



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Vyšetření citlivosti/rezistence
anaerobních bakterií k
antimikrobiálním
látkám stanovením minimálních
inhibičních koncentrací**

**MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Tomáš Krejčí**

Certifikovaná metodika č. 92

**Vyšetření citlivosti/rezistence anaerobních bakterií k antimikrobiálním látkám
stanovením minimálních inhibičních koncentrací**

Autoři:

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova
296/70, Brno

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova
296/70, Brno

MVDr. Tomáš Krejčí, LabMediaServis, s.r.o., Vítězná 92, 544 01 Huntířov

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky: SVS/2018/036997-G

Vydalo: Státní veterinární správa, Praha, 29. 3. 2018

**Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Národní agentury pro
zemědělský výzkum (QJ1510218), Národního programu udržitelnosti NPU-I (LO1218) a
projektu Ministerstva zemědělství ČR RO0517.**

ISBN 978-80-88233-30-5

Obsah:

I)	Cíl metodiky	3
II)	Vlastní popis metodiky	4
IIa)	Odběr vzorků k bakteriologickému vyšetření, transport vzorků do laboratoře	7
IIb)	Laboratorní zpracování vzorků, izolace a identifikace původce onemocnění	8
IIc)	Stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek	9
IId)	Interpretace výsledků	12
III)	Srovnání „novosti postupů“	13
IV)	Popis uplatnění certifikované metodiky	15
V)	Ekonomické aspekty	16
VI)	Seznam použité literatury	17
VII)	Seznam publikací, které předcházely metodice/Výstupy z originální práce	18

I) Cíl metodiky

Cílem vypracování certifikované metodiky je zavedení standardní metodiky stanovení kvantitativní úrovně citlivosti anaerobních mikroorganismů k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) do široké veterinární laboratorní praxe. Ve veterinárních laboratořích je v současné době většinou rutinně používána jednoduchá kvalitativní disková difúzní metoda, která není vhodná pro stanovení citlivosti/rezistence k antimikrobiálním látkám u anaerobních mikroorganismů, pro které mají laboratoře k dispozici pouze finančně náročné komerční E-testy nebo je možné MIC stanovit agarovým difúzním testem, jehož rutinní provádění s více vzorky najednou není technicky většinou možné.

Pro splnění cíle metodiky byly vyvinuty a následně jsou vyráběny sety pro stanovení MIC u anaerobních bakterií mikrodiluční metodou, které mohou výrazně zvýšit úroveň veterinární diagnostiky bakteriálních rezistencí u terapeuticky používaných antimikrobik k léčbě infekcí zvířat, které tyto bakterie způsobují. Zastoupení antimikrobiálních látek v setech je voleno tak, aby odpovídalo látkám, které se běžně používají především u klostridiových infekcí u selat. Údaje o stavu a vývoji rezistence bakteriálních původců infekcí jsou nezbytné pro predikci účinnosti antimikrobiálních látek v úvodní antibiotické léčbě a v určení pozice jednotlivých látek jako léků volby a léků alternativních v terapii infekcí. Jsou proto ve veterinární praxi rozhodujícím podkladem pro vytváření objektivních a na farmaceutickém průmyslu nezávislých doporučených postupů pro antibiotickou léčbu zvířat.

II) Vlastní popis metodiky

Předkládaná metodika představuje komplexní postup pro stanovení citlivostí/rezistencí bakteriálních původců mastitid od odběru vzorků k bakteriologickému vyšetření až po interpretaci výsledků. Stanovení MIC antimikrobiálních látek k anaerobním patogenům bude ve veterinární oblasti výrazným přínosem zejména zavedením zlatého standardu, tj. mikrodiluční metody pro testování a hodnocení citlivosti u veterinárních patogenů především z důvodů získání vyšší úrovně dosažených výsledků, které bude možné použít k vyhodnocení šíření rezistencí v bakteriálních populacích.

