



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně

MUNI
MED

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta



ÚSKVBL

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv



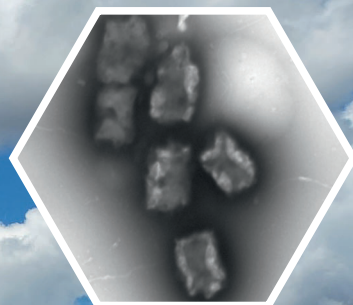
VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ
V BRNĚ

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PŮDĚ A PŘÍPADNĚ DALŠÍCH ČÁSTECH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Zpráva z funkčního úkolu MZe
za rok 2024

Brno, listopad 2024





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 2024

Brno, listopad 2024

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)

Bc. Jitka Navrkalová (FCH VUT v Brně)

Mgr. Šárka Poláková, Ph.D. (ÚKZÚZ)

OBSAH

ABSTRAKT	4
1. ÚVOD.....	6
2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU.....	14
3. MATERIÁL A METODIKA.....	15
3.1 Mikrobiologická část – část A.....	21
3.2 Analytická část – část B	28
3.3 Metodika sledování spotřeb antimikrobik – část C.....	34
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	35
4.1 Mikrobiologická část – část A.....	35
4.2 Analytická část – část B	46
4.3 Spotřeby antimikrobik – část C.....	52
5. ZÁVĚRY	60
6. REFERENCE.....	65

ABSTRAKT

Antibiotika jsou klíčová při léčbě bakteriálních infekcí u lidí i zvířat včetně akvakultur. Ve veterinární medicíně jsou v rámci EU od roku 2006 tato léčiva používána pouze pro léčbu, profylaxi a metafylaxi bakteriálních infekcí, i když dříve sloužila také pro zvýšení produkce v chovech. Některé země mimo EU, jako Mexiko, Jižní Korea či Nový Zéland, zakázaly antibiotika jako růstové stimulanty, zatímco v zemích jako Argentina, Čína, Indie a Rusko je tato praxe stále povolena. U každého použití antibiotika je třeba si uvědomit, že 90 % dávky může být vyloučeno nemetabolizovaně ve formě moči či exkrementů.

Rezidua antibiotik se mohou dostat do odpadních vod a čistírenských kalů, odkud pronikají do půdy prostřednictvím zavlažování, aplikace hnojiv nebo biosolidů. Tyto recyklační praktiky jsou Evropskou unií podporovány v rámci cirkulární ekonomiky, což však přináší riziko přenosu reziduí antibiotik do životního prostředí.

Přítomnost antibiotik v životním prostředí podporuje selekční tlak na rozvoj a šíření rezistence k antibiotikům, ohrožuje půdní organismy a kvalitu půdy. Antibiotika mohou být také přijímána rostlinami a v případě, že se jedná o plodiny určené k lidskému konzumu, tak jejich prostřednictvím vstoupit i do potravního řetězce. Proto se projekt zaměřil na chemické a mikrobiologické analýzy, které sledovaly rezidua tulathromycinu a také četnost vybraných bakterií rezistentních k makrolidům. Dále se projekt zaměřil na sledování genů rezistence, kódujících významné typy horizontálně šířené rezistence k této skupině antimikrobik. Sledování bylo prováděno ve vzorcích trusu a chlévské mrvy získaných z reálného provozu. Vzhledem k tomu, že statková hnojiva jsou v rámci cirkulární ekonomiky EU často aplikována na zemědělskou půdu, projekt testoval účinnost fermentace při eliminaci rezistentních mikroorganismů, genů rezistence, a reziduí tulathromycinu. Fermentovaná chlévská mrva byla následně aplikována na zemědělskou půdu a opakovaně analyzována, včetně stanovení reziduí tulathromycinu a jednoho z jeho metabolitů.

Projekt poskytl ucelený pohled na osud těchto látek v životním prostředí po aplikaci statkových hnojiv a mapoval celý proces od medikace telat, fermentace chlévské mrvy, její aplikace na půdu až po dopad v terestriálním prostředí. Součástí projektu je i vstupní analýza a zdůvodnění výběru makrolidů a jejího zástupce tulathromycinu pro testování. Projekt doplňují i trendová a aktuální data o celkové spotřebě antimikrobik a to včetně dat o používání antimikrobik u skotu v ČR, s recentními daty u telat. Jelikož zátěží pro životní prostředí a tlakem na AMR se

vyznačují jak antibiotika použita v humánní, ale i veterinární medicíně, pozornost je věnována oběma oblastem, v rámci ČR i Evropy, a je okomentován důsledek používání makrolidů i možná korelace rezistence s mírou používání předmětných antibiotik u sledovaných bakterií izolovaných z telat po podání tulathromycinu.

1. ÚVOD

Předkládaná zpráva navazuje na první, analytický dokument, zpracovaný v roce 2019 a je již čtvrtým 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). 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.

Produkci hovězího masa jako komodity k přímému kuchyňskému zpracování, lze rozdělit na dvě základní kategorie, maso telecí a maso hovězí (tvořené nejvíce kategoriemi býčci/býci masní, býčci dojných plemen, jalovice). Další produkční kategorie a jejich maso a vnitřnosti jsou pak používány také pro další potravinářské zpracování. V rámci EU byl zaznamenán meziroční pokles produkce (2022–2023) o 3,8 % (kalkulace vychází z hmotnostního objemu v tunách pro produkci hovězích a telecích jatečně zpracovaných těl). Pouhých 6 států tvořilo v roce 2023 většinu (mírně nad 75%) EU produkce hovězího a telecího masa, z toho největšími producenty hovězího masa byly Francie (20,7 %), Německo (17,3 %), Irsko (10,9 %), Itálie (9,7 %), Polsko (9,3%) a Španělsko (9,1 %). V případě telecího zaujímaly více než tři čtvrtiny trhu 4 státy – Nizozemí (27,5 %), Španělsko (21,9 %), Francie (18,3%) a Itálie (9,6 %) (data: [Agricultural production - livestock and meat - Statistics Explained](#)). Nejčastěji je léčba antimikrobiky indikována u dojeného skotu pro terapii mastitid, metritid a onemocnění paznehtů (kulhání skotu). U telat se nejvíce antimikrobik spotřebuje u gastrointestinálních a respiračních infekcí. Masný skot (zejména v případě chovu na pastvě) vykazuje spotřeby nejnižší. Česká republika nepatří mezi výrazné producenty telecího, ani hovězího masa. Z pohledu trendu produkce (2022–2023) na rozdíl od celoevropského meziročního poklesu (o 3,8 %) česká meziroční produkce vykázala nárůst (o 2,4 %), přičemž kalkulace vycházejí z hmotnostního objemu produkce hovězích a telecích jatečně opracovaných těl v tunách. Pokud bychom však zvážili dlouhodobou perspektivu, tak od roku 2020 do roku 2023 produkce

hovězího masa klesla v ČR o třetinu. Jelikož je chlévská mrva (resp. její fermentovaná forma) používána jako hnojivo pro zemědělské půdy, je potřeba zvažovat aspekt vnosu cizorodých látek, zde reziduí antibiotik do zemědělské půdy. Je tak potřebné zvážit jak benefity (hnojení materií organického původu, dodání živin a využití odpadu produkce skotu), tak rizika (kontaminaci půdy), či v konečném důsledku i kontaminace povrchových a podzemních vod antimikrobními látkami a šíření bakterií rezistentních k antimikrobikům a genů rezistence k antimikrobikům.

Makrolidy a jim příbuzné látky

Makrolidy jsou širokospektrá antibiotika s bakteriostatickým účinkem. Původně byla izolována z mikroskopické houby rodu *Streptomyces* a podle své chemické struktury se rozdělují na látky s 14-, 15- a 16laktonovým kruhem. Makrolidům jsou příbuzné i novější skupiny se základem tvořeným laktony – azalidy, ketolidy a triamilidy (do poslední jmenované skupiny, je zařazen také tulathromycin). Základní skupina makrolidů a tyto příbuzné látky je strukturně odlišná, ale funkčně příbuzná dalším látkám ze skupiny tzv. antibiotik MLS_B (makrolidy, linkosamidy, streptogramin B). Mechanismus působení výše uvedených skupin spočívá v zásahu do proteosyntézy buňky a v základu je u skupin stejný nebo velmi podobný. Makrolidy se vážou na 23S rRNA ribozomální podjednotky 50S bakteriální buňky a produkci bílkovin tak buď inhibují nebo způsobují vznik aberantních molekul (Fyfe et al., 2016). Jsou účinné zejména vůči grampozitivním (G⁺) bakteriím jako jsou stafylokoky nebo streptokoky. U gramnegativních (G⁻) bakterií je jejich působení omezené. Vnější membrána těchto mikroorganismů totiž limituje průnik makrolidů do buňky a působí tak jako přirozená bariéra. Nedávné výzkumy prokázaly, že se jedná o komplexní proces, do kterého je zapojeno až 23 různých genů podílejících se na syntéze jednotlivých komponent této membrány. Práce autorů Ma et al. (2024) naznačuje, že inaktivace některých z nich (*surA*, *waaG*) vede k opětovnému zvýšení permeability membrány a s využitím vhodných inhibitorů by tak bylo možné makrolidy použít i k terapii přirozeně rezistentních bakterií. Výše uvedené účinky a mechanismy pojednávají o přímé interakci makrolidů a příbuzných látek s buňkami bakterií, respektive jejich vnitřními strukturami. Je však potřeba připomenout rovněž další vlastnosti těchto antibiotik, díky kterým patří makrolidy mezi často využívaná léčiva. Jedná se o interakce s imunitními mechanismy organismu pacienta, které napomáhají zvládnutí infekce.

Kromě přirozené rezistence se poměrně krátce po zavedení makrolidů do klinické praxe objevily první bakteriální kmeny se získanou rezistencí. K únoru letošního roku bylo popsáno

127 genů, které mohou rezistenci k makrolidům způsobit. Jejich přehled a nomenklatura navazuje na práci autorů Roberts et al., (2004) a je dostupná online (<https://faculty.washington.edu/marilynr/ermwebA.pdf>). Získaná rezistence vzniká dvěma základními způsoby a lze ji popsat následujícími principy. Jedná se o modifikaci vazebného místa, ať už bakteriálního ribozomu (pomocí metylace) nebo molekuly antibiotika, nebo zvýšením vyplavování makrolidů z bakteriální buňky vlivem změny permeability buněčné membrány nebo činností efluxních pump (Dinos et al., 2017). Nejčastěji popisované efluxní proteiny jsou kódovány geny *mef* (geny pro efluxní pumpy ze skupiny tzv. Major Facilitator Superfamily) nebo *msr* (geny pro efluxní pumpy ze skupiny tzv. ABC transportérů). Změnu molekuly antibiotika mohou způsobit např. esterázy kódované geny *ere* nebo fosfotransferázy (geny *mph*) a změnu vazebného místa na ribozomu ovlivňují geny *erm*. Mnoho těchto genů je součástí plazmidů, transpozonů nebo profágů se snadným horizontálním šířením (Feßler et al., 2018). Relativně nově byly zjištěny i další mechanismy rezistence, např. rezistence v důsledku plasticity chromozomů u species z rodu *Mycoplasma*, či konstitutivní rezistence metylací rRNA A2058 či její G2058 mutace, způsobující problémy zejména v léčbě respiračních infekcí vyvolaných *Mycoplasma pneumoniae* u dětí (Ma et al., 2024).

Mef proteiny transportují z buňky navázaný makrolid a vyměňují jej za proton. Jsou účinné na 14- a 15laktonové sloučeniny, ale neváží 16laktonové makrolidy ani linkosamidy nebo streptogramin. Byly prokázány u G⁺ bakterií, méně často také u G⁻ (Dinos et al., 2017).

Msr proteiny byly dříve popisovány jako efluxní pumpy (Fyfe et al., 2016), podle jiných teorií je jejich účinek popisován jako ochrana ribozomu (Wilson et al., 2016). Jejich úlohou je obsadit vazebné místo bakteriálního ribozomu a zamezit tak možnému navázání antibiotika. Způsobují rezistenci k 14- a 15laktonovým makrolidům a streptograminu B. Izolovány byly u zástupců rodu *Staphylococcus*, *Enterococcus* a *Streptococcus*, ale také G⁻ bakterií jako *Pseudomonas* spp. (Dinos et al., 2017).

Makrolidové esterázy (Ere) jsou enzymy, které štěpí esterové vazby laktonového kruhu makrolidů a deaktivují je. Jsou specificky účinné na 14- a 15laktonové makrolidy, ostatní zástupce těchto antibiotik esterázy nehydrolyzují. Geny, které je kódují jsou součástí mobilních genetických elementů a byly prokázány u různých bakteriálních rodů (Dinos et al., 2017).

Fosfotransferázy inaktivují všechny druhy makrolidů, a to přerušením jejich vazby na bakteriální ribozom. Jejich účinek může být indukibilní (*mphA*) nebo konstitutivní (*mphB*) (Dinos et al., 2017, Fyfe et al., 2016).

Erythromycin metyltransferázy (Erm) jsou enzymy, které modifikují bakteriální 23S rRNA a omezují tak možnost všech zástupců skupiny MLS_B vázat se na bakteriální ribozom. Vzniká tak kombinovaná rezistence k makrolidům, linkosamidům a streptograminu B. Geny *erm* jsou lokalizované na plasmidech i transpozonech a obvykle je jejich výskyt spojen i s geny rezistence k dalším antimikrobiálním látkám. Rezistence kódovaná těmito geny se projevuje ve dvou formách – inducibilní nebo konstitutivní. U inducibilní formy se rezistence projevuje pouze v případě, kdy jsou makrolidy transportovány do bakteriální buňky (Ramu et al., 2009), u konstitutivního typu probíhá metylace ribozomů i bez přítomnosti antibiotik. V současné době bylo popsáno 49 různých typů a jejich výskyt byl potvrzen u širokého spektra G⁺, ale i G⁻ bakterií (Roberts et al., 2004).

Antibiotika v půdě

Rezidua léčiv a antibiotik, včetně makrolidových antibiotik, se do půdy dostávají různými způsoby. Mezi hlavní zdroje těchto reziduí v terestriálním prostředí patří zavlažování přečištěnou odpadní vodou, aplikace ošetřených čistírenských kalů (biosolidů) nebo statková hnojiva. V zemědělství jsou tyto recyklační praktiky podporovány Evropskou unií v rámci cirkulární ekonomiky. Tam, kde jsou hojně používána antimikrobika (zejména ta, která mají vyšší míru perzistence v životním prostředí), vzniká selekční tlak a bakterie se přizpůsobují tím, že akvírují další mechanismy rezistence (Wu et al. 2013; Kinney and Heuvel 2020; Riva et al. 2021; Khasawneh and Palaniandy 2021; Bijlsma et al. 2021; Ben Mordechay et al. 2022; Li et al. 2022). Kromě toho tyto matrice, jako jsou odpadní voda, čistírenské kaly, statková hnojiva a půda, nemusí obsahovat pouze parentální látky, ale potenciálně také jejich degradační produkty nebo metabolity těchto léčivých látek, které mohou být stále biologicky aktivní. Nicméně, aplikace statkových hnojiv na zemědělskou půdu je důležitá, protože zlepšuje půdní úrodnost, obohacuje půdu o důležité živiny a organickou hmotu, zvyšuje schopnost půdy zadržovat vodu a podporuje biodiverzitu půdních mikroorganismů, což vše přispívá k dlouhodobé udržitelnosti a zdraví půdy. Statková hnojiva jsou svojí primárně organickou povahou a výše uvedenými benefity významná a je potřeba zdůraznit, že nemohou, a to ani z důvodů ekologických či dalších závažných dopadů a důsledků, být nahrazována jinými hnojivy či agrotechnikou. V závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva, vlastnostech půdy a klimatických podmínkách může docházet k odplavu léčiv do povrchových vod, nebo mohou v půdě setrvávat a následně podléhat různě rychlému procesu degradace,

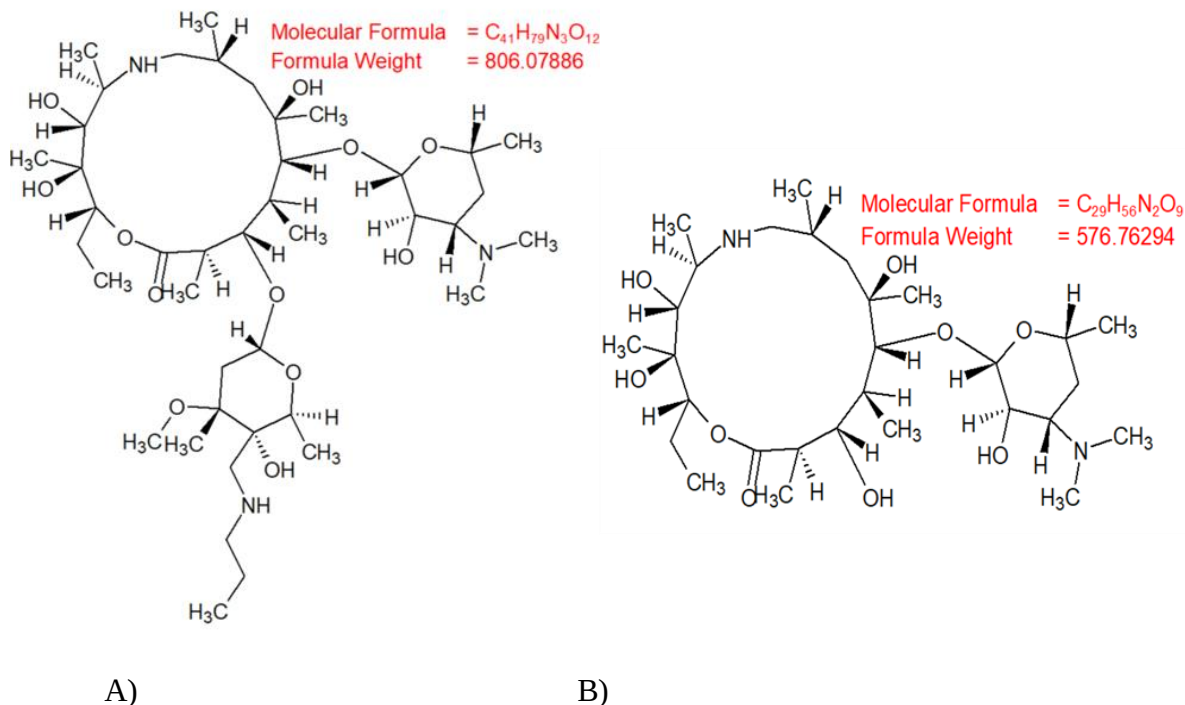
případně mohou být přijímána rostlinami či půdními organismy, které je mohou dále metabolizovat (Wu et al. 2010; Carter et al. 2015; Quaresma et al. 2019).

Avšak přítomnost těchto reziduí může negativně ovlivnit mikrobiotu v půdě, která je nezbytná pro oběh živin, udržování půdní struktury a kvality půdy, a celkového zdraví rostlin a půdních organismů (Gallego and Martin-Laurent 2020; Sauvêtre et al. 2020). Rezidua léčivých látek mohou vyvolat inhibici klíčení semen, potlačení růstu biomasy plodin nebo změny v morfologii rostlin (Hillis et al. 2011; Michelini et al. 2013), nebo také mohou být absorbována zemědělskými plodinami, což může vést k znečištění potravinového řetězce s potenciálně negativním dopadem na lidskou populaci z důvodu dlouhodobého příjmu nízkých koncentrací těchto látek (Carter et al. 2014b; Carter et al. 2014a). Mimo jiné tyto organické mikropolutanty, i ve stopových koncentracích vytvářejí prostředí příznivé pro rozvoj rezistence vůči antibiotikům, která pak může být přenášena napříč životním prostředím, mezi zvířata a lidi (Hashmi et al. 2017; Gallego and Martin-Laurent 2020). Pro studium a sledování osudu antibiotik v půdě je zásadní získat co nejvíce informací o jejich transportu, degradaci a sorpčních vlastnostech, tedy o jejich celkové perzistenci v půdním prostředí. Tyto procesy jsou ovlivněny jak vlastnostmi samotného léčiva, jako jsou struktura, molární hmotnost, polarita, rozpustnost ve vodě, sorpční koeficienty či poločas rozpadu, tak také charakteristikami půdy, včetně jejího pH, typu, obsahu a kvality organické hmoty, obsahu anorganických iontů (Ca^{2+} , Mg^{2+} , ...), složení půdní mikrobioty, pěstovanými plodinami (Kodešová et al. 2015; Kodešová et al. 2019; Keerthanan et al. 2021) nebo také klimatickými podmínkami (teplota, vlhkost, množství srážek) (Ben Mordechay et al. 2022; Keerthanan et al. 2022). Jedním z účinných způsobů, jak snížit koncentraci antibiotik a genů pro antibiotickou rezistenci ve statkových hnojivech, a tím i kontaminaci půdy/životního prostředí, je před jejich aplikací na zemědělskou půdu provést úpravu těchto hnojiv pomocí anaerobní digesce, kompostování nebo vermikompostování (Mohring et al. 2009; Motoyama et al. 2011; Ho et al. 2013; Sanchez-Hernandez 2020).

Fyzikálně-chemické vlastnosti makrolidových antibiotik

Struktura makrolidů je charakterizována laktonovým kruhem obsahujícím 12–16 atomů. Makrolidová léčiva jsou komplexní směsí úzce příbuzných antibiotik, která se liší chemickými substitucemi na různých uhlíkových atomech ve struktuře, a také přítomností aminocukrů a neutrálních cukrů. Mezi makrolidová antibiotika používaná v humánní medicíně patří zejména: azithromycin a clarithromycin, dále pak spiramycin a spíše v menším rozsahu

nejstarší erythromycin. V ČR byly v roce 2022 makrolidy druhou nejvíce používanou skupinou antimikrobik (ECDC, 2023); PUK 2024). Ve veterinární medicíně v ČR byly v roce 2022, 2023 a 2024 na trhu následující makrolidy a příbuzné látky: spiramycin, tulathromycin, gamithromycin, tildipirosin, tylosin, tilmikosin a tylvalosin (data ÚSKVBL).



Obrázek 1. Strukturní vzorce: A) tulathromycin, B) metabolit tulathromycin-M1

Tulathromycin (Obrázek 1A), který se skládá z makrolidového kruhu a dvou cukerných složek (tj. desosamin a modifikované kladinózy), je prvním členem nové podskupiny triamilidů polosyntetických makrolidových antibiotik (Saito-Shida et al. 2019). Tulathromycin má 13 nebo 15-členný makrocyclický kruh s cukernou složkou desosaminu na C-5 a modifikovanou cukernou složkou kladinózu na C-3 (El Badawy et al. 2014). Tulathromycin existuje jako směs dvou izomerů: tulathromycin A (15-členný makrolidový kruh) a B (13-členný makrolidový kruh) [10.1016/j.jchromb.2019.02.011], konkrétně ve vodných roztocích v poměru 9:1 (izomer A:izomer B) (Saito-Shida et al. 2019). Ačkoli je tulathromycin u léčených zvířat převážně vylučován nezměněný, někdy je pomalu metabolizován na tulathromycin-M1 (obrázek 1B) (Wang et al. 2012; Saito-Shida et al. 2019). Tulathromycin-M1 vzniká odštěpením modifikované kladinózové složky (oba jeho izomery) (Wang et al. 2012; Saito-Shida et al.

