

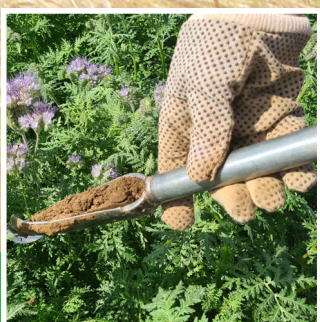
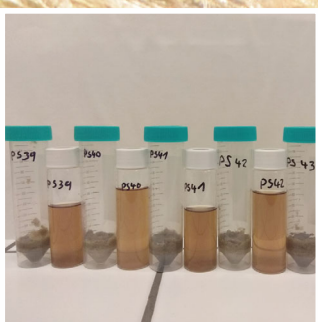
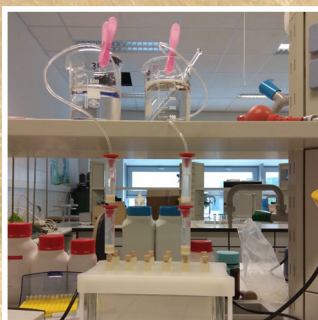
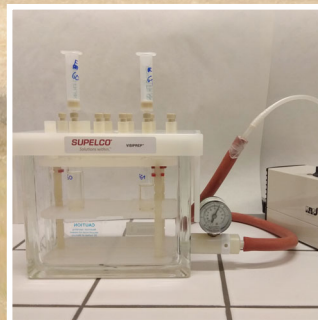


Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně

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 2021

Brno, listopad 2021



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně



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 2021**

Brno, listopad 2021

Autoři:

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

Ing. Jan Fučík (FCH VUT)

Bc. Kristýna Brabcová (FCH VUT)

Mgr. Lucie Pokludová, Dr. (ÚSKVBL)

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

Mgr. Tereza Gelbíčová, Ph.D. (LF MU)

Mgr. Šárka Poláková, Ph.D. (ÚKZÚZ)

MVDr. Petr Stolář (PTÁCY s.r.o.)

MVDr. Vladimír Sladeček (PTÁCY s.r.o.)

MVDr. David Šenk (PTÁCY s.r.o.)

## **OBSAH**

ABSTRAKT .....	5
1. ÚVOD.....	6
1.1. Důvod pro výběr enrofloxacinu, indikace a podmínky použití .....	6
1.2. Situace a trendy ve spotřebě enrofloxacinu v České republice a v kontextu se státy EU/EEA.....	11
2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU .....	14
3. MATERIÁL A METODIKA.....	15
3.1. Charakteristika farmy .....	15
3.2. Terénní práce .....	19
3.3. Analytické metody používané v současné literatuře pro stanovení fluorochinolonů ..	22
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	30
4.1. Analýza vzorků napájecí vody .....	30
4.2. Analýza vzorků podestýlky .....	30
4.3. Výsledky měření analýzy vzorků půdy .....	36
5. ZÁVĚRY .....	39
6. REFERENCE.....	42
7. PŘÍLOHA .....	47

## **SEZNAM ZKRATEK**

AMEG	Expertní skupiny pro antimikrobika (Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group) při Evropské lékové agentuře
AMR	Antimikrobiální rezistence
AP NAP	Akční plán Národního antibiotického programu
CBP	Clinical breakpoints (klinické hraniční hodnoty)
CIP	Ciprofloxacin
CVMP	Committee for Veterinary Medicinal Products (Komise pro veterinární léčivé přípravky)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (ethylenndiamintetraoctová kyselina)
ENR	Enrofloxacin
ECOFF	Epidemiological cut off (epidemiologické hraniční hodnoty)
HPLC	High performance liquid chromatography, (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
LC/MS	Liquid chromatography-tandem mass spektrometry (kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MWE	Microwave extraction (mikrovlnná extrakce)
Na <sub>2</sub> EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
NWT	Non-Wild Type
OIE	Světová organizace pro zdraví zvířat (World Organisation for Animal Health)
PCU	Population Correction Unit
PLE	Pressurized liquid extraction (extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku)
PMQR	Plasmidově přenosná rezistence vůči fluorochinolonům
PSA	Primary secondary amine (primární sekundární amin)
SPE	Solid phase extraction (extrakce na tuhou fázi)
UPLC	Ultra performance liquid chromatography (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
VLP	Veterinární léčivé přípravky
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

## **ABSTRAKT**

Antibiotika jsou nedílnou součástí našeho života. Jejich používání však přináší rizika spočívající v rozvoji a šíření rezistence k antimikrobikům. Skupinou antibiotik s kritickým významem jak pro humánní, tak pro veterinární medicínu jsou fluorochinolony. Fluorochinolony se používají u všech hospodářských zvířat, v rámci České republiky je však doloženo, že téměř 80 % spotřeb fluorochinolonů je využíváno u drůbeže. Navíc byla detekována vysoká míra rezistence k flurochinolonům u rodu *Campylobacter* spp. a izolátů *E.coli* z brojlerů, krůt a jatečných těl drůbeže (interpretováno dle epidemiologických hraničních hodnot). Pro Českou republiku je dostupné rovněž posouzení MIC k fluorochinolonům u *E.coli* pocházející od drůbeže v rámci monitoringů z nemocných zvířat i ze zvířat na jatkách. Na významu nabývají vstupy reziduí kontaminujících látek, včetně antimikrobik a tedy i fluorochinolonů do životního prostředí. V roce 2021 byl projekt zaměřen na enrofloxacin (a jeho metabolit ciprofloxacin) medikovaný brojlerům kura domácího. Byla optimalizována metoda stanovení uvedených látek v napájecí vodě, podestýlce a půdě. Byl proveden modelový pokus zaměřený na přetrvávání ENR/CIP v půdě vyhnojené drůbeží podestýlkou od zvířat léčených enrofloxacinem. Pomocí tohoto pokusu bylo potvrzeno setrvání enrofloxacinu v půdě 16 týdnů po aplikaci drůbeží podestýlky. Byly vymezeny možnosti pokračování funkčního úkolu pro rok 2022 (stanovení PMQR u *E.coli* v návaznosti na používání fluorochinolonů u drůbeže).



## **1. ÚVOD**

Předložený dokument je třetí ze série zpráv zpracovaných v rámci plnění parciálního cíle I.1.5 stanoveného v rámci realizační náplně Akčního plánu Národního antibiotického programu (AP NAP) schváleného na období 2019–2022. Náplní uvedeného cíle AP NAP je zformulovat rámec pro sledování bakteriálních kmenů rezistentních k antimikrobikům v půdě a reziduí léčivých látek používaných v chovech hospodářských zvířat s riziky pro životní prostředí a navržení zakomponování problematiky sledování AMR do programu monitoringu půd v ČR. Tato aktivita navázala na výsledky a práce předchozích dvou let. V roce 2019 byl zpracován analytický dokument, ve kterém byly identifikovány možné přístupy vhodné pro sledování zátěže:

- antimikrobikum (výběr primárně dle zátěže pro životní prostředí a kritického významu pro humánní či veterinární oblast, či míry spotřeby) +
- zvíře (cílový druh/produkční kategorie hospodářských zvířat) +
- vehikulum pro přenos do zemědělské půdy (kejsa u prasat, podestýlka u drůbeže, hnůj u skotu).

V témže roce byla provedena pilotní studie, která poskytla první výsledky a nastínila směr práce na nadcházející rok.

V roce 2020 byl projekt zaměřen na kolistin a jeho použití u prasat s potenciálním dopadem do životního prostředí ve smyslu možného přenosu reziduí, bakterií a rezistencí do půdy, do níž je zapracována kejsa prasat medikovaných kolistinem.

Pro rok 2021 bylo naplánováno zaměřit se na studium enrofloxacinu (ENR) a jeho metabolit ciprofloxacin (CIP) u brojlerů kura domácího s potenciálním dopadem do životního prostředí ve smyslu možného přenosu uvedené látky podestýlkou do půdy. Pro následující rok 2022 by bylo vhodné zjistit výskyt bakterií *E. coli* nesoucích geny PMQR v podestýlce ať již v čerstvém stavu, či fermentované a přežívání bakterií *E. coli* s geny PMQR v půdě po aplikaci podestýlky z chovu brojlerů ošetřených veterinárním léčivým přípravkem obsahujícím enrofloxacin.

### **1.1. Důvod pro výběr enrofloxacinu, indikace a podmínky použití**

V rámci daného funkčního úkolu je navázáno na první zprávu, ve které byla pomocí dostupných informací z odborné literatury zpracována výchozí analýza, z jejíchž závěrů vyplynulo, že jednou ze skupin, které má smysl monitorovat z pohledu možné zátěže půdy jsou fluorované

chinolony (fluorochinolony). Dalším důvodem monitorování je i skutečnost, že fluorované chinolony patří mezi kriticky významná antimikrobika a to dle klasifikace WHO (2019): humánní oblast, OIE (2021): veterinární oblast i AMEG (2020) spojující kritéria z humánní i veterinární oblasti. Pro Českou republiku (dále ČR) ve vztahu k sektoru hospodářských zvířat jsou z dané skupiny relevantní a používané enrofloxacin a marbofloxacin, u zvířat v zájmovém chovu pak pradofloxacin. Naprostou většinu spotřeb fluorovaných chinolonů za posledních 10 let lze v ČR alokovat na enrofloxacin, který je podáván hospodářským zvířatům jak ve formě injekční, ale pro celkovou spotřebu určující je především spotřeba perorálně podávaných forem veterinárních léčivých přípravků. Marbofloxacin je dostupný pouze v injekční formě a jeho podání je tak velmi individualizované.

U řady hospodářských zvířat se enrofloxacin různou mírou metabolizuje na mikrobiologicky účinný ciprofloxacin, proto je potřeba sledovat obě formy antimikrobik a jejich osud po podání enrofloxacinu (jak ve tkáních zvířat určených k lidskému spotřebě, jejich produktech, tak také v exkrementech a následně případně v půdě).

Závěrečnou odbornou rozvalu pro fluorochinolony při zohlednění výchozí analytické zprávy z roku 2019 lze shrnout do následujících bodů:

- sledovat rezidua enrofloxacinu a jeho metabolitu ciprofloxacinu v půdě, zejména v okolí chovů drůbeže (v menší míře prasat), a to zejména tam, kde byla zapracována podestýlka z chovů drůbeže (případně, kde je relevantní také kejda z chovů prasat)
- sledovat výskyt rezistence (např. geny *par*, *gyr*, *qep*, *oqx*, *aac(6')Ib*) či další dle aktuálního stavu poznání a odborné rozvahy a zaměřit se především na detekci transferabilní rezistence přenášené pomocí plazmidů (PMQR).

### **1.1.1 Aktuální klasifikace chinolonů a fluorovaných chinolonů dle WHO, OIE a AMEG**

Fluorované chinolony (včetně enrofloxacinu, marbofloxacinu a pradofloxacinu – tedy všech, které mají v současnosti v ČR platnou registraci a ciprofloxacinu, jako metabolitu enrofloxacinu) jsou zařazeny na seznamu WHO (2019) v 6. vydání mezi tzv. „antimikrobika s kritickým významem nejvyšší priority pro humánní medicínu“ (Highest Priority Critically Important Antimicrobials = HP CIAs), která naplňují současně obě z kritérií významnosti (C1 a C2) a také všechna kritéria P1, P2 a P3.

Kritérium C1: jedinečná, nebo jedna z omezeně dostupných léčebných možností pro léčbu závažných bakteriálních onemocnění člověka, pro fluorochinolony zdůvodněna následovně:



V rámci léčby infekcí člověka – omezená možnost léčby pro klinické případy infekcí vyvolaných *Campylobacter* spp., invazivní onemocnění vyvolaná *Salmonella* spp. a infekce vyvolané multirezistentními kmeny *Shigella* spp.

Kritérium C2: použití pro léčbu infekcí s možností přenosu z „non-humánních“ zdrojů, nebo s přenosem rezistence z „non-humánních“ zdrojů, pro fluorochinolony zdůvodněno následovně:

V rámci přenosu vlastních infekčních agens či rezistence z non-humánních zdrojů (tedy např. ze zvířat na člověka, či prostřednictvím environmentu) – riziko přenosu *Campylobacter* spp. a zástupců enterobakterií, včetně *E.coli* a *Salmonella* spp.

Kritérium P1: Použití pro léčbu velkého množství lidí, pro kterou jsou omezené možnosti z dostupných antimikrobik. Naplněno pro fluorochinolony.

Kritérium P2: Použití s vysokou frekvencí v humánní medicíně nebo u jiných vysoce rizikových skupin. Naplněno pro fluorochinolony.

Kritérium P3: Použití u infekcí lidí, kde existuje rozsáhlé množství důkazů o přenosu rezistentních bakterií nebo genů rezistence z „non-humánních“ zdrojů. Naplněno u fluorochinolonů – riziko přenosu *Campylobacter* spp. a zástupců enterobakterií, včetně *E.coli* a *Salmonella* spp.

Z pohledu klasifikace **OIE** (2021), kdy poslední dostupná aktualizace seznamu antimikrobik s významem pro veterinární medicínu byla vydána v červnu 2021, jsou fluorochinolony zařazeny mezi „veterinární kriticky významná antimikrobika“, splňují současně dvě kritéria:

Kritérium C1: více než 50 % respondentů na dotazník OIE identifikovalo významnost (a jsou určeny též indikace, případně patogeny), pro fluorochinolony to jsou nezbytnost pro léčbu septikémií, ale i respiračních či gastrointestinálních infektů. Fluorochinolony byly označeny za extrémně významné pro veterinární medicínu s ohledem na široké uplatnění u řady indikací (a nutno dodat i pro výborné farmakokinetické vlastnosti).

Kritérium C2: léčba závažných infekcí zvířat a dostupnost alternativních antimikrobik (pokud daná skupina léčivých látek je identifikována jako esenciální proti specifickým infekcím a je identifikován nedostatek alternativ).

Z pohledu klasifikace **AMEG** (2020) patří fluorochinolony do skupiny B (restrict, tedy omezte), jejich použití by se tedy mělo zvažovat pouze v případech, kdy nejsou možné jako klinicky účinné alternativy ze skupin s nižšími riziky (C a D). Vždy, když je to možné měl by

být podáván jakýkoliv zástupce z této skupiny antimikrobik pouze po otestování citlivosti. Klasifikace AMEG vycházela z faktu, že fluorochinolony naplnily následující kritéria:

- a) **Přenos rezistence prostřednictvím úspěšného klonu/ů:** definovaný jako vertikální přenos genů rezistence z rodičovské na dceřinou bakteriální buňku/y, s potenciálně širokou diseminací na léčivo odolného klonu v rámci bakteriální populace:  
  
Nejen přítomnost genu na mobilním genetickém elementu, ale rovněž přenos prostřednictvím vysoce transmisibilního, z pohledu šíření úspěšného klonu s rezistencí k fluorochinolonom.
- b) **Horizontální přenos rezistence** pomocí mobilních genetických elementů, u fluorochinolonomů např. geny na plasmidech či transpozomech
- c) **Ko-selekce rezistence**, definovaná jako typ rezistence, kde použití jednoho antimikrobika umožňuje vznik/výskyt rezistence na jinou skupinu či podskupinu antimikrobik s odlišným spektrem účinnosti. Při posouzení v rámci AMEG bylo toto omezeno na princip ko-selekce, kdy rozdílné geny jsou alokovány na shodném mobilním genetickém elementu (plasmidy, či např. také elementy typu inserčních sekvencí). Existují i specifické případy, kdy jeden gen kóduje určitý mechanismus rezistence postihující několik nepříbuzných skupin antimikrobik (např. vícelékové pumpy v efluxních systémech). Pro fluorochinolony zde byla udělena klasifikace 2 (ze 3stupňového systému), která indikovala buď přítomnost genu rezistence k fluorochinolonom s jinými geny rezistence na mobilním genetickém elementu nebo lokaci genu v prostředí, které umožňuje mobilizaci genu spolu s dalšími geny (např. inserční sekvence)
- d) **Přenos rezistence jak přes zoonotické, tak také komensální bakterie původem z potravin** pro fluorochinolony platí obě možnosti čili jsou řazeny do kategorie 3. Zoonotické a současně z potravin pocházející jsou například např. *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli*, enterokoky
- e) **Obdoba rezistence:** pro fluorochinolony platí, že existují shodné geny rezistence izolované jak u zvířat, tak u lidí (jde však spíše o tu skutečnost, v jakém rozsahu jsou konkrétní kmeny, či mobilní genetické elementy shodné.

### **1.1.2 Platná právní úprava, dávka, frekvence a celková doba podávání, vymezení druhů drůbeže a ochranná lhůta spolu s omezením pro vejce platné v ČR pro VLP s enrofloxacinem**

Z pohledu klasifikace dle platných právních předpisů v ČR platí pro VLP s fluorochinolony režim **indikačního omezení, který upravuje vyhláška 344/2008**. V rámci české republiky, ale i Evropské unie (následně po řízení přezkumu pro perorálně podávané VLP s enrofloxacinem – Commission Implementing Decision (C (2014) 1484), jsou platné registrace pro VLP, u kterých je schválený režim podávání pro schválené indikace a cílové druhy kura domácího a krůty v dávce **10 mg enrofloxacinu/kg živé hmotnosti/den po dobu 3–5 po sobě jdoucích dnů**. Přičemž režim 5denního podávání se považuje za opodstatněný u smíšených či i chronických infekčních stavů, avšak pouze tehdy reagují-li na léčbu do 2–3 dnů. Jelikož je *de facto* povinné z vyhlášky mít k dispozici vyšetření citlivosti, měly by být pro případ selhání k dispozici výsledky pro další antimikrobika, která by bylo možno použít při selhání léčby. V klinické praxi však je portfolio dostupných VLP/ antimikrobik omezené, mimo jiné i délkou ochranné lhůty, která následně limituje podání zejména v pozdějších fázích výkrmu brojlerů, či nejsou stanoveny ochranné lhůty pro vejce ke konzumu, což prakticky znemožňuje podání u nosnic. Pro VLP obsahující enrofloxacin jsou harmonizovaně schváleny ochranné lhůty 7 dnů pro maso (včetně vnitřností) u kura domácího, 13 dnů pro maso (včetně vnitřností krůt) a předmětné perorálně podávané veterinární léčivé přípravky nejsou registrovány pro nosnice produkující vejce pro lidskou spotřebu a rovněž je upozorněno, že se nemají předmětná VLP podávat kuřicím (budoucím nosnicím) 14 dnů před započítáním snášky vajec.

#### **Profylaxe, metafylaxe, léčba**

U fluorovaných chinolonů je známo, že jsou v sektoru drůbeže uplatňovány všechny tři možné přístupy, kdy lze VLP podávat. V případě použití ve velmi časných stádiích výkrmu, jelikož jsou fluorochinolony v režimu indikačního omezení, měla by být i pro tyto případy testována citlivost např. u oslabených zvířat či (byť i ojedinelých) úhynů, nebo by alespoň měla být k dispozici informace o citlivosti/výskytu možných etiologických agens z líhně (epidemiologická souvislost). U použití u drůbeže v produkčním cyklu platí obdobně (tedy pro dané hejno by měly být k dispozici výsledky citlivosti opravňující podání enrofloxacinu).