Hodnoty MIC jednotlivých antimikrobiálních látek anaerobních bakteriálních izolátů budou stanovovány zcela v souladu se standardizovanými metodikami Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012a,b; 2013a,b) a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017) pomocí originálních setů se speciálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek, který umožňuje testování rezistencí především veterinárních antimikrobik nebo zástupce některých skupin antimikrobik užívaných k léčbě kostridiových infekcí prasat a jejichž lékové formy jsou v ČR registrovány nebo je jejich testování vhodné z hlediska sledování možností léčby infekcí způsobených klostridiemi u lidí, především sledování rezistencí klostridií izolovaných ze zvířat ve vztahu k možnosti přenosu rezistentních kmenů mezi lidmi a zvířaty. Na mikrotitrační destičce s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H) jsou ve sloupcích dvojkové ředící řady dvanácti navržených antimikrobiálních látek v objemu 200 µl, u jedenácti antimikrobiálních látek (sloupce 1-11) je na destičce 8 ředění (řádky A-H) a u jedné antimikrobiální látky (sloupec 12) je 7 ředění (řádky B-H) a v řádku A je jamka s 200 µl média bez antimikrobiální látky sloužící jako pozitivní kontrola růstu testovaných bakterií. Počáteční koncentrace jednotlivých

antimikrobiálních látek na destičce jsou rozdílné a jsou voleny tak, aby hodnoty MIC vyšetřovaných bakterií zahrnovaly rozmezí breakpointů citlivosti/rezistence podle závazných mezinárodních metodik CLSI a EUCAST rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů povinně testovaných v rámci kontroly kvality (Tab. 1).

Tab. 1: Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u anaerobních bakterií

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	PNC	EFT	VAN	CLI	MER	TIG	ENR	TIA	TYL	FFC	SXT
16	16	128	16	32	64	64	32	64	128	32	PKR
8	8	64	8	16	32	32	16	32	64	16	32
4	4	32	4	8	16	16	8	16	32	8	16
2	2	16	2	4	8	8	4	8	16	4	8
1	1	8	1	2	4	4	2	4	8	2	4
0,5	0,5	4	0,5	1	2	2	1	2	4	1	2
0,25	0,25	2	0,25	0,5	1	1	0,5	1	2	0,5	1
0,125	0,125	1	0,125	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,25	0,5

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l.

SXT – koncentrace trimethoprim/sulfamethoxazol je 1/19; koncentrace uvedená v tabulce se vztahuje k trimethoprimu.

AMP	ampicilín
PNC	penicilin
EFT	ceftiofur
VAN	vankomycin
CLI	klindamycin
MER	meropenem
TIG	tigecyklin
ENR	enrofloxacin
TIA	tiamulin
TYL	tylosin
FFC	florfenikol
SXT	trimethopri/sulfamethoxazol 1/19

Sety musí být skladovány zamrazené při teplotě – 80 °C. Po rozmrazení a temperování setu na kultivační teplotu je nutné provést inokulaci destičky do 1hodiny. Rozmrazené sety se nesmí opětovně zamrazit (riziko degradace antimikrobiálních látek). Při skladování setů v -80 °C je doba expirace 6 měsíců ode dne výroby.

Kontrola kvality setů do doby expirace je na pracovišti výrobce setů prováděna pravidelným týdenním testováním kontrolního kmene *Clostridium difficile* ATCC 700057, který je přesně definován a hodnoty MIC k některým antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI a EUCAST. Stanovené hodnoty MIC jednotlivých antimikrobik musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC referenčních kmenů dle CLSI a EUCAST.

Stanovené rozmezí hodnot MIC kontrolního kmene *C. difficile* (mg/l) je vyznačeno v tabulce (Tab. 2) šedou barvou. Pokud u některých antimikrobiálních látek není pro některý z kontrolních kmenů vyznačeno šedé rozmezí hodnot MIC, nejsou v současné době ještě stanoveny hodnoty MIC kontrolního kmene k těmto antimikrobikům.

