Certifikovaná metodika 5826/2025

In vitro stanovení antibakteriální účinnosti herbálních extraktů používaných při léčbě mastitid v chovech mléčného skotu

Autoři

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.

Certifikovaná metodika byla vytvořena v rámci projektu projektu TAČR projektu NCK NACEBIVET TN02000017.

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

2025

OBSAH

1. Cíl metodiky
2. Vlastní popis metodiky
   - 2.1 Úvod a současný stav problematiky
     - 2.1.1 Mastitidy
     - 2.1.2 Etiologie a patogeneze mastitid
     - 2.1.3 Potřeba standardizace metod
     - 2.1.4 Mechanismy účinku herbálních extraktů
   - 2.2 Herbální extrakty a jejich charakteristika
     - 2.2.1 Vodní extrakty
     - 2.2.2 Alkoholové extrakty
     - 2.2.3 Olejové extrakty
       - 2.2.3.1 Stanovení poměru testovaného olejového extraktu a emulgátoru
   - 2.3 Popis metod a provedení testování
   - 2.4 Kvalitativní metody stanovení antibakteriální účinnosti
     - 2.4.1 Disková difúzní metoda
     - 2.4.2 Jamková metoda
     - 2.4.3 Indikátorové metody
   - 2.5 Kvantitativní metody stanovení antibakteriální účinnosti
     - 2.5.1 Mikrodiluční testy v tekutém médiu
     - 2.5.2 Agarová diluční metoda
     - 2.5.3 Stanovení FIC indexu
   - 2.6 Validace použitých metod
   - 2.7 Vyhodnocení a interpretace výsledků
     - 2.7.1 Porovnání kvalitativních a kvantitativních dat
3. Srovnání novosti postupů
4. Popis uplatnění metodiky
5. Ekonomické aspekty
   - 5.1 Snížení nákladů na léčbu mastitid
   - 5.2 Zvýšení efektivity laboratorní diagnostiky a výzkumu
   - 5.3 Podpora domácí výroby a inovací
   - 5.4 Dlouhodobé přínosy a udržitelnost
6. Seznam použité literatury

1. Cíl metodik

Rostoucí výskyt bakteriálních populací rezistentních k běžně používaným antibiotikům představuje závažný celosvětový problém, který významně komplikuje účinnost standardní antibiotické léčby. V důsledku toho se stále intenzivněji hledají alternativní přístupy k potlačení mikrobiálních infekcí, mezi nimiž zaujímají významné místo přírodní látky, mezi které patří i rostlinné extrakty s prokázanými antimikrobiálními vlastnostmi. Tyto extrakty často obsahují komplexní směsi bioaktivních sloučenin, které mohou působit synergicky a nabízet potenciální doplnění či náhradu konvenční terapie. Aby bylo možné jejich účinnost objektivně posoudit a porovnávat, je nezbytné využívat harmonizované a standardizované a reprodukovatelné metodické postupy pro hodnocení antimikrobiální aktivity. Metodika se proto věnuje testování těchto extraktů a poskytuje přehled doporučených postupů k jejich experimentálnímu posouzení z hlediska antimikrobiální účinnosti. Mastitidy představují jedno z nejčastějších a ekonomicky nejzávažnějších onemocnění mléčné žlázy hospodářských zvířat. V chovech dojnic a malých přežvýkavců je výskyt mastitid dlouhodobě spojen se snížením užitkovosti, zvýšenými náklady na léčbu a zhoršením welfare zvířat. Většinou jsou tyto infekce bakteriálního původu.

Hlavním cílem této metodiky je vytvořit standardizovaný a validovaný postup pro stanovení antibakteriální účinnosti herbálních extraktů, který bude použitelný v podmínkách státních veterinárních ústavů, výzkumných institucí a akreditovaných veterinárních laboratoří. Rostlinné extrakty jsou složité směsi, u nichž může účinnost významně kolísat v závislosti na:

- botanickém původu rostliny,
- době sklizně, sušení a skladování,
- použitém extrakčním postupu a rozpouštědle,
- a koncentraci aktivních složek.

Z těchto důvodů je nezbytné, aby metody hodnocení antibakteriální účinnosti byly přesně definované, opakovatelné a porovnatelné mezi laboratořemi. Metodika proto obsahuje jak kvalitativní, tak kvantitativní přístupy a popisuje validaci, která zaručuje spolehlivost výsledků.

Metodika definuje všechny kroky od volby vhodné metody testování až po validaci výsledků a jejich interpretaci. Umožňuje porovnání účinnosti různých extraktů a poskytuje podklad pro vývoj nových přípravků určených k podpůrné léčbě mastitid. Z metodického hlediska dokument klade důraz na:

- reprodukovatelnost a standardizaci výsledků napříč laboratořemi,
- vhodnost metod i pro různé typy extraktů (vodné, alkoholové, olejové),
- propojení mikrobiologických a chemicko-analytických přístupů,
- a vytvoření základního rámce pro následnou registraci přípravků rostlinného původu.

Metodika je navržena v souladu s principy Good Laboratory Practice (GLP), přičemž reflektuje mezinárodní normy pro hodnocení antimikrobiální aktivity Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Europen Committee on Antimicrobial EUCAST). Metodiky bylo třeba modifikovat, protože je třeba si uvědomit, že přírodní látky, jako jsou herbální extrakty, mají mnohem menší antimikrobiální účinnost než antibiotika. Metodika tak přispívá k rozšíření nástrojů veterinární diagnostiky a k posílení racionálního používání antibiotik prostřednictvím alternativních, vědecky ověřených přístupů.

Pro vypracování metodiky byla testována a vyhodnocována možnost využití různých modifikovaných metod, vycházejících z metodik pro stanovování citlivosti/rezistence bakteriálních populací k antibiotikům. Vzhledem k tomu, že jsou v různých přípravcích používány různé formy rostlinných extraktů, jako např. vodný roztok, roztok v různých dalších rozpouštědlech nebo olejová emulze, není možné použití jedné standardizované metody. Účinnost extraktů byla vyhodnocována podle jejich účinků na různé druhy bakterií, patogeny hospodářských zvířat, zejména původce mastitid u dojnic, protože metodika byla vypracována především za účelem možnosti vývoje a posouzení účinnosti veterinárního přípravku obsahujícího herbální extrakty právě pro léčbu mastitid v chovech mléčného skotu. Údaje o antibakteriální účinnosti léčebných přípravků jsou vždy nezbytné pro predikci vhodnosti terapie bakteriálních infekcí. Jsou rozhodujícím podkladem pro vytváření objektivních a na farmaceutickém průmyslu nezávislých doporučených postupů pro alternativy k antibiotické léčbě.

2. Vlastní popis metodik

2.1 Úvod a současný stav problematiky

Antibiotika jsou v současnosti lékem volby v terapii bakteriálních infekcí ve veterinární medicíně. Hlavními důvody pro použití antibiotik v chovech mléčného skotu jsou mastitidy dojnic. Jeden z velmi závažných vedlejších dopadů léčby antibiotiky je riziko vzniku rezistence k nim. Jakékoliv použití antibiotik, i když u některých účinných látek ve vyšší a u jiných v nižší míře, vyvolává selekční tlak na rozvoj a šíření rezistencí k antibiotikům v bakteriálních populacích. Z těchto důvodů je aktuální otázka doplnění antibiotické léčby nebo dokonce její úplná náhrada jinými účinnými látkami s antibakteriálními účinky, nejlépe přírodního původu. V současnosti se část vývoje alternativních léčiv k antibiotikům orientuje na různé účinné složky extraktů léčivých bylin. Metodika a její zavedení umožní harmonizaci testování antibakteriálního účinku herbálních látek a tím přispěje k dosažení rámcových cílů Akčního plánu - tlumení rezistence k antibiotikům, konkrétně předpokladem omezení používání antibiotik ve veterinární medicíně v důsledku používání účinných

alternativ léčby. Z hlediska léčby je dalším problémem schopnost některých patogenů vytvářet biofilm, který také výrazně snižuje účinnost antibiotik. I tato skutečnost je důvodem, proč se hledají alternativní látky, které dokážou narušit integritu biofilmu nebo působit na mikroorganismy jiným mechanismem než klasická antibiotika.

2.1.1 Mastitidy

Mastitida je zánět mléčné žlázy způsobený nejčastěji bakteriální infekcí, který představuje jedno z nejvýznamnějších onemocnění v chovech dojnic. Onemocnění může probíhat jak ve formě klinické, charakterizované zjevnými změnami na mléčné žláze a ve vzhledu mléka, tak i ve formě subklinické, jež se projevuje pouze laboratorními ukazateli, zejména zvýšeným počtem somatických buněk. Mastitida negativně ovlivňuje kvalitu mléka, a to nejen zvýšením obsahu somatických buněk, ale také poklesem koncentrace bílkovin, tuku a laktózy, což vede ke snížení jeho nutriční hodnoty. Současně dochází ke zhoršení celkového zdravotního stavu zvířete, poklesu užitkovosti a zvýšené náchylnosti k dalším onemocněním v důsledku stresu a zátěže organismu. Ekonomické ztráty spojené s mastitidami zahrnují nejen přímé náklady na léčbu a veterinární zásahy, ale také sekundární ztráty spojené s brakací dojnic, snížením mléčné produkce, prodloužením mezidobí a zhoršením reprodukčních ukazatelů. Mastitidy představují dlouhodobě zásadní problém jak v České republice, tak i v zahraničí, kde se opakovaně řadí mezi nejčastější příčiny ekonomických ztrát v mléčných produkčních systémech. Jejich komplexní dopad na produktivitu, welfare zvířat a rentabilitu chovu podtrhuje potřebu efektivní prevence, včasné diagnostiky a racionálních způsobů léčby tohoto onemocnění.

2.1.2 Etiologie a patogeneze mastitid

Etiologie mastitid je velmi různorodá a zahrnuje široké spektrum mikroorganismů s odlišnými vlastnostmi, způsobem šíření i patogenetickými mechanismy. Mezi nejvýznamnější bakteriální původce mastitid patří zejména:

- *Staphylococcus aureus* – patogen typický pro chronické a opakující se mastitidy, který se vyznačuje schopností invadovat tkáň mléčné žlázy, přežívat intracelulárně a vytvářet biofilm, čímž se výrazně snižuje účinnost antibiotické léčby. Infekce jím vyvolané mají často dlouhodobý, perzistentní charakter, mohou probíhat subklinicky a bývají spojeny s výraznými produkčními ztrátami.
- *Streptococcus uberis* – významný environmentální patogen, který se vyskytuje především v podestýlce, na kůži zvířat a v prostředí stájí. Způsobuje zejména subklinické nebo mírně klinické mastitidy, které však často přetrvávají díky jeho schopnosti adaptovat se v mléčné žláze a tvořit biofilm. Infekce se typicky objevují během období suchostojnosti a časné laktace, kdy je mléčná žláza nejzranitelnější.

- *Streptococcus agalactiae* – klasický kontagiózní původce, jehož přenos probíhá zejména při dojení prostřednictvím kontaminovaných pomůcek či rukou personálu. Tento mikroorganismus kolonizuje mléčnou žlázu trvale a vyvolává subklinické, ale vysoce infekční mastitidy, které se rychle šíří napříč stády, pokud nejsou přijata adekvátní hygienická opatření.
- *Escherichia coli* a *Klebsiella* spp. – představitelé environmentálních gramnegativních bakterií, které vyvolávají akutní až perakutní mastitidy, často doprovázené systémovými příznaky, endotoxemií či septikemií. Vznikají zpravidla po kontaminaci strukového kanálku v souvislosti s hygienou prostředí a jsou typické svou rychlou progresí a potenciálním ohrožením života zvířete.
- Další oportunní bakterie (např. *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus faecalis*) – uplatňují se zejména jako sekundární patogeny, které mohou komplikovat již probíhající mastitidy nebo zvyšovat celkový zánětlivý stres mléčné žlázy. Tyto mikroorganismy samostatně obvykle nezpůsobují těžké infekce, avšak mohou přispívat k perzistenci zánětu a zhoršit odpověď na léčbu.

2.1.3 Potřeba standardizace metod

Rostlinné extrakty představují komplexní směsi širokého spektra bioaktivních sloučenin, jejichž antimikrobiální účinnost se může výrazně lišit v závislosti na celé řadě faktorů. Mezi klíčové aspekty ovlivňující jejich vlastnosti patří především botanický původ rostliny, jelikož jednotlivé druhy i odrůdy se mohou lišit obsahem sekundárních metabolitů, které se na antimikrobiální aktivitě podílejí. Významnou roli hrají také podmínky pěstování, doba sklizně, způsob sušení a délka či podmínky skladování, které mohou ovlivnit stabilitu a koncentraci aktivních látek. Neméně důležitý je použitý extrakční postup, zejména volba rozpouštědla, teploty a doby extrakce, protože tyto parametry určují, jaké skupiny sloučenin se do extraktu dostanou a v jakém množství. Výsledná účinnost je tedy přímo závislá na chemickém profilu extraktu, který může být navíc ovlivněn i fyzikálně-chemickými interakcemi mezi jednotlivými složkami.

Z těchto důvodů je nezbytné, aby metody používané pro hodnocení antibakteriální účinnosti rostlinných extraktů byly pečlivě standardizovány, jednoznačně definovány a reprodukovatelné jak v rámci jedné laboratoře, tak mezi různými pracovišti. Pouze přesně popsané a harmonizované metodické postupy umožňují objektivní interpretaci výsledků, jejich porovnatelnost a spolehlivé vyhodnocení biologické aktivity testovaných extraktů. Navržená metodika proto zahrnuje jak kvalitativní přístupy, které poskytují základní přehled o přítomnosti antimikrobiální aktivity, tak kvantitativní metody umožňující přesné stanovení intenzity účinku. Součástí je rovněž validace jednotlivých kroků pro zajištění správnosti, přesnosti a robustnosti výsledků a tvoří nezbytný předpoklad pro jejich využitelnost ve výzkumu i praxi.

2.1.4 Mechanismy účinku herbálních extraktů

Rostlinné extrakty jsou komplexní směsi obsahující širokou škálu biologicky aktivních sloučenin, jejichž antimikrobiální účinek je zpravidla výsledkem souběhu několika mechanismů působících současně. Jednotlivé metabolity mohou zasahovat různé struktury i funkční procesy bakteriální buňky, což vytváří mnohostranný tlak, na který se patogeny adaptují jen obtížně. Mezi nejčastější mechanizmy účinku patří zejména narušení integrity buněčné stěny a cytoplazmatické membrány – tento efekt je typický například pro fenolické kyseliny, flavonoidy, terpenoidy či některé silice, které mohou měnit propustnost membrány, ovlivňovat její fluiditu a způsobovat únik intracelulárních komponent. Dalším významným mechanismem je denaturace klíčových intracelulárních enzymů a inhibice metabolických drah, které jsou nezbytné pro růst a energetický metabolismus bakterií. Některé rostlinné složky dále vykazují schopnost chelátovat esenciální kovové ionty, jako je železo nebo hořčík, čímž omezují jejich dostupnost a negativně ovlivňují biochemické procesy podmíněné těmito kofaktory.

K postřehnutelným účinkům mnoha rostlinných extraktů patří také interference s komunikací mezi bakteriálními buňkami (quorum sensing). Inhibicí těchto signálních drah dochází k potlačení tvorby biofilmu, omezení produkce virulenčních faktorů a snížení schopnosti bakterií koordinovat kolektivní chování, což je zásadní pro jejich přežívání a patogenitu. Kombinace těchto multifaktoriálních účinků je hlavní výhodou rostlinných antimikrobiálních látek, protože jejich působení nesměřuje na jediné specifické cílové místo, ale ovlivňuje více buněčných struktur a funkcí současně. Z tohoto důvodu se bakterie vůči těmto přírodním látkám adaptují výrazně pomaleji než vůči běžným antibiotikům, která obvykle inhibují jediný enzym či metabolickou dráhu. Multifaktoriální charakter účinku tak činí rostlinné extrakty perspektivním zdrojem alternativních nebo podpůrných látek v boji proti bakteriálním infekcím a problémům spojeným s antibiotickou rezistencí.

2.2 Herbální extrakty a jejich charakteristika

Rostlinné extrakty lze klasifikovat podle typu použitého rozpouštědla, které zásadně ovlivňuje nejen výtěžnost extrakce, ale především polaritu izolovaných sloučenin, a tím i jejich výsledné biologické vlastnosti. Různá rozpouštědla selektivně uvolňují specifické skupiny sekundárních metabolitů – od vysoce polárních až po zcela nepolární sloučeniny – což má přímý dopad na antimikrobiální aktivitu i možnost jejich laboratorního testování. V rámci metodiky se proto standardně rozlišují tři hlavní typy extraktů: vodní, alkoholové a olejové. Vodní extrakty jsou bohaté zejména na polární látky, jako jsou glykosidy, polysacharidy nebo některé fenolické kyseliny, a často se vyznačují mírnější, ale širokospektrální biologickou aktivitou. Alkoholové extrakty umožňují izolaci širšího spektra látek včetně flavonoidů, tanninů a dalších středně polárních metabolitů s výraznými antimikrobiálními účinky. Olejové (lipofilní) extrakty, případně esenciální oleje, koncentrují nepolární

sloučeniny, jako jsou terpeny a terpenoidy, které mají silný účinek na buněčné membrány mikroorganismů a často se vyznačují vysokou antimikrobiální účinností.

2.2.1 Vodní extrakty

Vodní extrakty představují nejjednodušší způsob získávání bioaktivních látek z rostlinného materiálu a obvykle se připravují formou nálevu, odvaru nebo macerace ve sterilní destilované vodě. Tento typ extrakce uvolňuje především hydrofilní sloučeniny, mezi které patří flavonoidní glykosidy, saponiny, fenolické kyseliny či polysacharidy. Významnou předností vodních extraktů je snadná dostupnost a netoxicita použitého rozpouštědla, stejně jako dobrá kompatibilita těchto extraktů s různými laboratorními testovacími médii. Na druhou stranu je jejich nevýhodou nižší chemická stabilita a zvýšené riziko mikrobiální kontaminace, což může ovlivnit skladování i spolehlivost experimentálních výsledků.

2.2.2 Alkoholové extrakty

Alkohol, zejména etanol nebo směs ethanol-voda, umožňuje extrakci látek se střední polaritou. Tato skupina zahrnuje alkaloidy, taniny, lignany, terpeny a některé fenolické sloučeniny. Alkoholové extrakty se vyznačují vyšší extrakční účinností a stabilitou, což je činí vhodnými pro dlouhodobé používání. Při jejich testování je však nutno zohlednit zbytkové množství rozpouštědla, které může ovlivnit výsledky testů – zejména u citlivějších bakterií. Proto se doporučuje provádět kontrolní testy s rozpouštědlem ve stejné koncentraci.

2.2.3 Olejové extrakty

Olejové extrakty slouží k získávání nepolárních, lipofilních sloučenin, mezi které patří esenciální oleje, diterpeny, seskviterpeny a lipofilní flavony. Tyto látky mají často výraznou antibakteriální aktivitu vůči grampozitivním mikroorganismům. Olejové extrakty vykazují obvykle výraznou aktivitu i v nízkých koncentracích, ale mohou být obtížně kvantifikovatelné a náchylné k oxidaci.

Vzhledem k nízké rozpustnosti ve vodě je nutné použít emulgátory, které umožní disperzi extraktu v kultivačním médiu. V metodice doporučujeme jako první volbu neiontové surfaktanty, zejména Tween 20 nebo Tween 80, které mají nejnižší interferenci s výsledky. Každý emulgátor musí být testován samostatně jako negativní kontrola (tzv. solvent/emulsifier control), aby bylo jisté, že sám o sobě nevykazuje inhibici růstu.

2.2.3.1 Stanovení poměru testovaného olejového extraktu a emulgátoru

Vhodný poměr olejového extraktu a Tweenu není univerzální pro všechny typy olejových extraktů. Obvykle je předpoklad, že pro málo viskózní olejové extrakty je používáno 1 – 5 % podílu Tweenu vzhledem

k celkovému objemu směsi. Pro stabilizaci lipofilních extraktů s vyšším obsahem pryskyřic, vosků nebo těžkých terpenoidů je potřeba podíl Tweenu 5 – 15 %. Vyšší podíly Tweenu se obvykle v mikrobiologických testech nepoužívají. Vhodný poměr je tedy pro daný extrakt specifický a stanovuje se experimentálně podle tří hlavních kritérií:

1. Stabilita emulze – olejový extrakt se musí rovnoměrně rozptýlit a nesmí způsobovat separaci nebo tvorbu kapek.
2. Minimalizace interferencí s mikroorganismy tak, aby neovlivnila životaschopnost bakterií a výsledky testu.
3. Transparentnost vůči hodnocení účinků – systém nesmí být příliš zkalený nebo viskózní, nesmí ovlivňovat čitelnost výsledků a musí umožnit rovnoměrné rozložení extraktu a inokula.

Provedení:

1. Připraví se několik zkušebních směsí olejového extraktu s různým podílem Tweenu.
2. Každou směs vyhodnotit z hlediska stability v čase, homogenity disperze a dostatečnou přenositelnost do testovacího média.

2.3 Popis metod a provedení testování

Předkládaná metodika představuje komplexní postup pro *in vitro* stanovení antibakteriální účinnosti herbálních extraktů od volby vhodné metody přes postup provedení vyšetření až po návrh interpretace výsledků.

Správná volba metody stanovení antibakteriální aktivity je klíčová pro dosažení relevantních a reprodukovatelných výsledků. Rozhodnutí o vhodném postupu závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech extraktu, zejména na jeho polaritě, rozpustnosti a stabilitě, a dále na typu cílového mikroorganismu. Volba metody by měla vycházet z následujících kritérií:

- Typ extraktu: Vodné a alkoholové extrakty se snadno testují difúzními i dilučními metodami, pro olejové extrakty nejsou difúzní testy vhodné.
- Typ mikroorganismu: U rychle rostoucích grampozitivních kmenů je vhodné využít agarové testy, zatímco u gramnegativních bakterií se doporučuje spíše mikrodiluční stanovení. Doporučení vychází z odlišných strukturálních a fyziologických vlastností grampozitivních a gramnegativních bakterií, které ovlivňují chování rostlinných extraktů i metodickou spolehlivost testů: U rychle rostoucích grampozitivních bakterií (např. *Staphylococcus*, *Streptococcus*) je agarový difuzní test vhodný, protože jejich jednoduchá buněčná stěna umožňuje snadnější průnik řady sloučenin a extrakty v agaru dobře difundují. Růst grampozitivních kmenů bývá navíc kompaktní a rovnoměrný, což umožňuje spolehlivé a dobře čitelné vyhodnocení zón

inhibice. Gramnegativní bakterie mají naopak komplexní buněčnou stěnu s vnější membránou bohatou na lipopolysacharidy, která výrazně omezuje průnik mnoha rostlinných metabolitů. Difuzní testy proto často podhodnocují skutečnou aktivitu extraktu, protože látky se přes membránu a agar difundují hůře. Z tohoto důvodu se upřednostňují mikrodiluční metody, které nejsou závislé na difuzi v agaru a dokáží lépe zachytit i slabší nebo pomalejší účinek extraktu uvnitř kapalného média.

- Cíl testu: Pro screening účinnosti postačí kvalitativní difuzní metoda, pro srovnávací studie je nezbytné kvantitativní stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC).

2.4 Kvalitativní metody stanovení antibakteriální účinnosti

Kvalitativní testy – difúzní metody – jsou vhodné především pro předběžný screening, představují rychlý a vizuálně názorný způsob stanovení antibakteriální aktivity. Je však nutné počítat s tím, že výsledky mohou být ovlivněny difúzní schopností testované látky, její viskozitou a složením média.

2.4.1 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda je založena na principu difúze bioaktivních látek z papírového disku definovaného průměru, který je předem nasycen zkoumaným extraktem a následně umístěn na povrch agarového média rovnoměrně inokulovaného bakteriální kulturou standardizované hustoty. Během inkubace se bioaktivní sloučeniny z disku šíří do okolního agaru, kde mohou inhibovat růst mikroorganismu. Pokud je extrakt účinný, vytvoří se kolem disku zřetelná zóna inhibice, jejíž průměr se po ukončení inkubace hodnotí v milimetrech.

Provedení:

1. Sterilní papírové disky (průměr 6 mm) se napustí 20–50 µl testovaného extraktu.
2. Napuštěné disky se umístí na Mueller-Hinton agar (MHA), případně krevní MHA nebo MHA obohacený o růstová média (dle charakteru bakteriální kultury), inokulovaný po celém povrchu přelivem nebo roztěrem suspenzí bakteriální kultury o hustotě 0,5 McFarlanda.
3. Inkubace při 37 °C po dobu 18–24 h (nebo upravených podmínek inkubace podle charakteru bakteriální kultury).
4. Po inkubaci se měří průměr zóny inhibice a výsledek se zaznamená v milimetrech.

Interpretace:

Velikost zóny inhibice poskytuje orientační informaci o míře antibakteriální aktivity:

- Zóna >20 mm = silná antibakteriální aktivita
- Zóna 10–20 mm = střední účinnost

- Zóna <10 mm = slabá nebo žádná aktivita

Hodnocení kvalit provedení testu:

Jako pozitivní kontrola se používají disky se standardními antibiotiky, které umožňují ověřit citlivost zvoleného bakteriálního kmene a srovnat účinek extraktu se známým referenčním kmenem (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Strptococcus pneumoniae* ATCC 49619). Negativní kontrolu tvoří disky obsahující pouze použité rozpouštědlo, což umožňuje odlišit vlastní antimikrobiální aktivitu extraktu od případného vlivu nosného média.

2.4.2 Jamková metoda

Jamková metoda umožňuje aplikaci většího objemu extraktu a tím i přesnější hodnocení účinku látek s nižší difuzní schopností. Je vhodná zejména pro viskózní a koncentrované extrakty.

Postup:

1. Na Petriho misky s Mueller-Hinton agarem (MHA), případně krevním MHA nebo MHA obohaceném o růstová média (dle charakteru bakteriální kultury), se aplikuje přelivem nebo roztěrem bakteriální kultura o hustotě 0,5 McFarlanda.
2. Do agaru se vytvoří jamky (např. sterilním korkovým vrtákem) o průměru 6 – 8 mm.
3. Do jamek se napipetuje přesné množství extraktu, obvykle 50 – 100 µl.
4. Inkubace při 37 °C po dobu 18–24 h (nebo upravených podmínek inkubace podle charakteru bakteriální kultury).
5. Po inkubaci se měří průměr zóny inhibice a výsledek se zaznamená v milimetrech.

Interpretace:

Zóna inhibice u jamkové metody bývá obecně větší než u diskové difúzní metody, ale neexistuje pevně stanovená konstantní hodnota, o kterou by se zóny zvětšovaly. Rozdíl závisí na vlastnostech konkrétního extraktu i mikroorganismu. U většiny rostlinných extraktů bývají zóny u jamkové metody o 20–80 % větší než diskové difúzní metody. Například zóna 10 mm v diskové metodě může odpovídat přibližně 12–18 mm v jamkové metodě, ale u extraktů, které hůře difundují z papírového disku, může být rozdíl ještě výraznější.

Hodnocení kvalit provedení testu:

Jako pozitivní kontrola se do jamek na agaru aplikuje vybrané standardní antibiotikum, které umožní ověřit citlivost zvoleného bakteriálního kmene a srovnat účinek extraktu se známým referenčním kmenem (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Strptococcus pneumoniae* ATCC 49619). Negativní kontrolu tvoří jamky obsahující pouze použité rozpouštědlo pro potvrzení, že samotné rozpouštědlo nemá inhibiční účinek.

2.4.3 Indikátorové metody

Pro ověření vitality a metabolické aktivity bakteriálních buněk po expozici herbálním extraktům lze využít indikátorová barviva, jako je například 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid (TTC) nebo resazurin. Tato barviva slouží jako citlivé redoxní indikátory: v přítomnosti živých, metabolicky aktivních buněk dochází k jejich enzymatické redukci, která vede k charakteristické změně barvy produktu. TTC je redukován na červený formazan a resazurin na růžový resorufin, přičemž intenzita zbarvení koreluje s úrovní buněčného metabolismu. Interpretace změny barvy tak umožňuje odlišit živé buňky od buněk poškozených nebo usmrcených účinkem testovaného extraktu.

Indikátorové metody mohou doplnit výsledky získané primárními testy inhibice růstu, neboť poskytují detailnější informaci o typu účinku extraktu. Zatímco jednoduché zjištění absence růstu může indikovat inhibici, indikátorová reakce pomáhá lépe rozlišit, zda testovaná látka působí bakteriostaticky (zastavení růstu při zachování vitality) nebo baktericidně (usmrcení buněk). Tyto metody jsou proto vhodné zejména při ověřování účinku na hraničních koncentracích nebo při porovnávání účinnosti různých extraktů.

2.5 Kvantitativní metody stanovení antibakteriální účinnosti

2.5.1 Mikrodiluční testy v tekutém médiu

Mikrodiluční testy umožňují přesné stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Jsou založeny na sledování růstu bakterií v přítomnosti postupně ředěných koncentrací extraktu.

Postup:

1. Do 96jamkové destičky se napipetuje 100 µl Mueller-Hinton bujónu (MHB) nebo MHA obohaceném o růstová média (dle charakteru bakteriální kultury) do všech jamek.
2. Do první jamky se přidá 100 µl testovaného extraktu v nejvyšší koncentraci, následně se provede „dvojkové“ ředění ředění – získáme ředění 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, atd. (z první jamky se přenese 100 µl obsahu do druhé jamky, z druhé jamky 100 µl obsahu do třetí jamky atd., z poslední jamky se 100 µl obsahu odstraní).
3. Do všech jamek se přidá 5 µl bakteriální suspenze o hustotě 0,5 McFarlanda.
4. Destička se zakryje a inkubuje při 37 °C po dobu 18–24 h (nebo upravených podmínek inkubace podle charakteru bakteriální kultury).
5. Růst bakteriální kultury se vyhodnotí vizuálně nebo spektrofotometricky (600 nm).

Interpretace:

MIC = nejnižší koncentrace, při které není detekován růst (čirá jamka).

MBC = koncentrace, při níž po subkultivaci na agar nedochází k růstu kolonií.

Použití spektrofotometru umožňuje přesné a rychlé měření optické hustoty. Tento přístup zvyšuje citlivost testu a eliminuje subjektivní chyby při vizuálním hodnocení.

Hodnocení kvalit provedení testu:

Jako pozitivní kontrola se do jamek na destičce aplikuje vybrané standardní antibiotikum, které umožní ověřit citlivost zvoleného bakteriálního kmene a srovnat účinek extraktu se známým referenčním kmenem (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Strptococcus pneumoniae* ATCC 49619). Pozitivní kontrolu růstu tvoří jamky pouze s médiem a negativní kontrolu tvoří jamky obsahující pouze použité rozpouštědlo pro potvrzení, že samotné rozpouštědlo nemá inhibiční účinek.

2.5.2 Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda je standardizovaný způsob stanovení MIC antimikrobiálních látek, při němž je testovaný materiál (extrakt) obsažen přímo v agarovém médiu v předem definovaných koncentracích. Umožňuje spolehlivé hodnocení rostlinných či jiných komplexních extraktů, pokud vykazují dostatečnou homogenitu při zapracování do média a zároveň současné testování více izolátů na jednom agaru.

Provedení:

1. Připravíme si řadu agarů (MHA), případně krevním MHA nebo MHA obohaceném o růstová média (dle charakteru bakteriální kultury) obsahující známý poměr testovaného extraktu. (Nejprve připravíme „dvojkovou ředící řadu testovaného extraktu – ke dvěma ml extraktu přidáme 2 ml MHB a dále ředíme podobně jako u mikrodilučního testu – získáme ředění 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 atd.). Na jedné Petriho misce k 18 ml agaru přidáme 2 ml testovaného extraktu, na druhé Petriho misce k 18 ml agaru přidáme 2 ml exraktu v ředění 1:1, na třetí Petriho misce k 18 ml agaru přidáme 2 ml extraktu v ředění 1:4 a tak pokračujeme až k poslednímu ředění, které máme připravené).
2. Na agary se aplikuje 20 – 50 µl bakteriální kultury o hustotě 0,5 McFarlanda. Na jeden agar je možno aplikovat více bakteriálních kultur společně, je nutné vyvarovat se spojení jednotlivých kapek různých testovaných bakterií.
3. Agary se inkubují při 37 °C po dobu 18–24 h (nebo upravených podmínek inkubace podle charakteru bakteriální kultury).
4. Růst bakteriální kultury v kapkách na agarech se vyhodnotí vizuálně.

Interpretace:

MIC = nejnižší koncentrace extraktu v agaru, při které není detekován růst (bakterie na agaru neroste).

Hodnocení kvalit provedení testu:

Jako pozitivní kontrola se použijí agary obsahující známá ředění vybraného standardního antibiotika, které umožní ověřit citlivost zvoleného bakteriálního kmene a srovnat účinek extraktu se známým referenčním kmenem (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Strptococcus pneumoniae* ATCC 49619). Pozitivní kontrolu růstu tvoří agary bez podílu extraktu a negativní kontrolu tvoří agary obsahující pouze použité rozpouštědlo pro potvrzení, že samotné rozpouštědlo nemá inhibiční účinek.

2.5.3 Stanovení FIC indexu

Výpočet indexu frakční inhibiční koncentrace (FIC index) se používá k hodnocení synergie dvou antimikrobiálních látek a umožňuje kvantifikovat interakce mezi složkami nebo látkami, například synergii nebo antagonismus mezi herbálními extrakty a antibiotiky, pokud je extrakt využíván jako doplněk k antibiotické léčbě.

Provedení:

1. Pomocí dilučních metod se určí MIC zvlášť (MIC_A a MIC_B) pro každou látku a pro jejich používanou kombinaci (MIC_{A+B}).
2. Výpočet frakční inhibiční koncentrace (FIC) pro každou látku:

   $FIC_A = MIC_{A+B} / MIC_A$

   $FIC_B = MIC_{A+B} / MIC_B$
3. Výpočet indexu FIC (FIC index):

   $FIC\ index = (FIC_A + FIC_B) / 2$

Hodnocení:

- FICI ≤ 0,5 → synergický efekt
- FICI 0,5–1,0 → aditivní efekt
- FICI 1–4 → indiferentní účinek
- FICI > 4 → antagonismus

Výsledky je vhodné prezentovat formou tabulek a grafů, které přehledně ukazují rozdíly mezi jednotlivými kombinacemi. V praxi mohou synergické kombinace vést k významnému snížení dávky antibiotika a zvýšení účinnosti léčby.

2.6 Validace použitých metod

Pro laboratorní účely je potřeba provést validaci použitých metod pro opakovatelnost, mez detekce a kvantifikace, přesnost a robustnost. Metoda je považována za reprodukovatelnou, pokud výsledky opakovaných testů nevykazují odchylky přesahující 10 %. Pro stanovení meze detekce a kvantifikace se empiricky stanovuje nejnižší koncentrace extraktu, která ještě vyvolá inhibiční efekt. Přesnost a robustnost metody se ověřuje drobnými změnami parametrů (např. teplota ±2 °C, čas ±1 h) bez ztráty validity výsledků. Pro validaci zvolené metody pro stanovení antimikrobiálních účinků je vhodné použít referenční bakteriální kmeny, například referenční kmeny pro testování citlivosti bakterií k antibiotikům: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.7 Vyhodnocení a interpretace výsledků

Interpretace výsledků stanovení antibakteriální účinnosti je nezbytná pro správné pochopení biologického významu zjištěných hodnot. Cílem není pouze konstatovat přítomnost účinku, ale stanovit jeho intenzitu, charakter a statistickou významnost.

2.7.1 Porovnání kvalitativních a kvantitativních dat

Zóny inhibice z difuzních testů se používají jako orientační parametr účinnosti. MIC a MBC získané mikrodiluční metodou poskytují přesnější a kvantitativní informace o síle účinku. V ideálním případě by měl být mezi oběma parametry lineární vztah, který potvrzuje konzistenci dat. Pokud je například pozorována malá zóna inhibice a nízká hodnota MIC, může to naznačovat špatnou difuzní schopnost nebo volatilitu složek. Tyto případy vyžadují doplňkové hodnocení chemického složení extraktu.

Poznámka:

Získané výsledky je nutné interpretovat v kontextu biologické relevance. Například vysoká účinnost extraktu *in vitro* nemusí automaticky znamenat jeho efektivitu *in vivo*, neboť faktory jako pH, přítomnost tuků či enzymů v mléce mohou účinnost výrazně ovlivnit. Proto je doporučeno následné ověřování účinnosti testovaných extraktů v nově vyvíjených přípravcích na modelových systémech a případně i v terénních podmínkách.

3. Srovnání „novosti postupů“

Rozpracovaná metodika předkládá komplexní harmonizovaný přístup k hodnocení antibakteriální účinnosti rostlinných extraktů, který v České republice není dosud stanoven. Laboratoře tato vyšetření provádějí, ale používají různé metody a různá interpretační kritéria. Výsledky proto nelze považovat za jednotné a nelze je statisticky či jinak vyhodnocovat nebo srovnávat.

Metodika reflektuje současné trendy ve veterinární diagnostice i farmakologickém výzkumu. Zahrnuje kombinaci klasických mikrobiologických metod s moderními přístupy, čímž se odlišuje od dříve používaných nejednotných nebo dílčích postupů. Metodika představuje ucelený systém pro standardizované hodnocení antibakteriální účinnosti rostlinných extraktů využívaných při léčbě mastitid. Zavedením tohoto postupu do praxe veterinárních laboratoří lze dosáhnout několika zásadních přínosů:

- Zajištění reprodukovatelnosti výsledků napříč laboratořemi.
- Vytvoření vědeckého základu pro hodnocení alternativních přípravků k antibiotikům.
- Posílení antibiotické „stewardship“ prostřednictvím ověřených přírodních alternativ.
- Možnost identifikace synergických kombinací extraktů, které mohou nahradit nebo doplnit antibiotickou terapii.

Jedním z klíčových prvků novosti je úprava standardních mikrodilučních metod pro testování olejových a jinak nepolárních extraktů**.** Tradiční protokoly často selhávají, protože nepolární látky se nerozpouštějí ve vodných médiích, což brání přesnému stanovení MIC. Zavedením emulgačních činidel s definovanou biologickou inertností se podařilo vytvořit stabilní disperze, které umožňují spolehlivé měření inhibice růstu. Tento přístup je klíčový pro reálné využití metodiky ve veterinární praxi, kde se často testují přírodní olejové složky s vysokým antibakteriálním potenciálem.

Dalším inovativním prvkem je integrované hodnocení účinnosti na základě kombinace difúzních, mikrodilučních a statistických metod. Tento vícestupňový přístup umožňuje jednak rychlý screening účinných extraktů, ale i detailní kvantitativní určení jejich účinnosti. Současně poskytuje informace o spektru účinku a možné přítomnosti více aktivních složek.

4. Popis uplatnění metodik

Metodika je určena pro všechny veterinární diagnostické laboratoře – veterinární antibiotická střediska, Státní veterinární ústavy i soukromé veterinární laboratoře. Jejím cílem je přispět ke zkvalitnění diagnostiky a hodnocení účinnosti léčby bakteriálních infekcí. Zvláštní důraz je kladen na využití metodiky jako nástroje pro ověřování antibakteriální aktivity bylinných (herbálních) extraktů vůči bakteriálním patogenům.

Předpokládá se široké uplatnění metodiky v rámci řešení výzkumných projektů zaměřených na hledání vhodných a efektivních alternativ k antibiotické terapii infekcí u zvířat z pohledu hodnocení účinnosti jednotlivých antimikrobiálních látek. Výsledkem zavedení metodiky do praxe by mělo být celkové zvýšení kvality léčby bakteriálních onemocnění u hospodářských i jiných zvířat. To se následně pozitivně projeví také v redukování ekonomických ztrát chovatelů spojených s výskytem a terapeutickým zvládáním infekčních onemocnění v chovech.

Metodika je koncipována tak, aby mohla být implementována do diagnostické činnosti veterinárních laboratoří, využívána při testování komerčních produktů (např. mastí, tinktur, intramamárních přípravků) a aplikována ve výzkumných projektech zaměřených na hodnocení biologických účinků přírodních látek. Tímto komplexním pojetím překračuje rámec běžného laboratorního postupu a stává se nástrojem vhodným pro vědecké, regulační i aplikační účely.

5. Ekonomické aspekt

Zavedení metodiky do praxe veterinárních diagnostických laboratoří, státních veterinárních ústavů a výzkumných pracovišť přináší významné ekonomické i provozní výhody, které lze rozdělit do tří hlavních oblastí:

1. Podpora vývoje a výroby herbálních léčivých přípravků jako možné alternativy k antibiotické léčbě
2. Snížení nákladů na léčbu mastitid
3. Zvýšení efektivity laboratorní diagnostiky a výzkumu

Zavedení metodiky představuje nejen odborný přínos, ale také ekonomicky měřitelný efekt v podobě úspor nákladů, zvýšení efektivity práce a rozvoje domácího trhu s přírodními veterinárními přípravky. Zavedení metodiky pro laboratoře není spojeno s nutností pořízení nových přístrojů a pomůcek do laboratoře. Pro provedení předkládaných postupů a metod jsou diagnostické laboratoře běžně vybaveny. Při dlouhodobé implementaci metodiky lze očekávat návratnost investice do zavedení a školení personálu velmi brzy.

5.1 Snížení nákladů na léčbu mastitid

Mastitidy patří mezi nejčastější onemocnění u dojnic, přičemž průměrné přímé náklady na léčbu jednoho případu v ČR dosahují 3 000–4 500 Kč (léčiva, ztráty mléka, pracovní čas). Při incidenci 20–30 % v chovu znamená toto onemocnění roční ztráty až 1,5–2 mil. Kč u středně velké farmy (200–300 krav). Použití rostlinných extraktů s prokázanou antibakteriální účinností by mohlo umožnit snížit spotřebu antibiotik až o 15–25 %, zkrátit dobu vyřazení mléka z dodávky minimálně o 1–2 dny, omezit vznik antibiotické rezistence v chovu, a tím dlouhodobě snížit náklady na léčbu až o 10–15 **%**.

5.2 Zvýšení efektivity laboratorní diagnostiky a výzkumu

Standardizace metod testování účinnosti herbálních extraktů přináší výraznou úsporu pracovního času a materiálových nákladů. Díky sjednocenému postupu lze snížit variabilitu výsledků mezi laboratořemi o 20–30 %, omezit potřebu opakovaných testů a především zkrátit dobu vyhodnocení testů až na 24–48 hodin. Zavedení metodiky přináší i ekonomický přínos i pro výzkumné instituce – jednotný protokol umožňuje sdílení dat**,** statistické porovnání výsledků a efektivnější transfer know-how mezi institucemi.

5.3 Podpora domácí výroby a inovací

Metodika poskytuje vědecký a technický základ pro vývoj českých veterinárních přípravků rostlinného původu, čímž přispívá k posílení inovačního potenciálu domácího farmaceutického a zemědělského sektoru. Z hlediska hospodářské politiky lze očekávat tyto dopady:

- zvýšení soběstačnosti v oblasti přírodních veterinárních léčiv,
- rozvoj regionálních výrobních kapacit (bylinné extrakty, suroviny),
- a vznik nových aplikovaných výzkumných projektů s komerčním potenciálem.

Zavedení metodiky zároveň umožní využít výsledky ve formálním certifikačním procesu nových přípravků, čímž se urychlí uvedení produktů na trh a zkrátí doba návratnosti investic výzkumných institucí a farmaceutických firem.

5.5 Dlouhodobé přínosy a udržitelnost

Z dlouhodobého hlediska metodika přispívá k:

- udržitelnosti zemědělské výroby díky nižšímu používání antibiotik,
- ochraně životního prostředí (snížený výskyt reziduí léčiv ve vodě a půdě),
- posílení mezinárodní konkurenceschopnosti českého zemědělství,
- ekonomické stabilitě veterinárního sektoru díky efektivnější diagnostice.

Tento soubor přínosů činí metodiku významným nástrojem nejen pro státní veterinární správu, ale i pro zemědělskou a farmaceutickou praxi.

6. Se□nam použité a související literatur□

1. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.* American Journal of Clinical Pathology, 45(4), 493–496.
2. CLSI. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (30th ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute.
3. Holko, I., et al. (2018). *Antibacterial activity of herbal extracts against mastitis pathogens.* Veterinary Microbiology, 216, 1–8.
4. Jančářová, D., et al. (2017). *Bioautography in the screening of antibacterial plant extracts.* Phytochemistry Letters, 19, 160–165.
5. Šimůnek, J., & Novák, J. (2015). *Standardizace extraktů rostlinného původu pro veterinární aplikace.* Veterinární medicína, 60(9), 451–460.
6. Cushnie, T. P., & Lamb, A. J. (2011). *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids.* International Journal of Antimicrobial Agents, 38(2), 99–107.
7. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.* Journal of Applied Microbiology, 86(6), 985–990.
8. Rios, J. L., & Recio, M. C. (2005). *Medicinal plants and antimicrobial activity.* Journal of Ethnopharmacology, 100(1–2), 80–84.
9. Cushnie, T. P., Cushnie, B., & Lamb, A. J. (2014). *Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities.* International Journal of Antimicrobial Agents, 44(5), 377–386.
10. Cowan, M. M. (1999). *Plant products as antimicrobial agents.* Clinical Microbiology Reviews, 12(4), 564–582.

7. Se□nam publikací a aplikovaných výsledků, které předchá□el□ metodice

Nedbalcova, K., Kucharovicova, I., Zouharova, M., Matiaskova, K., Kralova, N., Brychta, M., Simek, B., Pecha, T., Plodkova, H., Matiasovic, J. Resistance of Streptococcus suis isolates from the Czech Republic during 2018 – 2022. Antibiotics 2022, 11(9), 1214.

Bzdil, J., Sladecek, V., Senk, D., Stolar, P., Waicova, Z., Kollertova, N., Zouharova, M., Matiaskova, K., Linhart, P., Medbalcova, K.: Enterococci isolated from one-day-old chickens and their phenotypic susceptibility to antimicrobials in the Czech Repubic. Antibiotics 2023, 12(9), 1487.

Zouharova, M., Nedbalcova, K., Matiaskova, K., Slama, P., Matiasovic, J.: Antimicrobial susceptibility and resistance genes in Streptococcus uberis Isolated from bovine mastitis in the Czecgh Republic. Antibiotics, 2023, 12(10), 1527.

49. Nedbalcova, K., Bzdil, J., Papouskova, A., Zouharova, M., Matiaskova, K., Stastny, K., Sladecek, V., Senk, D., Matej, P., Stolar, P.: Pathotypes and phenotypic resistance of antimicrobials of Escherichia coli isolates from one-day-old chickens. Pathogens, 2023, 12, 1330.

50. Zouharová, M., Matiašovic, J., Gebauer, J., Matiašková, K., Nedbalcová, K. Survey of genotype diversity, virulence, and antimicrobial resistance genes in mastitis-causing Streptococcus uberis in dairy herds using whole-genome sequencing. Pathogens 2023, 12, 1378.

Nedbalcová, K., Zouharová, M.: Antimikrobiální rezistence a léčba vybraných bakteriálních onemocnění drůbeže – review. Veterinářství, 2019, 10, 692-696.

Nedbalcová K., Zouharová M., Matiašková K., Bzdil J.: Rezistence izolátů aviárně patogenních *Escherichia coli* (APEC) k antibiotikům v chovech drůbeže v ČR v roce 2019. Veterinářství 2020, 10, 613 – 617.

Nedbalcová, K., Kucharovičová, I., Brychta, M., Šimek, B., Zouharová, M., Matiašková, K., Matiašovic, J.: Rezistence izolátů *Streptococcus suis* k antimikrobikům v ČR v roce 2020. Veterinářství 2021;70(2):68-72.

Nedbalcová, K., Šperling, D., Karembe, M., Zouharová, M.: Srovnání výsledků stanovení MIC amoxicilinu a marbofloxacinu u izolátů *Streptococcus suis* různými metodami. Veterinářství 2021;71(2):75-80.

Nedbalcová, K., Bzdil, J., Stolář, P., Šenk, D., Sládeček, V., Papoušková, A., Matiašková, K., Zouharová, M.: Aviárně patogenní Escherichia coli – rezistence k antibiotikům u jednodenních brojlerů v České republice v roce 2022. Veterinářství 2023;73(7):411-415.

75. Zouharová, M., Nedbalcová, K., Matiašková, K., Mayer, R, Bidlová, P., Matiašovic, J.: Pětiletá studie antimikrobiální rezistence u kmenů Streptococcus uberis izolovaných v chovech dojnic v ČR v letech 2019 – 2023. Veterinářství 2023;73(9):510-518.

Nedbalcová K., Krejčí J., Zouharová M., Huvarová I., Matiašková K., Audová E., Ondriašová R.: Souprava k diagnostice antibiotických rezistencí veterinárních bakteriálních patogenů. Užitný vzor CZ 033427 U1, zapsáno u Úřadu průmyslového vlastnictví 3. 12. 2019.

Nedbalcova, K., Kucharovičová, I., Zouharová, M., Matiašková, K., Švejdová, M., Brychta, M., Šimek, B., Plodková, H., Pecka, T., Králová, N., Matiašovic, J.: Doporučené postupy diagnostiky, antibiotické léčby a

prevence onemocnění prasat způsobených bakteriemi *Streptococcus suis*. Certifikovaná metodika č. 143/2022, ISBN 978-80-7672-025-1, VÚVeL Brno, číslo Osvědčení: SVS/2022/151473-G.

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

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

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

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

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

Nedbalcová, K., Prátová, H., 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.

Nedbalcová, K., Zouharová, M., Krejčí, T.: Vyšetření citlivosti/rezistence anaerobních bakterií k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací. Certifikovaná metodika č. 92/2018, ISBN 978-80-88233-30-5, VÚVeL Brno 2018. Číslo osvědčení: SVS/2018/036997-G.

Zouharova M., Nedbalcova K., Audova E.: Metody průkazu, laboratorního testování a vyšetření citlivosti/rezistence k antimikrobikům izolátů *Streptococcus uberis* z mastitid dojnic. Certifikovaná metodika č. 130/2020, ISBN 978-80-88233-08-4, VÚVeL Brno 2020. Číslo osvědčení: SVS/2020/101856-G.

Nedbalcova K., Pokludova L.: Laboratory investigation and result interpretation. In: Antimicrobials in livestock 1: Regulation, science, practise. A European perspective. Springer Nature Switzerland AG 2020, ISBN 978-3-030-46720-3 ISBN 978-3-030-46721-0 (eBook), pp 195-232.

Oponenti:

doc. Ing. Petr Sláma, Ph.D.

Mendelova univerzita, Agronomická Fakulta, Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat

MVDr. Aneta Pier□□nová, Ph.D.

Státní veterinární správa České republiky