zvukovodu, chlupy ve zvukovodu nebo alergické reakce) a u těch pak velice často dochází k recidivám onemocnění nebo k jeho přechodu do chronického stavu.

Otitis externa je onemocněním multifaktoriální etiologie. Faktory, které se podílí na jeho vzniku, lze rozčlenit na predisponující, primární a udržující, ke kterým patří bakterie a kvasinky. Prevence vzniku otitis externa je velmi důležitá. Léčebná terapie sama o sobě bývá často velmi zdlouhavá, a bez vyšetření citlivosti kmenů na antimikrobiální léčiva, může být v mnoha případech neúčinná.

Na vzniku otitis externa se nejčastěji podílí bakterie *Staphylococcus intermedius* a kvasinka *Malassezia pachydermatis*. K dalším mikroorganismům izolovaným ze zánětlivého ložiska patří *Staphylococcus aureus*,  $\beta$ -hemolytické streptokoky, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Candida albicans* a mikromycety *Rhizopus* sp. či *Aspergillus* sp. U chronického zánětu zevního zvukovodu bývá nejčastější záchyt *Pseudomonas aeruginosa*.

Cílem této diplomové práce bylo vyšetření výtěrů ze zevního zvukovodu zdravých psů a koček a psů a koček s klinickými příznaky otitis externa, včetně stanovení citlivosti izolovaných kmenů na antimikrobiální léčiva. Součástí práce bylo také ověření morfologických, růstových a biochemických vlastností *Malassezia pachydermatis*.

## 1.1 Anatomie a fyziologie zevního zvukovodu psů a koček

Zevní zvukovod je trubicovitý útvar tvořený chrupavkou a kostí. Vertikální část zevního zvukovodu sousedí s boltcem, horizontální segment se nachází v těsném sousedství bubínku (Logas, 1994; Krahwinkel, 2003).

Zevní zvukovod je ohraničen kožní vrstvou, kterou tvoří stratifikovaný skvamózní epitel (Krahwinkel, 2003). Obsahuje četné množství mazových žláz umístěných v povrchové vrstvě kůže, dále apokrinních žláz situovaných v hlubších vrstvách kůže (White, 1999; Krahwinkel, 2003) a vlasových folikulů (Logas, 1994). Počet vlasových folikulů, mazových a apokrinních žláz je u psů vyšší ve vertikální části zvukovodu. Dlouhosrstá plemena psů disponují větším počtem vlasových folikulů než plemena krátkosrstá (Logas, 1994).

Primární funkcí zevního zvukovodu je převést zvukové vlny k bubínku a částečně až do středního ucha (Logas, 1994; Krahwinkel, 2003). Neméně významnou úlohu hraje zevní zvukovod také při ochraně bubínku a středního ucha před přímým poraněním (Logas, 1994).

## 1.2 Otitis externa

Otitis externa (OE) je zánětlivé onemocnění epitelu zevního zvukovodu, které může v některých případech zasáhnout i boltce (Blanco a kol., 1996; Guedeja-Marrón a kol., 1998; Silva, 2001). Jedná se o nejběžnější onemocnění zevního zvukovodu psů s incidencí 4-20 %. U koček je OE popisována méně často, uvádí se 2-6,6% výskyt (Blanco a kol., 1996; McKeever a Torres, 1997).

OE probíhá v akutní či chronické podobě (Guedeja-Marrón a kol., 1998). Chronický průběh OE může vést k ruptuře bubínku, progresi zánětlivé reakce až do středního ucha a následnému vzniku otitis media. V krajním případě může dojít až k ohluchnutí (McKeever a Torres, 1997).

Nejčastěji se OE vyskytuje u psů starých 2-5 let (Fernández a kol., 2006). Mezi plemena psů, která jsou k tomuto onemocnění nejvíce predisponována, patří kokršpanělé, němečtí ovčáci a pudlové (Carlotti, 1991; Gbelec, 2003; Fernández a kol., 2006).

V případě, že je postiženo jedno ucho, jedná se o unilaterální OE. Pokud jde o postižení obou uší, označuje se OE jako bilaterální.

### **1.2.1 Etiologie OE**

OE je onemocnění s multifaktoriální etiologií (Fernández a kol., 2006). Faktory podílející se na jeho vzniku a rozvoji lze rozčlenit na predispoziční, primární a udržující (White, 2001; Gbelec, 2003; Hall, 2004).

#### **A. Predispoziční faktory**

Tyto faktory vytvářejí podmínky vhodné pro rozvoj zánětu, samy o sobě však nejsou schopné OE vyvolat (Gbelec, 2003). Nadměrný růst chlupů, nadpočetné množství mazových žláz vyvolávající zvýšenou produkci ušního mazu či extrémní vlhkost v zevním zvukovodu mohou hrát významnou roli v rozvoji zánětlivého procesu.

Z anatomických vlivů se jako predispoziční faktor uplatňuje především zúžení zvukovodu či klopené ucho. Také nevhodně zvolené léčebné prostředky mohou sehrát svoji roli (Gbelec, 2003; Hall, 2004).

Odstranění predispozičních faktorů významně pomáhá při terapii zánětu.

#### **B. Primární faktory**

Primární faktory mohou i bez účasti dalších činitelů vyvolat zánětlivou reakci (Carlotti, 2001; Gbelec, 2003).

Alergické reakce patří mezi nejvýznamnější faktory vedoucí k rozvoji zánětu. Odhaduje se, že až 80 % zvířat trpících alergií jeví známky postižení zvukovodu či boltce (Gbelec, 2003). Nejčastěji se vyskytují alergické reakce na krmivo, na alergen v prostředí či kontaktní alergie (Carlotti, 1991; Gbelec, 2003). OE vzniklá na podkladě alergické reakce je ve většině případů bilaterální (Carlotti, 1991).

*Otodectes cynotis* (ušní svrab) způsobuje OE u 10 % psů a až u 50 % koček (Carlotti, 1991). Gbelec (2003) uvádí, že je tímto parazitem infikována většina koček, zánět zevního zvukovodu však způsobuje pouze u jedinců s oslabenou imunitou.

Poruchy keratinizace, při nichž dochází k nadměrné tvorbě ušního mazu, mohou být příčinou vzniku ceruminózního zánětu (Gbelec, 2003).

Cizí tělesa v uchu, především osiny trav, mohou vést rovněž k rozvoji OE. Ve většině případů vzniká unilaterální zánět (Carlotti, 1991; White, 2001).

Hnisavá OE je spojována s autoimunitními onemocněními jako je pemphigus či bulózní pemfigoid (Carlotti, 1991).

### **C. Udržující faktory**

Udržující faktory se podílejí na rozvoji OE a na jejím dalším přetrvávání. Bakteriální a kvasinkové infekce jsou hlavní komplikací zánětlivého procesu (Gbelec, 2003). Bakterií, které mohou OE způsobovat, je poměrně velké množství. Především se na tomto onemocnění podílí *Staphylococcus (S.) intermedius*, *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa*,  $\beta$ -hemolytické streptokoky, *Proteus* sp. a *Escherichia coli* (Carlotti, 1991), přičemž *Ps. aeruginosa* způsobuje především chronické otitidy. Hlavním zástupcem kvasinek je *Malassezia (M.) pachydermatis*, méně často *Candida* sp. Ve výjimečných případech může být ze zánětlivého procesu vykultivován *Aspergillus fumigatus* (Carlotti, 1991).

#### **1.2.2 Klinická manifestace OE**

Podle klinických příznaků se OE běžně dělí na erythemo-ceruminózní a hnisavou (Carlotti, 1991; Kiss a kol., 1997).

Erythemo-ceruminózní OE se projevuje silným zarudnutím, mírným otokem zevního zvukovodu či boltce a nadměrnou produkcí hustého ušního mazu, který je hnědě či světle hnědě zbarven. Silné svědění je také častým doprovodným jevem (Carlotti, 1991; Kiss a kol., 1997). OE v tomto případě bývá většinou bilaterální (Carlotti, 1991). Společným jmenovatelem je ve většině případů koupání psa v řece či nepřiměřený způsob vytrhávání chlupů z ucha (Kiss a kol., 1997)

Hnisavá OE se manifestuje zarudnutím, otokem, v chronických případech může dojít až ke ztluštění epitelu a tvorbě abscesů (Kiss a kol., 1997). Typickým znakem při této formě OE je silná bolestivost, která může vést až k agresivitě pacienta. Při třesení hlavou, může v uších vznikat „čvachtavý zvuk“, který je také významným diagnostickým kritériem hnisavých otitid (Carlotti, 1991). Nejčastěji tento typ otitidy vzniká po čištění uší nesterilními

nástroji, po koupání psa v řece či neodborném odstraňování travních osin z ucha (Kiss a kol., 1997).

Vzhled a především barva ušního mazu mohou být vodítkem pro předběžné určení mikroorganismů, které se v něm vyskytují. Hnědě až černě zabarvený maz může svědčit o přítomnosti *M. pachydermatis*, smíšené infekci *M. pachydermatis* se stafylokoky či o infekci parazitem *Otodectes cynotis*. Z tmavě žlutého až světle hnědého ušního mazu bývají ve většině případů vykultivováni zástupci rodů *Staphylococcus* či *Streptococcus*. Světle žlutý až zelený maz je často spojován s infekcí vyvolanou rody *Proteus* nebo *Pseudomonas*. Při smíšené infekci je barva ušního mazu variabilní (Rycroft a Saben, 1977).

### **1.2.3 Terapie OE**

Je třeba mít na paměti, že OE je multifaktoriální onemocnění a příčin, které tento zánětlivý proces mohou způsobovat, je velmi mnoho (Fernández a kol., 2006)

Důležitá je především prevence. Léčba je ve většině případů zdlouhavá a komplikovaná. Vhodným preventivním opatřením je čištění uší cerumenolytiky (látky rozpouštějící ušní maz). Jedná se např. o kyselinu salicylovou, boritou, octovou, a to v kombinaci s propylenglykolem (White, 1999; White, 2001; Matousek a Campbell, 2002). Dalším preventivním krokem je odstranění přebytečného množství chlupů ze zevního zvukovodu sterilními nástroji. Při nadměrné vlhkosti v zevním zvukovodu je vhodné použít sušících preparátů, protože zvýšená vlhkost může vytvořit vhodné podmínky pro přemnožení bakterií a kvasinek, což může vést k rozvoji zánětu (White, 1999; Yoshida a kol., 2002).

Opakující se OE jsou způsobeny bakteriální a kvasinkovou infekcí. Léčebné preparáty bývají podávány lokálně ve formě ušních kapek, emulzí nebo roztoků (Gbelec, 2003). U agresivních pacientů se léky podávají intramuskulárně (White, 1999). Před zahájením léčby je nutné vyšetřit citlivost bakterií či kvasinek na antibakteriální a antimykotické preparáty, aby se zabránilo případnému vzniku rezistence. Pro terapii otitid způsobených stafylokoky se nejčastěji používá gentamicin, neomycin a chloramfenikol, u gramnegativních bakterií gentamicin a polymyxin B (Carlotti, 1991; McKeever a Torres, 1997). Při infekcích vyvolaných *Ps. aeruginosa* se doporučuje enrofloxacin či amikacin (McKeever a Torres, 1997). Bylo také zjištěno, že TRIS-EDTA zvyšuje citlivost pseudomonád na gentamicin a jiné

aminoglykosidy (Hall, 2004; Hillier, 2005). Z antimykotik se s výhodou používá ketokonazol, ekonazol, nystatin a amfotericin B (Hall, 2004). Pro terapii otitid se však nejčastěji využívají preparáty, které obsahují různé kombinace antibiotik spolu s antimykotiky, které by se měly podávat po dobu minimálně jednoho měsíce (White, 1999).

Při parazitární OE, která je nejčastěji způsobována roztočem *Otodectes cynotis*, bývá předepisován pyrethrin, carbyryl či thiabendazol (McKeever a Torres, 1997).

Pro zmírnění zánětlivé reakce, způsobené nadměrnou stimulací buněk imunitního systému, se používají kortikoidy (Carlotti, 1991; McKeever a Torres; 1997, White, 1999).

### **1.3 Mikroflóra zevního zvukovodu psů a koček**

Zevní zvukovod zdravých psů obsahuje malé množství komenzálních i potenciálně patogenních mikroorganismů (Kiss a kol., 1997). Přítomnost bakterií či kvasinek tedy neznamená, že jsou primární příčinou onemocnění (McKeever a Torres, 1997).

Mikroflóra zevního zvukovodu zabraňuje přemnožení potenciálně patogenních mikroorganismů tím, že jim odebírá živiny (Lilenbaum a kol., 1998). Při porušení rovnováhy mikroprostředí však může dojít k rozvoji zánětu zevního zvukovodu, tedy k OE (McKeever a Torres, 1997).

#### **1.3.1 Mikroflóra zevního zvukovodu zdravých psů a koček**

Fyziologickou mikroflóru zvukovodu psů a koček tvoří koagulasanegativní stafylokoky (KNS), viridující a nehemolytické streptokoky, *Bacillus* sp. a koryneformní bakterie (Rycroft a Saben, 1977; Carlotti, 1991; Kiss a kol., 1997; McKeever a Torres, 1997; Fernández a kol., 2006). V zevním zvukovodu psů a koček bez klinických příznaků OE se přirozeně vyskytuje kvasinka *M. pachydermatis* (Rycroft a Saben, 1977; Carlotti, 1991; Logas, 1994; McKeever a Torres, 1997; Fernández a kol., 2006).

McKeever a Torres (1997) uvádějí, že *M. pachydermatis* se ve zdravém uchu psů vyskytuje v 15-49 %, *Staphylococcus* sp. v 10-20 %, *Streptococcus (Str.)* sp. v 16 % a *Pseudomonas* sp. v 0,4 % případů.

Z 15 výtěrů z uší psů bez klinických příznaků OE vyizolovali Fernández a kol. (2006) KNS (16,7 %), *S. epidermidis* (16,7 %), *Bacillus* sp. (16,7 %), *S. aureus* (8,3 %), *Escherichia*

*coli* (8,3 %), *Klebsiella ozoneae* (8,3 %), *Proteus vulgaris* (8,3 %) a *Ps. aeruginosa* (8,3 %).

Lyskova a kol. (2007) vyšetřili 178 stěrů ze zevního zvukovodu klinicky zdravých psů. Mezi vykultivovanými mikroorganismy se nejčastěji vyskytoval *S. intermedius* (19,6 %), *Bacillus* sp. (18,7 %) a KNS (16,9 %). Dále byly izolovány *Corynebacterium* sp., viridující streptokoky, gramnegativní tyče, *Micrococcus* sp., *Proteus* sp., *Enterococcus* sp., *Str. canis*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. a nehemolytické streptokoky. Autoři zjistili, že *M. pachydermatis* se vyskytovala v 8,7 % případů.

### **1.3.2 Mikroorganismy vyskytující se při otitis externa**

V zevním zvukovodu psů se OE nejčastěji vyskytuje kvasinka *M. pachydermatis* a bakterie *S. intermedius* (Logas, 1994; Barrasa a kol., 1999; Yamashita a kol., 2005), při chronické OE pak *Ps. aeruginosa* (Tejedor a kol., 2003). K dalším izolovaným mikroorganismům patří *S. aureus*,  $\beta$ -hemolytické streptokoky, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Corynebacterium* sp., méně často se vyskytují mikromycety *Aspergillus* sp. a *Rhizopus* sp. či kvasinka *Candida albicans* (Sharma a Rhodes 1975; Blue a Wooley, 1977; Rycroft a Saben, 1977; Hajsig a kol., 1980; Carlotti, 1991; Logas, 1994; Kiss a kol., 1997; McKeever a Torres, 1997; Gbelec, 2003; Hariharan a kol., 2006; Fernández a kol., 2006; Petrov a Mihaylov, 2008).

McKeever a Torres (1997) uvádějí, že *M. pachydermatis* se při OE u psů vyskytuje ve 2-80 %, *Staphylococcus* sp. ve 20-45 %, *Pseudomonas* sp. v 20 %, *Proteus* sp. v 11 % a *Streptococcus* sp. v 10 % případů.

Z 53 výtěrů ze zevního zvukovodu psů s chronickou OE vykultivovali Fernández a kol. (2006) nejčastěji *Ps. aeruginosa* (22,1 %), dále *Proteus mirabilis* (13,9 %), *S. aureus* (12,5 %), *S. epidermidis* (8,3 %), *Escherichia coli* (5,6 %) a KNS (5,6 %).