Tab. 2: Rozmezí MIC u kmene *Clostridium difficile* ATCC 700057

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	PNC	EFT	VAN	CLI	MER	TIG	ENR	TIA	TIL	FFC	SXT
16	16	128	16	32	64	64	32	64	128	32	PKR
8	8	64	8	16	32	32	16	32	64	16	32
4	4	32	4	8	16	16	8	16	32	8	16
2	2	16	2	4	8	8	4	8	16	4	8
1	1	8	1	2	4	4	2	4	8	2	4
0,5	0,5	4	0,5	1	2	2	1	2	4	1	2
0,25	0,25	2	0,25	0,5	1	1	0,5	1	2	0,5	1
0,125	0,125	1	0,125	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,25	0,5
						≤			≤		

IIa) Odběr vzorků k bakteriologickému vyšetření a transport vzorků do laboratoře

K vyšetření je nutný čerstvý a řádně odebraný vzorek mléka. Může být odebrán trus individuální nebo skupinový vzorek trusu, část podvázaného tenkého nebo tlustého střeva nebo obsah střeva zvířete. Tyto vzorky je třeba uchovat v chladu v nepropustném obalu a dopravit je co nejdříve do laboratoře. Další možnost je provedení rektálního výtěru nemocných zvířat tamponem uchovaným ve vhodném transportním médiu (např. Amies transportní medium s aktivním uhlím), odebrané výtěry udržet od odběru po celou dobu transportu do laboratoře v rozmezí teplot 5 – 20⁰ C. Transport vzorku by neměl trvat déle než do 24 hodin.

IIb) Laboratorní zpracování vzorků, izolace a identifikace původce onemocnění

V diagnostické laboratoři se provádí z odebraných vzorků trusu kultivační vyšetření obvyklým způsobem na neselektivním agarovém médiu vhodném pro kultivaci anaerobních bakterií, např. Schaedlerův agar. Inkubace probíhá při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 24 hodin v anaerobní atmosféře (dobu inkubace může být podle potřeby prodloužena – např. pro kultivaci *C. difficile* i na 3 – 7 dní). Pokud zpracováváme rektální výtěry, vložíme tampon do zkumavky s 0,9 ml BHI (brain heart infusion). Po vytřepání tamponu přeneseme ze zkumavky 0,1 ml vzniklé suspenze do další mikrozkušavky s 0,9 ml BHI. Obsah zkumavky se zakápně 4 kapkami parafrinového oleje a takto ošetřené vzorky ve zkumavkách se inkubují při 37 °C v termostatu aerobně po dobu minimálně 24 hodin (dobu inkubace může být podle potřeby prodloužena – např. pro kultivaci *C. difficile* i na 3 – 7 dní). Následná izolace původce z primokultivací se provádí na selektivních i neselektivních agarových médiích (Schaedlerův agar, *Clostridium perfringens* agar, *Clostridium difficile* agar apod.). Po izolaci původce onemocnění je vždy nutná jeho přesná identifikace (prováděná např. pomocí MALDI TOF, biochemickými, molekulárně diagnostickými a jinými povinnými nebo doporučenými testy).

IIc) Stanovení minimální inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek

Stanovení MIC u růstově nenáročných izolátů se provádí na destičkách s Brucella broth médiem s lyzovanou koňskou krví obohaceným heminem a vitamínem K₁, ve kterém jsou naředěny jednotlivé antimikrobiální látky.

1.1. Příprava inokula

Bakteriologickou kličkou se odebere 3 – 5 bakteriálních kolonií kultivovaných na neselektivním agarovém médiu (inkubovaných při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 48 hodin v anaerobní atmosféře do sterilního bujónu nebo fyziologického roztoku. Denzita suspenze se bujónem nebo fyziologickým roztokem upraví na zákal 2 McFarlanda, který odpovídá denzitě $1,6 \times 10^8$ CFU pro *C. difficile* ATCC 700057) se dále naředí na finální koncentraci inokula v jamce mikrotitrační desky.

Příklad postupu:

1 ml inokula o denzitě 1,5 MCFarlanda se naředí 9 ml sterilního fyziologického roztoku (odpovídá $1,6 \times 10^7$ CFU pro *C. difficile* ATCC 700057), po přenesení 5 µl takto naředěného inokula do jamky mikrotitrační desky s obsahem 100 µl bujónu je dosažena finální koncentrace inokula v jamce $1,6 \times 10^5$ CFU.

Poznámka: Příprava inokula musí být provedena co nejrychleji, v průběhu několika minut. Pokud připravujeme k inokulaci více kmenů, musí se již připravené inokulum uchovávat před naočkováním na destičku v anaerobním prostředí.