- a) profylaktické podání, kdy se jedná o podání celé hale naskladněných brojlerů kura ve stáří jeden den až několik dnů (celková doba podání většinou 3 dny, či max 5 dnů), a to z důvodu presumpce rozvoje infekce/infekcí u jednodenních kuřat (v důsledku

- nevyrovnanosti/oslabení naskladňovaných jednodenních kuřat, delšího transportu, naskladnění počtu kuřat v míře hraniční až mírně přesahující kapacitu haly);
- b) metafylaktické podání, kdy se se jedná nejčastěji o podání celé hale naskladněných brojlerů kura ve stáří jeden den či první týden po naskladnění (celková doba podání většinou 3 dny, či max 5 dnů) a to z důvodu, že jsou v hejnu přítomny indicie (např. počínající „nadlimitní“ úhyny), případně je již známa i citlivost (přímo z uhynulých kuřat (při transportu, naskladnění));
- c) léčebné podání (celkově méně časté ve srovnání s předchozími dvěma typy, v pokročilejších fázích výkrmu) z důvodu jednoznačné medicínské indikace (diagnózy patologií, úhynů apod. v rámci hejna).

## **1.2. Situace a trendy ve spotřebě enrofloxacinu v České republice a v kontextu se státy EU/EEA**

Trendům ve spotřebách fluorochinolonů by měla být věnována zásadní pozornost, a to především z důvodu, že jsou to antimikrobika s indikačním omezením, kde u vybraných bakteriálních agens (*E.coli*, salmonely, kampylobaktery) jsou rezistence již i v ČR velmi vysoké. Problémem je především míra používání fluorochinolonů u drůbeže. Lze uvést, že ačkoliv, co do hmotnostních objemů nepatří fluorochinolony mezi skupinu s nejvyššími spotřebami, frekvencí jejich podávání v rámci sektoru drůbeže se dostávají na první pozici ze všech u drůbeže používaných skupin antimikrobik (následované především amoxicilinem ze skupiny aminopenicilinů, doxycyklinem ze skupiny tetracyklinů, sulfonamidy (převážně v kombinaci s trimethoprimem) a také, i když v menší míře aminoglykosidy (např. neomycin), makrolidy (např. tylosin), pleuromutiliny (například tiamulin), či kombinací linkomycinu a spektinomycinu.

Jak u fluorochinolonů, tak u všech výše uvedených skupin antimikrobik jsou jejich spotřeby dány především používáním pro hromadnou medikaci/medikaci skupin (zde celých hal) kura domácího. V systému produkce drůbeže je *de facto* nemožné individualizovat podání léčiv obecně, není možné ani oddělit část zvířat a poskytnout ošetření menší skupině. Doposud nemáme pro ČR známa přesná data o používání u kategorií (rodiče, nosnice, brojleři kura domácího), která by vytvořila exaktní a přesný obraz o použití jednotlivých antimikrobik a jejich skupin v rámci sektoru drůbeže a zároveň indikovala přesnou míru léčebného, metafylaktického a profylaktického používání. Aby bylo dosaženo výrazného snížení používání

jakékoliv z těchto skupin, měl být kladen důraz na postupné vyfázování profylaktického podávání. Je také vhodné upřesnit, že v rámci nové legislativy k veterinárním léčivým přípravkům bude velmi omezeno a u medikovaných krmiv zakázáno hromadné profylaktické podávání veterinárních antibiotik od konce ledna roku 2022 v celé EU.

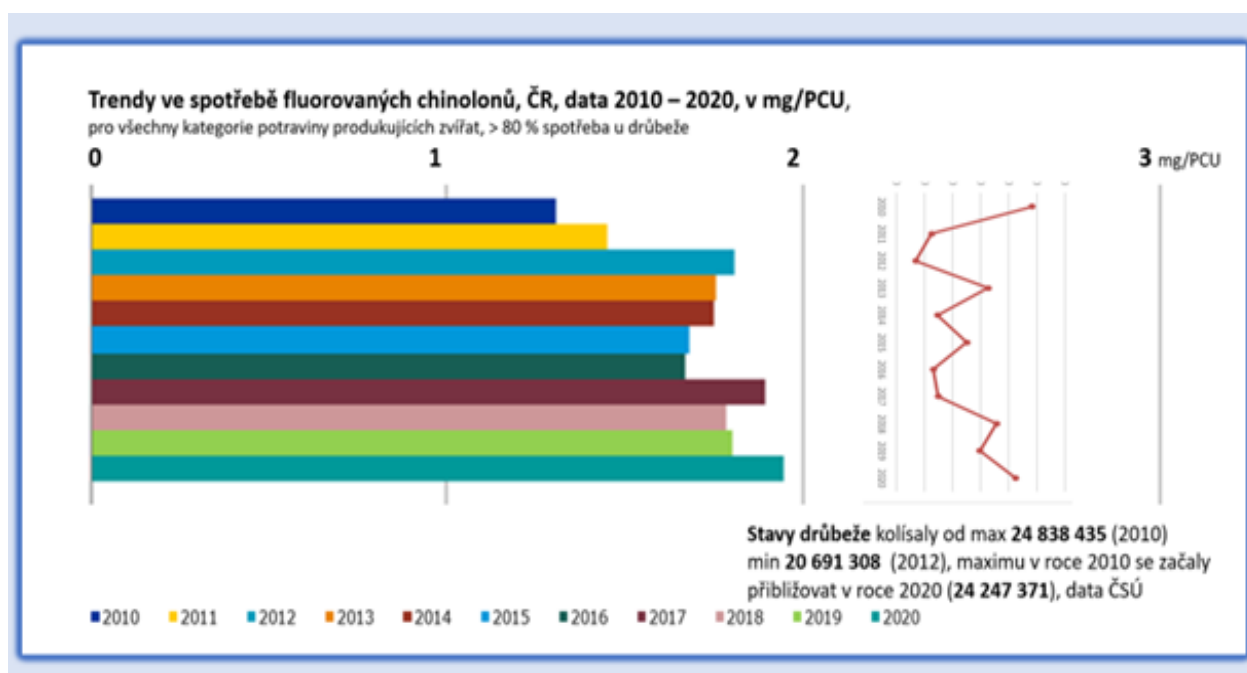
V rámci ČR činila spotřeba fluorochinolonů za rok 2020 1,94 mg/PCU. Z pohledu trendů, je s menšími fluktuacemi zaznamenáván kontinuální **nárůst spotřeb fluorochinolonů o 48,6 % v letech 2010 (1,31 mg/PCU) až 2020**. Při bližší analýze posledních 3 let je patrný meziroční pokles 2017–2018 o 6 %, nicméně následný nárůst 2019–2020 o 8 %, proto hovoříme o fluktuacích v jednotlivých letech. Je potřebné zmínit, že z údajů z kvalifikovaných odhadů/doložených dat ke stratifikaci spotřeb je patrné, že téměř 80 % spotřeby fluorochinolonů lze alokovat na spotřebu enrofloxacinu u drůbeže. Výše uvedené údaje je nutno vnímat zejména ve spojitosti se stavy drůbeže, které ve srovnávaném období podléhaly značné fluktuaci (2010 až 2020). Nelze vysledovat korelaci obou sledovaných parametrů (spotřeb a počtu drůbeže, neboť populace drůbeže není jediným ovlivňujícím faktorem). Mezi faktory ovlivňující spotřeby patří např. situace ve zdravotním stavu chované drůbeže (od prarodičovských (mimo ČR), přes rodičovská a produkční hejna. Dalším významným faktorem je období rizika, či propuknutí onemocnění, kdy se zvířata léčí (první dny života vs pozdější fáze např. výkrmu) – je významný rozdíl v celkovém objemu spotřebovaných antimikrobik, neboť se dávkuje mg léčivé látky na kg živé hmotnosti, která, zejména u brojlerových kuřat s časem výrazně narůstá. Trend vývoje spotřeb fluorochinolonů v ČR a trend v populacích drůbeže, dle statistických přehledů ČSÚ (obrázek 1).

Při srovnání s dalšími státy hodnocenými v rámci ESVAC za rok 2020, je patrné, že hodnota 1,94 mg/PCU (ČR) je stále nižší než agregovaná hodnota pro 25<sup>1</sup> zemí (2,20 mg/PCU), nicméně z dat za rok 2020 je patrné, že ČR se nyní řadí mezi státy, jejichž spotřeba převyšuje hranici 0,5 mg/PCU:

- **11 států má vyšší spotřeby fluorochinolonů než ČR** (PL: 12,0 mg/PCU, HU: 11,6 mg/PCU; PT: 7,3 mg/PCU; MT: 4,4 mg/PCU; RO: 5,7 mg/PCU; BL a ES 3,7 mg/PCU; SK 3,4 mg/PCU; CY 2,2 mg/PCU a HR: 2,1 mg/PCU; GR 2,0 mg/PCU)
- **19 států má spotřeby fluorochinolonů nižší než ČR**, z toho 12 států velmi nízké (pod 0,5 mg/PCU).

---

<sup>1</sup> 25 zemí zde komentováno z důvodu, že mají data od roku 2011 do roku 2020



**Obrázek 1:** Ilustrativní zachycení trendu spotřeb fluorovaných chinolonů za posledních 10 let (ČR, 2010–2020, data ÚSKVBL) spolu s trendem zachycujícím fluktuaci v celkových počtech drůbeže (ČR, 2010–2020, vizualizace dat ČSÚ)

Výše uvedená data již zohledňují celkovou chovanou populaci hospodářských zvířat (tedy všechny species a produkční kategorie).

Pokud bychom zvažovali zastoupení drůbeže v daných populacích, to se mezi jednotlivými zeměmi liší (např. Polsko (PL) má největší populaci chované drůbeže v EU (ve smyslu PCU 1 409 a celkové spotřeby fluorochinolonů jsou zde nejvyšší v Evropě 12,9 mg/PCU), nicméně, co do počtu – populace chované drůbeže je následováno Francií (FR: 1 087 PCU, ale ta dokázala snížit spotřeby fluorochinolonů na 0,1 mg/PCU) a Německo (DE) jakožto třetí země EU, co do velikosti populace drůbeže (1 022 PCU mělo rovněž spotřeby fluorochinolonů výrazně nižší než Polsko, a to 0,8 mg/PCU), přičemž obě další země mají vyšší počty zvířat i v sektorech skotu a prasat, které se také částečně mohou podílet na spotřebách fluorovaných chinolonů. Toto svědčí o skutečnosti, že je velmi potřebné pracovat na zlepšení faktorů určujících potřebu podat antimikrobika a tudíž finálně i spotřebu antimikrobik.



## **2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU**

Funkční úkol pro rok 2021 byl zaměřen na rezidua enrofloxacinu (ENR) a jeho metabolit ciprofloxacin (CIP), přičemž byla zpracována analýza posledních dostupných dat o spotřebách ENR (2016–2020) v České republice, metodika analytického stanovení uvedených látek v různých maticích a zjištění koncentrací ENR/CIP v napájecí vodě pro brojlery, v podestýlce a v půdě po aplikaci.

Cíl byl rozdělen do tří dílčích úkolů:

- A. Optimalizace metodiky ke stanovení reziduí ENR/CIP – VUT;
- B. Zpřesnění dostupných informací o koncentracích ENR/CIP v půdě po aplikaci organických hnojiv od medikovaných zvířat a dalších maticích pomocí modelového pokusu – VUT, ÚSKVBL, ÚKZÚZ;
- C. Výchozí analýza z pohledu možného návazného projektu k rezistencím ve spojení s používáním enrofloxacinu u drůbeže (ÚSKVBL + odborný expert), který by dle možnosti a dostupnosti kapacit expertů, odborných pracovišť a také finančních prostředků mohl navazovat v roce 2022) – uvedena v příloze této zprávy.

## **3. MATERIÁL A METODIKA**

### **3.1. Charakteristika farmy**

Farma byla vybrána na základě informací o používání enrofloxacinu v turnusech s produkcí masných brojlerů, většinou po naskladnění jednodenních kuřat. Jednalo se o farmu s chovem kura z Olomouckého kraje, v rozsahu 4 haly, 2 objekty. Kapacita haly 1 a 2 je do max 20 000, nicméně bývá nastájeno spíše 18–19 tisíc (v hale, ze které byly odebrány vzorky ustájeno 18 540 kusů, v době prvního odběru 27. dubna nastájeno 17 829 kusů), u haly 3 a 4 je kapacita nižší do 18 000 a bývá nastájeno přibližně 16–17,5 tisíc kusů. Do daného chovu probíhá návoz jednodenních kuřat v přepravkách většinou po 100 ks (případně po 90 ks). Neprobíhá zde sexování kuřat, ponechávají se společně kohoutci i slepičky. Kuřata jsou již navakcinovaná v líhni proti infekční bronchitidě.

V den návozu je prováděno bakteriologické vyšetření z 15 kuřat náhodně vybraných přímo z přepravek, ještě než přijdou do kontaktu s podestýlkou. Odebírají se směsné vzorky které jsou transportovány v médiu Amies – pupek, orgány a žloutek. Dále 5 vzorků kosti (femur). Kost se zasílá celá a k odběru dochází až v laboratoři – z důvodu minimalizace kontaminace. Vzorky jsou odesílány na bakteriologické vyšetření (v době vzorkování podestýlky na vyšetření pro účely tohoto FÚ byly vzorky odeslány do laboratoře SVÚ Jihlava, výsledky jsou k dispozici – viz níže shrnující přehled vybraných nálezů pro *E.coli*, *Enterococcus faecalis* a *S. aureus* a citlivosti k enrofloxacinu, včetně MIC; bez kvalitativních výsledků, ale indikující jejich citlivosti pak byly z laboratoře hlášeny ještě výsledky pro *Aeromonas hydrophila* a *Acinetobacter johnsonii* z daného vyšetřovaného turnusu. Dále byly uskutečněny také odběry krve ze shodných utracených kuřat. Krevní sérum je pouze archivováno, aby byla možnost vyšetření některých protilátek v případě potřeby.

Farma se naskladňuje z rodičovských chovů tuzemského producenta, ideálně z jednoho rodičovského chovu, avšak předmětné haly byly naskladněny ze dvou líhni. Zastávají se současně vždy všechny 4 haly. Kuřata se vyskladňují z přepravek přímo z aut. Kontroluje se vizuálně kvalita kuřat, posuzuje se uzavřenost pupku a po vysypání z krabic se posuzuje životaschopnost kuřat. Na každé hale se provádí vážení cca 100 ks jedinců – vždy celá bedna. O hodnotách jsou vedeny záznamy. Haly jsou nastaveny na teplotu 33 °C (a adekvátní vlhkost). Na hale s kapacitou 18 000 brojlerů jsou nainstalována 4 čidla, která sledují teplotu, je nastaveno udržování teploty (intenzita ventilace, přísávání vzduchu přes speciální klapky,

sprejování chladnou vodou za účelem ochlazování, které probíhá v létě při vysokých vnějších teplotách v poslední fázi výkrmu – dle hlášení termostatických čidel). V průběhu výkrmu je postupně snižována teplota, aby se, co možná nejvíce, přiblížila fyziologickým/produkčním potřebám chovaných zvířat. Doba pobytu v prostorách pro výkrm činí přibližně 37–42 dnů. Je uskutečňováno monitorování i vnější teploty, sledování vlhkosti prostředí a sledování teploty napájecí vody. Regulace světelného režimu (po návozu svítí až 23 hodin, na noc přepnou na noční (modré) světlo (v prvním týdnu noční režim jen hodinu, pak postupně prodlužován). Každý den (i vícekrát, dle potřeby a aktuálního stavu zvířat), jednotlivé haly pečlivě prochází pracovník farmy, který zvířata sleduje a sbírá uhynulé kusy. Je monitorován denní počet úhynů, překročí-li 1 ks/1000 je nutná urychlená akce. V denní pracovní době je celý den na farmě přítomna 1 pracovnice (zootechnička), monitoruje, zda se nevyskytuje problém (např. dle vokalizace, dle chování brojlerů – např. shromažďování v určitých částech haly). Monitoruje se také kanibalismus. Do haly vchází pracovníci v čistých ochranných oděvech – kombinéza, návleky, galoše (před vstupem prochází přes rohož s dezinfekčním roztokem). Každá hala má individuální měření spotřeby vody, vlastní medikátor (*de facto* kompresor), který je schopen z medikační nádoby, ve které se rozmíchávají léčiva, či aditiva do vody (např. vitamíny) je nasát a rozvést do napáječek.

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

Do chovu, ze kterého byly provedeny postupně odběry podestýlky, trusu a lepenek byla naskladněna kuřata plemene/hybridů ROSS 308, v obou turnusech se jednalo o 18 540 jedinců, v průběhu prvního turnusu (dubnový) byl úhyn 796 kusů, výsledný prodej 17 744 kusů o průměrné (celý turnus, všechny haly) živé hmotnosti 2,15 kg ve dni 40. Naskladněna byla jednodenní kuřata o průměrné hmotnosti 35g.

U dalšího turnusu (květnový) bylo naskladněno 18 540 kusů, průměrná hmotnost 0,39 g, doba výkrmu na dané hale opět 40 dnů, úhyn sumárně 481 kusů, prodáno 18 059 kusů o průměrné (celý turnus, všechny haly) živé hmotnosti 2,07 kg.

Krmná směs KS BR2, dále si chovatel připravuje ve vlastní míchárně, ale pouze v sypké formě. Nemá možnost granulace. Dosahované finální výkrmové hmotnosti (2,15 kg a 2,07 kg za 40 dnů) jsou tak vzhledem k celkové délce výkrmu poněkud nižší.

Z prvního turnusu, který byl na počátku výkrmu medikován enrofloxacinem (VLP Roxacin) byl proveden odběr dne 27. dubna 2021, kdy byla odebrána drůbeží podestýlka přímo z chovné haly v počátku 4. týdne výkrmu.

Z dalšího turnusu (květen) byly uskutečněny odběry před zahájením medikace (18. května 2021), 3. den medikace (21. května 2021) a 7. den od zahájení medikace (25. května 2021).

Vzorky podestýlky a podestýlaných papírů byly odebrány rovnoměrně z celé výkrmové haly, uloženy do PE sáčku a neprodleně předány do laboratoře. Zde byly uloženy za podmínek popsanych u metodických pasáží zprávy níže.

Zdravotní stav drůbeže byl uspokojivý, nicméně jejich hmotnost byla poměrně nízká, byly zaslány vzorky stěrů z vnitřních orgánů jednodenních kuřat na bakteriologické vyšetření (kultivačně a citlivost, včetně stanovení MIC) – shrnutí:

- *Escherichia coli*, intermediární citlivost k enrofloxacinu, jeden izolát (vnitřní orgány) MIC = 0,5 mg/l
- *Enterococcus faecalis*, identifikován ve 3 vzorcích, intermediární citlivost k enrofloxacinu, MIC u dvou izolátů (pupek, kost) MIC = 1 mg/l u jednoho izolátu (kost) MIC = 0,5 mg/l
- *Staphylococcus aureus*, identifikován s nižší kvantitou v jednom ze vzorků, izolát (žloutek) byl citlivý k enrofloxacinu, MIC = 0,25 mg/l

Dále byly ze vzorků vykultivovány a citlivost byla testována pro *Aeromonas hydrophila* (intermediární pro enrofloxacin, bez vyjádření MIC v protokolu) a *Acinetobacter johnsonii* (citlivý pro enrofloxacin, bez vyjádření kvantity MIC v protokolu). Vzorky byly negativní na *Salmonella* spp. a také na *Clostridium perfringens*.

Důvodem pro podání enrofloxacinu byla spíše profylaxe, nicméně byl zohledněn i bakteriologický nálezn a nízká průměrná hmotnost jednodenních kuřat, navíc s nevyrovnanou hmotností. Enrofloxacin byl podán v dávce 10 mg/kg živé hmotnosti, použit veterinární léčivý přípravek Roxacin, koncentrát pro podání prostřednictvím medikované napájecí vody (rozmíchává se v objemu 8–10 litrů napájecí vody, podáván 4 dny, připravován denně čerstvý).