Celkem 1819 bakteriálních kmenů vyizolovali Hariharan a kol. (2006) ze zevního zvukovodu psů s otitidou. Nejčastěji prokázali *S. intermedius* (36,3 %), *Ps. aeruginosa* (17,5 %), *Streptococcus* sp. (12,1 %), *Escherichia coli* (9,8 %), *Proteus* sp. (9,6 %) a *Enterococcus* sp. (2,4 %). K dalším, méně často zastoupeným bakteriím, patřila *Pasteurella*



sp., *Klebsiella* sp, *Citrobacter* sp. a *Enterobacter* sp. Mezi 103 bakteriálními kmeny získanými od koček s OE dominovaly KNS (30,1 %), koagulasapozitivní stafylokoky (KPS) (16,5 %), *Pasteurella* sp. (14,6 %), koliformní bakterie (11,7 %), v menším počtu byly izolovány streptokoky, enterokoky, *Ps. aeruginosa*, *Proteus* sp. a *Arcanobacterium pyogenes*.

V 97 stěrech ze zevního zvukovodu psů s klinickou manifestací OE prokázali Lyskova a kol. (2007) nejčastěji *S. intermedius* (24,2 %), *M. pachydermatis* (12,7 %) a *Str. canis* (12,3 %), dále pak *Bacillus* sp. (7,6 %) a *Proteus* sp. (5,9 %). KNS, viridující streptokoky, *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, gramnegativní tyče, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus* sp., *Enterococcus faecalis* a *Pasteurella* sp. autoři vykultivovali v méně než 5 % případů (Lyskova a kol., 2007).

Oliveira a kol. (2008) vyšetřili 100 stěrů pocházejících od 50 psů s bilaterální OE. Nejčastěji prokázali *M. pachydermatis* (36,1 %) a *S. intermedius* (34,7 %).

Petrov a Mihaylov (2008) zjistili ve 48 stěrech z otitických uší psů nejčastěji *Staphylococcus* sp. (53,1 %), *M. pachydermatis* (18,8 %), *Streptococcus* sp. (10,9 %), *Escherichia coli* (6,3 %), *Proteus mirabilis* (6,3 %) a *Ps. aeruginosa* (4,7 %).

## Bakterie

### A. Stafylokoky

Stafylokoky jsou grampozitivní koky o velikosti zhruba 1  $\mu\text{m}$ . Vyskytují se jednotlivě, v párech, tetradách a především v útvarech podobných hroznům. Charakteristické pro ně je, že nevytvářejí spóry, nepohybují se a většinou se vyskytují v neopouzdřené formě. Jsou fakultativně anaerobní, tvoří katalasu i oxidasu (Bednář a kol., 1999; Votava a kol., 2003).

Stafylokoky se vyznačují značnou mírou odolnosti k nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Vykazují odolnost k zahřátí na 55 °C po dobu 30 min i k případnému vysychání (Bednář a kol., 1999). Rostou i v přítomnosti 10% NaCl v kultivačním médiu (Votava a kol., 2003).

Stafylokoky produkují široké spektrum enzymů (koagulasa, hyaluronidasa, lipasa, nukleasa, fibrinolysin,  $\beta$ -laktamasa) a toxinů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$  hemolysiny, enterotoxin, toxin syndromu toxického šoku, exfoliatiny).

V praxi se stafylokoky tradičně dělí podle schopnosti koagulovat králičí plazmu na koagulasapozitivní (KPS) a koagulasanegativní stafylokoky (KNS) (Votava a kol., 2003). KNS jsou považovány za součást kožní mikroflóry lidí i zvířat (Bednář a kol., 1999) a většinou nezpůsobují vznik akutního onemocnění zevního zvukovodu. Naopak KPS mohou vyvolat infekční otitidy u psů. K jejich nejvýznamnějším zástupcům patří *S. intermedius* a *S. aureus*.

Lilenbaum a kol. (2000) vyšetřili 65 výtěrů z uší dospělých neléčených psů s OE, ze kterých vyizolovali 44 kmenů stafylokoků. Z KPS nejčastěji prokázali *S. aureus* (25 %) a *S. intermedius* (13,6 %), z KNS pak *S. epidermidis* (25 %), *S. simulans* (15,9 %), *S. haemolyticus* (11,4 %) a *S. saprophyticus* (9,1 %). Z celkového počtu 96 výtěrů ze zevního zvukovodu psů s chronickou OE vykultivoval Silva (2001) 57 kmenů stafylokoků, z toho bylo 41 kmenů koagulasanegativních a 16 koagulasapozitivních. Z KNS nejčastěji izoloval *S. sciuri* (22,8 %) *S. auricularis* (10,5 %) a *S. xylosus* (8,8 %). Z 16 kmenů KPS pak 12,3 % kmenů identifikoval jako *S. intermedius*, 8,8 % jako *S. aureus* a 7,0 % jako *S. hyicus*. Fernández a kol. (2006) vyšetřili 53 stěrů z uší psů s chronickou otitidou. *S. aureus* vyizolovali v 12,5 % případů. Z 1819 bakteriálních kmenů získaných ze zevního zvukovodu psů s OE Hariharan a kol. (2006) nejčastěji prokázali *S. intermedius* (36,3 %). Oliveira a kol. (2008) vyšetřili 100 stěrů od 50 psů s bilaterální OE a nejčastěji vykultivovali *S. intermedius* (34,7 %), méně často pak *S. aureus* ssp. *aureus* (5,4 %), *S. hyicus* (2,5 %), *S. aureus* ssp. *anaerobicus* (2,0 %), *S. schleiferi* ssp. *coagulans* (1,5 %) a *Staphylococcus* sp. (1,0 %). Ve 48 výtěrech z otitických uší psů zjistili Petrov a Mihaylov (2008) *Staphylococcus* sp. v 53,1 % případů.

Z celkového počtu 103 bakteriálních kmenů izolovaných ze zevního zvukovodu koček s OE vykultivovali Hariharan a kol. (2006) KNS v 30,1 % a KPS v 16,5 % případů.

## **B. Streptokoky**

Rod *Streptococcus* zahrnuje grampozitivní nepohyblivé koky, které jsou fakultativně anaerobní a bývají uspořádány do dvojic až řetězků. Netvoří enzym katalasu ani oxidasu. Nerostou v přítomnosti 6,5 % NaCl nebo 40 % žlučových solí v kultivačním médiu, ani při pH vyšším než 9 (Bednář a kol., 1999; Votava a kol., 2003).

V praxi se streptokoky dělí podle typu hemolýzy na krevním agaru na  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  hemolytické.  $\alpha$ -hemolytické streptokoky vytvářejí na krevním agaru viridaci,  $\beta$ -hemolytické

streptokoky úplnou hemolýzu a  $\gamma$ -hemolytické streptokoky na krevním agaru žádnou změnu nevytvářejí (Bednář a kol., 1999).

Důležitým diagnostickým kritériem pro rozdělení streptokoků do jednotlivých druhů je přítomnost skupinového polysacharidu C, který umožňuje jejich rozdělení do antigenních skupin A-Z (Votava a kol., 2003).

Streptokoky produkují řadu exolátů. *Str. pyogenes* vytváří streptolysin S a O, streptokinasu, hyaluronidasu, deoxyribonukleasy, proteinasy či pyrogenní streptokokové exotoxiny (Bednář a kol., 1999; Votava a kol., 2003).

*Str. pneumoniae* v uších psů s OE popsali Hajsig a kol. (1980). Ve výtěrech ze zevního zvukovodu psů s OE prokázali Kiss a kol. (1997) streptokoky v 1 % případů, přičemž 0,6 % vvkultivovali v čisté kultuře. Ze zevního zvukovodu 53 psů s otitidou prokázali Fernández a kol. (2006) viridující a nehemolytické streptokoky v 1,4 % případů. Hariharan a kol. (2006) vykultivovali 12,1 % kmenů streptokoků. Ze 100 stěrů získaných od 50 psů s bilaterální OE vyzolovali Oliveira a kol. (2008) *Streptococcus* sp. v 1,5 %. Petrov a Mihaylov (2008) prokázali *Streptococcus* sp. v 10,9 % výtěrů z uší psů se zánětlivým onemocněním.

### **C. *Pseudomonas aeruginosa***

*Ps. aeruginosa* je gramnegativní striktně aerobní, štíhlá, pohyblivá tyčinka. Produkuje široké spektrum pigmentů, nejčastěji modrozelený pyocyanin a žlutozelený fluorescein. *Ps. aeruginosa* se vyznačuje pozitivní katalasovou a oxidasovou aktivitou, produkce ureasy je také dalším významným diagnostickým kritériem (Bednář a kol., 1999; Votava a kol., 2003).

Kultivace a identifikace *Ps. aeruginosa* je poměrně snadná. Na krevním agaru vytváří tato bakterie úplnou hemolýzu (Bednář a kol., 1999), kolonie mají perleťový až kovový lesk, vůně mohou připomínat lipový květ, jasmín a fialky, starší kultury však mohou zapáchat po amoniaku (Votava a kol., 2003).

Patogenita tohoto mikroorganismu je dána velkým množstvím produkovaných exolátů, ale také faktory, které jsou vázány na bakteriální buňku. Z buněčných struktur je to především extracelulární polysacharid alginát a lipopolysacharidový komplex buněčné

stěny. K produkovaným exolátkám patří například proteolytické enzymy štěpící elastin, kolagen a fibrin (Bednář a kol., 1999; Votava a kol., 2003).

Problém léčby infekcí způsobených *Ps. aeruginosa* je mnohačetná rezistence na antibiotika a schopnost mikroorganismu předávat tuto vlastnost prostřednictvím plazmidů dalším generacím (Votava a kol., 2003).

Fernández a kol. (2006) vyšetřili 53 stěrů z uší psů s chronickou otitidou. Mezi nejčastěji vykultivovanými mikroorganismy byla *Ps. aeruginosa* (22,1 %). Z 1819 bakteriálních kmenů izolovaných ze zevního zvukovodu psů s OE vykultivovali Hariharan a kol. (2006) *Ps. aeruginosa* v 17,5 % případů. Oliveira a kol. (2008) prokázali *Ps. aeruginosa* v 1,5 % stěrů získaných od 50 psů s bilaterální OE.

## ***Malassezia pachydermatis***

Rod *Malassezia* zahrnuje lipofilní kvasinkovité organismy (Cafarchia a kol., 2005), které jsou součástí běžné kožní mikroflóry lidí i jiných teplokrevných obratlovců (Crespo a kol., 2000). Za určitých okolností mohou tyto mikroorganismy vystupovat jako oportunní patogeny, které se mohou podílet na vzniku různých kožních i systémových onemocnění lidí i zvířat (Ashbee a Evans, 2002; Cafarchia a kol., 2005).

### ***Taxonomie***

V praxi dělíme rod *Malassezia* na lipid-dependentní a lipid-nondependentní. Právě toto hledisko se ukázalo být rozhodující pro jejich úspěšnou kultivaci, protože někteří zástupci tohoto rodu rostou pouze na kultivačních médiích s obsahem mastných kyselin (Ashbee a Evans, 2002). Lipid-dependentní malasezie jsou plně závislé na přidavku vyšších mastných kyselin (VMK) do kultivačního média a VMK využívají jako jediný zdroj uhlíku. Pouze *M. pachydermatis* není závislá na přítomnosti VMK v kultivačním médiu, je tedy lipid-nondependentní (Crespo a kol., 2000; Woodgyer, 2004).

Taxonomické zařazení tohoto rodu bylo do nedávné doby velmi chaotické, a to především proto, že mikroorganismy rodu *Malassezia*, s výjimkou *M. pachydermatis*, vytvářejí jak kvasinkovou, tak myceliární formu. Mnoho lidí se domnívalo, že jde o dva různé rody. Proto byla kvasinková forma označena jako rod *Pityrosporum* a myceliární forma jako rod *Malassezia*.

V roce 1846 Einstedt objevil mikroorganismus, který způsoboval onemocnění pityriasis versicolor. Až v roce 1853 pojmenoval Robin původce tohoto onemocnění jako *Microsporon furfur* (Ashbee a Evans, 2002; Inamadar a Palit, 2003). Od té doby byl tento mikroorganismus přiřazen k různým rodům, jako například *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Pityrosporum*, *Dermatophyton*, *Monilia* (Ashbee a Evans, 2002). V roce 1898 pak zařadil Baillon tyto kvasinkovité organismy do rodu *Malassezia* (Inamadar a Palit, 2003).

V roce 1904 zjistil Sabouraud že jak kvasinková, tak i myceliární forma přísluší stejnému mikroorganismu a označil ho jako *Pityrosporum malassez*. (Ashbee a Evans, 2002). Panja pak v roce 1927 zařadil obě formy do stejného do rodu *Pityrosporum* (Ashbee a Evans, 2002). Od roku 1984 převážilo používání názvu *Malassezia* nad *Pityrosporum* a je všeobecně používáno do dnešní doby (Inamadar a Palit, 2003; Fan a kol, 2006).

Přesné začlenění kvasinkovitých organismů rodu *Malassezia* k jednotlivým druhům umožnilo až důkladné studium morfologických, růstových a biochemických vlastností a především použití molekulárně biologických metod (Crespo a kol., 2000; Hirai a kol, 2004).

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Třída: *Basidiomycetes*

Řád: *Ustilaginales*

Rod: *Malassezia*

Rod *Malassezia* zahrnuje ke dnešnímu dni 11 druhů. Do roku 1990 byly známy pouze dva druhy malasezií, a to *M. furfur* vyskytující se u lidí a *M. pachydermatis*, která je izolována ze zvířat (Woodgyer, 2004). V roce 1990 objevili Simmons a Guého s využitím molekulárně biologických metod nový druh, *M. sympodialis*. Guillot a Guého zavedli v roce 1995 novou klasifikaci malasezií, a to na základě sekvenování oblasti 23S rRNA a komplementárním studiím jaderné DNA. To znamenalo pro jejich identifikaci naprostý převrat, jehož výsledkem byla řada publikací popisujících nové druhy. Již v roce 1996 byly objeveny a popsány 4 nové druhy: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. sloofiale* a *M. restricta*. V roce 2002 objevili Sugita a kol. *M. dermatis* a v roce 2003 rovněž Sugita a kol. *M. japonica*. V posledních letech se v odborné

literatuře objevují zprávy o dvou nových druzích malasezií: *M. yamatoensis* (Sugita a kol., 2004) a *M. nana* (Hirai a kol., 2004).

### **Morfologické, kultivační a biochemické vlastnosti**

*M. pachydermatis* vytváří malé oválné buňky připomínající tvar lahve (Nobre a kol., 2001; Woodgyer, 2004). Jiní autoři ji přirovnávají k otisku nohy či burskému oříšku (Carlotti, 2001). Typický tvar buňky je dán tím, že se kvasinka rozmnožuje asexuálně monopolárním pučením z poměrně široké základny (Carlotti, 2001; Nobre a kol., 2001; David a kol., 2003; Woodgyer, 2004). Na mateřské buňce dojde po oddělení dceřiné buňky k vytvoření poměrně nápadné jizvy, která je přirovnávána k límečku (Takeo a Nakai, 1986; Nishimura a kol., 1991; Winiarczyk, 1992). *M. pachydermatis* netvoří myceliární hyfy (David a kol., 2003, Kozak, 2003) ani pseudohyfy (Nobre a kol., 2001), podle Grama se barví grampozitivně (Fan a kol., 2006) a velikost buňky nepřesahuje 5  $\mu\text{m}$  v délce a 2,5  $\mu\text{m}$  v šířce (David a kol., 2003)

*M. pachydermatis* vykazuje ve většině případů pozitivní katalasovou a ureasovou reakci (Kiss a kol., 1996). Kaneko a kol. (2007) zjistil, že v 95,3 % kmenů hydrolyzuje eskulin. Produkce acetoinu či indolu prokázána nebyla (Kiss a kol., 1996). Asimilace peptonu je pomalá a nekompletní (Gabal, 1988). *M. pachydermatis* nefermentuje maltózu, sacharózu, glukózu, galaktózu a rafinózu, ale asimiluje maltózu a glukózu (Kozak a kol., 2003). Všechny kmeny tvoří proteinasy, lipasy, lecitinasy a peroxidasy (Kiss a kol., 1996), zjištěna byla také produkce hyaluronidasy a chondroitin sulfatasy (David a kol., 2003). Koagulační ani hemaglutinační aktivita prokázána nebyla (Kiss a kol., 1996). Guého a kol. (1996) uvádějí, že *M. pachydermatis* využívá Tween 40, 60, 80, Tween 20 však nikoliv. Tento fakt je jedním z významných kritérií pro identifikaci tohoto mikroorganismu.