1.2. Naočkování mikrotitračních destiček

Rozmražené mikrotitrační destičky se musí naočkovat do 15 minut po standardizaci suspenze inokula. Do každé jamky destičky obsahující 200 μ l zředěné antimikrobiální látky v bujónu se přidá maximálně 10 μ l suspenze zředěného inokula.

Okamžitě po naočkování se ověří skutečná denzita inokula tak, že z jamky pozitivní kontroly růstu se odebere 10 μ l bakteriální suspenze, která se následně zředí v 10 ml bujónu nebo fyziologickém roztoku. Z tohoto ředění se přenese 100 μ l kultury na vhodnou agarovou půdu, která se inkubuje přes noc. Zkouška se považuje za vyhovující, pokud na agarové půdě vyrostou 10 - 50 kolonií.

Ověření bakteriální čistoty: Z jamky bez antimikrobiální látky (pozice 12A na destičce) se odebere 2 x 100 μ l, které se kultivují na dvou plotnách s neselektivním agarovým médiem, jedna při 34 – 37 °C po dobu 18 – 24 hodin aerobně a druhá 72 hodin v anaerobním prostředí.

Před inkubací se mikrotitrační destičky uzavrou těsnícím víčkem nebo lepící fólií.

1.3. Inkubace mikrotitračních destiček

Naočkované destičky musí být vloženy do inkubátoru do 15 minut po inokulaci. Destičky se inkubují v anaerobním prostředí při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 72 hodin.

1.4. Kontrola kvality výsledků

Kvalita výsledků stanovení MIC vyšetřovaných kmenů se kontroluje paralelně s testováním mikroorganismem stanovením MIC antimikrobiálních látek u referenčního kmene *C. difficile*

ATCC 700057 stejným způsobem a za stejných podmínek, jak je prováděna pravidelná kontrola kvality vyrobených setů (viz bod. I).

1.5. Odečítání výsledků

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

IId) Interpretace výsledků

Interpretace výsledků do kategorií citlivosti vyžaduje použití tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek (EUCAST, CLSI). Vyšetřovaný kmen bakterie lze kategorizovat za předpokladu, že příslušné breakpointy jsou použity v definovaném fenotypovém systému, to znamená, že níže uvedené breakpointy platí pouze pro anaerobní bakterie. Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé (s MIC v hodnotách označených zeleně), intermediální (s MIC v hodnotách označených modře) a rezistentní (Tab. 3). U antimikrobik, kde nejsou koncentrace barevně rozděleny, nejsou breakpointy pro anaerobní bakterie stanoveny a účinnost antimikrobiální látky lze posoudit pouze individuálně podle hodnoty MIC.

Tab. 3: Breakpointy antimikrobiálních látek pro anaerobní bakterie

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	PNC	EFT	VAN	CLI	MER	TIG	ENR	TIA	TYL	FFC	SXT
16	16	128	16	32	64	64	32	64	128	32	PKR
8	8	64	8	16	32	32	16	32	64	16	32
4	4	32	4	8	16	16	8	16	32	8	16
2	2	16	2	4	8	8	4	8	16	4	8
1	1	8	1	2	4	4	2	4	8	2	4
0,5	0,5	4	0,5	1	2	2	1	2	4	1	2
0,25	0,25	2	0,25	0,5	1	1	0,5	1	2	0,5	1
0,125	0,125	1	0,125	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,25	0,5

