



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně

MUNI
MED

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta



ÚSKVBL

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ
V BRNĚ

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická



ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PŮDĚ A PŘÍPADNĚ DALŠÍCH ČÁSTECH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Zpráva z funkčního úkolu MZe za rok 2023

Brno, listopad 2023



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně



Masarykova univerzita, Lékařská fakulta



Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv



Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PŮDĚ A PŘÍPADNĚ DALŠÍCH ČÁSTECH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Zpráva z funkčního úkolu MZe za rok 2023

Brno, listopad 2023

Autoři:

Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D. (LF MUNI)

MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D. (LF MUNI)

Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D. (ÚSKVBL)

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D. (FCH VUT v Brně)

Ing. Jan Fučík (FCH VUT v Brně)

Ing. Anna Amrichová (FCH VUT v Brně)

Mgr. Šárka Poláková, Ph.D. (ÚKZÚZ)

OBSAH

ABSTRAKT	4
1. ÚVOD.....	5
2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU	12
3. MATERIÁL A METODIKA.....	13
3.1 Mikrobiologická část – část A	20
3.2 Analytická část – část B	23
3.3 Metodika sledování spotřeb antimikrobik – část C.....	27
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
4.1 Mikrobiologická část – část A	29
4.2 Analytická část – část B	40
4.3 Spotřeby antimikrobik – část C	44
5. ZÁVĚRY	53
6. REFERENCE	56
7. PŘÍLOHY.....	65

ABSTRAKT

Antibiotika jsou významným pomocníkem při léčbě bakteriálních infekcí lidí i zvířat. I při jejich racionálním využívání, má však aplikace antibiotik negativní aspekty, např. jejich kontinuální uvolňování do životního prostředí, prostřednictvím zavlážením odpadní vodou, aplikace biosolidů nebo aplikace statkových hnojiv. Přítomnost antibiotik v půdě (a obecně životním prostředí) může představovat vhodné prostředí pro vznik antimikrobiální rezistence, ale také může mít nepříznivý vliv na půdní organismy (následně i kvalitu půdy), nebo může docházet k příjmu těchto látek rostlinami a pěstovanými plodinami a následně vstupu do potravního řetězce. Kontaminace životního prostředí léčivy, představuje, jak environmentální, tak i zdravotní rizika pro lidskou populaci i zvířata z hlediska antibiotické rezistence, ale i potenciálního dlouhodobého příjmu stopových koncentrací v kontaminovaných plodinách, které mohou být součástí lidské stravy či krmiv pro zvířata.

Primární náplní řešeného projektu byly mikrobiologické rozborů, konkrétně stanovení přítomností genů rezistence na fluorochinolony v různých částech drůbeží farmy (stěry větráků, krmítek a píték), ale následně i v orgánech kuřat a následně také v samotné podestýlce, která je v rámci cirkulární ekonomiky Evropské unie aplikována do zemědělské půdy. Z tohoto důvodu byla v rámci řešení projektu testována účinnost fermentace na odstranění genů rezistence, rezistentních mikroorganismů, ale také reziduí fluorochinolonů v podestýlce, proto byly provedeny mikrobiologické rozborů podestýlky i v průběhu samotné fermentace. Takto zpracovaná podestýlka byla následně aplikována do zemědělské půdy, jejíž vzorky byly také podrobeny mikrobiologickým rozborům. Za účelem komprehenzivního posouzení byly tyto mikrobiologické rozborů doplněny také stanovením reziduí enrofloxacinu a jeho primárního metabolitu ciprofloxacinu ve vzorcích podestýlky v průběhu fermentace a následně byla také prozkoumána perzistence těchto látek v půdním prostředí. V rámci řešeného projektu byl získán ucelený pohled nejen na osud těchto látek v životním prostředí po aplikaci statkových hnojiv, ale byl charakterizován celý proces od medikace brojlerů kuřat, přes aplikaci podestýlky až po samotný osud v terestriálním prostředí. Pro dokreslení celkové situace a zátěže životního prostředí jsou podána i trendová a aktuální data o spotřebách antimikrobik u drůbeže, a celkově ve veterinární i humánní medicíně v rámci ČR a Evropy. Je rovněž zahrnuta možná korelace rezistencí u indikátorových *E.coli* izolovaných z drůbeže.

1. ÚVOD

Předkládaná zpráva navazuje na první, analytický dokument, zpracovaný v roce 2019 a je třetím dokumentem zahrnujícím výsledky a experimentální data zpracovaným v rámci plnění parciálního cíle I.1.5 stanoveného v rámci realizační náplně Akčního plánu Národního antibiotického programu (AP NAP) schváleného na období 2019–2022. Náplní uvedeného cíle AP NAP je zformulovat rámec pro sledování environmentální zátěže (půda) v důsledku rezistence k antimikrobikům u bakterií a reziduí antimikrobních léčivých látek používaných v chovech hospodářských zvířat. V souvislosti s rezidui antimikrobik a rezistencí vůči antimikrobikům je dále zvažována role životního prostředí v transferu těchto látek do rostlin, které následně mohou sloužit jako potraviny či krmivo vstupující do potravního řetězce – a být tak rizikovými faktory ovlivňujícími zdraví lidí a zvířat.

Celosvětově roste produkce drůbeže, zejména z důvodu rostoucí poptávky po levnějších živočišných bílkovinách. Dochází tak k nárůstu produkce drůbeží podestýlky, která je běžně používána jako hnojivo pro zemědělské půdy. Tato praxe pomáhá řešit likvidaci odpadu z drůbežního průmyslu a recyklaci potřebných živin pro produkci plodin. Z důvodu využívání antibiotik v chovech zvířat však zemědělská aplikace organických hnojiv živočišného původu může vést ke kontaminaci půdy, povrchových a podzemních vod antibiotiky, k šíření bakterií rezistentních k antibiotikům a také genů antibiotické rezistence. Drůbežářský průmysl vyprodukuje v Evropské unii každoročně 13 milionů tun podestýlky, což představuje velkou výzvu pro zdraví lidí, zvířat i prostředí (Esperón et al. 2020).

Fluorochinolony (FQ) se řadí mezi baktericidní chemoterapeutika s účinkem na široké spektrum grampozitivních i gramnegativních bakterií. Vyznačují se výhodnými farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnostmi, proto se přípravky, které je obsahují staly ve veterinární medicíně oblíbenými a používanými. Jejich široké použití však rozkrylo i určité problémy a to jak ve vztahu k nežádoucím účinkům (které vedlo k přehodnocení humánních léčivých přípravků), tak ve vztahu k narůstající rezistenci, včetně velmi rizikové rezistence plasmidově přenosné. Léčená zvířata jak podanou látku, tak její stále mikrobiologicky aktivní metabolity, ve vysokých koncentracích vylučují svými exkrementy¹. Stabilita fluorochinolonů ve vnějším prostředí je vysoká, odhaduje se na více než 120 dní (Wu

¹ FQ (enrofloxacin) u drůbeže po PO podání má vysoký index biologické dostupnosti (přibližně 80 %, ale poslední práce uvádějí až 98 %)

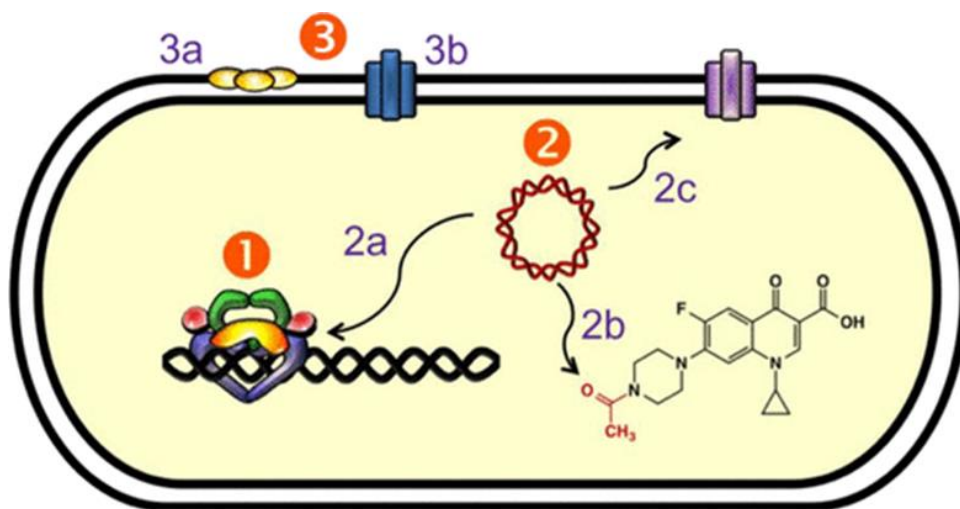
et al. 2005). Z pohledu vzniku rezistence bakterií ale náleží k nejrizikovějším skupinám antimikrobik. Rezistence se vyvíjí velmi rychle, často už v průběhu léčby, a je povětšinou zkřížená mezi všemi zástupci této skupiny (ČLS, 2019). Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici syntézy nukleových kyselin v bakteriální buňce prostřednictvím inaktivace enzymů topoizomeráz (DNA gyráza a topoizomeráza IV). Rezistence k jejich účinku je pak nejčastěji způsobena mutací genů řídících replikaci a segregaci chromozomální DNA bakterií a je kódována geny *gyrA*, *gyrB*, *parC* a *parE*. Rezistence může být způsobena i snížením propustnosti buněčné membrány v důsledku alterace porinů.

V současnosti je pozornost věnována zejména mechanismům, které jsou horizontálně šířené a označují se jako plazmidově vázaná rezistence k chinolonům – PMQR (Veldman et al. 2011). Do dnešního dne byly popsány tři různé mechanismy a klíčové molekuly, na nichž je PMQR založená:

1. Protektivní proteiny: Qnr peptidy – chrání bakteriální buňky před chinolony především snížením počtu dostupných enzymových cílů
2. Chinolony modifikující enzymy: protein *aac(6')-Ib-cr* – modifikovaná varianta aminoglykosid acetyltransferázy, která snižuje aktivitu chinolonů jejich acylací
3. Efluxní pumpy *OqxAB*, *QepA1* a *QepA2*, které snižují koncentraci hydrofilních fluorochinolonů v buňce. *QepA1* a *A2* byly popsány u původců bakteriálních infekcí v humánní populaci, *OqxAB* se vyskytuje téměř výhradně u původců infekcí zvířat (Aldred et al. 2014, Mirzaii et al. 2018; Recacha et al. 2017).

První výskyt plazmidově vázané rezistence k chinolonům (Plazmid Mediated Quinolone Resistance – PMQR) byl zaznamenán v roce 1998 u izolátu *Klebsiella pneumoniae* z moče pacienta (Martinez-Martinez et al. 1998). Gen odpovědný za tento typ rezistence byl pojmenován *qnr*, později pozměněn na *qnrA*, protože byly objeveny i jeho další varianty. Další mechanismus vzniku PMQR byl popsán v roce 2006, jednalo se o modifikaci chinolonů enzymem aminoglykosid acetyltransferáza (Robicsek et al. 2006). V roce 2007 v souvislosti s objevem chinolonových efluxních pump *QepA* (Yamane et al. 2007; Périchon et al. 2007) a *OqxAB* (Hansen et al. 2007) byl popsán třetí mechanismus rezistence k chinolonům nesený na plazmidech. Horizontální genový přenos těchto determinant PMQR mezi bakteriemi významně přispěl ke snížení citlivosti na fluorochinolony (Gay et al. 2006; Cattoir et al. 2008; Zhou et al. 2011; Li et al. 2012). Studie ukázaly, že izoláty *E. coli* získané z různých prostředí

často nesou jak geny rezistence typu PMQR, tak ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase) a obvykle koexistují na stejném plazmidu. Plazmidy nesoucí více genů rezistence mohou přenášet vícečetnou rezistenci k antibiotikům mezi různými bakteriemi, což představuje velkou hrozbu pro léčbu infekčních onemocnění (Jiang et al. 2012).



Obrázek 1. Mechanismy rezistence na chinolony převzato z Adler et al. (2014).

Chromozomálně vázaná rezistence – (1) mutace v gyráze a topoizomeráze IV, (3a) snížení absorpce léčiv z důvodu nedostatečné exprese porinů, (3b) zvýšená exprese efluxních pump.

Plazmidově vázaná rezistence - (2a) proteiny Qnr (žluté) chrání komplexy enzym-DNA před chinolony, (2b) Aac(6')-Ib-cr - aminoglykosid acetyltransferáza, která snižuje jejich účinnost ciprofloxacinu a norfloxacinu acetylací volného dusíku na kruhu C7, (2c) efluxní pumpy snižují koncentraci chinolonů v buňce.

Antibiotika v půdě

Rezidua léčiv včetně antimikrobik se mohou do půdy dostávat různými způsoby. Mezi hlavní zdroje patří odpadní voda a voda povrchová, které jsou využívány pro zavlažování, kaly z čistíren odpadních vod (zde primárně převažuje zátěž vzniklá používáním antimikrobik u člověka), a v neposlední v řadě také organická hnojiva, kde se rezidua vyskytují z chovů zvířat v závislosti na jejich medikaci. Organická hnojiva mohou obsahovat značný podíl vyloučených antibiotik, protože metabolizována je jen část aplikované dávky. Mohou však také obsahovat metabolity, včetně těch mikrobiologicky aktivních, což je i případ enrofloxacinu, kdy část přijaté dávky se změní na mikrobiologicky aktivní ciprofloxacin. V závislosti na vlastnostech může dané léčivo následně setrvávat v půdě po delší dobu, dochází k jeho degradaci nebo může být přijímáno rostlinami, které jsou pěstovány na plochách ošetřených organickými hnojivy (Pan et al. 2017).

Pro studium a kontrolu osudu antibiotik v půdě je důležité zjistit co nejvíce o jejich transportu, degradabilitě či sorpčním chování. Vše závisí jak na vlastnostech daného léčiva (např.

struktura, polarita, sorpční koeficienty, poločas rozpadu), tak na vlastnostech půdy (pH, půdní typ, obsah půdní organické hmoty) (Kodešová et. al. 2015). Možností, jak snížit koncentraci antibiotik v hnojivech, může být úprava tohoto organického hnojiva pomocí anaerobní digesce, kompostování nebo vermikompostování (Zhang et.al. 2015).

Adsorpční procesy

Adsorpce antibiotik v půdě ovlivňuje jejich mobilitu, degradaci a biologickou dostupnost. Adsorpci ovlivňují především přítomné funkční skupiny na molekule léčiva. Z vlastností půdy jsou to textura, pH, obsah iontů (např. Ca^{2+} , Mg^{2+}) a obsah půdní organické hmoty. Podle provedené studie se v hlinito-jílovité zemědělské půdě ochotně sorbují tetracykliny a rovněž i fluorochinolony. Dochází u nich ke kationtové výměně a tvorbě vodíkových můstků. Interagují s půdní organickou hmotou. Naopak sulfonamidy bývají velmi mobilní (Pan et al. 2017; Zhi et.al. 2019).

Transportní procesy

Antibiotika mohou být transportována do vodního prostředí. Transport je ovlivněn klimatickými podmínkami (množství srážek, teplota), vlastnostmi antibiotik (funkční skupiny) a vlastnostmi půdy (porozita, pH, organická hmota) (Zhi et.al. 2019). Dlouhodobé srážky a kyselé deště výrazně ovlivňují migraci antibiotik z hnojiva do půdy. Vyluhovatelnost úzce souvisí se sorpčními procesy. Například sulfonamidy vykazují potenciál pro snadnou migraci z půdy do vody (Pan et al. 2017)**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**

Degradační procesy

Degradace antibiotik může probíhat biotickými a abiotickými procesy. Mezi abiotické procesy patří fotodegradace a chemické přeměny (hydrolýza, oxidace, redukce). Hlavní roli při degradaci antibiotik hraje biodegradace, která je zprostředkována mikroorganismy v půdě. Je závislá na přítomnosti a množství kyslíku, pH, teplotě, vlhkosti, stupněm adaptace populace mikroorganismů, dostupnosti živin, struktuře odbourávané látky a její dostupnosti (Pan et al. 2017). Přítomnost některých antibiotik může ovlivnit aktivitu mikroorganismů přítomných v půdě, a tak výrazně ovlivnit jejich degradaci (Cycon et al. 2019).

Příjem rostlinami

Po aplikaci hnojiva obsahujícího rezidua antibiotik může dojít k příjmu části těchto látek rostlinou. Příjem závisí na mnoha faktorech, ať už na vlastnostech daného léčiva nebo na charakteristice daného prostředí, v němž se rostliny pěstují. Pro studium transportu léčiv se

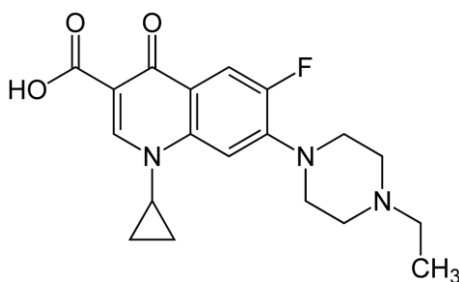
zakládají skleníkové nebo hydroponické experimenty. Látky jsou přijímány kořeny rostlin a následně vedeny do stonku, listů a v některých případech i do plodů (Tasho et al. 2016).

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Fluorochinolony mají nízkou tenzi par a velkou tendenci k sorpci na pevné částice v půdě, sedimentech a kalech. Jsou to zwitteriontové sloučeniny, takže jejich forma výskytu závisí na hodnotě pH, které ovlivňuje i další možné interakce (Riaz et.al. 2018).

Celkový výskyt a chování fluorochinolonů v půdě závisí na sorpčních procesech probíhajících v půdě. Ty jsou ovlivněny obsahem půdní organické hmoty, obsahem jílu, hodnotou pH, přítomností některých anorganických iontů. Fluorochinolony mají kyselou i bazickou funkční skupinu a jejich forma závisí na pH. Na interakci v půdě se potom podílí především kationtová výměnná aktivita a vodíkové můstky. Kationtová aktivita je v tomto případě významně závislá na koncentraci iontů Ca^{2+} , Mg^{2+} a Al^{3+} . Fluorochinolony s nimi interagují a mohou tvořit stabilní komplexy (Riaz et.al. 2018). To má význam pro jejich transport v půdním profilu.

Enrofloxacin

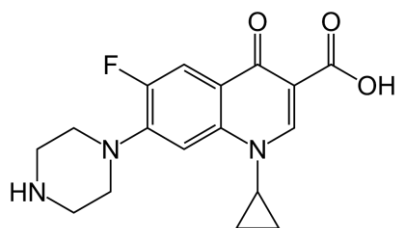


Obrázek 2. Struktura enrofloxacinu

Tabulka 1. Fyzikálně-chemické vlastnosti enrofloxacinu (Albero et al. 2018; Cycon et al. 2019; Pubchem; Tolls, 2001)

IUPAC název	1-cyklopropyl-7-(4-ethylpiperazin-1-yl)-6-fluor-4-oxochinolin-3-karboxylová kyselina
Sumární vzorec	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃
Molekulová hmotnost (g/mol)	359,4 (přesná hmota 359,16451973)
Vzhled	Světle žlutá krystalická látka
pK _{a1}	6,27
pK _{a2}	8,3
logK _{ow}	1,1
K _{oc}	39–77000 (L/kg)
K _d	127–4844 (L/kg)

Ciprofloxacin



Obrázek 3. Struktura ciprofloxacinu

Tabulka 2. Fyzikálně-chemické vlastnosti ciprofloxacinu (Albero et al. 2018; Cycon et al. 2019; Pubchem; Tolls, 2001)

IUPAC název	1-cyklopropyl-6-fluor-4-oxo-7-piperazin-1-ylchinolin-3-karboxylová kyselina
Sumární vzorec	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃
Molekulová hmotnost (g/mol)	331,3 (přesná hmota 331.13321961)
Vzhled	světle žlutá krystalická prášková látka
pK _{a1}	5,9
pK _{a2}	8,89
logK _{ow}	0,4
K _{OC}	1127–61000 (L/kg)
K _d	0,54–5612 (L/kg)

Analytické metody

Pro analýzu reziduí léčiv ve složkách životního prostředí je zapotřebí, aby v laboratořích byla k dispozici dostatečně robustní a spolehlivá analytická instrumentace pro stanovení a kvantifikaci. Dnes je hlavní a rutinní používanou metodou vzhledem k vlastnostem analytů kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS) (Kim et. al. 2005; EPA Method 1694). Lze omezeně využít i kapalinovou chromatografii s detekcí pomocí UV/VIS nebo fluorescenčním detektorem (Gumustas et. al. 2013).

Mezi využívané módy kapalinové chromatografie při analýze léčiv patří především chromatografie na reverzní fázi (RP) nebo iontově výměnná chromatografie. Stacionární fáze

využívaná při analýze léčiv v režimu RP je nejčastěji silikagel modifikovaným C18 nebo C8, případně hybridní stacionární fáze (např. BEH). Jako mobilní fáze se využívá většinou dvojsložkový systém s gradientem mobilní fáze založený na methanolu nebo acetonitrilu a vodné složky s upravenou hodnotou pH pomocí kyseliny mravenčí, mravenčanu, octanu atd. Jako iontový zdroj je v hmotnostním spektrometru je využíván především elektrosprej (ESI), případně chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Hmotnostním analyzátozem první volby díky svým možnostem v kvalitativní analýze je analyzátor je trojitý kvadrupól (QqQ). Další dnes už hojně využívanými analyzátory jsou hybridní analyzátory typu q-TOF nebo orbitální pasti. Měření jsou potom prováděna s vysokým rozlišením a velkou přesností měřené hmoty. Tento typ měření umožňuje kromě analýzy parentálních látek i identifikaci metabolitů léčiv v analyzovaných vzorcích sledovat vliv prostředí na průběh metabolismu a degradace v různých matricích (Bartha, 2012; Gros et.al. 2006).

2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU

Funkční úkol pro rok 2023 byl zaměřen na sledování výskytu genů rezistence k enrofloxacinu (ENR), případně ciprofloxacinu (CIP), zpřesnění údajů k reziduím enrofloxacinu a jeho metabolitu ciprofloxacinu, přičemž byla doplněna analýza posledních dostupných dat o spotřebách antimikrobik a specificky fluorovaných chinolonů, včetně enrofloxacinu (ENR) v ČR v období 2018–2022. Byl vybrán chov kura domácího – brojlerů na výkrm, kde v počátcích výkrmu byl zvířatům podán veterinární léčivý přípravek s obsahem léčivé látky enrofloxacinu prostřednictvím napájecí vody. K detekci mikrobioty v podestýlce a půdě byla použita kultivační metoda se selektivními agary suplementovanými fluorochinolony a metagenomová analýza. Obsah ENR a CIP v drůbeží podestýlce byl stanoven tandemovou technikou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Cíle bylo dosaženo provedením následujících úkolů:

- A. Zpřesnění dostupných informací o výskytu genů rezistence k ENR (CIP) ve fázi výkrmu, v drůbeží podestýlce (včetně změn, ke kterým dochází v průběhu fermentace podestýlky), v půdě po aplikaci vyzrálé drůbeží podestýlky od medikovaných zvířat a v pěstovaných rostlinách a sledováním diversity mikrobioty metodou 16S rRNA – MUNI, ÚKZÚZ
- B. Zpřesnění dostupných informací o koncentracích ENR (CIP) v různých typech podestýlky získané v průběhu fermentace a v půdě po aplikaci vyzrálé drůbeží podestýlky od medikovaných zvířat – VUT, ÚKZÚZ
- C. Analýza dostupných dat o spotřebách ENR v České republice – ÚSKVBL

3. MATERIÁL A METODIKA

Charakteristika farmy

Farma byla vybrána na základě informací o používání enrofloxacinu v turnusech s produkcí masných brojlerů, většinou po naskladnění jednodenních kuřat. Jednalo se o farmu s chovem kura z Olomouckého kraje, v rozsahu 4 haly, 2 objekty. Kapacita haly 1 a 2 je do max 20 000, nicméně bývá nastájeno spíše 18–19 tisíc, u haly 3 a 4 je kapacita nižší (do 18 000) a bývá nastájeno přibližně 16–17,5 tisíc kusů. Do daného chovu probíhá návoz jednodenních kuřat v přepravkách většinou po 100 ks (případně po 90 ks). Neprobíhá zde sexování kuřat, ponechávají se společně kohoutci i slepičky. Kuřata jsou již navakcinovaná v líhni proti infekční bronchitidě.

V den návozu je prováděno bakteriologické vyšetření z 10 kuřat náhodně vybraných přímo z přepravek ještě, než přijdou do kontaktu s podestýlkou. Odebírají se směsné vzorky, které jsou transportovány v médiu Amies – pupek, orgány a žloutek. Vzorky jsou odesílány na bakteriologické vyšetření (v době vzorkování podestýlky na vyšetření pro účely tohoto FÚ byly vzorky odeslány do laboratoře VÚVeL).

Přehled vybraných nálezů pro *E. coli* a *Enterococcus faecalis* a fenotypové citlivosti (interpretace dle CLSI, disková difuzní metoda, není známa hodnota MIC) k enrofloxacinu:

Pupek:

Enterococcus faecalis, intenzita růstu primokultivace +++++, k enrofloxacinu citlivý

Orgány:

E. coli, intenzita růstu primokultivace +++, k enrofloxacinu rezistentní

Enterococcus faecalis, intenzita růstu primokultivace ++, k enrofloxacinu citlivý

Žloutek:

E. coli, intenzita růstu primokultivace +++++, k enrofloxacinu rezistentní

Výsledky vyšetření byly známy až po zahájení léčby. Z důvodu klinické účinnosti byl zahájený kurz léčby dokončen.

Dále byly uskutečněny také odběry krve ze shodných utracených kuřat. Krevní sérum je pouze archivováno, aby byla možnost vyšetření některých protilátek v případě potřeby.

Farma se naskladňuje z rodičovských chovů tuzemského producenta, ideálně z jednoho rodičovského chovu.,. Zastavují se současně vždy všechny 4 haly. Kuřata se vyskladňují

z přepravek přímo z aut. Kontroluje se vizuálně kvalita kuřat, posuzuje se uzavřenost pupku a po vysypání z krabic se posuzuje životaschopnost kuřat. Na každé hale se provádí vážení cca 100 ks jedinců – vždy celá bedna. O hodnotách jsou vedeny záznamy. Haly jsou nastaveny na teplotu 33 °C (a adekvátní vlhkost). Na hale s kapacitou 18 000 brojlerů jsou nainstalována 4 čidla, která sledují teplotu, je nastaveno udržování teploty (intenzita ventilace, přísávání vzduchu přes speciální klapky, sprejování chladnou vodou za účelem ochlazování, které probíhá v létě při vysokých vnějších teplotách v poslední fázi výkrmu – dle hlášení termostatických čidel). V průběhu výkrmu je postupně snižována teplota, aby se, co možná nejvíce, přiblížila fyziologickým/produkčním potřebám chovaných zvířat. Doba pobytu v prostorách pro výkrm činí přibližně 37–42 dnů. Je uskutečňováno monitorování i vnější teploty, sledování vlhkosti prostředí a sledování teploty napájecí vody. Regulace světelného režimu (po návozu svítí až 23 hodin, na noc přepnou na noční (modré) světlo (v prvním týdnu noční režim jen hodinu, pak postupně prodlužován). Každý den (i vícekrát, dle potřeby a aktuálního stavu zvířat), jednotlivé haly pečlivě prochází pracovník farmy, který zvířata sleduje a sbírá uhynulé kusy. Je monitorován denní počet úhynů, překročí-li 1 ks/1000 je nutná urychlená akce. V denní pracovní době je celý den na farmě přítomna 1 pracovnice (zootechnička), monitoruje, zda se nevyskytuje problém (např. dle vokalizace, dle chování brojlerů – např. shromažďování v určitých částech haly). Monitoruje se také kanibalismus. Do haly vchází pracovníci v čistých ochranných oděvech – kombinéza, návleky, galoše (před vstupem prochází přes rohož s dezinfekčním roztokem). Každá hala má individuální měření spotřeby vody, vlastní medikátor (de facto kompresor), který je schopen z medikační nádoby, ve které se rozmíchávají léčiva, či aditiva do vody (např. vitamíny) je nasát a rozvést do napáječek.

Odpadové hospodaření s lepenkovým podkladem, podestýlkou (řezaná sláma) a trusem: uskladněno (externě, mimo farmu), následně smícháno s chlévskou mrvou, společně aplikováno na půdu.

Do chovu, ze kterého byly provedeny postupně odběry podestýlky, trusu a lepenek byla naskladněna **kuřata plemene/hybridů ROSS 308**, Naskladněno bylo 18 520 byla jednodenních kuřat o průměrné hmotnosti 35 g.

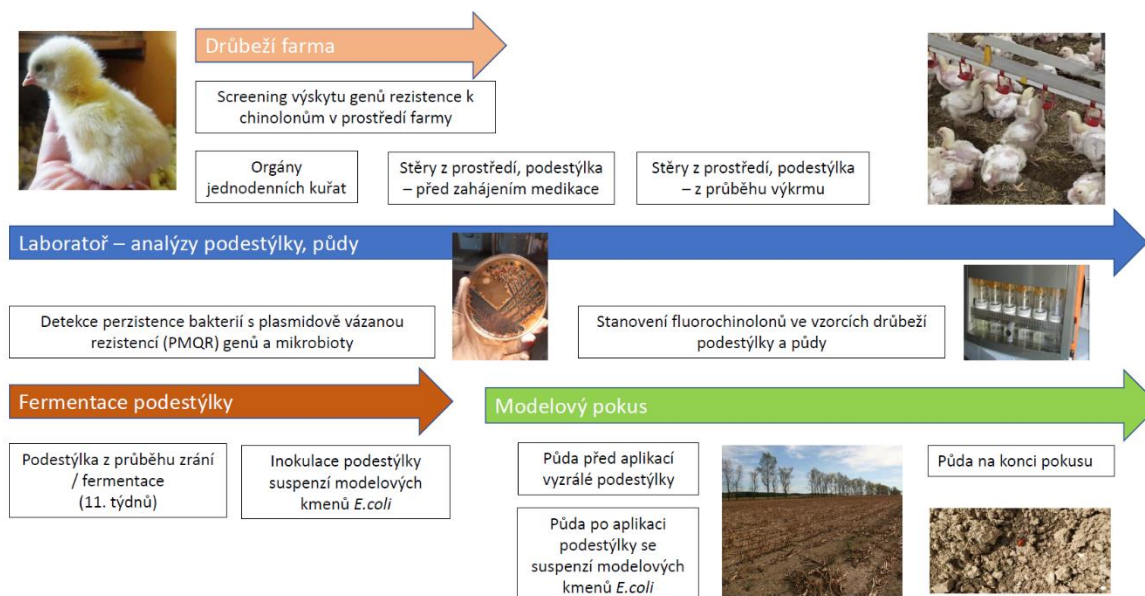
Krmná směs KS BR2, dále si chovatel směs připravuje ve vlastní míchárně, ale pouze v sypké formě. Nemá možnost granulace. Dosahované finální výkrmové hmotnosti (2,02 kg za 40 dnů) jsou tak vzhledem k celkové délce výkrmu poněkud nižší.

Enrofloxacin byl podán v dávce 10 mg/kg živé hmotnosti, použit veterinární léčivý přípravek Roxacin, koncentrát pro podání prostřednictvím medikované napájecí vody (rozmíchává se v objemu 8–10 litrů napájecí vody, podáván 4 dny (metafylakticky od 2. dne života), připravován denně čerstvý). Dávkování 10mg/kg živé hmotnosti a den bylo adjustováno dle počtu zvířat naskladněných na hale a následně dle přírůstků v jednotlivých dnech. Dále podáván Kombisol SeE, Kombisol D, Kombisol AD3E a vitamin C, okyselení Bioferm (kyselina mravenčí), AdiSalmo sol (pokud je bakteriologie pozitivní, aby se nepodávala ATM ve druhé části výkrmu).

Experimentální část

Experimentální část se skládala ze tří úrovní – drůbeží farma, fermentace drůbeží podestýlky a polní pokus. Na farmě byl získán vzorek drůbeží podestýlky k modelovému pokusu fermentace. Dále byl na farmě proveden screening výskytu genů rezistence k chinolonům v prostředí, a to u jednodenních kuřat a podestýlkových papírů z transportních krabic. Fermentace probíhala od 14. 3. do 30. 5. 2023 (celkem 77 dní). Pokusné políčko bylo založeno v areálu zkušební stanice ÚKZÚZ Chrlice, na fluvizemi.² Po aplikaci drůbeží podestýlky byly z testovacího pozemku odebírány v pravidelných intervalech vzorky půdy a vzorek vyšetřené rostliny (svazenka vratičolistá, *Phacelia tanacetifolia*).

² Fluvizemě jsou půdy vznikající v nivách řek a větších potoků při periodickém usazování horizontů. Obecně patří k velmi úrodným půdám, k čemuž přispívá i rovinatý terén, příznivý vodní režim a dobrá obdělavitelnost.



Obrázek 4. Aktivity realizované na farmě a v rámci modelového pokusu

Odběry vzorků z výkrmové haly

Těsně před zahájením výkrmu, dne 27. 3. 2023, byly z haly připravené k naskladnění kuřecích brojlerů odebrány stěry z prostředí (větráky, krmítka, pítka) a podestýlka (sláma). Současně byly odebrány i podestýlkové papíry z boxů sloužících k transportu jednodenních kuřat z líhně, a dále ve spolupráci s dozorujícím veterinárním lékařem byly odebrány orgány z deseti kuřat. První den výkrmu byla také zahájena medikace enrofloxacinem jeho aplikací do napájecí vody. Přibližně dva týdny po zahájení medikace (11. 4. 2023) byly z výkrmové haly odebrány vzorky podestýlky s trusem. Před ukončením výkrmu, cca čtyři týdny od zahájení medikace (25. 4. 2023) byly opakovaně provedeny stěry z prostředí, tj. z větráků, krmítek a pítek a byla odebrána podestýlka s trusem.

Stěry byly provedeny pomocí sterilní polyuretanové stěrové houbičky (World Bioproducts, USA) z celé haly. Podobně odběry vzorků slámy a podestýlky proběhly z celé plochy výkrmové haly, vzorky byly uloženy do PE sáčků a v den odběru předány do laboratoře.

Odběry vzorků z období zrání mrvy

Dne 14. 3. 2023 byla po ukončení turnusu výkrmu únor/březen odebrána drůbeží podestýlka přímo z chovné haly. Tato podestýlka byla určena k aplikaci na pokusný pozemek. Podestýlka v množství 11,3 kg byla rozmělněna na menší kusy, uložena do sudu a inokulována směsí bakteriálních kmenů *E. coli* nesoucích geny rezistence k chinolonům a kolistinu (CT210,

CT267). Zrání podestýlky probíhalo po dobu 11 týdnů. Během zrání byla podestýlka pravidelně zavlažována sterilní deionizovanou vodou. V průběhu procesu zrání byly odebrány celkem čtyři vzorky fermentované podestýlky za účelem stanovení obsahu ENR a CIP a výskytu genů PMQR.

První vzorek podestýlky pro analýzy byl odebrán těsně po rozmělnění podestýlky z celého objemu určeného ke zrání (6 dílčích vzorků). Při odběru druhého až čtvrtého vzorku byla zrající podestýlka lehce promíchána a vzorek asepticky odebrán přímo do PE sáčku z hloubky cca 15 cm. Po odběru byly vzorky buď ihned předány do laboratoře, nebo zamraženy na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a předány později.

Modelový pokus

Modelový pokus byl založen na pozemku zkušební stanice ÚKZÚZ v Chrlících (4 m^2) dne 30. 5. 2023. Drůbeží podestýlka byla na pokusnou plochu aplikována ručně. Aby mohla být vyzrálá podestýlka aplikována rovnoměrně, byla rozmělněna do kašovité konzistence (přídavkem sterilní deionizované vody). Na základě výsledků analýz ze vzorku odebraného dne 9. 5. 2023 byla těsně před aplikací podestýlka inokulována bakteriálními kmeny *Escherichia coli* (CT210 a CT267). Vyzrálá podestýlka byla aplikována v dávce odpovídající normativům uvedeným ve vyhlášce č. 377/2013 Sb., o skladování a způsobu používání hnojiv, v aktuálním znění (tj. při dávce 200 kg N/ha a průměrném obsahu $20,4\text{ kg N/t}$ drůbežního trusu s podestýlkou je aplikováno $0,98\text{ kg hnojiva/m}^2$). Týden po aplikaci (6. 6. 2023) byla plocha oseta svazenkou vratičolistou (*Phacelia tanacetifolia*).

Půda

Na základě analýzy vzorku lze konstatovat, že se jedná se o půdu těžkou, jílovitohlinitou, s neutrálním pH a vysokými až velmi vysokými obsahy přístupných živin. Ve vzorku byly stanoveny také obsahy celkového uhlíku a dusíku. Tyto odpovídají rozpětí pro ornou půdu. Poměr C:N je optimální. Obsahy rizikových prvků jsou vyšší, než jsou mediánové hodnoty pro orné půdy vypočtené z údajů na dlouhodobě monitorovaných plochách (BMP) a z Registru kontaminovaných ploch, nicméně pro fluvizemě jsou vyšší obsahy prvků a látek typické.

Tabulka 3. Agrochemické vlastnosti půdy

pH/CaCl ₂	P	K	Mg	Ca	N _{tot}	TOC
	Přístupné živiny (mg.kg ⁻¹)				%	
7,2	205	413	402	4968	0,18	1,75

Tabulka 4. Celkové obsahy rizikových prvků v půdě na ZS Chrlice a v půdách dlouhodobých programů ÚKZÚZ – v Registru kontaminovaných ploch, RKP a v dlouhodobém monitoringu půd, BMP (lučavka královská, mg.kg⁻¹ suš., půdy ostatní)

	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
Chrlice	11,6	1,40	0,41	17,6	63,0	33,6	48,1	35,7	58,6	124	0,136
RKP	11,8	1,04	0,29	11,6	40,2	21,5	24,2	28,5	48,7	75,8	0,100
BMP (2019)	9,13	0,95	0,24	11,6	38,8	20,1	25,4	25,6	40,5	70,4	0,065

První půdní vzorky ke stanovení enrofloxacinu, ciprofloxacinu a k mikrobiologickým analýzám byly z modelového políčka odebrány těsně před aplikací vyzrálé podestýlky a těsně po její aplikaci.

Další vzorkování proběhlo týden po aplikaci a dále pravidelně v čtrnáctidenních intervalech. Poslední analyzovaný vzorek byl z 12. září 2023. Aby byl pokus co nejblíže podmínkám na poli, byla 6. 6. 2023 na pozemek vyseta svazenka vřetáčovitá (*Phacelia tanacetifolia*).

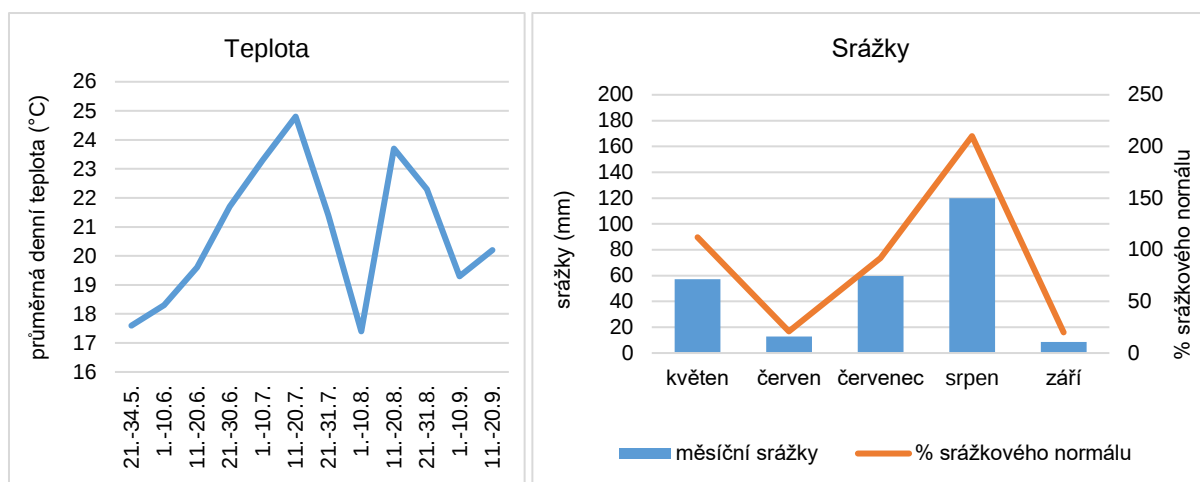
K odběru vzorků sloužil Edelmanův vrták. Z plochy byl odebrán jeden směsný vzorek, který tvořilo 15–18 individuálních vzorků. Na místě byl proveden prosev na 5mm síť. Takto upravený vzorek byl rozdělen na dva, vložen do PE sáčků a pokud možno ihned transportován na MU a VUT.