*M. pachydermatis* jako jediná lipid-nondependetní kvasinka rodu *Malassezia* dobře roste na Sabouraudově dextrózovém (SDA) a glukózovém agaru (SGA) či na modifikovaném sladinkovém agaru (Kiss a kol., 1997; Blanco a kol., 2000). Přítomnost VMK v médiu však podporuje její růst (Blanco a kol., 2000). Ke kultivaci lze také použít SGA s přidavkem sterilního olivového oleje (Blanco, 1996; Crespo a kol., 1999; Woodgyer, 2004). Mezi další média s přidavkem lipidů, která se používají v klinické praxi, patří především modifikovaný Dixonův agar (Nakagaki, 2000; Murai a kol., 2002; Cafarchia a kol., 2005; Rincón a kol., 2006) a Leeming a Notman agar (Belkum a kol., 1994; Gupta a kol., 2000; Faergemann, 2002). Jako selektivní agar umožňující izolaci *M. pachydermatis* v čisté kultuře lze využít

SBG s přidavkem chloramfenikolu a cykloheximidu (Nobre a kol., 2001; Kindo a kol., 2004; Petrov a Mihaylov, 2008). Kiss a kol. (1996) zjistili, že *M. pachydermatis* neroste na médiích, která neobsahují kyselinu nikotinovou. Autoři popsali také fenomén satelitního růstu této kvasinky v okolí kolonií *S. intermedius*.

Doporučovaná doba inkubace se nejčastěji pohybuje v rozmezí 2-7 dní za aerobních podmínek. Kultivujeme-li na SGA při 37 °C v mikroaerofilním prostředí, růst kolonií je v 75 % případů patrný již za 24 hodin (Blanco a kol., 2000). V anaerobním prostředí je růst *M. pachydermatis* velmi pomalý (David a kol., 2003). Nejčastěji používaná kultivační teplota se pohybuje okolo 37 °C, je totiž nejbližší teplotě uvnitř zevního zvukovodu (Bernardo a kol., 1998; Blanco a kol., 2000; Masuda a kol., 2000). Další autoři doporučují kultivaci při teplotě 32 °C (Cafarchia a kol., 2005; Morris a kol., 2005) či při 35 °C (Eichenberg a kol., 2003). *M. pachydermatis* dobře roste při hodnotách pH 1-3 a 4-8, pH 9-10 růst kvasinky inhibuje (Matousek a kol., 2003).

*M. pachydermatis* vyrůstá na Sabouraudově agaru po 24 h inkubaci při 37 °C v bílých, drobných koloniích, které se po prodloužené inkubaci zvětšují a jejich barva se mění na krémovou či světle hnědou. Povrch kolonií je konvexní a suchý (David a kol., 2003). Na modifikovaném Dixonově agaru vyrůstá tato kvasinka také v konvexních, krémově zbarvených koloniích (Woodgyer, 2004). *M. pachydermatis* může na krevním agaru vytvářet efekt podobný hemolýze, který vzniká působením peroxidasy. Růst na tomto médiu je však velmi slabý (Gabal, 1988; Blanco a kol., 2000).

### **Výskyt a patogenita**

*M. pachydermatis* je považována za běžnou součást kožní mikroflóry především psů (Fan a kol., 2006), ale také koček, lišek (Nakagaki a kol., 2000; David a kol., 2003; Fan a kol., 2006). Vyskytuje se na sliznicích zevního zvukovodu, pysků, tlamy, análního otvoru, genitálního traktu a na kůži zdravých psů. U koček není výskyt *M. pachydermatis* tak četný (Matousek a Campbell, 2002). Kvasinka kolonizuje stratum corneum zdravých jedinců ve velmi nízkém počtu. U psů s kožními alergickými onemocněními se může její množství v zevním zvukovodu a na kůži rapidně zvýšit (Morris a kol., 2005; Fan a kol., 2006). Z toho vyplývá, že *M. pachydermatis* se stává patogenní při změně mikroprostředí kůže a sliznic

či obranných mechanismů makroorganismu (Crespo a kol., 2000; Matousek a Campbell, 2002).

Procentuální zastoupení tohoto mikroorganismu u zdravých psů se pohybuje v rozmezí 15-49 %, u psů s OE se zvyšuje na 50-93 % (Guillot a kol., 1994; Crespo a kol., 2000). Nunes a Hamdan (1995) prokázali *M. pachydermatis* dokonce u 91 % zdravých psů. Výskyt a množství izolovaných malasezií závisí také na plemeni psa. Nejčastěji je *M. pachydermatis* popisována u kokršpanělů a německých ovčáků (Nobre a kol., 2001; Cafarchia a kol., 2005). V zevním zvukovodu zdravých koček popsali Guillot a kol. (1994) 20% výskyt *M. pachydermatis*.

U psů způsobuje *M. pachydermatis* dermatitidy, ale nejvíce je spojována s OE a je také nejčastěji izolovanou kvasinkou při tomto onemocnění (Nakano a kol., 2005; Fernández a kol., 2006). Carlotti (2001) uvádí, že *M. pachydermatis* může působit jako alergen.

Bernardo a kol. (1998) vyšetřili 46 výtěrů ze zevního zvukovodu psů s mykotickou otitidou a vykultivovali *M. pachydermatis* v 80,4 % případů. V zevním zvukovodu psů s OE prokázali Kozak a kol. (2003) tuto kvasinku v 31 % případů. Lyskova a kol. (2007) vyizolovali z výtěrů zevního zvukovodu 97 psů s OE *M. pachydermatis* v 12,7 % případů. Oliveira a kol. (2008) vyšetřili 100 stěrů od 50 psů s bilaterální OE a vykultivovali *M. pachydermatis* v 36,1 % případů

*M. pachydermatis* je známá především ve veterinární medicíně. Jako původce onemocnění u člověka je popisována sporadicky, a to zejména u imunosuprimovaných osob a předčasně narozených dětí (Crespo a kol., 2000; Morris a kol., 2005; Fan a kol., 2006).

## 1.4 Testování citlivosti na antimikrobiální léčiva

Rezistence mikroorganismů k některým druhům antimikrobiálních léčiv je v poslední době poměrně častým jevem. Tento stav je způsoben především jejich neuváženým a nadměrným předepisováním, aniž by byla vyšetřena citlivost kmenů bakterií či kvasinek, které onemocnění způsobily.

O výsledcích citlivosti kmenů stafylokoků izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých psů a psů s OE publikovaných některými autory informuje tabulka 1. Všichni autoři zjišťovali citlivost stafylokoků diskovou difúzní metodou.



**Tabulka 1** Citlivost stafylokoků na antibiotika publikovaná různými autory, uváděná v procentech citlivých kmenů

	Chloramfenikol	Erytromycin	Gentamicin	Klindamycin	Oxacilin	Penicilin	Rifampicin	Tetracyklin
<b>Pedersen a Wegener (1995) <sup>a</sup></b> n = 9	100,0	N	N	N	N	44,0	N	67,0
<b>Kiss a kol. (1997) <sup>a</sup></b> n = 60	N	58,0	96,0	62,0	50,0	31,0	N	19,0
<b>Cole a kol. (1998) <sup>a</sup></b> n = 23	100,0	N	96,3	N	N	40,7	N	61,5
<b>Lilenbaum a kol. (2000) <sup>b</sup></b> n = 44	N	N	84,1	N	95,4	61,3	97,7	93,2
<b>Silva (2001) <sup>a</sup></b> n = 7	71,4	57,1	100,0	N	42,9	42,9	N	N
<b>Silva (2001) <sup>c</sup></b> n = 5	100,0	60,0	100,0	N	80,0	60,0	N	N
<b>Junco a kol. (2002) <sup>d</sup></b> n = 67	80,5	76,1	N	N	N	52,3	N	80,6

<sup>a</sup> data pro *S. intermedius*; <sup>b</sup> data pro *Staphylococcus* sp.; <sup>c</sup> data pro *S. aureus*; <sup>d</sup> data pro KPS

Sarierler a Kirkan (2004) zjišťovali citlivost šesti kmenů *Streptococcus* sp. na antibiotika. Žádný z kmenů nebyl citlivý na gentamicin, naopak všechny byly citlivé na oxytetracyklin a ciprofloxacin.

Citlivost 221 kmenů streptokoků izolovaných ze zevního zvukovodu testovali Hariharan a kol. (2006). Všechny kmény byly citlivé na ampicilin a penicilin. Gentamicin byl účinný pouze na 71 % testovaných streptokoků.

Lyskova a kol. (2007) zjišťovali citlivost 34 kmenů *Str. canis* vykultivovaných z uší zdravých psů i psů s klinickou manifestací OE. Jako nejméně účinné antibiotikum vyhodnotili tetracyklin (35,3 % rezistentních kmenů). Všechny kmény byly citlivé na penicilin, ampicilin, gentamicin a chloramfenikol.

Všech 8 kmenů *Streptococcus sp.*, které získal Türkyilmaz (2008) ze stěrů ze zevního zvukovodu psů s otitidou bylo citlivých k penicilinu. Ampicilin byl účinný na 88 % a gentamicin na 75 % kmenů streptokoků.

Tabulka 2 informuje o výsledcích citlivosti pseudomonád izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých psů a psů s OE publikovaných některými autory. Citlivost pseudomonád byla ve všech případech zjišťována diskovou difúzní metodou.

**Tabulka 2** Citlivosti pseudomonád na vybraná antimikrobiální léčiva publikovaná různými autory, uváděná v procentech citlivých kmenů

	Ampicilin	Cefotaxim	Chloramfenikol	Gentamicin	Ofloxacin	Penicilin G	Piperacilin	Tetracyklin	Tikarcilin
<b>Kiss a kol. (1997) <sup>a</sup></b> n = 10;	N	N	N	92,0	N	N	N	17,0	N
<b>Barrasa a kol. (2000) <sup>a</sup></b> n = 19;	N	0,0	N	63,2	N	N	78,9	N	84,2
<b>Cole a kol. (2003) <sup>a</sup></b> n = 9;	25,0	N	0,0	75,0	N	0,0	N	0,0	N
<b>Sarierler a Kirkan (2004) <sup>b</sup></b> n = 9;	0,0	N	N	100,0	N	66,6	N	100,0	N
<b>Oliveira a kol. (2005) <sup>a</sup></b> n = 111;	0,0	24,4	5,4	53,3	N	0,0	N	1,6	N
<b>Lyskova a kol. (2007) <sup>a</sup></b> n = 7;	0,0	N	0,0	100,0	57,1	N	100,0	N	N
<b>Türkyilmaz (2008) <sup>a</sup></b> n = 16;	19,0	N	N	81,0	N	75,0	N	13,0	N

<sup>a</sup> data pro *P. aeruginosa*; <sup>b</sup> data pro *Pseudomonas sp.*

Einchenberg a kol. (2003) testovali citlivost 82 kmenů *M. pachydermatis* izolovaných od psů s OE k antimykotikům mikrodiluční metodou. Všechny kmeny byly citlivé k itrakonazolu, u flukonazolu se projevila rezistence ve 2,4 % a u ketokonazolu dokonce v 3,7 % případů.

Nascente a kol. (2003) zjišťovali citlivost 44 kmenů *M. pachydermatis* ze zevního zvukovodu psů a koček na antimykotika E-testem a bujónovou mikrodiluční metodou.

Souběžným vyhodnocením výsledků obou metod autoři zjistili, že nejúčinnějším antimykotikem byl flukonazol (64,3 % citlivých kmenů). Ke ketokonazolu bylo citlivých 57,1 % a k itrakonazolu 28,6 % kmenů.

Ve studii Lyskove a kol. (2007) testovali autoři citlivost *M. pachydermatis* na antimykotika diskovou difúzní metodou na Sabouraudově agaru. Autoři prokázali, že kmeny kvasinek byly citlivé ke všem testovaným antimykotikům. Pouze u 4,4 % kmenů byla zjištěna rezistence na flukonazol.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Materiál

#### 2.1.1 Vyšetřovaný materiál

Vyšetřovali jsme výtěry ze zevního zvukovodu zdravých psů a koček a psů a koček s klinickou manifestací OE. Vzorky odebírali veterinární lékaři veterinárních klinik MVDr. Vladimíra Tluchoře, MVDr. Jiřího Žabky a MVDr. Valentiny Sedláčkové.

Vyšetřovaný materiál byl nejpozději do 4 h od odběru transportován do laboratoře k dalšímu zpracování. Pokud nebylo možné zajistit okamžitý transport vzorků, byly tyto umístěny do Amiesova transportního média (Dispolab, spol. s.r.o., č.š. 0978) a do 24 h převezeny do laboratoře. Spolu s ním byly dopraveny průvodní listy, které obsahovaly informace o místě odběru vzorku, klinickém nálezu, rase, věku a pohlaví zvířete.

#### 2.1.2 Kultivační média

- **Christensenův agar** připravený rozpuštěním základu podle návodu výrobce (IMUNA Pharm, č.š. 3130393).
- **Krevní agar** s 5 % defibrinované beraní krve (LabMediaServis s.r.o.) připravený z Blood agar base No. 2 podle návodu výrobce (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., č.š. 0000017141).
- **MacConkey agar** připravený rozpuštěním základu podle návodu výrobce (IMUNA Pharm, č.š. 500307).
- **„Malassezia“ agar** připravený rozpuštěním 1g peptonu (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., č.š. 96018), 4 g glukózy, 0,01 g kvasničného extraktu (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd.), 0,2 ml glycerolu (Sigma-Aldrich), 0,2 ml Tweenu 80 (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., č.š. 5-1113), 50 mg 100% olivového oleje (Centrální lékárna Pardubice), 2 g agaru (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., č.š. 3-0003) ve 100 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.
- **Mueller-Hinton agar** se 7 % defibrinované beraní krve (LabMediaServis s.r.o.) připravený rozpuštěním základu podle návodu výrobce (OXOID Ltd., č.š. 389630).

- **Půda pro utilizaci Tweenu** připravená rozpuštěním 4 g Nutrient agaru No. 2 (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., č.š. 0000045172) a 1 ml Tweenu 20 (Sigma-Aldrich, č.š. F7H013715), Tweenu 40 (Sigma-Aldrich, č.š. 094K0152), Tweenu 60 (Sigma-Aldrich, č.š. 065K0222) či Tweenu 80 ve 100 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.
- **Sabouraudův agar** připravený dle návodu ze Sabouraud Dextrose Agar firmy HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd (č. š. XK132).
- **Slanetz-Bartley agar** připravený rozpuštěním základu podle návodu výrobce (HIMEDIA Laboratories Pvt. Ltd., č.š. 0000025573)

Pro ověřování každé šarže „*Malassezia*“ agaru používaného pro kultivaci kvasinek jsme používali referenční kmeny *M. pachydermatis* CCY 85-1-5 a *M. furfur* CCY 85-2-1 získané od Ing. Eleny Slávikové ze Zbierky kultur kvasinek, Chemický ústav AV SR, Bratislava.

### **2.1.3 Diagnostické sady a testy**

Identifikaci izolovaných mikroorganismů jsme prováděli následujícími komerčně dodávanými testy:

#### **Komerční mikrotesty a diagnostické soupravy**

- **STAPHYtest 16** (PLIVA- Lachema, a.s., č.š. 310707)
- **STREPTOtest 16** (PLIVA- Lachema, a.s., č.š. 300708)
- **ENTEROtest 24** (PLIVA- Lachema, a.s., č.š. 308507)
- **NEISSERIAtest** (PLIVA- Lachema, a.s., č.š. 22303105)
- **NEFERMtest 24** (PLIVA- Lachema, a.s., č.š. 22308605)
- **ITEST STAPHY-KOAGULASA** (ITEST plus, s.r.o., č.š. 2015)
- **ITEST PYR test** (ITEST plus, s.r.o., č.š. 1078)
- **ITEST STREPTO GROUP** (ITEST plus, s.r.o., č.š. 1064)
- **VP test** (PLIVA-Lachema, a.s., č.š. 229307)
- **ONP test** (PLIVA-Lachema, a.s., č.š. 22205706)

## Konvenční testy

- **Produkce oxidasy**- testována na filtračních papírcích napuštěných 1% vodným roztokem tetramethyl-p-fenylendiaminu
- **Produkce katalasy**- průkaz prováděn v 3% roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- **Produkce ureasy**- testována na Christensenově agaru připraveném dle návodu výrobce

### 2.1.4 Antibiotické testační disky

Citlivost bakterií na antibiotika jsme vyšetřovali antibiotickými testačními disky firmy OXOID Ltd.:

- Ampicilin (AMP)- 10 µg, č.š. 400155
- Ampicilin/sulbaktam (SAM)- 20 µg,, č.š. 405448
- Aztreonam (ATM)- 5 µg,, č.š. 418207
- Cefotaxim (CTX)- 30 µg,, č.š. 384667
- Ciprofloxacin (CIP)- 5 µg,, č.š. 454246
- Erytromycin (E)- 30 µg,, č.š. 342010
- Gentamicin (CN)- 10 µg, ,č.š. 453266
- Chloramfenikol (C)- 30 µg,, č.š. 444248
- Klindamycin (DA)- 2 µg, č.š. 402244
- Nitrofurantoin (F)- 300 µg, č.š. 413222
- Ofloxacin (OFX)- 30 µg, č.š. 398105
- Oxacilin (OX)- 1 µg, č.š. 334967
- Penicilin G (P)- 10 U, č.š. 444031
- Piperacilin (PRL)- 100 µg, č.š. 412787
- Rifampicin (RD)- 5 µg, č.š. 237049
- Sulfametazol/trimetoprim (STX)- 25 µg, č.š. 221246
- Teikoplanin (TEC)- 30 µg,, č.š. 446260
- Tetracyklin (TE)- 30 µg, č.š. 447329
- Tikarcilin (TIC)- 75 µg, č.š. 349403
- Vankomycin (VA)- 30 µg, č.š. 440940

### **2.1.5 Antimykotické testační disky**

Testování citlivosti izolovaných kvasinek jsme prováděli antimykotickými testačními disky firmy ITEST plus, s.r.o.:

- Amfotericin B (AMB)- 50 µg, č.š. 1070
- Bifonazol (BIF)- 30 µg, č.š. 1086
- Ciklopiroxolamin (CIK)- 30 µg, č.š. 1056
- Ekonazol (EKO)- 30 µg, č.š. 1116
- Flukonazol (FLU)- 25 µg, č.š. 1118
- Itrakonazol (ITR)- 30 µg, č.š. 1106
- Ketokonazol (KET)- 30 µg, č.š. 1106
- Klotrimazol (KLO)- 30 µg, č.š. 1116
- Mikonazol (MIK)- 30 µg, č.š. 1096
- Nystatin (NYS)- 50 µg, č.š. 1116
- Pimaricin (PIM)- 50 µg, č.š. 1106

### **2.1.6 Roztoky, činidla a chemikálie**

- 0,85% vodný roztok NaCl (fyziologický roztok) pro přípravu suspenzí izolovaných bakterií, kvasinek a mikroskopických preparátů
- 1% vodný roztok tetramethyl-p-fenylendiaminu pro průkaz oxidasy
- 3% vodný roztok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro průkaz katalasy
- Roztoky pro barvení preparátů dle Grama – 40% roztok krystalové violeti v 10% roztoku šťavelanu amonného, Lugolův roztok (10% vodný roztok I<sub>2</sub> a KI), 0,1% roztok karbolfuchsinu
- 70% ethanol

### **2.1.7 Přístroje a pomůcky**

- Autokláv
- Horkovzdušný sterilizátor
- Lednička

- Mraznička
- Světelný mikroskop
- Termostat
- Váhy
- Vodní lázeň
- Petriho misky, zkumavky, gumové zátky, stojany na zkumavky, Erlenmayerovy baňky, kádinky, odměrné válce, podložní sklíčka, očkovací kličky, kahan, pinzety, mikropipety, sterilní špičky a dávkovač antibiotických testačních disků

## **2.2 Pracovní postup**

### **2.2.1 Primokultivace**

Výtěry ze zevního zvukovodu psů a koček jsme kultivovali na krevní, „*Malassezia*“, MacConkey, Sabouraudův agar a Slanetz-Bartleyho agar a inkubovali v termostatu při 37 °C po dobu 24-48 h. („*Malassezia*“ a Sabouraudův agar 24-72 h).

### **2.2.2 Subkultivace**

Po 24 h inkubaci jsme hodnotili morfologii kolonií narostlých na půdách. Charakteristické kolonie bakterií jsme izolovali na krevní agar, v případě kvasinek na „*Malassezia*“ a Sabouraudův agar, které jsme inkubovali v termostatu 24 h při 37 °C. Izolaci kolonií jsme často prováděli opakovaně, než se nám podařilo získat čistou kulturu mikroorganismů.

### **2.2.3 Identifikace izolovaných mikroorganismů**

Získané kmeny mikroorganismů jsme dále identifikovali na základě morfologie bakteriálních buněk, růstových, antigenních a biochemických vlastností



## **Barvení dle Grama**

V kapce fyziologického roztoku na podložním sklíčku jsme vytvořili suspenzi testovaného kmene. Nátěr jsme nechali zaschnout a poté ho fixovali plamenem. Preparát jsme následně obarvili dle Grama, a to následujícím způsobem. Nátěr jsme převrstvili roztokem krystalové violeti na 30 s. Poté jsme barvivo slili a preparát přelili na 30 s Lugolovým roztokem. Nátěr jsme odbarvili 70% ethanolem a opláchlí destilovanou vodou. Na závěr jsme preparát převrstvili na 60 s karbolfuchsinem. Barvivo jsme slili a preparát opláchlí destilovanou vodou. Obarvený preparát jsme pozorovali ve světelném mikroskopu při celkovém zvětšení 1500x a hodnotili jsme tvar, uspořádání a barvitelnost buněk dle Grama.

## **Průkaz katalasy**

Tvorbu katalasy jsme sledovali v kapce 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , do které jsme bakteriologickou kličkou nanесли testovanou kulturu. Pokud testovaný mikroorganismus produkoval katalasu, došlo k rozkladu  $\text{H}_2\text{O}_2$  podle rovnice  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  a následnému úniku kyslíku za tvorby bublinek. Pokud testovaný mikroorganismus katalasu netvořil, k úniku bublinek nedošlo.

## **Průkaz cytochromoxidasy**

Testovanou kulturu jsme pomocí skleněné tyčinky nanесли na filtrační papírek napuštěný 1% vodným roztokem tetramethyl-p-fenylendiaminu. Pozitivní reakce pro průkaz cytochromoxidasy se projevila zmodráním papírku, při negativní reakci zůstal papírek nezbarven.

## **Průkaz vázané koagulasy**

Na podložní sklíčko jsme nanесли kapku králičí plasmy a rozetřeli v ní několik kolonií testovaného mikroorganismu. V pozitivním případě došlo působením vázané koagulasy k přeměně rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin, vytvoření aglutinátu a projasnění suspenze. Pokud testovaný mikroorganismus vázanou koagulasu neprodukoval, zůstala suspenze zakalená a k vytvoření aglutinátu nedošlo.

### **Průkaz volné koagulasy**

Do aglutinační zkumavky s 0,5 ml králičí plasmy jsme asepticky přenesli několik kolonií testované kultury. Směs jsme inkubovali 3 h při 37 °C, a pak do druhého dne při laboratorní teplotě. Výsledek jsme odečítali po 3 h resp. 24 h. V pozitivním případě došlo ke ztuhnutí plasmy či k vytvoření chuchvalců a sraženin.

### **Průkaz tvorby acetoinu (VP test)**

Do suspenze testovaného kmene ve fyziologickém roztoku odpovídající 1. stupni McFarlandovy stupnice pro enterobakterie a 2. stupni McFarlandovy stupnice pro streptokoky, enteroky a stafylokoky jsme umístili diagnostický proužek, který obsahoval pyruvát sodný jako substrát. Po 24 h inkubaci při 37 °C jsme přidali 1 kapku činidla VPT I ( $\alpha$ -naftol) a 1 kapku činidla VPT II (hydroxid sodný). Pokud acetoin vznikal, došlo do 30 min ke vzniku červeného zbarvení.

### **Průkaz produkce $\beta$ -D-galaktosidasy (ONP test)**

Z testovaného kmene jsme v 0,6 ml fyziologického roztoku připravili bakteriální suspenzi, která odpovídala 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice, a do takto připravené suspenze jsme vložili testovací proužek pro průkaz  $\beta$ -D-galaktosidasy. Následovala inkubace 24 h při 37 °C. Pokud testovaný mikroorganismus produkoval  $\beta$ -D-galaktosidasu, došlo ke žlutému zbarvení suspenze.

### **Průkaz produkce pyrrolidonylarylamidázy (PYR test)**

Testovací disk jsme navlhčili malým množstvím sterilní destilované vody a na jeho střed nanесли bakteriologickou kličkou malé množství testované kultury. Poté jsme nechali inkubovat 1-2 min při laboratorní teplotě a aplikovali 1 kapku barevné vývojky. Pozitivní reakce se projevila zčervenáním testovacího disku v místě, kde jsme testovaný mikroorganismus nanесли, v negativním případě disk v inokulovaném místě barvu nezměnil nebo lehce zežloutl.

## **Určení skupinového antigenu $\beta$ -hemolytických streptokoků**

Do extrakční zkumavky jsme kápli 1 kapku činidla I a resuspendovali v ní přibližně 5 kolonií testovaného kmene. Poté jsme přidali 1 kapku činidla II a roztok zežloutl. Protřepali jsme a nechali 3 min inkubovat. Nakonec jsme přidali 2 kapky činidla III, což vedlo ke zružování roztoku. Pasteurovou pipetou jsme na 5 černých ploch destičky kápli po jedné kapce extraktu a vedle ní přidali po kapce latexové suspenze anti-A, B, C, G a F. Kapky jsme pomocí míchadélka smísili a s destičkou kolébali. Při pozitivní reakci došlo ke zřetelné aglutinaci a k projasnění suspenze. V negativním případě aglutinát nevznikl a suspenze zůstala zakalená.

## **Průkaz produkce ureasy**

Aktivitu ureasy jsme testovali na Christensenově šikmém agaru. Testovaný mikroorganismus jsme naočkovali na Christensenův agar a inkubovali 24 h při 37 °C. V pozitivním případě došlo působením ureasy k rozkladu močoviny přítomné v agaru na amoniak a oxid uhličitý a následné alkalizaci média amoniakem. Zvýšení pH se projevilo změnou barvy fenolové červeně z okrové na růžovou až červenou. Při negativní reakci ke změně barvy acidobazického indikátoru nedošlo.

## **Průkaz utilizace Tweenu 20, 40, 60 a 80**

Utilizaci Tweenu jsme testovali na Nutrient agaru No. 2 s 1 % Tweenu 20, 40, 60 či 80. Agar naočkovaný testovanou kulturou kvasinek jsme inkubovali 24 h při 37 °C. Utilizace Tweenu se projevila nárůstem testované kultury kvasinek. Pokud testovaná kvasinka Tween neutilizovala, na médiu nenarostla.

## **Biochemické vlastnosti bakterií určované identifikačními soupravami**

Biochemické vlastnosti bakterií jsme zjišťovali komerčními mikrotesty STAPHYtest 16, STREPTOtest 16, ENTEROtest 24, NEISSERIAtest, NEFERMtest 24 firmy PLIVA-Lachema, a.s. (2008). Při jejich provádění jsme postupovali podle návodů uvedených výrobcem. K vyhodnocení mikrotestů jsme používali počítačový identifikační program TNW Lite verze 6.0 (PLIVA-Lachema, a.s, 2000).

## 2.2.4 Citlivost na antimikrobiální léčiva

### Testování citlivosti bakterií na antibiotika

Testování citlivosti na antibiotika jsme prováděli diskovou difúzní metodou na Mueller-Hintonově agaru se 7 % defibrinované beraní krve. Z testované kultury jsme připravili suspenzi o hustotě, která odpovídala 0,5 stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Sterilním vatovým tamponem jsme suspenzi nanесли na celý povrch Mueller-Hintonova agaru a dávkovačem antibiotických disků jsme na povrch nanесли požadovaná antibiotika. Inkubovali jsme 24 h při 37 °C. Po inkubaci jsme změřili průměr inhibičních zón pro jednotlivá antibiotika a změřené hodnoty jsme porovnali s průměry inhibičních zón stanovenými pro citlivé kmeny.

Výsledné hodnocení citlivosti na antibiotika jsme prováděli podle údajů doporučených Clinical Laboratory Standard Institute (Pennsylvania, USA; 2007) pro stafylokoky, streptokoky, enterobakterie, enteterokoky a pseudomonády, které jsou uvedeny v příloze 1, 2, 3, 4 a 5.

### Testování citlivosti kvasinek na antimykotika

Testování citlivosti kvasinek na antimykotika jsme prováděli diskovou difúzní metodou na „*Malassezia*“ agaru. Z testované kultury jsme si připravili suspenzi o hustotě odpovídající 0,5 stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Suspenzi jsme sterilním vatovým tampónem nanесли na celý povrch agaru a sterilní pinzetou jsme na povrch média umístili antimykotické disky. Inkubovali jsme 24 h při 37 °C. Po inkubační době jsme změřili velikost inhibičních zón a výsledky porovnali s průměry inhibičních zón uváděnými výrobcem antimykotických disků, firmou ITEST plus, s.r.o. (příloha 6).

## 2.3 Statistické zpracování dat

Získaná data byla uváděna v procentech a byla dále vyhodnocena s využitím  $X^2$  – testu hypotézy o shodnosti struktury dle následujícího vzorce:

$$\chi^2 = n \frac{(ad - bc)^2}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)} \quad (\text{Zvárová, 2007}).$$

## 3 VÝSLEDKY

### 3.1 Ověření růstových vlastností *M. pachydermatis*

Porovnávali jsme růst *M. pachydermatis* na Sabouraudově agaru a „*Malassezia*“ agaru. Po 24-48 h inkubaci při 37 °C vyrůstala tato kvasinka spolehlivě na obou kultivačních médiích.

### 3.2 Výsledky mikrobiologického vyšetření výtěrů ze zevního zvukovodu

Celkem jsme získali 28 výtěrů ze zevního zvukovodu 17 psů a 5 koček s klinickými příznaky OE, jako je lokální bolest, svědění, zarudnutí či otok. Dále jsme vyšetřili 61 psů a 15 koček bez klinických příznaků OE, které jsme zařadili jako kontrolní skupinu (tabulka 3).

**Tabulka 3** Výsledky mikrobiologického vyšetření stěrů ze zevních zvukovodů psů a koček

Zevní zvukovod		Počet zvířat	Vzorků celkem	Z toho	
				kultivačně pozitivních	
				n	%
Zdravá zvířata	psi	61	63	54	85,7
	kočky	15	15	14	93,3
Zvířata s OE	psi	17	22	20	90,9
	kočky	5	6	6	100,0
<b>Celkem</b>		<b>98</b>	<b>106</b>	<b>94</b>	<b>88,7</b>

Z údajů uvedených v tabulce 3 vyplývá, že stěry ze zevního zvukovodu psů a koček s klinickou manifestací OE byly častěji kultivačně pozitivní než stěry pocházející od zdravých psů a koček.

#### 3.2.1 Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu zdravých psů

Z celkového počtu 63 vyšetřených vzorků jsme izolovali 89 kmenů bakterií, 10 kmenů kvasinek a mikromycetu *Rhizopus* sp. Nejčastěji jsme prokázali KNS (37,0 %) a *Bacillus* sp.

(34,0 %). V čisté kultuře jsme nejčastěji vykultivovali *Bacillus* sp., ve směsi KNS společně s *Bacillus* sp. Zjištěné výsledky jsou zaznamenány v tabulce 4.

**Tabulka 4** Mikrobiální nálezy ve výtěrech ze zevního zvukovodu zdravých psů

	Počet izolovaných kmenů		Z toho			
			v čisté kultuře		ve směsi	
	n	%	n	%	n	%
<b>Bakterie</b>	<b>89</b>	<b>89,0</b>	<b>21</b>	<b>23,6</b>	<b>68</b>	<b>76,4</b>
<i>Bacillus</i> sp.	34	34,0	8	23,5	26	76,5
KNS	37	37,0	9	24,3	28	75,7
Koryneformní tyče	3	3,0	0	0,0	3	100,0
<i>S. aureus</i>	2	2,0	0	0,0	2	100,0
<i>S. intermedius</i>	11	11,0	3	27,3	8	72,7
<i>S. schleiferi</i> ssp. <i>coagulans</i>	1	1,0	1	100,0	0	0,0
<i>Str. canis</i>	1	1,0	0	0,0	1	100,0
<b>Kvasinky</b>	<b>10</b>	<b>10,0</b>	<b>5</b>	<b>50,0</b>	<b>5</b>	<b>50,0</b>
<i>M. pachydermatis</i>	10	10,0	5	50,0	5	50,0
<b>Mikromycety</b>	<b>1</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>	<b>1</b>	<b>100,0</b>
<i>Rhizopus</i> sp.	1	1,0	0	0,0	1	100,0
<b>Celkem</b>	<b>100</b>	<b>100,0</b>	<b>26</b>	<b>26,0</b>	<b>74</b>	<b>74,0</b>

### 3.2.2 Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu psů s OE

Z celkového počtu 22 vyšetřených vzorků jsme vykultivovali 33 kmenů bakterií a 6 kmenů kvasinek (tabulka 5). K nejčastěji izolovaným mikroorganismům patřily *Bacillus* sp. (28,2 %), KNS (15,4 %) a *M. pachydermatis* (15,4 %). V čisté kultuře jsme nejčastěji získali *M. pachydermatis*, ve směsi pak KNS společně s *Bacillus* sp.