2019; Yaeger et al. 2021). Fyzikálně-chemické vlastnosti tulathromycinu je možné nalézt v tabulce 1.

Tabulka 1. Fyzikálně-chemické vlastnosti tulathromycinu

IUPAC název	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>R</i>)-11-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-[(2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyl-5-(propylaminomethyl)oxan-2-yl]oxy-3,5,8,10,12,14-hexamethyl-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one
Sumární vzorec	C ₄₁ H ₇₉ N ₃ O ₁₂
Molární hmotnost [g·mol ⁻¹]	806,1
Monoizotopická hmotnost	805.56637
Vzhled	bílý prášek
Rozpustnost ve vodě [mg·ml ⁻¹]	0,184
pK _{a1}	10,21
pK _{a2}	12,2
LogP	2,78

Analytické metody

Při analýze organických polutantů v environmentálních (půda, odpadní voda, čistírenské kaly) a biologických vzorcích (statková hnojiva, zemědělské plodiny, půdní organismy) je příprava vzorků klíčovou částí, jelikož analyty jsou přítomné v nízkých koncentracích a jejich kvantitativní stanovení je komplikováno matričními vlivy. Pro získání kvalitních dat jsou zapotřebí ideálně již optimalizované, robustní a validované analytické metody, skládající se z extrakční metody a vhodné dostatečně selektivní a citlivé analytické koncovky (např. kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií) (Albero et al. 2019; Manasfi et al. 2020).

V dnešní době mezi nejběžněji používané extrakční postupy patří: extrakce ultrazvukem (USE), extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE), mikrovlnná extrakce (MAE) anebo QuEChERS, respektive tedy vortexováním či protřepáváním (manuálním nebo na třepačce) (Chuang et al. 2015; Aparicio et al. 2018; Albero et al. 2019; da Silva et al. 2020).

Avšak spolu s extrahovanými analyty (v našem případě léčivy) je získáno i velké množství koextrahovaných látek (Albero et al. 2019). Dále samotnou výtěžnost extrakce sledovaných

analytů výrazně ovlivňují i vlastnosti vzorku, například v případě půdy (půdní druh, pH půdy; EC půdy; % organické hmoty půdy; KVK a koncentrace TN, TP, Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+) (Karcı and Balcıoğlu 2009; Zhang et al. 2014). Problematická může být ať už samotná extrakce léčiv ze vzorku nebo vliv matrice při analýze, kdy může nastat zvýšení (enhance) nebo potlačení (suprese) signálu analytu kvůli matričním efektům. Z těchto důvodů je obvykle používán další krok čištění (případně prekoncentrace) vzorku (nejčastěji za a) extrakce na tuhou fázi – SPE nebo b) disperzní SPE – dSPE v podobě metody QuEChERS) (Petrovic et al. 2006; Ben et al. 2008; Komori et al. 2013; Pocrnić et al. 2020), i když podle dostupné literatury některé výzkumné skupiny zastávají i filozofii „extract and inject“, kdy jsou vzorky analyzovány bez dalšího přečišťování či ředění (Parente et al. 2021).

Hlavní a rutinně používanou analytickou koncovkou pro stanovení organických mikropolutantů, včetně léčiv představuje kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Petrovic et al. 2006; Ben et al. 2008; Huang et al. 2013). Mezi nejčastěji využívaný separační mód v kapalinové chromatografii při analýze léčiv je systém reverzních fází, kdy stacionární fáze je nepolární (nejčastěji silikagel modifikovaný C18) a 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 amonného nebo octanu amonného (Petrovic et al. 2006; Huang et al. 2013; Mravcová et al. 2024). Jako iontový zdroj je v hmotnostním spektrometru nejčastěji využíván především elektrosprej (ESI). Hmotnostním analyzátozem první volby díky svým možnostem v kvantitativní analýze je trojitý kvadrupól (QqQ či TQ) (Huang et al. 2013; Mravcová et al. 2024). Dalšími dnes už hojně využívanými analyzátory jsou q-TOF nebo orbitální past, které jsou vhodnější spíše pro identifikaci degradačních produktů či metabolitů léčiv v analyzovaných vzorcích (Petrovic et al. 2006).

2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU

Funkční úkol pro rok 2024 byl zaměřen na rezidua tulathromycinu (antibiotikum ze skupiny makrolidů používané u skotu) a jeho metabolitu, současně je doplněna analýza posledních dostupných dat o jejich spotřebách v letech 2018–2023 v České republice. Ke stanovení vybraných látek v chlévské mrvě z chovu léčených zvířat a v půdě byly provedeny extrakce prostřednictvím ultrazvuku a následně byly kvantifikovány pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Přítomnost bakterií rezistentních k makrolidům byla v odebraných vzorcích trusu, mrvy a půdy sledována kultivačními metodami se selektivními médii suplementovanými erythromycinem. Průkaz vybraných genů rezistence byl proveden metodou PCR.

Cíle bylo dosaženo provedením následujících úkolů:

- A. Analýza dostupných dat o spotřebách antibiotik používaných u potravinových zvířat a za rok 2023 i specificky u skotu v České republice – ÚSKVBL
- B. Vývoj metodiky a vlastní stanovení obsahů vybraných látek v chlévské mrvě a v půdě po aplikaci vyzrálé chlévské mrvy od medikovaných zvířat – VUT, ÚKZÚZ
- C. Pomocí vhodných feno- a genotypových metod byly získány informace o abundanci rezistentních bakterií a prevalenci genů zodpovědných za rezistenci k makrolidům ve faeces a chlévské mrvě – MUNI
- D. Modelový pokus s využitím chlévské mrvy zapracované do půdy umožnil stanovit dobu přežívání rezistentních bakterií v prostředí – MUNI, ÚKZÚZ

3. MATERIÁL A METODIKA

Charakteristika hospodářství

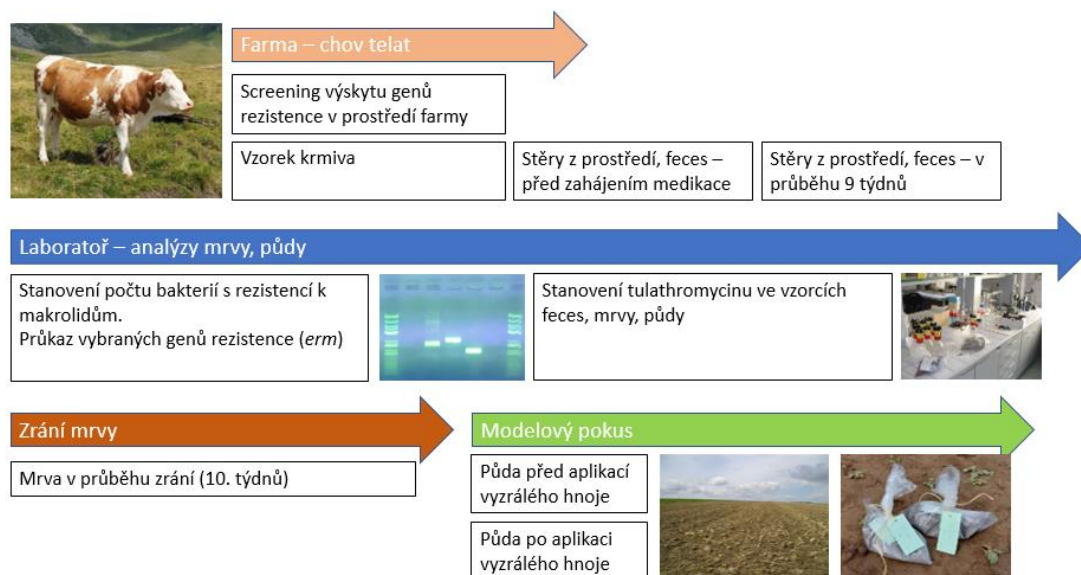
Hospodářství bylo vybráno na základě informací o používání veterinárních léčivých přípravků (VLP) s obsahem tulathromycinu u telat. Jednalo se o hospodářství s chovem skotu v kraji Vysočina, s odchovem telat. V rámci odchovu telat byla pro odběry vybrána hala, která byla rozdělena na 5 sekcí. V každé ze sekcí může být umístěno 20 telat po odstavu. Telata byla postupně odstavena a převáděna na pevnou stravu. V době studie byla krmena pevnou krmnou směsí. Krmná směs je zamíchávána v mobilním míchači, který projíždí halu a krmivo zakládá do krmných žlabů. Krmná směs by mohla být jedním ze vstupů bakteriální kontaminace, proto byl odebrán směsný vzorek bezprostředně po založení krmiva do žlabů. Telata jsou umístěna v hale, kde jsou oddělující ohradníky. V rámci sledování vstupů z prostředí byly proto odebrány vzorky stěrů z ohradníků a rovněž z podlahy zastájených sekcí. Dále byly provedeny odběry trusu telat před léčbou a po léčbě VLP s tulathromycinem (v příslušných časových odstupech a z prostředí téže sekce i shodných zvířat).

V době provádění odběrů bylo v sekci ustájeno 18 telat, která byla indikována pro podání tulathromycinu z důvodu bronchopneumonie. V době podání VLP obsahujícího tulathromycin (Draxxin injekční, držitel rozhodnutí o registraci Zoetis) měla telata živou hmotnost přibližně 80 kg. Dávkování VLP bylo uskutečněno v souladu s podmínkami registrace, tedy dle souhrnu informací o přípravku. Jednalo se o jednorázové subkutánní podání do oblasti krku, v dávce 2,5 mg tulathromycinu/kg živé hmotnosti (což odpovídalo objemu VLP 1 ml/40 kg živé hmotnosti léčeného telat, tj. celkem 2 ml *pro toto* (na kus)).

Experimentální část

Experimentální část se skládala ze tří úrovní – farma s chovem masného typu skotu, fermentace chlévské mrvy a polní pokus. Na farmě byl získán vzorek mrvy k modelovému pokusu fermentace. Dále byl na farmě proveden screening výskytu genů rezistence k tulathromycinu v prostředí. Fermentace probíhala od 27. 3. do 28. 5. 2024 (celkem 10 týdnů). Pokusné poličko bylo založeno v areálu zkušební stanice ÚKZÚZ Chrlice, na fluvizemi.¹ Po aplikaci vyzrálého hnoje byly z testovacího pozemku odebírány v pravidelných intervalech vzorky půdy.

¹ 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 2. Aktivitty realizované v roce 2024 v rámci funkčního úkolu

Odběry vzorků z výkrmové haly

V polovině dubna (15. 4. 2024) byl úkol na farmě zahájen odběrem vzorku krmiva, faeces a provedením mikrobiologických stěrů z podlahy a hrazení. V tento den byla zároveň zahájena léčba, resp. bylo provedeno jednorázové subkutánní podání VLP Draxxin ustájeným telatům.

Stěry z prostředí a odběry vzorků faeces ke stanovení bakterií rezistentních k makrolidům a průkazu vybraných genů rezistence byly prováděny pravidelně po 2 týdnech. Stěry byly provedeny pomocí sterilní polyuretanové stěrové houbičky (World Bioproducts, USA). Vzorky faeces a krmiva byly uloženy do PE sáčků, uloženy do chladicího boxu a v den odběru předány do laboratoře.

Ode dne podání tulathromycinu byly dále v přesně stanovených termínech odebírány vzorky faeces ke stanovení reziduí tulathromycinu. Den podání léčiva byl stanoven jako den 0, vzorky byly odebírány 1., 3., 5., 10., 14., 28. a 42. den.

Vzorky faeces byly odebírány z několika míst v dané sekci, z podlahy, přímo do PE sáčku. Nelze tedy vyloučit příměs moči ve vzorku.

Odběry vzorků z období zrání mrvy

Dne 23. 3. 2024 byla na farmě odebrána chlěvská mrva určená k vyžrání a následné aplikaci na pokusný pozemek. Mrva (17,8 kg) byla uložena do sudu a 9. 4. 2024 inokulována modelovými kmeny *Escherichia coli* (CT228) a *Staphylococcus aureus* (SM10) pozitivní na přítomnost horizontálně přenosných genů rezistence k makrolidům (*ermB*, *ermA*). Z mrvy před a po inokulaci byl odebrán vzorek k mikrobiologickým analýzám. Následující den (10. 4. 2024) byla směs spikována veterinárním léčivým přípravkem Draxxin; bylo aplikováno 1,8 ml léčiva a byl odebrán vzorek pro chemickou analýzu. Během zrání byla směs zavlažována deionizovanou vodou. Zrání mrvy probíhalo po dobu 10 týdnů. V průběhu zrání bylo ze směsi odebráno dalších 15 vzorků zrající mrvy.

Vzorky určené k mikrobiologickým analýzám byly asepticky odebrány do sterilních vzorkovnic a okamžitě předány do laboratoře. Vzorky určené ke stanovení obsahu reziduí tulathromycinu byly ukládány do PE sáčků a 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 Chrlicích (4 m^2) dne 28. 5. 2024. Vyzrálý hnůj byl kašovitě konzistence a mohl být rovnoměrně aplikován na pokusnou plochu. Celkem bylo aplikováno 12 kg hnoje na 4 m^2 . Jednalo se o ruční aplikaci. Na rozdíl od předchozích úkolů (Mravcová et al., 2021, Karpíšková et al., 2023) nebyl materiál před aplikací opakovaně inokulován modelovými bakteriálními kmeny, ani obohacen o tulathromycin. Dva týdny po aplikaci (10. 6. 2024) byla plocha oseta lničkou setou (*Camelina sativa*). Lnička bohužel nevzešla, a proto byl výsev 8. 7. 2024 opakován. Z tohoto výsevu vzešlo přibližně 20 % osiva a na ploše se začaly rozvíjet plevelné rostliny, především šrucha zelná (*Portulaca oleracea*) a laskavec ohnutý (*Amaranthus retroflexus*). Vzhledem k tomu, že pokus má simulovat produkční plochu, byly plevele ponechány.

Půda

Na základě analýzy vzorku lze konstatovat, že se jedná se o půdu těžkou, jílovitohlinitou, s neutrálním pH a 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.



Obrázek 3. Porost na pokusném poličku (5. 8. 2024)

Tabulka 2. Agrochemické vlastnosti půdy

pH/CaCl ₂	P	K	Mg	Ca	Ntot	TOC
	Přístupné živiny (mg.kg ⁻¹)				%	
7,0	183	307	359	4842	0,18	1,77

První půdní vzorky ke stanovení tulathromycinu a k mikrobiologickým analýzám byly z modelového polička odebrány těsně před aplikací vyzrálého hnoje a těsně po jeho aplikaci. Další vzorkování probíhalo pravidelně v čtrnáctidenních intervalech. Poslední analyzovaný vzorek byl z 2. září 2024.

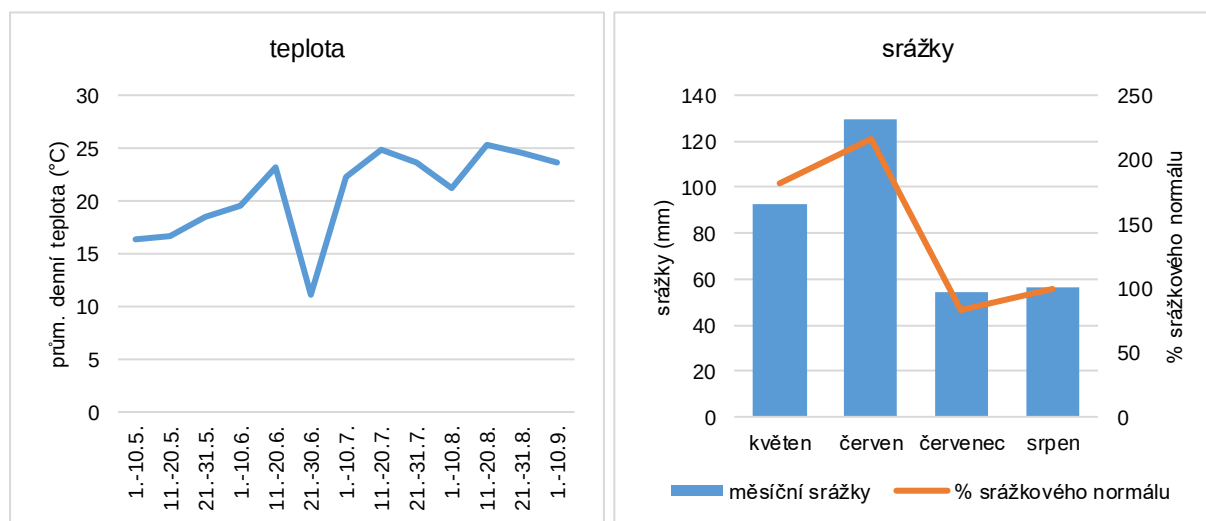
Tabulka 3. Celkové obsahy rizikových prvků v půdě na ZS Chrlice a v půdách dlouhodobých programů ÚKZÚZ – v Registru kontaminovaných ploch, RKP a v dlouhodobém monitoringu půd, BMP (lučavka královská, mg.kg⁻¹ suš., půdy ostatní)

	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
Chrlice	13,7	1,35	0,29	17,2	54,0	31,8	43,2	27,7	59,3	116	0,130
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

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 MUNI a VUT.

Meteorologické podmínky na pokusném pozemku

Na ZS Chrlice je umístěna automatická meteostanice. Podle údajů z této stanice činilo rozpětí teplot od zahájení (28. 5. 2024) do ukončení pokusu (2. 9. 2024) 7,0–36,4 °C, přičemž průběh průměrných teplot v jednotlivých týdnech je graficky zachycen na obrázku 4. Srážkové úhrny činily od 0,1 mm v srpnu po 129,3 mm v červnu.



Obrázek 4. Průběh průměrných denních teplot a srážek na zkušební pozemku

Tabulka 4. Přehled základních termínů

Týdny (trvání)	Datum	Vzorky z farmy (z průběhu léčby)	Vzorky z farmy (pravidelné odběry)	Vzorky z období fermentace (zrající mrva)	Vzorky půdy z modelového pokusu
1	27.03.2024			FERM (MUNI, VUT)	
2	-				
3	09.04.2024			FERM (MUNI)	
	10.04.2024			FERM (VUT)	
	12.04.2024			FERM (VUT)	
4	15.04.2024		krmivo, stěry, feces (MUNI)	FERM (VUT)	
	16.04.2024	feces - 1.den (VUT)			
	17.04.2024			FERM (VUT)	
	18.04.2024	feces - 3.den (VUT)			
	19.04.2024			FERM (VUT)	
	20.04.2024	feces - 5.den (VUT)			
5	22.04.2024			FERM (MUNI, VUT)	
	25.04.2024	feces - 10.den (VUT)		FERM (VUT)	
6	29.04.2024	feces - 14.den (VUT)	stěry, feces (MUNI)	FERM (VUT)	
	03.05.2024			FERM (VUT)	
7	06.05.2024			FERM (MUNI, VUT)	
	09.05.2024			FERM (VUT)	
8	13.05.2024	feces - 28.den (VUT)	stěry, feces (MUNI)	FERM (VUT)	
	16.05.2024			FERM (VUT)	
9	21.05.2024			FERM (MUNI, VUT)	
	23.05.2024			FERM (VUT)	
10	27.05.2024	feces - 42.den (VUT)	stěry, feces (MUNI)		
	28.05.2024			FERM (MUNI, VUT)	půda 0 (VUT, MUNI)
11					
12	10.06.2024				půda 2 (VUT, MUNI)
	12.06.2024		stěry, feces (MUNI)		
13	17.06.2024				
14	24.06.2024				půda 4 (VUT, MUNI)
15	01.07.2024				
16	08.07.2024				půda 6 (VUT, MUNI)
17	15.07.2024				
18	22.07.2024				půda 8 (VUT, MUNI)
19	29.07.2024				
20	05.08.2024				půda 10 (VUT)
21	12.08.2024				
22	19.08.2024				půda 12 (VUT)
23	26.08.2024				
24	02.09.2024				půda 14 (VUT)

3.1 Mikrobiologická část – část A

Výběr a testování vhodného kultivačního média pro modelové kmeny, testování koncentrace suplementu

Příprava selektivního suplementu

Zásobní roztok erythromycinu (Merck, D) byl připraven rozpuštěním 32 mg látky v 1 ml 95% etanolu (Penta, ČR). Koncentrace suplementu v jednotlivých médiích byla navržena podle kritérií pro stanovení rezistence k antimikrobiálním látkám metodou minimální inhibiční koncentrace (MIC). U *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bylo využito kritérium uvedené v EUCAST (2024) tj. 1 µg/ml. Pro *E. coli* nejsou kritéria k hodnocení rezistence k erythromycinu ve standardně používaných pokynech (EUCAST, CLSI) stanovena, proto byla koncentrace suplementu nastavena podle kritérií pro bakterie rodu *Salmonella* (CLSI, 2020). U všech sledovaných bakterií byla testována také půda s vyšším obsahem suplementu, než udávají uvedená kritéria.

Kultivační média

Ke kultivaci bakterií *Escherichia coli* (*E. coli*) bylo použito médium Harlequin® Chromogenic coliform Agar (Neogen, USA). Ke kontrole kvality připraveného média a výběru vhodné koncentrace suplementu byly využity dva kmeny *E. coli*, které nenesly geny rezistence k erythromycinu a dále tři kmeny *E. coli* s genem *ermB*. Schopnost růstu byla sledována jak na půdě bez suplementace, tak na půdách s přidavkem erythromycinu a růst byl semikvantitativně hodnocen (+, ++, +++). K vlastním analýzám bylo vybráno médium s koncentrací suplementu, která spolehlivě bránila růstu kmenům bez specifických genů rezistence, ale kmeny nesoucí geny *erm* rostly bez ovlivnění.

Stanovení počtu *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bylo testováno na médiích Manitol salt agar (Liofilchem, IT), Baird-Parker agar (HiMedia, IN) a Chromatic Staph aureus (Liofilchem, IT). Připravena byla média nesuplementovaná erythromycinem, a dále s obsahem erythromycinu 1 µg/ml a 2 µg/ml. Výběr média byl proveden na základě růstu/inhibice kmenů k erythromycinu senzitivních (3) a rezistentních (3). Schopnost růstu byla hodnocena semikvantitativně (+, ++, +++). Sledován byl také specifický růst, udávaný výrobcem a možnost odlišení jednotlivých kolonií. K vlastním analýzám bylo vybráno médium

s koncentrací suplementu, která spolehlivě inhibovala růst senzitivních kmenů, ale neovlivnila růst kmenů rezistentních a kolonie *S. aureus* na něm měly charakteristický jednotný vzhled.