Obrázek 5. Vrcházející porost svazenky na pokusném pozemku v Chrlicích (30. 6. 2023) a v plné růstu (1. 8. 2023)

Meteorologické podmínky na pokusném pozemku

Na ZS Chrlice je umístěna automatická meteostanice. Podle údajů z této stanice činilo rozpětí teplot od zahájení (30. 5. 2021) do ukončení pokusu (12. 9. 2023) 1,2–35,8 °C, přičemž průběh průměrných teplot v jednotlivých týdnech je graficky zachycen na obrázku 6. Srážkové úhrny činily od 8,7 mm v září po 119,8 mm v srpnu.



Obrázek 6. Průběh průměrných denních teplot a srážek na zkušebním pozemku

Tabulka 5. Přehled základních termínů

týdny (trvání)	datum		vzorky z období VÝKRMU	vzorky z období ZRÁNÍ PODESTÝLKY / FERMENTACE	vzorky z POLNÍHO POKUSU
1		FERMENTACE (14.3-30.5.)		podestýlka	
2					
3	27. 3.		stěry z výkrmové haly, čistá podestýlka (sláma), papíry z líhně		
4	11.4.		podestýlka (sláma) s trusem		
5					
6	19.4.			podestýlka	
7	25.4.		stěry z výkrmové haly, podestýlka (sláma) s trusem		
8					
9	9.5.			podestýlka	
10					
11	23.5.			podestýlka	
12	30. 5.	POLNÍ POKUS (30.5.-12.9.)			půda
13	6. 6.				půda
14					
15	20. 6.				půda
16					
17	30. 6.				půda
18					
19	18. 7.				půda
20					
21	1. 8.				půda
22					
23	15. 8.				půda
24					
25	29. 8.				půda
26					
27	12. 9.				půda

3.1 Mikrobiologická část – část A

Výběr bakteriálních kmenů

Ke sledování přežívání bakterií nesoucích geny rezistence k chinolonům byly vybrány multirezistentní kmeny *E. coli* získané v rámci rutinní praxe mikrobiologické laboratoře MUNI. Jejich charakteristika je uvedena v tabulce 6. V případě kmene *E. coli* CT210 se jednalo o glukuronidáza negativní *E. coli*, kmen CT267 byl glukuronidáza pozitivní. V obou případech se jednalo o kmeny s méně obvyklým vzorcem rezistence k antimikrobikům.

Tabulka 6. Původ a charakteristika modelových kmenů *Escherichia coli*

Označení kmene	Původ	Sérotyp	Geny rezistence	Antibiogram
CT210	kuřecí maso Brazílie	O155:H-	<i>qnrB</i> , <i>mcr1</i>	AMP, CTX, C, S, K, CN, N, Su, SXT, W, TE, NA, CIP, ENR, ATM
CT267	žabí stehýnka Vietnam	O64:H11	<i>qnrS</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>mcr1</i>	AMP, AMC, CTX, C, S, K, CN, Su, SXT, W, TE, NA, CIP, ENR, ATM

AMP – ampicilin, AMC – amoxicilin, CTX – cefotaxim, C – chloramfenikol, S – streptomycin, K – kanamycin, CN – gentamicin, N – neomycin, Su – sulfonamidy, SXT – sulfonamidy/trimetoprim, W – trimetoprim, TE – tetracyklin, NA – kys. nalidixová, CIP – ciprofloxacin, ENR – enrofloxacin, ATM – aztreonam

Příprava inokula

Modelové kmeny *E. coli* CT210 a CT267 byly uchovány ve formě kryokonzerv v hlubokomrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro oživení byly rozmrazeny, vyočkovány na Columbia krevní agar (Labmediaservis, ČR) a inkubovány po dobu 18–24 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

U takto připravených kultur byla ověřena jejich čistota a potvrzena přítomnost genů rezistence metodou PCR. Následně byly kmeny použity pro přípravu inokula. Příprava probíhala samostatně pro každý kmen. Do lahve o objemu min. 500 ml bylo přidáno 300 ml pufrované peptonové vody (PPV, Oxoid, UK), do které byly inokulovány modelové bakteriálními kmeny v množství cca $\frac{1}{4}$ kultury na Petriho misce. Směs byla inkubována 72 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za stálého třepání rychlostí 100 rpm (IKA, D). Po ukončení kultivace byla kontrolně změřena optická denzita (OD) kultur (Denovix, USA), přidáno cca 200 ml sterilní PPV a prodloužena inkubace o dalších 24 h. Po ukončení inkubace byla upravena finální koncentrace bakteriálních kmenů tak, aby se výsledná OD_{600} roztoku rovnala 0,5, což odpovídá přibližně počtu 10^8 KTJ/ml. Z finální suspenze o objemu 1 l byl odebrán 1 ml k archivaci v podobě kryokonzervy, 1 ml

k extrakci DNA (Blood and Tissue kit, Qiagen, UK) a ověření přítomnosti genů metodou PCR a 1 ml k ověření počtu KTJ/ml kultivační metodou.

Zpracování stěrů

Stěry z prostředí farmy byly ihned po transportu do laboratoře zpracovány. K polyuretanové stěrové houbičce bylo přidáno 20 ml PPV a provedena homogenizace na přístroji typu stomacher (Interscience, F). Následně byly vzorky inkubovány při 37 °C po dobu 18–24 h. Z pomnožené PPV byl odebrán 1 ml k extrakci DNA pomocí Blood and Tissue kitu a průkazu genů rezistence metodou PCR a dále byl vzorek vyočkován na půdy Chromatic™ Coliform Agar (Liofilchem, IT) a Chromatic™ ESBL agar (Liofilchem, IT).

Zpracování vzorků podestýlky, půdy a svazenky

Ze vzorků typu podestýlka, podestýlkový papír, půda a svazenka bylo v laboratoři naváženo 25 g a homogenizováno s 225 ml PPV. Z takto připravené suspenze byl odebrán 1 ml k extrakci DNA pro stanovení metagenomu, 1 ml zamražen a 1 ml využit pro přípravu desetinasobného ředění a stanovení počtu kolonie tvořících jednotek (KTJ). Zbylá suspenze byla inkubována při 37 °C po dobu 18–24 h, po ukončení inkubace byl 1 ml použit k extrakci DNA (Blood and Tissue kit) ke stanovení přítomnosti genů rezistence a suspenze byla dále vyočkována na Chromatic™ Coliform Agar a Chromatic™ ESBL agar, oba suplementované kyselinou nalidixovou na koncentraci 16 µg/l (Sigma-Aldrich, N).

Stanovení počtu enterobakterií s rezistencí typu ESBL a současně rezistentních k chinolonům

Stanovení počtu sledovaných kmenů se specifickou rezistencí bylo provedeno ve vzorcích podestýlky, půd a svazenky. Ke stanovení byl použit Chromatic™ ESBL agar suplementovaný kyselinou nalidixovou (16 µg/l). Na povrch média bylo inokulováno 200 µl výchozí suspenze vzorku nebo jeho následného desetinasobného ředění. Stanovení bylo prováděno v duplikátech. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24–48 h. Po ukončení kultivace byl stanoven počet KTJ s typickou morfologií růstu, tj. okrouhlé kolonie růžové barvy s pravidelným okrajem. U vybraných kolonií nebo jejich směsi byla následně provedena konfirmace přítomnosti genů rezistence *qnrB*, *S*, *aac(6')-Ib-cr* a *mcr1*.

Příprava DNA z bakteriálních kultur

DNA z bakteriálních kultur byla získána lýzou varem. Suspektní kolonie byly promyty v 1 ml fyziologického roztoku, poté odstředěny při 11 000 ot./10 min. Po slití supernatantu a přidání 200 µl sterilní destilované vody byl vzorek inkubován v suché lázni při teplotě 95 °C/20 min, odstředěn při 12 000 ot./6 min a supernatant byl použit jako templát pro PCR.

Stanovení přítomnosti genů PMQR

Přítomnost genů kódujících Qnr proteiny *qnrA*, *qnrB* a *qnrS* (Cattoir et al. 2007; Gay et al. 2006), aminoglykosid acetyltransferázu *aac(6')Ib-cr* (Park et al. 2006), efluxní pumpu *qepA* (Yamane et al. 2008) a rezistenci ke kolistinu *mcr1* (Liu et al. 2016) byla testována metodou PCR. K amplifikaci byl použit QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagene, D) a vlastní reakční cyklus byl převzat z předchozích studií (Cattoir et al. 2007; Gay et al. 2006; Park et al. 2006). Templátová DNA byla připravena dle typu vzorku buď lýzou varem (bakteriální kultury) nebo extrakčním kitem. Přítomnost případných inhibitorů PCR byla limitována naředěním extrahované DNA v poměru 1:10 sterilní vodou pro PCR (Top-Bio, ČR). Vlastní PCR produkt byl po amplifikaci obarven barvivem MIDORI Green Advance (Nippon, D) a vizualizován UV světlem.

Tabulka 7. Primery použité ve studii – jejich sekvence a zdrojová literatura

Název primer	Gen	Sekvence (5´-3´)	Velikost produktu (bp)	Reference
QnrAm-F	qnrA	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	580	Cattoir et al. (2007)
QnrAm-R		TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC		
QnrBm-F	qnrB	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG	264	
QnrBm-R		TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA		
QnrS-1	qnrS	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA	428	Gay et al. (2006)
QnrS-2		TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC		
aac(6´)Ib-F	aac(6´)Ib	TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA	482	Park et al. (2006)
aac(6´)Ib-R		CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT		
QEPA-F	qepA	GCA GGT CCA GCA GCG GGT AG	199	Yamane et al. (2008)
QEPA-R		CTT CCT GCC CGA GTA TCG TG		
CLR5-F	mcr-1	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	309	Liu et al.(2016)
CLR5-R		CTTGGTCGGTCTGTAGGG		

Extrakce DNA pro stanovení metagenomu

Z vybraných vzorků podestýlky z experimentu fermentace a půd z polního pokusu byla izolována DNA pro stanovení metagenomu. Použit byl kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Microprep (Zymo Research, USA) a postupovalo se dle instrukcí výrobce.

Analýza metagenomu vzorků drůbeží podestýlky a půd

Knihovna 16S rRNA ampliconů byla připravena podle 16S Metagenomic Sequencing Library preparation Protocol (Illumina). Variabilní region 16S rRNA V3-V4 byl amplifikován pomocí degenerovaných primerů s mezeríkovými sekvencemi (tzv. spacers) pro zvýšení diverzity knihovny. Amplicony byly přečištěny a indexovány dle protokolu Illumina. Finální knihovny byly poolovány a ředěny na finální koncentraci 8pM, a následně smíchány s PhiX (20 %). Finální knihovna byla sekvenována pomocí Miseq reagent kit V3 na stroji MiSeq 2000 instrument podle návodu výrobce. Po sekvenaci byly ready demultiplexovány ve stroji a výsledné fastq soubory analyzovány in-house pipeline, která využívala DADA2 algoritmu. Upravené ready byly srovnány s databází SILVA a taxonomicky určeny.

3.2 Analytická část – část B

V rámci provedeného experimentu byly analyzovány dva typy vzorků – kuřecí podestýlka a půda po aplikaci fermentované podestýlky. Všechny vzorky byly po odebrání do doby analýzy uskladněny v mrazícím boxu při -80 °C.

Použité materiály a chemikálie

Milli-Q voda; voda pro LC/MS, filtrovaná na 0,2 µm (VWR); acetonitril čistoty min. 99,9 % pro LC-MS (VWR); methanol čistoty min. 99,9 % pro LC-MS (VWR); kyselina mravenčí čistoty min. 98% , (Sigma Aldrich), kyselina citronová monohydrát čistoty min. 99,5 % (Lach-Ner); hydrogenfosforečnan disodný čistoty min. 98 % (Lach-Ner); Chelaton III dihydrát čistoty min 99 % (Lach-Ner); dusičnan hořečnatý $Mg(NO_3)_2 \times 6H_2O$ (VWR); 25% vodný roztok amoniaku (VWR); enrofloxacin čistoty min. 99 %, CRM (Sigma Aldrich); ciprofloxacin čistoty min. 98%, CRM (Sigma Aldrich); enrofloxacin – d5 hydrochloride čistoty min. 99 % (Sigma Aldrich); Ciprofloxacin - d8 hydrochloride hydrate čistoty min. 99 % (Sigma Aldrich).

Použité laboratorní vybavení

Přístroj pro přípravu Milli-Q vody Milli-Q Millipore, Academic; kapalinový chromatograf UHPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies; kolona (Luna® Omega Polar C18 Phenomenex, 100 x 2.1 mm; 1.6 µm); hmotnostní spektrometr Bruker Evoq LC/TQ; Analytické váhy Kern 770; zařízení pro sušení dusíkem Evaterm, Labicom; ultrazvuková lázeň Kraitex 5; centrifuga Eppendorf 5804; centrifuga EBA 20, Hettich Zentrifugen; vortex; automatické mikropipety; PP zkumavky 50 ml a 15 ml; stříkačkové nylonové filtry 0,22 µm (Chromservis); stříkačky pro filtrování; SPE vacuum Manifold, Sigma Aldrich; SPE kolonky EnviroHLB (200 mg, 6 ml) (Chromservis); běžné laboratorní sklo a pomůcky

Metoda přípravy vzorků pro stanovení fluorochinolonů v podestýlce

Byl navážen 1 g zhomogenizovaných a rozmělněných vzorků podestýlky do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Následně byly k podestýlkám přidány extrakční činidla: EDTA s navázkou 0,6 g, pufr pH 6 a ACN o objemu 7,5 ml, roztok $Mg(NO_3)_2$ o objemu 4,8 ml a 0,2 ml 2,5% roztoku NH_3). Takto připravené směsi byly promíchány 30 sekund na vortexu, následně ihned vloženy na 10 min do ultrazvuku při teplotě 35 °C. Po extrakci byly vzorky odstředěny pomocí centrifugy nastavené na 4 800 otáček za minutu, po dobu 8 min. Extrakt byl slit do vialky o objemu 30 ml. Extrakce byla provedena ještě jedenkrát s polovičními objemy extrakčních činidel a bez přídavku EDTA (pufr pH=6 a ACN o objemu 3,75 ml, roztok $Mg(NO_3)_2$ o objemu 2,4 ml a 0,1 ml 2,5% roztoku NH_3) a supernatanty byly slity do vialky k předchozím supernatantům.

Z extraktu byly odebrány 2 ml extraktu, byly odpařeny do sucha a znovu rozpuštěny v 1 ml směsi 0,1% $HCOOH:ACN$ 5:95. Do všech roztoků byla přidána směs vnitřních standardů deuterovaného ciprofloxacinu a enrofloxacinu v množství 100 ng/10 µl. Následně byla provedena filtrace přes stříkačku s nylonovým filtrem o velikosti pórů 0,22 µm do vialky se septem. Vzorek byl proměřen pomocí LC/MS/MS a množství analytů bylo určeno pomocí kalibrace na základě poměru intenzity signálu analytu a příslušného vnitřního standardu. Analýza každého vzorku byla provedena třikrát. Výtěžnost metody byla testována na koncentracích 2,5; 5; 25 a 50 µg/kg. Bylo dosaženo výtěžnosti 90–130 %.

Tabulka 8. Limity detekce a kvantifikace metody pro analýzu podestýlky

	CIP [µg/kg]	ENR [µg/kg]
LOD	129	105
LOQ	357	321

Metoda přípravy vzorku pro stanovení fluorochinolonů v půdě

Do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml byl navážen 1 g vzorek zhomogenizované a rozmělněné půdy. K půdám ve zkumavkách byly přidány vybraná extrakční činidla: 0,6 g Na₂EDTA, 7,5 ml McIlvane pufr pH 6; 7,5 ml ACN; 4,8 ml roztoku Mg(NO₃)₂·6H₂O o koncentraci 0,5 g/ml a 0,2 ml 2,5% roztoku NH₃. Takto připravené směsi byly promíchány pomocí vortexu po dobu 30 sekund a následně vloženy na 10 minut do ultrazvuku vyhrátého na teplotu 35 °C. Po extrakci byly vzorky vloženy do centrifugy na 4800 otáček za minutu po dobu 8 minut. Potom byl supernatant slit do kádinky o objemu 600 ml. Extrakce byla provedena ještě jedenkrát s polovičními objemy extrakčních činidel bez přídavku Na₂EDTA (3,75 ml McIlvane pufr pH 6; 3,75 ml ACN; 2,4 ml roztoku Mg(NO₃)₂·6H₂O o koncentraci 0,5 g/ml a 0,1 ml 2,5% roztoku NH₃). Na konci byly oba supernatanty slity spolu do kádinky a za účelem naředění organické fáze před SPE k nim bylo přidáno 480 ml Milli-Q vody.

Pro takto připravené roztoky o objemu cca 500 ml bylo provedeno SPE pomocí kolonek EnviroHLB (200 mg; 6 ml). Nejprve byly HLB kolonky kondicionovány 6 ml methanolu, následně 6 ml Milli-Q vody. Po kondicionaci byla připojena hadička pro provedení SPE vzorku z kádinky. Následoval proplach 15 ml Milli-Q vody. SPE kolonka byla vysušena podobu cca 2 min. Eluce proběhla do 20 ml vialky pomocí 9 ml 0,1 % kyseliny mravenčí v methanolu. Takto získaný eluát byl následně sušen po dusíkem na minimální zbytkový objem.

K vysušenému vzorku bylo následně přidáno 990 µl 0,1% HCOOH ve směsi 5:95 (ACN:H₂O) a 10 µl vnitřního standardu o koncentraci 10 µg/ml. Nakonec byla provedena filtrace přes stříkačku s nylonovým filtrem o velikosti pórů 0,22 µm do vialky pro měření vzorku pomocí metody LC/MS/MS. Výtěžnost metody byla testována na koncentracích 25, 50, 100 a 500 µg/kg. Bylo dosaženo výtěžnosti 70–120 %.

Tabulka 8. Limity detekce a kvantifikace metody pro analýzu půdy

	CIP [µg/kg]	ENR [µg/kg]
LOD	0,5	0,6
LOQ	1,4	1,8

Tabulka 9. Parametry metody pro kapalinový chromatograf

UPLC parametry		
Objem nástřiku	7 µl	
Průtok mobilní fáze	0,5 ml·min ⁻¹	
Teplota	35 °C	
Mobilní fáze	A: 0,1 % HCOOH ve vodě	
	B: Acetonitril	
Gradient mobilní fáze	t [min]	B [%]
	0,0	10
	0,5	10
	13,00	65
	13,10	95
	15,50	10
	15,90	10
Oplach jehly	ACN:H ₂ O 90:10 s 1 % kyselinou mravenčí 2 min	

Tabulka 10. Parametry metody pro hmotnostní spektrometr

Iontový zdroj	elektrosprej (HESI)
Napětí	4 500 V
Polarita	positive (ESI+)
Průtok pomocného plynu	15
Teplota pomocného plynu	350 °C
Průtok sušícího plynu	25
Teplota sušícího plynu	500 °C
Průtok zmlžovacího plynu	45
Aktivní odťah	ON
Režim skenu	MRM
Tlak kolizního plynu	1,5 mTorr

Tabulka 11. MRM přechody pro ciprofloxacin a enrofloxacin a jejich deuterované standardy (IS)

		RT (min)	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Kolizní energie (eV)
Ciprofloxacin	kvant. přechod	3,30	332,4	314,20	10
	kval. přechod	3,30	332,4	288,20	10
Enrofloxacin	kvant. přechod	3,74	360,4	316,2	10
	kval. přechod	3,74	360,4	342,20	20
Ciprofloxacin Deut.	kvant. přechod	3,30	340,4	322,1	15
	kval. přechod	3,30	340,4	296,1	15
Enrofloxacin Deut.	kvant. přechod	3,74	365,4	321	10
	kval. přechod	3,74	365,4	346,8	20

3.3 Metodika sledování spotřeb antimikrobik – část C

Byla využita data dostupná ÚSKVBL z oficiálního národního programu sledování prodeje veterinárních antimikrobik (sloužící jako podklady pro hlášení ESVAC) a dále pro získání informací pro provedení kvalifikovaného odhadu používání vůči celkovým prodejem vzorek farem drůbeže reprezentující přibližně 30% produkce sektoru v ČR (data Q12022 a Q1 2023 a informace z pilotního projektu startifikace spotřeb antimikrobik u majoritních species zvířat z roku 2016).

Byly zhodnoceny prodeje specificky pro enrofloxacin. Jednak z VLP registrovaných pouze pro drůbež (kur domácí, případně kur domácí a krůty), kde lze důvodně předpokládat, že veškeré finální použití lze alokovat do sektoru drůbeže.

Dále byly využity kvalifikované odhady pro vyjádření objemů VLP s enrofloxacinem, které lze alokovat jako spotřeby u kura a krůt u VLP, které jsou registrovány i pro cílový druh prase, případně i telata skotu, či (výjimečně) i jiné species. V případě enrofloxacinu byl určen koeficient 85 % spotřeb alokovaných do sektoru drůbeže, u většiny dalších léčivých látek byl použit zjednodušený výpočet vycházející z poměru PCU (populačně korekční jednotku, vyjádřenou v 1 000 tun) a to pro skupinu drůbež a skupinu prasata. Kde za rok 2021 poměr činil 135 (drůbež, kde je výpočet proveden z hodnot pro kura a krůty) ku 202 (prasata všech

produkčních kategorií). Na drůbež bylo tedy finálně alokováno 40 % spotřeb (kur, krůty, husy, kachny, křepelky, perličky, bažanti) a na prasata 55 % a zbytek (přibližně 5 %) byl alokovan na další minoritní použití u dalších species či produkčních kategorií, pro které jsou předmětné antimikrobní VLP registrovány (telata, výjimečně také ovce, králíci či jiná zvířata). Přepočet spotřeb s koeficientem 40 % byl využit pro kalkulace spotřeb následujících léčivých látek: amoxicilin, doxycyklin, linkomycin, spektinomycin, neomycin, sulfamethoxazol (vybrané VLP v kombinaci s trimethoprimem), tiamulin, tilmikosin, tylosin.

Specifické koeficienty přepočtu byly zvoleny pro vybrané látky (a tyto látky obsahující VLP), pro které je znám jiný poměr. Pro tyto účely byl využit projekt stratifikace 2016 a též data 1Q 2022 a 1Q 2023 pokrývající přibližně 30 % sektoru chovů brojlerů kura domácího. Pro následující léčivé látky byl využit přepočet s odpovídajícím koeficientem (příslušné procento spotřeby přímo pro drůbež) následovně: kolistin (20 %), enrofloxacin (85 %), florfenikol (10%), chlortetracyklin (5 %), oxytetracyklin (5 %).

S ohledem na skutečnost, že zátěž půdy může kromě primárního a poměrově významnějšího vstupu ze spotřeby antimikrobik ze zemědělství, pocházet částečně ze vstupu v důsledku používání antimikrobik ve zdravotnictví (zejména prostřednictvím zavlažovací vody a kalů), byla rovněž doplněna data ukazující na srovnání spotřeb v humánní a veterinární medicíně. Tato data citují zprávu JIACRA IV, do které byla poskytnuta data i za ČR, jak z veterinární, tak humánní medicíny a v tomto ohledu jsou zhodnocena data za rok 2021, Tato data jsou zaměřena na fluorochinolony a chinolony (s vědomím, že jsou v obou oblastech používány různé léčivé látky- zástupci skupin fluorochinolonů a chinolonů, přičemž ciprofloxacin je používán jako léčivá látka v HLP, zatímco ve VLP u drůbeže je používán enrofloxacin, který je v tělech zvířat z části metabolizován na ciprofloxacin. I přesto, že v této zprávě není věnována pozornost exaktně spotřebám jednotlivých léčivých látek, není tento fakt na závadu, jelikož v rámci skupiny fluorochinolonů je prokázána zkřížená rezistence (s několika individuálními výjimkami při posouzení starší a novější generace flurochinolonů).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Mikrobiologická část – část A

Průkaz genů plazmidově vázané rezistence k chinolonům na farmě

Výskyt vybraných genů kódujících plazmidově vázanou rezistenci k chinolonům na farmě byl sledován v období jednoho výkrmového turnusu. Celkem bylo odebráno 13 vzorků v různých fázích výkrmu. Vzorky prostředí, konkrétně podestýlka a stěry z vnitřního vybavení (větráky, pítka a krmítka) byly odebírány před zahájením nového turnusu výkrmu, tj. po pravidelném úklidu, dezinfekci a deratizaci haly, a následně na konci výkrmu. V průběhu turnusu byl dále odebrán jeden vzorek podestýlky. Přítomnost genů PMQR byla také sledována v orgánech deseti jednodenních kuřat a v podestýlkových papírech z transportních krabic.

Tabulka 12. Sledování přítomnosti vybraných genů rezistence ve vzorcích z farmy

Číslo vzorku MUNI	Datum odběru	Typ vzorku	Popis vzorku	Průkaz genů rezistence po pomnožení					
				<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>	<i>aac</i>	<i>mcr1</i>
237/23	27.03.2023	jednodenní kuřata	žloutkový vak	-	+	+	+	-	-
238/23	27.03.2023		pupek	-	+	+	+	-	-
239/23	27.03.2023		orgány	-	+	+	+	-	-
236/23	27.03.2023		podestýlkový papír	-	-	+	-	-	-
240/23	27.03.2023	prostředí za začátku výkrmu	krmítko	-	+	+	-	+	-
241/23	27.03.2023		větrák	-	-	+	-	+	-
242/23	27.03.2023		pítka	-	+	-	-	+	-
243/23	27.03.2023		sláma (čistá)	-	+	-	-	-	-
301/23	11.04.2023	prostředí v průběhu výkrmu	podestýlka z výkrmové haly, kuřata 15 dní	-	+	+	+	-	-
372/23	25.04.2023	prostředí na konci výkrmu	větrák	-	+	+	-	+	-
373/23	25.04.2023		krmítko	-	+	+	-	+	-
374/23	25.04.2023		pítka	-	+	+	-	+	-
375/23	25.04.2023		podestýlka z výkrmové haly, kuřata 29 dní	-	+	-	-	-	-

aac = *aac(6')-Ib-cr*, – negativní, + pozitivní

Nejčastěji byly detekovány geny *qnrB* (11/13) a *qnrS* (10/13), a to jak u vzorků orgánů kuřat, tak v prostředí farmy. Gen *aac(6')-Ib-cr* byl detekován pouze v prostředí výkrmové haly, a to v podestýlce i ve stěrech z vnitřního vybavení před naskladněním kuřat i na konci výkrmu. Gen pro efluxní pumpu *qepA* byl prokázán u vzorků orgánů uhynulých kuřat a v podestýlce v průběhu výkrmu. V žádném z testovaných vzorků nebyly zjištěny geny *qnrA* a *mcr1*. Kombinace genů, prokázaných v jednotlivých typech vzorků jsou uvedeny v tabulce 12.

Qnr proteiny byly uváděny jako nejčastější typ plazmidově vázané rezistence k chinolonům. Dosud bylo popsáno asi 100 variant genů *qnr*, které jsou rozděleny do 5 různých rodin: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* a *qnrS* (Strahilevitz et al. 2009). Mezi nejrozšířenější patří geny *qnrA*, *qnrB* a *qnrS*, které byly zaznamenány nejen u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, ale také *Aeromonadaceae* nebo *Vibrionaceae* (Marti, Balcázar, 2012). Dominantní nález *qnrB* a *qnrS* genů v naší studii, je shodný s výsledky studie autorů Röderová et al. (2017), provedené v letech 2013 až 2014 v ČR, kdy geny PMQR byly detekovány u 10,9 % (17/156) izolátů *E. coli* ze vzorků prostředí drůbežích farem a až u 48,6 % (51/105) *E. coli* izolovaných z kloakálních výtěrů krůt odebíraných při jatečném zpracování. U obou typů vzorků převažoval výskyt genů *qnrS* a *qnrB*, zatímco nález ostatních genů jako např. *qepA* nebo *aac(6')-Ib-cr*, na rozdíl od našich výsledků, prokázán nebyl. Gen *aac(6')-Ib-cr* byl ale ve zmíněné studii prokázán u 27,3 % (60/220) izolátů *E. coli* z humánní populace, a dále v odpadních vodách (4/90; 4,4 %).

V Evropě byl proveden screening výskytu plazmidově vázané rezistence k chinolonům u izolátů salmonel a *E. coli* získaných v letech 1994 až 2009 od zvířat, lidí, potravin a prostředí (Veldman et al. 2011). Geny PMQR neslo 59 % izolátů salmonel (zejména geny *qnrS* a *qnrB*) a 15 % izolátů *E. coli* (především gen *qnrS*). Salmonely nesoucí geny PMQR izolované z drůbeže byly zjištěny v Belgii, Dánsku, Finsku, Německu, Itálii, Polsku, Španělsku a Nizozemí. V případě *E. coli*, byly izoláty k dispozici pouze ze čtyř zemí a pozitivní nálezy genů PMQR byly zaznamenány v Polsku a Nizozemí. Přestože jsou uvedené výsledky ovlivněny různými faktory, počty izolátů získaných z různých zdrojů dostupných v jednotlivých zemích ukazují, že chovy drůbeže jsou v Evropě hlavním zdrojem genů PMQR.

V Brazílii, byl v rámci screeningu 200 izolátů bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (více jak 90 % *E. coli*, *E. fergusonii*, *K. oxytoca* a *K. pneumoniae*) ze zdravých kuřat pocházejících ze dvou různých farem prokázán výskyt genů PMQR u 23 % izolátů. Dominantní zastoupení měl gen *qnrB* (43/200), s ojedinělým výskytem genů *qnrS* (2/200) a *aac(6')-Ib-cr* (1/200). Všechny izoláty nesoucí geny PMQR byly multirezistentní a vykazovaly současně také ESBL typ rezistence (Ferreira et al. 2018). Podobně bylo v Číně prokázáno, že léčba salmonelových infekcí u kuřat enrofloxacinem vedla v trávicím traktu kuřat nejen k selekci izolátů *E. coli*

rezistentních k fluorochinolonům, ale současně také k beta-laktamům a tetracyklinu (Li et al. 2019).

Modelový pokus přežívání *E. coli* s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům při fermentaci drůbeží podestýlky

Pokus probíhal s podestýlkou odebranou na farmě drůbeže na konci výkrmu (14. 3. 2023). Inokulace proběhla dne 27. 3. 2023 jedním litrem suspenze kmenů *E. coli* s rezistencí typu ESBL a PMQR v denzitě $3,25 \times 10^8$ KTJ/ml. Fermentace probíhala celkem 77 dní.

Tabulka 13. Stanovení počtu modelových kmenů *Escherichia coli* a průkaz genů rezistence v průběhu pokusu fermentace drůbeží podestýlky

Číslo vzorku MUNI	Datum odběru	Popis vzorku	Stanovení počtu modelových <i>E. coli</i>	Průkaz genů rezistence	
				konfirmace stanovení počtu	po pomnožení
244/23	14.03.2023	podestýlka k fermentaci	<50 KTJ/g	-	<i>qnrB</i>
353/23	19.04.2023	podestýlka zaočkovaná kmeny, výsledek po 21 dnech fermentace (inokulace 29.3.)	350 KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
454/23	09.05.2023	podestýlka zaočkovaná kmeny, výsledek po 41 dnech fermentace (inokulace 29.3.)	50 KTJ/g	<i>qnrS, aac, mcr1</i>	<i>qnrB, aac</i>
506/23	23.05.2023	podestýlka zaočkovaná kmeny, výsledek po 55 dnech fermentace (inokulace 29.3.)	<50 KTJ/g	-	<i>qnrB, aac</i>

aac = *aac(6')-Ib-cr*

V průběhu pokusu byly odebrány 4 vzorky. První z nezaočkované podestýlky, dva z průběhu fermentace a jeden na konci pokusu před aplikací fermentované podestýlky na pole. Z tabulky 13 vyplývá, že před inokulací bakteriálními kmeny nebyly v podestýlce přítomny žádné enterobakterie nesoucí podobnou rezistenci jako modelové kmeny. Přítomnost sledovaných genů rezistence nebyla potvrzena ani po pomnožení vzorku, s výjimkou genu *qnrB*. Po 41 dnech fermentace byla při stanovení počtu detekována pouze jedna kolonie *E. coli*, která svojí charakteristikou odpovídala modelovému kmeni CT267. Výskyt genů *qnrS* a *mcr1* ale nebyl potvrzen ve vzorku PPV po pomnožení. To potvrzuje skutečnost, že bakteriální kmeny nejsou

ve vzorku distribuovány rovnoměrně a vyšetření je proto vhodnější provádět více metodami nebo v duplikátech.

V posledním vzorku podestýlky, odebraném 55 den po inokulaci, nebyly modelové kmeny ani příslušné geny rezistence prokázány. Vzorek byl ale pozitivní na přítomnost genů *qnrB* a *aac(6')-Ib-cr*.

Fermentace je složitý biochemický proces, při kterém dochází k částečnému odbourávání jednotlivých složek chlévské mrvy. Délka doby zrání se liší a v závislosti na ročním období trvá asi 2–3 měsíce (Richter et al. 2004). Podle teploty, které podestýlka v průběhu zrání dosahuje, lze proces rozdělit na mezofilní (30–50 °C) a termofilní (50–70 °C). Oba postupy se liší nejen teplotou, ale jak bylo zjištěno v nedávné studii autorů Wang et al. (2022) také složením mikrobiomu a vlivem na přetrvávání genů rezistence. Během mezofilního procesu (např. zrání hnoje na hromadách) došlo ve zmíněné studii ke zvýšení množství sledovaných genů rezistence. Naproti tomu proces, kdy v průběhu zrání se teplota zvýšila až na 70 °C, vedl k vymizení až 97 % genů rezistence. Bylo prokázáno, že klíčovým faktorem ovlivňujícím obsah genů rezistence byla teplota, kdy vyšší teplota přímo snižovala nejen množství rezistentních bakterií, detekovatelných genů rezistence, ale také množství mobilních genetických elementů. Drůbeží podestýlka využívaná ke hnojení je považována za hlavní zdroj fluorochinolonů v zemědělských půdách. Sorpce fluorochinolonů k pevným částicím patří k hlavním mechanismům jejich šíření v prostředí a může se lišit v závislosti na různých typech matrice. Leal et al. (2012) prokázal, že sorpční potenciál fluorochinolonů v drůbeží podestýlce (rýžová sláma a borovicové hoblíny) byl vysoký (sorpce nejméně 69 % aplikovaného obsahu), ale přesto byl výrazně nižší než v půdě. Nižší afinitu fluorochinolonů v drůbeží podestýlce autoři vysvětlují nižším množstvím sorpčních míst a mírně alkalickým pH. V úvahu je navíc třeba brát i různé typy drůbeží podestýlky používané v zemědělské praxi. Gupta et al. (2021) ve studii o účincích růstových a terapeutických antibiotik na dynamiku mikrobiomu a rezistomu v kuřecích kloakálních výtěrech a podestýlce prokázal různé účinky při použití enrofloxacinu. Relativní množství genů kódujících rezistenci k chinolonům v kloakálních výtěrech se zvýšilo po terapii enrofloxacinem, ale v podestýlce byl pozorován opačný účinek. To naznačuje, že výskyt enrofloxacinu v kuřecím střevě podporoval selekci rezistentních bakterií a výskyt genů PMQR, ale následně nedošlo ke stejnému efektu v podestýlce. Obecně terapie enrofloxacinem zvyšovala v obou případech relativní množství multirezistentních kmenů *Enterobacteriaceae*, a to primárně *E. coli*.

Modelový pokus přežívání *E. coli* s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům v půdě

Fermentovaná podestýlka pro polní pokus byla těsně před aplikací opakovaně inokulována nově připravenou suspenzí modelových kmenů *E. coli* CT210 a CT267 v denzitě $1,1 \times 10^8$ KTJ/ml v objemu jeden litr. Přežívání kmenů bylo sledováno po dobu 15 týdnů. V rámci sledování byl v pravidelných intervalech odebrán vzorek půdy a po 9 týdnech také vzorek z nadzemní části vyšetě vegetace (svazenka).

Přítomnost kmenů s podobnou charakteristikou jako byly modelové *E. coli* nebyla ve vzorku půdy z polního pokusu, odebraného před zahájením experimentu, potvrzena. Prokázána byla pouze přítomnost genů *qnrB* po pomnožení vzorku v pufrované peptonové vodě. Přehled odebraných vzorků, výsledků stanovení počtu modelových kmenů a detekovaných genů rezistence uvádí tabulka 14.

Tabulka 14. Stanovení počtu modelových kmenů *Escherichia coli* v průběhu polního pokusu

Číslo vzorku MUNI	Datum odběru	Popis vzorku	Stanovení počtu modelových <i>E. coli</i>	Průkaz genů rezistence	
				konfirmace stanovení počtu	po pomnožení
513/23	30.05.2023	půda před aplikací	<50 KTJ/g	-	<i>qnrB</i>
514/23	30.05.2023	půda ihned po aplikaci	15000 KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
516/23	06.06.2023	půda 7 dní po aplikaci	10000 KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
536/23	20.06.2023	půda 3 týdny po aplikaci	7000 KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
601/23	30.06.2023	půda 5 týdnů po aplikaci	5000 KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
635/23	18.07.2023	půda 7 týdnů po aplikaci	1000 KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
668/23	01.08.2023	půda 9 týdnů po aplikaci	2750 KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
669/23	01.08.2023	svazenka nadzemní část	<50 KTJ/g	-	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
674/23	15.08.2023	půda 11 týdnů po aplikaci	150 KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS</i>
674/23	29.08.2023	půda 13 týdnů po aplikaci	<50 KTJ/g	-	<i>qnrB, qnrS</i>
702/23	12.09.2023	půda 15 týdnů po aplikaci	<50 KTJ/g	-	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>

aac = *aac(6')-Ib-cr*

Z výsledků vyplývá, že do 7. týdne od založení pokusu docházelo k pozvolnému snižování počtu KTJ modelových kmenů v gramu půdy. V 9. týdnu je patrný mírný nárůst počtu KTJ/g, zřejmě z důvodu období dešťových srážek, které předcházely vlastnímu odběru. Od tohoto

týdne ale kultivačně prokazatelný počet KTJ/g klesal strmě a od 13. týdne se počet pohyboval pod mezí detekce zvolené metody.

Geny rezistence typické pro modelové kmeny byly detekovány v pomnoženém vzorku až do 9. týdne. V 11. týdnu byly prokázány pouze u kmenů získaných kultivační metodou a v 15. týdnu pouze u vzorku po pomnožení. Tyto výsledky ukazují, že kmeny v půdě přežívají dlouhodobě, uchovávají si schopnost rezistence, ale jsou distribuovány nerovnoměrně. To je zřejmě důvod proč, ve 13. týdnu detekovány nebyly, ale v 15. týdnu byly sledované geny zachyceny ve vzorku po jeho pomnožení.

I další studie uvádí, že bakterie rezistentní k flurochinolonům a geny PMQR mohou v prostředí perzistovat až po dobu několika měsíců. Za laboratorních podmínek bylo metodou qPCR prokázáno, že relativní množství genů PMQR (*oqxA*, *oqxB*, *aac(6')-Ib-cr* a *qnrS*) se v zemědělské půdě významně snížilo až za dva měsíce po aplikaci prasečího hnoje (Xiong et al. 2015a). Snížení četnosti bakterií v důsledku přítomnosti antibiotik a jejich reziduí v půdě může vést ke špatné adaptaci bakterií z hnoje na půdní prostředí, čímž může být ovlivněn také výskyt a zastoupení genů antibiotické rezistence. Složení půdního mikrobiomu se může lišit v závislosti na obsahu fluoroquinolonů v půdách. Ve studii Huang et al. (2016) bylo zjištěno, že aplikace hnoje s nízkými koncentracemi ciprofloxacinu (0,04 a 0,4 mg/kg) vedla ke zvýšení relativní četnosti bakterií patřících do kmene *Actinobacteria* a tříd *Bacilli*, *Clostridia* a *Gammaproteobacteria*, které zahrnují i enterobakterie, a naopak inhibovala *Acidobacteria* a *Halophaga*. Xiong et al. (2015b) v laboratorních podmínkách prokázal, že aplikace fluoroquinolonů (enrofloxacin, ciprofloxacin a norfloxacin) do půdy o koncentraci 5 mg/kg poskytla selektivní výhodu pro bakteriální kmeny *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* a *Planctomycetes*, zatímco růst *Proteobacteria* a *Actinobacteria* byl potlačen. Tuo et al. (2018) ve své studii určil, že hlavními faktory, které ovlivnily změny v zastoupení genů PMQR a mobilních genetických elementů v půdě, jsou pH a složení mikrobiální komunity. V půdách s kontaminací ciprofloxacinem v koncentraci 20 mg/kg byla v uvedené studii zjištěna nižší četnost genů PMQR. V Brazílské studii zaměřené na sledování vlivu krátkodobé a dlouhodobé fertilizace zemědělské půdy drůbeží podestýlkou (<1–30 let) byly zjištěny vysoké koncentrace fluoroquinolonů v drůbeží podestýlce (0,56–100 mg/kg), akumulační trend mezi krátkodobě a střednědobě hnojenými půdami, následovaný poklesem jejich koncentrací u dlouhodobě hnojených půd a také přítomnost genu *qnrS* v půdě (Parente et al. 2019). Aktuálně byl také prokázán negativní vliv fluoroquinolony kontaminované drůbeží podestýlky na populaci žížal, které hrají významnou roli při mineralizaci organické matrice a udržování půdní porosity, a jsou

indikátorem kvality půdy (Parente et al. 2021). Polní experiment realizovaný za účelem vyhodnocení vlivu rozmetání drůbeží podestýlky obsahující enrofloxacin a jeho metabolit ciprofloxacin na počty bakterií čeledě *Enterobacteriaceae* rezistentních k ciprofloxacinu v půdě prokázal, že bakterie *E. coli* rezistentní k ciprofloxacinu přetrvávaly v půdě po dobu nejméně tří měsíců (Pourcher et al. 2014). V námi provedené studii byly kmeny detekovatelné kultivační metodou necelé 2,5 měsíce (11 týdnů) po inokulaci, geny ale byly prokazatelné i 3,5 měsíce (15 týdnů) po inokulaci.

V Číně v polním experimentu s dlouhodobou aplikací (11 let) prasečí kejdy a kalů do půdy byly zjištěny počty bakterií rezistentních k ciprofloxacinu řádově 10^7 KTJ/g půdy. Z celkem 21 bakteriálních izolátů rezistentních k ciprofloxacinu zařazených ke kmenům *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* a *Bacteroidetes* bylo 18 pozitivních na přítomnost genů PMQR (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrD*, *qepA*, *oqxA* a *oqxB*). V rámci kmene *Proteobacteria* byly získané izoláty s PMQR geny zařazeny k rodům *Brevundimonas*, *Sphingopyxis*, *Sphingomonas* a *Bosea*, nebyly ale prokázány u enterobakterií, které jsou u hospodářských zvířat popisovány jako nositelé těchto genů. Ačkoli byly v uvedené studii geny PMQR detekovány pouze v půdách, na které byl aplikován hnůj, nebylo možné určit, zda je jejich výskyt výsledkem přežívání bakterií z hnoje od prasat nebo horizontálního přenosu mezi bakteriemi z hnoje a původními půdními bakteriemi (Xu et al. 2015). Aby bylo možné kontrolovat proliferaci polutantů, je důležité znát jejich osud od organických hnojiv až po životní prostředí.

Analýza metagenomu vzorků drůbeží podestýlky a půd

Analýza diverzity bakteriálního genomu ve vybraných vzorcích podestýlky a půdy byla provedena celkem u 10 vzorků. Jejich charakteristiku uvádí tabulka 15. Z modelového pokusu fermentace drůbeží podestýlky inokulované kmeny *E. coli* byly vybrány 4 vzorky. Konkrétně se jednalo o vzorek podestýlky před zaočkováním modelovými kmeny (vzorek A) a 3 vzorky (B–D) z průběhu fermentace. Z modelového pokusu přežívání kmenů *E. coli* v půdě bylo analyzováno celkem 6 vzorků. Jednalo se o půdu před aplikací podestýlky (vzorek E) a následně vzorky z průběhu pokusu (vzorky F–J).

Analýza odhalila výrazné rozdíly ve složení bakteriomu vzorků podestýlky a půd, a to jak v rozmanitosti zastoupených taxonů, tak v jejich relativní četnosti.

Tabulka 15. Charakteristika vzorků vybraných pro analýzu metagenomu

Číslo vzorku MUNI	Označení vzorků v metagenomické analýze	Datum odběru	Označení experimentu	Popis vzorku
375/23	A	14.3.2023	I	podestýlka bez zaočkování kmeny <i>E. coli</i>
353/23	B	19.4.2023	I	podestýlka zaočkována kmeny <i>E. coli</i> fermentace 21 dní
454/23	C	9.5.2023	I	podestýlka zaočkována kmeny <i>E. coli</i> fermentace 41 dní
506/23	D	23.5.2023	I	podestýlka zaočkována kmeny <i>E. coli</i> fermentace 55 dní
513/23	E	30.5.2023	II	půda před aplikací <i>E. coli</i> a podestýlky
514/23	F	30.5.2023	II	půda obohacená <i>E. coli</i> (10^4 KTJ/g) a fermentovanou podestýlkou
536/23	G	20.6.2023	II	obohacená půda 21 dní po aplikaci
601/23	H	30.6.2023	II	obohacená půda 31 dní po aplikaci
635/23	I	18.7.2023	II	obohacená půda 49 dní po aplikaci
668/23	J	1.8.2023	II	obohacená půda 63 dní po aplikaci

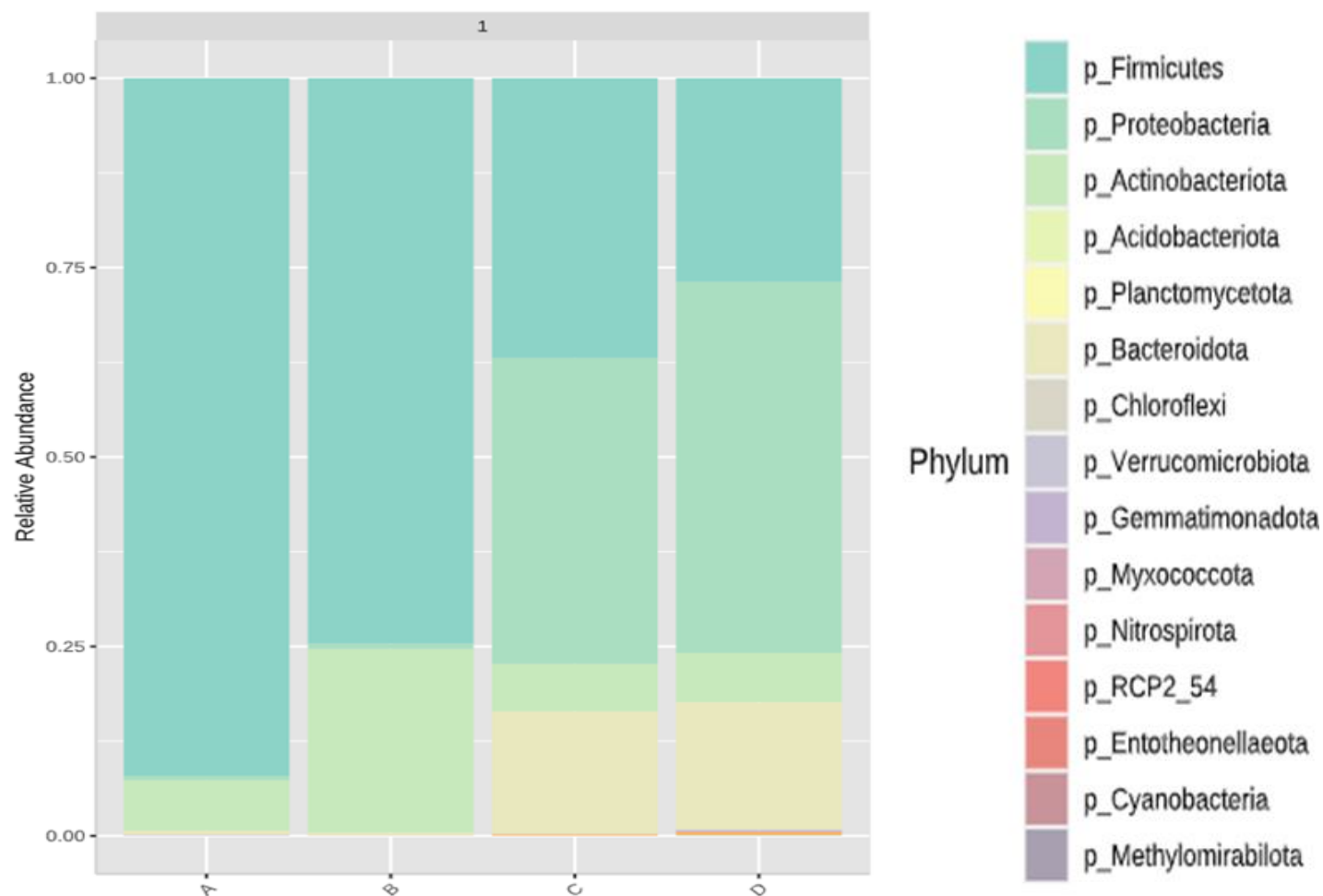
I – modelový pokus přežívání *E. coli* s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům při fermentaci drůbeží podestýlky

II - modelový pokus přežívání *E. coli* s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům v půdě

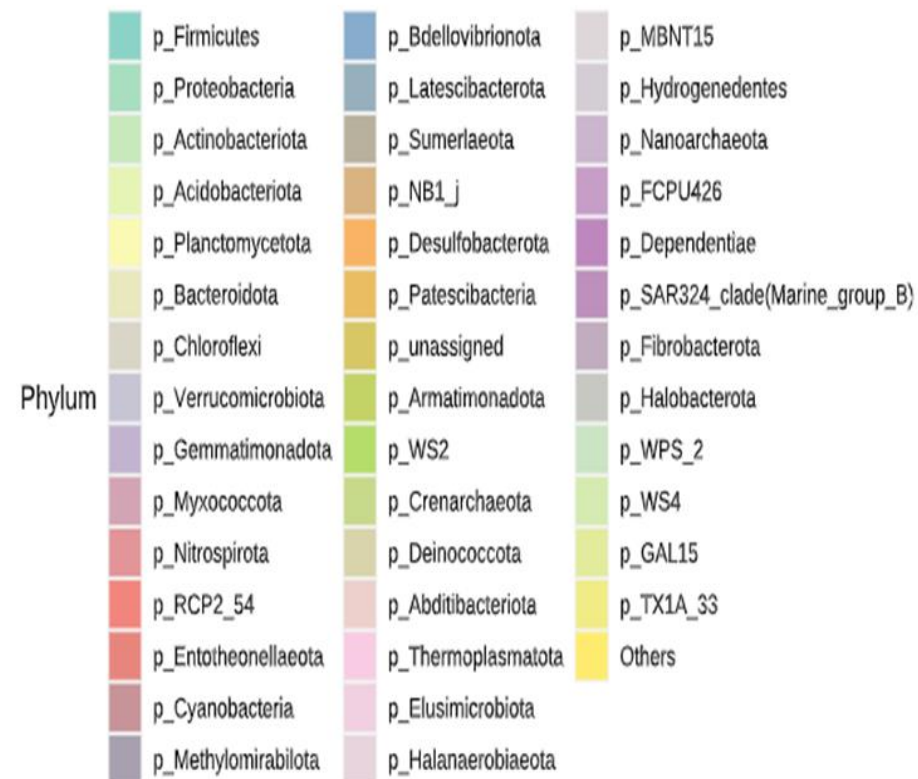
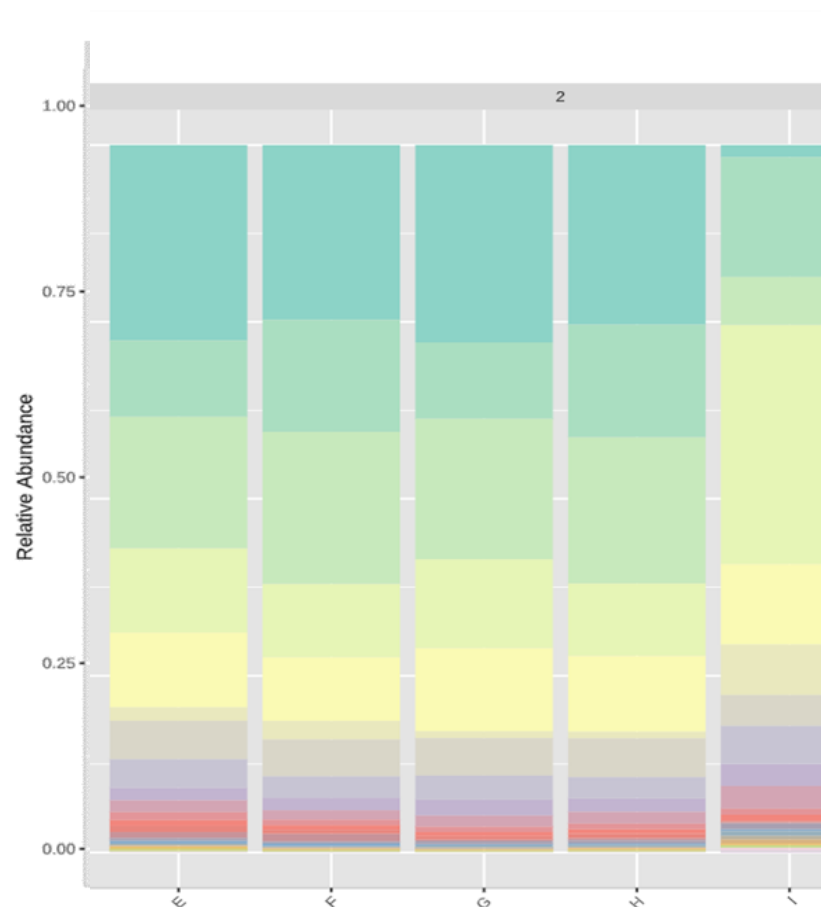
V podestýlce bylo detekováno až 440 různých bakteriálních druhů, z nichž nejvyšší relativní četnost byla zaznamenána u zástupců kmene *Firmicutes*, kam se řadí většina grampozitivních bakterií včetně sporotvorných rodů *Bacillus* nebo *Clostridium*, a dále např. zástupci řádu *Lactobacillales* (Sedláček I., 2007), který byl také nejvíce zastoupen (62 %) ve vzorku podestýlky určené k fermentaci (vzorek A). V průběhu procesu fermentace došlo k významnému snížení četnosti kmene *Firmicutes* a *Actinobacteria* ve prospěch zástupců z kmene *Proteobacteria* a *Acidobacteriota* (obrázek 7). Kmen *Proteobacteria* zahrnuje skupinu gramnegativních bakterií, včetně čeledí *Pseudomonadaceae* a *Aeromonadaceae*, které zejména v pozdějších stádiích fermentace podestýlky vykazovaly vyšší zastoupení (43 % a 52 %). Do kmene *Proteobacteria* se řadí i bakterie *E. coli*, které v tomto pokusu byly použity pro inokulaci podestýlky. Z analýzy metagenomu vyplynulo, že nejvyšší abundance tohoto druhu byla prokázána v prvním vzorku podestýlky (před zaočkováním) a v průběhu fermentace se jeho relativní četnost snižovala.

Ve vzorcích půd byla diverzita bakteriomu výrazně vyšší než v podestýlce. Bylo detekováno až 1600 různých druhů, ale na rozdíl od podestýlky se jejich vzájemný podíl v ve vzorcích odebraných v jednotlivých etapách pokusu významněji nelišil. Výjimkou byl vzorek I, u kterého je patrné výrazné navýšení zástupců kmene *Acidobacteriota* (obrázek 8). Jedná se o fyziologicky rozmanitou skupinu bakterií, které se v půdě přirozeně vyskytují a tvoří v ní až 50 % běžné bakteriální komunity (Dunbar et al. 2002). Tento nárůst mohl být ovlivněn intenzivnějšími dešťovými srážkami, které vlastnímu odběru předcházely (obrázek 6).

Detailnější výsledky analýzy metagenomu uvádí heat mapa v příloze 1.



Graf č. 7. Změny v metagenomu v průběhu fermentace drůbeží podestýlky

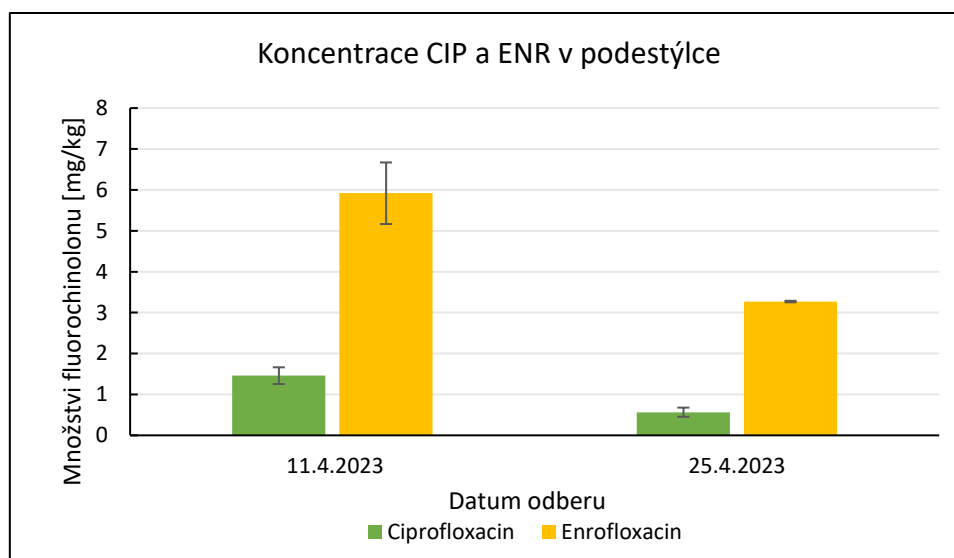


Obrázek 8. Změny v metagenomu v průběhu fermentace drůbeží podestýlky

4.2 Analytická část – část B

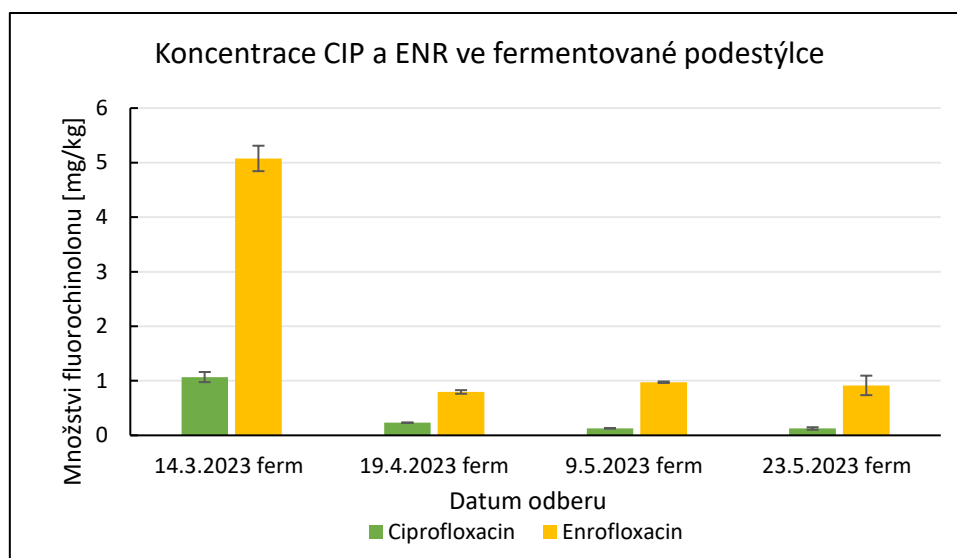
Analýza vzorků podestýlky

Analýza reziduí ciprofloxacinu a enrofloxacinu byla provedena na několika vzorcích podestýlky. Vzorek byl vždy vysušen a pomletím homogenizován. Byla to směs slámy a kuřecího trusu. Vzorky z 11. 4. 2023 a 25. 4. 2023 nebyly fermentovány a byly analyzovány přímo po odběru z chovné haly. Koncentrace obou antibiotik v čase mírně poklesla, což může být způsobené rozdílným stářím, respektive metabolismem medikovaných brojlerů. Tyto naměřené koncentrace jsou v souladu s výsledky, které jsou uvedeny v předchozí zprávě z roku 2021 (https://eagri.cz/public/web/file/691658/Zprava_AMR_2021_FINAL_s_tit.pdf), kde byly taktéž v kuřecí podestýlce zjištěny koncentrace v řádu jednotek až desetin mg/kg. Mimo to, v rámci předchozí studie byly stanoveny koncentrace enrofloxacinu i v medikované pitné vodě, kde se koncentrace enrofloxacinu pohybovaly v desítkách mg/L, zatímco ciprofloxacin byl pod limitem kvantifikace. Absence ciprofloxacinu v medikované pitné vodě prokázala, že ke vzniku ciprofloxacinu, jakožto metabolitu enrofloxacinu dochází kvůli metabolismu medikovaných kuřat, což je v souladu s literaturou (Morales-Gutiérrez et al. 2015), kde bylo identifikováno přes 30 metabolitů enrofloxacinu v různých tkáních medikovaných kuřat. Obdobně vysoké koncentrace fluorochinolonů v podestýlkách v řádu desetin až stovek mg/kg byly také zjištěny ve studii (Zhao et al. 2010). Tyto výsledky v kombinaci s výsledky potvrzující přítomnost genů na rezistenci v podestýlkách pouze zdůrazňují nutnost zavedení adekvátní legislativy a ošetřujících procesů před aplikací kontaminovaných statkových hnojiv na zemědělskou půdu s ohledem na potenciální environmentální a zdravotní riziko. Jednou z mnoha možností, jak snížit koncentrace reziduí antibiotik a genů rezistence ve statkových hnojivech je právě fermentace (Janusch et al. 2014), jejíž účinnost na přítomnost genů je podrobně diskutována v kapitole 4.1 této závěrečné zprávy.



Obrázek 9. Koncentrace ciprofloxacinu a enrofloxacinu v podestýlce odebráné z chovu kuřat

Dále byly analyzována podestýlka, která dle výše uvedených podmínek prošla po prvotním odběru fermentací. Jak je vidět na obrázku 9 z původních koncentrací ciprofloxacinu a enrofloxacinu v čerstvé podestýlce došlo během jednoho měsíce k úbytku 78,3 % ciprofloxacinu a 84,3 % enrofloxacinu. V dalších týdnech už zůstala koncentrace obou analytů téměř konstantní. Drobné rozdíly mohou být způsobeny odlišnou konzistencí a složením podestýlky, kdy v prvních týdnech obsahovala větší množství slámy a hmota nebyla tak kompaktní. Z výsledků je patrné, že k degradaci léčiv dochází zejména v rámci prvního týdne fermentace a následně koncentrace již spíše stagnují. Toto zjištění je v souladu s review (Gaballah et al. 2021; Spielmayer, 2018), které shrnují poznatky v oblasti degradace veterinárních antibiotik ve statkových hnojivech. Dle tohoto review a dalších publikací (Ho et al. 2013; Jechalke et al. 2014; Mohring et al. 2009; Motoyama et al. 2011; Sanchez-Hernandez et al. 2020; Saranya et al. 2018) je obvykle účinnost odstranění antibiotik prostřednictvím fermentace v rozsahu 40 až 100 % v závislosti na zvoleném způsobu zpracování statkových hnojiv (kompostování, vermikompostování, aerobní či anaerobní fermentace), době zpracování (2 týdny až několik měsíců), podmínkách zpracování (aerobní/anaerobní, teplota, vlhkost apod.), vlastnostech veterinárních léčiv (respektive třídy antibiotik, např. fluorochinolonová antibiotika, sulfonamidy, makrolidy, tetracykliny). Avšak již mnohem méně studií se zabývá identifikací degradačních produktů (a obecně popisem mechanismu degradace), které vznikají v průběhu zpracování těchto statkových hnojiv, jelikož i tyto vznikající metabolity mohou mít negativní vliv na životní prostředí a vznik genů rezistence (Spielmayer, 2018).



Obrázek 10. Koncentrace ciprofloxacinu a enrofloxacinu v podestýlce odebráné z chovu kuřat s následnou fermentací v období od 14.3. do 23.5. 2023

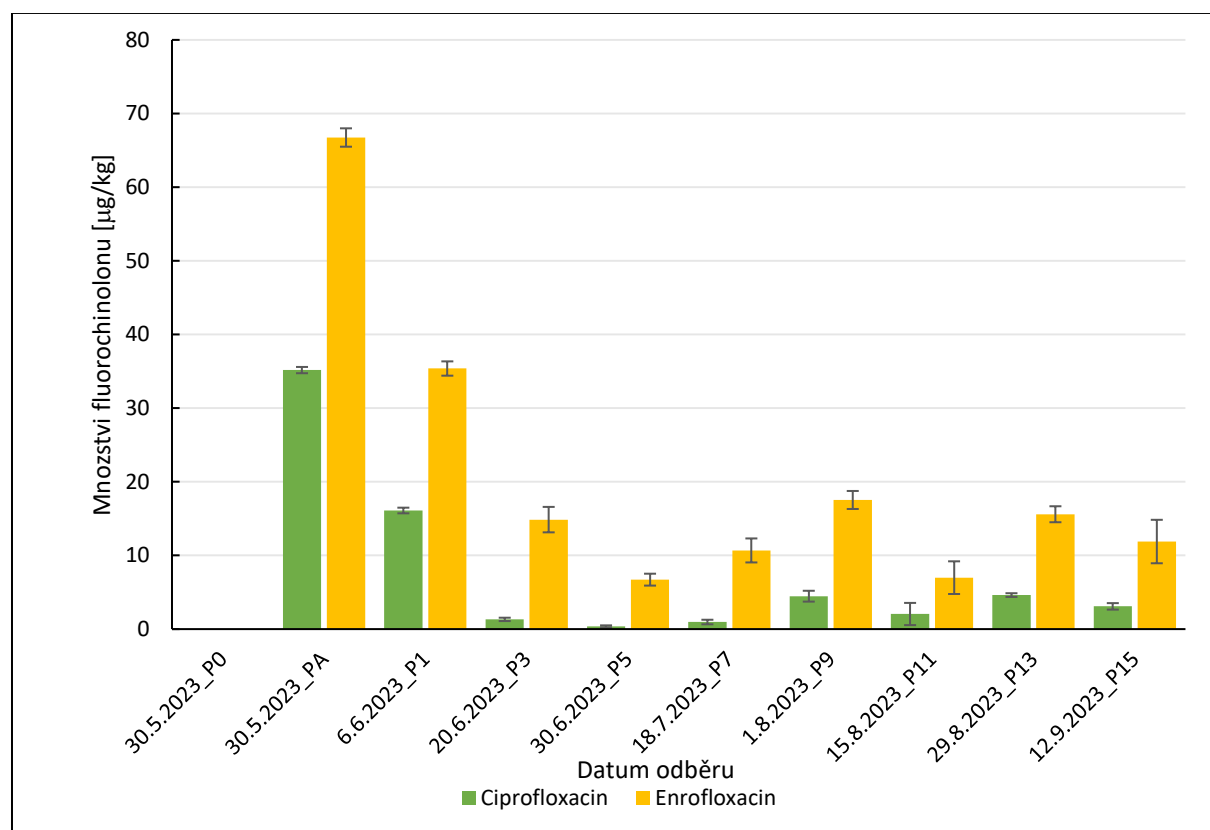
Analýza vzorků půdy

Vzorky půdy byly extrahovány dle výše uvedeného postupu a následně analyzovány pomocí LC/MS/MS. Každý vzorek byl extrahován a proměřen 3x. V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty koncentrací zjištěných při jednotlivých odběrech a směrodatné odchylky stanovení. V půdě odebrané před zahájením pokusu byla koncentrace obou analytů pod mezí detekce. Po aplikaci podestýlky se koncentrace v půdě zvýšila k desítkám $\mu\text{g/kg}$. V prvním odběru 6. 6. 2023 se koncentrace ciprofloxacinu i enrofloxacinu snížila zhruba na polovinu, ve vzorku z 20. 6. 2023 opět koncentrace poklesla asi o polovinu, ale v dalších odběrech se již pohybovala okolo stejné hodnoty (přibližně 5 $\mu\text{g/kg}$ CIP, resp. 15 $\mu\text{g/kg}$ ENR), což je také v souladu s předchozí závěrečnou zprávou z roku 2021 (Mravcová et al. 2021) a dostupnou zahraniční literaturou (Albero et al. 2018; Rosendahl et al. 2012; Thiele-Bruhn, 2003), jelikož fluorochinolonová antibiotika mají v půdním prostředí poločas rozpadu delší než 90 dnů, na rozdíl od ostatních léčiv (např. penicilinů). Avšak perzistence antibiotik a obecně léčiv v půdním prostředí není závislá jen na vlastnostech léčiv (pK_a , $\log P$, ...), ale také na fyzikálně-chemických vlastnostech půdy.

Koncentrace enrofloxacinu a ciprofloxacinu jsou srovnatelné s výsledky z předchozího úkolu a zároveň jsou v souladu s dostupnými vědeckými publikacemi (Fuentes et al. 2006; Uslu et al.

2008), které se na rozdíl od této studie obvykle zabývají pouze monitoringem léčiv v životním prostředí nikoliv charakterizací vstupu a jejich antibiotik v půdním prostředí.

Dalším problémem souvisejícím s přítomností reziduí antibiotik v životním prostředí mimo vznik antibiotické rezistence je také riziko spojené s příjmem těchto látek půdními organismy (následné ovlivnění půdní kvality) nebo pěstovanými plodinami (vstup do potravního řetězce) (Carter et al. 2014; Carter et al. 2016). Mimo jiné tyto látky mohou v půdním prostředí také způsobit inhibici klíčení semen a růstu plodin obecně (Saranya et al. 2018).



Obrázek 11. Koncentrace ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích půdy po aplikaci fermentované podestýlky odebíraných po dobu 4 měsíců

4.3 Spotřeby antimikrobik – část C

Situace a trendy ve spotřebě enrofloxacinu v České republice a v kontextu se státy EU/EEA ve veterinární i humánní medicíně

Trendům ve spotřebách fluorochinolonů by měla být věnována zásadní pozornost, a to především z důvodu, že jsou to kriticky významná antimikrobika z pohledu humánní i veterinární medicíny a v rámci České republiky jsou veterinární léčivé přípravky, které je obsahují, klasifikovány a používány v režimu indikačního omezení (viz pravidla novely Zákona o léčivech 314/2022). Z dlouhodobého hlediska je ve veterinárním sektoru (nejen v České republice) problémem především míra používání fluorochinolonů (konkrétně enrofloxacinu) u drůbeže. Lze uvést, že ačkoliv, co do hmotnostních objemů nepatří fluorochinolony mezi skupinu s nejvyššími spotřebami, frekvencí jejich podávání v rámci sektoru drůbeže se dostávají na první pozici ze všech u drůbeže používaných skupin antimikrobik. Níže je uvedena komplexní analýza spotřeb antimikrobik a trendů u drůbeže a krůt pro ČR za období posledních 5 let.

Pro dokreslení situace konkrétně pro enrofloxacin je uvedena analýza celkové spotřeby, spotřeb fluorovaných chinolonů a chinolonů za posledních 12 let v rámci ČR (11 let v rámci celé EU) a dále podáno srovnání pozice ČR versus další státy EU (data 2022; obrázek 12).

Tabulka 16: Trend v celkových spotřebách antimikrobik ve VLP a specificky ve spotřebách fluorochinolonů a chinolonů

a v rámci ČR, za období 2010 – 2022 a

b v rámci celé EU (agregované, medián, z 25 států, 2011 - 2022)

ČR Prodeje v mg na PCU													
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Fluorochinolony (ČR)	1,31	1,45	1,81	1,75	1,75	1,68	1,67	1,89	1,79	1,80	1,94	1,63	1,56
Ostatní chinolony (ČR)	0,22	0,22	0,07	0,05	0,03	0,05	0,03	0,01	0,004	0	0	0	0
Celkové spotřeby ČR (mg/ PCU)	94,34	83,05	79,76	82,16	79,85	68,04	61,18	63,47	56,93	53,77	56,22	50,02	46,36
Celkové populace PCU (tuny)	755,22	732,16	672,78	696,75	702,64	698,05	704,88	693,07	704,57	702,02	699,35	708,97	696,71
Fluorochinolony (medián, EU celek, 25 států)		2,50	2,90	2,70	3,00	2,80	2,70	2,30	2,40	2,20	2,20	2,20	1,90
Ostatní chinolony (medián, EU celek, 25 států)		1,10	0,9	0,70	0,60	0,50	0,40	0,40	0,30	0,20	0,20	0,20	0,10

FQ	CZ 1,56 mg/PCU	extrémně nižší (<0,4)	DK, FI, IE, IS, NO, SE, CH, UK
		nižší (0,4 – 1,0)	AT, BE, EE, FR, DE, LT, LU, NL, SI
		obdobné (1,1 – 1,6)	IT, LI
		vyšší (>1,7)	BG, HR, CY, GR, HU, MT I, PL II, PT I, RO, SK, ES

Obrázek 12: Srovnání ČR vs další státy EU/ EEA (včetně UK), suma spotřeby fluorchinolonů a chinolonů v mg/PCU (souhrn za všechna potravinová zvířata, včetně akvakultur)

Trendy spotřeb antimikrobik (vychází z VLP, která jsou registrována pouze pro cílový druh kur domácí, či krůty)

V rámci těchto hodnocených VLP lze vyčíslit trend pro následující antimikrobika, kde VLP byla registrována pouze pro cílový druh kur domácí, či pro cílový druh kur domácí a krůty a lze tedy jednoznačně anticipovat, že byly použity v sektoru drůbeže. U těchto VLP lze důvodně předpokládat, že veškeré finální použití lze alokovat do sektoru drůbeže. Je vhodné upozornit, že vybraná VLP (ta obsahující amoxicilin, či enrofloxacin) nejsou určena pro nosnice snášející vejce pro lidský konzum (a ani kuřice, budoucí nosnice v období před počátkem snášky) a proto lze jejich použití v majoritě (> 95 %) alokovat do sektoru zvířat krmených pro účely produkce masa, či minoritně se používají také u rodičovských či prarodičovských hejn.

Amoxicilin (beta-laktam, AMEG D): celkově sestupný trend (2018–2022), pokles o 28,4 %, s meziroční fluktuací, nejvyšší spotřeby v roce 2018.

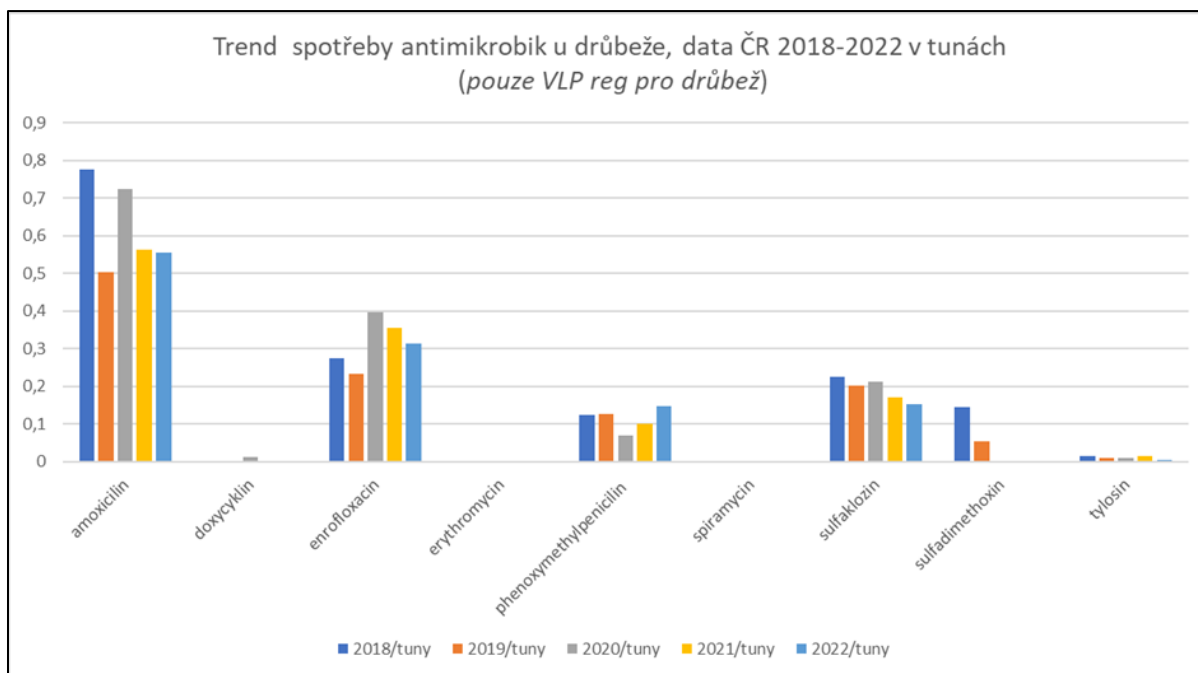
Enrofloxacin (fluorchinolon, AMEG B): celkově nárůst (2018 a 2019 nižší spotřeby, kulminace spotřeb v roce 2020, následný pokles).

Phenoxymethylpenicilin (beta-laktam, AMEG D): celkově mírný nárůst (2018–2022) o 15,1 % s výrazným propadem spotřeb v roce 2020.

Sulfonamidy (AMEG D): v období (2018–2022) zaznamenán pokles o 32, 2 %, nejvyšší spotřeba v roce 2018.

Tylosin (makrolid, AMEG C): pokles (2018–2022) o 61,8 %, nevyšší spotřeba v roce 2018.

Pořadí („TOP 5“) od nejvíce po nejméně spotřebovávané, dle hmotnostních objemů v tunách: amoxicilin, enrofloxacin, sulfonamidy, fenoxymethylpenicilin, tylosin. Tyto výsledky jsou vizualizovány v obrázku 13. Vyjádření k výsledkům (hmotnostní objemy v tunách vs frekvence podání) jsou podána níže.



Obrázek 13. Trend celkových spotřeb antimikrobních látek podaných ve VLP u drůbeže v ČR 2018–2022 (v tunách, vyjádřeno z VLP registrovaných pouze pro drůbež)

Trendy spotřeby antimikrobik (vychází z VLP, která jsou registrována jak pro cílový druh kur domácí, či krůty, tak i pro další species), ČR období 2018–2022, tuny

Níže jsou uvedena data vyjadřující trendy spotřeby antimikrobik (vychází z VLP, která jsou registrována jak pro cílový druh kur domácí, či krůty, tak i pro další species – kde, kromě drůbeže, další majoritní druh, který je potřeba zohlednit jsou zejména prasata), pro ČR za období 2018 až 2022, vyjádřená v tunách léčivých látek.

U většiny léčivých látek byl použit zjednodušený výpočet vycházející z poměru PCU (populačně korekční jednotku, vyjádřenou v 1 000 tun) a to pro skupinu drůbež a skupinu prasata. Poměr v roce 2021 činil 135 (drůbež, kde je výpočet proveden z hodnot pro kura a krůty) ku 202 (prasata všech produkčních kategorií). Na drůbež bylo tedy finálně alokováno 40 % spotřeb (kur, krůty, husy, kachny, křepelky, perličky, bažanti) a na prasata 55 % a zbytek (přibližně 5 %) byl alokován na další minoritní použití u dalších species či produkčních kategorií, pro které jsou předmětné antimikrobní VLP registrovány (telata, výjimečně také

ovce, králíci či jiná zvířata). Přepočtení spotřeb s koeficientem 40 % byl využit pro kalkulace spotřeb následujících léčivých látek: amoxicilin, doxycyklin, linkomycin, spektinomycin, neomycin, sulfamethoxazol (vybrané VLP v kombinaci s trimethoprimem), tiamulin, tilmikosin, tylosin.

Specifické koeficienty přepočtu byly zvoleny pro vybrané látky (a tyto látky obsahující VLP), pro které je znám jiný poměr. Pro tyto účely byl využit projekt stratifikace 2016 a též data 1Q 2022 a 1Q 2023 pokrývající přibližně 30 % sektoru chovů brojlerů kura domácího. Pro následující léčivé látky byl využit přepočet s odpovídajícím koeficientem (příslušné procento spotřeby přímo pro drůbež) následovně: kolistin (20 %), enrofloxacin (85 %), florfenikol (10 %), chlortetracyklin (5 %), oxytetracyklin (5 %).

V rámci těchto hodnocených VLP lze vyčíslit trend (spotřeb u drůbeže) pro následující antimikrobika:

Amoxicilin: vzestupný trend (2018–2022), nárůst o 10,35 %, trend nejprve nárůst, kdy spotřeby v roce 2020 kulminovaly a následně pokles, kdy však celkově spotřeba neklesla pod úroveň roku 2018.

Doxycyklin: sestupný trend (2018–2022), pokles o 40,57 %, nejvyšší spotřeby v roce 2018.

Enrofloxacin: trend poklesu o 29,35 % (2018 až 2022), s kulminací spotřeb v roce 2019, v letech 2021 a 2022 stagnace spotřeb.

Sulfonamidy: (2018–2022) pokles o 27,28 %, nejvyšší spotřeba v roce 2018, přičemž část spotřeb tvořily VLP, kde je kombinace léčivých látek sulfonamid a trimethoprim.

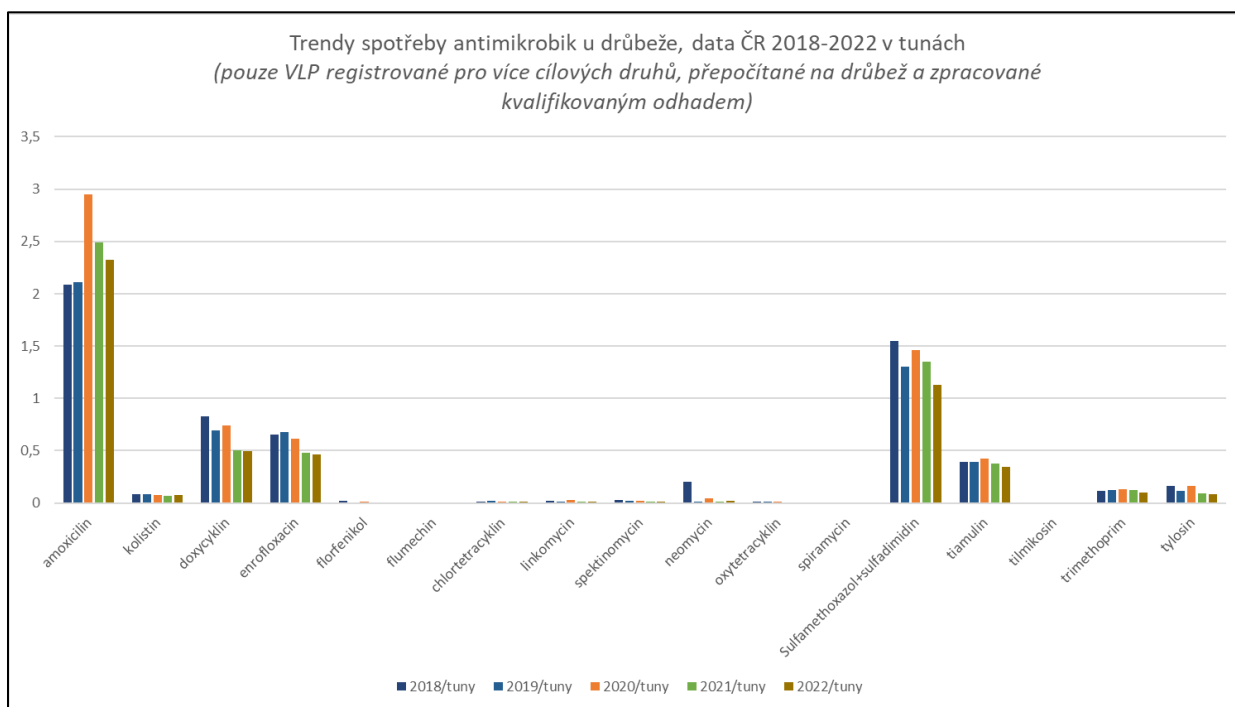
Tiamulin: (2018–2022), pokles o 11,15 %, s kulminací v roce 2020.

Tylosin: pokles (2018–2022) pokles o 47,68 %, nejvyšší spotřeba v roce 2018.

Kolistin: který má velmi nízké spotřeby vykázal (2018–2022) celkový pokles o 8,79 %, s nejvyšší spotřebou v roce 2018.

Výsledky jsou vizualizovány na obrázku 14.

Pořadí („TOP 5“) od nejvíce po nejméně spotřebovávané, dle hmotnostních objemů v tunách: amoxicilin, sulfonamidy (vybrané v kombinaci s trimethoprimem), doxycyklin, enrofloxacin a tiamulin. Následovaly tylosin (vyšší spotřeby v letech 2018 a 2020) a fenoxymethylpenicilin (vyšší spotřeby než tylosin 2019 a 2021 a 2022). K rozdílům stran frekvence podání komentář viz níže.



Obrázek 14. Trendy spotřeby antimikrobik (vychází z VLP, která jsou registrována jak pro cílový druh kur domácí, či krůty, tak i pro další species), ČR období 2018–2022, tuny

Komentář a vysvětlení zjištěných trendů

Spotřeby v tunách jsou podstatné pro vyčíslení zátěže pro životní prostředí, i když i zde je potřeba zohlednit stabilitu léčivých látek (málo stabilní je například amoxicilin a fenoxymethylpenicilin, stabilní jsou naopak tetracykliny, či sulfonamidy, či fluorochinolon enrofloxacin). Část ze spotřebovaných VLP se dostane do životního prostředí se zbytkem – nespotebovanou medikovanou napájecí vodou, která postoupí například do kanalizace, část pak se zbytky podestýlky a/nebo exkrementů chované drůbeže, přičemž je potřebné rovněž brát v úvahu následné zpracování/zfermentování a až po té případnou aplikaci na půdu/zpracování do půdy.

Na spotřebu v tunách je nutno nahlížet s rozvahou reflektující fakt, že se do nich promítá dávkování příslušných VLP na kg živé hmotnosti a den (kde nejvyšší dávky jsou u sulfonamidů, či sulfonamidu s trimethoprimem, nižší u chlortetracyklinu, následuje amoxicilin (zde srovnatelné například s doxycyklinem), ještě nižší dávka pak u enrofloxacinu. Toto je tedy potřebné zohlednit při posouzení dat v tunách, či i v množstvích vztažených na jednotku biomasy, neboť údaj získaný z hmotnostních objemů nebude odpovídat například frekvenci podání. Data ať již v tunách, či v mg/PCU je tedy nutné spíše zvažovat z pohledu celkových trendů v čase, či spolu s dalšími daty (například stabilita vlastní léčivé látky, či jejích metabolitů) pro zhodnocení zátěže životního prostředí.

Pokud bychom chtěli hodnotit zátěž a míru selekčního tlaku, lze využít například indexy frekvence, či DDDvet, či DCDvet. Pro toto hodnocení by však bylo vhodné nemít pouze kvalifikované odhady, ale přesná data o používání přímo u kura, krůt a další drůbeže (ideálně i u příslušných produkčních či věkových kategorií), aby bylo možné detailní vyčíslení.

Prozatím lze udělat pouze rámcový kvalifikovaný odhad stran frekvence podání – velmi časté/nejčastější podání enrofloxacinu (především brojleři kura domácího v prvním týdnu věku, tj. velmi nízká hmotnost léčených zvířat cca 40–100 g), následované po stránce frekvence podání amoxicilinem (brojleři kura domácího ve vyšších věkových kategoriích, tím pádem i o vyšší hmotnosti, která se v konečném důsledku také promítne do celkového objemu spotřeb), sulfonamid/trimethoprim (nelze přesněji specifikovat, více se odvíjí od nakažové situace a od faktu, zda touto kombinací je nahrazeno např. podání enrofloxacinu) – obdobně také doxycyklin.

Nejpřesnějších dat je možné dosáhnout sledování používání antimikrobních VLP přímo na farmě. **Pro následné zhodnocení a zvážení z pohledu zhodnocení rizika tlaku na rozvoj AMR je velmi podstatné, v jaké fázi chovu, jak často, jakým množstvím a jakým konkrétním antimikrobikem jsou zvířata léčena.** Je potřebné mít ve vztahu ke spotřebovanému množství léčivé látky - antimikrobika, frekvenci podání vztaženu populaci zvířat, kterým bylo léčivo podáno. Zejména u brojlerů v kombinaci s výpočtem biomasy – rozdíl hejno 10 000 brojlerů v 1.týdnu života vs. stejné hejno, tedy o něco méně než 10 000 brojlerů (určité úhyny), ve třetím týdnu života). **Z pohledu AMR (resp. přenosu bakterií s rezistencí, či pouhých genetických determinant rezistence) je rovněž podstatné, zda a jak byla léčena rodičovská i prarodičovská hejna, neboť jak výskyt rezistentních bakterií, tak také determinant rezistence se přenáší mezi jednotlivými fázemi odchovu.**

Dalším podstatným komentářem je také potřeba rozlišení pojmu rezidua (antimikrobik) v potravinách živočišného původu a rezistencí k antimikrobikům (zde (fluoro) chinolonům. Riziko nálezu hladiny reziduí enrofloxacinu nad limitem detekce či kvantifikace u brojlera kura je na hladině nulové pravděpodobnosti. Mimo jiné, je tento fakt možno odůvodnit i skutečností, že jsou v naprosté většině případů léčena zvířata v prvním týdnu života o hmotnosti od přibližně 40 g do přibližně 100 g a probíhá metabolizace (na ciprofloxacin) a vyloučení obou látek (původního enrofloxacinu a metabolizovaného ciprofloxacinu s trusem) a biomasa zvířete se za období od posledního podání enrofloxacinu do výkrmu (okolo 40 dnů) minimálně zdvacetinasobí (živá hmotnost před poražením u kuřat z farmy zahrnuté do tohoto FÚ činila přibližně 2 kg).

Na rozdíl od reziduí je však potřebné věnovat pozornost tlaku na rozvoj a šíření rezistence k fluorochinolonům, kde lze důvodně předpokládat příčinnou souvislost právě se spotřebou fluorochinolonů u kura domácího a rezistencí k fluorochinolonům u bakterií izolovaných ze slepých střev drůbeže (JIACRA IV, 2023).

Jelikož současná situace vyžaduje také zhodnocení pohledů v rámci koncepce „Jedno zdraví“, bylo by vhodné uvést určité (byť metodologicky limitované) srovnání spotřeb fluorochinolonů v humánní a veterinární medicíně. Z obou oblastí totiž vstupují rezidua fluorochinolonů do životního prostředí. Zbytky (rezidua) léčiv používaných v humánní medicíně jsou majoritním podílem vstupu do odpadních vod, následně kalů a následně půdy. Ve veterinární oblasti a zemědělství pak majoritním podílem vstupu do půdy jsou exkrementy zvířat-hnůj, kejda, či podestýlka s exkrementy, které vstupují především do obdělávané a jimi hnojené půdy.

Celková spotřeba fluorochinolonů a dalších chinolonů vztažená na biomasu (vypočtenou z populací lidí a potravin produkujících zvířat) v roce 2021 u zemí EU/EEA byla vyšší u lidí než u zvířat určených k produkci potravin ve všech zemích zahrnutých do hodnocení, kromě pěti, kde převládala spotřeba u zvířat. Lze vyčíslit medián a vážený průměr vztažený na populace pro spotřeby fluorovaných chinolonů v roce 2021 pro 29 států, které měly dostupné spotřeby jak v humánní, tak ve veterinární medicíně. Pro 28 států (bez Německa v humánní medicíně, neboť nemá zahrnut nemocniční sektor) a 29 států ve veterinární medicíně pro rok 2021, čísla vyjadřují **mg/kg** (mg jako hmotnostní objemy sumy fluorochinolonů a chinolonů na kilogramy odhadované biomasy (populace lidí) předmětných zemí a biomase/populaci chovaných hospodářských, potravin produkujících zvířat:

Medián:

LIDÉ: **4,6 mg** FQ/kg biomasy ku

POTRAVINOVÁ ZVÍŘATA: **0,9 mg** FQ/kg biomasy

Vážený průměr:

LIDÉ: **6,3 mg** FQ /kg biomasy ku

POTRAVINOVÁ ZVÍŘATA: **2,9 mg** FQ/kg

U zemí, které měly vysokou spotřebu fluorochinolonů a chinolonů u lidí, byla statisticky významně korelující i spotřeba těchto léčivých látek i u potravin produkujících zvířat (JIACRA IV, 2023).

Byla rovněž prokázána statisticky významná pozitivní korelace mezi spotřebou fluorochinolonů a dalších chinolonů u lidí a rezistence vůči fluorochinolonům u invazivních *E. coli* izolovaných ze vzorků krve a mozkomíšního moku u hospitalizovaných pacientů, a to ve všech studovaných letech (2019–2021). Dále byla rovněž prokázána statisticky významná pozitivní korelace mezi spotřebou fluorochinolonů a dalších chinolonů u zvířat určených k produkci potravin a rezistence k fluorochinolonům u indikátorových *E. coli*, izolovaných ze vzorků odebíraných na jatcích ze zvířat určených k produkci potravin za všechna časová období (2018–2019, 2019–2020 a 2020–2021). Byla zkoumána rovněž spotřeba fluorochinolonů a chinolonů u drůbeže, kde byla potvrzena statisticky významná korelace mezi spotřebou a rezistencí pro *Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni* (JIACRA IV, 2023).

Situace a trendy v AMR u indikátorových bakterií *E. coli* a *E. coli* sledovaných s důrazem na nebezpečné profily rezistence

V rámci ČR byly v letech 2014, 2016, 2018 a 2022 sledovány izoláty indikátorové *Escherichia coli* ze slepých střev brojlerů kura domácího. Byl zjištěn postupný nárůst prevalence rezistence ke třem a více antimikrobikům, v roce 2022 navíc bylo detekováno i zvýšení prevalence izolátů, které vykazovaly multirezistenci na 6 a více antimikrobik z různých farmakologických skupin. V souvislosti s předmětným funkčním úkolem zaměřeným na chinolony, je nutné uvést trend vzestupu prevalence chinolonrezistentních izolátů *E. coli* ve studovaných souborech, a navíc nalezený fenotyp se sdruženou rezistencí k antimikrobikům: chloramfenikolu – sulfamethoxazolu – trimethoprimu – gentamicinu a ciprofloxacinu (zástupce fluorochinolonů). Celkově u *E. coli* izolátů u drůbeže byl zjištěn rovněž výrazný vzestup prevalence multirezistentních fenotypů (ampicilin-sulfamethoxazol-trimethoprim-tetracyklin).

Ze vzorků slepých střev, kde bylo provedeno specifické vyšetření s cílem selektivní detekce beta-laktamáz (ESBL a AmpC a dále karbapenemáz) u izolátů *E. coli* vzešla následující zjištění:

Byl prokázán stálý dynamický pokles prevalence výskytu producentů beta-laktamáz ESBL u selektivně detekovaných izolátů *E. coli* z kuřecího masa (jatka) na hladinu 28 % (nejvíce *bla*_{CTXM1} pozitivních izolátů), zatímco izoláty ze slepých střev brojlerů kura domácího vykazovaly spíše stagnaci prevalence výskytu producentů beta-laktamáz (okolo 37 %).

Ve 13 % byly zjištěny kmeny produkující AmpC beta-laktamázy.

Ve vztahu k chinolonům je však zásadní zjištění, že u více než 85 % izolátů byla detekována přítomnost genů a mutací zodpovědných za rezistenci k chinolonům, kde hlavní příčinou je mutace chromozomálních genů tzv. QRDR, což lze brát jako průkaz změny populace v důsledku selekčního tlaku po podávání fluorochinolonů či chinolonů.

Situace a trendy AMR u patogenní *E. coli* izolované z drůbeže

Zvláštní pozornost je třeba věnovat rezistenci vůči fluorochinolonům a chinolonům u cílových patogenů – zejména kmenů APEC (aviární patogenní *E. coli*), kdy rezistence k (fluoro)chinolonům jak v nízké úrovni, tak ve vysoké úrovni s mechanismy založenými na chromozomálních mutacích či třemi možnými mechanismy, které jsou známy jako PMQR (plazmidy přenášející chinolonová rezistence) činí ve výsledku mnohdy i terapeutický problém – selhání účinnosti, zejména jsou-li podány dávky na hranici, či dokonce pod hranicí minimální inhibiční koncentrace finálně dosažitelné v tkáních invadovaných *E. coli*. V ČR (Prátová, 2020) ve vzorcích *E. coli* jak z vnitřních orgánů, tak z GIT (N=124) bylo 51 % citlivých, 20,2 % intermediárních a 28,2 % rezistentních vůči fluorochinolonům (hraniční koncentrace citlivý <0,25 mg/l; intermediární (citlivý za zvýšené expozice) = 0,5–1 mg/l; rezistentní >2 mg/l). Další studie Nedbalcové et al. (2020) APEC (PCR potvrzené geny virulence *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT* a *fimC*) vykazovaly 53,75 % rezistentní, 28,75 % intermediární (citlivý za zvýšené expozice) a 17,5 % rezistentní izoláty na fluorochinolony. Poslední dostupná data za ČR z roku 2022 získaná ze 60 izolátů *E. coli* z monitoringu cílových patogenů získaných ze vzorků nemocných jedinců kura domácího ukazovala na 65% citlivost, 16,7% intermediární citlivost a 18,3 % na rezistenci.

5. ZÁVĚRY

Z výsledků realizovaného funkčního úkolu vyplývá několik důležitých závěrů týkajících se průkazu genů PMQR na farmách drůbeže a jejich přežívání v přírodním prostředí:

- **Výskyt genů PMQR na farmách drůbeže:** Na základě sledování bylo zjištěno, že geny *qnrB* a *qnrS* jsou nejčastěji detekovány jak u vzorků kuřat, tak v prostředí farmy. Tyto výsledky naznačují, že PMQR geny jsou v produkčních chovech brojlerů a jejich prostředí hojně rozšířeny. V žádném z testovaných vzorků nebyl zjištěn gen *qnrA* a *mcr1*, které byly zvoleny jako markery modelové kontaminace.
- **Shoda s mezinárodními výzkumy:** Výsledky našeho výzkumu jsou v souladu s výsledky mezinárodních studií, které ukazují, že geny PMQR jsou u drůbeže a v prostředí farem drůbeže celosvětově rozšířeny. Tyto geny mohou hrát významnou roli v rezistenci k chinolonům v tomto prostředí.
- **Persistence genů PMQR v prostředí:** V modelovém pokusu bylo zjištěno, že kmeny *E. coli* s geny PMQR mohou přetrvávat v podestýlce dlouhodobě, a to i během fermentace podestýlky. Přítomnost PMQR genů byla detekována i po několika týdnech fermentace (55 dní).
- **Vliv prostředí na přežívání genů PMQR:** Důležitým faktorem ovlivňujícím přežívání genů PMQR v prostředí farem je teplota. Vyšší teploty, zejména během fermentace, vedou k účinnějšímu snižování počtu bakterií i genů rezistence.
- **Vliv aplikace farmářských postupů:** Důležité je také brát v úvahu vliv farmářských postupů, jako je aplikace drůbeží podestýlky na pole, na přenos genů PMQR do půdy. Tyto geny mohou přetrvávat v půdě a mohou ovlivnit bakteriom půdy a zvýšit rezistenci bakterií v prostředí.
- **Pokles koncentrací reziduí ENR a CIP v průběhu fermentace podestýlky:** Z analýzy reziduí ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích podestýlky bylo prokázáno, že fermentace podestýlky snížila jejich koncentraci přibližně o 80 %. Přesto se hodnota koncentrace enrofloxacinu v podestýlce před aplikací do půdy blížila k 1 mg/kg.
- **Persistence reziduí ENR a CIP v půdě:** Po aplikaci podestýlky do půdy se v prvním měsíci koncentrace ciprofloxacinu a enrofloxacinu snížila asi na 25 % původní koncentrace, ovšem dále už byly zjištěné detekovatelné hodnoty konstantní a byla prokázána jejich setrvání v půdě po dobu delší než 4 měsíce, což je v souladu s naší předchozí zprávou z roku 2021, ale také odbornou literaturou, jelikož fluorochinolová antibiotika mají poločas rozpadu delší než 100 dnů.
- **Spotřeba fluorochinolonů ve veterinární medicíně v ČR:** V průběhu let 2010 až 2022 se spotřeba zvýšila z 1,31 mg/PCU na 1,56 mg/PCU (V roce 2010 byly však používány i chinolony 0,22 mg/PCU, v roce 2022 již nikoliv). Spotřeba všech fluorochinolonů (FQ) od minima (suma FQ+Q) 1,53 mg/PCU v roce 2010 po maximum (pouze FQ) 1,94 mg/PCU zaznamenané v roce 2020, a dále pokles na 1,56 mg/PCU (2022) ukazuje, že

míra používání FQ v chovech v ČR vykazuje fluktuace, ale má v posledních dvou letech sestupný trend.

- **Srovnání sumy spotřeb FQ a Q v ČR a zemích EU/EEA:** I když řada států EU má stále spotřeby násobně vyšší, existuje i řada jiných EU zemí, které dokázaly spotřeby minimalizovat až k hodnotám 0,1 mg/PCU. Snížení používání by napomohlo snížit tlak na rozvoj a šíření rezistence a také snížit hladinu reziduí, které mohou být dále přenášeny do půdy. Takto by byl minimalizován dopad na následný koloběh jak reziduí, tak determinant rezistence a rezistentních bakterií v životního prostředí.
- **Srovnání spotřeb FQ humánní a veterinární medicína:** V rámci Evropy (jako celku) i ČR převažují spotřeby FQ v humánní oblasti nad spotřebami veterinárními, nicméně existují státy, kde se daří používání FQ snížit v obou sektorech, což by napomohla i snížení zátěže životního prostředí jak v oblasti kontaminace povrchových vod, tak půdy.

Závěry studie ukazují na význam sledování genů PMQR a jejich persistence v prostředí farmy, zejména s ohledem na jejich potenciální vliv na šíření rezistence k fluorochinolonům a antibiotikům vůbec. Je důležité provádět další výzkumy a monitorování, abychom lépe porozuměli této problematice a přijali opatření k omezení jejich šíření.

Čerpání finančních prostředků k funkčnímu úkolu „AMR v půdě a případně dalších částech životního prostředí“ za rok 2023

Stanovení fluorochinolonů v reálných vzorcích drůbeží podestýlky a půdy po aplikaci podestýlky (FCH VUT)	200 000 Kč
Analýza posledních dostupných dat o spotřebách enrofloxacinu v ČR Rešerše recentně publikovaných dat k - možnému vlivu enrofloxacinu na bakterie, - rezistenci k fluorochinolonům (zejména ENR/CIP) a - ko-selekcí rezistence k dalším antimikrobikům, - plasmidově přenosné rezistenci (PMQR), perzistenci ENR/CIP v životním prostředí a jejich dalšímu potenciálu ovlivňovat ekosystémy a jejich mikrobiotu (ÚSKVBL)	40 000 Kč
Detekce perzistence bakterií s plasmidově vázanou rezistencí (PMQR) genů a mikrobioty (MU) - Analýza přežívání Escherichia coli rezistentních k fluorochinolonům (PMQR) v podestýlce, fermentované podestýlce a v půdě - Spotřební materiál	349 890,32 Kč
Nákup ostatního materiálu (ÚKZÚZ) - DDHM do 3 000 Kč - ochranné pomůcky - náhradní díly a příslušenství - hovorové - PHM - Cestovné - ostatní materiál jinde nezařazený	60 000 Kč
Celkem	649 890,32 Kč

6. REFERENCE

Albero B., Tadeo J. L., Escario M., Miguel E., Pérez R. A. (2018) Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems. *Science of The Total Environment*, 643, 1562-1570.

Aldred, K. J., Kerns, R. J., Osherooff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* 53 (10), 1565–1574.

Barns, SM., Cain, EC., Sommerville, L., Kuske, CR. (2007). *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3113–6.

Bartha B. (2012) Uptake and metabolism of human pharmaceuticals in plants: Identification of metabolites and specification of the defense enzyme systems under pharmaceutical exposure. München. *Dizertační práce*. Technická univerzita Mnichov.

Carter L.J., Garman C.D., Ryan J, Dowle A., Bergström E., Thomas-Oates J., Boxall A.B. (2014) Fate and uptake of pharmaceuticals in soil-earthworm systems. *Environ Sci Technol.* 48(10), 5955-63.

Carter, L. J., Ryan, J. J., & Boxall, A. B. A. (2016). Effects of soil properties on the uptake of pharmaceuticals into earthworms. *Environmental Pollution*, 213, 922–931.

Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.J., Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 60:394-397.

Cattoir, V., Poirel, L., Auber, t C., Soussy, CJ., Nordmann P. (2008). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infectios Diseases*, 14, 231-237.

Ciprofloxacin. In: PubChem [online].

Česká lékařská společnost, Subkomise pro antibiotickou politiku (SKAP). Konsensus používání antibiotik: Fluorochinolony 2019. Dostupné na <https://www.cls.cz/antibioticka-politika> (staženo dne 11.4.2023).

Dunbar, J., Barns, SM., Ticknor, LO., Kuske, ChR. (2002). Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3035–3045.

Enrofloxacin. In: PubChem [online].

EPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, 2022.

Esperón, F., Albero, B., Ugarte-Ruiz, M., Domínguez, L., Carballo, M., Tadeo, JL., del Mar Delgado, M., Moreno, MA., de la Torre, A. (2020). Assessing the benefits of composting poultry manure in reducing antimicrobial residues, pathogenic bacteria, and antimicrobial resistance genes: a field-scale study. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 27738-27749.

Ferreira, JC., Filho, RACP., Kuaye, APY., Andrade, LN., Junio, AB., da Costa Darini, AN. (2018). Identification and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae isolated from healthy poultry in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 60, 66-70.

Fuentes A., Lloréns M., Sáez J., Aguilar M.A., Pérez-Marín A.B., Ortuño J.F., Meseguer V.F. (2006) Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges. *Environ Pollut.*, 143(2), 355-60.

Gaballah M. S., Guo J., Hui Sun, Aboagye D., Sobhi M., Muhmood A., Renjie Dong R. (2021) A review targeting veterinary antibiotics removal from livestock manure management systems and future outlook, *Bioresource Technology*, 333, 125069.

Gay, K, Robicsek, A, Strahilevitz, J, Park, CH, Jacoby, G, Barrett, TJ, Medalla, F, Chiller, TM, Hooper, DC. (2006). Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis*. 43, 297-304.

Gros M., Petrović M., Barceló D. (2006) Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 386, 941-952.

Gupta, CL., Blum, SE., Kattusamy, K., Daniel, T., Druyan, S., Shapira, R., Krifucks, O., Zhu, YG., Zhou, XY., Su, JQ., Cytryn, E. (2021). Longitudinal study on the effects of growth promoting and therapeutic antibiotics on the dynamics of chicken cloacal and litter microbiomes and resistomes. *Microbiome*, 9, 178.

Hansen, LH., Jensen, LB., Sorensen, HI., Sorensen, SJ. (2007). Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 145-147.

Ho Y.B., Zakaria M.P., Latif P.A., Saari N. (2013) Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting. *Bioresour Technol.*;131:476-84.

Huang, T., Xu, Y., Zeng, J., Zhao, DH., Li, L., Liao, XP., Liu, YH., Sun J. (2016). Low-concentration ciprofloxacin selects plasmid-mediated quinolone resistance encoding genes and affects bacterial taxa in soil containing manure. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1730.

Janusch F., Scherz G., Mohring S. A. I., Hamscher G. (2014) Determination of fluoroquinolones in chicken feces – A new liquid–liquid extraction method combined with LC–MS/MS, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38, (3), 792-799.

Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K. (2014) Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol.*,22(9), 536-45.

Jian,g HX., Tang, D., Liu, YH., Zhang, XH., Zeng, ZL., Xu, L., Hawkey, PM. (2012). Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes

in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2350-2353.

JACRA IV, 2023 European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) and European Medicines Agency (EMA). Fourth joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA (JACRA IV),

Leal, RMP., Figueira, RF., Tornisiello, VL., Regitano, JB. (2012). Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment*, 432, 344-349.

Li, J., Hao, H., Dai, M., Zhang, H., Ning, J., Cheng, G., Shabbir, MUB., Sajid, A., Yuana, Z. (2019). Resistance and virulence mechanisms of *Escherichia coli* selected by enrofloxacin in chicken. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63 (5), e01824-18.

Li, J., Wang, T., Shao, B., Shen, J., Wang, S., Wu, Y. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic residues in wastewater and soil adjacent to swine feedlots: potential transfer to agricultural lands. *Environmental Health Perspectives*, 120, 1144-1149.

Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, h., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet. Infectious diseases*, 16, 161-168.

Marti, E., Balcázar, J. L. (2012). Real-Time PCR Assays for Quantification OfqnrGenes in Environmental Water Samples and Chicken Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 1743–1745.

Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Jacoby, GA. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351, 797-799.

Mirzaii M., Jamshidi S., Zamanzadeh M., Marashifard M., Hosseini SAAM., Haeili M., Jahanbin F., Mansouri F., Darban-Sarokhalil D., Khoramrooz SS. (2018). Determination of *gyrA* and *parC* mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infection in Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 197-200.

Mohring, S. A. I., Strzysch, I., Fernandes, M. R., Kiffmeyer, T. K., Tuerk, J., Hamscher, G. (2009) Degradation and Elimination of Various Sulfonamides during Anaerobic Fermentation: A Promising Step on the Way to Sustainable Pharmacy? *Environmental Science & Technology*, 43(7), 2569–2574.

Morales-Gutiérrez F.J., Barbosa J., Barrón D. (2015) Metabolic study of enrofloxacin and metabolic profile modifications in broiler chicken tissues after drug administration. *Food Chemistry*, 172, 30-39.

Motoyama, M., Nakagawa, S., Tanoue, R., Sato, Y., Nomiyama, K., & Shinohara, R. (2011) Residues of pharmaceutical products in recycled organic manure produced from sewage sludge and solid waste from livestock and relationship to their fermentation level. *Chemosphere*, 84(4), 432–438.

Mravcová, L., Fučík, J., Brabcová, K., Pokludová, L., Karpíšková, R., Gelbíčová, T., Poláková, Š., Stolář, P., Sládeček, V., Šenk, D. (2021) Antimikrobiální rezistence v půdě a případně dalších částech životního prostředí. Zpráva z funkčního úkolu MZe za rok 2021.

https://eagri.cz/public/web/file/691658/Zprava_AMR_2021_FINAL_s_tit.pdf

Parente, C. E. T., Brito, E. M. S., Azeredo, A., Meire, R. O., Malm, O. (2019) Fluoroquinolone Antibiotics and Their Interactions in Agricultural Soils – A Review. *Orbital: Electron. J. Chem.* 11, 42-52.

Parente, CET., da Silva, EO., Júnior ,SFS., Hauser-Davis, RA., Malm, O., Correia, FV., Saggiaro, EM. (2021). Fluoroquinolone-contaminated poultry litter strongly affects

earthworms as verified through lethal and sub-lethal evaluations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111305.

Park, CH, Robicsek, A, Jacoby, GA, Sahm, D, Hooper, DC.(2006). Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 3953-3955.

Périchon, B., Courvalin, P., Galimand, M. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 2464-2469.

Pourcher, AM., Jadas-Hecart, A., Cotinet, P., Dabert, P., Ziebal, C., Le Roux, S., Moraru, R., Heddadj D., Kempf I. (2014). Effect of land application of manure from enrofloxacin-treated chickens on ciprofloxacin resistance of *Enterobacteriaceae* in soil. *Science of the Total Environment*, 482, 269-275.

Recacha, E., Machuca, J., Alba, PDD., Ramos-Güelfo, M., Docobo-Pérez, F., Rodriguez-Beltrán, J., Blazquez, J., Pascual, A., Rodriguez-Martinez, JM. (2017). Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response. *MBio*, 8, e00971-17.

Richter, R., Hlušek, J., Ryant, P., Lošák, T. (2004) Organická hnojiva a jejich postavení v zemědělské praxi. *Úroda* 50 (9): 9-12.

Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, GA., Macielag, M., Abbanat, D., Park, CH., Bush, K., Hooper, DC. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12, 83-88.

Rosendahl, I., Siemens, J., Kindler, R., Groeneweg, J., Zimmermann, J., Czerwinski, S., Lamshöft, M., Laabs, V., Wilke, B.-M., Vereecken, H. and Amelung, W. (2012), Persistence of the Fluoroquinolone Antibiotic Difloxacin in Soil and Lacking Effects on Nitrogen Turnover. *J. Environ. Qual.*, 41: 1275-1283.

Röderova, M., Halova, D., Papousek, I., Dolejska, M., Masarikova, M., Hanulik, V., Pudova, V., Broz, P., Htoutou-Sedlakova, M., Sauer, M. Bardon, J., Cizek, A., Kolar, M., Literak, I. (2017). Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environment in the Czech Republic. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2147.

Sanchez-Hernandez, J.C. (2020). Vermiremediation of Pharmaceutical-Contaminated Soils and Organic Amendments. In: Pérez Solsona, S., Montemurro, N., Chiron, S., Barceló, D. (eds) Interaction and Fate of Pharmaceuticals in Soil-Crop Systems. *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 103. Springer

Saranya K., Kakarla D., Venkateswarlu K., Megharaj M., Yoon Y.-E., Lee Y. B. (2018) Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 257, 47-59.

Sedláček, I. (2007). Taxonomie prokaryot. Petr Ondrovčík. Brno: Masarykova Univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

Spielmeyer A. (2018) Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments: A short review, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9, 76-86.

Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D.C., Robicsek, A.(2009). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: A Multifaceted Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 664–689.

Thiele-Bruhn, S. (2003), Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 166: 145-167.

Tolls J. (2001) Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review, *Environ. Sci. Technol.*, 35, 17, 3397–3406.

Tuo, X., Gu, J., Wang, X., Sun, Y., Duan, M., Sun, W., Yin, Y., Guo, A., Zhang, L. (2018). Prevalence of quinolone resistance genes, copper resistance genes, and the bacterial communities in a soil-ryegrass system co-polluted with copper and ciprofloxacin. *Chemosphere*, 197, 643-650.

Uslu, M.Ö., Yediler, A., Balçioğlu, I.A. (2008) Analysis and Sorption Behavior of Fluoroquinolones in Solid Matrices. *Water Air Soil Pollut* 190, 55–63.

Veldman, K., Cavaco, L.M., Mevius, D., Battisti, A., Franco, A., Botteldoorn, N., Bruneau, M., Perrin-Guyomard, A., Cerny, T., Escobar, C.D., Guerra, B. Schroeter, A., Gutierrez, M., Hopkin, K., Myllyniemi, A.L., Sunde, M., Wasyl, D., Aarestrup, F.M. (2011). International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1278-1286.

Wang, G., Kong, Y., Yang, Y., Ma, R., Li, L., Li, G., Yuan, J. (2022). Composting temperature directly affects the removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in livestock manure. *Environ Pollut.* 15, 119174.

Wu IB., Wang ZS., Liao XD., Chen Z. (2005). Study on the excretion of enrofloxacin in chicken and its degradation in chicken feces. *Acta Veterinaria Zootech. Sin.*, 36, 1069.

Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Zhang, Y., Zhong, X., Liang, W., Zeng Z. (2015a). Responses of plasmid-mediated quinolone resistance genes and bacterial taxa to (fluoro)quinolones-containing manure in arable soil. *Chemosphere*, 119, 473-478.

Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Wang, M., Zeng Z. (2015b). Selective pressure of antibiotics on ARGs and bacterial communities in manure-polluted freshwater-sediment microcosms. *Frontiers in Microbiology*, 6, 194.

Xu, Y., Yu, W., Ma, Q., Zhou, H. (2015). Occurrence of (fluoro)quinolones and (fluoro)quinolone resistance in soil receiving swine manure for 11 years. *Science of the Total Environment*, 530-531, 191-197.

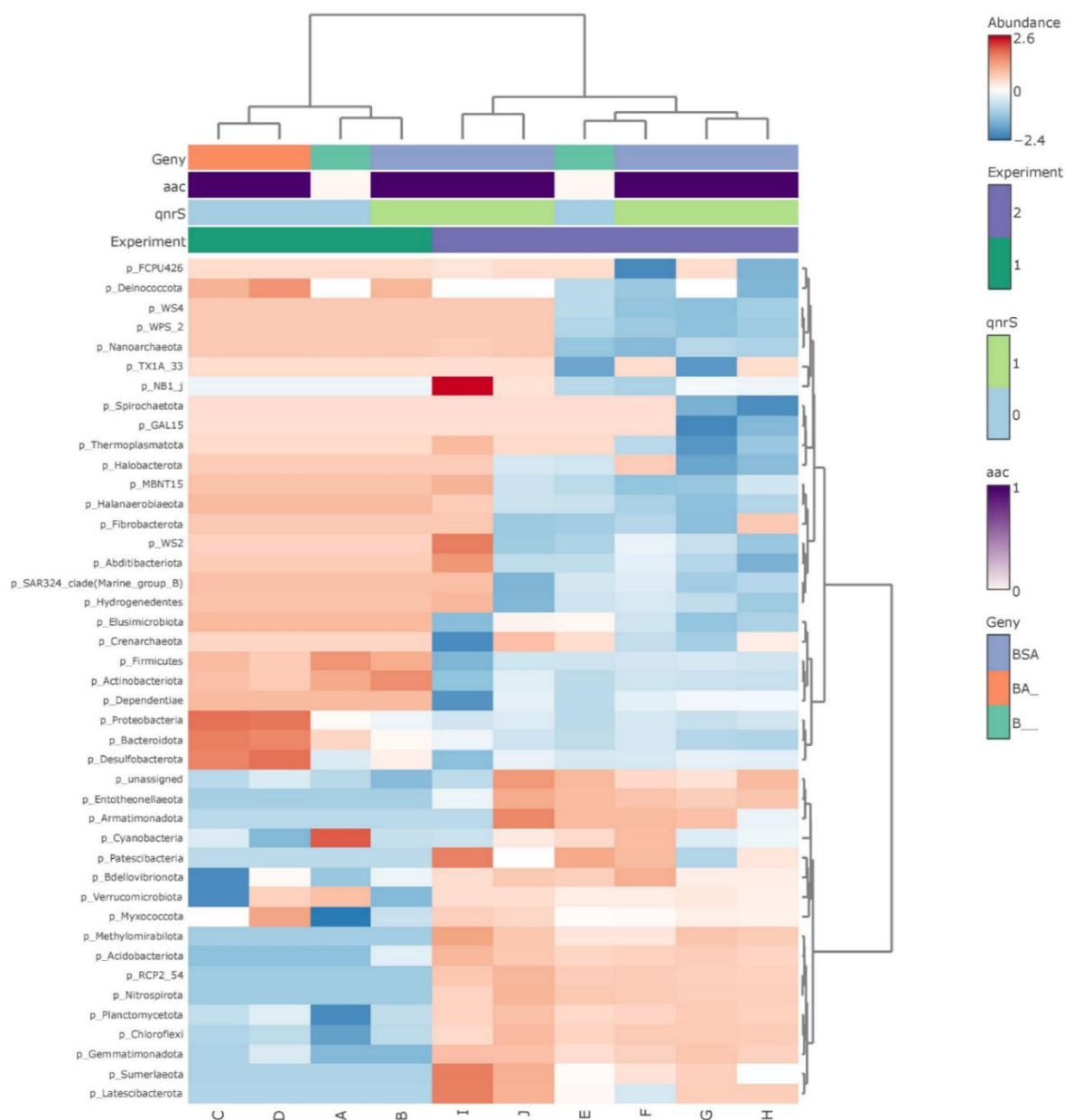
Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 3354–3360.

Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008, 52(4):1564-1566.

Zhao L, Dong YH, Wang H. (2010) Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of The Total Environment*, 408(5), 1069-75.

Zhou, TL., Chen, XJ., Zhou, MM., Zhao, YJ., Luo, XH., Bao, QY. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates in Wenzhou, Southern China, 2002–2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64, 55-57.

7. PŘÍLOHY



Příloha 1. Shluková analýza a heat mapa metagenomu vzorků podestýlky v průběhu fermentace a půd podle detekovaných kmenů