**Tabulka 5** Mikrobiální nálezy ve výtěrech ze zevního zvukovodu psů s OE

	Počet izolovaných kmenů		Z toho			
			v čisté kultuře		ve směsi	
	n	%	n	%	n	%
<b>Bakterie</b>	<b>33</b>	<b>84,6</b>	<b>6</b>	<b>18,2</b>	<b>27</b>	<b>81,8</b>
<i>Bacillus</i> sp.	11	28,2	2	18,2	9	81,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	2,6	0	0,0	1	100,0
Gramnegativní koky	1	2,6	0	0,0	1	100,0
KNS	6	15,4	1	16,7	5	83,3
Koryneformní tyče	2	5,1	0	0,0	2	100,0
<i>Moraxella</i> sp.	2	5,1	0	0,0	2	100,0
<i>Proteus</i> sp.	1	2,6	0	0,0	1	100,0
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	2,6	0	0,0	1	100,0
<i>S. intermedius</i>	5	12,8	1	20,0	4	80,0
<i>S. schleiferi</i> ssp. <i>coagulans</i>	3	7,7	2	66,7	1	33,3
<b>Kvasinky</b>	<b>6</b>	<b>15,4</b>	<b>5</b>	<b>83,3</b>	<b>1</b>	<b>16,7</b>
<i>M. pachydermatis</i>	6	15,4	5	83,3	1	16,7
<b>Celkem</b>	<b>39</b>	<b>100,0</b>	<b>11</b>	<b>28,2</b>	<b>28</b>	<b>71,8</b>

### 3.2.3 Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu zdravých koček

Z celkového počtu 15 vyšetřených vzorků jsme vykultivovali 19 kmenů bakterií, 3 kmeny kvasinek a mikromycetu *Penicillium* sp. Z tabulky 6 vyplývá, že ze zevního zvukovodu zdravých koček jsme nejčastěji vyizolovali KNS (60,9 %). V čisté kultuře jsme nejčastěji vykultivovali KNS, ve směsi pak *M. pachydermatis* společně s KNS.

**Tabulka 6** Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu zdravých koček

	Počet izolovaných kmenů		Z toho			
			v čisté kultuře		ve směsi	
	n	%	n	%	n	%
<b>Bakterie</b>	<b>19</b>	<b>82,6</b>	<b>10</b>	<b>52,6</b>	<b>9</b>	<b>47,4</b>
<i>Bacillus</i> sp.	2	8,7	2	100,0	0	0,0
KNS	14	60,9	7	50,0	7	50,0
<i>S. aureus</i>	1	4,3	0	0,0	1	100,0
<i>S. intermedius</i>	2	8,7	1	50,0	1	50,0
<b>Kvasinky</b>	<b>3</b>	<b>13,0</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>	<b>3</b>	<b>100,0</b>
<i>M. pachydermatis</i>	2	8,7	0	0,0	2	100,0
Blíže neurčená kvasinka	1	4,3	0	0,0	1	50,0
<b>Mikromycety</b>	<b>1</b>	<b>4,4</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>	<b>1</b>	<b>100,0</b>
<i>Penicillium</i> sp.	1	4,4	0	0,0	1	100,0
<b>Celkem</b>	<b>23</b>	<b>100,0</b>	<b>10</b>	<b>43,5</b>	<b>13</b>	<b>56,5</b>

### 3.2.4 Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu koček s OE

Z celkového počtu 6 vyšetřených vzorků jsme vykultivovali 8 kmenů bakterií a 2 kmeny kvasinek (tabulka 7). V zevním zvukovodu koček se zánětlivým onemocněním ušního epitelu v naprosté většině dominovaly KNS (60,0 %). Kvasinku *M. pachydermatis* jsme izolovali ve 20,0 %. V čisté kultuře jsme nejčastěji izolovali KNS, ve směsi pak KNS společně s *M. pachydermatis*.



**Tabulka 7** Mikrobiální nálezy v zevním zvukovodu koček s OE

	Počet izolovaných kmenů		Z toho			
			v čisté kultuře		ve směsi	
	n	%	n	%	n	%
<b>Bakterie</b>	<b>8</b>	<b>80,0</b>	<b>3</b>	<b>37,5</b>	<b>5</b>	<b>62,5</b>
KNS	6	60,0	2	33,3	4	66,7
<i>S. aureus</i>	1	10,0	1	100,0	0	0,0
<i>S. schleiferi</i> ssp. <i>coagulans</i>	1	10,0	0	0,0	1	100,0
<b>Kvasinky</b>	<b>2</b>	<b>20,0</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>	<b>2</b>	<b>100,0</b>
<i>M. pachydermatis</i>	2	20,0	0	0,0	2	100,0
<b>Celkem</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>	<b>3</b>	<b>30,0</b>	<b>7</b>	<b>70,0</b>

### 3.3 Vlastnosti *M. pachydermatis*

U všech kmenů *M. pachydermatis* izolovaných ze zdravých psů a koček a psů a koček s klinickými příznaky OE jsme zjišťovali morfologii bakteriálních buněk, kultivační a biochemické vlastnosti (tabulka 8).

Na základě mikroskopického vyšetření jsme prokázali, že všechny kmeny měly lahvovitý tvar buňky (příloha 7). Dále jsme zjistili, že všechny kmeny *M. pachydermatis* vyrůstají na Sabouraudově nebo „*Malassezia*“ agaru po 24-48 h inkubaci při 37 °C ve smetanových, hladkých a matných koloniích.

Katalasu tvořilo 95 % a ureasu 75 % kmenů. Schopnost využít Tween 40, 60 a 80 jsme prokázali u všech testovaných kmenů *M. pachydermatis*, avšak využití Tweenu 20 pouze u 85 % kmenů.

**Tabulka 8** Vlastnosti kmenů *M. pachydermatis* izolovaných ze zevního zvukovodu psů a koček

	<i>M. pachydermatis</i> (N=20)	
	+	%
Lahvovitý tvar buňky	20	100
Smetanové, hladké, matné kolonie	20	100
Růst při 37 °C	20	100
Produkce katalasy	19	95,0
Produkce ureasy	15	75,0
Utilizace Tweenu 20	17	85,0
Utilizace Tweenu 40	20	100,0
Utilizace Tweenu 60	20	100,0
Utilizace Tweenu 80	20	100,0

Legenda: + - počet kmenů s danou vlastností

### 3.4 Testování citlivosti na antimikrobiální léčiva

#### 3.4.1 Citlivost bakterií izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých psů a psů s OE

Citlivost bakterií na antibiotika jsme testovali diskovou difúzní metodou na Mueller-Hintonově agaru se 7 % debrinované beraní krve. Dva kmeny KNS se nepodařilo dále kultivovat, z tohoto důvodu u nich nemohla být vyšetřena jejich citlivost na antibiotika. Údaje týkající se kmenů stafylokoků jsme zaznamenali do tabulky 9.

Z uvedeného vyplývá, že KNS izolované ze zevního zvukovodu zdravých psů byly nejcitlivější na ampicilin/sulbaktam a rifampicin, naopak největší míru rezistence jsme zjistili u penicilinu G (60,0 % citlivých kmenů). Všechny kmeny *S. intermedius* byly citlivé na ampicilin/sulbaktam, chloramfenikol, oxacilin, ofloxacin, gentamicin, klindamycin, nitrofurantoin a rifampicin. Jako nejméně účinné jsme vyhodnotili tetracyklin a penicilin G.

Kmen *S. schleiferi* ssp. *coagulans* byl citlivý k ampicilin/sulbaktamu, chloramfenikolu, erytromycinu, gentamicinu, klindamycinu, nitrofurantoinu, ofloxacinu, oxacilinu, penicilinu G, rifampicinu, teikoplaninu, tetracyklinu a vankomycinu. Všechny kmeny *S. aureus* byly citlivé k ampicilin/sulbaktamu, chloramfenikolu, gentamicinu, nitrofurantoinu, ofloxacinu, oxacilinu, rifampicinu, teikoplaninu, tetracyklinu a vankomycinu.

Dále jsme zjišťovali citlivost kmene *Str. canis* vykultivovaného ze zevního zvukovodu psa bez klinických příznaků OE. Tento kmen byl citlivý k cefotaximu, chloramfenikolu, erytromycinu, klindamycinu, penicilinu G, tetracyklinu a vankomycinu, rezistentní pak k ampicilinu.

Všechny kmeny KNS získané od psů s klinickými příznaky OE byly citlivé k ampicilin/sulbaktamu, gentamicinu, ofloxacinu, rifampicinu, tetracyklinu a vankomycinu. Jako nejméně účinný jsme vyhodnotili erytromycin a oxacilin (33,3 % citlivých kmenů). Všechny kmeny *S. intermedius* byly citlivé k ampicilin/sulbaktamu, chloramfenikolu, nitrofurantoinu, ofloxacinu, rifampicinu a teikoplaninu. Nejvyšší procento rezistentních kmenů jsme zjistili u penicilinu G (20 % citlivých kmenů). Nejméně účinným antibiotikem proti *S. schleiferi* ssp. *coagulans* byl vankomycin, který inhiboval pouze 33,3 % kmenů.

Dva kmeny *Moraxella* sp. izolované ze zevního zvukovodu psa s OE byly citlivé k rifampicinu a sulfametazol/trimetoprimu. Rezistenci jsme zaznamenali k cefotaximu, ciprofloxacinu, penicilinu G a tetracyklinu.

*Enterococcus faecalis* byl citlivý k ampicilinu, chloramfenikolu, penicilinu G, teikoplaninu a vankomycinu, intermediárně rezistentní k nitrofurantoinu a rifampicinu a rezistentní k ofloxacinu a tetracyklinu.

Rezistenci k nitrofurantoinu, penicilinu G a k tetracyklinu jsme prokázali u kmene *Proteus* sp. K ampicilinu, ampicilin/sulbaktamu, aztreonamu, cefotaximu, chloramfenikolu, gentamicinu, ofloxacinu, piperacilinu a tikarcilinu byl tento mikroorganismus citlivý.

*Pseudomonas* sp. byla citlivá k aztreonamu, chloramfenikolu, ciprofloxacinu, gentamicinu, piperacilinu a tikarcilinu, rezistentní k ampicilinu, ampicilin/sulbaktamu, penicilinu G a tetracyklinu a intermediárně rezistentní k cefotaximu.

**Tabulka 9** Výsledky citlivosti stafylokoků izolovaných ze zevního zvukovodu psů uváděné v % citlivých kmenů, zjištěné diskovou difúzní metodou

Antibiotikum	KNS				<i>S. intermedius</i>				<i>S. scheliferi</i> ssp. <i>coagulans</i>		<i>S. aureus</i>	
	Zdraví psi (N=35)		Psi s OE (N=6)		Zdraví psi (N=11)		Psi s OE (N=5)		Psi s OE (N=3)		Zdraví psi (N=2)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ampicilin/sulbaktam	35	100,0	6	100,0	11	100,0	5	100,0	3	100,0	2	100,0
Chloramfenikol	32	91,4	4	66,7	11	100,0	5	100,0	3	100,0	2	100,0
Erytromycin	24	68,6	2	33,3	10	90,9	4	80,0	3	100,0	1	50,0
Gentamicin	34	97,1	6	100,0	11	100,0	4	80,0	3	100,0	2	100,0
Klindamycin	32	91,4	5	83,3	11	100,0	3	60,0	2	66,7	1	50,0
Nitrofurantoin	33	94,3	4	66,7	11	100,0	5	100,0	3	100,0	2	100,0
Ofloxacin	33	94,3	6	100,0	11	100,0	5	100,0	3	100,0	2	100,0
Oxacilin	28	80,0	2	33,3	11	100,0	4	80,0	2	66,7	2	100,0
Penicilin G	21	60,0	3	50,0	4	33,6	1	20,0	2	66,7	1	50,0
Rifampicin	35	100,0	6	100,0	11	100,0	5	100,0	3	100,0	2	100,0
Teikoplanin	28	80,0	5	83,3	9	81,8	5	100,0	2	66,6	2	100,0
Tetracyklin	26	74,3	6	100,0	5	45,5	3	60,0	3	100,0	2	100,0
Vankomycin	32	91,4	6	100,0	10	90,9	3	60,0	1	33,3	2	100,0

### **3.4.2 Citlivost bakterií izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých koček a koček s OE**

Z tabulky 10 vyplývá, že všechny kmeny KNS byly citlivé na chloramfenikol, gentamicin, klindamycin, ofloxacin, oxacilin, rifampicin a tetracyklin. Nejméně účinný byl penicilin G (78,6 % citlivých kmenů). *S. intermedius* byl ve všech případech inhibován ampicilin/sulbaktamem, gentamicinem, nitrofurantoinem, oxacilinem, ofloxacinem, rifampicinem, teikoplaninem a vankomycinem. Kmen *S. aureus* byl citlivý na všechna testovaná antibiotika s výjimkou ampicilin/sulbaktamu a erytromycinu, na teikoplanin byl kmen intermediárně rezistentní.

Z uvedeného je patrné, že nejméně účinným antibiotikem u KNS izolovaných ze zevního zvukovodu koček s OE byl teikoplanin (66,6 % citlivých kmenů). Kmen *S. aureus* byl citlivý ke všem testovaným antibiotikům s výjimkou erytromycinu a penicilinu G. Kmen *S. schleiferi* ssp. *coagulans* byl citlivý na všechna námi testovaná antibiotika.

**Tabulka 10** Výsledky citlivosti stafylokoků izolovaných ze zevního zvukovodu koček uváděné v % citlivých kmenů, zjištěné diskovou difúzní metodou

Antibiotikum	KNS				<i>S. aureus</i>		<i>S. intermedius</i>	
	Zdravé kočky (N=14)		Kočky s OE (N=6)		Zdravé kočky (N=1)	Kočky s OE (N=1)	Zdravé kočky (N=2)	
	n	%	n	%	výsledek	výsledek	n	%
Ampicilin/sulbaktam	13	92,9	6	100,0	rezistentní	citlivý	2	100,0
Chloramfenikol	14	100,0	6	100,0	citlivý	citlivý	1	50,0
Erytromycin	12	85,7	6	100,0	rezistentní	rezistentní	1	50,0
Gentamicin	14	100,0	5	83,3	citlivý	citlivý	2	100,0
Klindamycin	14	100,0	6	100,0	citlivý	citlivý	1	50,0
Nitrofurantoin	13	92,9	6	100,0	citlivý	citlivý	2	100,0
Ofloxacin	14	100,0	6	100,0	citlivý	citlivý	2	100,0
Oxacilin	14	100,0	5	83,3	citlivý	citlivý	2	100,0
Penicilin G	11	78,6	5	83,3	citlivý	rezistentní	1	50,0
Rifampicin	14	100,0	6	100,0	citlivý	citlivý	2	100,0
Teikoplanin	12	85,7	4	66,6	intermediární	citlivý	2	100,0
Tetracyklin	14	100,0	5	83,3	citlivý	citlivý	1	50,0
Vankomycin	13	92,9	6	100,0	citlivý	citlivý	2	100,0

Legenda: intermediární - intermediárně rezistentní kmen

## 3.5 Testování citlivosti izolovaných kvasinek na antimykotika

### 3.5.1 Citlivosti kvasinek izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých psů a psů s OE

Citlivosti kvasinek na vybraná antimykotika jsme testovali diskovou difúzní metodou na „*Malassezia*“ agaru.

Jednoznačně nejúčinnějším antimykotikem na kmeny *M. pachydermatis* izolované ze zevního zvukovodu zdravých psů byl ciklopiroxolamin. Všechny testované kmeny byly k tomuto antimykotiku citlivé, rezistentní však byly k mikonazolu. Na ekokonazol a klotrimazol byl citlivý pouze jeden kmen *M. pachydermatis* (tabulka 11)

Z tabulky 11 dále vyplývá, že nejúčinnějším antimykotikem na kmeny *M. pachydermatis* získané od psů s OE byl ciklopiroxolamin. Naopak všechny kmeny byly rezistentní k bifonazolu, ekonazolu, ketokonazolu, klotrimazolu a mikonazolu.

**Tabulka 11** Citlivost kmenů *M. pachydermatis* izolovaných ze zevního zvukovodu psů na antimykotika uváděná v % citlivých kmenů, zjištěná diskovým difúzním testem

Antimykotikum	<i>M. pachydermatis</i>			
	Zdraví psi (N=10)		Psi s OE (N=6)	
	n	%	n	%
Amfotericin B	9	90,0	3	50,0
Bifonazol	7	70,0	0	0,0
Ciklopiroxolamin	10	100,0	6	100,0
Ekonazol	1	10,0	0	0,0
Flukonazol	5	50,0	1	16,6
Itrakonazol	7	70,0	3	50,0
Ketokonazol	2	20,0	0	0,0
Klotrimazol	1	10,0	0	0,0
Mikonazol	0	0,0	0	0,0
Nystatin	8	80,0	3	50,0
Pimaricin	9	90,0	2	33,3

### 3.5.3 Citlivosti kvasinek izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých koček a koček s OE

Všechny kmeny *M. pachydermatis* izolované ze zevního zvukovodu zdravých koček byly citlivé k ciklopiroxolaminu a rezistentní ke všem dalším testovaným antimykotikům.

Ciklopiroxolamin byl rovněž jediným antimykotikem účinkujícím na blíže neurčenou kvasinku. (tabulka 12).

Z tabulky 12 dále vyplývá, že všechny testované kmeny *M. pachydermatis* získané ze zevního zvukovodu koček s OE byly citlivé k ciklopiroxolaminu a rezistentní ke klotrimazolu a mikonazolu .



**Tabulka 12** Citlivost kmenů *M. pachydermatis* izolované ze zevního zvukovodu koček na antimykotika uváděná v % citlivých kmenů, zjištěná diskovým difúzním testem

Antimykotikum	<i>M. pachydermatis</i>				Blíže neurčená kvasinka
	Zdravé kočky (N=2)		Kočky s OE (N=2)		Zdravé kočky (N=1)
	n	%	n	%	Výsledek
Amfotericin B	0	0,0	1	50,0	rezistentní
Bifonazol	0	0,0	1	50,0	rezistentní
Ciklopiroxolamin	100	100,0	2	100,0	citlivý
Ekonazol	0	0,0	1	50,0	rezistentní
Flukonazol	0	0,0	1	50,0	rezistentní
Itrakonazol	0	0,0	1	50,0	rezistentní
Ketokonazol	0	0,0	1	50,0	rezistentní
Klotrimazol	0	0,0	0	0,0	rezistentní
Mikonazol	0	0,0	0	0,0	rezistentní
Nystatin	0	0,0	1	50,0	rezistentní
Pimaricin	0	0,0	1	50,0	rezistentní

### **3.6 Plemena psů a jejich spojitost se vznikem OE**

Ze 17 psů s klinickými příznaky OE byli v naší studii nejčastěji zastoupeni labradoři (23,5 %) a kříženci (17,6 %). V kontrolní skupině 61 zdravých psů se nejčastěji pak vyskytovali kříženci (21,3 %) a jorkšírští teriéři (19,7 %). Zastoupení jednotlivých plemen psů v naší studii dokumentuje tabulka 13.

Plemena s klopeným uchem jsou v tabulce označena hvězdičkou a to proto, že klopené ucho, protože klopené ucho je jedním z významných faktorů predisponujících rozvoj OE. Všechna plemena, u kterých byla diagnostikována OE, mají klopené ucho. Výjimku představovali pouze West-highland teriér a Bullteriér.

**Tabulka 13** Plemena psů, z nichž pocházely výtěry ze zevního zvukovodu

Plemeno psa	Počet psů příslušejících k danému plemenu			
	Zdraví psi (N=61)		Psi s OE (N=17)	
	n	%	n	%
Aljašský malamut	1	1,6	-	-
Bernardýn *	1	1,6	-	-
Bišonek *	1	1,6	-	-
Brazilská fila *	1	1,6	-	-
Briard *	1	1,6	-	-
Bullmastif *	1	1,6	1	5,9
Bullteriér	-	-	1	5,9
Čivava	1	1,6	-	-
Dalmatin *	1	1,6	-	-
Dinmont teriér *	1	3,2	-	-
Irský vlokodav *	-	-	1	5,9
Jack Russel teriér *	1	1,6	-	-
Jezevčík *	6	9,8	-	-
Jorkšírský teriér	12	19,7	-	-
Kanadsko-americký pes	1	1,6	-	-
King Charles kavalír *	-	-	1	5,9
Knírač	2	3,3	-	-
Kokršpaněl *	3	4,9	1	5,9
Kříženec *	13	21,3	3	17,6
Labrador *	2	3,3	4	23,5
Maltézský teriér *	-	-	1	5,9
Mops *	1	1,6	-	-
Německý ovčák	1	1,6	-	-
Ohař *	2	3,3	-	-
Pekingský palácový psík *	1	1,6	-	-
Pinč	1	1,6	-	-
Pudl *	4	6,6	-	-
Pitbull	1	1,6	-	-
Pražský krysařík	1	1,6	-	-
Sharpei *	-	-	1	5,9
Skotský teriér	-	-	1	5,9
West Highland teriér	-	-	2	11,8

## 4 DISKUZE A ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjištění výskytu mikroorganismů v zevním zvukovodu zdravých psů a koček a psů a koček s klinickou manifestací OE, včetně stanovení citlivosti izolovaných kmenů na antimikrobiální látky. Součástí této práce bylo také ověření morfologických, růstových a biochemických vlastností *M. pachydermatis*.

Vyšetřili jsme 28 výtěrů ze zevního zvukovodu 17 psů a 5 koček s klinickými příznaky OE. Z uvedeného počtu pocházelo 22 výtěrů od psů OE a 6 výtěrů od koček. Dva (9,1 %) vzorky od psů s OE byly kultivačně negativní. Dále jsme vyšetřili 78 výtěrů ze zevního zvukovodu 61 zdravých psů a 15 koček, z toho pocházelo 63 výtěrů od psů a 15 od koček.

Z devíti (14,3 %) vyšetřovaných vzorků od zdravých psů a jednoho (6,7 %) od kočky jsme nevykultivovali žádné mikroorganismy. Rozdíly v počtech kultivačně pozitivních a negativních výsledků mikrobiologického vyšetření u zdravých psů a koček a psů a koček s OE nebyly statisticky významné. Výsledky mikrobiologického vyšetření mohly být negativně ovlivněny antimikrobiální terapií, která u některých zvířat předcházela odběru vzorku.

Počet námi zjištěných kultivačně negativních vzorků je významně nižší než uvádí Uchida a kol. (1990). Autoři nevyizolovali žádné mikroorganismy z 29 (29 %) vzorků od psů a 57 (57 %) vzorků od koček bez příznaků OE.

Z výtěrů ze zevního zvukovodu zdravých psů jsme nejčastěji vykultivovali KNS (37,0 %) a *Bacillus* sp. (34,0 %), dále *S. intermedius* (11,0 %) a *M. pachydermatis* (10,0 %). Koryneformní tyče, *S. aureus*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *Str. canis* a *Rhizopus* sp. představovali méně než 10 % všech izolovaných kmenů.

Procentuální zastoupení KNS v naší studii je v rozporu se zjištěními Lyskove a kol. (2007), Fernández a kol. (2006) a Yoshidy a kol. (2002), kteří prokázali 16,9 %, 16,7 % a 27,4 % KNS v materiálu odebraném ze zevního zvukovodu zdravých psů.

Naše výsledky týkající se výskytu *Bacillus* sp. jsou rovněž vyšší, než uvádějí Fernández a kol. (2006) a Lyskova a kol. (2007). *Bacillus* sp. představoval 16,7 % a 18,7 % všech mikroorganismů izolovaných ze zevního zvukovodu psů bez příznaků OE.

*S. intermedius* jsme v zevním zvukovodu zdravých psů prokázali ve stejném počtu (11 %) jako Bornand (1992), ale v nižším než Lyskova a kol. (2007), kteří uvádějí 19,6% výskyt.

Naše výsledky o výskytu *M. pachydermatis* u psů bez OE se shodují s údaji publikovanými Lyskovou a kol. (2007). Autoři popsali 8,7% výskyt této kvasinky v uších psů bez příznaků OE. Yoshida kol. (2002) izoloval tuto kvasinku z uší psů bez příznaků otitidy v 30,6 % případech.

Yoshida a kol. (2002) vykultivovali ze zevního zvukovodu zdravých psů 1,6 % koryneformních bakterií. Výskyt těchto bakterií je v našem výzkumu téměř o 1,5 % vyšší.

*S. aureus* vykultivovali Fernández a kol. (2006) z uší zdravých psů ve vyšším počtu (8,3 %) než jsou námi zjištěná 2 %.

Výsledky týkající se zastoupení *Str. canis* v klinickém materiálu odebraného od zdravých psů se shodují s údaji uváděnými Lyskovou a kol. (2007). Autoři popsali 2,3% výskyt *Str. canis* v zevním zvukovodu zdravých psů.

Na rozdíl od Fernández a kol. (2006) a Lyskove a kol. (2007) jsme v zevním zvukovodu psů bez příznaků OE nezjistili přítomnost *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. ani *Proteus* sp.

Stejně jako Sharma a Rhodes (1975) jsme prokázali ve výtěrech ze zevního zvukovodu zdravých psů *Rhizopus* sp.

Ze zevního zvukovodu psů s otitidou jsme nejčastěji vyizolovali *Bacillus* sp. (28,2 %), KNS (15,4 %), *M. pachydermatis* (15,4 %) a *S. intermedius* (12,8 %). Ostatní mikroorganismy (*S. schleiferi* ssp. *coagulans*, koryneformní bakterie, *Moraxella* sp., *Enterococcus* sp., gramnegativní koky, *Proteus mirabilis* a *Pseudomonas* sp.) jsme prokázali v méně než 8 % případech.

Ve výtěrech získaných z uší psů s klinickými příznaky OE se nejčastěji vyskytoval *Bacillus* sp. (28,2 %). V námi dostupné odborné literatuře jsme nenalezli informace odpovídající našim zjištěním. Naopak, Uchida a kol. (1990) a Lyskova a kol. (2007) vykultivovali *Bacillus* sp. ve 4,4 % a 7,6 % případech.

Výskyt KNS ve výtěrech ze zevního zvukovodu psů se zánětlivým onemocněním odpovídal údajům publikovaným Oliveirou a kol. (2005) a Türkyilmazem (2008), kteří uvádějí 12,2 % a 19,4 % izolovaných kmenů KNS. Yoshida a kol. (2002) prokázali u psů s klinickou manifestací OE dokonce 40,5 % KNS. Naše zjištění jsou v rozporu s

pozorováními Fernández a kol. (2006) a Lyskové a kol. (2007), kteří uvádějí 5,6% a 4,7% výskyt KNS

Téměř shodné procentuální zastoupení *M. pachydermatis* v uších psů publikovali Lyskova a kol. (2007), kteří ji prokázali v 12,7 % případů. Petrov a Mihaylov (2008) uvádějí 18,8% a Yoshida a kol. (2002) dokonce 24,4% výskyt *M. pachydermatis* v zevním zvukovodu psů se zánětlivým onemocněním. Bornand (1992) a Kiss a kol (1997) zjistili mezi mikroorganismy přítomnými v uších psů s otitidou *M. pachydermatis* v 56 % případů. .... Námí zjištěný výskyt *S. intermedius* je nižší než uvádí většina studií zaměřených na mikrobiologické vyšetření výtěrů ze zevního zvukovodu psů s OE. Uchida a kol. (1990) publikovali 17,8%, Lyskova a kol. (2007) 24,2% a Oliveira a kol. (2008) dokonce 34,7% výskyt *S. intermedius*. Naopak Fernández a kol. (2006) uvádí pouze 1,4% zastoupení této bakterie.

Prokázali jsme vyšší výskyt *S. schleiferi* ssp.*coagulans* v uších psů se zánětlivým onemocněním než Lyskova a kol. (2007), kteří tuto bakterii izolovali v 2,5 % a Oliveira a kol. (2008) v 1,5 % případů.

Přítomnost koryneformních bakterií v zevním zvukovodu psů s otitidou jsme zjistili téměř ve shodném počtu jako jako Cole a kol. (1998), Yoshida a kol.(2002) a Lyskova a kol. (2007), kteří tuto bakterii vykultivovali v 7,7, 6,2 % a 4,2 % případů.

Z výtěrů z uší psů s OE jsme izolovali *Proteus mirabilis* ve 2,6 %, což odpovídá zjištěním Oliveiry a kol. (2008), kteří vykultivovali tento mikroorganismus v 3,5 %. Naopak Fernández a kol. (2006) uvádí, že se *Proteus mirabilis* vyskytoval až v 13,9 % případů.

Výskyt *Enterococcus* sp ve výtěrech ze zevního zvukovodu psů se zánětlivým onemocněním odpovídal údajů publikovaným Lyskovou a kol. (2007), kteří mezi mikroorganismy přítomnými v zevním zvukovodu psů s OE prokázali tuto bakterii v 2,1 % případů. Cole a kol. (1998) zjistili, že *Enterococcus* sp. se ve výtěrech ze zevního zvukovodu psů s OE vyskytoval v 6,6 %

Z uší psů se zánětlivým onemocněním jsme vykultivovali *Pseudomonas* sp. v 4,5 %, podobně jako Uchida a kol. (1990) a Yoshida a kol. (2002). Autoři izolovali tuto bakterii ve 4,4 %, a 3,4 % případů.

Nevyizolovali jsme žádný kmen *Escherichia coli* podobně jako Cole a kol. (1998). Fernández a kol. (2006) uvádí 5,6%, Lyskova a kol. (2007) 4,2% a Türkyilmaz (2008) 10,8% výskyt této bakterie.

Nezjistili jsme přítomnost zástupců rodu *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Streptococcus* a *Pasteurella* v uších psů s OE, jejichž izolace uvádějí ve svých pracích Cole

a kol. (2003), Sarierler a Kirkam (2004), Fernández a kol. (2006), Lyskova kol. (2007), Oliveira a kol. (2008) a Türkyilmaz (2008).

Zajímavý je nález *Moraxella* sp. v zevním zvukovodu psa s klinickými příznaky OE. V námi dostupné literatuře se nepodařilo najít publikaci popisující výskyt moraxel u psů s OE.

V uších zdravých koček dominovaly KNS (60,9 %). *M. pachydermatis*, *Bacillus* sp. a *S. intermedius* jsme vykultivovali v 8,7 %. Dále jsme prokázali po jednom kmenu *S. aureus*, *Penicillium* sp. a blíže neurčené kvasinky. O složení mikroflóry zevního zvukovodu zdravých koček jsme v dostupné odborné literatuře nezjistili žádné údaje, a proto námi získané výsledky nelze diskutovat.

V uších koček s klinickou manifestací OE dominovaly KNS (60 %). *M. pachydermatis* jsme vykultivovali v 20 % a *S. aureus* a *S. schleiferi* ssp. *coagulans* v 10 % případů. Uchida a kol.(2002) zjistil přítomnost *S. aureus* v uších koček s OE v 12,5 % případů, což je v souladu s našimi pozorováními. *M. pachydermatis* izolovali tito autoři ve 25 % případů. Výskyt této kvasinky v zánětlivých uších koček je v porovnání s naší studií vyšší. Na rozdíl od naší práce však nevykultivovali Uchida a kol. (1990) žádné kmeny KNS.

Na základě statistického vyhodnocení jsme zjistili, že neexistuje významný rozdíl ve výskytu mikroorganismů v zevním zvukovodu zdravých psů a koček a psů a koček s OE. Výjimku tvoří pouze KNS a *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, které byly častěji vykultivovány ze zevního zvukovodu zdravých psů. Výsledky však mohou být ovlivněny nízkým počtem psů a koček s OE zařazených v naší studii.

U izolovaných kmenů bakterií a kvasinek jsme zjišťovali citlivost na antimikrobiální léčiva diskovou difúzní metodou.

Všechny kmeny KNS vykultivované ze zevního zvukovodu zdravých psů a psů s OE byly citlivé na ampicilin/sulbaktam a rifampicin. Nejméně účinným jsme vyhodnotili penicilin G. U kmenů izolovaných od zdravých psů dosahovala rezistence 40 % a u kmenů ze psů s OE dokonce 50 %. Významně vyšší rezistenci na oxacilin a nitrofurantoin jsme zaznamenali u kmenů KNS vykultivovaných ze zevního zvukovodu psů s klinickými příznaky OE.

Všechny kmeny KNS izolované ze zevního zvukodu koček byly citlivé na chloramfenikol, klindamycin, ofloxacin a rifampicin. Nejméně účinným antibiotikem byl penicilin G (21,4 % rezistentních kmenů od zdravých koček a 16,7 % rezistentních kmenů od koček s OE) a teikoplanin (14,3 % a 33,3 % rezistentních kmenů).

Řada autorů publikovala nízkou účinnost penicilinu G na KNS izolované ze zevního zvukovodu psů, což se shoduje s našimi zjištěními. Lyskova a kol. (2007) publikovali 43,8 % a Türkyilmaz (2008) 39 % kmenů KNS rezistentních na toto antibiotikum. Naproti tomu Sarierler a Kirkan (2004) označili penicilin G za neúčinnější, protože inhiboval všechny jimi testované kmeny KNS. Hariharan a kol. (2006) uvádějí 13 % rezistentních kmenů KNS izolovaných ze zevního zvukovodu koček.

Zjistili jsme, že všechny kmeny *S. intermedius*, který jsme izolovali z uší zdravých psů a psů s otitidou byly citlivé na ampicilin/sulbaktam, chloramfenikol, nitrofurantoin, ofloxacin a rifampicin. Za nejméně účinný jsme označili penicilin G. U kmenů *S. intermedius* izolovaných ze zevního zvukovodu zdravých psů byla zaznamenána rezistence u 66,4 % a u kmenů od psů s OE dokonce u 80 % kmenů této bakterie.

Dva kmeny *S. intermedius* vykultivované ze zevního zvukovodu zdravých koček byly citlivé k ampicilin/sulbaktamu, gentamicinu, nitrofurantoinu, ofloxacinu, oxacilinu, rifampicinu, teikoplaninu a vankomycinu.

Lyskova a kol. (2007), podobně jako my, prokázali citlivost všech kmenů *S. intermedius* izolovaných z uší psů na ofloxacin. Pedersen a Wegener (1995), Cole a kol. (1998) a Cole a kol. (2003) zjistili, že všechny kmeny *S. intermedius* izolované ze zevního zvukovodu psů byly citlivé k chloramfenikolu. Téměř shodnou citlivost této bakterie na klindamycin popsali Kiss s kol. (1997) a Lyskova a kol. (2007). Autoři zjistili, že toto antibiotikum je účinné na 62 %, resp. 65 % kmenů *S. intermedius*.

Z uší zdravých psů jsme izolovali 2 kmeny *S. aureus*, které byly dobře citlivé ke všem testovaným antibiotikům. Výjimku tvořil pouze erytromycin, klindamycin a penicilin G. Pouze 50 % kmenů této bakterie bylo ke zmíněným antibiotikům citlivých.

Dva kmeny *S. aureus* získané ze zevního zvukovodu koček byly citlivé na chloramfenikol, gentamicin, klindamycin, nitrofurantoin, ofloxacin, oxacilin, rifampicin, tetracyklin a vankomycin.

Všechny kmeny *S. schleiferi* ssp. *coagulans* vykultivované z uší psů byly citlivé na ampicilin/sulbaktam, chloramfenikol, erytromycin, gentamicin, nitrofurantoin, ofloxacin,



rifampicin a tetracyklin. Tato bakterie byla nejméně inhibována vankomycinem, na který bylo pouze 33,3 % kmenů citlivých.

*S. schleiferi* ssp. *coagulans* izolovaný z uší koček se zánětlivým onemocněním byl citlivý k ampicilin/sulbaktamu, chloramfenikolu, erytromycinu, gentamicinu, klindamycinu, nitrofurantoinu, ofloxacinu, oxacilinu, penicilinu G, rifampicinu, teikoplaninu, tetracyklinu a vankomycinu

*Str. canis* izolovaný ze zevního zvukovodu zdravých psů vykazoval citlivost k cefotaximu, chloramfenikolu, erytromycinu, klindamycinu, penicilinu G, tetracyklinu a vankomycinu, rezistentní byl k ampicilinu.

Dva kmeny *Moraxella* sp. vykultivované z uší psů s OE byly citlivé k rifampicinu a sulfametoxazol/trimetoprimu, rezistentní k cefotaximu, ciprofloxacinu, penicilinu G a tetracyklinu.

V zevním zvukovodu psů se zánětlivým onemocněním jsme prokázali jeden kmen *Enterococcus faecalis*, který byl citlivý k ampicilinu, chloramfenikolu, penicilinu G, teikoplaninu a vankomycinu, intermediárně rezistentní k nitrofurantoinu a rifampicinu a rezistentní k ofloxacinu a tetracyklinu. Lyskova a kol. (2007) uvádějí jako nejefektivnějším antibiotikem proti *Enterococcus* sp. ampicilin a vankomycin.

*Proteus* sp. izolovaný ze zevního zvukovodu psů s OE byl citlivý k ampicilinu, ampicilin/sulbaktamu, aztreonamu, cefotaximu, chloramfenikolu, gentamicinu, ofloxacinu, piperacilinu a k tikarcilinu, rezistentní k nitrofurantoinu, penicilinu G a tetracyklinu.

*Pseudomonas* sp., kterou jsme vykultivovali z uší psů se zánětlivým onemocněním, byla citlivá k aztreonamu, chloramfenikolu, ciprofloxacinu, gentamicinu, ofloxacinu, piperacilinu a tikarcilinu. Rezistenci jsme prokázali u ampicilinu, ampicilin/sulbaktamu, penicilinu G a tetracyklinu.

Cole a kol. (1998) uvádějí, že na gentamicin bylo citlivých 56,3 % a na tetracyklin 7,1 % kmenů *Pseudomonas* sp. Žádný z testovaných kmenů nebyl citlivý k ampicilinu, chloramfenikolu a penicilinu. Barrasa a kol. (2002) zjistili, že tikarcilin byl účinný na 87 %, ciprofloxacin a piperacilin na 78,3 % a gentamicin na 65,2 % kmenů *Pseudomonas* sp. Sarierler a Kirkan (2004) uvádějí jako nejúčinnější gentamicin a tetracyklin.

Jednoznačně nejúčinnějším antimykotikem na kmeny *M. pachydermatis* získané z uší psů byl ciklopiroxolamin, který inhiboval růst všech kmenů této kvasinky. Jako nejméně účinný jsme vyhodnotili mikonazol, ke kterému byly všechny kmeny *M. pachydermatis*

rezistentní. Kmeny kvasinek získané ze zevního zvukovodu psů s otitidou byly častěji rezistentní než kmeny od zdravých psů.

Všechny kmeny *M. pachydermatis* izolované z uší koček byly citlivé na ciklopiroxolamin a rezistentní na klotrimazol a mikonazol. Blíže neurčená kvasinka získaná ze zevního zvukovodu zdravých koček byla rezistentní ke všem testovaným antimykotikům s výjimkou ciklopiroxolaminu.

Nesouhlasíme s tvrzením Kisse a kol. (1997), že nejúčinnějším antimykotikem na *M. pachydermatis* je ketokonazol. Naše výsledky týkající se citlivosti kvasinek izolovaných ze zevního zvukovodu psů se neshodují s Einchenbergem a kol. (2003), kteří uvádějí, že itrakonazol je účinný na všechny kmeny kvasinek. Autoři prokázali rezistenci ke ketokonazolu u 3,7 % a flukonazolu u 2,4 % kmenů. Lyskova a kol. (2007) v rozporu s námi prokázali, že kmeny *M. pachydermatis* byly citlivé ke všem testovaným antimykotikům. Pouze k flukonazolu bylo 4,4 % kmenů této kvasinky rezistentních.

Všechny kmeny *M. pachydermatis* vyrůstaly na „*Malassezia*“ a Sabouraudově agaru v smetanových, hladkých, konvexních a matných koloniích. „*Malassezia*“ agar jsme používali proto, že umožňuje také záchyt lipid-dependentních malassezií, které se v zevním zvukovodu psů a koček mohou sporadicky vyskytovat.

Hlavním kritériem identifikace *M. pachydermatis* byl pro nás růst kvasinky na Sabouraudově agaru při 37 °C po 24-48 h, vzhled kolonií na tomto agaru a na základě mikroskopického vyšetření prokázaný lahvovitý tvar buněk.

Souhlasíme s tvrzením Nobre a kol. (2001) a Woodgyer (2004), že *M. pachydermatis* vytváří malé buňky, které připomínají tvar lahve. Stejně jako Kiss a kol. (1997) a Blanco a kol. (2000) jsme zjistili, že kvasinka dobře roste na Sabouraudově agaru. Stejně jako Bernardo a kol. (1998), Blanco a kol. (2000) a Masuda a kol. (2000) jsme zjistili, že při 37 °C vytváří *M. pachydermatis* dobře vyvinuté kolonie.

Ověření, že kvasinky námi označené jako *M. pachydermatis* jsou opravdu správně identifikovány, nám poskytlo provedení druhově-specifická PCR, což bylo předmětem jiné diplomové práce. Výsledky PCR vyšetření potvrdily, že všechny kvasinky určené na základě mikrobiologického vyšetření jako *M. pachydermatis* přísluší opravdu k tomuto druhu.

Produkcí katalasy jsme prokázali u 95 % a ureasy u 75 % kmenů *M. pachydermatis*. Naše výsledky se shodují se studií Kisse a kol. (1996), který zjistil, že kvasinka vykazuje ve většině případů pozitivní katalasovou a ureasovou reakci. Guého a kol. (1996) stejně jako my prokázali, že *M. pachydermatis* využívá TWEEN 40, 60 a 80. Rozdíl však nalézáme u

TWEENU 20. Guého a kol. (1996) zjistili, že mikroorganismus tuto látku neutilizuje. V naší práci využívalo TWEEN 20 ke svému růstu 85 % kmenů *M. pachydermatis*. Ke stejnému závěru dospěli také Kaneko a kol. (2007).

Z plemen psů, u kterých byla diagnostikována OE, byli v naší studii nejčastěji zastoupeni labradoři (23,5 %) a kříženci (17,6 %). Zajímavým zjištěním je skutečnost, že všechna plemena, u nichž byla diagnostikována otitida, mají s výjimkou West-highland teriéra a Bullteriéra klopené ucho. Toto zjištění potvrzuje známý předpoklad, že klopené ucho je významným predispozičním faktorem pro rozvoj OE, jak ve své práci například uvádí Gbelec (2003).

Je potřeba mít na paměti, že otitis externa je onemocnění s multifaktoriální etiologií a jeho příčina nemusí být vždy na první pohled zřejmá. Diagnostika tohoto onemocnění vyžaduje pečlivou analýzu všech příčin, které se na rozvoji OE mohou podílet. Jedná se především o důkladné mikrobiologické vyšetření výtěrů ze zevního zvukovodu a identifikaci mikroorganismů, které se mohou na rozvoji a přetrvávání onemocnění podílet, ať se jedná o bakterie či kvasinky. Z důvodu zvyšující se rezistence mikroorganismů na antimikrobiální léčiva běžně používaná k terapii otitid je nutné, aby u kmenů bakterií a kvasinek, které onemocnění způsobily, byla vždy testována citlivost.

## 5 PŘÍLOHY

**Příloha 1** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Staphylococcus* sp.

**Příloha 2** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Streptococcus* sp.

**Příloha 3** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Enterobacteriaceae*

**Příloha 4** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Enterococcus* sp.

**Příloha 5** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Ps. aeruginosa*

**Příloha 6** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro kvasinky

**Příloha 7** *M. pachydermatis* obarvená methylenovou modří

**Příloha 8** Izolace *M. pachydermatis* na „*Malassezia*“ agaru

**Příloha 9** Primokultivace na Sabouraudově agaru: nahoře *M. pachydermatis* se stafylokoky,

dole jen stafylokoky

**Příloha 10** *S. intermedius* na krevním agaru

**Příloha 1** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Staphylococcus* sp. (CLSI document M100-S17, 2007)

Antibiotikum	<i>Staphylococcus</i> sp.		
	Průměry inhibičních zón uváděné v mm		
	R	I	C
Ampicilin/sulbaktam	≤ 11	12-14	≥ 15
Chloramfenikol	≤ 12	13-17	≥ 18
Erytromycin	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicin	≤ 12	13-14	≥ 15
Klindamycin	≤ 14	15-20	≥ 21
Nitrofurantoin	≤ 14	15-16	≥ 17
Ofloxacin	≤ 14	15-17	≥ 18
Oxacilin	≤ 17	-	≥ 18
Penicilin G	≤ 28	-	≥ 29
Rifampicin	≤ 16	17-19	≥ 20
Teikoplanin	≤ 10	11-13	≥ 14
Tetracyklin	≤ 14	15-18	≥ 19
Vankomycin	-	-	≥ 15

**Příloha 2** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Streptococcus* sp. (CLSI document M100-S17, 2007)

Antibiotikum	<i>Streptococcus</i> sp.		
	Průměry inhibičních zón uváděné v mm		
	R	I	C
Ampicilin	-	-	≥ 24
Cefotaxim	-	-	≥ 24
Chloramfenikol	≤ 17	18-20	≥ 19
Erytromycin	≤ 15	16-20	≥ 21
Klindamycin	≤ 15	16-18	≥ 19
Penicilin G	-	-	≥ 24
Tetracyklin	≤ 18	19-22	≥ 23
Vankomycin	-	-	≥ 17

**Příloha 3** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Enterobacteriaceae* (CLSI document M100-S17, 2007)

Antibiotikum	<i>Enterobacteriaceae</i>		
	Průměry inhibičních zón uváděné v mm		
	R	I	C
Ampicilin	≤ 13	14-16	≥ 17
Ampicilin/sulbaktam	≤ 11	12-14	≥ 15
Aztreonam	≤ 15	16-21	≥ 22
Cefotaxim	≤ 14	15-22	≥ 23
Chloramfenikol	≤ 12	13-17	≥ 18
Gentamicin	≤ 12	13-14	≥ 15
Nitrofurantoin	≤ 14	15-16	≥ 17
Ofloxacin	≤ 12	13-15	≥ 16
Piperacilin	≤ 17	18-20	≥ 21
Tetracyklin	≤ 11	12-14	≥ 15
Tikarcilin	≤ 14	15-19	≥ 20

**Příloha 4** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Enterococcus* sp. (CLSI document M100-S17, 2007)

Antibiotikum	<i>Enterococcus</i> sp.		
	Průměry inhibičních zón uváděné v mm		
	R	I	C
Ampicilin	≤ 16	-	≥ 17
Chloramfenikol	≤ 12	13-17	≥ 18
Nitrofurantoin	≤ 14	15-16	≥ 17
Penicilin G	≤ 14	-	≥ 15
Rifampicin	≤ 16	17-19	≥ 20
Teikoplanin	≤ 10	11-13	≥ 14
Tetracyklin	≤ 14	15-18	≥ 19
Vankomycin	≤ 14	15-16	≥ 17

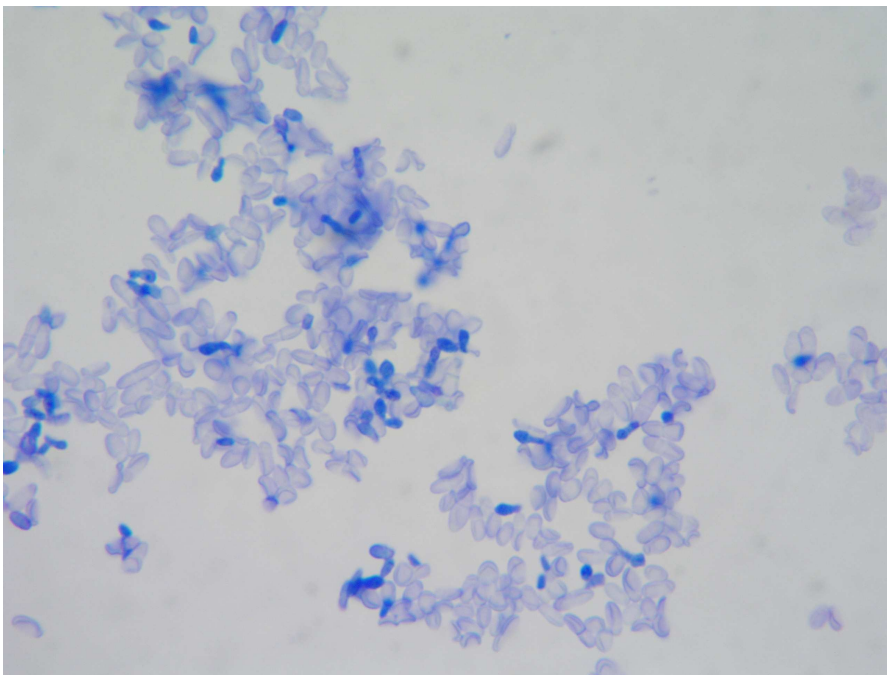
**Příloha 5** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro *Ps. aeruginosa* (CLSI document M100-S17, 2007)

Antibiotikum	<i>Ps. aeruginosa</i>		
	Průměry inhibičních zón uváděné v mm		
	R	I	C
Aztreonam	≤ 15	16-21	≥ 22
Cefotaxim	≤ 14	15-22	≥ 23
Ciprofloxacin	≤ 15	16-20	≥ 21
Gentamicin	≤ 12	13-14	≥ 15
Ofloxacin	≤ 12	13-15	≥ 16
Piperacilin	≤ 17	-	≥ 18
Tikarcilin	≤ 14	-	≥ 15

**Příloha 6** Výkladové standardy pro průměry inhibičních zón pro kvasinky (ITEST plus, s.r.o., 2005)

Antimykotikum	Kvasinky
	Průměry inhibičních zón uváděné v mm
	C
Amfotericin B	> 10
Bifonazol	> 10
Ciklopiroxolamin	> 10
Ekonazol	> 20
Flukonazol	> 15
Itrakonazol	> 10
Ketokonazol	> 20
Klotrimazol	> 20
Mikonazol	> 20
Nystatin	> 15
Pimaricin	> 10

**Příloha 7** *M. pachydermatis* obarvená methylenovou modří



**Příloha 8** Izolace *M. pachydermatis* na „*Malassezia*“ agaru (inkubace 24 h při 37 °C)





**Příloha 9** Primokultivace na Sabouraudově agaru: nahoře *M. pachydermatis* se stafylokoky, dole jen stafylokoky (inkubace 24 h při 37 °C)



**Příloha 10** *S. intermedius* na krevním agaru (inkubace 24 h při 37 °C)



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ASHBEE, H. R.; EVANS, E. G. V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clinical microbiology reviews*. 2002, vol. 15, no. 1, s. 21-57. ISSN 1098-6618.

BARRASA, J. L. M. a kol. Antibacterial susceptibility of *Pseudomonas* strain Isolated from Chronic Canine Otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine. B*. 2000, vol. 47, no. 3, s. 191-196. ISSN 1439-0450.

BEDNÁŘ, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie*. Praha, Marvil, 1996.

BELKUM, A.; BOEKHOUT, T.; BOSBOOM, R. Monitoring spread of *Malassezia* infection in a neonatal intensive care unit by PCR-Mediated genetic typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, vol. 32, no. 10, s. 2528-2532. ISSN 1098-660X.

BERNARDO, F. M.; MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. A survey of mycotic otitis externa of dogs in Lisabon. *Revista Iberoamericana Micología: órgano de la Asociación Española de Especialistas en Micología*. 1998, vol. 15, no. 3, s. 163-165. ISSN 1130-1406.

BLANCO, J. L. a kol. Microbiological diagnoses of chronic otitis externa in the dog. *Journal of Veterinary Medicine. B*. 1996, vol. 43, no. 8, s. 475-482. ISSN 0514-7166.

BLANCO, J. L. a kol. Optimum incubation condition for the isolation of yeasts from canine otitis externa. *Journal of veterinary medicine. B*. 2000, vol. 47, no. 8, s. 599-605. ISSN 0514-7166.

BORNARD, V. Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 1992, vol. 134, s. 341-348. ISSN 0036-7281

BLUE, J. L.; WOOLEY, R. E. Antibacterial sensitivity patterns of bacteria isolated from dogs with otitis externa. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1977, vol. 171, no. 4, s. 362-363. ISSN 0003-1488.

CAFARCHIA, C. a kol. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2005, vol. 17, no. 4, s. 316-322. ISSN 1040-6387.

CARLOTTI, D. N. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*. 1991, vol. 32, no. 8, s. 394-400. ISSN 0022-4510.

CARLOTTI, D. N. *Malassezia* dermatitis in the dog. In Small Veterinary Association World Congress 2001 [on-line]. Vancouver, 2001 [citace 2008-11-12]. Dostupný z www: <<http://www.vin.com/vindbpub/searchpb/proceedings/pr05000/pr00097.htm>>.

CLSI document M100-S17. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth informational supplement*. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007, s.177.

COLE, L. K. a kol. Evaluation of an ear cleanser for the treatment of infectious otitis externa in dogs. *Veterinary therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*. 2003, vol. 4, no. 1, s. 12-23. ISSN 1528-3593.

COLE, L. K. a kol. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1998, vol. 212, no. 4, s. 534-538. ISSN 0003-1488.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. *Journal of clinical microbiology*. 2000, vol. 38, no. 6, s. 2383-2385. ISSN 1098-660X.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. *Journal of clinical mikrobiology*. 1999, vol. 37, no. 5, s. 1573-1574 . ISSN 1098-660X.

DAVID, M.; GABRIEL, M.; KOPECKA, M. Unusual ultrastructural characteristics of the yeast *Malassezia pachydermatis*. *Scripta medica (Brno)*. 2003, vol. 76, no. 3, s. 173-186. ISSN 1211-3395.

EINCHENBERG, M. L. a kol. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2003, vol. 31, no. 2, s. 75-80. ISSN 1679-9216.

FAERGEMANN, J. Atopic dermatitis and fungi. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, vol. 15, no. 4, s. 545-563. ISSN 1098-6618.

FAN, Y. M. a kol. Granulomatous skin infection caused by *Malassezia pachydematis* in a dog owner. *Archives of Dermatology*. 2006, vol. 142, no. 9, s. 1181-1184. ISSN 1538-3652.

FERNÁNDEZ, G. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. *Revista Científica (Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. División de Investigación.)* 2006, vol. 16, no. 1, s. 23-30. ISSN 0798-2259.

GABAL, M. A. Preliminary studies on the mechanism of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. *Mycophatologia*. 1988, 104, no. 2, s. 93-98. ISSN 0369-299X.

GBELEC, P. Choroby uší [on-line]. 2003. [cit. 2005-20-04]. Dostupný z www: < <http://www.aavet.cz/main.php?page=rclanek&id=6>>.

GUEDEJA-MARRÓN, J. a kol. Susceptibility of bacterial isolates from chronic canine otitis externa to twenty antibiotics. *Journal of Veterinary Medicine. B.* 1998, vol. 45, no. 8, s. 507-512. ISSN 0514-7166.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1996, vol. 69, no. 4, s. 337-355. ISSN 1572-9699.

GUILLOT, J; CHERMETTE, R; GUÉHO, E. Prévalence du genre *Malassezia* chez les mammifères. *Journal of medical and veterinary mycology.* 1994, vol. 4, s.72–79. ISSN 0268-1218

GUILLOT, J; GUÉHO, E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1995, vol. 67, s. 297-314. ISSN 1572-9699

GUPTA, A. K.; KOHLI, Y.; SUMMERBELL, R. C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *Journal of Clinical Microbiology.* 2000, vol. 38, no. 5, s. 1869-1875. ISSN 1098-660X.

HAJSIG, D. a kol. Otitis externa in dogs: Bacteriological and mycological study. *Veterinarski Arhiv.* 1980, vol. 50, no. 4, s. 159-164. ISSN 0372-5480.

HALL, J. A. Medical management of end-stage canine otitis externa [on-line]. 2004. [cit. 2008-12-11]. Dostupný z www <[http://www.dermapet.com/articles/es\\_canine.htm](http://www.dermapet.com/articles/es_canine.htm)>.

HARIHARAN, H. a kol. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *The Canadian Veterinary Journal.* 2006, vol. 47, no. 3, s. 253-255. ISSN 0008-5286.

HILLIER, A.: Treatment of *Pseudomonas* otitis in the dog. [on-line]. 2005. [cit. 2005-20-4]. Dostupný z www: <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/article/articleDetail.jsp?id=179408>>.

HIRAI, A. a kol. *Malassezia nana* sp. nov.: a novel lipid-dependement yeast species isolated from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2004, vol. 54, s. 623-627. ISSN 1466-5034.

INAMADAR, A. C.; PALLIT, A. The genus *Malassezia* and human disease. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology.* 2003, vol. 69, no. 4, s. 265-270. ISSN 0973-3922."

ITEST plus, s.r.o., Hradec Králové. *Antimykotické disky.* 2005. 2 s.

JUNCO, M. T. T.; BARRASA, J. L. M. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase positive staphylococci isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine. B.* 2002, vol. 49, no. 9, s. 419-423. ISSN 1439-0450.

KANEKO, T. a kol. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007, vol. 45, no. 11, s. 3737-3742. ISSN 1098-660X.

KINDO, A. J. a kol. Identification of *Malassezia* species. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 2004, vol. 22, no. 3, s. 179-181. ISSN 1998-3646.

KISS, G.; RADVÁNYI, S. Z.; SZIGETI, G. Characteristic of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa. *Mycoses.* 1996, vol. 39, no. 7-8, s. 313-321. ISSN 1439-0507.

KISS, G.; RADVÁNYI, S. Z.; SZIGETI, G. New combination for the therapy of canine otitis externa I Microbiology of otitis externa. *Journal of Small Animal Practice.* 1997, vol. 38, no. 2, s. 51-56. ISSN 0022-4510.

KOZAK, M. a kol. Study of dermatophytes in dogs and risk of human infection. *Bratislavské Lekárske Listy.* 2003, vol. 104, no. 7-8, s. 211-217. ISSN 0006-9248.

KRAHWINKEL, D. J. *Textbook of Small Animal Surgery.* 2. Vyd. 2003. Kapitola External ear canal. s. 1746-1748. ISBN 0721686079.

LILENBAUM, W. a kol. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Letters Applied Microbiology.* 2000, vol. 31, no. 2, s. 42-45. ISSN 1472-765X.

LILENBAUM, W.; NUNES, E. L. C.; AZEREDO, M. A. I. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. *Letters in Applied Microbiology.* 1998, 27, no. 4, s. 224-228. ISSN 1472-765X.

LOGAS, D. B. Disease of the ear canal. *The Veterinary Clinics of North America. Small animal practise.* 1994, vol. 24, no. 5, s. 905-917. ISSN 0195-5616.

LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeast isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine Series A.* 2007, vol. 54, no. 10, s. 559-563. ISSN 1439-0442.

MASUDA, A. a kol. Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *Journal of Veterinary Medical Sciences.* 2000, vol. 62, no. 11, s. 1177-1182. ISSN 1347-7439.

- MATOUSEK, J. L. a kol. Evaluation of the effect of pH on in vitro growth of *Malassezia pachydermatis*. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2003, 67, no. 1, s. 56-59. ISSN 0830-9000.
- MATOUSEK, J. L.; CAMPBELL, K. L. *Malassezia* dermatitis. *Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian*. 2002, vol. 24, no. 4, s. 224-229. ISSN 01931903.
- MCKEEVER, P. J.; TORRES, S. M. F. Ear disease and its management. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practise*. 1997, vol. 27, no. 6, s. 1523-1526. ISSN 0195-5616.
- MORRIS, D. O. a kol. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. *Emerging Infectious Diseases*. 2005, vol. 11, no. 1, s. 83-87. ISSN 1080-6059.
- MURAI, T. a kol. Homogenous cell suspension of *Malassezia pachydermatis* obtained with an ultrasonic homogenizer. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. 2002, vol. 64, no. 4, s. 381-383. ISSN 1347-7439.
- NAKAGAKI, K. a kol. *Malassezia pachydermatis* isolated from a south american sea lion (*Otaria byronia*) with dermatitis. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. 2000, vol. 62, no. 8, s. 901-903. ISSN 1347-7439.
- NAKANO, Y.; WADA, M.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Effects of  $\beta$ -Thujaplicin on anti-*Malassasezia pachydermatis* remedy for canine otitis externa. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. 2005, vol. 67, no. 12, s. 1243-1247. ISSN 1347-7439.
- NISHUMURA, K. a kol. Ultrastructure of budding process of *Malassezia pachydermatis*. *Journal of Medical Veterinary Mycology*. 1991, vol. 29, no. 6, s. 387-93. ISSN 0268-1218.
- NOBRE, M. O. a kol. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents of external otitis of dogs from Rio Grande Do Sul State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2001, vol. 32, no. 3, s. 245-249. ISSN 1517-8382.
- NUNES, B. M.; HAMDAN, J. S. *Prevalência de Malassezia pachydermatis no conduto auditivo externo de cães sadios*. XXIII Congresso de Microbiologia, Santos, 1995, s.132
- OLIVEIRA, L. C. a kol. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *The Canadian Veterinary Journal*. 2008, vol. 49, no. 8, s. 785-788. ISSN 0008-5286.
- OLIVEIRA, L. C. a kol. Susceptibilidade a antimicrobianos isoladas de otite externa em caes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2005, vol. 57, no. 3, s. 405-408. ISSN 0102-0935.

PEDERSEN, K.; WEGENER, H. C. Antimicrobial susceptibility and rRNA gene restriction patterns among *Staphylococcus intermedius* from healthy dogs and from dogs suffering from pyoderma or otitis externa. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1995, vol. 36, no. 3, s. 335-342. ISSN 1751-0147.

PETROV, V.; MIHAYLOV, G. *Malassezia pachydermatis*: Etiology and clinical findings in canine external otitis: Therapeutic approaches. *Trakia Journal of Sciences*. 2008, vol. 6, no. 1, s. 123-126. ISSN 1313-3551.

PLIVA-Lachema a.s. *Identifikační program TNW verze 6.0*. 2000.

PLIVA-Lachema a.s., Brno. *ENTEROtest 24*. 2008. 4 s.

PLIVA-Lachema a.s., Brno. *NEFERMtest 24*. 2008. 4 s.

PLIVA-Lachema a.s., Brno. *NEISSERIAtest*. 2008. 4 s.

PLIVA-Lachema a.s., Brno. *STAFYtest 16*. 2008. 4 s.

PLIVA-Lachema a.s., Brno. *STREPTOtest 16*. 2008. 4 s.

RINCÓN, S.; CEPERO, M. C.; ESPINEL, A. A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of six *Malassezia* species to Voriconazole, Itraconazole, and Ketoconazole. *Journal of clinical Microbiology*. 2006, vol. 44, no. 9, s. 3429-3421. ISSN 1098-660X.

RYCROFT, A. K.; SABEN, H. S. A. Clinical study of otitis externa in the dog. *The Canadian Veterinary Journal*. 1977, vol. 18, no. 3, s. 64-70. ISSN 0008-5286.

SARIERLER M., KIRKAN, S. Microbiological diagnosis and therapy of canine otitis externa. *Veteriner Cerrahi Dergisi*. 2004, vol. 10, no. 3-4, s. 11-15. ISSN 1300-7106.

SHARMA, V. D.; RHODES, H. E. The occurrence and microbiology of otitis externa in the dog. *The Journal of Small Animal Practice*. 1975, vol. 16, no. 1-12, s. 341-247. ISSN 0022-4510.

SILVA, N. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus* spp. isolated from canine chronic otitis externa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2001, vol. 53, no. 2. ISSN 0102-0935.

SIMMONS, R. B.; GUÉHO, E. A new species of *Malassezia*. *Mycological research*. 1990, vol. 94, s. 1146-1149. ISSN 0953-7562.

SUGITA, S.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M.; SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISNIKAWA, A. A New yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with saborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiology and Immunology*. 2004, vol. 48, no. 8, s. 579-583. ISSN 1348-0421.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002, vol. 40, no. 4, s. 1363-1367. ISSN 1098-660X

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODANA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, vol. 41, no. 10, s. 4695-4699. ISSN 1098-660X.

TAKEO, K.; NAKAI, E. Mode of cell growth of *Malassezia (Pityrosporum)* as revealed by using plasma membrane configurations as natural markers. *Canadian Journal of Microbiology*. 1986, vol. 32, no. 5, s. 389-94. ISSN 1480-3275.

TEJEDOR, M. T.; MARTÍN, J. L.; NAVIA, M.; FREIXES, J.; VILA, J. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. *Veterinary Microbiology*. 2003, vol. 94, no. 4, s. 295-301. ISSN 0378-1135.

TÜRKYILMAZ, S. Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs with otitis externa. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*. 2008, vol. 32, no. 1, s. 37-42. ISSN 1528-3593.

VOTAVA, M. a kol: *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno, Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.

WHITE, P. D. Medical management of chronic otitis in dogs. *Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian*. 1999, vol. 21, no. 8, s. 716-227. ISSN 01931903.

WHITE, Stephen. Medical treatment of otitis externa. In *World Small Veterinary Association World Congress 2001* [on-line]. Vancouver, 2001. [citace 2008-11-12]. Dostupný z [www:http:// www.vin.com/VINDBPub/SearchPB/Proceedings/PR05000/PR00096.htm](http://www.vin.com/VINDBPub/SearchPB/Proceedings/PR05000/PR00096.htm).

WINIARCZYK, S. The ultrastructure of *Pityrosporum pachydermatis*. *Archivum veterinarium Polonicum/Polish Academy of Sciences, Committee of Veterinary Sciences*. 1992, vol. 32, no. 3-4, s. 5-13. ISSN 1230-5359.

WOODGYER, A. *Malassezia* update. *The official newsletter of the Australian federation of medical veterinary mycology*. 2004, vol. 9, no. 1, s. 12-18. ISSN 1170-7062

YAMASHITA, K. a kol. Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2005, vol. 67, no. 3, s. 263-268. ISSN 1347-7439.



YOSHIDA, N.; NAITO, F.; FUKATA, T. Studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2002, vol. 64, no. 12, s. 1145-1147. ISSN 1347-7439.