V rámci hejna naskladněného v dubnu bylo zahájeno ošetření u 18 540 ustájených brojlerů (o průměrné hmotnosti 35 g u jednodenních kuřat v okamžiku vyskladnění do haly, tj. vstupní hmotnost hejna byla 648,9 kg, což by při dávce 10 mg/kg ž.hm/den mělo představovat 6 489

mg enrofloxacinu/den0/hejno. První den by tedy měla být spotřeba přibližně 65 ml VLP Roxacin, neboť VLP Roxacin je o koncentraci 100 mg/ml enrofloxacinu, další dny navýšení dle hmotnosti brojlerů.

U druhého vzorkovaného turnusu (květen) bylo uskutečněno podání v termínu od: 18. 5. 2021, po dobu 4 dnů. V rámci hejna zahájeno ošetření u 18 540 nastájených brojlerů (o průměrné hmotnosti 39 g u jednodenních kuřat v okamžiku vyskladnění do haly, tj. vstupní hmotnost hejna byla 723,06 kg, což by při dávce 10 mg/kg ž.hm/den mělo představovat 7231 mg enrofloxacinu/den0/hejno. První den by tedy měla být spotřeba přibližně 72 ml VLP Roxacin, neboť VLP Roxacin je o koncentraci 100 mg/ml enrofloxacinu, další dny navýšení dle hmotnosti brojlerů.

Dále podáván Kombisol SeE, Kombisol D, Kombisol AD3E a vitamin C, okyselení Bioferm (kyselina mravenčí), AdiSalmo sol (pokud je bakteriologie pozitivní, aby se nepodávala ATM ve druhé části výkrmu).

V rámci farmy jsou dále používána antikokcidika narasin či nikarbazin.

Po vyskladnění, odstranění podestýlky (vyhrabání na hrubo, vymetení, mechanická očista, wap vysokotlaký parní čistič – očista vodou, vyschnutí, dezinfekce, vyschnutí, vyplynování. Střídají biocidy s obsahem kvarterních amoniových solí a jiné biocidy (blíže neurčeno). Úklid farmy a následně technologická odstávka trávající přibližně týden.

Léčba enrofloxacinem byla aplikována u brojlerů kura domácího po dobu 5 dnů, v počátcích výkrmu:

- dubnový zástav – celkový objem VLP Roxacin byl 450 ml, tj. 45 000 mg (tedy 45 g) enrofloxacinu v daném zástavu
- květnový zástav – celkový objem VLP Roxacin byl 480 ml, tj. 48 000 mg (tedy 48 g) enrofloxacinu v daném zástavu

Veterinární léčivý přípravek ROXACIN ve formě koncentrátu pro přípravu perorálního roztoku obsahujícího enrofloxacin byl podáván zvířatům ve formě medikované napájecí vody po dobu 4 dnů, denní dávka byla připravovaná vždy čerstvá, rozmíchaný koncentrovaný roztok (v 8–10 litrech vody) byl následně přimícháván do celkového předpokládaného objemu vody, který brojleři spotřebují, v dávce odpovídající 10 mg enrofloxacinu na kg živé hmotnosti a den.

Podání veterinárního léčivého přípravku obsahujícího enrofloxacin bylo indikováno z důvodu profylaxe (riziko infekcí *E. coli*, *Enterococcus faecium*, případně *S. aureus*).

## **3.2. Terénní práce**

Experimentální část se skládala ze tří úrovní – drůbeží farma, polní pokus, laboratorní práce. Na farmě proběhl odběr vzorků drůbeží podestýlky k modelovému pokusu, podestýlaných papírů a odběr napájecí vody. Pokusné políčko bylo založeno v areálu zkušební stanice ÚKZÚZ Chrlice, na fluvizemi.<sup>2</sup> Po aplikaci drůbeží podestýlky byly z testovacího pozemku odebírány vzorky půdy v pravidelných intervalech.

### **Odběr vzorků napájecí vody**

Při zahájení medikace byl odebrán vzorek napájecí vody (medikované) ze zásobního roztoku. V průběhu 3. dne medikace byl proveden odběr dvou vzorků napájecí vody z haly, první vzorek z napáječky na začátku haly, druhý z výpustního ventilu na konci haly. Shodným způsobem byly odebrány vzorky v průběhu 7. dne od začátku medikace. Vzorky byly napuštěny do sterilní skleněné láhve, na místě se se vzorkem již nemanipulovalo. V chladícím boxu byly vzorky neprodleně převezeny do laboratoře.

### **Odběr vzorků drůbeží podestýlky**

Dne 27. dubna 2021 byla odebrána drůbeží podestýlka přímo z chovné haly v počátku 4. týdne výkrmu. Tato podestýlka byla určena k aplikaci na pokusný pozemek. Dále byl proveden odběr podestýlaných papírů z důvodu zjištění obsahu ENR ve výkalech medikovaných kuřat, a to konkrétně před zahájením medikace (18. května), 3. den medikace (21. května) a 7. den od zahájení medikace (25. května). V posledním uvedeném termínu byl odebrán i vzorek podestýlky, resp. trusu se slámou.

Vzorky podestýlky a podestýlaných papírů byly odebrány rovnoměrně z celé výkrmové haly, uloženy do PE sáčku a neprodleně předány do laboratoře. Zde byly uloženy při -80 °C.

### **Aplikace drůbeží podestýlky na půdu**

Drůbeží podestýlka byla na pokusnou plochu aplikována ručně dne 20. 5. 2021. Aplikační dávka byla vypočtena tak, aby předpokládané množství dusíku činilo 200 kg/ha. Výsledná aplikace činila 0,98 kg drůbeží podestýlky na 1 m<sup>2</sup>.

---

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



Pokusné poličko bylo rozděleno na dvě části – na jednu část byla aplikována podestýlka obohacená o ENR, na druhou byla aplikována podestýlka bez dodatečného obohacení enrofloxacinem. Dávka ENR činila 30 mg ENR na 1 m<sup>2</sup> půdy a byla vypočtená na základě předpokládané produkce hnoje (v jedné hale a jednom turnusu), známé dávky VLP obsahující enrofloxacin a informací o vylučování VLP a ENR z těl brojlerů, s cílem dosáhnout koncentrace ENR v půdě po aplikaci obohacené podestýlky 0,1 mg/kg.

Před samotnou aplikací byla podestýlka v maximální možné míře homogenizována, zprvu ručně, poté v míchači. Po homogenizaci bylo naváženo přesné množství podestýlky a zředěno deionizovanou vodou tak, aby byla umožněna rovnoměrná aplikace na půdu.

### **Půda**

Na základě analýzy vzorku lze konstatovat, že se jedná se o půdu střední zrnitosti, s neutrálním pH a vysokými až velmi vysokými obsahy přístupných živin. Ve vzorku byly stanoveny také obsahy celkového uhlíku a dusíku. Tyto odpovídají rozpětí pro ornou půdu. Poměr C:N je optimální. Obsahy rizikových prvků jsou vyšší, než je mediánová hodnota pro orné půdy vypočtená z údajů na dlouhodobě monitorovaných plochách, nicméně pro fluvizemě jsou vyšší obsahy prvků a látek typické.

**Tabulka 1. Agrochemické vlastnosti půdy**

pH/CaCl <sub>2</sub>	P	K	Mg	Ca	Ntot	Ctot
	Přístupné živiny (mg.kg <sup>-1</sup> )					%
7,1	161	315	336	6106	0,19	1,83

**Tabulka 2. Celkové obsahy rizikových prvků v půdě (lučavka královská, mg.kg<sup>-1</sup> suš.)**

	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
Chrlice	13,6	1,25	0,43	16,1	67,4	30,2	45,5	31,0	52,7	113	0,140
Dlouhodobý monitoring (2013)	9,64	0,94	0,23	11,5	35,9	19,5	23,6	25,1	40,6	70,5	0,070

Půdní vzorky ke stanovení enrofloxacinu a ciprofloxacinu byly odebrány týden po aplikaci drůbeží podestýlky, za dva týdny po aplikaci a dále pravidelně v čtrnáctidenních intervalech. Poslední analyzovaný vzorek je z 9. září 2021. Aby byl pokus co nejbližší podmínkám na poli, byla 27. 5. 2021 na pozemek vyseta svazanka. K odběru vzorků sloužil Edelmanův vrták. Z každé části pokusného pozemku byl odebrán jeden směsný vzorek, který tvořilo 18 individuálních vzorků. Na místě byl proveden prosev na 5mm síť. Takto upravený vzorek byl vložen do PE sáčku a v chladičím boxu transportován na VUT, kde byl zamražen na -80 °C.



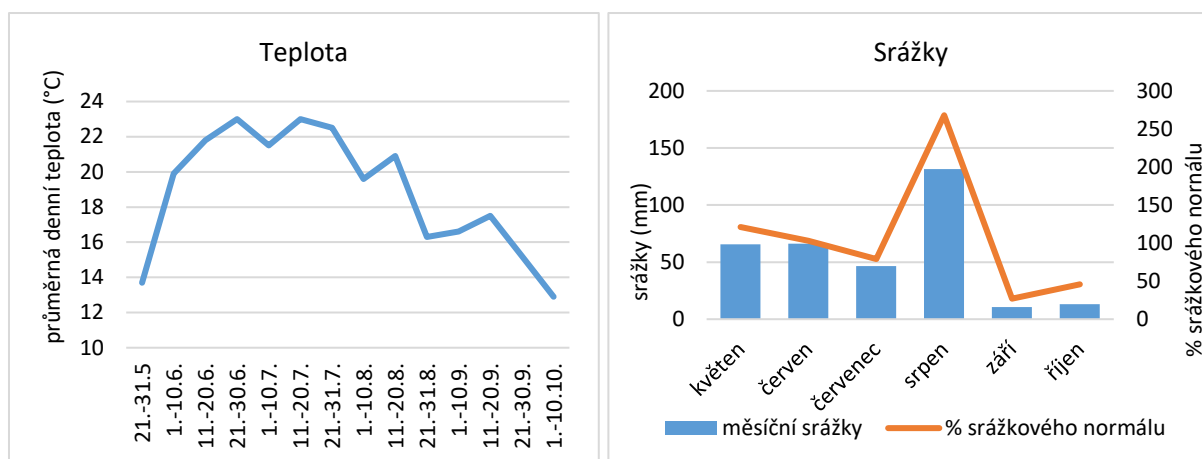
**Obrázek 2.** Porost svazenky na pokusném pozemku v Chrlicích (15. 7. 2021)



**Obrázek 3.** Sada nářadí k odběru půdního vzorku, odebrané vzorky

### **Meteorologické podmínky na pokusném pozemku**

Na ZS Chrlice je umístěna automatická meteostanice. Podle údajů z této stanice činilo rozpětí teplot od zahájení (20. 5. 2021) do ukončení pokusu (7. 10. 2021) 0,1–34,6 °C, přičemž průběh průměrných teplot v jednotlivých týdnech je graficky zachycen na obrázku 4. Srážkové úhrny činily od 12,2 mm v říjnu po 131,5 mm v srpnu.



**Obrázek 4.** Průběh průměrných denních teplot a srážek na zkušebním pozemku

#### Přehled základních termínů na farmě

27. 4. 2021	Vzorek podestýlky určený k aplikaci na pokusný pozemek
18. 5. 2021	NASKLADNĚNÍ KUŘAT Vzorek vody ze zásobníku Vzorek podestýlky (podestlané papíry od právě naskladněných kuřat)
21. 5. 2021	3. DEN MEDIKACE Vzorek medikované vody z rozvodů Vzorek podestýlky (podestlaný papír)
25. 5. 2021	7. DEN OD ZAČÁTKU MEDIKACE Vzorek medikované vody z rozvodů Vzorek podestýlky (podestlaný papír; sláma+trus)

#### Přehled základních termínů na pokusném pozemku

20. 5. 2021	ZALOŽENÍ POLNÍHO POKUSU Aplikace drůbeží podestýlky na pozemek
27. 5. 2021	Výsev svazenky

### 3.3. Analytické metody používané v současné literatuře pro stanovení fluorochinolonů

#### Odběr vzorku

Odebraný pevný vzorek půdy, podestýlky nebo trusu může být zpracován několika způsoby. Vzorek půdy je přesítován dle požadavků daných studií (nejčastěji 0,5–1 mm), vzorek

podestýlky s trusem je rozemlet (je možné až po vysušení). Vzorky jsou skladovány v mrazu při teplotě -20 °C nebo -80°C. Před vlastní analýzou je vzorek vysušen. V tomto případě se používá sušení v laboratoři za laboratorní teploty, sušení v sušárně za mírně zvýšené teploty (max. 50 °C) nebo sušení lyofilizací. Následně je pevný vzorek půdy nebo podestýlky analyzován.

### **Extrakce a úprava vzorku**

Postupy extrakce vzorku se dají v literatuře najít různé. Obecně je možné říci, že záleží na typu pevného vzorku, kdy se liší analýzy vzorků půdy a vzorků podestýlky, hnoje, trusu atd. (Petrović *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2013; Salvia, Fieu and Vulliet, 2015; Qasim *et al.*, 2020). Vzorky půdy vyžadují složitější úpravu a celkově je dosahováno nižší výtěžnosti. Je to způsobeno tím, že půda je velmi komplexní matrice. Spolu s extrahovanými analyty získáme i velké množství koextrahovaných látek. Dále samotnou výtěžnost extrakce sledovaných analytů výrazně ovlivňují vlastnosti půdy, zejména potom obsah organické hmoty, iontově výměnná kapacita půdy, pH atd. Úspěch postupů je závislý i na vlastnostech analyzovaných sloučenin v ekosytému ( $pK_a$ ,  $K_{ow}$ ,  $K_{oc}$ ) (tabulka 4) (Tolls, 2001). Problém může být až už samotná extrakce analytů z půdy nebo vliv matrice a extrakčních činidel při LC/MS/MS analýze, kdy může nastat zvýšení nebo potlačení signálu analytu (matriční efekty). V následujících odstavcích jsou uvedeny nejčastěji používané metody a postupy extrakce nebo úpravy vzorku. Vybrané metody jsou uvedeny v tabulce 3.

Extrakční postupy mohou být rozděleny na dvě skupiny, jednak klasické ekstrakční metody jako extrakce ultrazvukem (USE), extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE), mikrovlnná extrakce (MWE), a potom metoda založená na principu QuEChERS (Dorival-García *et al.*, 2013; Janusch *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2016).

Navážka vzorku půdy pro extrakci je nejčastěji 1–2 g. V některých publikacích je používáno i větší množství vzorku. Pro podestýlku s trusem je to obdobné.

Pro extrakci ultrazvukem je možné použít různá extrakční činidla a jejich směsi. Fluorochinolony patří mezi analyty, které mají velkou sorpční afinitu k půdní matrici. Jejich extrakci můžeme v zásadě ovlivnit složením extrakční směsi, hodnotou pH, přidávkem solí. Pro zvýšení účinnosti se používá ve většině případů  $Na_2EDTA$  (sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové). EDTA je komplexační činidlo a po jejím přidávku ke vzorku půdy dochází k vytvoření komplexů EDTA a kationtů přítomných v půdě. Tímto způsobem zabráníme tvorbě komplexů mezi fluorochinolony a ionty v půdě a extrakční účinnost je vyšší. Používané množství je různé, ale jako optimální se ukazuje přídavek 0,4 g pevné soli.

Vzhledem k vlastnostem enrofloxacinu a ciprofloxacinu (jejich  $pK_a$ ) je možné využít různé hodnoty pH extrakčních směsí. Mezi používané hodnoty pH patří 2,6; 3; 4; 7; 9. Pro jeho úpravu se využívají McIlvainův pufr (kyselina citrónová + hydrogenufosforečnan sodný), fosfátový pufr, mravenčan amonný, kyselina mravenčí, amoniak, kyselina chlorovodíková atd. K roztoku pufru je přidáno také organické rozpouštědlo, vzhledem k charakteru analytu je to především methanol nebo acetonitril v různém množství, případně byla extrakce provedena i za přídavku acetonu nebo dichlormethanu (Speltini *et al.*, 2011; Janusch *et al.*, 2014; Golovko *et al.*, 2016). Obdobné extrakční směsi jsou přidávány i při PLE (kdy se vynechává přídavek solí, ale využívá se zvýšené teploty a tlaku) a MWE (zde je možné přidat sůl, extrakce opět za zvýšené teploty a tlaku).

Metoda QuEChERS byla původně vymyšlena pro extrakci pesticidů z rostlinného materiálu. Protože je to metoda velmi rychlá a jednoduchá, rozšířilo se její využívání i do jiných oblastí analýzy. Její využití lze najít i při analýze léčiv v půdách. Metoda je založena na jednoduché extrakci vzorku do rozpouštědla rychlým promícháním, následně s využitím solí dojde k separaci vodné a organické složky extrakční směsi. Organická složka je po centrifugaci odebrána a podle potřeby jsou k ní přidány sorbenty ve formě disperzní SPE. Používají se nejčastěji stacionární fáze PSA, C18. Po odstředění je vzorek připraven k analýze. Tohoto postupu v různých obměnách bylo využito v početných studiích. Pro vybrané fluorochinolony se obvyklé výtěžnosti pohybují v rozmezí 10–50 % v závislosti na zvolených postupech, vlastnostech vzorku, liší se především ve složení extrakční směsi, typu použitých solí a sorbentů. Vybrané postupy byly využity pro analýzu vzorků půdy a podestýlky a jsou uvedeny v tabulce 12.

V rámci řešení projektu byly analyzovány tři typy vzorků. Napájecí voda pro kuřata, podestýlka, která byla rozdělena na směsný vzorek obsahující papír + sláma + exkrementy a dále byla oddělena jen sláma a exkrementy, posledním typem vzorku byla půda z pokusné plochy v Brně-Chrlicích. Z tohoto důvodu bylo potřeba optimalizovat tři postupy pro analýzu různých typů vzorků. Konečná metoda analýzy na pomoci LC/MS/MS byla shodná pro všechny vzorky. Lišil se však postup úpravy vzorku.

Tabulka 3. Různé metody a postupy extrakce pro analýzu ciprofloxacinu a enrofloxacinu

Typ vzorku	Analyt	Typ extrakce	Podmínky extrakce, přečištění	Literatura
půda	CIP,ENR	USE	0,4 g Na <sub>2</sub> EDTA, 10 ml ACN:fosfátový pufr pH 3,2 (1:1 v/v), vortex 15 minut, extrakce v ultrazvuku 15 min, odstředění 4500 rpm, dvojnásobná extrakce, odpaření a doplnění na 4 ml	(Albero <i>et al.</i> , 2018)
půda	CIP,ENR a další	PLE	1g, citrátovo-fosfátový pufr pH7:ACN, po extrakci přídavek Na <sub>2</sub> EDTA, SPE (HLB, 200 mg)	(da Silva <i>et al.</i> , 2020)
		QuEChERS	QuEChERS - 5 ml citrate-phosphate buffer, pH 2,6; 6 ml ACN, 6,0 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 50 mg PSA, 150 mg C18, 900 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
podestýlka	CIP,ENR	USE	1 g; 8 ml Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (50% v/v) + 4% NH <sub>4</sub> OH, filtrace a měření	(Parente <i>et al.</i> , 2021)
voda, kal	CIP	QuEChERS	700 ul vody, 70 mg octanu sodného, 280 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100 mg Na <sub>2</sub> EDTA, 700 µl ACN; online SPE	(Bourdat-Deschamps <i>et al.</i> , 2014)
půda, kal, hnůj	CIP,ENR a další	USE	2g, fosfátový pufr 20 ml (10,56 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 0,82 ml H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 80 g Na <sub>2</sub> EDTA v 1 l) : 50% Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 2,5% NH <sub>4</sub> OH (96:4); 3:1 (v/v), přidáno ke vzorku a přes noc necháno ve tmě, 30 min třepáno, 15 min v ultrazvuku, odstředit 5000 rpm; extrakce ještě jednou 10 ml; zfiltrováno a zředěno na 500 ml (obsah organiky míň než 5 %); SPE – HLB	(Huang <i>et al.</i> , 2013)
půda	CIP,ENR a další	PLE	5 g půdy; MeOH:ACN:0,2M HCOOH (pH 4,5) (40:40:20); 80°C, 120 bar, 10 min, 2 cykly; SPE- 5 ml MeOH, 5 ml H <sub>2</sub> O, 500 ml extraktu, 5 ml H <sub>2</sub> O, 15 minut sušení, eluce 6 ml MeOH, přidáno 100 ul DMSO, odpaření	(Salvia, Fieu and Vulliet, 2015)
půda	CIP	MAE	1 g, 0,25 g Na <sub>2</sub> EDTA + 10 ml aceton:MeOH:HCOOH 4:4:2 (v/v/v), odtředit, zředěno na 500 ml, SPE – HLB	(Qasim <i>et al.</i> , 2020)
půda	CIP, ENR a další	USE	2 g, 3 ml ACN + 3 ml fosfátového pufru (pH 4) + 0,2 EDTA, vortex 1 min, ultrazvuk 20 min, odstředit 2600 rpm 10 min, opakovaná extrakce 5 + 5 + 4 ml; potom zředěno na 500 ml; SPE – HLB	(Sun <i>et al.</i> , 2017)
půda, vliv typu půdy a surfaktantu	ENR	USE	1 g, 0,2 g Na <sub>2</sub> EDTA, 5 ml fosfátového pufru pH3:ACN (1:1 v/v), vortex 1 min, ultrazvuk 15 min, odstředit 5000 rpm, opakovaná extrakce s množstvím 4, 3, a opět 3 ml pufru; vše zředěno na 200 ml; SPE- kombinace SAX a HLB	(Yu <i>et al.</i> , 2012)

### Použité materiály a chemikálie

Milli-Q voda, voda pro LC/MS, filtrovaná na 0,2 µm, VWR; acetonitril čistoty min. 99,9 % pro HPLC, Chromasolv, Sigma Aldrich; methanol čistoty min. 99,9 % pro HPLC, Chromasolv,



Sigma Aldrich; kyselina mravenčí čistoty min. 98 % , Sigma Aldrich; kyselina octová, PENTA, DSC – 18 SPE; SUPELCO, Sigma Aldrich; PSA SPE; SUPELCO, Sigma Aldrich; sodná sůl kyseliny octové čistoty 99 %, Sigma Aldrich; síran sodný, síran hořečnatý bezvodý čistoty min. 99,5 %, Sigma Aldrich; chlorid sodný čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich; citrát disodný seskvihydrát čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich; citrát trisodný dihydrát čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich; kyselina citronová monohydrát, Lach-Ner; hydrogenfosforečnan disodný čistoty min. 99 % pro HPLC, Fluka; Chelaton III dihydrát čistoty min 99 %, Lach-Ner; dusičnan hořečnatý  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (VWR; amoniak Verkon; enrofloxacin čistoty min. 99 %, CRM; Sigma Aldrich; ciprofloxacin čistoty min. 98 %, CRM; Sigma Aldrich; enrofloxacin-d5 hydrochloride čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich; Ciprofloxacin-d8 hydrochloride hydrate čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich.

### **Použité laboratorní vybavení**

Přístroj pro přípravu Milli-Q vody Milli-Q Millipore, Academic; kapalinový chromatograf UHPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies; kolona (Luna® Omega Polar C18 Phenomenex, 100 x 2.1 mm; 1.6  $\mu$ m); hmotnostní spektrometr Bruker Evoq LC-TQ; Analytické váhy Kern 770; zařízení pro sušení dusíkem Evaterm, Labicom; ultrazvuková lázeň Teson 4; Centrifuga NF 800, Nüve; centrifuga EBA 20, Hettich Zentrifugen; vortex; automatické mikropipety; PP zkumavky 50 ml a 15 ml; stříkačkové nylonové filtry 0,22  $\mu$ m, Chromservis; stříkačky pro filtrování, Braun; SPE vacuum Manifold (Sigma Aldrich); SPE kolony HLB (200 mg, 6 ml), Waters; běžné laboratorní sklo a pomůcky.

### **Vlastnosti analytů**

*Tabulka 4. Vlastnosti ciprofloxacinu a enrofloxacinu (Albero et al., 2018; Cycoń et al., 2019; Tolls, 2001)*

	<b>M<sub>w</sub></b>	<b>pK<sub>a</sub></b>	<b>log K<sub>ow</sub></b>	<b>Rozpustnost ve vodě (g/l)</b>	<b>K<sub>oc</sub> (l/kg)</b>	<b>T<sub>1/2</sub> v půdě</b>	<b>K<sub>d</sub> (l/kg)</b>
<b>enrofloxacin</b>	359,4	6,4;7,8	2,32 (0,7)	>53,9 mg/l	39–770000	>90 dnů	427-4844
<b>ciprofloxacin</b>	331,3	5,9; 8,89	0,28	30	1127– 61000	>90 dnů	0,54-5612



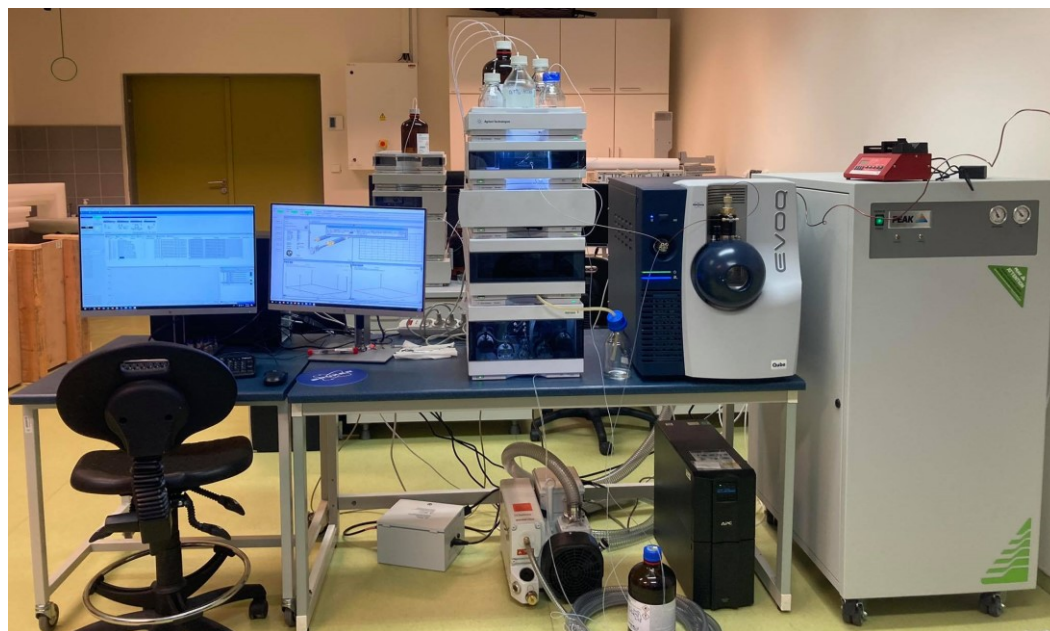
**Obrázek 5.** a) Strukturní vzorec enrofloxacinu, b) strukturní vzorec ciprofloxacinu

### **Přístroj**

Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity (kolona: Luna® Omega Polar C18 Phenomenex, 100 x 2.1 mm; 1.6 µm + předkolona), hmotnostní spektrometr BRUKER EVOQ LC-TQ, generátor dusíku a vzduchu, Peak Scientific – Genius 3045

### **Kalibrace**

Ke kalibraci byly použity roztoky standardů ciprofloxacinu a enrofloxacinu v koncentraci 1 ng/ml až 500 ng/ml. Ke každému roztoku bylo přidáno 10 µl směsi vnitřních standardů v množství 100 ng. Výsledná koncentrace IS byla 100 ng/ml.



**Obrázek 6.** Fotografie přístroje UHPLC/TQ

Tabulka 5. Parametry metody pro kapalinový chromatograf

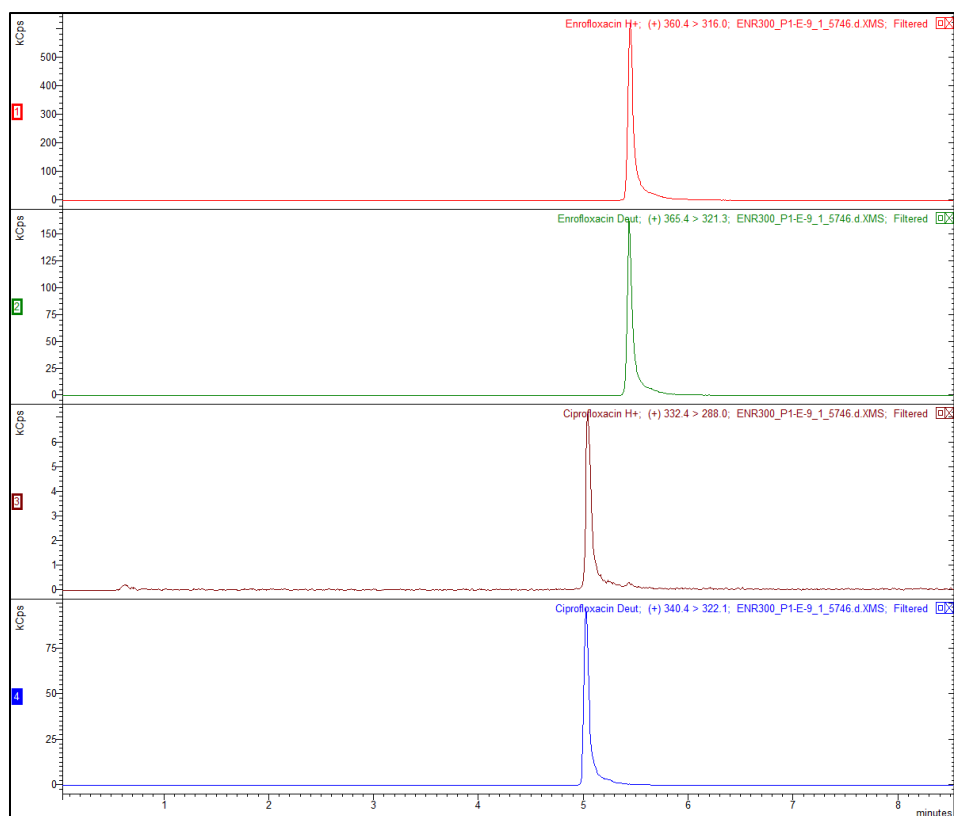
UPLC parametry		
Objem nástřiku	5 $\mu$ l	
Průtok mobilní fáze	0,35 ml·min <sup>-1</sup>	
Teplota	30 °C	
Mobilní fáze	A: 0,1 % HCOOH ve vodě	
	B: Acetonitril	
Gradient mobilní fáze	<b>t [min]</b>	<b>B [%]</b>
	0,0	5
	0,5	5
	8,0	40
	8,5	100
	8,9	20
Oplach jehly	ACN:H <sub>2</sub> O 90:10 s 2 % kyselinou mravenčí 40 s	

Tabulka 6. Parametry metody pro hmotnostní spektrometr

Iontový zdroj	elektrosprej (HESI)
Napětí	4 500 V
Polarita	positive (ESI+)
Průtok pomocného plynu	20
Teplota pomocného plynu	350 °C
Průtok sušícího plynu	50
Teplota sušícího plynu	300 °C
Průtok zmlžovacího plynu	50
Aktivní odtah	ON
Režim skenu	MRM
Tlak kolizního plynu	1,5 mTorr

Tabulka 7. MRM přechody pro ciprofloxacin a enrofloxacin a jejich deuterované standardy (interní standardy, IS)

		RT (min)	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Kolizní energie (eV)
Ciprofloxacin	kvant. přechod	5,0	332,4	288	10
	kval. přechod	5,0	332,4	245	20
Enrofloxacin	kvant. přechod	5,5	360,4	316	10
	kval. přechod	5,5	360,4	245	20
Ciprofloxacin Deut.	kvant. přechod	5,0	340,4	322,1	15
	kval. přechod	5,0	340,4	296,1	15
Enrofloxacin Deut.	kvant. přechod	5,5	365,4	321,3	10
	kval. přechod	5,5	365,4	347,4	10



**Obrázek 7.** Chromatogram standardů ciprofloxacinu, enrofloxacinu, ciprofloxacinu-d5 (IS), enrofloxacinu-d8 (IS)

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Analýza vzorků napájecí vody

U vzorku vody nebylo nutné optimalizovat složitý postup pro úpravu vzorku. Vzhledem k tomu, že se jednalo naředěný vzorek léku Enrogal, byl vzorek napájecí vody pro přímou analýzu příliš koncentrovaný a bylo nutné zvolit vhodné ředění. Dodané vzorky byly měřeny bez ředění nebo byly ředěny 1:50 v mobilní fázi (0,1 %HCOOH:ACN, 10:90 v/v). Každý vzorek byl měřen třikrát. Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulce 8 (průměr).

*Tabulka 8. Koncentrace ciprofloxacinu a enrofloxacinu v napájecí vodě na začátku a konci rozvodu vody*

Datum odběru	Název vzorku	Popis vzorku	CIP (mg/l)	ENR (mg/L)
18.05.2021	18/05/2021-V1	Medikovaná voda ze zásobníku	< LOD	77,32
21.05.2021	21/05/2021-V1-Z	3 dny od začátku medikace, začátek rozvodu vody	0,148	39,18
21.05.2021	21/05/2021-V1-K	3 dny od začátku medikace, konec rozvodu vody	0,195	32,57
25.05.2021	25/05/2021-V1-Z	7. dní od začátku medikace, začátek rozvodu vody	< LOD	< LOD
25.05.2021	25/05/2021-V1-K	7. dní od začátku medikace, konec rozvodu vody	< LOD	<LOD

*Tabulka 9. Limity detekce a kvantifikace metody pro analýzu napájecí vody*

	CIP [µg/l]	ENR [µg/l]
LOD	9,092	4,151
LOQ	30,86	12,81

### 4.2. Analýza vzorků podestýlky

Vzorky podestýlky byly dodány v různé podobě. Základ byl tvořen papírem, na kterém se nacházela směs slámy a trusu. Druhým typem vzorku byla podestýlka, resp. trus se slámou. Vzorky byly uchovány v mrazu při teplotě -80 °C. Před vlastní analýzou musely být vysušeny, nastříhány na menší kousky a následně rozemlety.

Vzorky byly zpracovány dvěma způsoby – vzorek A byl tvořen vždy kompletním dodaným materiálem, tedy buď podestýlaným papírem (v tabulce označeno „papír+sláma), nebo

podestýlkou (v tabulce označeno „trus+sláma“). Vzorek B sestával pouze z trusu, ať už seškrábaného z papíru nebo separovaného z podestýlky (v tabulce označeno „trus“). Z tohoto důvodu se mohou výsledky mezi jednotlivými vzorky lišit, někdy i výrazně.

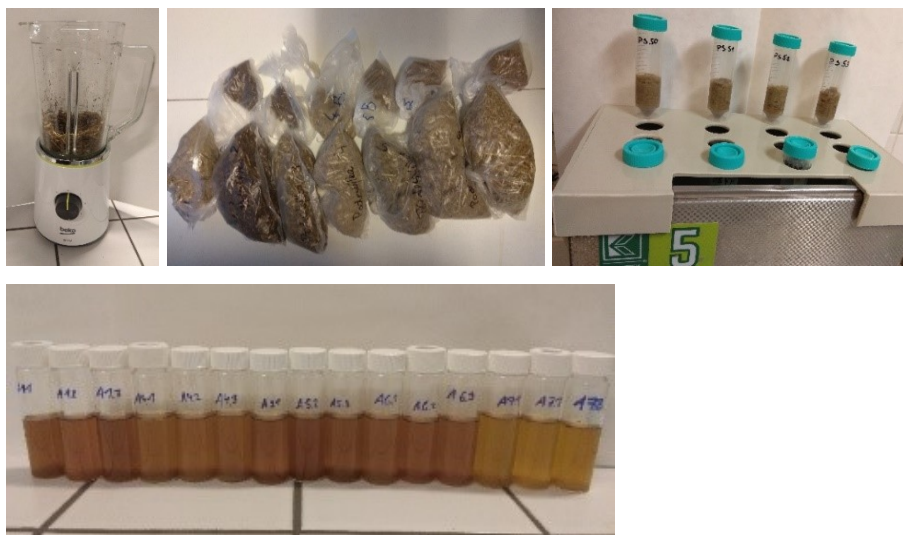
### **Výběr vhodného extrakčního postupu a validace metody**

K extrakci byla vždy použita ultrazvuková lázeň. V počátku práce se vzorkem byly na základě dostupné literatury ověřovány různé možnosti a postupy pro extrakci podestýlky. Byly provedeny extrakce s různými extrakčními činidly – fosfátový pufr, McIlvainův pufr, kyselina mravenčí, methanol a acetonitril v různých poměrech. Bylo ověřováno vhodné pH pro extrakci 2,6; 4; 6, 7, 8. Ke vzorku bylo přidáváno různé množství Na<sub>2</sub>EDTA – 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 1 g. Byl také ověřen vliv vícenásobné extrakce. Ze všech možných kombinací byl vybrán postup, se kterým byla dosažena nejlepší výtěžnost (107 % a 114 % pro enrofloxacin, resp. ciprofloxacin). Výtěžnost byla ověřena na třech koncentracích (2,5, 25 a 50 µg/g podestýlky). Optimalizovaný postup je uveden dále.

### **Optimalizovaný postup pro extrakci podestýlky**

Byl navážen 1 g vzorku podestýlky. Vzorek byl umístěn do 30 ml zkumavky (PP) a byl zalit 20 ml extrakční směsí (7,5 ml pufru pH4 + 7,5 ml ACN + 5 ml Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), bylo přisypáno 0,6 g Na<sub>2</sub>EDTA. Vzorek byl promíchán na vortexu 30 s a extrahován v ultrazvukové lázni 10 minut. Poté byl odstředěn 10 minut při 4100 rpm. Extrakt byl odlit do vialky (sklo, 30 ml). Extrakce byla provedena ještě jednou s menším objemem směsí (10 ml) bez přídavku Na<sub>2</sub>EDTA. Vzorek byl opět promíchán a extrahován v ultrazvukové lázni 10 minut, znovu odstředěn a extrakt byl slit a přidán k předchozímu. Dle koncentrace analytů v roztoku bylo odebráno 100 nebo 350 µl a doplněno na objem 1 ml směsí 0,1% HCOOH:ACN 5:95 (v/v). U málo koncentrovaných roztoků byly odebrány 2 ml extraktu, byly odpařeny do sucha a znovu rozpuštěny v 1 ml směsí. Do všech roztoků byla přidána směs vnitřních standardů deuterovaného ciprofloxacinu a enrofloxacinu v množství 100 ng/10 µl. Vzorek byl proměřen pomocí LC/MS/MS a množství analytů bylo určeno pomocí kalibrace na základě poměru intenzity signálu analytu a příslušného vnitřního standardu. Analýza každého vzorku byla provedena třikrát.





**Obrázek 8.** Postupné zpracování vzorku podestýlky

### Výsledky měření

**Tabulka 10.** Koncentrace ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích podestýlky (mg/kg), extrakce ultrazvukem

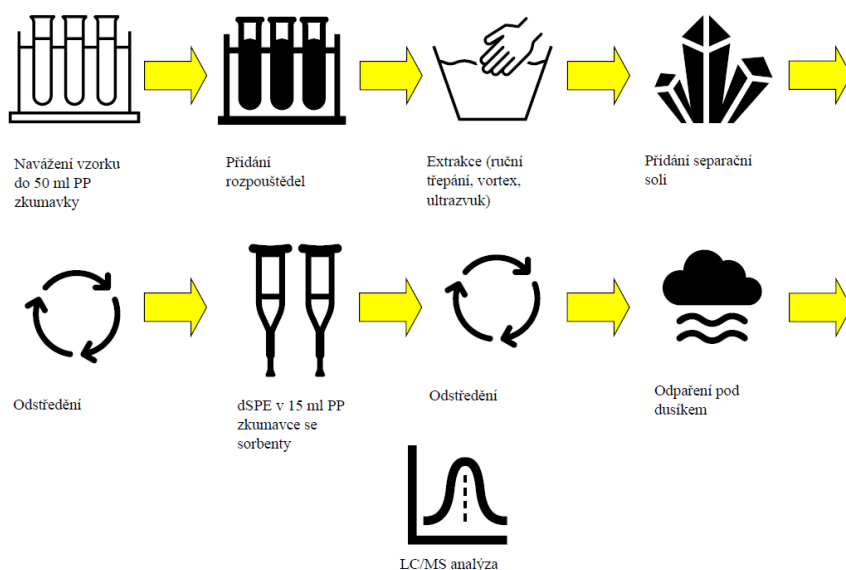
Číslo vzorku	Datum odběru (charakter vzorku)	Poznámka k datu odběru vzorku	CIPR (mg/kg)	ENR (mg/kg)
A1	27/04/2021 (trus+sláma)		0,329	2,071
B1	27/04/2021 (trus)		0,261	1,373
A2	18/05/2021 (papír+sláma)	Naskladnění kuřat	3,401	9,500
B2	18/05/2021(trus)	Naskladnění kuřat	0,792	13,52
A3	21/05/2021 (papír+sláma)	3. den medikace	6,628	38,82
B3	21/05/2021 (trus)	3. den medikace	11,15	37,55
A4	25/05/2021-H2 (papír+sláma)	7 dní od začátku medikace	20,92	56,73
B4	25/05/2021-H2 (trus)	7 dní od začátku medikace	39,11	101,2
A5	25/05/2021-H1 (trus+sláma)	7 dní od začátku medikace	14,00	51,12
B5	25/05/2021-H1 (trus)	7 dní od začátku medikace	26,17	68,08

**Tabulka 11.** Limity detekce a kvantifikace pro ciprofloxacin a enrofloxacin v podestýlce

	CIP (mg/kg)	ENR (mg/kg)
<b>LOD</b>	9,420	4,385
<b>LOQ</b>	28,21	13,48

### Výsledky měření extrakce podestýlky metodou QuEChERS

Jako alternativou klasických postupů extrakce s následným přečištěním a zakoncentrováním pomocí SPE je extrakce typu QuEChERS.



**Obrázek 9.** Schéma QuEChERS extrakce

V rámci optimalizace metody byly zkoušeny různé vybrané postupy, které jsou dostupné ze současných publikací. Tři z těchto metod jsou uvedeny v tabulce 12. Nejvyšší výtěžnost byla dosažena pro postup 2 (obdobně to platilo i u vzorků půdy), který byl v původním článku použit pro extrakci vzorků kejdy. Tato výtěžnost extrakce bylo pro ciprofloxacin 46 % a enrofloxacin 55 %. Podle předchozích výsledků extrakce podestýlky pomocí ultrazvuku bylo u jednotlivých vzorků využito rozdílného ředění u získaných přečištěného extraktů. Protože 1 g podestýlky představuje větší objem než 1 g půdy, byl ke vzorkům přidáván v některých případech rozdílný objem směsí než u vzorků půdy. Přesný postup je uveden dále.

Tabulka 12. Vybrané postupy QuEChERS pro extrakci vzorků půdy a podestýlky

Postup	Typ vzorku	Detailní popis extrakce	Literatura
1	půda	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 1 g půdy do 50 ml PP zkumavky</li> <li>· přidáno 5 ml rozpouštědla 1, vortex 30 s</li> <li>· přidáno 6 ml rozpouštědla 2, ruční třepání 5 min</li> <li>· přidána separační sůl, vortex 30 s, odstředěno</li> <li>· odebrány 4 ml organické fáze pro disperzní SPE (dSPE)</li> <li>· dSPE: do 15 ml PP zkumavky naváženo 50 mg PSA, 150 mg C18 a 900 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>· 4 ml organické fáze přidány do 15 ml PP zkumavky se sorbenty, vortex 30 s, odstředěno</li> <li>· 3 ml supernatantu převedeny do skleněné 10 ml vialky, odpařeno pod dusíkem téměř do sucha</li> <li>· přidán 1 ml rozpouštědla (0,1 % HCOOH:ACN, 95:5 ), přidáno 10 µl roztoku IS</li> <li>· přefiltrováno přes stříkačkový filtr do 2 ml skleněné vialky</li> </ul>	da Silva <i>et al.</i> , 2020
2	kejda	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 1 g půdy do 50 ml PP zkumavky</li> <li>· přidáno 10 ml Mcllvainova pufru o pH 4</li> <li>· přidáno 0,4 g EDTA, protřepáno kvůli rozpuštění EDTA</li> <li>· přidáno 7,5 ml acetonitrilu a 2,5 ml methanolu, vortex 1 min, ultrazvuk 15 min</li> <li>· přidána separační sůl: 1 g NaCl + 4 g MgSO<sub>4</sub>, ruční třepání 2 min</li> <li>· odebráno 8 ml organické fáze pro disperzní SPE (dSPE), odstředěno</li> <li>· dSPE: do 15 ml PP zkumavky naváženo 320 mg PSA, 160 mg C18 a 1,8 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>· 8 ml organické fáze přidáno do 15 ml PP zkumavky se sorbenty, vortex 1 min, odstředěno</li> <li>· 6 ml supernatantu převedeno do skleněné 10 ml vialky, odpařeno pod dusíkem téměř do sucha</li> <li>· přidán 1 ml rozpouštědla (0,1 % HCOOH:ACN, 95:5 ), přidáno 10 µl roztoku IS</li> <li>· přefiltrováno přes stříkačkový filtr do 2 ml skleněné vialky</li> </ul>	Guo <i>et al.</i> , 2016
3	voda	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 1 g půdy do 50 ml PP zkumavky</li> <li>· bylo přidáno 10 ml vody pro HPLC</li> <li>· bylo přidáno 0,37 g EDTA, protřepáno 1 min</li> <li>· bylo přidáno 8 ml acetonitrilu a 2 ml methanolu, vortex 1 min</li> <li>· byla přidána separační sůl: 1 g NaCl + 4 g MgSO<sub>4</sub> + 1 g citronanu trisodného (dihydrát) + 0,5 g citronanu disodného (seskvihydrát), ruční třepání 5 min, vortex 2 min</li> <li>· odebráno 8 ml organické fáze pro disperzní SPE (dSPE), odstředěno</li> <li>· dSPE: do 15 ml PP zkumavky naváženo 150 mg PSA a 450 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>· 8 ml organické fáze přidáno do 15 ml PP zkumavky se sorbenty, vortex 1 min, odstředěno</li> <li>· 6 ml supernatantu převedeno do skleněné 10 ml vialky, odpařeno pod dusíkem téměř do sucha</li> <li>· přidán 1 ml rozpouštědla (0,1 % HCOOH:ACN, 95:5 ), přidáno 10 µl roztoku IS</li> <li>· přefiltrováno přes stříkačkový filtr do 2 ml skleněné vialky</li> </ul>	Ajibola <i>et al.</i> , 2021

U vzorků s označením A byl navážen 1 g podestýlky do 50 ml PP zkumavky. Bylo přidáno 20 ml Mcllvainova pufru o pH 4, dále 0,454 g Na<sub>2</sub>EDTA a vzorek byl protřepán. Poté se do zkumavky nalilo 15 ml acetonitrilu a 5 ml methanolu, vortex 1 min a ultrazvuk 15 min. Byla přidána separační sůl – 1 g NaCl + 4 g MgSO<sub>4</sub>, a vzorek byl 2 min protřepáván. Bylo odebráno a smícháno (v 15 ml PP zkumavce) 8 ml organické fáze a směs pro přečištění pomocí disperzní SPE (dSPE) – 320 mg PSA, 160 mg C18 a 1,8 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Vzorek byl odstředěn 5 min, 4100 rpm. V závislosti na koncentraci byl celý objem vzorku vysušen a rozpuštěn v mobilní fázi nebo bylo odebráno jen 0,1 ml a vzorek byl doplněn mobilní fází na objem 1 ml.

U vzorků s označením B byl postup jen mírně modifikován, a to tak, že objem pufru a rozpouštědel byl poloviční. Na závěr bylo opět dle závislosti na koncentraci zvoleno různé

ředění do mobilní fáze. Přechištěný extrakt byl celý vysušen a rozpuštěn v mobilní fáze nebo bylo odebráno jen 0,1 nebo 0,35 ml a vzorek byl doplněn mobilní fází na objem 1 ml.

Všechny vzorky byly přefiltrovány přes nylonový filtr 0,22 µm a byl do nich přidán vnitřní standard.

Získané výtěžnosti na obohacených vzorcích na koncentrační hladinu 2,5 a 25 mg/kg byly pro ciprofloxacin 44–48 % a obdobně pro enrofloxacin 45–50%.

**Tabulka 13.** *Výsledky měření vzorků podestýlky při použití QuEChERS extrakce*

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Datum odběru (charakter vzorku)</b>	<b>Poznámka k datu odběru vzorku</b>	<b>CIPR (mg/kg)</b>	<b>ENR (mg/kg)</b>
<i>A1</i>	27/04/2021 (trus+sláma)		0,172	0,113
<i>B1</i>	27/04/2021 (trus)		0,133	1,060
<i>A2</i>	18/05/2021 (papír+sláma)	Naskladnění kuřat	3,404	9,504
<i>B2</i>	18/05/2021 (trus)	Naskladnění kuřat	0,791	13,52
<i>A3</i>	21/05/2021 (papír+sláma)	3. den medikace	3,480	7,092
<i>B3</i>	21/05/2021 (trus)	3. den medikace	5,643	21,86
<i>A4</i>	25/05/2021 (papír+sláma)	7 dní od začátku medikace	10,68	25,22
<i>B4</i>	25/05/2021 (trus)	7 dní od začátku medikace	22,05	36,20
<i>A5</i>	25/05/2021 (trus+sláma)	7 dní od začátku medikace	7,620	54,56
<i>B5</i>	25/05/2021 (trus)	7 dní od začátku medikace	14,99	31,42

Pro obě metody extrakce byly získány obdobné výsledky. Koncentrace enrofloxacinu v podestýlce byla v desítkách mg/kg, koncentrace ciprofloxacinu byly výrazně nižší. Vzorky typu B představují především hodnoty koncentrací pro trus, který byl z podestýlky (papíru a slámy) seškrabán. Takto získaná hmota obsahovala přes 90 % trusu, zbytky mohly být kousky papíru nebo sláma, které nebylo možné oddělit. Vzorky typu A jsou vzorky celé podestýlky tak, jak byly odebrány na farmě. Mezi jednotlivými hodnotami mohou být rozdíly, poněvadž vzorky byly velkého objemu a značně heterogenní. Nebylo možné získat zcela reprezentativní homogenní vzorek. Přesto je možné konstatovat, že koncentrace obou analytů se nacházela v podestýlce v hodnotách jednotek nebo desítek mg/kg v závislosti na typu vzorku. V závislosti na těchto výsledcích bylo možné očekávat výskyt ciprofloxacinu i enrofloxacinu ve vzorcích půdy.

### 4.3. Výsledky měření analýzy vzorků půdy

Tabulka 14. Seznam analyzovaných vzorků půdy

Číslo vzorku	Čas po aplikaci (dny)	Datum odběru	Jméno vzorku	Popis vzorku
1	0	20.05.2021	20/05/2021-P	půda před založením pokusu
2	0	20.05.2021	20/05/2021-PAO	O = po aplikaci, přirozená podestýlka
3	0	20.05.2021	20/05/2021-PAE	E = po aplikaci, spikováno roztokem ENR
4	7	27.05.2021	27/05/2021-PAO	týden po aplikaci
5	7	27.05.2021	27/05/2021-PAE	týden po aplikaci
6	14	03.06.2021	03/06/2021-PAO	2 týdny po aplikaci
7	14	03.06.2021	03/06/2021-PAE	2 týdny po aplikaci
8	28	17.06.2021	17/06/2021-PAO	4 týdny po aplikaci
9	28	17.06.2021	17/06/2021-PAE	4 týdny po aplikaci
10	42	01.07.2021	1/07/2021-PAO	6 týdnů po aplikaci
11	42	01.07.2021	1/07/2021-PAE	6 týdnů po aplikaci
12	56	15.07.2021	15/07/2021-PAO	8 týdnů po aplikaci
13	56	15.07.2021	15/07/2021-PAE	8 týdnů po aplikaci
14	70	29.07.2021	29/07/2021-PAO	10 týdnů po aplikaci
15	70	29.07.2021	29/07/2021-PAE	10 týdnů po aplikaci
16	84	12.08.2021	12/08/2021-PAO	12 týdnů po aplikaci
17	84	12.08.2021	12/08/2021-PAE	12 týdnů po aplikaci
18	101	26.08.2021	26/08/2021-PAO	14 týdnů po aplikaci
19	101	26.08.2021	26/08/2021-PAE	14 týdnů po aplikaci
20	115	09.09.2021	09/09/2021-PAO	16 týdnů po aplikaci
21	115	09.09.2021	09/09/2021-PAE	16 týdnů po aplikaci

#### Extrakce QuEChERS

Alternativou klasických postupů extrakce s následným přečištěním a zakoncentrováním pomocí SPE je extrakce typu QuEChERS. V rámci optimalizace metody byly zkoušeny různé vybrané postupy dostupné z literatury. Tři z těchto metod jsou uvedeny v tabulce 12. Nejvyšší výtěžnost byla dosažena pro postup 2, který byl v původním článku použit pro extrakci vzorků kejdý, a to pro ciprofloxacin 46 % a enrofloxacin 55 %. U ostatních metod výtěžnosti nedosahovaly ani 20 %. Postup 2 byl také zvolen pro extrakci všech vzorků půdy. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 15.

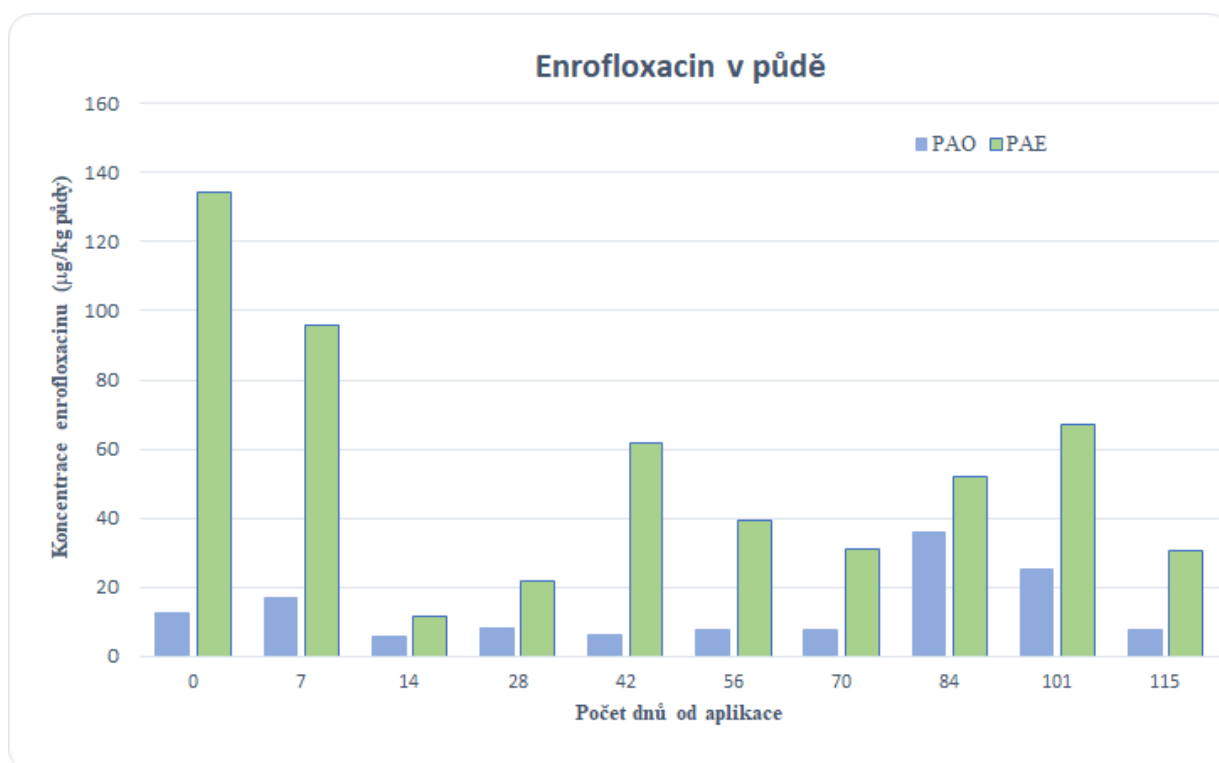
Pro vzorky půdy byla také ověřována možnost extrakce půdy pomocí ultrazvuku, s následným naředěním extraktu na 0,5 l a využití SPE (HLB, 200 mg) pro přečištění a zakoncentrování analytů. Oproti postupu QuEChERS byla tato metoda časově náročnější a nebylo s ní dosaženo potřebných parametrů.

**Tabulka 15.** Koncentrace ciprofloxacinu a enrofloxacinu ( $\mu\text{g/kg}$ ) ve vzorcích půdy po extrakci QuEChERS

Číslo	Jméno vzorku	ENR ( $\mu\text{g/kg}$ půdy)	CIP ( $\mu\text{g/kg}$ půdy)
1	20/05/2021-P	< LOD	< LOD
2	20/05/2021-PAO	< LOQ (12,41)	< LOD
3	20/05/2021-PAE	134,6	< LOD
4	27/05/2021-PAO	16,80	< LOD
5	27/05/2021-PAE	95,07	< LOD
6	03/06/2021-PAO	< LOQ (5,570)	< LOD
7	03/06/2021-PAE	< LOQ (11,31)	< LOD
8	17/06/2021-PAO	< LOQ (8,113)	< LOD
9	17/06/2021-PAE	21,93	< LOD
10	1/07/2021-PAO	< LOQ (6,112)	< LOD
11	1/07/2021-PAE	61,67	< LOD
12	15/07/2021-PAO	< LOQ (7,491)	< LOD
13	15/07/2021-PAE	39,22	< LOQ (9,112)
14	29/07/2021-PAO	< LOQ (7,501)	n.d.
15	29/07/2021-PAE	30,90	< LOQ (22,90)
16	12/08/2021-PAO	35,84	< LOD
17	12/08/2021-PAE	51,81	< LOD
18	26/08/2021-PAO	25,26	< LOD
19	26/08/2021-PAE	67,29	< LOQ (14,18)
20	09/09/2021-PAO	< LOQ (7,400)	< LOD
21	09/09/2021-PAE	30,50	< LOD

**Tabulka 16.** Limity detekce pro stanovení ENR a CIP v půdě metodou QuEChERS

	ENR ( $\mu\text{g/kg}$ )	CIP ( $\mu\text{g/kg}$ )
<b>LOD</b>	4,451	9,050
<b>LOQ</b>	13,48	27,38



**Obrázek 10.** Koncentrace enrofloxacinu ve vzorcích půdy, srovnání vzorků s aplikací přirozené podestýlky (PAO) a podestýlky s přísadkou enrofloxacinu (PAE), v grafu jsou uvedeny i hodnoty pod limitem kvantifikace

V analyzovaných vzorcích metodou QuEChERS byl stanoven pouze enrofloxacin. Ciprofloxacin se téměř ve všech případech pohyboval pod limitem detekce metody nebo nebyl detekován vůbec. Kolísání hodnot v čase je pravděpodobně způsobeno aplikací podestýlky v reálném prostředí pokusné plochy. Ze zjištěných koncentrací je pozorovatelné, že v půdě byl enrofloxacin zjištěn i po třech měsících po aplikaci. Je to jak v případě vzorku PAO – vzorek reálné podestýlky, tak PAE – vzorek podestýlky obohacený o přísadku enrofloxacinu. Ze stanovených koncentrací lze pozorovat počáteční pokles koncentrace enrofloxacinu (vzorky řady PAE). V dalších týdnech zůstaly již přibližně stejné. Toto zjištění je ve shodě s publikací Albero *et al*, 2018, kde bylo pozorováno, že po počátečním poklesu asi o 20 % zůstala koncentrace enrofloxacinu i ciprofloxacinu přibližně stejná po dobu větší než 90 dnů a poločas rozpadu v půdě byl stanoven jako větší než 90 dnů.

## 5. ZÁVĚRY

V rámci řešeného funkčního úkolu byly naplněny všechny cíle, jak **optimalizace metodiky**, tak **stanovení reziduí enrofloxacinu v požadovaných maticích** (medikovaná voda, podestýlka ošetřených brojlerů, půda se zapravenou podestýlkou od ošetřených zvířat i půda se zapravenou podestýlkou obohacenou o enrofloxacin), tak formou přílohy analýza výskytu kfluorochinolonům rezistentních kmenů enterobakterií s výhledem na pokračování projektu v roce 2022, který bude posledním rokem Akčního plánu NAP pro funkční období 2019–2022.

Byla optimalizována metodika ke stanovení reziduí enrofloxacinu a jeho metabolitu ciprofloxacinu v napájecí vodě, podestýlce z chovu enrofloxacinem ošetřených brojlerů a půdě po aplikaci podestýlky z chovu ošetřených brojlerů a podestýlky obohacené o enrofloxacin.

Ve všech maticích byla pomocí LC/MS/MS prokázána přítomnost enrofloxacinu. Ciprofloxacin byl nad limity detekce pouze ve vzorcích medikované vody a podestýlky ošetřených brojlerů. Koncentrace obou analytů v jednotlivých maticích klesala vždy přibližně o tři řády, a to v pořadí:

**medikovaná voda** z napájecího zařízení – **podestýlka z chovu** enrofloxacinem ošetřených brojlerů – **půda se zapravením podestýlky** z chovu ošetřených brojlerů.

V průběhu modelového pokusu byly po dobu 16 týdnů odebrány vzorky půdy. Během této doby byl enrofloxacin přítomen v koncentracích až 67 ppb v případě půdy po aplikaci podestýlky obohacené enrofloxacinem a až 35 ppb ve vzorku půdy po aplikaci podestýlky z chovu ošetřených brojlerů. Po počátečním poklesu koncentrace se hodnota již významně neměnila. Bylo tedy prokázáno, že jeho perzistence v půdním ekosystému je významná, a může tak být spojen s přetrvávajícím tlakem na výskyt genů rezistence. Je však nutné brát v úvahu, že v rámci experimentu byla uvažována nejhorší varianta možného vstupu enrofloxacinu do životního prostředí přes drůbeží podestýlku ošetřených zvířat, protože byla použita podestýlka čerstvá, bez jakékoliv fermentace, během které může dojít k přirozenému snížení obsahu antibiotik v matici.

Byla zpracována analýza výskytu rezistentních kmenů *Enterobacteriaceae* k fluorochinolonům z dostupných recentních dat a studií ze zahraničí i z České republiky, v chovech drůbeže, případně i půdě a vodě a byly identifikovány mezery v poznání, které by bylo vhodné doplnit



a to za podmínek reflektujících situaci v ČR (jak chovy drůbeže, typy používaných podestýlek, jejich skladování, způsob zapravení do půdy, typ půdy, klimatické podmínky apod.). Proto bylo navrženo i schéma další fáze pilotní studie, kterou by bylo vhodné zrealizovat v rámci posledního roku funkčního období stávajícího Akčního plánu NAP v roce 2022. Byly nastíněny i možnosti další studie v odpadních vodách propojující v rámci zohlednění konceptu “Jedno zdraví” oblast zdravotnictví, zemědělství a životního prostředí.

## **Čerpání finančních prostředků k funkčnímu úkolu „AMR v půdě a případně dalších částech životního prostředí“ za rok 2021**

Analýza reziduí enrofloxacinu a ciprofloxacinu v různých maticích:

- optimalizace LC/MS/MS metody
- analýza reálných vzorků napájecí vody, podestýlky a půdy po aplikaci podestýlky (FCH VUT) 229 900 Kč

---

Analýza posledních dostupných dat o spotřebách enrofloxacinu v ČR

Rešerše recentně publikovaných dat k

- možnému vlivu enrofloxacinu na bakterie,
- rezistenci k fluorochinolonům (zejména ENR/CIP) a
- ko-selekcii rezistence k dalším antimikrobikům, 49 000 Kč
- plasmidově přenosné rezistenci (PMQR),

f) perzistenci ENR/CIP v životním prostředí a jejich dalšímu potenciálu ovlivňovat ekosystémy a jejich mikrobiotu) (ÚSKVBL)

---

Rešerše na téma výskyt rezistentních kmenů čeledi Enterobacteriaceae k fluorochinolonům v ČR a ve světě v chovu drůbeže a v prostředí (půda, voda)

20 000 Kč

Návrh modelového pokusu na rok 2022 (MU)

---

Nákup ostatního materiálu

- DDHM do 3 000 Kč
- ochranné pomůcky
- náhradní díly a příslušenství 21 100 Kč
- tonery
- ostatní materiál jinde nezařazený

---

**Celkem**

**320 000 Kč**

---

Relevantní daňové doklady jsou k dispozici v účetnictví ÚKZÚZ.

## 6. REFERENCE

Ajibola, A. S. *et al.* (2021) ‘QuEChERS Approach for the Analysis of Three Fluoroquinolone Antibiotics in Wastewater: Concentration Profiles and Ecological Risk in Two Nigerian Hospital Wastewater Treatment Plants’, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(2), pp. 389–401. doi: 10.1007/s00244-020-00789-w.

Albero, B. *et al.* (2018) ‘Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems’, *Science of the Total Environment*, 643, pp. 1562–1570. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.314.

Dorival-García, N. *et al.* (2013) ‘Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Comparison of the efficiency of three extraction techniques’, *Talanta*, 106, pp. 104–118. doi: 10.1016/j.talanta.2012.11.080.

Golovko, O. *et al.* (2016) ‘Development of fast and robust multiresidual LC-MS/MS method for determination of pharmaceuticals in soils’, *Environmental Science and Pollution Research*, 23(14), pp. 14068–14077. doi: 10.1007/s11356-016-6487-6.

Guo, C. *et al.* (2016) ‘Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry’, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1027, pp. 110–118. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.05.034.

Huang, Y. *et al.* (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), pp. 3721–3731. doi: 10.1039/c3ay40220g.

Janusch, F. *et al.* (2014) ‘Determination of fluoroquinolones in chicken feces - A new liquid-liquid extraction method combined with LC-MS/MS’, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(3), pp. 792–799. doi: 10.1016/j.etap.2014.09.011.

Leal, R. M. P. *et al.* (2013) ‘Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils’, *Chemosphere*, 92(8), pp. 979–985. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.03.018.

Parente, C. E. *et al.* (2021) ‘Fluoroquinolone-contaminated poultry litter strongly affects earthworms as verified through lethal and sub-lethal evaluations’, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207(September 2020). doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111305.

Petrović, M. *et al.* (2005) ‘Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A review’, *Journal of Chromatography A*, 1067(1–2), pp. 1–14. doi: 10.1016/j.chroma.2004.10.110.

Qasim, B. *et al.* (2020) ‘Quantitative determination of fluoroquinolones in contaminated soils by HPLC with solid-phase extraction’, *Baghdad Science Journal*, 17(1), pp. 48–566. doi: 10.21123/bsj.2020.17.1.0048.

Salvia, M. V., Fieu, M. and Vulliet, E. (2015) ‘Determination of tetracycline and fluoroquinolone antibiotics at trace levels in sludge and soil’, *Applied and Environmental Soil Science*, 2015. doi: 10.1155/2015/435741.

da Silva, J. J. *et al.* (2020) ‘Pressurized Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS evaluation for the analysis of antibiotics in agricultural soils’, *MethodsX*, 7. doi: 10.1016/j.mex.2020.101171.

Speltini, A. *et al.* (2011) ‘Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices’, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(8), pp. 1337–1350. doi: 10.1016/j.trac.2011.04.011.

Sun, J. *et al.* (2017) ‘Antibiotics in the agricultural soils from the Yangtze River Delta, China’, *Chemosphere*, 189, pp. 301–308. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.040.

Tolls, J. (2001) ‘Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review’, *Environmental Science and Technology*, 35(17), pp. 3397–3406. doi: 10.1021/es0003021.

;

Yu, Z. *et al.* (2012) ‘Leaching behavior of enrofloxacin in three different soils and the

influence of a surfactant on its mobility’, *Journal of Environmental Sciences*, 24(3), pp. 435–439. doi: 10.1016/S1001-0742(11)60771-7.

Ajibola, A. S. *et al.* (2021) ‘QuEChERS Approach for the Analysis of Three Fluoroquinolone Antibiotics in Wastewater: Concentration Profiles and Ecological Risk in Two Nigerian Hospital Wastewater Treatment Plants’, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(2), pp. 389–401. doi: 10.1007/s00244-020-00789-w.

Albero, B. *et al.* (2018) ‘Persistence and availability of veterinary antibiotics in soil and soil-manure systems’, *Science of the Total Environment*, 643, pp. 1562–1570. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.314.

AMEG (2020) Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group: Categorisation of antibiotics in the European Union Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals; EMA/CVMP/CHMP/682198/2017; European Medicines Agency, 2020. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf) Navštíveno 14.11. 2021

Bourdat-Deschamps, M. *et al.* (2014) ‘Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction’, *Journal of Chromatography A*, 1349, pp. 11–23. doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.006.

Cycoń, M. *et al.* (2019) ‘Antibiotics in the Soil Environment – Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity’, *Frontier in Microbiology*, 10:338, doi: 10.3389/fmicb.2019.00338

Golovko, O. *et al.* (2016) ‘Development of fast and robust multiresidual LC-MS/MS method for determination of pharmaceuticals in soils’, *Environmental Science and Pollution Research*, 23(14), pp. 14068–14077. doi: 10.1007/s11356-016-6487-6.

Guo, C. *et al.* (2016) 'Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1027, pp. 110–118. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.05.034.

Huang, Y. *et al.* (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), pp. 3721–3731. doi: 10.1039/c3ay40220g.

Janusch, F. *et al.* (2014) 'Determination of fluoroquinolones in chicken feces - A new liquid-liquid extraction method combined with LC-MS/MS', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(3), pp. 792–799. doi: 10.1016/j.etap.2014.09.011.

Parente, C. E. *et al.* (2021) 'Fluoroquinolone-contaminated poultry litter strongly affects earthworms as verified through lethal and sub-lethal evaluations', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207(September 2020). doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111305.

Petrović, M. *et al.* (2005) 'Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A review', *Journal of Chromatography A*, 1067(1–2), pp. 1–14. doi: 10.1016/j.chroma.2004.10.110.

Qasim, B. *et al.* (2020) 'Quantitative determination of fluoroquinolones in contaminated soils by HPLC with solid-phase extraction', *Baghdad Science Journal*, 17(1), pp. 48–566. doi: 10.21123/bsj.2020.17.1.0048.

OIE (2021) World Organisation for Animal Health. OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance (June 2021), <https://www.oie.int/app/uploads/2021/06/a-oie-list-antimicrobials-june2021.pdf>, Navštíveno 14.11. 2021

Salvia, M. V., Fieu, M. and Vulliet, E. (2015) 'Determination of tetracycline and fluoroquinolone antibiotics at trace levels in sludge and soil', *Applied and Environmental Soil Science*, 2015. doi: 10.1155/2015/435741.

da Silva, J. J. *et al.* (2020) 'Pressurized Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS evaluation for the analysis of antibiotics in agricultural soils', *MethodsX*, 7. doi: 10.1016/j.mex.2020.101171.

Sun, J. *et al.* (2017) 'Antibiotics in the agricultural soils from the Yangtze River Delta, China', *Chemosphere*, 189, pp. 301–308. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.040.

Speltini, A. *et al.* (2011) 'Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(8), pp. 1337–1350. doi: 10.1016/j.trac.2011.04.011.

Tolls, J. (2001) 'Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review', *Environmental Science and Technology*, 35(17), pp. 3397–3406. doi: 10.1021/es0003021.

WHO (2019) World Health Organization. WHO list of critically important antimicrobials for human medicine (WHO CIA list). World Health Organization.

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/325036>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, Navštíveno 14. 11. 2021

Yu, Z. *et al.* (2012) 'Leaching behavior of enrofloxacin in three different soils and the influence of a surfactant on its mobility', *Journal of Environmental Sciences*, 24(3), pp. 435–439. doi: 10.1016/S1001-0742(11)60771-7.

## **7. PŘÍLOHA**



**Výskyt rezistentních kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* k fluorochinolonům v ČR a ve světě v chovech drůbeže, v prostředí (půda a voda) a návrh modelového pokusu na rok 2022 se zaměřením na schopnost přežívání kmene *Escherichia coli* (s PMQR typem rezistence) v podestýlce drůbeže, a půdě**



**Autoři:**

Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D. a Mgr. Tereza Gelbíčová, Ph.D.

Spoluautor: Mgr. Lucie Pokludová Dr.

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: [info@med.muni.cz](mailto:info@med.muni.cz), [www.med.muni.cz](http://www.med.muni.cz)  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

MUNI  
MED

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: [info@med.muni.cz](mailto:info@med.muni.cz), [www.med.muni.cz](http://www.med.muni.cz)  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

## Úvod

V rámci Akčního plánu Národního antibiotického programu pro funkční období 2019–2022 bylo jako jedno z realizačních opatření odsouhlaseno uskutečnění sady pilotních projektů zaměřených na sledování zbytků antimikrobik a AMR v půdě a případně dalších částech životního prostředí. Jako první část pilotní fáze byla, v souladu s realizačním plánem a kompetencemi spadajícími pod Ministerstvo zemědělství a jemu podřízené instituce (ÚKZUZ a ÚSKVBL) byla vyhotovena primární analýza (FÚ 2019), v jejíž závěrečné odborné rozvaze pro fluorochinolony bylo jedním z parciálních cílů sledování výskytu rezistence (např. prostřednictvím analýz výskytu genů rezistence k (fluoro)chinolonům *par*, *gyr*, *qep*, *oqx*, *aac(6')Ib*) či dalších dle aktuálního stavu poznání a odborné rozvahy a zaměřit se především na detekci transferabilní rezistence přenášené pomocí plazmidů (PMQR). Níže uvedená vstupní analýza je součástí Cíle C této předmětné zprávy Funkčního úkolu zpracovávaného v roce 2021, tak aby mohlo být navázáno v případě dostupnosti finančních i personálních zdrojů praktickým ověřením dat v podmínkách ČR a to především ve vztahu k výskytu rezistencí, jak bylo nastíněno v rámci odborné rozvahy z roku 2019.

### **Výskyt rezistentních kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* k fluorochinolonům v ČR a ve světě v chovech drůbeže a v prostředí (půda a voda)**

Fluorochinolony patří mezi antimikrobika, která mají široké spektrum účinků působících na řadu gram pozitivních i gram negativních bakterií. Vyznačují se velmi dobrou biologickou dostupností a dlouhým biologickým poločasem a jsou dostupné v řadě lékových forem. Pro tyto vlastnosti patří fluorochinolony k oblíbeným přípravkům, podávaným k léčbě infekcí způsobených gram negativními i gram pozitivními bakteriemi nejen u lidí, ale i zvířat.

Jako modelové mikroorganismy byly zvoleny enterobakterie, konkrétně *E.coli*. Kmeny *E.coli* lze detekovat jak ze vzorků pocházejících od lidí, zvířat, ale i z prostředí. *E.coli* na základě jejich genetických charakteristik dělíme na patogenní (s charakterem zoonotickým u vybraných klonů/klastrů ST) a komensální, nebo indikátorové (indikující možné fekální znečištění).

U enterobakterií byly popsány čtyři hlavní mechanismy rezistence k fluorochinolonům:

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

1. Získaná rezistence je nejčastěji způsobena mutací genů řídících replikaci a segregaci chromozomální DNA u enzymu topoizomerázy II (DNA gyrázy), která je kódovaná geny *gyrA* a *gyrB* a topoizomerázy IV, kódované geny *parC* a *parE*.
2. Dalším mechanismem je aktivní eflux fluorochinolonů z bakteriální buňky hyperexpresí chromozomálních pump.
3. Rezistence může být způsobena i snížením propustnosti buněčné membrány v důsledku alterace porinů.
4. K nejnovějším mechanismům patří rezistence vyvolaná Qnr proteiny chránícími cílový protein DNA gyrázu, produkcí enzymu aminoglykosid acetyltransferázy AAC(6')-Ib-cr, který inaktivuje chinolony acetylací a akvizicí plasmidových pump QepA/OqxAB, které snižují koncentraci hydrofilních fluorochinolonů v buňce (Mirzaii et al. 2018; Recacha et al. 2017).

V posledních letech je celosvětově zaznamenáván nárůst rezistence bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* k fluorochinolonům. Původně byla rezistence k chinolonům považována za výhradně způsobenou chromosomálními mutacemi, které blokují replikaci DNA inhibicí gyrázy a topoizomerázy IV. V současnosti je pozornost věnována zejména horizontálně šířené rezistenci nesené na plasmidech a to i z důvodu epidemiologického významu takového přenosu. První výskyt plasmidově nesené rezistence k chinolonům (Plasmid Mediated Quinolone Resistance – PMQR) byl zaznamenán v roce 1998 u urinárního izolátu *Klebsiella pneumoniae* (Martinez-Martinez et al. 1998). Gen odpovědný za tento typ rezistence byl pojmenován *qnr*, později pozměněn na *qnrA*, protože byly objeveny další varianty tohoto genu. Další mechanismus vzniku PMQR byl popsán v roce 2006, jednalo se o modifikaci chinolonů enzymem aminoglykosid acetyltransferáza (Robicsek et al. 2006). V roce 2007 v souvislosti s objevem chinolonových efluxních pump QepA (Yamane et al. 2007; Périchon et al. 2007) a OqxAB (Hansen et al. 2007) byl popsán třetí mechanismus rezistence k chinolonům nesený na plasmidech. Horizontální genový přenos těchto determinant PMQR mezi bakteriemi významně přispěl ke snížení citlivosti na fluorochinolony (Gay et al. 2006; Cattoir et al. 2008; Zhou et al. 2011; Li et al. 2012). Studie ukázaly, že izoláty *E. coli* získané z různých prostředí často nesou jak geny rezistence typu PMQR, tak ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase) a obvykle koexistují na stejném plasmidu. Plasmidy nesoucí více genů rezistence mohou

přenášet vícečetnou rezistenci k antibiotikům mezi různými bakteriemi, což představuje velkou hrozbu pro léčbu infekčních onemocnění (Jiang et al. 2012).

Fluorochinolony, podobně jako většina dalších ve vodě rozpustných antibiotik využívaných ve veterinární medicíně nejsou zcela absorbovány nebo metabolizovány *in vivo* a léčená zvířata je ve vysokých koncentracích vylučují svými exkrementy. Stabilita fluorochinolonů ve vnějším prostředí je vysoká, odhaduje se na více než 120 dní (Wu et al. 2005).

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

### **Výskyt bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních k fluorochinolonům a genů PMQR u drůbeže**

Protože (fluoro)chinolony patří mezi tzv. antibiotika s nejvyšší prioritou v humánní medicíně, jejich aplikace u potravinových zvířat podléhá iniciativě obezřetného používání (EFSA, 2021). Množství používaných antibiotik v jednotlivých zemích hraje významnou roli, např. v USA je popisován nižší výskyt rezistence k fluorochinolonům a chinolonům u *E. coli* izolovaných v chovech brojlerů (méně než 5 %), kde nejsou registrovány k použití u drůbeže. Naopak v zemích s legalizovanou spotřebou u drůbeže např. v Brazílii, Číně a EU, činil výskyt rezistentních *E. coli*, více než 40 %. Provedený průzkum také ukazuje na absenci harmonizovaného přístupu při monitorování spotřeby antibiotik dle živočišných druhů a hodnocení rezistence pomocí jednotné metodiky (Roth et al. 2019). Částečně lze využít data o prodejích antimikrobik spotřebovaných u zvířat a kvalifikovaných odhadů na cílové druhy

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

zvířat. Takovým příkladem je evropská zpráva JIACRA III (2021): kde jsou popsány korelace mezi spotřebou fluorochinolonů a dalšími chinolony u prasat a drůbeže.

Přestože zákaz fluorochinolonů a chinolonů není limitujícím faktorem snižujícím výskyt rezistentních populací bakterií k těmto antibiotikům, omezení jejich používání může vést k nižšímu výskytu fluorochinolonové rezistence. Perrin-Guyomard et al. (2020) ve své studii poukazuje, že ve Francii snížení expozice fluorochinolonů u drůbeže o 71,5 % v průběhu let 2011–2018 vedlo u *E. coli* izolovaných od nemocných zvířat ke snížení fluorochinolonové rezistence u brojlerů a slepic z 9,0 % na 5,4 % a u krůt ze 7,4 % na 3,4 %. Francie dosáhla za poslední období výrazného snížení celkových spotřeb antimikrobik (ESVAC, 2020) a s ohledem na možnou ko-selekcii rezistence mezi fluorochinolony a dalšími velmi často podávanými skupinami antimikrobik (leč uvést například beta-laktamy (zde především amoxicilin), tetracykliny či sulfonamidy a trimethoprim) je pak pokles rezistence možné přičítat i tomuto celkovému snížení (viz též práce Ingram et al., 2013).

V Evropské unii byla v roce 2018 hlášena rezistence k (fluoro)chinolonům na vysoké až velmi vysoké úrovni u izolátů *Salmonella* spp. i *E. coli* získaných od brojlerů, krmných krůt a jatečně upravených těl drůbeže/masa. Celkově byla z hlášení 26 členských států a 2 států mimo EU pozorována velmi vysoká/vysoká úroveň rezistence k ciprofloxacinu a kyselině nalidixové u salmonel izolovaných od brojlerů (51,8 % a 48,8 %) a krůt (42,7 % a 33,7 %), ve srovnání s nižší úrovní rezistence u izolátů salmonel od nosnic (16,2 % a 14,9 %). U izolátů získaných na úrovni porážky byla u izolátů salmonel získaných z JUT brojlerů registrována rezistence na vysoké až extrémně vysoké úrovni ve většině evropských zemích zahrnutých do analýzy (19 členských států a 2 státy mimo země EU), u ciprofloxacinu činila 51,4 % a k. nalidixové 48,8 %. U krůt na porážce byla zaznamenána rezistence salmonel k ciprofloxacinu u 32,4 % a u k. nalidixové 23,7 %. Mezi jednotlivými členskými státy (9) byly potvrzeny velké rozdíly, od velmi nízké úrovně rezistence až po extrémně vysokou. Podobně jako u salmonel tomu bylo i u izolátů *E. coli* od brojlerů (ciprofloxacin 73,5 %, k. nalidixová 64,1 %) a krůt (ciprofloxacin 56,5 %, k. nalidixová 34,8 %). Mezi jednotlivými zeměmi, které poskytly data byly také zaznamenány velké rozdíly (EFSA, 2021). Z uvedených hlášení evropských zemí však není možné zjistit, zda a v jaké míře se na rezistenci podílí geny PMQR.

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

Z dat získaných v rámci monitoringu cílových patogenů prasat, skotu a kura, který probíhá od roku 2015 (Nedbalcová et al, 2015), je zřejmé, že u řady izolátů je detekována snížená citlivost nebo rezistence k enrofloxacinu (Národní program sledování rezistencí k antimikrobikům u veterinárně významných patogenů: zprávy jsou dle roků publikace dostupné na webu svscr.cz). Z interní analýzy pro MZe v rámci Funkčního úkolu 8/2020 vyplynule, že u souboru izolátů *E.coli* z brojlerů kura s klinickým onemocněním byla nejvyšší prevalence NWT fenotypu k enrofloxacinu ze všech sledovaných cílových druhů (kur, prasata, telata). Bylo zjištěno 73 NWT izolátů z klinicky nemocných brojlerů (58,9 %, n = 124, izoláty ČR, 2018, Národní program sledování rezistencí k antimikrobikům u veterinárně významných patogenů). Mezi prevalencí NWT fenotypu k enrofloxacinu u izolátů *E. coli* z brojlerů a z prasat či telat byl identifikován statisticky významný rozdíl. Tato skutečnost reflektuje *de facto* míru používání (spotřeb) fluorochinolonů u drůbeže – která převažuje jednoznačně nad spotřebou u všech ostatních cílových druhů. V případě prevalence NWT fenotypu k fluorochinolonům u *E.coli* z brojlerů je nutné zdůraznit, že uvedená interpretace pomocí ECOFF nevypovídá o potenciálním klinickém výsledku léčby, ale o přítomnosti mechanismů rezistence, které se projevují ve fenotypu. S ohledem na současný stav odborného poznání (2021) jsou popsány 4 základní mechanismy rezistence bakterií k fluorochinolonům (viz výše).

Při použití veterinárních klinických breakpointů (CBP) pro enrofloxacin by rozložení citlivosti u patogenních izolátů *E. coli* (n=124) vypadalo následovně: 64 izolátů citlivých (51,6 %; CBP-C < 0,25 mg/l), 25 izolátů intermediárních (20,2 %; CBP-I = 0,5–1 mg/l) a 35 izolátů rezistentních (28,2 %; CBP-R > 2 mg/l). Tato zjištění pocházejí z analýzy dat v rámci Funkčního úkolu 8/2020 MZe ČR a citovaných publikací Národního programu sledování rezistencí k antimikrobikům veterinárně významných patogenů (2018).

V rámci řízení přezkumu (referral) bylo i z důvodu enormního nárůstu rezistence nejen u klinických izolátů z nemocných zvířat, ale také izolátů vyvolávajících zoonózy (*Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni*) v CVMP stanovisku 21 vyjádřeno, že by měla být vyjmuta indikace *E.coli* u perorálně podávaných VLP s enrofloxacinem. Rovněž se zvyšuje tlak na úplné vyřazení vybraných molekul antimikrobik s kritickým významem pro humánní medicínu, mezi které fluorochinolony beze sporu patří. I přes nesporné výhody podání enrofloxacinu u drůbeže, mezi něž patří především výhodná farmakokinetika léčivé látky

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224



umožňující dostupnost ve tkáních, kam jiná antimikrobika obtížně pronikají a koncentračně závislý rychlý nástup baktericidního účinku, je v návaznosti na výše uvedené třeba pomýšlet na možnost postupného vyfázování této léčivé látky a intenzívně hledat vhodná opatření, která sníží potřebu použití těchto antimikrobik.

V rámci retrospektivní mezinárodní studie z 13 evropských zemí byl proveden screening výskytu plasmidově vázané rezistence k chinolonům u izolátů salmonel a *E. coli* získaných v letech 1994 až 2009 od zvířat, lidí, potravin a prostředí (Veldman et al. 2011). Geny PMQR neslo 59 % izolátů salmonel (zejména geny *qnrS* a *qnrB*) a 15 % izolátů *E. coli* (především gen *qnrS*). Salmonely nesoucí geny PMQR izolované z drůbeže byly zjištěny v Belgii, Dánsku, Finsku, Německu, Itálii, Polsku, Španělsku a Nizozemí. V případě *E. coli*, byly izoláty k dispozici pouze ze čtyř zemí a pozitivní nálezy genů PMQR byly zaznamenány v Polsku a Nizozemí. Přestože jsou uvedené výsledky ovlivněny různými faktory, počty izolátů získaných z různých zdrojů dostupných v jednotlivých zemích ukazují, že chovy drůbeže jsou v Evropě hlavním zdrojem genů PMQR.

V České republice byly v letech 2013 až 2014 geny PMQR detekovány u 10,9 % (17/156) izolátů *E. coli* z environmentálních vzorků (z prostředí farem brojlerů) a u 48,6 % (51/105) *E. coli* izolovaných z kloakálních výtěrů krůt na úrovni jatek. U obou typů vzorků převažoval výskyt genu *qnrS* a *qnrB*, a většina z nich byla citlivá k třetí generaci cefalosporinů (Röderová et al. 2017).

### **Ko-selekcce rezistence fluorochinolonů – ve vztahu k dalším antimikrobikům / či v důsledku používání dalších antimikrobik**

Jednou z velmi závažných kombinací (s možnou ko-selekcí) rezistencí je přítomnost plasmidově přenášené rezistence k fluorochinolonům (PMQR) a současně genů kódujících tzv. širokospektré beta-laktamázy (ESBL). Kmeny, které nesou tyto genetické charakteristiky pak nebudou odpovídat na léčbu jak (fluoro)chinolony tak základními betalaktamy (peniciliny, aminopeniciliny), ale ani cefalosporiny, včetně těch vyšších generací. Byly rovněž pozorovány mutace v genech *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE*. V České republice byl Röderovou et al. (2017) analyzován unikátní soubor celkem 1050 izolátů *E. coli* (303 humánních izolátů, 156 izolátů

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224



z brojlerů kura domácího, 105 z krůt, 114 z havranů a 372 ze vzorků odpadních vod). Ze zkoumaných vzorků bylo získáno 262 (25%) izolátů s pozitivitou na PMQR (nejvíce u krůt 48,6% a pacientů z humánní oblasti (32%). Nejčastěji zjištěným u PMQR byl gen *qnrS1* detekovaný u 146 (56%) izolátů, následovaný genem *aac(6')-Ib-cr* u 77 (29%) izolátů, gen *qnrB19* byl pak zjištěn u 41 (16%) izolátů a gen *qnrB1* u 9 (3%) izolátů. U všech izolátů byla potvrzena vysoká rezistence na (zvolený substrát) ciprofloxacin (>32 mg/l) pokud tyto obsahovaly současně dvě nebo tři mutace genu *gyrA* kombinované s jednou či dvěma mutace v genu *parC*. Zajímavé je, že oproti jiným publikacím, autoři u těchto vzorků nepotvrdili vysokou míru shody/příbuznosti mezi izoláty z různých zdrojů.

Ko-selekce rezistence však může být vnímána i z perspektivy, kdy jiná antimikrobika, respektive jejich podání může ko-selektovat rezistenci k fluorovaným chinolonům, jak popsali ve své práci Ingram et al. (2013), kdy detekovali současně rezistence k amoxicilinu, gentamicinu, tetracyklinu a kombinaci and trimethoprim/sulfamethoxazol. Ve své studii identifikovali unikátní fylogenetickou příbuznost indikující možné klonální šíření v důsledku selekce s pomocí jiných antimikrobik než fluorovaných chinolonů. Práce ukázala na gen *aac(6')-Ib-cr*. Rovněž tak s ohledem na průkaz této ko-selekce autoři práce poukázali na skutečnost, že pro záchranu účinnosti fluorochinolonů (respektive zachování nízké míry rezistence) nestačí jen snížit či přestat používat fluorochinolony, ale pozornost je nutno věnovat i dalším skupinám antimikrobik.

Ko-selekce rezistence může být rovněž vyvolána např. dezinfekčními látkami (např. organickými sloučeninami, fytoaditivy typu olejů (pine oil) a také například triclosanem (Randall et al., 2008). Závažným problémem se jeví ko-selekce rezistence pomocí genů nesených na též plasmidu, kdy je nesené několik genů rezistence k různým antimikrobikům, nebo jsou zde geny kódující AcrAB-TolC effluxní pumpy (a tudíž vyloučení fluorochinolonů vně buňky (Koronakis et al., 2004)), či kódování geny s konečným dopadem do propustnosti porinů (Li et al., 2015) nebo výskytem A87G mutace na GyrA (Weber et al., 2013). Všechny tyto mechanismy ve finálním dopadu přispějí nejen k rezistenci k fluorochinolonům, ale i k dalším látkám antimikrobní povahy (antimikrobika, či desinfekční látky) a limitují boj s původci onemocnění nejen zvířat, ale i člověka.

Další studie (Li et al., 2019) u komensálních kmenů *E.coli* izolovaných od drůbeže ukázala, že dlouhodobé používání enrofloxacinu selektovalo multirezistentní (MDR) izoláty *E. coli* ve

střevech kuřat a že tyto izoláty měly rozmanité spektrum genů odpovědných za sníženou citlivost či rezistenci k fluorochinolonům. K rezistenci s vysokými hodnotami MIC ( $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ ) přispělo několik genetických změn, včetně dvojitych mutací na *gyrA* (S83L a D87N), jediné mutace *parC* (S80I) a *parE* (S458E), včetně aktivace effluxních pump a přítomnosti proteinu kódovaného gene *qnrS1*. Relativně nízkou míru rezistence (MIC v rozpětí 8 či 16  $\mu\text{g/ml}$ ) způsobila, kromě efluxních pump rovněž snížená exprese porinového proteinu OmpF. Ve studii rezistence u izolátů *E.coli* z kura domácího (izoláty z chovů v ČR) byly prokázány jak geny rezistence k chinolonům, tak geny rezistence k beta-laktamům, nejčastěji se jednalo o TEM beta-laktamázy. Ve studii nebyla použita selektivní média a nebyl záchyt přítomnosti *bla*<sub>CTX-M</sub> genu, zatímco čtyři izoláty nesly *bla*<sub>CMY-2</sub> gen. Tento gen, spolu s *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, je nejčastější ESBL/AmpC beta-laktamáza u izolátů drůbeže *E. coli*. V rámci tohoto souboru byla u většiny izolátů rezistentních k chinolonům zjištěna chromozomální mutace v genu *gyrA*, sedm izolátů neslo *qnrS-1*. Byl také pozorován souběžný výskyt *bla*<sub>CMY-2</sub>, -59 a *qnrS-1*. I přes skutečnost, že výše citované izoláty se souběžnou rezistencí nejsou běžně spojeny s lidským onemocněními, neznamená to, že jsou epidemiologicky irelevantní, protože mohou stále sloužit jako zdroj rezistence při horizontálním přenosu genů (Papoušková et al., 2020).

V Brazílii, byl v rámci screeningu 200 izolátů bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (více jak 90 % *E. coli*, následované *E. fergusonii*, *K. oxytoca* a *K. pneumoniae*) ze zdravých kuřat pocházejících ze dvou různých farem prokázán výskyt genů PMQR u 23 % izolátů. Dominantní zastoupení měl gen *qnrB* (43/200), s ojedinělým výskytem genů *qnrS* (2/200) a *aac(6')-Ib-cr* (1/200). Všechny izoláty nesoucí geny PMQR byly multirezistentní a vykazovaly současně také ESBL typ rezistence (Ferreira et al. 2018). Podobně bylo v Číně prokázáno, že léčba salmonelových infekcí u kuřat enrofloxacinem vedla v trávícím traktu kuřat nejen k selekci izolátů *E. coli* rezistentních k fluorochinolonům, ale současně také k beta-laktamům a tetracyklinu (Li et al. 2019).

Drůbeží podestýlka je považována za hlavní zdroj fluorochinolonů v zemědělských půdách. Sorpce fluorochinolonů k pevným částicím patří k hlavním mechanismům jejich šíření v prostředí a může se lišit v závislosti na různých typech matrice. Leal et al. (2012) prokázal, že sorpční potenciál fluorochinolonů v drůbeží podestýlce (rýžová sláma a borovicové hoblíny) byl vysoký (sorpce nejméně 69 % aplikovaného obsahu), ale přesto byl výrazně nižší než v půdě. Nižší afinitu fluorochinolonů v drůbeží podestýlce autoři vysvětlují nižším množstvím

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

sorpčních míst a mírně alkalickým pH. V úvahu je navíc třeba brát i různé typy drůbeží podestýlky používané v zemědělské praxi. Gupta et al. (2021) ve studii o účincích růstových a terapeutických antibiotik na dynamiku mikrobiomu a rezistomu v kuřecích kloakálních výtěrech a podestýlce prokázal různé účinky při použití enrofloxacinu. Relativní množství genů kódujících rezistenci k chinolonům v kloakálních výtěrech se zvýšilo po terapii enrofloxacinem, ale v podestýlce byl pozorován opačný účinek. To naznačuje, že koncentrace enrofloxacinu v kuřecím střevě podporovala selekci rezistentních bakterií a výskyt genů PMQR, ale následně nedošlo ke stejnému efektu v podestýlce. Obecně terapie enrofloxacinem zvyšovala v obou případech relativní množství multirezistentních kmenů *Enterobacteriaceae*, a to primárně *E. coli*.

### **Výskyt bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních k fluorochinolonům a genů PMQR v půdě**

Studie zaměřené na přítomnost enterobakterií nesoucích geny PMQR, nebo popisující samotný výskyt genů PMQR v zemědělských půdách v souvislosti s hnojením drůbeží podestýlkou chybí. Dostupné studie sledující šíření fluorochinolonové rezistence a genů PMQR v půdách pocházejí zejména z Asijských zemích, které s ohledem na významné zastoupení produkce vepřového masa, poukazují na šíření genů PMQR do zemědělské půdy z kejdy a odpadních vod z chovů prasat. Řada studií již popsala vliv aplikace odpadů z chovů prasat (kejdy, kalů a odpadních vod) do půdy na výskyt genů PMQR v půdě (Li et al. 2012; Xiong et al. 2015; Wu et al. 2019), stejně jako na pozitivní korelaci mezi relativním množstvím genů kódujících PMQR, fluorochinolonovou rezistencí u bakterií a koncentrací fluorochinolonů v prostředí (Li et al. 2012; Xu et al. 2015; Huang et al. 2016).

Li et al. (2012) ve své studii prokázal geny PMQR (*qnrD*, *qepA* a *oqxB*) ve všech vzorcích odpadních vod ze sedmi farem prasat a ve vzorcích půd z okolních polí, kde byly odpadní vody používány k zavlažování. Informace o druhovém složení bakterií nesoucích geny PMQR však chybí, protože uvedená studie byla zaměřena jen na přímou detekci genů ze vzorků odpadních vod a půdy pomocí kvantitativní PCR (qPCR). Další studie z Číny poukazuje na fakt, že chovy prasat kontaminují v okolí farem vzduch, vodu, bahno a půdu bakteriemi *E. coli* nesoucími

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

geny PMQR, které se tak mohou dále šířit do prostředí. Celkem 82,3 % (107/130) izolátů *E. coli* z prasat neslo alespoň jeden gen PMQR, s dominantním výskytem genu *qnrS*. Výsledky typizace metodou pulsní gelové elektroforézy (PFGE-pulsed field gel electrophoresis) ukázaly, že 49 % izolátů *E. coli* pocházejících ze vzorků vzduchu, říční vody, půdy a bahna mělo více jak 85% podobnost s fekálními izoláty a 40,8 % z nich sdílelo stejné geny PMQR (Wu et al. 2019). V Číně v polním experimentu s dlouhodobou aplikací (11 let) prasečí kejdy a kalů do půdy byly zjištěny počty bakterií rezistentních k ciprofloxacinu řádově 107 KTJ/g půdy. Z celkem 21 bakteriálních izolátů rezistentních k ciprofloxacinu zařazených ke kmenům *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* a *Bacteroidetes* bylo 18 pozitivních na přítomnost genů PMQR (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrD*, *qepA*, *oqxA* a *oqxB*). V rámci kmene *Proteobacteria* byly získané izoláty s PMQR geny zařazeny k rodům *Brevundimonas*, *Sphingopyxis*, *Sphingomonas* a *Bosea*, nebyly ale prokázány u enterobakterií, které jsou u hospodářských zvířat popisovány jako nositelé těchto genů. Ačkoli byly v uvedené studii geny PMQR detekovány pouze v půdách, na které byl aplikován hnůj, nebylo možné určit, zda je jejich výskyt výsledkem přežívání bakterií z hnoje od prasat nebo horizontálního přenosu mezi bakteriemi z hnoje a původními půdními bakteriemi (Xu et al. 2015).

Aby bylo možné kontrolovat proliferaci polutantů, je důležité znát jejich osud od organických hnojiv až po životní prostředí. Rezistentní bakterie k flurochinolonům a geny PMQR mohou v prostředí perzistovat až po dobu několika měsíců. Za laboratorních podmínek bylo metodou qPCR prokázáno, že relativní množství genů PMQR (*oqxA*, *oqxB*, *aac(6')-Ib-cr* a *qnrS*) v zemědělské půdě se významně snížilo až za dva měsíce po aplikaci prasečího hnoje (Xiong et al. 2015).

Snížení četnosti bakterií v důsledku přítomnosti antibiotik a jejich reziduí v půdě může vést ke špatné adaptaci bakterií z hnoje na půdní prostředí, čímž může být ovlivněn také výskyt a zastoupení genů antibiotické rezistence. Složení půdního mikrobiomu se může lišit v závislosti na obsahu fluorochinolonů v půdách. Byl zjištěn vliv aplikace hnoje s nízkými koncentracemi ciprofloxacinu (0,04 a 0,4 mg/kg) na obohacení půdy bakteriemi patřícími do kmene *Actinobacteria* a tříd *Bacilli*, *Clostridia* a *Gammaproteobacteria*, které zahrnují i enterobakterie a naopak inhibici *Acidobacteria* a *Halophage* (Huang et al. 2016). Xiong et al. (2015) v laboratorních podmínkách prokázal, že aplikace fluorochinolonů (enrofloxacin, ciprofloxacin a norfloxacin) do půdy o koncentraci 5 mg/kg poskytla selektivní výhodu pro

bakteriální kmeny *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* a *Planctomycetes* vyskytujícími se v půdě, zatímco růst *Proteobacteria* a *Actinobacteria* byl potlačen. Tuo et al. (2018) ve své studii určil, že hlavními faktory, které ovlivnily změny v zastoupení genů PMQR a mobilních genetických elementů v půdě, jsou pH a složení mikrobiální komunity. V půdách s kontaminací ciprofloxacinem v koncentraci 20 mg/kg byla v uvedené studii zjištěna nižší četnost genů PMQR.

V návaznosti na předchozí studie lze konstatovat, že aplikace drůbeží podestýlky, která je považována za významný zdroj fluorochinolonů, bakterií rezistentních k těmto látkám a genů PMQR v agrárním prostředí, ovlivňuje výskyt této skupiny antibiotik v půdách a podílí se na dalším šíření rezistentních bakterií do prostředí. To může být ovlivněno řadou faktorů: 1) množstvím fluorochinolonů v drůbeží podestýlce a jejím typem; 2) množstvím a druhy bakterií rezistentních k fluorochinolonům obsahujících plasmidy s geny PMQR v drůbeží podestýlce; 3) četností aplikace drůbeží podestýlky na zemědělskou půdu; 4) fyzikálně chemickými vlastnostmi půdy, složením půdního mikrobiomu a klimatickými podmínkami v dané oblasti a 5) schopností bakterií s geny PMQR persistovat v půdách a podílet se na horizontálním přenosu genů PMQR mezi bakteriemi.

V Brazílské studii zaměřené na sledování vlivu krátkodobé a dlouhodobé fertilizace zemědělské půdy drůbeží podestýlkou (<1–30 let) byly zjištěny vysoké koncentrace fluorochinolonů v drůbeží podestýlce (0,56–100 mg/kg), akumulační trend mezi krátkodobě a střednědobě hnojenými půdami, následovaný poklesem jejich koncentrací u dlouhodobě hnojených půd a také přítomnost genu *qnrS* v půdě (Parente et al. 2019). Aktuálně byl také prokázán negativní vliv fluorochinolony kontaminované drůbeží podestýlky na populaci žížal, které hrají významnou roli při mineralizaci organické matrice a udržování půdní porosity, a jsou indikátorem kvality půdy (Parente et al. 2021). Polní experiment realizovaný za účelem vyhodnocení vlivu rozmetání drůbeží podestýlky obsahující enrofloxacin a jeho metabolit ciprofloxacin na počty bakterií čeledě *Enterobacteriaceae* rezistentních k ciprofloxacinu v půdě prokázal, že bakterie *E. coli* rezistentní k ciprofloxacinu přetrvávaly v půdě po dobu nejméně tří měsíců (Pourcher et al. 2014). Na snížení vlivu fertilizace půdy drůbeží podestýlkou s ohledem na šíření rezistence k antimikrobikům, má vliv způsob ošetření hnoje před jeho aplikací. Bylo prokázáno, že kompostování drůbežího hnoje s obsahem enrofloxacinu, doxycyklinu a ciprofloxacinu po dobu 10 týdnů podporuje redukci reziduí těchto antibiotik

a snižuje výskyt většiny genů antibiotické rezistence, včetně genu *qnrS* a potenciálně patogenních a komezálních bakterií, jako například bakterie rodu *Kampylobacter* a *E. coli* (Esperón et al. 2020).

### **Výskyt bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních k fluorochinolonům a genů PMQR ve vodách**

Vodní prostředí je příjemcem velkého množství odpadních vod komunálního, nemocničního a agrárního původu, které představují nejen zdroj šíření bakterií rezistentních k antibiotikům, ale také cestu, která umožňuje transfer genů rezistence do přirozených bakteriálních ekosystémů (horizontální přenos).

Antibiotika a bakterie rezistentní k antibiotikům, které prochází procesem čištění v čistírnách odpadních vod (ČOV), mohou perzistovat v upravených odpadních vodách a kalesch a kontaminovat povrchové vody a půdu. Rezidua fluorochinolonů, stejně jako bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentní k fluorochinolonům lze detekovat v odpadních vodách z nemocnic i v komunálních odpadech upravených v ČOV i v povrchových vodách. V brazilské studii byly bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentní k fluorochinolonům detekovány nejen v odpadních vodách, ale i v řekách, do kterých byly odpady vypouštěny. Mezi mechanismy rezistence u získaných enterobakterií patřily nejen chromozomální mutace v genu *gyrA* (47 %), ale také geny PMQR (52,9 %), a to konkrétně geny *aac-(6')-Ib-cr*, *oqxAB*, *qnrS* a *qnrB* (Conte et al. 2017). Také v Polsku bylo prokázáno, že navzdory čištění odpadní vody v čistírnách, mohou být komunální odpadní vody zdrojem enterobakterií rezistentních k fluorochinolonům nesoucích geny PMQR a dostávat se do povrchových vod (řek), do kterých jsou vypouštěny. V uvedené studii byla většina izolátů rezistentních k fluorochinolonům identifikována jako *E. coli* (25 %), *Acinetobacter* (25 %) a *Aeromonas* (6,9 %). V menší míře byla identifikována i celá řada dalších bakteriálních rodů (např. *Acidovorax*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cronobacter*, *Flavobacterium*, *Hydrogenophaga*). Dominantním genem PMQR byl gen *aac-(6')-Ib-cr* (91 %), následovaný geny *qnrD* (27 %), *oqxA* (25 %), and *qnrS* (24 %). Geny *qnrA*, *qnrB*, *qepA*, and *oqxB* byly detekovány ve vzorcích pouze ojedinele, nebo vůbec (Osińska et al. 2016). Na dominantní zastoupení genu *aac-(6')-Ib-cr* ve vodním prostředí



poukazují také studie z Číny zaměřené na sledování kvality odpadních a povrchových vod (Wen et al. 2016; Yan et al. 2017).

V portugalské studii zaměřené na detekci PMQR u *E. coli* izolovaných z povrchových, podzemních, pitných a rekreačních vod, byl u 16 % izolátů *E. coli* z povrchových vod prokázán výskyt pouze genu *qnrA*. To by mohlo souviset s původem vod, protože rezervoárem genu *qnrA* byly identifikovány bakterie *Shewanella algae*, které se běžně vyskytující ve vodním prostředí. A právě od nich zřejmě bakterie *E. coli* uvedený gen získaly (Mendoca et al. 2012). Nižší variabilita genů PMQR v uvedené studii by mohla souviset také s tím, že na rozdíl od předchozích studií nebyla tato studie cíleně zaměřena na vyšetřování povrchových vod v místech, kde se vypouští odpadní vody z čistíren.

S ohledem na výskyt genů PMQR ve vodním prostředí kontaminovaném odpady z chovů prasat byl rovněž zjištěn výskyt genu *aac-(6)-Ib-cr* a dále genu *oqxB* v povrchových vodách a především v sedimentech těchto vod (Xiong et al. 2015). Obecně ale studie, které by se zabývaly vlivem odpadních vod<sup>3</sup> z chovů hospodářských zvířat na šíření bakterií rezistentních k fluorochinolonom a genů PMQR do prostředí, chybí. I v rámci České republiky by proto bylo do budoucího Akčního plánu Národního antibiotického programu vhodné zakomponovat sledování rezistencí k antimikrobikům a také reziduí v oblasti odpadních vod.

S ohledem na rozdělení kompetencí mezi Ministerstvo zemědělství (produkce potravin rostlinného a živočišného původu a péče o půdní fond) a Ministerstvo životního prostředí (oblast životního prostředí včetně čistoty vod, resp. znečištění vod z různých zdrojů (lidské zdroje (např. odpady z nemocnic; průmyslové zdroje např. odpady z farmaceutické výroby; živočišné zdroje – například hnůj, kejda, podestýlka a jejich uskladnění a další využití, odpadní vody po očištění stájí) a Ministerstvo zdravotnictví (zátěž odpadních vod například odpady z nemocnic) je nutné, aby takové aktivity byly v budoucím Akčním plánu dobře popsány a zkoordinovány. Je to i v souladu s Akčním plánem EU, který v rámci koncepcí “jedno zdraví” propojuje oblast zdraví lidí, zvířat a životní prostředí.

---

<sup>3</sup> Odpadní vody (chovy drůbeže) pouze ve smyslu očištění hal mezi turnusy. Jinak medikovanou vodu vypijí.

## Plán aktivit FÚ na rok 2022

Z dostupných studií je zřejmé, že výskyt fluorochinolonů (např. enrofloxacinu, ciprofloxacinu), bakterií rezistentních k těmto antibiotikům a genů PMQR, které mohou být horizontálně šířeny, lze očekávat také v prostředí chovů drůbeže a okolním prostředí (zemědělské půdě, povrchových či podzemních vodách, pěstovaných plodinách) v ČR. V současnosti neexistují systematické studie, které by se touto problematikou zabývaly. Chybí rovněž informace o výskytu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních k fluorochinolonům a nesoucích geny PMQR v trávicím traktu drůbeže, v podestýlce a v půdě v podmínkách České republiky. Ani v evropském, či globálním měřítku nejsou souhrnně posouzeny a známy vlivy typu podestýlky na sorpci fluorochinolonů a na přežívání k nim rezistentním bakteriím. Nejsou k dispozici informace o vlivu fermentace různých typů podestýlek na hodnoty fluorochinolonů a výskyt bakterií s PMQR typem rezistence. Chybí také informace o vlivu zavlažování kontaminovanou povrchovou vodou na zemědělské půdy a v ní přežívající bakterie rezistentní k fluorochinolonům a geny PMQR.

V rámci funkčního úkolu Mze pro rok 2022 proto navrhujeme navázat na studii z roku 2021 zabývající se šířením fluorochinolonů z drůbeží podestýlky do zemědělské půdy. Práce budou po mikrobiologické stránce zaměřeny na výskyt genů rezistence v chovu drůbeže v počáteční etapě výkrmu (určení mikrobioty z líhní, sřetrování v chovné hale) a na výskyt a přežívání genů v drůbeží podestýlce v průběhu její fermentace. K detekci PMQR genů bude použita metoda extrakce celkové DNA ze vzorků drůbeží podestýlky a půdy.

Pro další Akční plán by bylo vhodné zahrnout i studii věnující se schopnosti šíření *E.coli* nesoucí geny PMQR z půdy zavlažované kontaminovanou vodou do pěstovaných zemědělských plodin.



## **Závěr**

Vzhledem k výše popsaným mezerám v poznání chování fluorochinolonů po jejich podání, metabolizaci a vyloučení zvířaty, nejen v chovech drůbeže, ale i v dalších zemědělských technologiích, především u majoritních druhů zvířat, kde jsou tato léčiva používána je považováno za velmi vhodné pokračování jak pilotní studie rezistence *E.coli* se zaměřením na plasmidově přenosnou rezistenci v půdě, ale do budoucího Akčního plánu by měly být propojeny resortní instituce a to formou spolupráce na pokračování projektu v odpadních vodách.

## Reference

Cattoir V., Poirel L., Aubert C., Soussy CJ., Nordmann P. (2008). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp.

*Emerging Infectious Diseases*, 14, 231-237.

Conte D., Palmeiro JK., Nogueira KD., de Lima TMR., Cardoso MA., Pontarolo R., Pontes FLD., Dalla-Costa LM. (2017). Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 62-69.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease

Prevention and Control), 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial

Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019.

*EFSA Journal* 2021;19(4):6490, 179 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>

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

EMA (2020) European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2020. 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018'. (EMA/24309/2020);

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: [info@med.muni.cz](mailto:info@med.muni.cz), [www.med.muni.cz](http://www.med.muni.cz)  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf) Navštíveno 14. 11.

2021

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

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

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

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

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

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

Ingram PR., Rogers BA., Sidjabat HE., Gibson JS, Inglis TJJ. Co-selection may explain high rates of ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* from retail poultry reared without prior fluoroquinolone exposure. *J Med Microbiol.* 2013 Nov;62(Pt 11):1743-1746

JACRA III (2021) European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) and European Medicines Agency (EMA). Third 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 III. 2016–2018. Stockholm, Parma, Amsterdam: ECDC, EFSA, EMA; 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/JACRA-III-Antimicrobial-Consumption-and-Resistance-in-Bacteria-from-Humans-and-Animals.pdf>

navštíveno 14. 11. 2021

Jiang HX., Tang D., Liu YH., Zhang XH., Zeng ZL., Xu L., Hawkey PM. (2012). Prevalence and characteristics of  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2350-2353.

Koronakis V, Eswaran J, Hughes C (2004) Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73():467-89.

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: [info@med.muni.cz](mailto:info@med.muni.cz), [www.med.muni.cz](http://www.med.muni.cz)  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

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

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

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

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

Li XZ, Plésiat P, Nikaido H (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Apr; 28(2):337-418

Mendonça N., Ramalho J., Vieira P., Da Silva GJ. (2012). Association of plasmid-mediated quinolone resistance and virulence markers in *Escherichia coli* isolated from water. *Journal of Water and Health*, 10, 288-294.

Mirzaii M., Jamshidi S., Zamanzadeh M., Marashifard M., Hosseini SAAM., Haeili M., Jahanbin F., Mansouri F., Darban-Sarokhalil D., Khoramrooz SS. (2018). Determination of

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

*gyrA* and *parC* mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infection in Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 197-200.

Osińska A., Harnisz M., Korzeniewska E. (2016). Prevalence of plasmid-mediated multidrug resistance determinants in fluoroquinolone-resistant bacteria isolated from sewage and surface water. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 10818-10831.

Papouškova A, Masarikova M, Valcek A, et al. (2020) Genomic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from diseased chicken in the Czech Republic. *BMC Vet Res*. 16(1):189.

Parente CET., Azeredo A., Vollu RE., Zonta E., Azevedo-Silva CE., Brito EMS., Seldin L., Torres JPM., Meire RO., Malm O. (2019). Fluoroquinolones in agricultural soils: Multi-temporal variation and risks in Rio de Janeiro upland region. *Chemosphere*, 219, 409-417.

Parente CET., da Silva EO., Júnior SFS., Hauser-Davis RA., Malm O., Correia FV., Saggiore EM. (2021). Fluoroquinolone-contaminated poultry litter strongly affects earthworms as verified through lethal and sub-lethal evaluations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111305.

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

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

Perrin-Guyomard A., Jouy E., Urban D., Claire Chauvin C., Granier SA., Mourand G., Chevance A., Adam C., Moulin G., Kempf I. (2020). Decrease in fluoroquinolone use in French poultry and pig production and changes in resistance among *E. coli* and *Campylobacter*. *Veterinary Microbiology*, 243, 108637.

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

Randall LP, Bagnall MC, Karatzas KA, Coldham NC, Piddock LJ, Woodward MJ (2008) Fitness and dissemination of disinfectant-selected multiple-antibiotic-resistant (MAR) strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens, *J Antimicrob Chemother*. 2008 Jan; 61(1):156-62

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

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

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: [info@med.muni.cz](mailto:info@med.muni.cz), [www.med.muni.cz](http://www.med.muni.cz)  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

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

Roth N., Käsbohrer A., Mayrhofer S., Zitz U., Hofacre C., Domig KJ. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*, 98, 1791–1804.

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

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

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: [info@med.muni.cz](mailto:info@med.muni.cz), [www.med.muni.cz](http://www.med.muni.cz)  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224



Webber MA, Ricci V, Whitehead R, Patel M, Fookes M, Ivens A, Piddock LJ (2013) Clinically relevant mutant DNA gyrase alters supercoiling, changes the transcriptome, and confers multidrug resistance mBio. 2013 Jul 23; 4(4):.

Wen Y., Pu X., Zheng W., Hu G. (2016). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and IncQ plasmids carrying *qnrS2* Gene in bacteria from rivers near hospitals and aquaculture in China. *PLoS ONE*, 11, e0159418.

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

Wu B., Qi Q., Zhang X., Cai Y., Yu G., Lv J., Gao L., Wei L., Chai T. (2019). Dissemination of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes from swine farms to surroundings. *Science of the Total Environment*, 665, 33-40.

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

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

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika  
T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz  
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

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

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

Yan L., Liu D., Wang XH., Wang Y., Zhang B., Wang M., Xu H. (2017). Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China. *Scientific Reports*, 7, 40610.

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