III) Srovnání „novosti postupů“

Set ke stanovení MIC anaerobních obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k veterinárně specifickým antimikrobiálním látkám, které jsou užívány k léčbě onemocnění způsobených zvířat klostridiemi nebo jinými anaerobními bakteriemi a jejichž léčivé formy jsou v ČR registrovány nebo je jejich testování vhodné z hlediska sledování možností léčby infekcí způsobených klostridiemi u lidí. V současné době jsou k testování rezistencí anaerobních bakterií ve veterinární i v humánní medicíně k dispozici e-testy nebo je podle metodik možné testování anaerobních bakterií (kromě skupiny *Bacillus fragilis*) agarovým difúzním testem. Použití mikrodiluční metody, která je buď finančně (e-testy) nebo technicky (agarová difúzní metoda) mnohem výhodnější a vhodnější pro rutinní použití v diagnostických laboratořích, zatím není doporučována jako diagnostický standard, především proto, že dosud nebyly stanoveny harmonizované postupy pro tuto metodu u anaerobních bakterií. V rámci testování přesnosti stanovení MIC u anaerobních bakterií mikrodiluční metodou podle předkládané metodiky bylo potvrzeno, že podle specifity a stability byly získané výsledky touto metodou zcela srovnatelné s výsledky stanovení MIC u anaerobních bakterií rodu *Clostridium* spp. paralelním vyšetřováním testovaných kmenů pomocí komerčně vyráběných e-testů i s výsledky dosaženými stanovením MIC kmenů agarovou difúzní metodou. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí anaerobních bakterií k antimikrobikům reaguje na aktuální potřebu veterinárních diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, jiným metodám stanovení MIC u anaerobních bakteriálních patogenů konkurovat kvalitou provedení, originalitou a především cenovou dostupností.

Metody vyšetření citlivosti/rezistence anaerobních patogenů k antimikrobiálním látkám a v neposlední řadě také interpretace zjištěných výsledků nejsou v současné době jednotné a neposkytují proto relevantní výsledky pro klinickou veterinární praxi. V předkládané metodice je navrženo komplexní harmonizované řešení metod vzorkování, vyšetření a interpretace výsledků rezistence/citlivosti bakteriálních původců mastitid s významem pro humánní i veterinární oblast. Realizací těchto metod bude dosažena potřebná úroveň výsledků ke sledování a vyhodnocení šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám v bakteriálních populacích.

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro veterinární diagnostické laboratoře - certifikovaná veterinární antibiotická střediska, veterinární nebo výzkumné laboratoře, Státní veterinární ústavy a soukromé veterinární laboratoře. Je možné její uplatnění v systému celonárodního monitoringu citlivosti/rezistence vybraných veterinárních patogenů k antimikrobiálním látkám vyhodnoceného na základě harmonizovaných standardních postupů. V konečném důsledku se uplatnění metodiky projeví ve zkvalitnění terapie infekčních onemocnění zvířat způsobených anaerobními bakteriálními patogeny vhodnou volbou léčiv.

V. Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou minimální (0 – 5 tis. Kč), protože jejich provedení nevyžaduje žádné speciální přístrojové vybavení bakteriologické laboratoře, je možné s využitím běžných přístrojů a pomůcek (termostat, anaerostat, pipety) a spotřebního materiálu.

Ekonomický přínos pro laboratoře bude představovat zisk z provedených vyšetření. Za předpokladu vyšetření v jedné laboratoři cca 500 vzorků ročně při ceně za jedno vyšetření kolem 500,- Kč, by se zisk 20 % z tržeb mohl pohybovat kolem 50 tis. pro jednu laboratoř.

V konečném důsledku budou uživatelé výsledků vyšetření chovatelé hospodářských zvířat, kterým se sníží zlepšením diagnostiky ekonomické náklady na léčbu a prevenci onemocnění a zvýší se tržby za prodej zdravotně nezávadných kvalitních potravin a surovin živočišného původu.

VI. Seznam použité a související literatury

CLSI, 2012a. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Eighth Edition. M11-A8, vol. 32, No. 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2012: 39 pp.

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

CLSI, 2013a. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. Vet 01-A4, vol. 33, No. 7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2013: 73 pp.

CLSI, 2013b. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. Vet 01-S2, vol. 33, No 8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2013: 63 pp.

CLSI 2016: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M 100, 26th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2016: 251 pp.

EUCAST - Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Version 5.13. [Database online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [cit. 2017-12-07]. available in www: <<http://217.70.33.99/Eucast2/>>

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

Nedbalcova, K., Kucerova, Z.: Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* isolates associated with porcine pneumonia. *Acta Veterinaria Brno*, 2013, 82(1), 3-7.