Tabulka 5. Výsledky testování média Harlequin® Chromogenic coliform Agar (HCCA) pro *Escherichia coli* (EC)

Geny získané rezistence k erythromycinu	Označení kmene	Růst testovaných kmenů na médiích		
		HCCA	HCCA + 16 µg/ml ery	HCCA + 32 µg/ml ery
nezjištěny	CT303	+++	+	-
	CT304	+++	+	-
<i>ermB</i> +	CT228	+++	+++	+++
	CT248	+++	+++	+++
	CT262	+++	+++	+++

bez nárůstu, + jednotky kolonií; ++ desítky kolonií; +++ stovky kolonií

Tabulka 6. Výsledky testování média Manitol salt agar (MSA) pro *Staphylococcus aureus* (SA)

Citlivost kmenů k erythromycinu	Označení kmene	Růst testovaných kmenů na médiích		
		MSA	MSA + 1 µg/ml ery	MSA + 2 µg/ml ery
senzitivní	SM551	+++	+	-
	SM560	+++	+	-
	SM561	+++	+	-
rezistentní (<i>ermA</i> +)	SM10	+++	+++	+++
	SM125	+++	+++	+++
	SM154	+++	+++	+++

bez nárůstu, + jednotky kolonií; ++ desítky kolonií; +++ stovky kolonií

Tabulka 7. Výsledky testování média Chromatic Staph aureus (CHRSA) pro *Staphylococcus aureus* (SA)

Citlivost kmenů k erythromycinu	Označení kmene	Růst testovaných kmenů na médiích		
		CHRSA	CHRSA + 1 µg/ml ery	CHRSA + 2 µg/ml ery
senzitivní	SM551	+++	+	-
	SM560	+++	+	-
	SM561	+++	+	-
rezistentní (<i>ermA</i> +)	SM10	+++	+++	+++
	SM125	+++	+++	+++
	SM154	+++	+++	+++

bez nárůstu, + jednotky kolonií; ++ desítky kolonií; +++ stovky kolonií

Tabulka 8. Výsledky testování média Baird-Parker (BP) pro *Staphylococcus aureus* (SA)

Citlivost kmenů k erythromycinu	Označení kmene	Růst testovaných kmenů na médiích		
		BP	BP + 1 µg/ml ery	BP + 2 µg/ml ery
senzitivní	SM551	+++	-	-
	SM560	+++	+	-
	SM561	+++	-	-
rezistentní (<i>ermA</i> +)	SM10	+++	+++	+++
	SM125	+++	+++	+++
	SM154	+++	+++	+++

bez nárůstu, + jednotky kolonií; ++ desítky kolonií; +++ stovky kolonií

Příprava médií pro stanovení počtu modelových kmenů

Na základě testování a výběru médií byly připraveny kultivační půdy pro vlastní analýzy. Ke stanovení počtu *E. coli* byl použit Harlequin® Chromogenic coliform Agar (HACC) s přídavkem erythromycinu o výsledné koncentraci 32 µg/ml. Počet *S. aureus* byl sledován na médiu Chromatic Staph aureus (CHRSA) s obsahem erythromycinu 2 µg/ml.

Příprava médií pro stanovení počtu vybraných bakterií ve vzorcích z farmy a půdy

Počty bakterií *E. coli* a *S. aureus* byly stanoveny na kultivačních médiích připravených stejným způsobem jako pro stanovení počtu modelových kmenů. Počet bakterií rodu *Enterococcus* byl sledován na médiu Slanetz and Bartley medium (Himedia, IN) s 16 µg/ml erythromycinu.

Zpracování stěrů prostředí

Stěry z prostředí farmy byly ihned po transportu do laboratoře zpracovány. K polyuretanové stěrové houbičce bylo přidáno 20 ml PPV (pufrované peptonové vody) a provedena homogenizace na přístroji typu stomacher (Interscience, F). Z každého vzorku byla připravena řada desetinásobných ředění. Z vybraných ředění byl stanoven celkový počet glukuronidáza pozitivních *E. coli*, *S. aureus* a rodu *Enterococcus* inokulací 0,1 ml příslušného ředění na média bez suplementace a dále počet sledovaných bakterií presumptivně rezistentních k makrolidům inokulací 0,1 ml na média obohacená erythromycinem. Následovala inkubace při 37 °C po dobu 18–24 h. Z každé misky použité pro stanovení počtu příslušného bakteriálního rodu/druhu bylo odebráno až 5 suspektních kolonií ke confirmaci. U těchto kmenů byla sledována přítomnost

genů *erm* metodou PCR. Z pomnožené PPV byl odebrán 1 ml k extrakci DNA pomocí Blood and Tissue kitu (Qiagen, D) a průkazu genů rezistence metodou PCR.

Zpracování vzorků chlévské mrvy a půdy

Ze vzorků typu mrva, faeces a půda bylo v laboratoři naváženo 25 g a homogenizováno s 225 ml PPV. Z každého vzorku byla připravena řada desetinásobných ředění a z vybraných ředění bylo provedeno stanovení celkový počet glukuronidáza pozitivních *E. coli*, *S. aureus* a rodu *Enterococcus* a stejných bakterií presumptivně rezistentních k makrolidům dle postupu popsáném výše. Z každé misky použité pro stanovení počtu příslušného bakteriálního rodu/druhu bylo odebráno až 5 suspektních kolonií ke confirmaci. U těchto kmenů byla sledována přítomnost genů *erm* metodou PCR. Z pomnožené PPV byl odebrán 1 ml k extrakci DNA pomocí Blood and Tissue kitu a průkazu genů rezistence metodou PCR.

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.

Extrakce DNA z pomnožené pufrované peptonové vody

Po ukončení inkubace PPV byl odebrán 1 ml homogenátu, zcentrifugován při 8 000 rpm/10 min, supernatant byl odstraněn a peletka byla promyta v 500 ml fosfátového pufru (VITRUM VWR, ČR). Po následném odstředění 8 000 rpm/5 min byla peletka resuspendována v 180 µl ATL pufru a další kroky následovaly dle návodu od výrobce kitu DNA pomocí Blood and Tissue. Výsledná DNA byla naředěna v poměru 1:10 se sterilní PCR vodou (TOP-BIO, ČR) a použita do PCR reakce.

Stanovení přítomnosti vybraných genů rezistence k makrolidům

Přítomnost genů kódujících 23S rRNA metyltransferázy *ermA*, *ermB*, *ermF*, *ermT* a *ermQ* (Koike et al. 2010; Chen et al. 2007) byla testována metodou PCR. K amplifikaci byl použit

QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagene, D) a vlastní reakční cyklus byl převzat z předchozích studií (Koike et al. 2010; Chen et al. 2007). Templátová DNA byla připravena dle typu vzorku buď lýzou varem (bakteriální kultury) nebo extrakčním kitem (pomnožená PPV). Vlastní PCR produkt byl po amplifikaci a elektroforetickém rozdělení v agarózovém gelu obarven barvivem MIDORI Green Advance (Nippon, D) a vizualizován UV světlem.

Konfirmace rodu *Enterococcus* a druhů *E. faecalis*, *E. faecium*

Rodová a druhová identifikace izolátů z média Slanetz Bartley byla provedena metodou PCR dle studií autorů Deasy et al. (2000) a Jackson et al. (2004). K amplifikaci byl použit PPP master mix (Top-Bio, ČR) a vlastní reakční cyklus byl převzat z uvedených studií. Templátová DNA byla z bakteriálních kultur připravena lýzou varem. Vlastní PCR produkt byl po amplifikaci a rozdělení v agarózovém gelu obarven barvivem MIDORI Green Advance (Nippon, D) a vizualizován UV světlem.

Tabulka 9. Primery použité ve studii – jejich sekvence a zdrojová literatura

Název primeru	Gen	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu (bp)	Reference
ermA-FV	ermA	AGTCAGGCTAAATATAGCTATC	157	Koike et al. (2010)
ermA-RV		CAAGAACAATCAATACAGAGTCTAC		
ermB-FW	ermB	GGTTGCTCTTGCACTCAAG	191	
ermB-RV		CAGTTGACGATATTCTCGATTG		
ermF-189f	ermF	CGACACAGCTTTGGTTGAAC	309	Chen et al. (2007)
ermF-497r		GGACCTACCTCATAGACAAG		
ermT-52f	ermT	CATATAAATGAAATTTTGAG	369	
ermT-420r		ACGATTGTATTTAGCAACC		
ermQ-FW	ermQ	CACCAACTGATATGTGGCTAG	154	Koike et al. (2010)
ermQ-RV		CTAGGCATGGGATGGAAGTC		
InKo1	16S	GGA GGA AGG TGG GGA TGA CG	241	Martineau et al., (1996)
InKo2		ATG GTG TGA CGG GCG GTG TG		
E1		TCA ACC GGG GAG GGT	733	Deasy et al, 2000
E2		ATT ACT AGC GAT TCC GG		
FL1	E. faecalis (sodA)	ACTTATGTGACTAACTTAACC	360	Jackson et al, 2004
FL2		TAATGGTGAATCTTGGTTTGG		
FM1	E.faecium (sodA)	GAAAAACAATAGAAGAATTAT	215	
FM2		TGCTTTTTGAATTCTTCTTTA		

Stanovení minimální inhibiční koncentrace erythromycinu metodou E-test

Z vyšetřovaných izolátů bylo připraveno inokulum o denzitě 0,5 McF, naneseno na médium Müller-Hinton agar (Oxoid, UK), přiložen proužek TEST STRIP Erythromycin E 0,016-256 (Liofilchem, IT) a výsledek byl odečten po dokončené inkubaci 37 °C/24 h.

Modelové pokusy přežívání bakterií s geny rezistence k makrolidům**Výběr kmenů a příprava inokula**

K modelovým pokusům sledování přežívání bakterií nesoucích geny rezistence k makrolidům byly vybrány kmeny *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* získané v rámci rutinní praxe mikrobiologické laboratoře MUNI. Jejich charakteristika je uvedena v tabulkách 10, 11. V případě kmene *E. coli* CT228 se jednalo o glukuronidáza pozitivní kmen, nesoucí také gen rezistence ke kolistinu *mcr1*. *S. aureus* byl kromě makrolidů rezistentní také k meticilinu (MRSA).

Tabulka 10. Původ a charakteristika modelového kmene *Escherichia coli*

Označení kmene	Původ	Sérotyp	Geny rezistence k makrolidům	Antibiogram
CT228	rybí maso Vietnam	O109:H28	<i>ermB</i> , <i>mdfA</i>	AMP, C, S, K, CN, N, Su, SXT, W, TE, NA, CIP, ENR

Tabulka 11. Původ a charakteristika modelového kmene *Staphylococcus aureus*

Označení kmene	Původ	MLST typ/ <i>spa</i> typ	Geny rezistence k makrolidům	Antibiogram
SM10	Humánní - stěr z rány ČR	ST225/t045	<i>ermA</i>	DA, E, CN, TE, CIP, FOX

AMP – ampicilin, 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, DA – klindamycin, E – erythromycin, FOX – ceftioxin

Modelové kmeny *E. coli* CT228 a SM10 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 sledovaných 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 150 ml pufrované peptonové vody (PPV, Oxoid, UK), do které byly inokulovány modelové bakteriální 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 100 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 0,7, což odpovídá přibližně počtu 10^9 KTJ/ml. Z finální suspenze o objemu 0,5 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.

3.2 Analytická část – část B

V rámci provedeného experimentu byly analyzovány dva typy vzorků: chlévská mrva a půda před a po aplikaci fermentované, chlévské mrvy. Po odběru byly všechny vzorky až do analýzy skladovány v mrazícím boxu při teplotě -18 °C, aby byla zajištěna jejich stabilita a minimalizováno riziko degradace analyzovaného léčiva a jeho metabolitu.

Použité materiály a chemikálie

Milli-Q voda; LC-MS voda 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); 25% vodný roztok amoniaku (VWR); hydroxid sodný čistoty 35% (VWR); kyselina chlorovodíková čistoty 35-38% (VWR); tulathromycin A analytický standard (s obsahem 5% tulathromycin B) (LGC), tulathromycin A d-7 (LGC).

Použité laboratorní vybavení

Přístroj pro přípravu Milli-Q vody Milli-Q Millipore, Academic; kapalinový chromatograf UHPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies; chromatografická kolona (Luna® Omega Polar C18 Phenomenex, 100 x 2,1 mm; 1,6 µm); hmotnostní spektrometr Bruker Evoq LC/TQ; Generátor dusíku a vzduchu, Peak Scientific – Genius 3045; Analytické váhy Kern 770; ultrazvuková lázeň Kraintek 5; zařízení pro sušení dusíkem Evaterm, Labicom; centrifuga Eppendorf 5804; pH metr inoLab® 730, WTW Cond; automatické mikropipety; PP/PE zkumavky o objemu 50 ml; stříkačkové nylonové filtry o průměru 13 mm s póry o velikost 0,22 µm (Chromservis); injekční stříkačky pro filtrování; a další běžné laboratorní sklo a pomůcky.

Použité plyny

Dusík o čistotě 4.7 (Siad Czech spol. s r. o.) a argon o čistotě 5.0 (SIAD Czech spol. s.r.o.).

Postup přípravy metabolitu tulathromycinu

Do PP/PE centrifugační zkumavky o objemu 50 ml bylo napipetováno 5 ml zásobního roztoku tulathromycinu o koncentraci 10 mg·ml⁻¹. Tato parentální látka byla hydrolyzována na svůj metabolit (deglykosylace tulathromycinu), Tulathromycin-M1, přidavkem 590 µl 17,5% HCl, přičemž molární poměr HCl k tulathromycinu byl 5:1. Následná hydrolýza probíhala v ultrazvukové lázni vyhřáté na 80 °C po dobu 1 hodiny, což umožnilo přeměnu parentální látky na její metabolit. Po dokončení hydrolýzy byla HCl neutralizována přidavkem 1125 µl 10% roztoku NaOH.

Postup extrakce tulathromycinu a jeho metabolitu ze vzorků kejdy

Do PP/PE centrifugační zkumavky o objemu 50 ml bylo naváženo 1,00±0,05 g zhomogenizovaného vzorku chlévské mrvy. K tomuto vzorku byla přidána extrakční činidla, konkrétně 5 ml McIlvaineho pufru o hodnotě pH 6,0±0,2 a 5 ml acetonitrilu (ACN). Vzorek byl promíchán pomocí vortexu po dobu 30 sekund a následně byl umístěn do ultrazvukové lázně po dobu 10 minut při teplotě 35 °C. Po dokončení extrakce byly vzorky centrifugovány při 4 800 otáčkách za minutu po dobu 8 minut. Extrakt byl následně slit do vialky o objemu 30 ml. Poté byla extrakce opakována ještě jednou a obě frakce supernatantu byly slity do jedné vialky, kde byl uchován konečný extrakt. Po předchozích krocích byla provedena filtrace extrahovaného vzorku přes stříkačkový filtr s nylonovým filtrem o velikosti pórů 0,22 µm do vialky se septem. Vzorek byl připraven buď k analýze jako neředěný, nebo byl před LC-MS/MS analýzou vhodně naředěn. K 995 µl vzorku bylo následně přidáno 5 µl vnitřního standardu tulathromycinu-d7 o koncentraci 10 µg/ml ke kompenzaci matričních efektů.

Pro kvantifikaci tulathromycinu a tulathromycinu-M1 ve vzorcích chlévské mrvy byla použita metoda externí kalibrace zahrnující izotopicky značený vnitřní standard tulathromycinu d7. V souladu s literaturou (Saito-Shida et al. 2019), bez ohledu na čistotu standardu, se poměry izomerů A a B nacházejí v roztoku v poměru 9:1. Proto kalibrační rovnice pro tulathromycin a jeho metabolit byly získány součtem ploch píků izomerů A a B (tak jako ve studiích (Gáler et al. 2004; Saito-Shida et al. 2019)) v lineárním rozsahu 1,0 až 500 ng·ml⁻¹, což odpovídá 20 až 10 000 ng·g⁻¹ v chlévské mrvě). Koeficienty determinace (R²) přesahující hodnotu 0,995 pro oba analyty potvrdily linearitu. Konkrétní výsledky validace pro oba analyty, včetně MLoD, MLoQ, RR, inter-day RSD a ME, jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12. Validační výsledky pro stanovení tulathromycinu a jeho metabolitu ve vzorcích kejdy

	tulathromycin	tulathromycin M-1
LoD [ng·ml ⁻¹]	4,3	0,8
LoQ [ng·ml ⁻¹]	13,0	2,3
MLoD [ng·g ⁻¹]	86	12
MLoQ [ng·g ⁻¹]	260	46
RR 500 ng·g ⁻¹ [%]	42±4	34±1
RR 1 000 ng·g ⁻¹ [%]	55±2	69±11
RR 2 500 ng·g ⁻¹ [%]	67±3	96±3
RR 5 000 ng·g ⁻¹ [%]	73±1	88±6
RR 25 000 ng·g ⁻¹ [%]	76±2	83±3
RR 50 000 ng·g ⁻¹ [%]	87±3	70±4
Inter-day RSD [%]	4	6
ME [%]	59	81

Postup extrakce tulathromycinu a jeho metabolitu ze vzorků půdy

Do PP/PE centrifugační zkumavky o objemu 50 ml bylo naváženo 2,00±0,05g zhomogenizovaného vzorku půdy. K tomuto vzorku bylo přidáno 5 ml 0,1% roztoku amoniaku (NH₃) v methanolu (MeOH). Následně byl vzorek promíchán pomocí vortexu po dobu 30 sekund a poté extrahován v ultrazvukové lázni vyhřáté na 35 °C po dobu 10 minut. Po dokončení extrakce byly vzorky centrifugovány při 6 000 otáčkách za minutu po dobu 8 minut. Supernatant byl přefiltrován přes nylonový filtr (velikosti pórů 0,22 µm) do vialky o objemu 20 ml. Celý proces extrakce byl zopakován se stejným objemem extrakčního činidla a přefiltrován, přičemž oba supernatanty byly slity dohromady a důkladně promíchány. Následně bylo extrakční médium odpařeno pod proudem dusíku na minimální zbytkový objem v termostatu vyhřátém na 40 °C. K vysušenému vzorku bylo následně přidáno 995 µl 0,1% NH₃ v MeOH a 5 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.

Pro kvantifikaci tulathromycinu a tulathromycinu-M1 ve vzorcích půdy byla použita metoda externí kalibrace zahrnující izotopicky značený vnitřní standard tulathromycinu d₇. Kalibrační

rovnice pro tulathromycin a jeho metabolit byly získány součtem ploch píků izomerů A a B (tak jako ve studiích (Gáler et al. 2004; Saito-Shida et al. 2019)) v lineárním rozsahu 1,0 až 500 ng·ml⁻¹ (což odpovídá 0,5 ng·g⁻¹ až 250 ng·g⁻¹ v půdě). Koeficienty determinace (R^2) přesahující hodnotu 0,995 pro oba analyty potvrdily linearitu. Konkrétní výsledky validace pro oba analyty, včetně MLoD, MLoQ, RR, inter-day RSD a ME, jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13. Validační výsledky pro stanovení tulathromycinu a jeho metabolitu ve vzorcích půdy

	tulathromycin	tulathromycin M-1
LoD [ng·ml ⁻¹]	4,3	0,8
LoQ [ng·ml ⁻¹]	13,0	2,3
MLoD [ng·g ⁻¹]	2,15	0,4
MLoQ [ng·g ⁻¹]	6,5	1,15
RR 25 ng·g ⁻¹ [%]	46±1	12±10
RR 50 ng·g ⁻¹ [%]	38±3	31±3
RR 75 ng·g ⁻¹ [%]	37±1	42±3
RR 100 ng·g ⁻¹ [%]	39±2	53±1
RR 200 ng·g ⁻¹ [%]	49±13	59±15
Inter-day RSD [%]	9	25
ME [%]	90	125

LC-MS/MS metoda pro kvanfitikaci tulathromycinu a jeho metabolitu ve vzorcích chlévské mrvy a půdy

Parametry kapalinového chromatografu (LC), které zahrnují podmínky, jako je typ kolony, složení mobilní fáze, průtok mobilní fáze a gradient separace, jsou detailně popsány v tabulce 14. Parametry iontového zdroje (ESI), včetně hodnot napětí a teplot, které ovlivňují ionizaci vzorků, jsou uvedeny v tabulce 15. Parametry hmotnostního analyzátoru (TQ) jsou popsány v tabulce 16. Tyto parametry zajišťují optimální výkon metody pro detekci a kvantifikaci tulathromycinu, ale i jeho metabolitu.

Tabulka 14. Parametry metody pro kapalinový chromatograf

UPLC parametry		
Objem nástříku	10 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 15. MS Parametry nastavení iontového zdroje

MS parametry iontového zdroje	
Iontový zdroj	elektrosprej (HESI)
Napětí	5 000 V
Polarita	pozitivní (ESI+)
Průtok pomocného plynu	15
Teplota pomocného plynu	600 °C
Průtok sušícího plynu	25
Teplota sušícího plynu	250 °C
Průtok zmlžovacího plynu	45
Aktivní odťah	ON
Režim skenu	MRM
Tlak kolizního plynu	1,5 mTorr

Tabulka 16. MRM přechody pro tulathromycin, jeho deuterovaný vnitřní standard a pro metabolit tulathromycinu (včetně izomerů A i B)

Analyt	MRM přechod	RT (min)	Prekurzorový iont (m/z)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
tulathromycin A	kvant. přechod	3,5	806,6	577,1	20
	kval. přechod	3,5	403,8	72,2	20
	kval. přechod	3,5	403,8	116,2	20
	kval. přechod	3,5	403,8	158,0	20
	kval. přechod	3,5	403,8	230,0	10
tulathromycin B	kvant. přechod	2,0	806,6	577,1	20
	kval. přechod	2,0	403,8	72,2	20
	kval. přechod	2,0	403,8	116,2	20
	kval. přechod	2,0	403,8	158,0	20
	kval. přechod	2,0	403,8	230,0	10
tulathromycin A d7	kvant. přechod	3,5	407,6	79,3	10
	kval. přechod	3,5	407,6	116,0	20
	kval. přechod	3,5	407,6	158,0	20
tulathromycin B d7	kvant. přechod	2,0	407,6	79,3	10
	kval. přechod	2,0	407,6	116,0	20
	kval. přechod	2,0	407,6	158,0	20
tulathromycin A - M1	kvant. přechod	2,4	289,0	72,1	20
	kval. přechod	2,4	289,0	98,0	20
	kval. přechod	2,4	289,0	116,0	20
	kval. přechod	2,4	289,0	158,0	10
	kval. přechod	2,4	289,0	231,0	10
tulathromycin B - M1	kvant. přechod	1,2	289,0	72,1	20
	kval. přechod	1,2	289,0	98,0	20
	kval. přechod	1,2	289,0	116,0	20
	kval. přechod	1,2	289,0	158,0	10
	kval. přechod	1,2	289,0	231,0	10

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 ESUAvet). Dále byla využita data o používání antimikrobních VLP v chovech skotu (dojeného, masného a plemenného) za rok 2023 a za první pololetí roku 2024.

Byly zhodnoceny prodeje specificky pro tulathromycin, a to prostřednictvím zpracování dat z prodeje všech VLP (včetně generických) za rok 2023 a trendová analýza spotřeb tulathromycinu od roku 2018. Byly zhodnoceny také souhrnné prodeje pro skupinu makrolidů v ČR (včetně příbuzných látek) za léta 2018–2023 (spiramycin, tulathromycin, gamithromycin, tildipirosin, tylosin, tilmikosin a tylvalosin). Pro rok 2023 byly zhodnoceny prodeje makrolidů a specificky tulathromycinu v sektoru skotu. Dále, z důvodu faktu, že geny *erm* jsou selektovány jak makrolidy, či příbuznými azalidy, ketolidy a triamilidy, tak linkosamidy byly sledovány i trendy v používání linkosamidů (linkomycin, pirlimycin) za období 2018–2023. Pro rok 2023 bylo provedeno i zhodnocení používání linkosamidů v sektoru skotu.

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 pro skupinu makrolidů (a příbuzných látek) a také pro skupinu linkosamidů, specifická data pro streptograminy nejsou pro humánní sektor dostupná. 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, k datu zhotovení této zprávy, poslední dostupná data za rok 2021. Tato data jsou zaměřena na skupiny makrolidů a linkosamidů (s vědomím, že jsou v obou oblastech používány různé léčivé látky), nicméně při použití obou skupin vzniká selekční tlak na rozvoj rezistence k makrolidům a linkosamidům (geny *erm*).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Mikrobiologická část – část A

Průkaz genů rezistence k makrolidům u izolátů získaných na farmě

Výskyt vybraných genů kódujících rezistenci k makrolidům byl sledován na farmě ve vzorcích faeces chovaných zvířat a ve stěrech z prostředí chovu (podlaha, hrazení). Celkem bylo provedeno 5 odběrů s odstupem přibližně 14 dní. Odebráno bylo celkem 15 vzorků. V prvním termínu byly sledované ukazatele zjišťovány i v krmivu.

Z výsledků uvedených v tabulce 17 vyplývá, že v žádném z vyšetřených vzorků nebyla zjištěna přítomnost genů *ermT* a *ermQ*. Ve všech vzorcích, s výjimkou krmiva, byla zjištěna přítomnost genu *ermB*. Druhým nejčastěji detekovaným genem byl *ermF*. Gen *ermA* se vyskytl jen u tří vzorků (jedenkrát faeces, dvakrát stěr z podlahy v různých odběrových termínech). Ve vzorku krmiva nebyl detekován žádný ze sledovaných genů rezistence.

Tabulka 17. Přítomnost sledovaných genů rezistence ve vzorcích z farmy

Číslo vzorku MUNI	Datum odběru	Popis vzorku	Průkaz genů rezistence po pomnožení					
			<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>ermT</i>	<i>ermQ</i>	InKo
279/24	15.04.2024	15/04/24_faeces chov	-	+	+	-	-	+
280/24		15/04/24_krmivo	-	-	-	-	-	+
281/24		15/04/24_stěr podlaha	-	+	+	-	-	+
282/24		15/04/24_stěr hrazení	-	+	-	-	-	+
359/24	29.04.2024	29/04/24_faeces chov	+	+	+	-	-	+
360/24		29/04/24_stěr podlaha	+	+	+	-	-	+
361/24		29/04/24_stěr hrazení	-	+	+	-	-	+
432/24	13.05.2024	13/05/24_faeces chov	-	+	+	-	-	+
433/24		13/05/24_stěr podlaha	+	+	+	-	-	+
434/24		13/05/24_stěr hrazení	-	+	-	-	-	+
567/24	27.05.2024	27/05/24_faeces chov	-	+	+	-	-	+
568/24		27/05/24_stěr podlaha	-	+	+	-	-	+
569/24		27/05/24_stěr hrazení	-	+	+	-	-	+
637/24	12.06.2024	12/06/24_faeces chov	-	+	+	-	-	+
638/24		12/06/24_stěr podlaha	-	+	+	-	-	+
639/24		12/06/24_stěr hrazení	-	+	+	-	-	+

InKo – interní kontrola, – negativní; + pozitivní;

Stanovení počtu indikátorových mikroorganismů

Bakterie *E. coli* byly detekovány ve všech vzorcích faeces a stěrů z podlahy (obrázek 5). Nejvyšší počty byly zjištěny ve faeces z 3. odběru (13. 5. 2024). Počet *E. coli* se pohyboval v rozmezí $2 \times 10^5 - 8 \times 10^6$ KTJ/g faeces. Bakterie *E. coli* rostoucí na médiu suplementovaném erythromycinem se vyskytovaly v počtech o řád nižších v rozmezí $2 \times 10^4 - 2 \times 10^6$ KTJ/g. U stěrů z hrazení byly kmeny *E. coli* detekovány ve dvou květnových odběrech. V jednom případě pouze varianta kmenů rostoucích pouze na médiu bez suplementace erythromycinem.

Ke confirmaci bylo odebráno celkem 107 kmenů suspektních *E. coli*. V osmi případech nebyl druh *E. coli* potvrzen, jednalo se o vzorky stěrů z hrazení odebrané 12. 6. 2024. U všech potvrzených *E. coli* byla sledována přítomnost vybraných genů rezistence (49 z média HCCA bez suplementace, 50 z média HCCA s erythromycinem). Gen *ermF* byl prokázán u 14 izolátů *E. coli* (14 %) a gen *ermB* v pěti případech (5 %). Žádný kmen nenesl více sledovaných genů současně. U 28 (56 %) izolátů z média suplementovaného erythromycinem nebyl potvrzen žádný ze sledovaných genů rezistence k makrolidům.

Výskyt *S. aureus* nebyl prokázán v žádném z vyšetřovaných vzorků. Ke confirmaci bylo odebráno 23 izolátů, ale příslušnost ke sledovanému druhu potvrzena nebyla.

Výskyt grampozitivních (G+) bakterií rezistentních k erythromycinu byl dále sledován na médiu Slanetz-Bartley. Pozitivní nálezy byly zjištěny ve všech sledovaných vzorcích s výjimkou krmiva. Počet KTJ v jednotlivých odběrech je uveden na obrázku 6. Nejvyšší nálezy sledovaných bakterií ve faeces a stěrech z podlahy byly prokázány v odběrech provedených v dubnu v rozmezí $8 \times 10^6 - 1,3 \times 10^7$ KTJ/g faeces, nálezy bakterií rezistentních k makrolidům byly ve většině případů o 2 řády nižší, přesto tvořily většinu ze sledované populace bakterií. Ve stěrech z hrazení byly tyto bakterie prokázány řádově v nižších počtech, ve stěru z 13. 5. 2024 nebyly žádné kolonie prokázány na médiu suplementovaném erythromycinem.

Ke confirmaci příslušnosti k rodu *Enterococcus* bylo izolováno 118 kolonií (56 z média Slanetz-Bartley bez suplementace, 62 z média obohaceného erythromycinem). Rodová příslušnost byla potvrzena metodou PCR u 17 izolátů (14 %), v jednom případě byl izolát identifikován i na úrovni druhu jako *E. faecalis*. Přítomnost genů *erm* byla prokázána u 8 z nich (47 %), gen *ermB* byl detekován v sedmi případech, gen *ermF* jednou. Celkem 23 ze

zbývajících rodově nedoručených izolátů (101) získaných z média Slanetz-Bartley neslo některý ze sledovaných genů. Jednalo se o gen *ermF* (12), *ermB* (10) a u jednoho izolátu byly detekovány oba geny současně.

U vybraných izolátů *E. coli* (17) a *Enterococcus* spp. (7) bylo provedeno stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) metodou E-test. U téměř všech izolátů byla MIC určena jako >256 µg/ml. Pouze v jednom případě (izolát *Enterococcus* spp., *ermB* pozitivní) byla MIC stanovena 12 µg/ml.

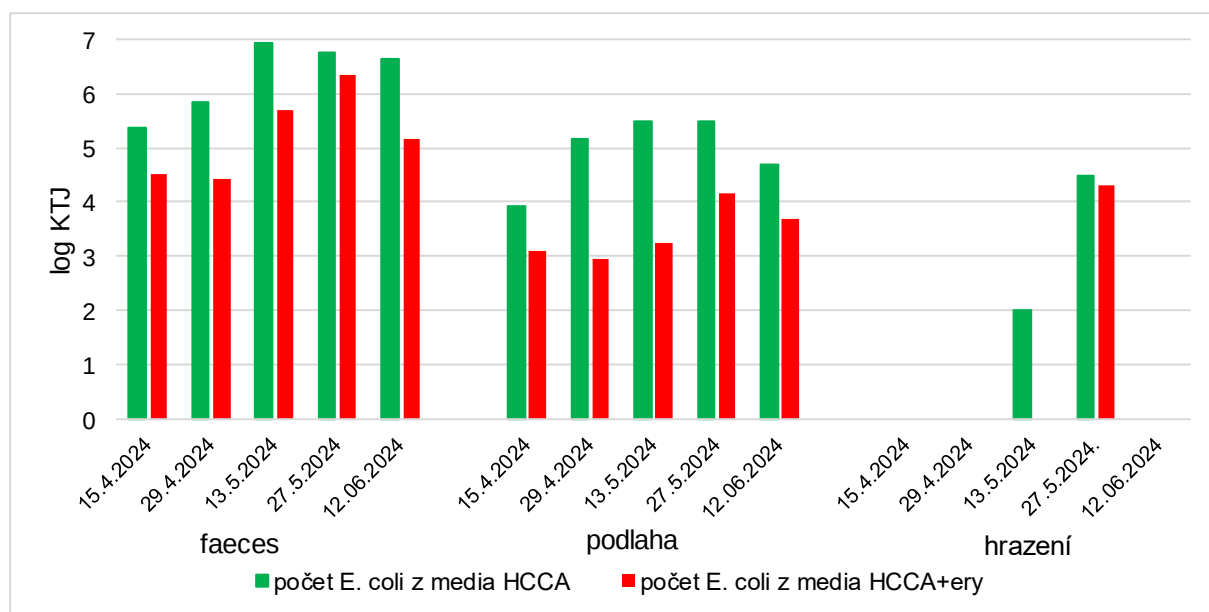
Z uvedených výsledků je patrné, že bakterie rezistentní k makrolidům se na sledované farmě vyskytují jak u zvířat, tak v prostředí, nebyly však detekovány z krmiva. Sledované geny rezistence jsou rozšířeny v populaci G⁺ i G⁻ bakterií, dominantní byl výskyt genů *ermB* a *ermF*, gen *ermA* byl prokázán pouze v celkové DNA z pomnoženého vzorku, u jednotlivých izolátů potvrzen nebyl.

Vliv používání makrolidů v chovech skotu na selekci rezistentních kmenů je studován dlouhodobě. Nedávno byla např. popsána studie autorů Schmidt et al. (2020), která se zaměřila na sledování, zda podávání tylosinu skotu vede ke zvýšení abundance bakterií rezistentních k antimikrobiální látkám ve faeces zvířat, případně v prostředí. Celkem 84 kusů skotu z výkrmu bylo opakovaně testováno v období od listopadu 2015 do června 2016. Design studie zahrnoval sledování počtu *E. coli* rezistentních k cefalosporinům třetí generace, výskyt methicilin rezistentních *S. aureus* a stanovení počtu enterokoků rezistentních k erythromycinu. Bylo zjištěno, že *E. coli* rezistentní k cefalosporinům se vyskytovaly ve faeces ze všech odběrů od zvířat, kterým byl podáván tylosin, v signifikantně vyšších počtech než u kontrolní skupiny. Kmeny *S. aureus* byly prokázány pouze u 0,6 % vzorků, ale žádný z izolátů nebyl rezistentní k methicilinu. Enterokoky rezistentní k makrolidům byly izolovány z faeces kontrolní i testovací skupiny zvířat v počtech bez statisticky významného rozdílu. Autoři Müller et al. (2018) také sledovali vliv podávání tylosinu u skotu na vznik rezistence bakterií rodu *Enterococcus*. V rámci provedeného pokusu porovnávali počty enterokoků izolovaných z média Slanetz-Bartley bez přídavku erythromycinu a z média suplementovaném tímto antibiotikem. Obdobně jako v naší studii, byli kromě bakterií rodu *Enterococcus* na tomto médiu detekováni také zástupci jiných G⁺ rodů, zejména rodu *Streptococcus* nebo *Bacillus*. Z jejich výsledků vyplynulo, že se v průběhu podávání tylosinu signifikantně zvýšil počet enterokoků rezistentních k makrolidům, a to nejen ve skupinách zvířat, kde byl aplikován

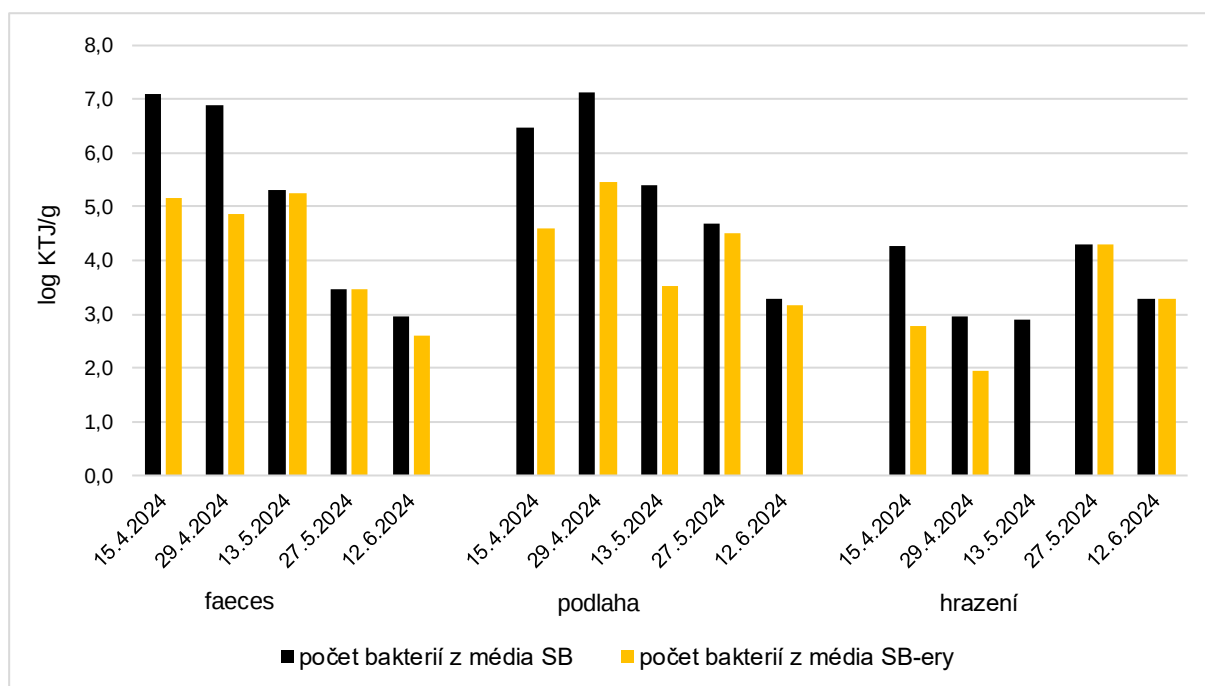
tylosin, ale také u skupiny zvířat z negativní kontroly. Autoři předpokládají, že na selekci rezistentních kmenů nemá vliv pouze vlastní aplikace antibiotika, ale také kumulativní efekt expozice z prostředí, kde se tyto látky dlouhodobě používají. Tato hypotéza by vysvětlovala i výskyt G⁺ bakterií rezistentních k makrolidům ve vzorcích námi sledovaného chovu, kdy rezistentní kmeny byly detekovány nejen ve faeces zvířat, ale také v prostředí.

Metyltransferázy (Erm) jsou enzymy, které se způsobují rezistenci nejen k makrolidům, ale i k funkčně podobným antibiotikům jako jsou linkosamidy a streptogramin. Geny, které je kódují, se nachází na mobilních genetických elementech a mohou se tak snadno šířit v rámci bakteriální populace. Většinou se šíří společně s dalšími geny rezistence. Tím je vysvětlován také např. vyšší výskyt cefalosporin rezistentních *E. coli* u tylosinem léčených telat ve studii autorů Schmidt et al. (2020). Mobilní genetické elementy se mohou v bakteriálních buňkách nacházet ve více kopiích, případně se mohou kombinovat různé mechanismy rezistence nebo typy genů rezistence k makrolidům a zesilovat tak svůj účinek. To by potvrzovalo fakt, že je možné pozorovat rozdíl mezi počtem kolonií *E. coli* k makrolidům přirozeně rezistentních, které rostou na kultivačních médiích bez a se suplementací erythromycinem.

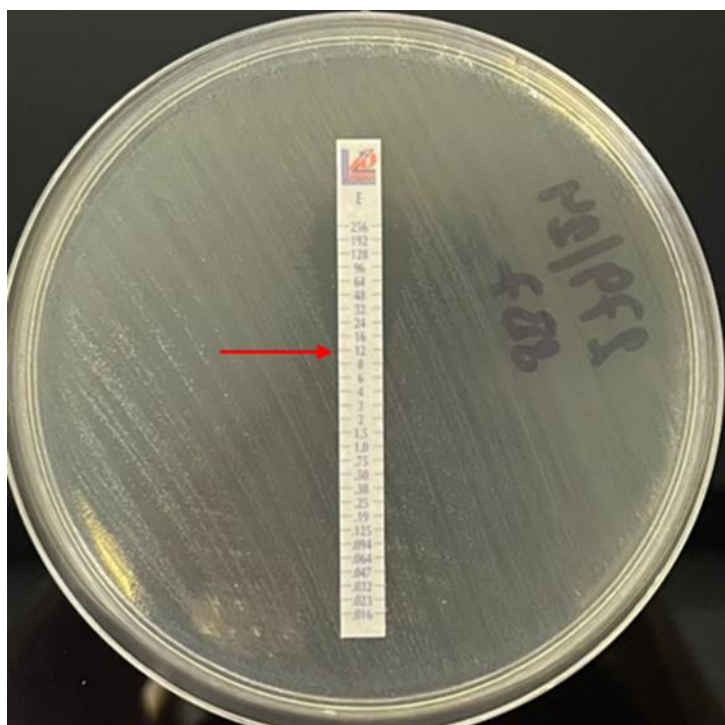
Geny *ermB* a *ermF*, které byly ve vzorcích z farmy prokázány, patří k nejčastěji detekovaným zástupcům této skupiny u hospodářských zvířat (Chen et al., 2007, Koike et al., 2010, Gardner et al., 2014). Popsány byly nejen u enterokoků nebo *E. coli*, ale také u dalších více než 30 bakteriálních rodů mimo jiné také u rodů *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. nebo u anaerobních bakterií rodu *Bacteroides* nebo *Clostridium* (Roberts et al., 2008).



Obrázek 5. Počet *E. coli* stanovený v jednotlivých termínech odběrů na farmě podle druhu vzorku (HCCA-Harlequin® chromogenic coliform agar; +ery – suplementovaný erythromycinem)



Obrázek 6. *bakterií rostoucích na médiu Slanetz-Bartley (SB) bez a se suplementací erythromycinem (SB-ery) v jednotlivých termínech odběrů na farmě a dle druhu vzorku*



Obrázek 7. *Ukázka stanovení minimální inhibiční koncentrace metodou E-test u kmene Enterococcus spp.*

Modelový pokus přežívání *E. coli* a *S. aureus* s geny rezistence k makrolidům v průběhu fermentace chlévské mrvy

Pokus probíhal s chlévskou mrvou odebranou na farmě dne 23. 3. 2024. Inokulace vzorku proběhla jedním litrem suspenze modelových kmenů *E. coli* a *S. aureus*. Kmen *E. coli*, s rezistencí typu ESBL a genem *ermB*, byl připraven v denzitě 2×10^8 KTJ/ml. Denzita *S. aureus*, rezistentního k meticilinu a pozitivního na gen *ermA*, byla 4×10^8 KTJ/ml. Po zaočkování a promíchání probíhala fermentace po dobu 50 dnů.

Mrva určená k fermentaci byla vyšetřena dvakrát. Jednou po odběru vzorku na farmě a podruhé těsně před zaočkováním. V obou vzorcích byla po pomnožení 25 g prokázána přítomnost genů *ermB* a *ermF*. Gen *ermA* nebyl detekován (tabulka 18). Při stanovení počtu *E. coli* nebo bakterií rostoucích na mediu Slanetz-Bartley nebyly mezi oběma odběry zaznamenány rozdíly (obrázek 8). Bakterie *E. coli* byly v obou případech stanoveny v počtu 10^3 KTJ/g, z média Slanetz-Bartley byly detekovány bakterie v počtu $8,7 \times 10^6$ a 1×10^7 KTJ/g. *S. aureus* ve vzorcích detekován nebyl. Ke confirmaci bylo odebráno 40 izolátů (20 suspektních *E. coli* a 20 izolátů z obou variant agarů Slanetz-Bartley). Žádný z potvrzených kmenů *E. coli* nenesl rezistenci shodnou s modelovým kmenem, bylo ale detekováno osm kmenů *E. coli* s genem *ermF*. Gen *ermB* byl prokázán u osmi izolátů z media Slanetz-Bartley. V pěti případech se jednalo o bakterie rodu *Enterococcus*, tři izoláty byly identifikovány jako zástupci rodu *Streptococcus*. Další vzorek z pokusu fermentace byl odebrán ihned po přidání modelových kmenů a následně pokračovaly odběry v průběhu pokusu vždy v odstupu 14 dnů. Celkem byly z průběhu fermentace odebrány 3 dílčí vzorky.

Výsledky stanovení počtu jednotlivých mikroorganismů shrnují obrázky 9, 10, 11. Po inokulaci mrvy modelovými kmeny se počet *E. coli* rezistentních k erythromycinu zvýšil z 3×10^4 KTJ/g na 1×10^7 KTJ/g. V průběhu fermentace se celkový počet *E. coli* mírně snižoval až na hodnotu 1×10^5 KTJ/g.

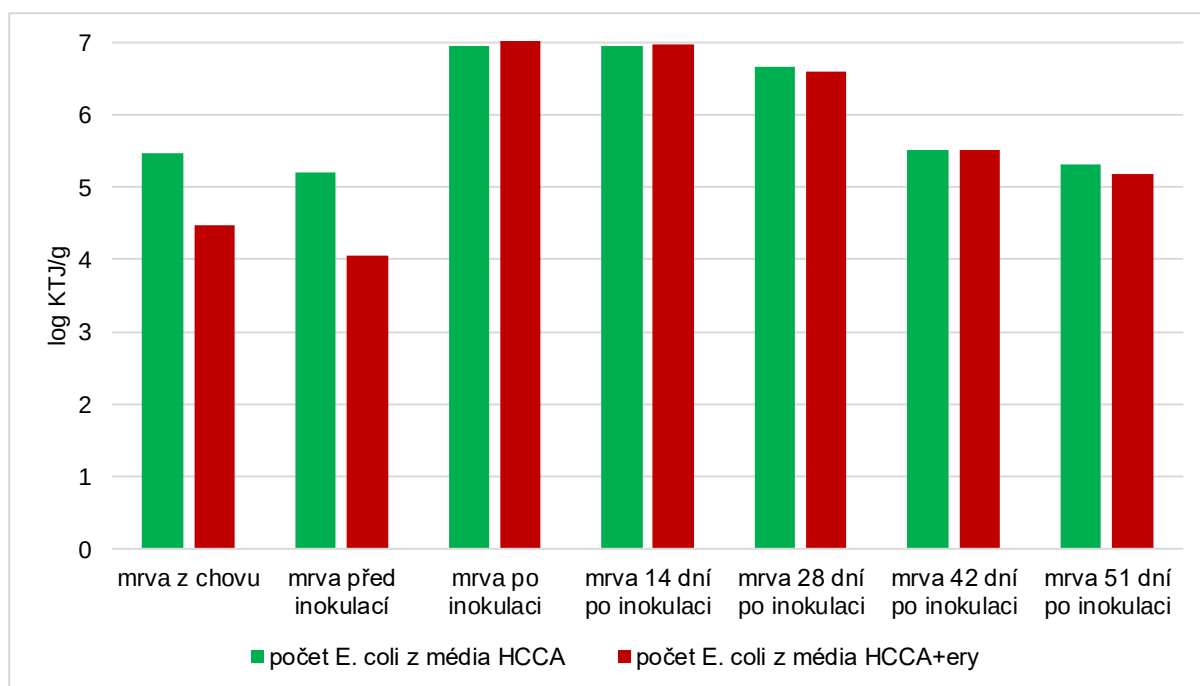
Počet bakterií *S. aureus* byl nejvyšší v odběru provedeném ihned po inokulaci modelovým kmenem. Z hodnoty 1×10^7 KTJ/g se jejich počet ale poměrně rychle snižoval a poslední dva odběry už byly tyto kmeny pod mezí detekce kvantitativní kultivační metody. Gen *ermA* byl ale v celkové DNA z pomnožených vzorků prokazatelný ve všech odběrech provedených po inokulaci.

Sledováno bylo také přežívání bakterií rostoucích na mediu Slanetz-Bartley. Bylo zjištěno, že jejich počet se obdobně jako u kmenů *S. aureus* během fermentace snižoval a 42 dní po začátku pokusu byl jejich počet <100 KTJ/g (pod mezí detekce kvantitativní kultivační metody).

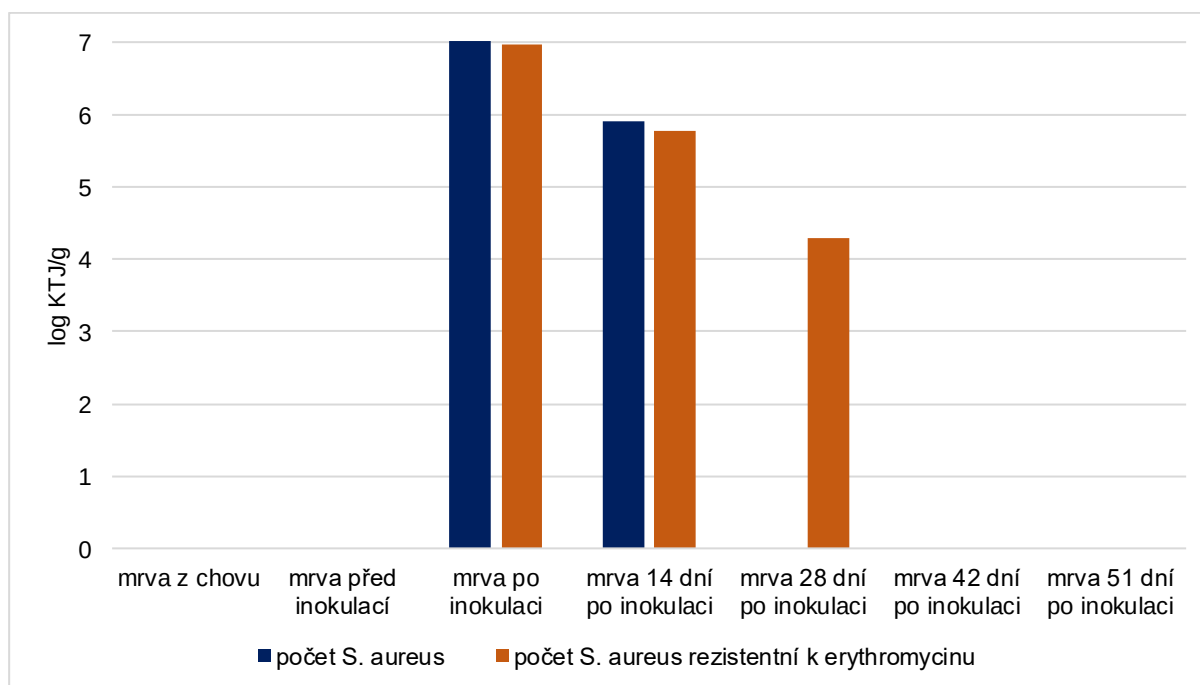
V průběhu fermentace chlévské mrvy dochází ke změnám fyzikálně-chemických ukazatelů jako je teplota, pH nebo obsah vody. Celý proces tak prochází několika fázemi, kdy nejprve dochází ke zvýšení teploty a poklesu pH (termofilní fáze 1.–20. den), následně se teplota sníží a pH se zvyšuje (21.–40. den fáze mezofilní) a ve fázi zrání (41.–45. den) teplota dále klesá, ale pH je ustálené. Obsah vody se v průběhu procesu postupně snižuje (Sardar et al., 2021). Změna fyzikálních podmínek bezprostředně ovlivňuje také složení mikrobiomu včetně přítomnosti 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 (Wang et al., 2022). Studie dynamiky změn bakteriálního společenství na taxonomické úrovni kmenů ukázaly, že počáteční mírná převaha zástupců G+ kmenů *Firmicutes* (28,9 %) a *Actinobacteria* (26,1 %) byla po proběhlé fermentaci nahrazena kmeny *Bacteroidetes* a *Proteobacteria*, které zahrnují běžné zástupce G- bakterií (Wang et al., 2022, Sardar et al., 2021). Tyto výsledky korespondují s nálezy v naší provedené studii, kdy 42. den po zahájení fermentace, nebylo možné sledované zástupce G+ bakterií potvrdit kultivačně. Přítomnost genu *ermA* v celkové DNA z pomnožených vzorků ukazuje, že se modelový kmen ve vzorku nacházel, ale zřejmě v množství pod detekčním limitem metody nebo jako součást neživotaschopných buněk.

Tabulka 18. Přítomnost vybraných genů rezistence ve vzorcích mrvy z pokusu fermentace

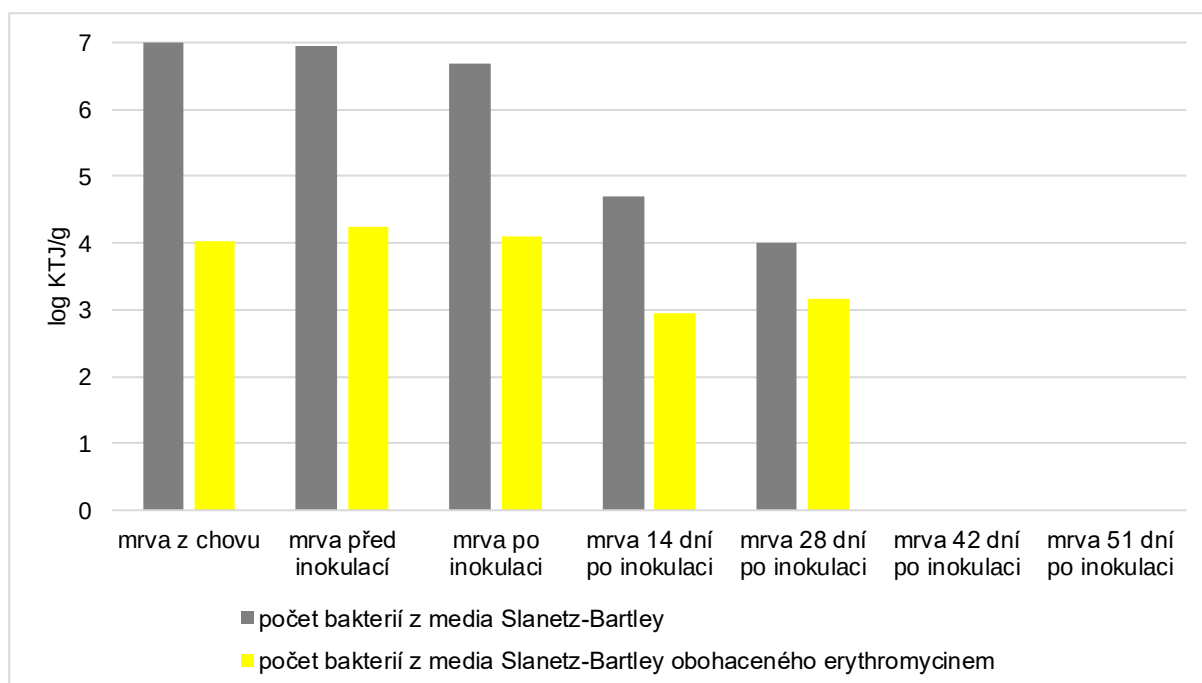
Datum odběru	Číslo vzorku MUNI	Popis vzorku	Průkaz genů rezistence po pomnožení vzorku					
			<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>ermT</i>	<i>ermQ</i>	InKo
27.03.2024	227/24	mrva z chovu	-	+	+	-	-	+
09.04.2024	256/24	mrva k fermentaci	-	+	+	-	-	+
09.04.2024	257/23	mrva po inokulaci	+	+	+	-	-	+
22.04.2024	313/24	mrva po inokulaci a aplikaci makrolidů	+	+	+	-	-	+
06.05.2024	365/24	mrva po inokulaci a aplikaci makrolidů	+	+	+	-	-	+
21.05.2024	504/24	mrva po inokulaci a aplikaci makrolidů	+	+	+	-	-	+



Obrázek 8. Počet *E. coli* stanovený v jednotlivých odběrech pokusu fermentace (HCCA-Harlequin® chromogenic coliform agar; +ery – suplementovaný erythromycinem)



Obrázek 9. Počet *S. aureus* v jednotlivých odběrech pokusu fermentace



Obrázek 10. Celkový počet bakterií rostoucích na Slanetz-Bartley mediu v jednotlivých odběrech pokusu fermentace

Modelový pokus perzistence genů *erm* v půdě

Přítomnost genů *erm* byla sledována ve vzorcích půdy po zapracování fermentované mrvy po dobu 54 dnů. Výskyt genů byl zjišťován v celkové DNA získané po pomnožení vzorků, a dále u kmenů izolovaných na selektivních půdách. Sledován byl počet *E. coli* rostoucích na médiu HCCA bez a se suplementací erythromycinem a dále počet G⁺ bakterií (*S. aureus*, rod *Enterococcus*). Vzorek půdy byl vyšetřen také před zahájením pokusu, kdy nebyla přítomnost sledovaných genů rezistence nebo vybraných bakterií senzitivních ani rezistentních k erythromycinu zjištěna.

Mrva aplikovaná na pokusné pole obsahovala geny *ermA*, *ermB* a *ermF* a modelový kmen *E. coli* v počtu $1,5 \times 10^5$ KTJ/g. Přehled dalších odebraných vzorků, výsledků detekce sledovaných genů a vývoj počtu modelových kmenů uvádí tabulka 19 a obrázek 11.

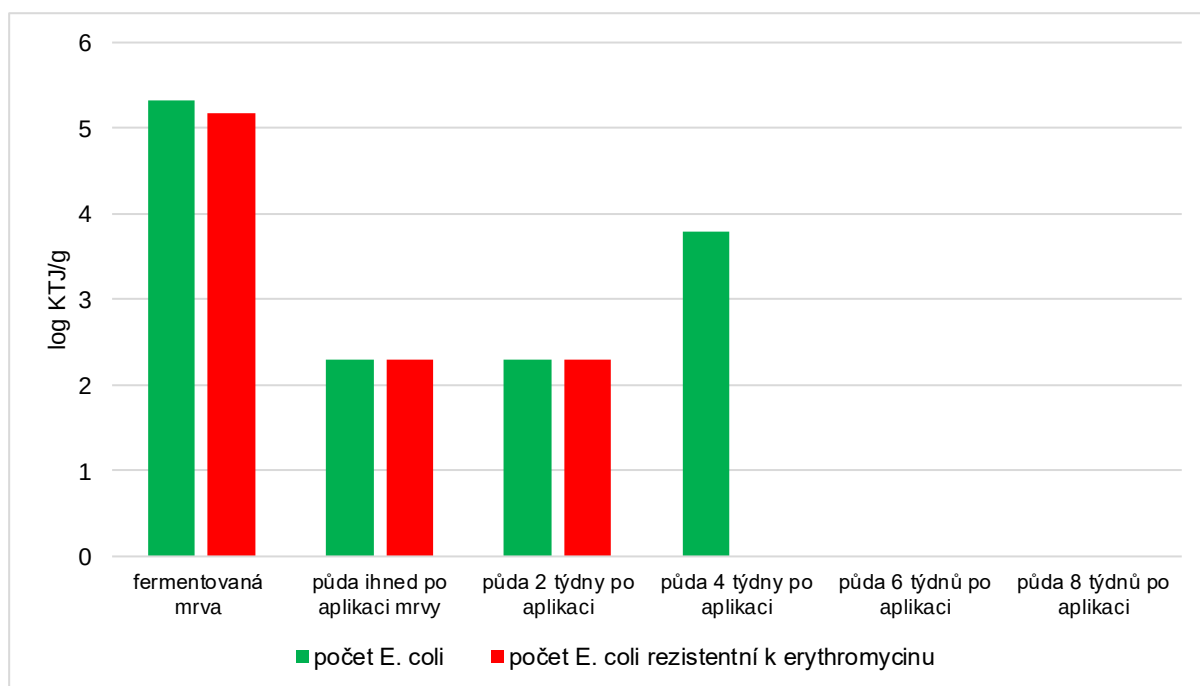
Z výsledků vyplývá, že modelový kmen *E. coli* rostoucí na půdě suplementované erythromycinem byl ve vzorcích kultivačně prokazatelný ihned po aplikaci mrvy a v následujícím odběru s odstupem cca 14 dní. Při dalším odběru (24. 6. 2024) byly sice bakterie *E. coli* detekované ve vyšších počtech, ale pouze na médiu bez suplementace erythromycinem a u žádného z testovaných izolátů nebyl prokázán žádný se sledovaných genů *erm*. Nejednalo se tedy o modelové kmeny, ale zřejmě přirozenou kontaminaci.

Gen *ermA* a modelový kmen *S. aureus* nebyly ve vzorcích půdy po aplikaci mrvy prokázány v žádném z provedených odběrů. Nejdéle v půdě přetrval gen *ermB*, a to ještě min 28 dní od posledního kultivačního průkazu životaschopných bakterií. Gen *ermF* byl zjištěn pouze ve vzorku půdy ihned po aplikaci mrvy. V dalších odběrech už prokázán nebyl.

Studie, které se zabývaly složením mikrobiomu půdy uvádějí nejvyšší relativní abundanci zástupců kmen *Proteobacteria*, kam se řadí i čeleď *Enterobacteriaceae*. Z dalších čteně zastoupených kmenů jsou popisovány *Actinobacteria* a *Bacteroidetes*. Kmen *Firmicutes*, kam spadají i námi sledované G+ koky rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus* se ve vzorcích půdy vyskytují s velmi nízkou abundancí pod 0,5 % (Fitzpatrick et al., 2021; McPherson et al., 2018). Cíleně se na přežívání enterokoků v půdě hnojené chlévskou mrvou zaměřila studie autorů Garner et al. (2014). Jejich výsledky uvádí, že počet enterokoků byl statisticky významně vyšší u půd hnojených v porovnání s půdou, která se nehnojila. Počty byly vyšší po dobu jednoho roku sledování, v následujícím roce už se počet KTJ/g statisticky významně nelišil. Enterokoky rezistentní k makrolidům byly v této studii izolovány pouze u půd, kde byla mrva aplikována, a to jen cca 6 měsíců po aplikaci. Celkově se jednalo o nízké počty do 100 KTJ/g.

Tabulka 19. Sledování přítomnosti vybraných genů rezistence ve vzorcích z polního pokusu

Datum odběru	Číslo vzorku MUNI	Popis vzorku	Průkaz genů rezistence po pomnožení					
			<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>ermT</i>	<i>ermQ</i>	InKo
28.05.2024	590/24	fermentovaná mrva	+	+	+	-	-	+
28.05.2024	591/24	půda před začátkem polního pokusu	-	-	-	-	-	+
28.05.2024	592/24	půda po aplikaci mrvy	-	+	+	-	-	+
10.06.2024	626/24	půda 2 týdny po aplikaci mrvy	-	+	-	-	-	+
24.06.2024	684/24	půda 4 týdny po aplikaci mrvy	-	-	-	-	-	+
08.07.2024	707/24	půda 6 týdnů po aplikaci	-	+	-	-	-	+
22.07.2024	722/24	půda 8 týdnů po aplikaci	-	-	-	-	-	+

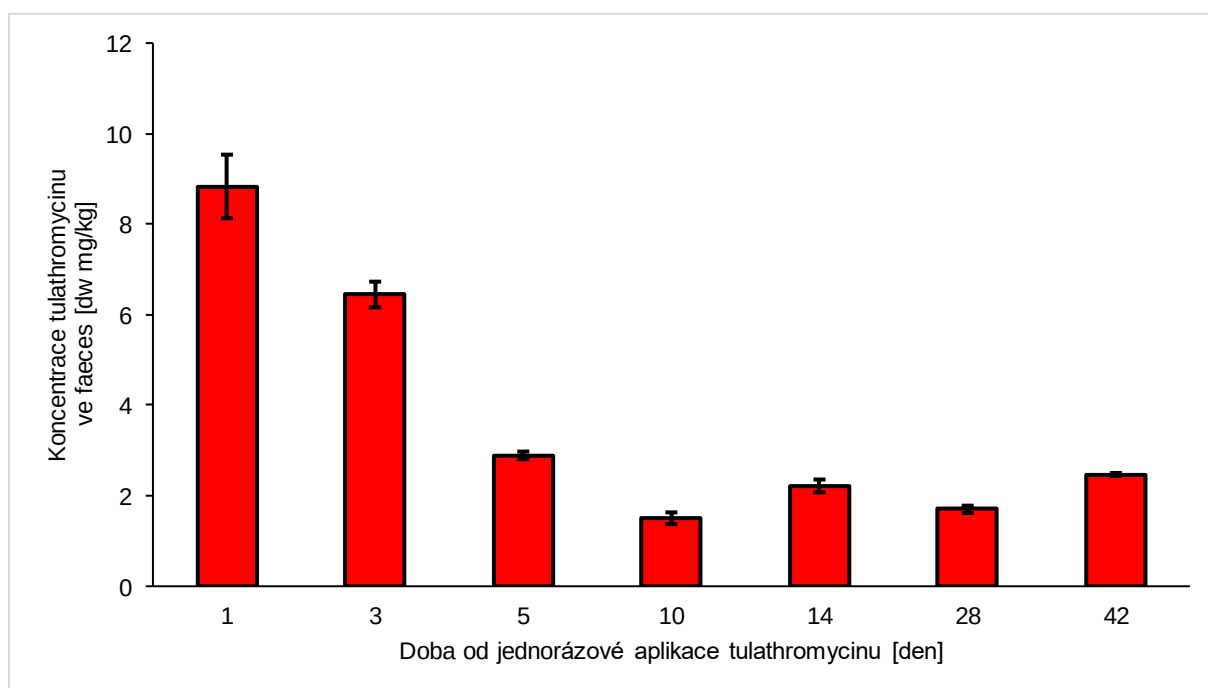


Obrázek 11. Počet *E.coli* stanovený v jednotlivých odběrech polního pokusu (HCCA-Harlequin® chromogenic coliform agar; +ery – suplementovaný erythromycinem)

4.2 Analytická část – část B

Analýza vzorků faeces medikovaných telat

Analýza tulathromycinu a jeho metabolitu tulathromycinu-M1 byla provedena na vzorcích faeces odebraných v období 0–42 dnů po jednorázové subkutánní aplikaci přípravku Draxxin telatům v oblasti krku. Ve sledované sekci bylo 18 telat s průměrnou hmotností 80 kg, přičemž každému teleti bylo aplikováno 2 ml Draxxinu (ekvivalent 200 mg tulathromycinu), tedy v souladu s podmínkami registrace předmětného VLP. Vzorky faeces byly nejprve homogenizovány, následně extrahovány a analyzovány metodou LC-MS/MS. Pro každý vzorek byla stanovena sušina (v rozmezí 15–27 %) a výsledky jsou prezentovány jako koncentrace tulathromycinu přepočtená na sušinu faeces v dw $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (obrázek 12).



Obrázek 12. Koncentrace tulathromycinu ve faeces telat léčených pomocí VLP s tulathromycinem

Ve všech odebraných vzorcích faeces byl kvantifikován tulathromycin a to konkrétně v rozmezí 1,5–8,8 dw $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Obrázek 12). Zatímco, v žádném z analyzovaných vzorků nebyl detekován metabolit tulathromycin-M1. Dle literatury (Spielmeyer 2018) až 90 % podaného antibiotika může být vyloučeno z těla organismu ve formě moči či faeces, což bylo potvrzeno i v případě tulathromycinu podaného kravám (Linden Moffatt 2007), která považuje tulathromycin-M1 za

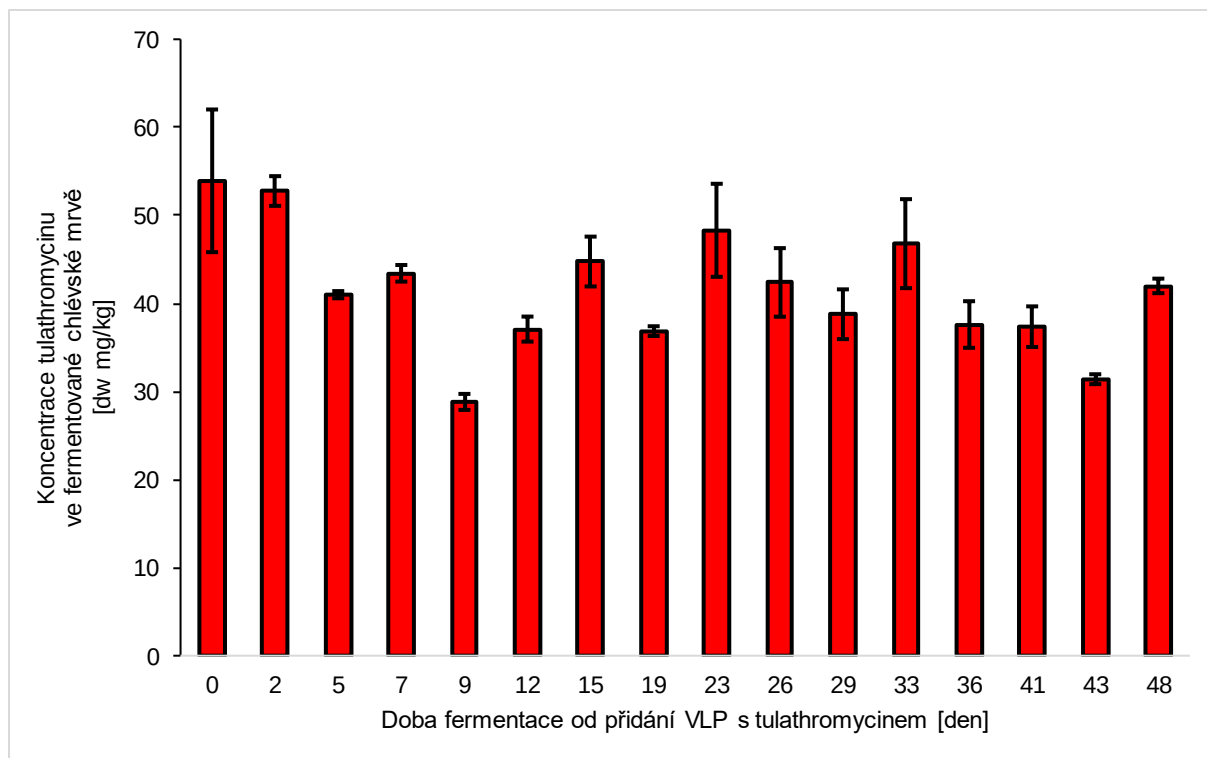
jeden z primárních metabolitů tohoto antibiotika. Nicméně studie (Linden Moffatt 2007) identifikovala i celou řadu dalších metabolitů.

Podle stejné studie (Linden Moffatt 2007) až 48% podaného tulathromycinu kravám je uvolněno v rámci prvních 5 dnů od subkutánního podání ve formě moči a faeces a následujících 19 % je uvolňováno výrazně pomaleji v rámci až 42 dnů. Toto je v souladu s námi naměřenými daty (obrázek 12), kdy výrazně vyšší koncentrace tulathromycinu byly naměřeny ve faeces v rámci prvních 5 dnů, respektive spíše v prvních 3 dnech.

Mimo jiné, tyto vysoké koncentrace v řádu $\text{dw mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (sušina v rozmezí 15–27 %) nejsou ojedinělým jevem, i celá řada odborných článků (Spielmeyer 2018) reportovala u v minulosti koncentrace v řádu $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ až $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i pro řadu jiných antibiotik a to nejen makrolidová antibiotika (např. tetracykliny, fluorochinolony, sulfonamidy) a to i následně v půdním prostředí, v případech kdy tyto statková hnojiva nejsou vhodně ošetřena, např. anaerobní fermentací.

Analýza vzorků chlévské mrvy v průběhu fermentace

Analýza tulathromycinu a jeho metabolitu tulathromycinu-M1 byla provedena na vzorcích mrvy, které byly odebrány v průběhu fermentace za účelem odstranění tulathromycinu před následnou aplikací mrvy na zemědělskou půdu. Každý vzorek byl nejprve homogenizován, poté podroben extrakci a následně analyzován metodou LC-MS/MS. Dále byla u každého vzorku stanovena sušina (výsledky v rozmezí 11–25 %), a výsledky jsou uvedeny jako koncentrace tulathromycinu přepočtená na sušinu fermentované mrvy v $\text{dw mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (obrázek 13).



Obrázek 13. Koncentrace tulathromycinu v chlévské mrvě v průběhu fermentace

Fermentace chlévské mrvy probíhala od 27. 3. 2024 do 28. 5. 2024 (celkem 10 týdnů). Dne 10. 4. 2024 bylo do rozfermentované mrvy přidáno 1,8 ml přípravku Draxxin ($T = 0$ den na obrázku 13), což odpovídá dávce 180 mg tulathromycinu na 17,8 kg chlévské mrvy, tedy přibližně $10,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tulathromycinu na mokrou váhu chlévské mrvy (sušina vzorku v $T = 0$ byla stanovena na 15 %). Naměřené koncentrace tulathromycinu v čase T_0 odpovídají předpokladům s ohledem na extrakční výtěžnosti naší analytické metody.

Během fermentace byly analyzovány vzorky chlévské mrvy v rozmezí 0–48 dnů. Tulathromycin jako výchozí látka byl detekován ve všech vzorcích, zatímco jeho metabolit tulathromycin-M1 se v žádném z analyzovaných vzorků neprokázal. V průběhu fermentace se koncentrace tulathromycinu pohybovaly v rozmezí $28,2\text{--}53,9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, což odpovídá degradaci 2–47 % vůči koncentraci v čase T_0 . Ke konci fermentace ($T = 42$ dnů) došlo k poklesu koncentrace tulathromycinu o 22 % oproti původní hodnotě. Výsledky tedy naznačují, že nízká účinnost degradace odpovídá absenci detekce tulathromycinu-M1. Kolísání koncentrací tulathromycinu v průběhu fermentace může být přisouzeno odchylkám analytické metody, nehomogenitě vzorku v nádobě, kde probíhala fermentace, nebo variabilitě obsahu vody v průběhu procesu.

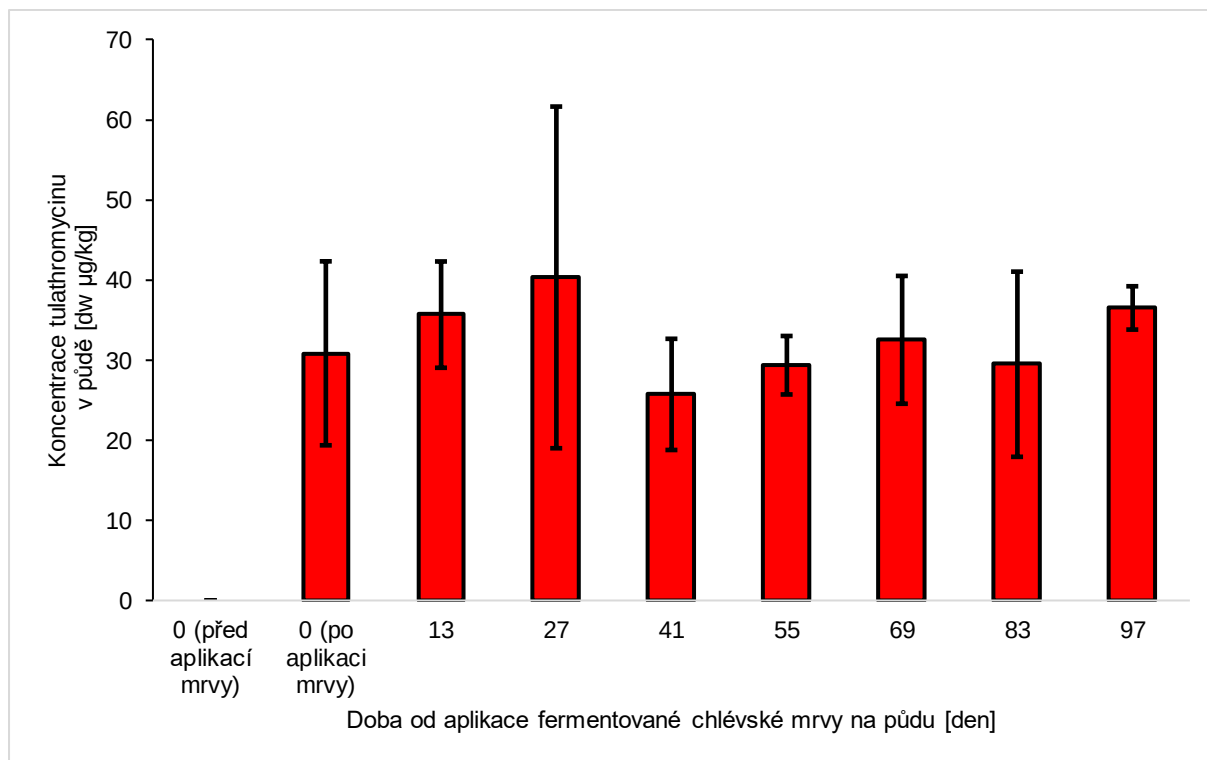
Degradační kinetika antibiotik je obecně ovlivněna především jejich biodostupností, která závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech (hydrofobicita, pKa) a také na třídě degradovaného antibiotika. Dále je zásadní charakteristika statkového hnojiva (typ hnoje, vlhkost, teplota, složení) i zvolený způsob zpracování (kompostování, vermikompostování, aerobní či anaerobní fermentace), doba zpracování (od 2 týdnů až po několik měsíců) a podmínky (aerobní/anaerobní, teplota, vlhkost) (Mohring et al. 2009; Motoyama et al. 2011; Massé et al. 2014; Jechalke et al. 2014; Kuppusamy et al. 2018; Spielmeyer 2018; Zahedi et al. 2022). Odborné publikace (Mohring et al. 2009; Motoyama et al. 2011; Kuppusamy et al. 2018) uvádějí účinnost odstranění antibiotik fermentací až 99 %, přičemž kompletní odstranění je zřídka dosaženo (Spielmeyer 2018).

Studie (Schlüsener et al. 2006) se zaměřila na odstranění vybraných makrolidových antibiotik ze statkového hnoje a zjistila, že poločas degradace pro erythromycin je 41 dnů, pro roxithromycin 130 dnů a pro salinomycin 5,1 dne. Podle studie (Spielmeyer 2018) však bývají výsledky poločasů rozpadu pro stejná antibiotika v různých studiích často odlišné, jelikož fermentační podmínky (či podmínky jiné metody odstranění) významně ovlivňují účinnost procesu.

Přestože se řada studií zaměřuje na odstraňování antibiotik ze statkových hnojiv, jen velmi omezený počet prací se zabývá degradačními drahami a analýzou vznikajících metabolitů, které mohou zůstat biologicky aktivní. Tento přístup by poskytl komplexnější pohled na danou problematiku (Spielmeyer 2018).

Analýza vzorků půdy

Analýza tulathromycinu a jeho metabolitu tulathromycinu-M1 byla provedena na vzorcích půdy, které byly odebrány před a po aplikaci fermentované mrvy. Aplikovaná mrva spikovaná Draxxinem fermentovala po dobu 48 dnů (obrázek 13) a naměřená koncentrace tulathromycinu v mrvě před aplikací byla $42,0 \pm 0,8$ dw $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Na zemědělskou půdu o výměře 4 m² bylo celkem aplikováno 12 kg fermentované mrvy. Každý vzorek půdy byl nejprve homogenizován, poté podroben extrakci a následně analyzován metodou LC-MS/MS. Dále byla u každého půdního vzorku stanovena sušina (80 %), a výsledky jsou uvedeny jako koncentrace tulathromycinu přepočtená na sušinu půdy v dw $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (obrázek 14).



Obrázek 14. Koncentrace tulathromycinu ve vzorcích půdy po aplikaci fermentované chlévské mrvy

Obdobně jako u předchozích typů vzorků (faeces a fermentovaná mrva) byl ve všech vzorcích naměřen pouze tulathromycin (s výjimkou vzorku před aplikací fermentované mrvy kontaminované tulathromycinem) a v žádném ze vzorků půdy nebyl detekován metabolit tulathromycin-M1.

Půdní vzorky byly odebrány a analyzovány v rozmezí 0–97 dnů, kdy byly naměřeny koncentrace tulathromycinu v rozmezí 25,7–40,3 dw µg·kg⁻¹. V průběhu těchto 97 dnů nebylo pozorováno snížení koncentrace tulathromycinu, které by bylo možné přisoudit degradaci tulathromycinu, či odplavu vlivem naměřených srážek na stanici ÚKZÚZ (viz meteorologická data na obrázku 4).

Obdobné koncentrace v řádu µg·kg⁻¹ až mg·kg⁻¹ antibiotik jsou také reportovány i ve vědeckých studiích (Shi et al. 2012; Hou et al. 2015) po aplikacích statkových hnojiv či biosolidů či po závlaze přečištěnou odpadní vodou. Mimo jiné, například studie (Schlüsener and Bester 2006) provedla 120denní experiment, kde se zaměřila na perzistenci makrolidových antibiotik v půdě, výsledky studie ukázaly, že poločas rozpadu erythromycinu je 20 dnů, oleandomycinu 27 dnů, tylosinu 8 dnů, salinomycinu 5 dnů, zatímco koncentrace roxithromycinu zůstala v podstatě neměnná po celou dobu experimentu. Nicméně obdobně jako u poločasů degradace antibiotik

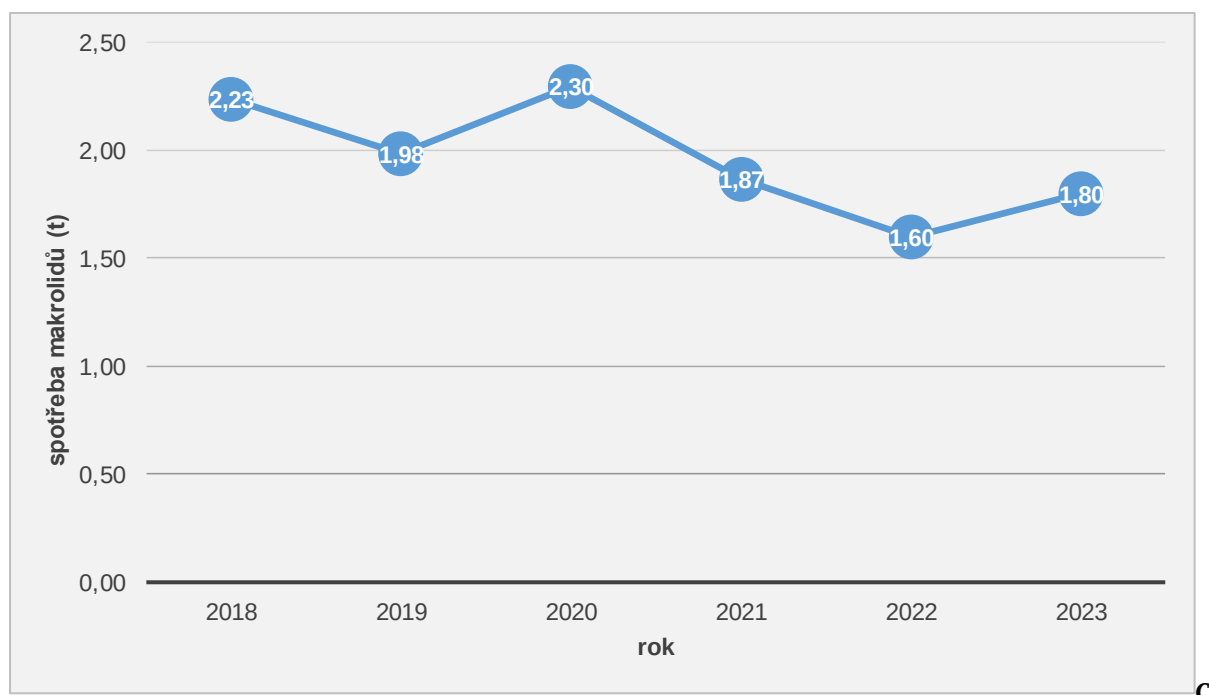
v průběhu fermentace, tak i poločasy rozpadů antibiotik v půdě se výrazně liší kvůli experimentálním podmínkám, kvůli odlišným fyzikálně-chemickým vlastnostem půdy, rozdílným klimatickým podmínkám apod. (Schlüsener and Bester 2006; Hou et al. 2015; Pan and Chu 2016).

Dva týdny po aplikaci fermentovaného hnoje (10. 6. 2024) byla plocha oseta lničkou setou (*Camelina sativa*). Avšak lnička nevzešla, což vedlo k opakovanému výsevu dne 08. 7. 2024. Z tohoto výsevu však vzešlo pouze přibližně 20 % osiva, zatímco na ploše se začaly hojně rozvíjet plevely, zejména šrucha zelná (*Portulaca oleracea*) a laskavec ohnutý (*Amaranthus retroflexus*). Kromě obvyklých příčin, jako jsou nedostatek vláhy, nepříznivé teploty, choroby či škůdci, je dalším možným faktorem nízkého klíčení lničky fytotoxicita způsobená přítomností léčiv v půdě. Studie (Pino et al. 2016; Gworek et al. 2021; Carballo et al. 2022) prokázaly, že rezidua léčiv mohou v půdě vyvolat inhibici klíčení, snížení růstu biomasy a negativní změny v morfologii plodin.

4.3 Spotřeby antimikrobik – část C

Situace a trendy ve spotřebě tulathromycinu, makrolidů a příbuzných látek a linkosamidů v České republice a v kontextu se státy EU/EEA ve veterinární i humánní medicíně

Byla shromážděna data o spotřebách makrolidů a příbuzných látek a provedena analýza trendů spotřeb u potravin produkujících zvířat za roky 2018–2023 v ČR. V dané skupině byly započítány následující léčivé látky: erythromycin, spiramycin, tulathromycin, gamithromycin, tildipirosin, tylosin, tilmikosin a tylvalosin. Výsledky pro jednotlivé roky jsou znázorněny na obrázku 15. Z této analýzy vyplývá, že ve srovnání s iniciálním sledovaným rokem 2018 se spotřebami 2,23 tuny makrolidů a příbuzných látek klesla do roku 2023 celková spotřeba těchto látek o 19,3 % (na 1,80 tuny), i když tento pokles nebyl kontinuální a v roce 2020 došlo dokonce k mírnému nárůstu spotřeb (2018 vs 2020 2,23 vs 2,30 tuny, nárůst o 3 %). Trendová data k celkovým spotřebám makrolidů a příbuzných látek je však nutné vnímat i ve spojení se spotřebovávanými lékovými formami, kdy u skotu jsou ze skupiny makrolidů a jim příbuzných látek spotřebovávány především injekční VLP, ve velmi minoritních objemech pak u neruminujících telat mohou být podány i perorální lékové formy. Právě i individualizace podání a lékové formy jsou důvodem, že ve srovnání s celkovými spotřebami makrolidů sumárně za rok 2023 (1,80 tuny, všechna potravin produkující zvířata) tvořily spotřeby u skotu (sumárně injekční + perorální VLP) pouhých 0,046 tun (tj. 2,6 %). Pokud bychom začlenili rozvahu o přesnějším poměru hmotnostních objemů makrolidů a příbuzných látek ve srovnání injekčních versus perorálně podávanými, injekční VLP tvořily u skotu více než 98 %. Ve výše uvedených statistikách hovoříme o celkových hmotnostních objemech (tuny) léčivých látek makrolidů a příbuzných látek, neboť to je podstatné z pohledu posouzení i objemů matečných (= původních) látek či metabolitů, které jsou následně vylučovány do životního prostředí. V rámci skupiny injekčních makrolidů a příbuzných látek byly v letech 2023 a 2024 u skotu podávány VLP obsahující následující pětici antibiotik: gamithromycin, tildipirosin, tilmikosin, tulathromycin a tylosin. Z této pětice tvořil v roce 2023 nejvyšší procento spotřeby u skotu právě tulathromycin (53,4 %, přepočet přes hmotnostní objemy).



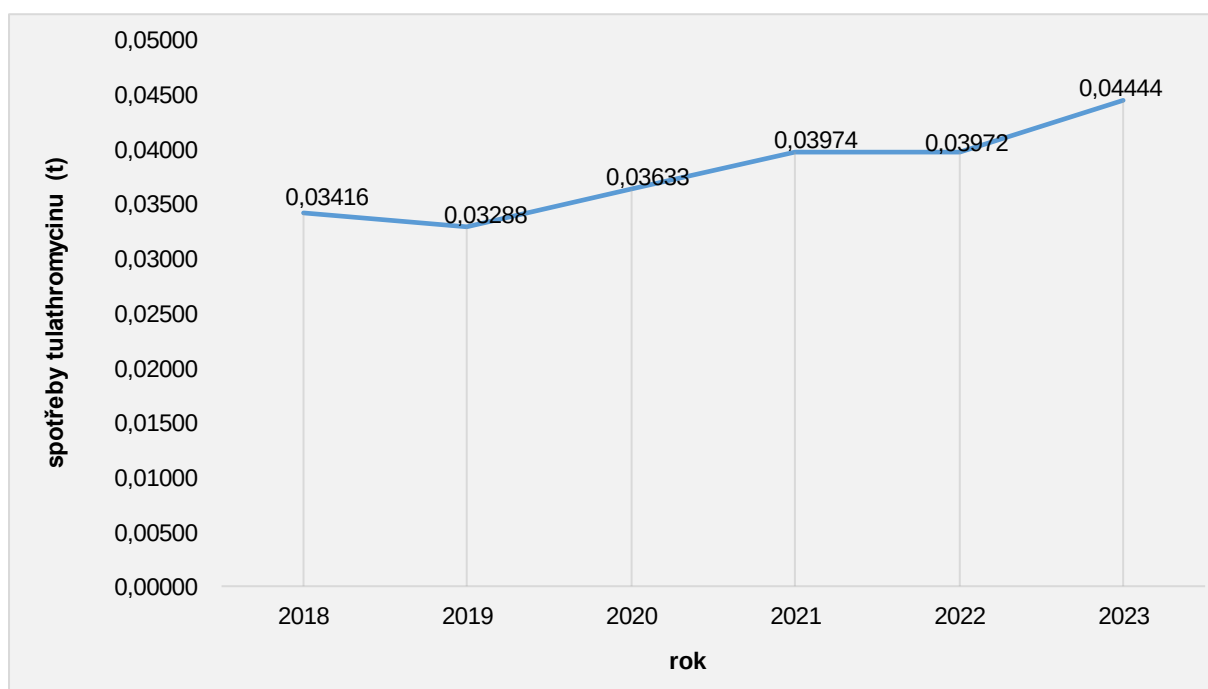
Obrázek 15. Spotřeby makrolidů, ČR 2018–2023, v tunách léčivých látek (zahrnuty všechny lékové formy a všechny cílové druhy zvířat)

Trendy spotřeb specificky pro léčivou látku tulathromycin pro všechny VLP, včetně generických, v rámci ČR za období 2018–2023, jsou graficky shrnuty na obrázku 16. Z trendové křivky je patrný nárůst spotřeb tulathromycinu o 23 %, ke kterému došlo zřejmě i z důvodu ukončení patentové ochrany referenčního VLP a nástupu generických VLP, kdy následně konkurenční podmínky a promo akce vedou k výraznému snížení cen a komerčnímu tlaku na podávání právě těchto nově zaváděných generických VLP. Ke zvýšenému zájmu o tyto injekční VLP však přispívá i fakt jednorázového podání, díky charakteru tulathromycinu jako léčivé látky s dlouhodobým účinkem a výhodnými PK parametry. Farmakokinetické vlastnosti tulathromycinu (podpořené i formulací VLP) jako jsou rychlá absorpce, následovaná rozsáhlou distribucí a pomalou eliminací, kdy se maximální koncentrace ($C_{\max}$) v plazmě pohybuje přibližně okolo hodnoty 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a ve studiích byla $C_{\max}$ dosažena přibližně 30 minut po podání. Koncentrace tulathromycinu v plicním homogenátu získaném z léčených zvířat byly podstatně vyšší než v plazmě. I pro tyto vlastnosti byl VLP zařazený do studie u zvířat v této studii podán za účelem pokrytí indikace bronchopneumonie. Tulathromycin se navíc akumuluje v neutrofilech a alveolárních makrofázích, tedy dochází k interakci s imunodefenzními mechanismy nemocného zvířete, což může příznivě ovlivnit terapeutický zásah. Obsah tulathromycinu klesá a vykazuje hodnotu eliminace ($t_{1/2}$) v plazmě 90 hodin. Vazba na proteiny plazmy je nízká, přibližně 40 %. Biologická dostupnost tulathromycinu po subkutánním podání

u skotu byla přibližně 90 %. Výše uvedené vlastnosti tak činí VLP s tulathromycinem mnohdy preferovanými před staršími makrolidovými, či dalšími antibiotika obsahujícími VLP.

Tulathromycin, zástupce triamilidů byl a doposud je dostupný pouze v lékové formě injekčních VLP. Přičemž 15 injekčních VLP (s koncentrací 100 mg tulathromycinu/ml injekčního roztoku) je registrováno pro skot, ovce a prasata a 8 injekčních VLP pak pouze pro prasata (zde je koncentrace tulathromycinu 25 mg/ml injekčního roztoku). V roce 2023 bylo spotřebováno celkem (skot, ovce, prasata) 0,044 tun tulathromycinu, z toho 54 % představovala spotřeba u skotu. Pokud bychom celkovou spotřebu tulathromycinu u skotu měli ještě dále stratifikovat, z prvního roku sledování (2023, ČR, hlášení zamýšleného podání u kategorií skotu veterinárními lékaři) je poměr podání:

- 46,2 % u dojeného skotu (jelikož tulathromycin nemá MRL pro mléko a především z důvodu indikací, lze se důvodně domnívat, že je podáván telatům a mladému skotu (býčkům, či jalovicím) před obdobím produkce mléka
- 36,7 % masného skotu
- 17,1 % ostatního (plemenného) skotu.



Obrázek 16. Spotřeby tulathromycinu, ČR 2018–2023, v tunách léčivých látek (zahrnutý všechny cílové druhy zvířat, pro které je tulathromycin registrován (skot, prase, ovce), přičemž lze důvodně anticipovat, že přibližně polovina (v roce 2023 konkrétně 54 %) bylo spotřebováno u skotu

Dále, z důvodu faktu, že geny *erm* jsou selektovány několika skupinami látek (makrolidy, příbuznými azalidy, ketolidy, triamilidy a linkosamidy) byly sledovány i trendy v používání linkosamidů (u skotu jsou z této skupiny používána dvě antibiotika – linkomycin a pirlimycin). Byly tedy sledovány také trendy jejich používání v rámci ČR za období 2018–2023 (v tunách), které jsou graficky znázorněny na obrázku 17.

Pro rok 2023 bylo provedeno i detailní zhodnocení používání linkosamidů (zaznamenáno pouze použití linkomycinu, pirlimycin již nebyl na trhu a VLP s léčivou látkou klindamycin jsou používány v tabletové formě u zvířat v zájmovém chovu). V sektoru skotu bylo zaznamenáno použití celkem 0,028 tuny linkomycinu, přičemž suma linkomycinu z injekčních VLP tvořila podíl 29,6 % a suma linkomycinu z intramamárních VLP pro krávy v laktaci představovala podíl 70,4 %. Stratifikace na cílové kategorie skotu byla následující:

Injekční VLP:

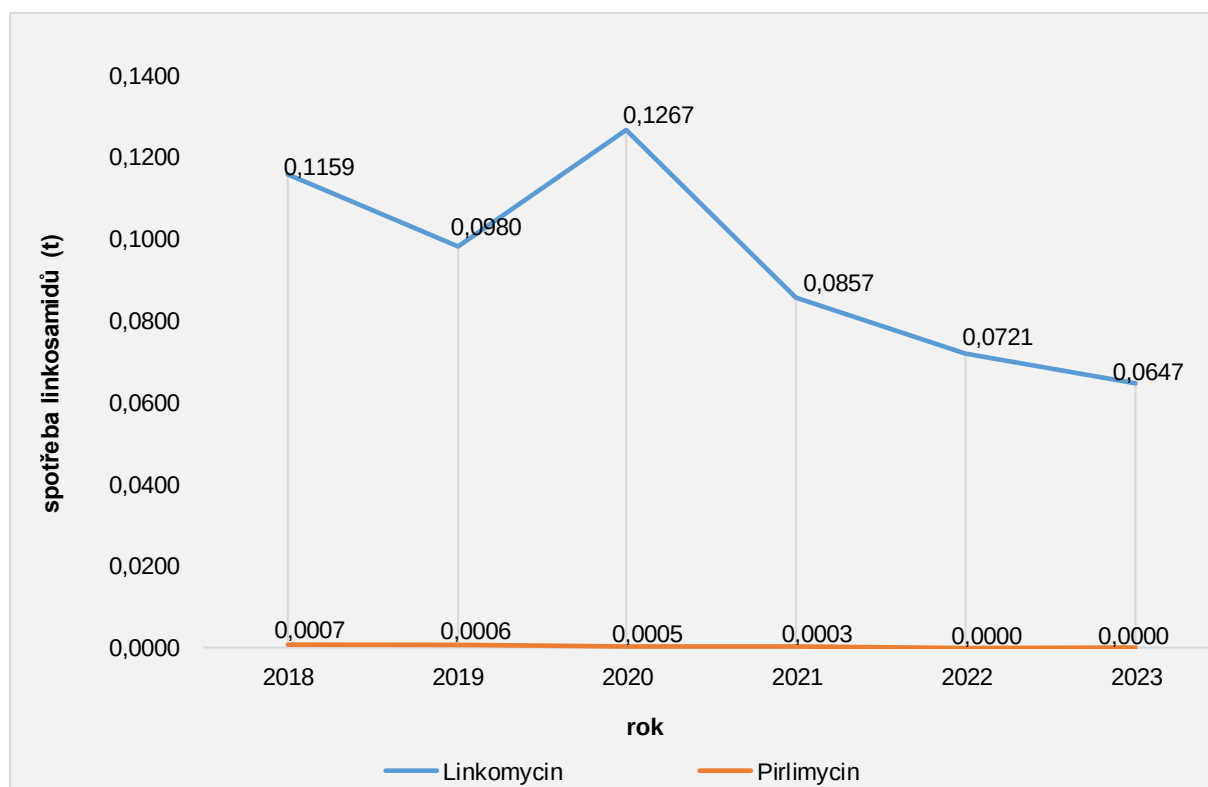
- 87,71 % u dojeného skotu
- 3,24 % u masného skotu
- 9,05 % u ostatního (plemenného) skotu

U intramamárních VLP tvořila spotřeba:

- 98,81 % u dojeného skotu
- 1,07 % u masného skotu
- 0,12 % u ostatního skotu

Spotřeby linkomycinu a pirlimycinu celkové

Ve skupině linkosamidů používaných u skotu tvořil v roce 2018 linkomycin 99,4 % a pirlimycin pouhých 0,6 % spotřeb. Od roku 2018 byla zaznamenán pokles spotřeb linkomycinu o 56% (z 0,1159 na 0,0647 tuny). V roce 2023 bylo v ČR ukončeno uvádění na trh VLP s obsahem pirlimycinu a měl tedy nulové spotřeby. Spotřeby obou látek jsou graficky shrnuty na obrázku 17.



Obrázek 17. Spotřeby linkosamidů (linkomycinu a pirlimycinu), ČR 2018–2023, v tunách léčivých látek (zahrnutý injekční a intramamární VLP).

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. Makrolidy jsou v důsledku své chemické struktury v environmentálních podmínkách výrazně stabilnější, než jiné léčivé látky s vyšší frekvencí podávání u skotu – například beta-laktamy (jako penicilin a jeho deriváty, či amoxicilin, či kyselina klavulanová). Mezi stabilní antimikrobika lze naopak zařadit tetracykliny, či sulfonamidy, či fluorochinolony enrofloxacin nebo marbofloxacin, které jsou u skotu rovněž podávány. Na spotřeby v tunách je nutno nahlížet s rozvahou reflektující fakt, že se do nich promítá dávkování příslušných VLP na kg živé hmotnosti a den. Z pohledu zhodnocení pro životní prostředí, jsou však vhodná zejména data v tunách. Údaje mg/PCU je vhodné 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 ve smyslu přímého dopadu na bakterie, lze využít například indexy frekvence, či DCDvet. Pro taková detailní hodnocení by však bylo vhodné nemít pouze kvalifikované odhady, ale přesná data o používání přímo nejen u species zvířat (skot), ale pro velkou hmotnostní odlišnost v rámci skotu ideálně i data

o spotřebách u věkových a hmotnostních kategorií (v této studii byl tulathromycin například používán u telat o živé hmotnosti přibližně 80 kg), neboť od těchto údajů se odvíjí celkové množství podané léčivé látky – zde tulathromycinu. Jelikož je VLP podáván jednorázově, lze zde dovodit i přesně podávanou dávku (na celkovou dobu léčby) a tudíž celkovou spotřebu tulathromycinu, tedy vlastní léčivé látky. Jak již bylo naznačeno výše, použití daného antibiotika přímo u telat, není jediným rizikovým faktorem. Je nutno se dívat na všechny látky, které mohou ovlivnit selekci rezistence. Nejpresnějších dat je možné dosáhnout sledováním 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. Ve vztahu ke spotřebovanému množství léčivé látky – antimikrobika, je vhodné mít informace o frekvenci podání vztažené na populaci zvířat, kterým bylo léčivo podáno. Dále je také potřebné mít data o míře podávání antibiotik u matek telat. Dalším rizikem může být, jak již bylo naznačeno výše, také přenos přímo reziduí antibiotik (podaných matce telete) prostřednictvím kolostra (v dané studii by se tato skutečnost mohla týkat linkomycinu). I když v ČR již nesmí být telatům podáváno odpadní mléko po léčbě krav (mléko v ochranné lhůtě), pokud by k takové praxi došlo, lze předpokládat expozici po podání u linkomycinu, či pirlimycinu, či některého dalšího makrolidu (například tylosinu), který je určen i pro dojnice v laktaci. To, zda byla léčena matka, či zvířata, která jsou s ní v kontaktu, nebo požíla např. kolostrum zatížené rezidui antibiotik je velmi podstatné z pohledu AMR (resp. přenosu bakterií s rezistencí, či pouhých genetických determinant rezistence). Výskyt rezistentních bakterií, či také determinant rezistence je tímto ovlivněn a může dojít jednak k přímému přenosu mezi jednotlivými fázemi odchovu a je možný i posun v celkovém složení (kvantitativním a kvalitativním) mikrobiomu, přežití bakterií rezistentních vůči určitému antibiotiku, či skupině antibiotik, pokud se jedná o multirezistenci či k selekci rezistence.

Dalším podstatným komentářem je také potřeba rozlišení pojmu rezidua (antimikrobik) v potravinách živočišného původu a rezistencí k antimikrobikům (zde makrolidům či linkosamidům). V uplynulých letech byly u individuálních jedinců zaznamenány v rámci monitoringu reziduí cizorodých látek i nálezy tulathromycinu přímo ve tkáních poražených telat. Zjištěná rezidua ve svalu, játrech a ledvinách překročila mnohdy velmi významně hladiny tzv. maximálních reziduálních limitů, tyto nálezy souvisely s injekčním podáním tulathromycinu přímo telatům. Záchyt těchto (byť velmi ojedinělých) případů ukazuje na funkčnost monitoringu cizorodých látek, jehož účelem je dohled nad potravinami živočišného

původu a jejich produkcí, tak aby nebylo ohroženo zdraví konzumenta. Pokud by konzument pozřel maso, játra či ledviny s hladinami reziduí nad MRL, znamená to, že iniciálně jeho trávicí trakt a mikrobiom v něm je vystaven účinku nadlimitních zbytků antibiotika, což může mít přímé nežádoucí účinky právě na konzumentův mikrobiom (v němž vybrané bakterie takovou reziduální hladinu antibiotika nemusí přežít), ale i selekci rezistence u těch, které naopak přežijí.

Naproti tomu přenos rezistence funguje na jiném principu. Produkty zvířat kontaminované rezistentními bakteriemi, či obsahující determinanty rezistence nejsou hrozbou pouze pro přímého konzumenta, ale pro všechny, kteří se účastní řetězce zpracování potravin (zde skutečně platí pojem od farmy na vidličku), zahrnuje tak chovatele/ošetřovatele, veterinárního lékaře, pracovníky jatek, zpracovatele masa, prodávajícího a následně nakonec i konzumenta. Proto je podstatné mít na paměti, že každé použití antibiotika, ať již u člověka, nebo u zvířete je příčinou selekčního tlaku a ovlivnění mikrobů.

Je však nutné uvést, že přenos rezistence může fungovat i opačným směrem tedy z člověka (ošetřovatele, chovatele, veterinárního lékaře) na zvířata. V případě makrolidů je toto tvrzení velmi důvodné, neboť jsou druhou nejvíce podávanou skupinou i lidí v ČR. V rámci životního prostředí pak následně můžeme sledovat jako kontaminaci výskyt antibiotik, na jehož počátku bylo podání tohoto léčiva člověku, či zvířeti. Proto by práce věnující se dopadům na životní prostředí měly uvádět i zhodnocení pohledů v rámci koncepce „Jedno zdraví“. I přes jisté metodologické limity, jsou níže doloženy a okomentovány informace pocházející ze zprávy JIACRA IV, která shrnuje a srovnává data o používání makrolidů a linkosamidů v humánní a veterinární medicíně. 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. V případě injekčně, či intramamárně individuálním zvířatům podávaných léčiv, jako je tomu u skotu a perorálně či injekčně podávaných léčiv u telat, je hlavní cestou přestupu do životního prostředí exkrece močí či faeces léčených zvířat. Perorální podání antibiotik neruminujícím telatům je do značné míry limitované na jednotlivé dávky v rámci přesného množství medikované mléčné náhražky, či medikovaného mléka individuálním telatům, takže míra odpadu je zde velmi nízká. Jak již bylo patrné z výše uvedených dat, v případě makrolidů, je většina těchto antibiotik spotřebována u jiných druhů hospodářských zvířat než skotu, který tvořil přibližně 2 % celkových spotřebovaných hmotnostních objemů.

Celková spotřeba makrolidů vztažená na biomasu (vypočtenou z populací lidí a potravin produkujících zvířat) v roce 2021 u zemí EU/EEA byla při zhodnocení populačně váženého průměru vyšší u potravin produkujících zvířat (7,8 mg/odhadovanou biomasu) než u lidí (6,2 mg/odhadovanou biomasu). Na hladině mediánů obou souborů (zvířata vs lidé, souhrnně EU/EEA) byla shodná 5,0 mg/odhadovanou biomasu. Rozmezí spotřeb makrolidů mezi státy se významně liší, od 0,5–11,1 mg/odhadovanou biomasu u lidí či ještě větší odlišnost mezi státy je ve veterinární oblasti 0–22,6 mg/odhadovanou biomasu u hospodářských zvířat (data pro 28 členských států + Norsko, data Německa nezahrnula spotřeby u lidí v nemocničním sektoru, JIACRA IV, 2023).

U skupiny linkosamidů převažovaly spotřeby u potravin produkujících zvířat nad spotřebami v humánní medicíně (což je ovlivněno i faktem, že linkomycin (často i v kombinaci se spektinomycinem) je podáván i prostřednictvím medikovaného krmiva či napájecí vody).

Při detailním náhledu na data z humánní medicíny skupina makrolidů, linkosamidů a streptograminů v rámci EU/EHP měla trend navýšení (populačně vážený průměr byl 2021: 2,7644; 2022: 3,7284 a 2023: 3,2530 vyjádřeno jako DDD na 1000 obyvatel a den).

Pokud bychom se podívali konkrétně na data z České republiky, tak spotřeby skupiny makrolidy, linkosamidy a streptograminy souhrnně (skupina ATC 01F) tvořily v roce 2023 3,831 DDD na 1000 obyvatel a den, přičemž v rámci ČR zaujímají druhé místo po penicilínech (6,928 DDD na 1000 obyvatel a den) a převyšují vážený průměr EU/EHP (Data ESAC-net, interaktivní databáze). Ve veterinární medicíně nejsou v ČR používány streptograminy a spotřeby jsou rozděleny pouze na makrolidy a linkosamidy, přičemž ČR v roce 2022 vykázala 2,2 mg/PCU makrolidů a 0,1 mg/PCU linkosamidů a byla tak výrazně pod mediánem 31 zemí EU/EEA, který byl pro makrolidy 3,9 mg/PCU a pro linkosamidy 0,4 mg/PCU.

5. ZÁVĚRY

Z výsledků realizovaného funkčního úkolu vyplývají následující závěry:

- **Koncentrace tulathromycinu ve faeces telat:** Po jednorázové aplikaci přípravku Draxxin telatům byla analyzována přítomnost tulathromycinu v jejich faeces v intervalu 1–42 dní. Analýzy v souladu s odbornou literaturou potvrdily, že převážná část tulathromycinu je vyloučena během prvních 3–5 dní. Přesto byly významné koncentrace reziduí tulathromycinu zjištěny i po celou dobu sledovaného období, tedy 1–42 dní. Výsledky rovněž potvrzují, v souladu s předchozími studiemi, že podstatná část antibiotika je vylučována ve formě moči a exkrementů. To následně vede k šíření antibiotických reziduí do půdního prostředí, pokud tato statková hnojiva nejsou dostatečně ošetřena před jejich aplikací na zemědělskou půdu.
- **Fermentace chlévské mrvy:** Analýza vzorků chlévské mrvy ukázala, že proces fermentace snížil koncentraci tulathromycinu přibližně o 22 % během 42 dnů. Tento výsledek naznačuje rozdílnou účinnost fermentace při odstraňování reziduí antibiotik v závislosti na třídě léčiva (ve srovnání s předchozími zprávami) a oproti jiným studiím zaměřeným na makrolidová antibiotika. Před aplikací do půdy obsahovala chlévská mrva $42,0 \pm 0,8$ mg tulathromycinu/kg sušiny chlévské mrvy.
- **Perzistence tulathromycinu v půdním prostředí:** Po aplikaci fermentované chlévské mrvy na testovací pole ÚKZÚZ byla v půdě naměřena koncentrace tulathromycinu 31 ± 12 µg/kg sušiny. Následné analýzy vzorků v období 0–97 dnů po aplikaci ukázaly, že koncentrace reziduí v půdě zůstává stabilní, bez prokazatelného rozkladu. Tento výsledek potvrzuje dlouhodobou perzistenci makrolidových antibiotik v půdním prostředí, podobně jako tomu bylo u fluorochinolonových antibiotik v naší předchozí studii z roku 2023.
- **Výskyt bakteriálních kmenů rezistentních k makrolidům na farmě:** Bakterie rezistentní k makrolidům byly izolovány ze všech vzorků faeces zvířat odebraných na farmě, a to v množství, které tvořilo většinu z celkově zjištěných počtů KTJ pro sledované zástupce. Byly detekovány také ve stěrech z podlahy a v menší míře také ve stěrech z hrazení. Identifikační metody ukázaly zastoupení jak kmenů z rodu *Enterococcus*, *Streptococcus*, ale i další blíže nedourčené rody.

- **Abundance vybraných genů rezistence k erythromycinu:** Sledování přítomnosti pěti vybraných genů *erm* (A, B, F, T, Q) ukázalo, že nejčastěji se v chovu vyskytoval gen *ermF*, dále *ermB* a ojediněle byl zaznamenán i gen *ermA*. Geny *ermF* a *ermB* byly prokázány u zástupců G⁺ i G⁻ bakterií, gen *ermA* nebyl u jednotlivých izolátů potvrzen. Geny *ermT* a *ermQ* nebyly potvrzeny u žádného z vyšetřovaných vzorků.
- **Persistence kmenů rezistentních k makrolidům a genů *erm* v chlévské mrvě:** V modelovém pokusu fermentace chlévské mrvy inokulované modelovými kmeny *E. coli* (*ermB*⁺) a *S. aureus* (*ermA*⁺) bylo zjištěno, že zatímco zástupce G⁻ bakterií (*E. coli*) byl detekovatelný v chlévské mrvě i po 50 dnech fermentace v počtech pouze o 2 řády nižších než v době inokulace, G⁺ bakterie (modelový kmen *S. aureus* nebo bakterie rostoucí na médiu Slanetz-Bartley) nebyly od 42. dne po zahájení fermentace, kultivačně prokazatelné.

Přítomnost genů *ermB* a *ermA* byla potvrzena v celkové DNA ve všech odebraných dílčích vzorcích pokusu a ukazuje tak, že se modelový kmen *S. aureus* ve vzorku nacházel, ale zřejmě v množství pod detekčním limitem metody nebo jako součást neživotoschopných buněk.

- **Přežívání kmenů rezistentních k makrolidům a genů *erm* v půdě:** Výsledky sledování přítomnosti modelového kmene *E. coli* (*ermB*⁺) v půdě po aplikaci fermentované mrvy ukázaly, že sledovaný kmen přežíval v tomto prostředí po dobu cca 14 dní. Z genů *erm*, původně přítomných v zapravené mrvě, v půdě nejdéle přetrval gen *ermB*, a to ještě min 28 dní od posledního kultivačního průkazu životoschopných bakterií. Gen *ermF* byl zjištěn pouze ve vzorku půdy ihned po aplikaci mrvy, gen *ermA* nebyl prokázán vůbec. Potvrzují se tak závěry i jiných studií, že odolnost G⁻ bakterií v prostředí je vyšší a s tím je spojeno také riziko perzistence genů rezistence, které tyto bakterie mohou nést.
- **Spotřeba makrolidů a linkosamidů ve veterinární medicíně v ČR:** V průběhu let 2018 se spotřebami 2,23 tuny makrolidů a příbuzných látek klesla do roku 2023 jejich celková spotřeba o 19,3 % (na 1,80 tuny). Na spotřebě v roce 2023 se podílel sektor skotu pouhými 0,046 tunami, tj. 2,6 %. Od roku 2018 byla zaznamenán pokles spotřeb linkomycinu o 56 % (z 0,1159 na 0,0647 tuny). Na spotřebě linkomycinu se sektor skotu podílel v roce 2023 v rozsahu 43,3%.
- **Spotřeba tulathromycinu:** Trendy spotřeb specificky pro léčivou látku tulathromycin pro všechny VLP, včetně generických, v rámci ČR za období 2018–2023 ukazují výrazný

nárůst spotřeb tulathromycinu o 23 %. Z celkových spotřeb tulathromycinu se z dat pro rok 2023 jeví, že 54 % hmotnostních objemů této látky bylo spotřebováno v sektoru skotu.

- **Spotřeba linkomycinu a pirlimycinu:** V roce 2023 bylo v sektoru skotu zaznamenáno použití celkem 0,028 tuny linkomycinu, (z celkových 0,0647 tuny u všech cílových druhů potravinových zvířat) přičemž suma linkomycinu z injekčních VLP tvořila podíl 29,6 % a suma linkomycinu z intramamárních VLP pro krávy v laktaci představovala podíl 70,4 %. Pirlimycin nebyl již v roce 2023 používán.
- **Srovnání sumy spotřeb makrolidů a linkosamidů 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 nulovým hodnotám. Snížení používání by napomohlo snížit tlak na rozvoj a šíření rezistence a také snížit hladinu reziduí, které mohou být dále přenášeny do půdy, přičemž je známo, že makrolidy jsou schopny dlouhé perzistence v životním prostředí, což bylo prokázáno i v této studii pro tulathromycin. Takto by byl minimalizován dopad na následný koloběh jak reziduí, tak determinant rezistence a rezistentních bakterií v životního prostředí.
- **Srovnání spotřeb makrolidů humánní a veterinární medicína:** V rámci Evropy převažují spotřeby makrolidů ve veterinární oblasti nad spotřebami v oblasti humánní. Celková spotřeba makrolidů vztažená na biomasu (vypočtenou z populací lidí a potravin produkujících zvířat) v roce 2021 u zemí EU/EEA byla při zhodnocení populačně váženého průměru vyšší u potravin produkujících zvířat (7,8 mg/odhadovanou biomasu) než u lidí (6,2 mg/odhadovanou biomasu), pro mediány byla však shodná 5, 0 mg /odhadovanou biomasu. Rozmezí spotřeb makrolidů mezi státy se významně liší, od 0,5–11,1 mg/odhadovanou biomasu u lidí či ještě větší odlišnost mezi státy je ve veterinární oblasti 0–22,6 mg/odhadovanou biomasu u hospodářských zvířat.
- **U skupiny linkosamidů převažovaly spotřeby u potravin produkujících zvířat nad spotřebami v humánní medicíně**
- **Obě skupiny antibiotik (jak makrolidy, tak linkosamidy) mají potenciál vytváření selekčního tlaku na rozvoj, šíření, či udržení genů erm v populacích patogenních i komensálních bakterií.** Obecně se předpokládá, že vyšší míra selekčního tlaku především na gramnegativní bakterie (komensální i patogenní) je spojena se systémově podávanými antimikrobiky. V tomto konkrétním studovaném souboru se jednalo

o tulathromycin, který byl na předmětné farmě podáván a jelikož, což tato studie také prokázala, gramnegativní bakterie jsou schopny dlouhodobější perzistence v životním prostředí i horizontálního přenosu genů rezistence, je nutno se do budoucna posílit ve větší míře preventivní opatření předcházející podání makrolidů, ale také neopomenout i podání linkosamidů a to jak v injekční, tak intramamární formě.

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 makrolidům 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 2024

(FCH VUT) Vývoj metodiky a vlastní stanovení obsahů vybraných látek (tulathromycin) v trusu, chlěvské mrvě a v půdě po aplikaci vyzrálé chlěvské mrvy od medikovaných zvířat	249 999,31 Kč
(ÚSKVBL) Analýza posledních dostupných dat o celkových spotřebách antimikrobik v sektoru skotu, se zacílením na farmakologickou skupinu makrolidů a jim příbuzných antimikrobik (perorální i injekční), vč. způsobu používání tulathromycinu u skotu a jeho produkčních kategorií v České republice.	
Rešerše recentně publikovaných dat k možnému vlivu používání makrolidů na bakterie, zhodnocení trendových dat k rezistenci k makrolidům (a příbuzným antimikrobním látkám) u izolátů ze skotu a ko- rezistenci k dalším antimikrobikům v rámci ČR , horizontálně přenosnou rezistenci a případně perzistenci makrolidů a specificky tulathromycinu v životním prostředí a další potenciál ovlivňovat ekosystémy a jejich mikrobiotu	40 000 Kč
Vzorek veterinárního léčivého přípravku Draxxin 100 mg/ml injekční roztok pro skot, prasata a ovce 2 x 50ml	
(MUNI) Detekce perzistence bakterií s plasmidově vázanou rezistencí (PMQR) genů a mikrobioty	
- Analýza výskytu a přežívání bakterií Escherichia coli a Staphylococcus aureus rezistentních k makrolidům v prostředí farmy - v čerstvém trusu a na vybraných místech stáje; dále v průběhu fermentace a v půdě po aplikaci kontaminovaného hnoje	90 000 Kč
- Spotřební materiál	209 213,77 Kč
(ÚKZÚZ) Nákup ostatního materiálu	
- DDHM do 3 000 Kč	
- ochranné pomůcky	
- náhradní díly a příslušenství	
- hověrné	
- PHM	
- Cestovné	
- ostatní materiál jinde nezařazený	60 786,69 Kč
Celkem	649 999,77 Kč

6. REFERENCE

(CLSI) Weinstein MP, Lewis JS 2nd. The Clinical and Laboratory Standards Institute Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Background, Organization, Functions, and Processes. J Clin Microbiol. 2020 Feb 24;58(3):e01864-19. doi: 10.1128/JCM.01864-19. PMID: 31915289; PMCID: PMC7041576.

(EUCAST) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. Dostupné na <http://www.eucast.org>.

Albero B, Tadeo JL, Pérez RA (2019) Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants. TrAC Trends in Analytical Chemistry 118:739–750. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.007>
Aparicio I, Martín J, Abril C, Santos JL, Alonso E (2018) Determination of household and industrial chemicals, personal care products and hormones in leafy and root vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 1533:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.011>

Ben Mordechay E, Mordehay V, Tarchitzky J, Chefetz B (2022) Fate of contaminants of emerging concern in the reclaimed wastewater-soil-plant continuum. Science of The Total Environment 822:153574. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153574>

Ben W, Qiang Z, Adams C, Zhang H, Chen L (2008) Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr A 1202(2):173–180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.014>

Bijlsma L, Pitarch E, Fonseca E, Ibáñez M, Botero AM, Claros J, Pastor L, Hernández F (2021) Investigation of pharmaceuticals in a conventional wastewater treatment plant: Removal efficiency, seasonal variation and impact of a nearby hospital. J Environ Chem Eng 9(4):105548. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105548>

Carballo M, Rodríguez A, de la Torre A (2022) Phytotoxic Effects of Antibiotics on Terrestrial Crop Plants and Wild Plants: A Systematic Review. Arch Environ Contam Toxicol 82(1):48–61. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00893-5>

Carter LJ, Garman CD, Ryan J, Dowle A, Bergström E, Thomas-Oates J, Boxall ABA (2014a) Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil–Earthworm Systems. Environ Sci Technol 48(10):5955–5963. <https://doi.org/10.1021/es500567w>

Carter LJ, Harris E, Williams M, Ryan JJ, Kookana RS, Boxall ABA (2014b) Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil–Plant Systems. J Agric Food Chem 62(4):816–825.

Carter LJ, Williams M, Böttcher C, Kookana RS (2015) Uptake of Pharmaceuticals Influences Plant Development and Affects Nutrient and Hormone Homeostases. Environ Sci Technol 49(20):12509–12518. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03468>

da Silva JJ, da Silva BF, Stradiotto NR, Petrovic M, Gago-Ferrero P, Gros M (2020) Pressurized Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS evaluation for the analysis of antibiotics in agricultural soils. MethodsX 7:101171. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101171>

Deasy, B. M., M. C. Rea, G. F. Fitzgerald, T. M. Cogan, and T. P. Beresford. 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. Syst. Appl. Microbiol. 23:510–522.

El Badawy SA, Amer AMM, Constable PD, Guda AM (2014) Effect of tulathromycin on abomasal emptying rate in healthy lactating goats. Small Ruminant Research 121(2–3):395–399. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.06.008>

Feßler AT, Wang Y, Wu C, Schwarz S. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. Plasmid. 2018 Sep;99:2-10. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.05.001. Epub 2018 May 26. PMID: 29807043.

Fitzpatrick CR, Copeland J, Wang PW, Guttman DS, Kotanen PM, Johnson MTJ. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. Proc Natl Acad

Sci U S A. 2018 Feb 6;115(6):E1157-E1165. doi: 10.1073/pnas.1717617115. Epub 2018 Jan 22. PMID: 29358405; PMCID: PMC5819437.

Fyfe C, Grossman TH, Kerstein K, Sutcliffe J. Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 Oct 3;6(10):a025395. doi: 10.1101/cshperspect.a025395. PMID: 27527699; PMCID: PMC5046686.

Gáler D, Hessong S, Beato B, Risk J, Inskeep P, Weerasinghe C, Schneider RP, Langer C, LaPerle J, Renouf D, Bessire A, Español E, Rafka R, Ragan C, Boettner W, Murphy T, Keller D, Benchaoui H, Nowakowski MA (2004) An Analytical Method for the Analysis of Tulathromycin, an Equilibrating Triamilide, in Bovine and Porcine Plasma and Lung. J Agric Food Chem 52(8):2179–2191. <https://doi.org/10.1021/jf0351624>

Gallego S, Martin-Laurent F (2020) Impact of PhACs on Soil Microorganisms. pp 267–310

Garder JL, Moorman TB, Soupier ML. Transport and persistence of tylosin-resistant enterococci, genes, and tylosin in soil and drainage water from fields receiving Swine manure. J Environ Qual. 2014 Jul;43(4):1484-93. doi: 10.2134/jeq2013.09.0379. PMID: 25603096.

Gworek B, Kijewska M, Wrzosek J, Graniewska M (2021) Pharmaceuticals in the Soil and Plant Environment: a Review. Water Air Soil Pollut 232(4):145. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04954-8>

Hashmi MZ, Mahmood A, Kattel DB, Khan S, Hasnain A, Ahmed Z (2017) Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in Soil: Occurrence, Fate, and Effects. pp 41–54

Hillis DG, Fletcher J, Solomon KR, Sibley PK (2011) Effects of Ten Antibiotics on Seed Germination and Root Elongation in Three Plant Species. Arch Environ Contam Toxicol 60(2):220–232. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9624-0>

Ho Y Bin, Zakaria MP, Latif PA, Saari N (2013) Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting. Bioresour Technol 131:476–484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.194>

Hou J, Wan W, Mao D, Wang C, Mu Q, Qin S, Luo Y (2015) Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China. *Environmental Science and Pollution Research* 22(6):4545–4554. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3632-y>

Huang Y, Cheng M, Li W, Wu L, Chen Y, Luo Y, Christie P, Zhang H (2013) Simultaneous extraction of four classes of antibiotics in soil, manure and sewage sludge and analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the isotope-labelled internal standard method. *Analytical Methods* 5(15):3721. <https://doi.org/10.1039/c3ay40220g>

Chen J, Yu Z, Michel FC Jr, Wittum T, Morrison M. Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jul;73(14):4407-16. doi: 10.1128/AEM.02799-06. Epub 2007 May 11. PMID: 17496134; PMCID: PMC1932836. Koike et al. (2010)

Chuang Y-H, Zhang Y, Zhang W, Boyd SA, Li H (2015) Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables. *J Chromatogr A* 1404:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.022>

Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug;42(8):3558-65.

Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K (2014) Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol* 22(9):536–545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>

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)

Karacı A, Balcıoğlu IA (2009) Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of The Total Environment* 407(16):4652–4664. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.047>

Karpíšková, R., Kolářková, I., Pokludová, L., Mravcová, L., Fučík, J., Amrichová, A., Poláková, Š. (2023) Antimikrobiální rezistence v půdě a případně dalších částech životního prostředí. Zpráva z funkčního úkolu MZe za rok 2023. <https://mze.gov.cz/public/portal/-a30976---7WANGDJK/antimikrobialni-rezistence-zprava-za-rok-2023>

Keerthanan S, Jayasinghe C, Biswas JK, Vithanage M (2021) Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in the environment: Plant uptake, translocation, bioaccumulation, and human health risks. *Crit Rev Environ Sci Technol* 51(12):1221–1258. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1753634>

Keerthanan S, Jayasinghe C, Bolan N, Rinklebe J, Vithanage M (2022) Retention of sulfamethoxazole by cinnamon wood biochar and its efficacy of reducing bioavailability and plant uptake in soil. *Chemosphere* 297:134073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134073>

Khasawneh OFS, Palaniandy P (2021) Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants. *Process Safety and Environmental Protection* 150:532–556. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.04.045>

Kinney CA, Heuvel B Vanden (2020) Translocation of pharmaceuticals and personal care products after land application of biosolids. *Curr Opin Environ Sci Health* 14:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.11.004>

Kodešová R, Grabic R, Kočárek M, Klement A, Golovko O, Fér M, Nikodem A, Jakšík O (2015) Pharmaceuticals' sorptions relative to properties of thirteen different soils. *Science of The Total Environment* 511:435–443. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.088>

Kodešová R, Klement A, Golovko O, Fér M, Kočárek M, Nikodem A, Grabic R (2019) Soil influences on uptake and transfer of pharmaceuticals from sewage sludge amended soils to spinach. *J Environ Manage* 250:109407. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109407>

Koike S, Aminov RI, Yannarell AC, Gans HD, Krapac IG, Chee-Sanford JC, Mackie RI. Molecular ecology of macrolide-lincosamide-streptogramin B methylases in waste lagoons and subsurface waters associated with swine production. *Microb Ecol.* 2010 Apr;59(3):487-98. doi: 10.1007/s00248-009-9610-0. Epub 2009 Nov 19. PMID: 19924466.

Komori K, Suzuki Y, Minamiyama M, Harada A (2013) Occurrence of selected pharmaceuticals in river water in Japan and assessment of their environmental risk. *Environ Monit Assess* 185(6):4529–4536. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2886-4>

Kuppusamy S, Kakarla D, Venkateswarlu K, Megharaj M, Yoon Y-E, Lee YB (2018) Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. *Agric Ecosyst Environ* 257:47–59. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.026>

Li Y, Sallach JB, Zhang W, Boyd SA, Li H (2022) Characterization of Plant Accumulation of Pharmaceuticals from Soils with Their Concentration in Soil Pore Water. *Environ Sci Technol* 56(13):9346–9355. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00303>

Linden Moffatt (2007) Draxxin injectable solution - APVMA Product Number 59304

Ma Y, Pirolo M, Jana B, Mebus VH, Guardabassi L. The intrinsic macrolide resistance of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2024 Aug 7;68(8):e0045224. doi: 10.1128/aac.00452-24. Epub 2024 Jun 28. PMID: 38940570; PMCID: PMC11304742.

Ma, CX., Li, Y., Liu, WT. et al. Synthetic macrolides overcoming MLSBK-resistant pathogens. *Cell Discov* 10, 75 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41421-024-00702-y>

Manasfi R, Labad F, Montemurro N (2020) Development of Methods for the Determination of PhACs in Soil/Earthworm/Crop System Irrigated with Reclaimed Water

Martineau F, Picard JF, Roy HP, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, vol. 34, no. 12, p. 2888-2893.

Massé D, Saady N, Gilbert Y (2014) Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals* 4(2):146–163. <https://doi.org/10.3390/ani4020146>

McPherson MR, Wang P, Marsh EL, Mitchell RB, Schachtman DP. Isolation and Analysis of Microbial Communities in Soil, Rhizosphere, and Roots in Perennial Grass Experiments. *J Vis Exp.* 2018 Jul 24;(137):57932. doi: 10.3791/57932. PMID: 30102263; PMCID: PMC6126543. Michelini L, La Rocca N, Rascio N, Ghisi R (2013) Structural and functional alterations induced by two sulfonamide antibiotics on barley plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 67:55–62. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.027>

Miklasińska-Majdanik M. Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* (Basel). 2021 Nov 17;10(11):1406. doi: 10.3390/antibiotics10111406. PMID: 34827344; PMCID: PMC8615237.

Mohring SAI, Strzysch I, Fernandes MR, Kiffmeyer TK, Tuerk J, Hamscher G (2009) Degradation and Elimination of Various Sulfonamides during Anaerobic Fermentation: A Promising Step on the Way to Sustainable Pharmacy? *Environ Sci Technol* 43(7):2569–2574. <https://doi.org/10.1021/es802042d>

Motoyama M, Nakagawa S, Tanoue R, Sato Y, Nomiya 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.048>

Mravcová L, Amrichová A, Navrkalová J, Hamplová M, Sedlár M, Gargošová HZ, Fučík J (2024) Optimization and validation of multiresidual extraction methods for pharmaceuticals in Soil, Lettuce, and Earthworms. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33492-7>

Mravcová, L., Fučík, J., Brabcová, K., Pokludová, L., Karpíšková, R., Gelbíčová, T., Poláková, Š., Stolár, 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

Müller HC, Van Bibber-Krueger CL, Ogunrinu OJ, Amachawadi RG, Scott HM, Drouillard JS. Effects of intermittent feeding of tylosin phosphate during the finishing period on feedlot performance, carcass characteristics, antimicrobial resistance, and incidence and severity of liver abscesses in steers. *J Anim Sci.* 2018 Jun 29;96(7):2877-2885. doi: 10.1093/jas/sky166. PMID: 29718254; PMCID: PMC6095443.

Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC, Browne AJ, Chipeta MG, Fell F, Hackett S, Haines-Woodhouse G, Kashef Hamadani BH, Kumaran EAP, McManigal B, Achalapong S, Agarwal R, Akech S, Albertson S, Amuasi J, Andrews J, Aravkin A, Ashley E, Babin F-X, Bailey F, Baker S, Basnyat B, Bekker A, Bender R, Berkley JA, Bethou A, Bielicki J, Boonkasidecha S, Bukosia J, Carneiro C, Castañeda-Orjuela C, Chansamouth V, Chaurasia S, Chiurchiù S, Chowdhury F, Clotaire Donatien R, Cook AJ, Cooper B, Cressey TR, Criollo-Mora E, Cunningham M, Darboe S, Day NPJ, De Luca M, Dokova K, Dramowski A, Dunachie SJ, Duong Bich T, Eckmanns T, Eibach D, Emami A, Feasey N, Fisher-Pearson N, Forrest K, Garcia C, Garrett D, Gastmeier P, Giref AZ, Greer RC, Gupta V, Haller S, Haselbeck A, Hay SI, Holm M, Hopkins S, Hsia Y, Iregbu KC, Jacobs J, Jarovsky D, Javanmardi F, Jenney AWJ, Khorana M, Khusuwan S, Kissoon N, Kobeissi E, Kostyanov T, Krapp F, Krumkamp R, Kumar A, Kyu HH, Lim C, Lim K, Limmathurotsakul D, Loftus MJ, Lunn M, Ma J, Manoharan A, Marks F, May J, Mayxay M, Mturi N, Munera-Huertas T, Musicha P, Musila LA, Mussi-Pinhata MM, Naidu RN, Nakamura T, Nanavati R, Nangia S, Newton P, Ngoun C, Novotney A, Nwakanma D, Obiero CW, Ochoa TJ, Olivas-Martinez A, Olliaro P, Ooko E, Ortiz-Brizuela E, Ounchanum P, Pak GD, Paredes JL, Peleg AY, Perrone C, Phe T, Phommasone K, Plakkal N, Ponce-de-Leon A, Raad M, Ramdin T, Rattanaovong S, Riddell A, Roberts T, Robotham JV, Roca A, Rosenthal VD, Rudd KE, Russell N, Sader HS, Saengchan W, Schnall J, Scott JAG, Seekaew S, Sharland M, Shivamallappa M, Sifuentes-Osornio J, Simpson AJ, Steenkeste N, Stewardson AJ, Stoeva T, Tasak N, Thaiprakong A, Thwaites G, Tigoi C, Turner C, Turner P, van Doorn HR, Velaphi S, Vongpradith A, Vongsouvath M, Vu H, Walsh T, Walson JL, Waner S, Wangrangsimakul T, Wannapinij P, Wozniak T, Young Sharma TEMW, Yu KC, Zheng P, Sartorius B, Lopez AD, Stergachis A, Moore C, Dolecek C, Naghavi M (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399(10325):629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Pan M, Chu LM (2016) Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. *Science of The Total Environment* 545–546:48–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.040>

Parente CET, Oliveira da Silva E, Sales Júnior SF, 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. *Ecotoxicol Environ Saf* 207:111305. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111305>

Petrovic M, Gros M, Barcelo D (2006) Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1124(1–2):68–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.024>

Pino MR, Muñiz S, Val J, Navarro E (2016) Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Pollution Research* 23(22):22530–22541. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7446-y>

Pocrnić M, Ansorge M, Dovhunová M, Habinovec I, Tesařová E, Galić N (2020) Chiral separation of beta-blockers by high-performance liquid chromatography and determination of bisoprolol enantiomers in surface waters. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 71(1):56–62. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3318>

Quaresma A V., Sousa BA, Silva KTS, Silva SQ, Werle AA, Afonso RJCF (2019) Oxidative treatments for atenolol removal in water: Elucidation by mass spectrometry and toxicity evaluation of degradation products. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 33(3):303–313. <https://doi.org/10.1002/rcm.8338>

Ramu H, Mankin A, Vazquez-Laslop N (2009). Programmed drugdependent ribosome stalling. *Mol Microbiol* 71: 811–824.

Reeves PT (2011) Antibiotics: Groups and Properties. In: *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. Wiley, pp 1–60

Riva F, Zuccato E, Pacciani C, Colombo A, Castiglioni S (2021) A multi-residue analytical method for extraction and analysis of pharmaceuticals and other selected emerging contaminants in sewage sludge. *Analytical Methods* 13(4):526–535. <https://doi.org/10.1039/D0AY02027C>

Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2008 May;282(2):147-59. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x. Epub 2008 Apr 9. PMID: 18399991.

Roberts, M. C. 2004. Distribution of macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide and oxazolidinone (MLSKO) resistance genes in Gram-negative bacteria. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 4:207–215.

Saito-Shida S, Kashiwabara N, Nemoto S, Akiyama H (2019) Determination of the total tulathromycin residues in bovine muscle, fat, and liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 1110–1111:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.02.011>

Sanchez-Hernandez JC (2020) Vermiremediation of Pharmaceutical-Contaminated Soils and Organic Amendments

Sardar MF, Zhu C, Geng B, Ahmad HR, Song T, Li H. The fate of antibiotic resistance genes in cow manure composting: shaped by temperature-controlled composting stages *Bioresour. Technol.*, 320 (Pt B) (2021), Article 124403, 10.1016/j.biortech.2020.124403

Sauvêtre A, Eichhorn P, Pérez S (2020) Metabolism of Pharmaceuticals in Plants and Their Associated Microbiota. pp 221–264

Shi X, Zhang S, Zhang Y, Geng Y, Wang L, Peng Y, He Z (2022) Novel and simple analytical method for simultaneous determination of sulfonamide, quinolone, tetracycline, macrolide, and chloramphenicol antibiotics in soil. *Anal Bioanal Chem* 414(22):6497–6506. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04206-0>

Shi Y, Gao L, Li W, Liu J, Cai Y (2012) Investigation of Fluoroquinolones, Sulfonamides and Macrolides in Long-Term Wastewater Irrigation Soil in Tianjin, China. *Bull Environ Contam Toxicol* 89(4):857–861. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0761-1>

Schlüsener MP, Bester K (2006) Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution* 143(3):565–571. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.049>

Schlüsener MP, von Arb MA, Bester K (2006) Elimination of Macrolides, Tiamulin, and Salinomycin During Manure Storage. *Arch Environ Contam Toxicol* 51(1):21–28. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0240-8>

Schmidt JW, Vikram A, Miller E, Jones SA, Arthur TM. In-Feed Tylosin Phosphate Administration to Feedlot Cattle Minimally Affects Antimicrobial Resistance. *J Food Prot.* 2020 Feb 1;83(2):350-364. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-19-342. PMID: 31971461.

Spielmeyer A (2018) Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments: A short review. *Sustain Chem Pharm* 9:76–86. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.06.004>

Wang G, Kong Y, Yang Y, Ma R, Li L, Li G, Yuan J. Composting temperature directly affects the removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in livestock manure. *Environ Pollut.* 2022 Jun 15;303:119174. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119174. Epub 2022 Mar 16. PMID: 35306090.

Wang X, Tao YF, Huang LL, CHen DM, Yin SZ, Ihsana A, Zhou W, Su SJ, Liu ZL, Pan YH, Yuan ZH (2012) Pharmacokinetics of tulathromycin and its metabolite in swine administered with an intravenous bolus injection and a single gavage. *J Vet Pharmacol Ther* 35(3):282–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2011.01322.x>

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.

Wilson DN, Arenz S, Beckmann R (2016). Translation regulation via nascent polypeptide-mediated ribosome stalling. *Curr Opin Struct Biol* 37: 123–133

Wu C, Spongberg AL, Witter JD, Fang M, Czajkowski KP (2010) Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Soybean Plants from Soils Applied with Biosolids and Irrigated with Contaminated Water. Environ Sci Technol 44(16):6157–6161. <https://doi.org/10.1021/es1011115>

Wu X, Ernst F, Conkle JL, Gan J (2013) Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables. Environ Int 60:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.015>

Yaeger M, Mochel JP, Wu Z, Plummer P, Sahin O, Smith J, Ocal M, Beyi A, Xu C, Zhang Q, Griffith RW (2021) Pharmacokinetics of tulathromycin in pregnant ewes (*Ovis aries*) challenged with *Campylobacter jejuni*. PLoS One 16(8):e0256862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256862>

Zahedi S, Gros M, Casabella O, Petrovic M, Balcazar JL, Pijuan M (2022) Occurrence of veterinary drugs and resistance genes during anaerobic digestion of poultry and cattle manures. Science of The Total Environment 822:153477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153477>

Zhang Y-L, Lin S-S, Dai C-M, Shi L, Zhou X-F (2014) Sorption–desorption and transport of trimethoprim and sulfonamide antibiotics in agricultural soil: effect of soil type, dissolved organic matter, and pH. Environmental Science and Pollution Research 21(9):5827–5835. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2493-8>