Dedikace: *This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant numbers QH 71051, QH 71053 and MZE 0002716202) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant number ED0006/01/01 AdmireVet).*

Nedbalcova, K., Nechvatalova, K., Pokludova, L., Bures, J., Kucerova, Z., Koutecka, L., Hera, A.: Resistance to selected beta-lactam antibiotics. *Veterinary Microbiology*, 2014, 171(3-4), 328-336.

Dedikace: *This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant numbers QJ 1210119 and MZE 0002716202) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant number ED0006/01/01 AdmireVet).*

Nedbalcova, K., Nechvatalova, K., Kucerova, Z.: Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and mutant prevention concentration (MPC) of selected antimicrobials in bovine and swine *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* isolates. *Acta Vet Brno*, 2015, 84(2), 83-89.

Dedikace: *This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant number QJ1210119) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant number LO1218). The results of the project LO1218 were obtained with a financial support from the MEYS of the CR under the NPU I program.*

Nedbalcova, K., Zouharova, M., Sperling, D.: The determination of minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobials for porcine *Haemophilus parasuis* isolates from the Czech Republic. Acta Vet. Brno 2017, 86: 175-181

Dedikace: *This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant number QJ1210119) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant number LO1218). The results of the project LO1218 were obtained with a financial support from the MEYS of the CR under the NPU I program.*

Nedbalcova, K., Kucharovičová, I., Černý, T., Pokludová, L., Bureš, J., Hera, A., Šatrán, P.: Sledování rezistencí k antimikrobikům u veterinárně významných patogenů. Veterinářství, 2015, 65(3), 206-211.

Dedikace: *Rukopis byl vypracován v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu Ministerstva zemědělství ČR (číslo grantu QJ1210119), za finanční podpory Ministerstva zemědělství prostřednictvím Státní veterinární správy ČR a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.*

Nedbalcová, K., Pokludová, L., Bureš, J., Krejčí, T., Hera, A.: Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních patogenů prasat k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací. Certifikovaná metodika 45/2014, ISBN 978-80-86895-51-2, VÚVeL Brno, 2015.
Číslo osvědčení: SVS/2015/025687

Dedikace: *Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.*

Nedbalcová, K., Pokludová, L., Bureš, J., Krejčí, T., Hera, A.: Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních patogenů skotu k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací. Certifikovaná metodika č. 46/2014, ISBN 978-80-86895-52-9, VÚVeL Brno, 2015. Číslo osvědčení: SVS/2015/025859

Dedikace: *Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.*

Nedbalcová, K., Zouharová, M., Pokludová, L., Bureš, J., Krejčí, T., Hera, A.: Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních patogenů drůbeže k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací. Certifikovaná metodika č. 71/2015, ISBN 978-80-86895-79-6, VÚVeL Brno 2015. Číslo osvědčení: SVS/2016/006578-G

Dedikace: *Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.*

Nedbalcová, K., Zouharová, M., Pokludová, L., Bureš, J., Krejčí, T., Hera, A.: Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních původců mastitid k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací. Certifikovaná metodika č. 74/2016, ISBN 978-80-86895-87-1, VÚVeL Brno 2016. Číslo osvědčení: SVS/2017/001199-G

Dedikace: *Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství,*

mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.

Nedbalcová, K., Zouharová, M., Pokludová, L., Bureš, J., Krejčí, T., Hera, A.: Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních patogenů psů a koček k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací. Certifikovaná metodika č. 75/2016, ISBN 978-80-86895-88-8, VÚVeL Brno 2016. Číslo osvědčení: SVS/2017/001251-G

Dedikace: *Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.*

Nedbalcová, K., Zouharová, M., Pokludová, L., Bureš, J., Krejčí, T., Hera, A.: Metodika testování citlivosti/rezistence na antimikrobiální látky pro vybrané cílové bakteriální patogeny pocházející z definovaných onemocnění zvířat a doporučené postupy antimikrobiální léčby. Certifikovaná metodika č. 76/2016, ISBN 978-80-86895-89-5, VÚVeL Brno 2016. Číslo osvědčení: SVS/2017/008283-G.

Dedikace: *Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.*

Oponenti:

MVDr. Milada Dubská – Státní veterinární správa ČR, Praha

Ing. Petr Sláma, Ph.D. – Mendelova univerzita v Brně



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz