



MUNI
MED



ÚSKVBL



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ
V BRNĚ

FAKULTA
CHEMICKÁ

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv

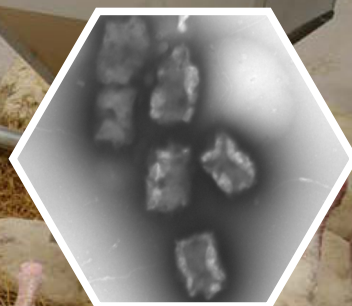
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická



ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PŮDĚ A PŘÍPADNĚ DALŠÍCH ČÁSTECH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Zpráva z funkčního úkolu MZe
za rok 2025

Brno, listopad 2025





Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně



Masarykova univerzita, Lékařská fakulta



Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv



Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PŮDĚ A PŘÍPADNĚ DALŠÍCH ČÁSTECH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Zpráva funkčního úkolu MZe za rok 2025

Brno, listopad 2025

Autoři:

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

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

Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D. (ÚSKVBL)

MVDr. Pavla Novotná (ÚSKVBL)

RNDr. Veronika Ostatná, Ph.D. (FCH VUT v Brně)

Ing. Marie Hamplová (FCH VUT v Brně)

Mgr. Šárka Poláková, Ph.D. (ÚKZÚZ)

OBSAH

ABSTRAKT	5
1. ÚVOD	6
1.1 Důvod pro výběr kolistinu a enrofloxacinu	8
1.1.1 Kolistin	9
1.1.2 Enrofloxacin	10
2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU	11
3. SPOTŘEBY ANTIBIOTIK POUŽÍVANÝCH U KRŮT CHOVANÝCH NA MASO V ČESKÉ REPUBLICE	12
3.1 Spotřeby enrofloxacinu a kolistinu u drůbeže/krůt.....	13
3.2 Metodika sledování spotřeb antimikrobik (A1).....	16
3.3 Spotřeby antimikrobik	19
4. MATERIÁL A METODIKA.....	21
4.1 Výkrm krůt.....	21
4.1.1 Stanovení kolistinu (A2)	25
4.1.2 Stanovení enrofloxacinu (B).....	31
4.1.3 Sledování abundance vybraných genů rezistence (C)	33
4.2 Modelový pokus	37
4.2.1 Popis modelového pokusu.....	37
4.2.2 Stanovení fluorochinolonů ve vzorcích půdy	42
4.2.3 Přežívání kmenů <i>Escherichia coli</i> s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům a kolistinu ve fermentované podestýlce s faeces z krůtí farmy.....	45
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	47
5.1 Prostředí faremního chovu	47
5.1.1 Abundance vybraných genů rezistence na farmě (C)	47
5.2 Modelový pokus (D).....	52
5.2.1 Přežívání kmenů <i>Escherichia coli</i> s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům a kolistinu ve fermentované podestýlce s faeces z krůtí farmy.....	52
5.2.2 Přežívání kmenů <i>Escherichia coli</i> s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům a kolistinu v půdě.....	53
5.2.3 Analýza vzorků podestýlky v průběhu fermentace	56
5.2.4 Analýza vzorků půdy	60
6. ZÁVĚRY	63
7. REFERENCE	67

ABSTRAKT

Bez antibiotik si dnes již nelze představit humánní ani veterinární medicínu. Kromě pozitivních důsledků jejich používání spočívajících v úspěšné léčbě rozličných bakteriálních infekcí, čímž se nepřímo podílí např. na zajištění potravinové bezpečnosti, má jejich užití také negativní důsledky. K těm patří zejména vznik rezistence a šíření rezistentních bakterií nebo genů rezistence do všech složek životního prostředí. Také půda může sloužit jako rezervoár a zdroj těchto faktorů, jejichž původ souvisí s aplikací statkových hnojiv různého původu s antibiotiky z léčených chovů. Je zde riziko kontaminace pěstovaných plodin rezistentními bakteriemi a ohrožení potravního řetězce.

Kolistin a enrofloxacin patří mezi vysoce kriticky významná antimikrobika. Enrofloxacin tvořil za posledních 15 let majoritu spotřebovaných fluorochinolonů nejen v České republice, ale i v Evropské unii. Oproti tomu spotřeby kolistinu jsou v ČR minimální, ale protože se stále používá, je nezbytné věnovat pozornost i jemu.

Projekt byl zaměřen na stanovení přítomnosti genů rezistence ke kolistinu a enrofloxacinu v různých částech prostředí krůtí farmy. Byly provedeny stěry ve vnitřním prostředí chovné haly, analyzovány přepravní krabice, ve kterých byla kuřata dopravena z líhně, stejně tak čistá podestýlka, voda a krmivo; byly odebrány i vzorky faeces s podestýlkou v průběhu celého životního cyklu krůt. S ohledem na problémy doprovázející stanovení kolistinu chemickými metodami, byla zvolena metoda mikrobiologická difúzní metoda, osvědčená při stanovení kolistinu v léčivech. Vhodnost této metody byla odzkoušena na vzorcích vody o známých koncentracích a následně i na faeces s podestýlkou. Dále bylo sledováno přežívání bakterií se specifickými geny rezistence ke kolistinu a enrofloxacinu v průběhu fermentace faeces s podestýlkou a v půdě, na kterou byla tato podestýlka aplikována.

Rezidua enrofloxacinu a jeho metabolitu ciprofloxacinu byla sledována ve fermentující mrvě a v půdě, na kterou byla vyžralá mrva aplikována. Vzhledem k tomu, že v rámci sledovaného chovu nebyl enrofloxacin medikován, byla faeces s podestýlkou v průběhu fermentace obohacena VLP Enrogal, a to ve vyšší než běžné dávce za účelem prozkoumání chování v prostředí s vyšší koncentrací enrofloxacinu v průběhu fermentace a v půdě.

Součástí zprávy jsou i trendová data o spotřebách antibiotik u krůt, a celkově ve veterinární a humánní medicíně v ČR a v EU.

1. ÚVOD

Problematika rezistence k antimikrobikům představuje jednu z nejvýznamnějších výzev současného zdravotnictví i ochrany životního prostředí. Vzhledem k její závažnosti a s ohledem na skutečnost, že i nová Strategie Národního antibiotického programu má jako jeden z cílů řešení otázek spojených se zátěží životního prostředí v důsledku používání antimikrobik, vzniká další ze série zpráv, která navazuje na předchozí aktivity směřující k plnění parciálního cíle I.1.5 stanoveného v rámci realizační náplně Akčního plánu Národního antibiotického programu (AP NAP) pro období 2019–2022. I tento projekt tak přináší další informace, které pomohou přesněji zformulovat rámec pro hodnocení jisté části rizik pro životní prostředí – konkrétně těch, které lze sledovat pomocí monitorování dopadů na půdní ekosystémy. Základním cílem sledování předmětných projektů, včetně zde předkládaného, je zjištění míry přenosu bakteriálních kmenů rezistentních k antimikrobikům do půdy a kontaminaci půdy rezidui léčivých látek používaných v chovech hospodářských zvířat. Aktivita navazuje na výsledky dosažené v projektech předchozích let. V roce 2019 byl zpracován analytický dokument, ve kterém byly identifikovány možné přístupy vhodné pro sledování zátěže životního prostředí. Byla identifikována trojkombinace: antimikrobikum + konkrétní produkční kategorie hospodářských zvířat + vehikulum (kejda či podestýlka s trusem nebo hnůj), pro kterou jsou pak navrhovány konkrétní metodiky zkoumání přenosu rezistentních bakterií a reziduí antimikrobik do půdy v podmínkách České republiky. V roce 2020 byl projekt zaměřen na kolistin a jeho použití u prasat, v letech 2021 a 2023 byly provedeny chemické analýzy a mikrobiologická stanovení fluorochinolonů, konkrétně enrofloxacinu (ENR) a jeho metabolitu ciprofloxacinu (CIP) u brojlerů kura domácího. V roce 2022 nebyl úkol z finančních důvodů realizován. V roce 2024 pak následovala studie u skotu sledující skupinu makrolidů a příbuzných látek, konkrétně tulathromycin. V rámci projektu pro rok 2025 byl pak vybrán další druh drůbeže chované na produkci masa – brojleři krůt se zacílením na kriticky významná antimikrobika enrofloxacin a kolistin, zařazená Evropskou lékovou agenturou do skupiny AMEG B, tedy těch, která mají vysoký význam pro humánní medicínu a u zvířat by měla být použita až jako poslední, v případech, kdy nejsou účinná antimikrobika s nižšími riziky z pohledu selekčního tlaku na rezistenci.

Antibiotika v půdě

Antibiotika se do životního prostředí obecně dostávají v průběhu celého jejich životního cyklu, tj. během výroby, používání u lidí, či zvířat a při nakládání s nepoužitými přípravky. V podmínkách EU jsou emise vznikající při výrobě léčivých přípravků obecně zanedbatelné, přičemž největší podíl kontaminace pochází z jejich spotřeby lidmi, či zvířaty. Významným zdrojem kontaminace jsou chovy hospodářských zvířat, kterým jsou léčiva podávána. Dávka léčiva se z těla zvířat vylučuje z 30 až 90 % v původní formě v moči a exkrementech (BIO Intelligence Service, 2013). Část léčiv se navíc vylučuje ve formě metabolitů vzniklých transformací původní látky, které mohou zůstat mikrobiologicky aktivní. U enrofloxacinu se část podávané dávky v těle zvířat metabolizuje na biologicky aktivní ciprofloxacin. V humánní medicíně se podává pacientům přímo ciprofloxacin.

Léčiva, která se dostanou do půdy, mohou být následně částečně vyplavována do povrchových vod nebo infiltrovat do vod podzemních. Mohou být též přijímána půdními organismy a z půdní vody i rostlinami. Léčiva, jejichž mobilita je v půdě omezená, podléhají řadě procesů přirozené atenuace, zahrnující biotické i abiotické reakce. Díky činnosti mikroorganismů jsou léčiva v půdě mineralizována na jednoduché anorganické sloučeniny, biodegradována na jednodušší organické sloučeniny, případně pouze transformována na metabolity s odlišnými vlastnostmi. Popřípadě mohou z metabolitů opět vznikat původní léčiva (Kuppusamy et al., 2018). Zmíněné biotické procesy silně závisí na typu mikroorganismů a struktuře léčiva, pH, teplotě, vlhkosti, salinitě, přítomnosti kyslíku a dalších faktorech. Konkrétně antibiotika mohou narušovat stabilitu půdního ekosystému a ovlivňovat složení a funkci mikrobiálních společenstev. Přítomnost antibiotik a jejich metabolitů či degradačních produktů navíc i v nízkých koncentracích přispívá k rozvoji rezistence bakterií k antimikrobikům (AMR), která pak může být přenášena napříč životním prostředím, mezi zvířata a lidi (Hashmi et al. 2017). Mezi hlavní abiotické procesy, kterým podléhají léčiva v půdě, patří sorpce, fotodegradace a hydrolýza. Adsorpce léčiv spočívá v navázání molekul léčiv fyzikálními a chemickými interakcemi na pevné povrchy půdních částic (Shaheen et al., 2022). Pokud jsou léčiva z půdy odbourávána pomalu, dochází k jejich transportu vyplavováním do povrchových vod či vyluhováním z nenasycené zóny do podzemních vod. Transport léčiv je ovlivněn také klimatickými podmínkami (množství srážek, teplota). Dlouhodobé srážky a kyselé deště výrazně zvyšují vertikální migraci antibiotik z hnojiva do půdy. Jejich mobilita v půdě je omezena degradací a sorpcí na půdní částice, jejichž míra se liší z důvodu strukturní variability jednotlivých léčiv (Corada-Fernández et al., 2017).

1.1 Důvod pro výběr kolistinu a enrofloxacinu

Kolistin a také fluorochinolon enrofloxacin patří mezi vysoce kriticky významná antimikrobika (WHO, 2024), což reflektuje i zařazení těchto léčivých látek do tzv. skupiny „AMEG B“ s imperativem na jejich omezené použití AMEG kategorizace 2020 (revidovaná verze, pak z roku 2025). Tato kategorizace spojuje kritéria hodnotící přínosy a rizika optikou humánní i veterinární medicíny a navazuje na legislativní rámec EU, především nařízení o veterinárních léčivých přípravcích (EU) 2019/6 a jeho prováděcí předpisy a také dokument vydaný Evropskou lékovou agenturou, který hodnotí jednotlivé parametry podstatné pro zařazení do kategorií AMEG (Categorisation of Antibiotic in the European Union, [AMEG 2018 - Categorisation of antibiotics](#) (EMA/CHMP/CVMP/682198/2017-Rev. 1, září 2025)). Pro Českou republiku (dále ČR) ve vztahu k sektoru hospodářských zvířat jsou ze skupiny fluorochinolonů relevantní a používané enrofloxacin a marbofloxacin, u zvířat v zájmovém chovu pak pradofloxacin. Z pohledu hodnocení rizik je vhodné se zaměřit na enrofloxacin, neboť za posledních 15 let tvořil majoritu spotřebovaných fluorochinolonů v rámci ČR, ale i souhrnně v EU. Nejvyšší podíl na této spotřebě mají perorální lékové formy veterinárních léčivých přípravků, neboť jsou podávány skupinám zvířat, což je rovněž případ terapeutického či metafylaktického podání krutám. Naproti tomu injekčně podávaný enrofloxacin, či marbofloxacin, díky individualizovanému podání, tvoří minoritu spotřeb. Jelikož se enrofloxacin v těle zvířat různou mírou metabolizuje na mikrobiologicky účinný ciprofloxacin, je po podání enrofloxacinu nutné sledovat obě tyto látky a jejich osud jak ve tkáních zvířat určených k lidskému spotřebě, jejich produktech, tak také v exkrementech a následně případně v půdě. U krůt jsou veterinární léčivé přípravky obsahující enrofloxacin schváleny pro podání v indikacích léčby infekcí vyvolaných *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* a *Pasteurella multocida* s potvrzenou citlivostí.

V případě kolistinu, jsou jeho spotřeby v rámci České republiky minimální, nicméně stále ještě je ve vybraných chovech prasat, kura domácího či krůt používán, a proto není možné jej opomíjet. U krůt jsou veterinární léčivé přípravky obsahující kolistin schváleny pro podání v indikacích léčby a metafylaxe střevních infekcí vyvolaných neinvazivními *E. coli* citlivými ke kolistinu, přičemž před metafylaktickou léčbou by měla být stanovena přítomnost onemocnění v hejnu. Důležitost kolistinu a nutnost jeho zařazení ještě podtrhuje fakt, že je pro lékaře v humánní medicíně mnohdy i poslední možnou volbou a tedy i šancí pro pacienty s těžkými infekcemi vyvolanými gramnegativními multirezistentními bakteriemi.

Pro případný monitoring dopadů na půdní složku životního prostředí s ohledem na podání enrofloxacinu či kolistinu krūtám, je klíčové sledovat:

- I) Rezidua enrofloxacinu (metabolitu ciprofloxacinu) a kolistinu v půdě, zejména tam, kde je použita fermentovaná podestýlka s trusem z chovů krūt (či jiných tímto antimikrobikem ošetřených species a kategorií zvířat).
- II) Výskyt rezistence
 - a. k fluorovaným chinolonům:

přítomnost genů rezistence, např. geny *par*, *gyr*, *qep*, *oqx*, *aac(6')**lb* či dalších dle aktuálního stavu poznání a odborné rozvahy a zaměřit se především na detekci transferabilní rezistence přenášené pomocí plazmidů (PMQR).
 - b. ke kolistinu:

se speciálním zaměřením na transferabilní rezistenci kódovanou geny *mcr*

1.1.1 Kolistin

Kolistin (polymyxin E) je cyklické polypeptidové antibiotikum ze skupiny polymyxinů. Původně byl izolován roku 1947 jako sekundární metabolit ze sporulující půdní bakterie *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus* (dle původního taxonomického zařazení *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*). Polymyxiny jsou kationické polypeptidy skládající se z cyklického heptapeptidu s tripeptidovým postranním řetězcem acylovaným na N-konci skupinou mastných kyselin. Kolistin je vícesložkový, ze 70 až 80 % aktivity je tvořeno molekulou dvou kolistinů A a B, odlišujících se acylovou skupinou na jejich N-konci (U kolistinu A: acylová skupina: (S)-6-methyloktanoyl a u kolistinu B: acylová skupina: 6-methylheptanoyl).

Ve veterinární medicíně jsou v ČR registrovány a používají se veterinární léčivé přípravky obsahující kolistin ve formě sulfátu a jsou podávány perorálně.

Kolistin je účinný proti gramnegativním bakteriím a v současnosti jsou jeho účinky popisovány již velmi komplexně, jako:

- působení na destabilizaci lipopolysacharidové složky, s dopadem na zvýšení permeability bakteriální membrány (následuje pro bakterii fatální únik intracelulárního obsahu).
- mechanismus tzv. vezikulárního kontaktu mezi periplazmatickou vrstvou vnější a vnitřní membrány gramnegativních bakterií, kdy elektrostatickými interakcemi

finálně dochází ke strukturním změnám a narušení osmotické rovnováhy vedoucí k buněčné lýze.

- tzv. anti-endotoxinová aktivita, tedy schopnost neutralizovat uvolňující se bakteriální endotoxin při lýze buňky navázáním se na lipid A (součást lipopolysacharidové složky buněčné stěny u gramnegativních bakterií).
- dalším možným mechanismem je i lýza buňky prostřednictvím akumulace hydroxylových radikálů ($\cdot\text{OH}$) – vysvětlení nabízí schopnost kolistinu vyvolat tvorbu reaktivních forem kyslíku a poškodit DNA, lipidy a proteiny cílové bakteriální buňky.
- inhibice pro bakteriální buňku nezbytných enzymů respirace (NADH: quinonové oxidoreduktázy typu II) lokalizovaných ve vnitřní membráně gramnegativních bakterií.

1.1.2 Enrofloxacin

Enrofloxacin patří mezi zástupce tzv. fluorovaných chinolonů. Název 1-cyklopropyl-7-(4-ethylpiperazin-1-yl)-6-fluor-4-oxochinolin-3-karboxylová kyselina dle IUPAC napovídá, že se strukturou jedná o fluorovaný chinolon s oxoskupinou na uhlíku C4, fluorem na uhlíku C6, přičemž ethylpiperazinová skupina je lokalizovaná na uhlíku C7 a zvyšuje aktivitu a rozšiřuje spektrum působení na různé species bakterií. Zatímco cyklopropylová substituce na dusíku N1 zvyšuje antibakteriální účinek, ethylová skupina na piperazinu zvyšuje lipofilitu a snižuje toxicitu pro centrální nervový systém. Má charakter zwitterionu, s hodnotami $\text{pK}_{\text{a}1}$ v rozmezí 5,88–6,06 a $\text{pK}_{\text{a}2}$ v rozmezí hodnot 7,70–7,74. Působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie, zásahem topoizomerázy IV či DNA gyrázy, čímž narušuje schopnost vytvoření superhelikální struktury dvoušroubovice DNA u zasažené bakterie.

2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU

Funkční úkol (FÚ) pro rok 2025 je zaměřen na sledování reziduí a rezistencí po podání antibiotik používaných u masných plemen krůt.

Parciálními cíly jsou:

- analýza posledních dostupných dat o spotřebách fluorochinolonů a kolistinu v letech 2018–2024 v České republice, a to se zvláštním důrazem na data týkající se jejich spotřeby v chovech krůt v ČR za roky 2023 a 2024.
- stanovení reziduí enrofloxacinu, jeho metabolitu ciprofloxacinu a kolistinu v matricích podestýlka s trusem a medikovaná napájecí voda. Ke stanovení enrofloxacinu (a metabolitu ciprofloxacinu) u léčených zvířat a v půdě budou zvoleny vhodné detekční a kvantifikační chemické metody. V případě kolistinu bude odzkoušena možnost využití mikrobiologické metody pro stanovení v matrici podestýlka s trusem a medikovaná napájecí voda.
- monitorování výskytu vybraných genů rezistence vůči chinolonům a kolistinu v prostředí farmy. K tomuto účelu budou ověřeny a použity vhodné kultivační a molekulárně biologické metody.

Cílů bude dosaženo provedením následujících úkolů:

- A. Analýza dostupných dat o spotřebách antibiotik používaných u krůt chovaných na maso v České republice (A1), vývoj metodiky pro detekci kolistinu a případně kvantifikaci obsahu kolistinu v napájecí vodě, podestýlce, ve zrající mrvě a v půdě po aplikaci vyzrálé mrvy od medikovaných zvířat mikrobiologickou metodou (A2) – ÚSKVBL
- B. Optimalizace metodiky a vlastní stanovení obsahů vybraných látek (enrofloxacinu a ciprofloxacinu) v napájecí vodě, podestýlce, ve zrající mrvě a v půdě po aplikaci vyzrálé mrvy od medikovaných zvířat – VUT, ÚKZÚZ
- C. Pomocí vhodných fenotypových a genotypových metod budou získány informace o abundanci vybraných genů zodpovědných za rezistenci k fluorochinolonům se zaměřením na geny významné z pohledu horizontálního přenosu rezistence ve faeces, podestýlce a stěrech z prostředí farmy – MUNI
- D. Modelový pokus s využitím fermentace mrvy a jejím zapracování do půdy umožní stanovit dobu přežívání rezistentních bakterií v prostředí a změny obsahu reziduí sledovaných látek – MUNI, VUT, ÚKZÚZ

3. SPOTŘEBY ANTIBIOTIK POUŽÍVANÝCH U KRŮT CHOVANÝCH NA MASO V ČESKÉ REPUBLICE

Informace o konkrétních spotřebách u krůt jsou uvedeny v celkovém kontextu spotřeb antimikrobik u potravin produkujících zvířat a cíleněji pak u drůbeže.

V Evropské Unii patří spotřeba fluorochinolonů, a kolistinu, jak v humánní, tak veterinární medicíně mezi zásadní sekundární indikátory kvality používání antimikrobik. Primárním indikátorem ve veterinární medicíně jsou celkové spotřeby (*de facto* prodeje) antimikrobik přepočtené na populace zvířat. Česká republika dlouhodobě snižuje celkové spotřeby antimikrobik. Poslední data za rok 2024 ukazují spotřebu ČR (42,69 mg/PCU) hluboce pod průměrem vyjádřeným sumárně pro země EU (89,6 mg/PCU), který však v posledních letech také velmi výrazně klesl. V rámci EU byla schválena Strategie Farm to Fork, která cílí na 50% pokles celkových prodejů antimikrobik u potravin produkujících zvířat a akvakultur za období 2018–2030. Data za ČR ukazují, že se již podařilo do roku 2024 snížit spotřeby antimikrobik o 25 % (2018: 59,93 mg/PCU – 2024: 42,69 mg/PCU), přičemž již v předchozím desetiletém období (2008–2018) ČR dokázala snížit používání antimikrobik u hospodářských zvířat o 50 %.

Od roku 2023 byl zahájen sběr, odevzdávání a vyhodnocování dat o prodejkách (SALEs) a použití (USE) antimikrobik v systému ESUAvet (European Sales and Use of Veterinary Antimicrobials). Zde se namísto jednotky PCU pro vyjádření biomasy, u které jsou použita antimikrobika, využívá nového systému kalkulace “kg biomasy” vypočtené z hmotnosti při porážení zvířat. V rámci celé EU (+ NO a IS) byla dle systému ESUAvet spotřeba všech antimikrobik u hospodářských zvířat v roce 2023: 37,3 mg/kg biomasy (ČR za stejný rok o 31,8 mg/kg biomasy, tedy o téměř 15 % méně) a v roce 2024: 34,3 mg/kg biomasy (ČR za tento rok 30,6 mg/kg biomasy, tedy téměř o 11% méně). Pokud bychom shrnuli spotřebu vysoce kriticky významných antimikrobik skupiny AMEG B (kolistin, fluorochinolony/chinolony a cefalosporiny 3. a 4. generace) pak v rámci EU (+NO a IS) byla spotřeba v roce 2023: 0,88 mg/kg biomasy a 2024: 0,87 mg/kg biomasy, v ČR však byla spotřeba těchto antimikrobik vyšší než hodnota EU (+ NO a IS) a to 1,3 mg/kg biomasy v roce 2023 a mírný pokles na 1,2 mg/kg biomasy byl zaznamenán v roce 2024.

Pokud bychom pozornost věnovali specificky trendům spotřeby antimikrobik u krůt, nově se v systému ESUAvet sbírají data o populaci krůt na výkrm a také krůt chovných a adekvátně tomu i data o použití (terapeutickém nebo metafylaktickém) antimikrobik. ČR nemá dlouhodobě chovné krůty. Všechna krůťata chovaná následně v ČR pro produkci masa jsou tedy dovážena a následně v ČR vykrmena. Tuzemští chovatelé však nemají žádný vliv na

kvalitu dovážených krůtat (ve smyslu, zda jejich rodičům byla či nebyla podávána antimikrobika a s jakou frekvencí). To, zda byla rodičovská hejna medikována antimikrobiky se pak může promítnout i do kvality krůtat, jejich mikrobiomu a genů rezistence vůči antimikrobikům, které si s sebou do chovů přivážejí spolu s mikrobiomem. Od roku 2023 jsou hlášena, odevzdávána a vyhodnocována data o použití antimikrobik pro krůty. V ČR, vzhledem k výše uvedeným informacím, tedy pouze pro krůty na výkrm (krůty chované pro produkci masa). V roce 2023 u těchto zvířat bylo v ČR spotřebováno 26,36 mg antimikrobik/kg biomasy a v roce 2024 došlo k nárůstu těchto spotřeb na 30,42 mg/kg biomasy, tedy k nárůstu spotřeb o 15,4 % (což vzhledem k nově zavedenému systému pro tuto kategorii zvířat může být způsobeno rovněž tím, že systém se v roce 2023 teprve zaváděl a nějakou dobu trvalo, než veterinární lékaři dokázali zpřesnit hlášení na jednotlivé kategorie u drůbeže (kur domácí na výkrm, kur domácí nosnice, kur domácí rodičovská a prarodičovská hejna a krůta domácí na výkrm). Je tedy možné, že nárůst mohl vzniknout i zpřesňováním hlášení v čase.

Pokud jde o spotřebu kriticky významných antimikrobik, sekundárních indikátorů, činily celkové prodeje fluorochinolonů (bez nefluorovaných chinolonů) pro všechna potraviny produkující zvířata rámci EU 2,8 % z celkových prodejů antimikrobik, přičemž prodeje fluorochinolonů (v perorální a injekční lékové formě) meziročně v EU vzrostly z 1,1 mg/kg v roce 2023 na 1,3 mg/kg v roce 2024 (data ESUAvet).

Kolistin, patřící do skupiny polymyxinů, není samostatně uváděn (nicméně tyto prodeje vyjadřují *de facto* v téměř 100 % kolistin). Prodeje této skupiny (pouze perorální lékové formy), zůstávají v letech 2023 a 2024 shodné, 1,2 mg/kg biomasy a tvořily 2,7 % celkových prodejů antimikrobik zemí EU (data ESUAvet).

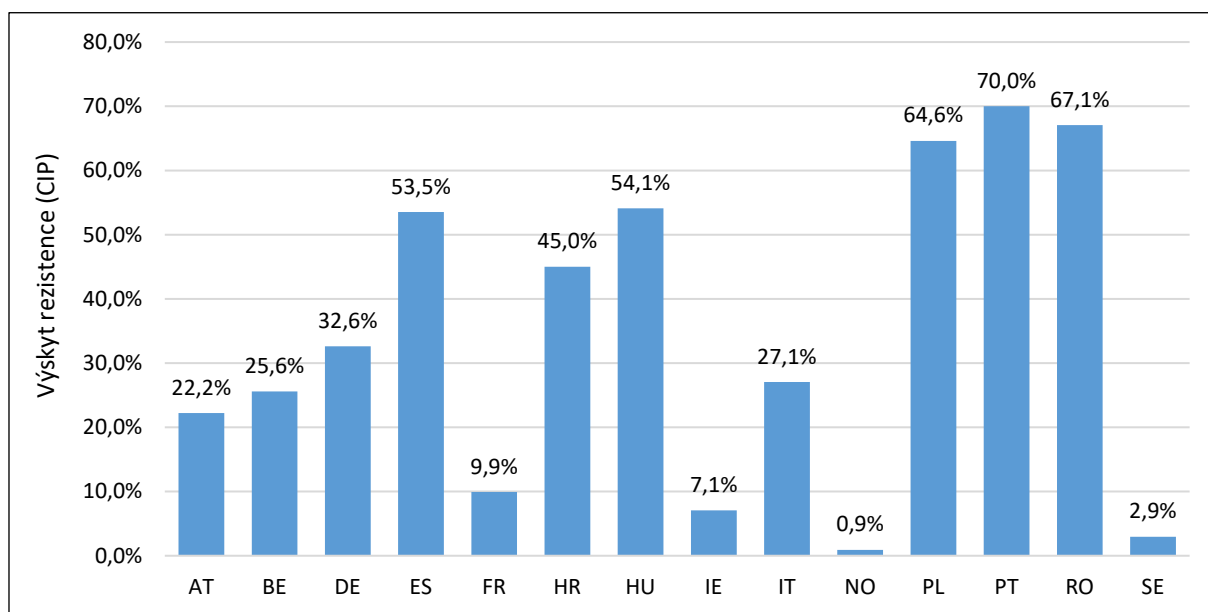
3.1 Spotřeby enrofloxacinu a kolistinu u drůbeže/krůt

V České republice představuje enrofloxacin největší objem spotřeb v rámci skupiny fluorochinolonů. Majorita celkových hmotnostních objemů enrofloxacinu je použita u drůbeže, konkrétně u brojlerů kura domácího (a to i z důvodu množství odchovaných brojlerů kura, nicméně spotřeby lze následně přepočítat na jednotku populace, a tak srovnat míru podání u kura a krůt). U masných plemen kura je enrofloxacin metafylakticky či terapeuticky podáván 3–4 dny, v období prvního týdne a zejména tam, kde dynamika úhynů s bakteriální etiologií či progredující onemocnění šířící se v rámci hejna ukazuje na nutnost podání. U krůt byly hmotnostní objemy (kg enrofloxacinu vyšší v roce 2023 (konkrétně 76,31 kg), zatímco v roce

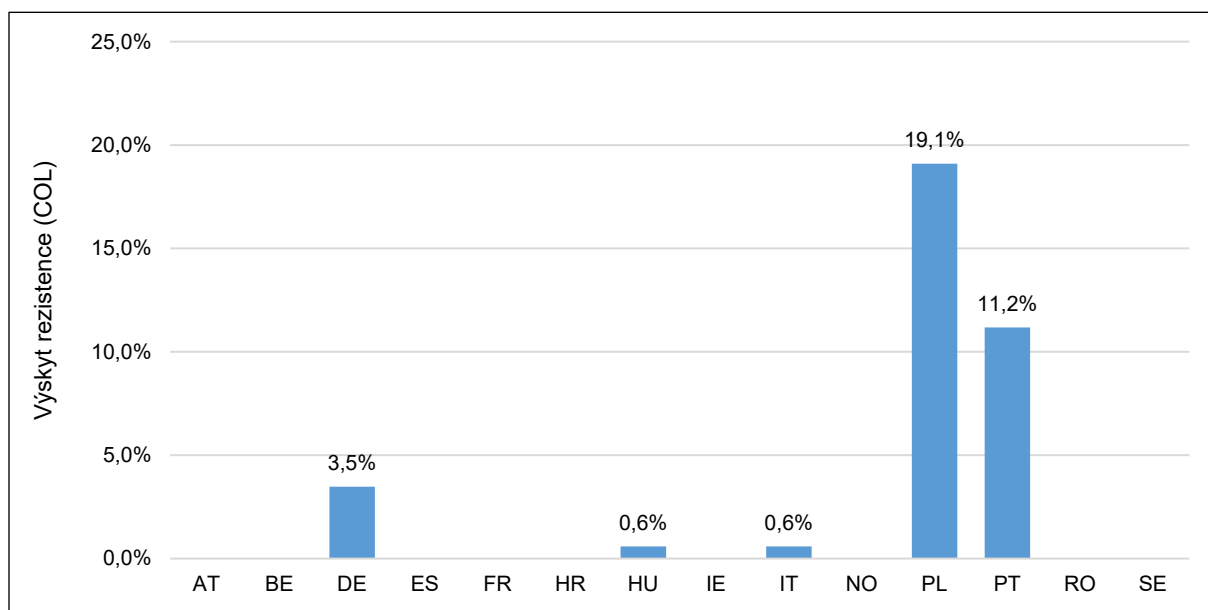
2024 spotřeby tohoto antimikrobika poklesly o 17 %, na 63,73 kg. Enrofloxacin je podáván v dávce 10 mg/kg ž.hm./den jak u kura, tak u krůt. Vzhledem k časnému podání v období prvních dnů podání u kura, je množství léčivé látky enrofloxacinu (celkový hmotnostní objem) předmětných VLP zde podaných minimální (kuřata v tomto věku mají hmotnost přibližně 50 až 70 g/kus), do celkových spotřeb se však u kura promítá velikost chované populace, zejména pak produkční kategorie brojlera kura domácího. U krůt bývá naopak podání v pozdějších fázích výkrmu, v případech, kdy jsou zvířata s projevy onemocnění např. vyvolaného *Mycoplasma* spp., tudíž jsou ošetřována zvířata o větší hmotnosti a na stejný počet jedinců se spotřebuje větší hmotnostní objem léčivé látky z daného VLP.

Enrofloxacin v ČR patří mezi antimikrobika v režimu indikačního omezení, pro které novela zákona č. 314/2022 Sb., o léčivech stanovuje zvláštní, zprísněná pravidla používání. Podání enrofloxacinu by tak mělo být vždy, když je to možné, provedeno na základě výsledků vyšetření citlivosti kauzálních bakterií, získaných z uhynulých či nemocných jedinců. V rámci sektoru brojlerů kura domácího má ČR dlouhodobě dostupná data k profilům rezistence k enrofloxacinu zejména u *E. coli* – izolátů zahrnutých do monitoringu cílových patogenů. U vybraných bakteriálních agens (*E. coli*, salmonely, kampylobaktery) jsou rovněž sledovány rezistence k fluorochinolonům a recentní data ukazují, že jsou již i v ČR velmi vysoké. Míra používání enrofloxacinu u kura se promítá i do míry rezistence. V roce 2022 byla u indikátorových *E. coli* izolovaných z brojlerů kura zjištěna 85% rezistence (data národního monitoringu zoonotických a indikátorových *E. coli*), včetně přítomnosti QRDR (quinolone resistance-determining region). Tento fakt svědčí o vysoké míře selekčního tlaku (interní komunikace, MVDr. T. Černý, NRL pro AMR při SVÚ Praha, Výsledky pro indikátorové *E.coli* – kur domácí). Z data EFSA pro rok 2022 vyplynulo, že rezistence vůči (fluoro) chinolonům (ciprofloxacin a kyselina nalidixová) byla zaznamenána na vysoké až velmi vysoké úrovni u izolátů *Salmonella* spp. a indikátorových komenzálních *E. coli* izolovaných nejen z brojlerů, ale i výkrmových krůt a dovezeného drůbežího masa. Také u *Salmonella* spp. byl v období 2014–2023 zaznamenán statisticky významný vzestupný trend v rezistenci na ciprofloxacin na úrovni členských států u brojlerů a nosnic. U výkrmových krůt byly zaznamenány vysoké rezistence k fluorochinolonům (32,6%) a naopak raritní rezistence ke kolistinu. Z pohledu trendů byl také zjištěn statisticky významný pokles rezistence vůči ampicilinu, ciprofloxacinu, cefotaximu, tetracyklinu a kolistinu, stejně jako nárůst kompletní citlivosti a, klíčového výstupního indikátoru kompletní citlivosti, což svědčí o pokroku směrem k nižší úrovni rezistence v několika zemích. Zlepšení situace bylo v posledních letech

nejvýraznější u brojlerů a výkrmových krůt. (EFSA, [The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2022–2023 - - 2025 - EFSA Journal - Wiley Online Library](#)). Data z předmětné zprávy EFSA je nutno vnímat především z pohledu faktu, že všechny krůty na výkrm jsou dováženy, mnohdy ze zemí, kde jsou rezistence ke kolistinu či ciprofloxacinu vysoké.



tabázek 1. *Proporce výskytu rezistence E.coli, krůty – výkrm, ciprofloxacin: (EFSA, data 2022: [Dashboard on antimicrobial Resistance | EFSA](#))*



Obrázek 2. *Proporce výskytu rezistence E.coli, krůty – výkrm, kolistín (EFSA, 2022: [Dashboard on antimicrobial Resistance | EFSA](#))*

Jak již bylo nastíněno výše, u krůt je většinou situace poněkud odlišná, a to i s ohledem na celkovou délku výkrmu a případný výskyt patogenů, které je nutno léčit. Zde bývá enrofloxacin podáván spíše v průběhu výkrmu, nikoliv pouze na samém počátku. Situace se však může u jednotlivých odchovů (produkčních cyklů) lišit v závislosti na incidenci onemocnění. Problémem v ČR ale jsou chybějící data k citlivosti a rezistenci, jak u indikátorových *E. coli*, tak u cílových patogenů izolovaných z krůt. Počty chovaných krůt nedosahují limity, pro které je monitorování rezistence k enrofloxacinu, ale i kolistinu u indikátorových *E. coli* povinné, a proto nejsou tato vyšetření kofinancována. Každý majitel chovu si tak, pokud to (po konzultaci s veterinárním lékařem) považuje za nutné, musí zaplatit za kultivaci a testování citlivosti. V případě použití enrofloxacinu, s ohledem na režim indikačního omezení daný zákonem o léčivech (novela 314/2022, v účinnosti od 1. prosince 2022) musí, vždy když je to možné, provést odběr vzorků na testování citlivosti cílových patogenů. Pro kolistin prozatím režim indikačního omezení neplatí. V případě indikovaného použití enrofloxacinu na vybrané infekce je zde však kromě otázky finanční (cena vyšetření) a logistické (doprava vzorků do laboratoře) také problém ztížené diagnostiky, kultivace a náročnosti testování bakterií z rodu *Mycoplasma*.

V případě kolistinu je celkově toto antimikrobikum u drůbeže podáváno až raritně, tj. v minimálním rozsahu. U výkrmových brojlerů se kolistin samostatně téměř nepodává. U krůt pak spíše v pozdějších stádiích výkrmu a v období rizika souvisejícího se stresem či přesunem zvířat při dělení krůt a krocanů do oddělených hal pro další výkrm. V těchto situacích jsou zvířata více náchylná k propuknutí onemocnění. Konkrétně u krůt v ČR byla spotřeba kolistinu v roce 2023 9,80 kg a v roce 2024 nebylo použití kolistinu u krůt v ČR vůbec nahlášeno (a ani zjištěno cílenou inspekcí). Jelikož však některé státy EU kolistin u krůt používají v nemalém rozsahu, byl i toto jeden z důvodů, zařadit tuto léčivou látku do projektu funkčního úkolu. V roce 2025 došlo na jednom z chovů k použití kolistinu, čehož bylo využito k odběrům vzorků.

3.2 Metodika sledování spotřeb antimikrobik (A1)

Pod pojem “spotřeba” antimikrobik lze zahrnout dva specifické pojmy:

PRODEJ antimikrobik, který pokrývá celková data pro určité teritorium (ČR či EU) a hovoří o kvantitě prodaných množství VLP obsahujících antimikrobik (vyjádřený v tunách léčivých látek charakteru antimikrobika) s presumpcí, že byly v daném období i spotřebovány v rámci

daného teritoria (počítá se s určitým meziročním přesahem finálního použití z dlouhodobé perspektivy víceméně stabilním);

POUŽITÍ antimikrobik, kdy tento pojem pokrývá, v co nejvyšším možném rozsahu reálné použití, navíc rozdělené na species a kategorie zvířat.

Prezentované odborné informace k celkovým prodejm byly primárně získány sběrem a vyhodnocením dat o prodejm shromážděných od distributorů a mícháren medikovaných krmiv v rámci České republiky. Takto jsou data dlouhodobě sbírána a shromažďována od roku 2003 (kvartální sběr dat od výše uvedených subjektů), systém je validován, jednotlivé datové sady jsou nahrávány do databáze ÚSKVBL a souhrnně ročně posouzeny z pohledu kvality dat a následně jejich podrobného vyhodnocení. Od roku 2009 toto vyhodnocení probíhá pravidelně 1x ročně ve spolupráci s Evropskou lékovou agenturou (EMA). Data za ČR byla pak pravidelně součástí tzv. zpráv ESVAC (počínaje první zprávou za období 2005–2009, konče poslední zprávou za rok 2022, zveřejněnou na podzim 2023). V posledních letech byly na webových stránkách EMA publikovány také specifické národní zprávy k prodejm antimikrobik (včetně podrobných dat k sekundárním indikátorům kvality spotřeb – fluorovaným chinolonům a polymyxinům (*de facto* kolistinu).

Dle nařízení o veterinárních léčivých přípravcích (EU) 2019/6 (zde zejména čl. 57) se stalo sledování prodejů a použití antimikrobik u zvířat povinným. Byla zbudována tzv. Union Product Databáze (UPD), na kterou musely být provázány národní databáze veterinárních léčivých přípravků (VLP). ČR má k dispozici národní databázi VLP v rámci ÚSKVBL od roku 2010 (včetně systému, kdy jsou každému VLP přiděleny registrační číslo a každému typu balení je přidělen i unikátní kód). Toto muselo být provázáno na tzv. “product identifier” a “unique package identifier” v EMA UPD. Je rovněž vhodné podotknout, že systém kódování léčivých přípravků – tzv. unikátní kódy balení (známé též jako tzv. SÚKL kódy) má ČR zavedeny na shodném principu pro humánní i veterinární léčivé přípravky již více než 30 let.

Z důvodu výše uvedených, je povinné sbírat a odevzdávat data nejen o prodejm, ale i o použití antimikrobik u zvířat. Počínaje rokem 2023 je tak možné sledovat nejen vývoj celkových prodejů, ale i použití konkrétně u vybraných species a produkčních kategorií zvířat (skot, prasata, kur a krůty). Od roku 2026 budou následovat další species potravin produkujících zvířat (včetně koní a ryb), od roku 2029 pak psi, kočky a kožesinová zvířata (lišky a norci, ve státech, kde je chov kožesinových zvířat i nadále povolen). V rámci nového povinného systému, ESUAvet jsou tak shromažďována podrobnější data. Od roku 2023 jsou konkrétně za ČR k dispozici data o použití u následujících cílových druhů a jejich kategorií:

- Skot (masný, mléčný a ostatní (zahrnuje především chovné /plemenné jedince)
- Prasata (výkrm a ostatní (zahrnuje především chovné/plemenné jedince)
- Kur domácí (brojleři masní, nosnice konzumních vajec, ostatní – rodiče a prarodiče)
- Krůty (brojleři masní, ostatní - rodiče a prarodiče, *pozn. kategorie ostatní není v ČR*)

Jelikož v prvním roce (2023) nebyly všechny státy schopny dodat informace o používání antimikrobik pro jednotlivé species/kategorie v požadovaném rozsahu, nebyla konkrétní data publikována. Data za ČR však byla v požadované kvalitě dodána již za rok 2023 a jsou i zpracována. ČR zdrojová data o používání antimikrobik získává prozatím systémem hlášení veterinárních lékařů přes zavedenou síť distributorů (při objednání VLP je indikováno koncové použití na species a kategorii zvířat). Do dalšího období se předpokládá zpřesnění dat využitím aplikací navazujících na faremní software či aplikací přímo pro veterinární lékaře sloužících zároveň jako deník léčby, avšak schopných i sumarizovat a odesílat data o použití antimikrobních VLP. Za rok 2024 již budou (prosinec 2025) publikována data těch států, jejichž pokrytí (používání v rámci daného sektoru zvířat) přesáhlo 90 %.

Z výše uvedeného vyplývá, že ČR již disponuje daty o použití antimikrobik u komerčních chovů krůt od roku 2023. Podstatnou informací, nejen z pohledu sledování používání antimikrobik, ale je, že v ČR nejsou chována rodičovská hejna krůt. Všichni brojleři krůt pro výkrm jsou tedy dováženi z jiných zemí, což má dopady i z pohledu epizootologického (včetně možnosti přenosu bakteriálních patogenů a genů AMR). AMR u bakterií izolovaných z krůt chovaných v ČR či z faeces těchto krůt je tedy ovlivněna nejen selekčním tlakem antimikrobik podávaných přímo v českých chovech, ale může být ovlivněna i nakládáním s antibiotiky v zemi původu. V předmětné studii byla krůťata dovezena z Německa, kde je míra používání fluorochinolonů přepočtená na jednotku biomasy nižší než v ČR, naopak mírná podávání kolistinu je výrazně vyšší než v ČR (viz graf s daty 2024).

Z pohledu kvantifikace spotřeb (prodejů či použití) je rovněž zásadní uvést, že spotřeby mohou být vyjádřeny buď množstvím léčivých látek (tuny, kg či mg) nebo množstvím léčivých látek vztažených na jednotky reflektující populaci zvířat chovaných na daném teritoriu. V rámci EU byla pro vyjádření populací zvířat dlouhodobě používána jednotka PCU (Population Correction Unit), která reflektovala populace potravinu produkujících zvířat včetně koní a akvakultur a využívala kalkulace vycházející z počtu zvířat a odhadované hmotnosti v době léčby. Tato jednotka byla používána v hodnoceních v rámci projektu ESVAC a zůstává i jednotkou používanou pro zhodnocení dlouhodobého trendu v rámci Strategie Farm to Fork (2018–2030),

kdy jsou objemy antimikrobik vyjádřené v miligramech vždy vztaženy na tuto jednotku reflektující populace chovaných a ošetřovaných zvířat (mg/PCU).

Od roku 2023, i z důvodu harmonizace s daty, která jsou sbírána Světovou organizací pro zdraví zvířat (WOAH, databáze ANIMUSE), kam ČR rovněž doposud dodávala data o prodejkách, byla pro projekt ESUAvet zvolena jiná jednotka. Zůstává (s minimálními odchylkami) kvantifikace množství léčivých látek charakteru antimikrobik vyjádřená v hmotnostním objemu (mg), ale je vztažena k jednotce biomasy zvířat (nově kg biomasy), která je kalkulována se zohledněním porážkových hmotností, které jsou vyšší než hmotnosti, které byly uváděny a započítány do PCU. Tím pádem takto “aritmeticky” byla navýšena biomasa/populace zvířat a celkové použití reportované v rámci ESUAvet (mg/kg biomasy) se jeví “číselně nižší” než to reportované v rámci ESVAC (mg/PCU). Tento krok byl nutný, neboť pokud by EU zůstala u původní jednotky, působily by v kontextu světových dat její spotřeby vyšší.

Oba typy dat (ESUAvet i ESVAC) jsou dostupná pro jednotlivé skupiny antimikrobik, či pro jednotlivé lékové formy, či agregovaně pro všechny léčivé látky a všechny lékové formy, a to jak ve formě konsolidovaných zpráv, tak také ve formě elektronické na webových stránkách EMA, kdy se připravují jejich interaktivní náhledy v podobě tzv. Dashboards.

Všech kroků v rámci obou projektů se ČR aktivně účastnila a i nadále účastní, a to prostřednictvím návrhů a připomínek k jednotlivým komponentám záznamu, uchovávání, hodnocení a publikace dat, jelikož po celou dobu měla zastoupení ve zúžené expertní skupině (ne vždy se však podařilo všechny navrhované varianty prosadit).

3.3 Spotřeby antimikrobik

V rámci České republiky byla zaznamenána data o používání VLP obsahujících antimikrobika u krůt za roky 2023 a 2024.

V roce 2023 bylo do ČR (dle dat ČSÚ a ústřední evidence drůbeže) dovezeno 1 008 509 kusů krůt k výkrmu, přičemž dle dat EUROSTAT bylo v ČR poraženo 172 720, dle dat TRACES vyvezeno k porážce 632 291 krůt (rozdíl, vývoz či porážka následující rok). V roce 2024 bylo do ČR dovezeno 930 396 krůt, dle dat EUROSTAT poražen v ČR bylo 169 990 krůt a vyvezeno na porážku 648 780 krůt. Pro spotřeby antimikrobik jsou zásadní počty krůt, které byly dovezeny a v daném roce byl u nich zahájen tedy i výkrm. Nicméně pro vyjádření používání v rámci projektu ESUAvet se však používají počty poražených (vnitrostátně i mimo území

daného státu sledujícího spotřeby, je to z důvodu harmonizace se světem a uvádění dat v databázi ANIMUSE (spravované Světovou organizací pro zdraví zvířat WOAH).

V tabulce níže jsou uvedeny přehledy používání antimikrobik v chovech krůt na území ČR za rok 2023 a 2024 a to jak v celkových hmotnostních objemech (kg) pro jednotlivá antimikrobika a v hmotnostních objemech vztažených na jednotku biomasy (mg /kg biomasy v ČR odchovaných krůt). Z dat v tabulce je patrné, že meziročně (2023 vs 2024) došlo k poklesu používání obou antimikrobik. U enrofloxacinu bylo používání sníženo o téměř 18 %, v případě kolistinu bylo používání sníženo o 100 % (dle záznamů o odebraném množství VLP s kolistinem s použitím u krůt byla spotřeba nulová).

Tabulka 1. Použití antimikrobik u krůt v letech 2023 a 2024, data v hmotnostních objemech (kg) a objemech léčivých látek charakteru antimikrobik vyjádřených na kg biomasy krůt chovaných na produkci masa na území ČR.

	Použití 2023 (Kg)	Použití 2023 (mg/kg biomasy)	Léčivá látka	Použití 2024 (Kg)	Použití 2024 (mg/kg biomasy)
Enrofloxacin	76,31	7,18	Doxycyclin	137,04	12,68
Phenoxymethylpenicilin	60,94	5,74	Enrofloxacin	63,73	5,90
Doxycyclin	52,99	4,99	Phenoxymethylpenicilin	39,26	3,63
Amoxicilin	43,27	4,07	Amoxicilin	35,75	3,31
Sulfamethoxazol	17,00	1,60	Sulfamethoxazol	25,00	2,31
Kolistin	9,80	0,92	Sulfadimidin	8,81	0,82
Linkomycin	4,24	0,40	Trimethoprim	7,37	0,68
Trimethoprim	4,21	0,40	Spektinomycin	6,00	0,56
Sulfadimidin	3,71	0,35	Linkomycin	3,00	0,28
Tylosin	3,00	0,28	Tylosin	2,49	0,23
Neomycin	1,97	0,19	Florfenikol	0,30	0,03
Spektinomycin	1,93	0,18	Neomycin	0,00	0,00
Florfenikol	0,60	0,06	Erythromycin	0,00	0,00
Sulfaclozin	0,08	0,01	Spiramycin	0,00	0,00
Tiamulin	0,02	0,00	Tilmikosin	0,00	0,00
Erythromycin	0,00	0,00	Tylvalosin	0,00	0,00
Spiramycin	0,00	0,00	Tiamulin	0,00	0,00
Tilmikosin	0,00	0,00	Kolistin	0,00	0,00
Tylvalosin	0,00	0,00	Sulfaklozin	0,00	0,00
Sulfadimethoxin	0,00	0,00	Sulfadimethoxin	0,00	0,00
Chlortetracyklin	0,00	0,00	Chlortetracyklin	0,00	0,00
Oxytetracyklin	0,00	0,00	Oxytetracyklin	0,00	0,00

4. MATERIÁL A METODIKA

Experimentální část se skládala ze tří úrovní – farmy s chovem krůt, fermentace krůtí podestýlky a polního pokusu.

4.1 Výkrm krůt

S ohledem na cíl funkčního úkolu, byla vybrána farma s chovem masných krůt, kde u některých turnusů docházelo v minulých dvou letech k terapeutickému a/nebo metafylaktickému podávání veterinárních léčivých přípravků s enrofloxacinem či s kolistinem (tento byl podáván pouze v roce 2023). Na základě dat o použití jak kolistinu, tak enrofloxacinu, které hlásí od roku 2023 jednotliví veterinární lékaři, byl identifikován veterinární lékař, který v minulých dvou letech indikoval a použil enrofloxacin (a v roce 2023 také kolistin). Při volbě antimikrobik se mimo klinické zkušenosti a aktuální klinické a *post mortem* nálezy opíral také o výsledky stanovení citlivosti *E. coli*. Předmětná antimikrobika byla indikována k podání u počínajících enteritid v chovu, a to zejména v okamžiku rozdělení hejna (do individuálních hal zvlášť krůty a krocani). V těchto případech, i z důvodu přesunů a stresu zvířat ošetřující veterinární lékař zvažoval podání kolistinu (v případě nutnosti následně i enrofloxacinu) v turnusu s produkcí masných krůt.

Zdravotní stav (kvalita) naskladňovaných zvířat je ovlivněna například stářím rodičovského hejna, jeho zdravím a vakcinačním statutem (vůči vybraným onemocněním, z nichž některá, ač jsou virového původu, mohou ovlivnit celkovou kondici zvířat a schopnost odolávat bakteriálním onemocněním, takže při oslabení virovým agens může nastoupit sekundární bakteriální infekce, na kterou je již vhodné/nutné podat antibiotikum). Vliv mívá i roční období (kritičtější jsou podzim a zima, či teplotní extrémy, kdy i haly s klimatizačními jednotkami mohou mít problém udržet vhodné a stabilní podmínky) či kvalitou a délkou transportu. U jednodenních krůťat se do 3–4 dne po naskladnění mohou vyskytnout infekce (pupku nebo septické stavy) způsobené původci, které ještě lze spojovat s prostředím rodičovského chovu a líhně. Pokud je hejno celkově v dobrém zdravotním stavu a kondici, míra umbilikálních infekcí a septických stavů případně až úhynů je velmi nízká, většinou postačí podat v napájecí vodě vitamín C a zabezpečit kvalitní krmivo a environmentální podmínky. Při zjevných příznacích výše uvedených infekcí, s rozvahou mikrobiologického profilu (rodiče a odběry i od naskladněných krůťat) a se zvážením rychlosti progresu a šíření onemocnění v hejně a míry úhynů je zvažováno nasazení antibiotik (u předmětného hejna byl těsně před vlastním odběrem

vzorků nasazen pouze kolistin (samostatně, nikoliv v kombinaci). Poznámka: VLP s kolistinem lze podat s jiným VLP s enrofloxacinem, či jiným VLP například s amoxicilinem, kde kombinaci kolistin/enrofloxacin či kolistin/amoxicilin je ve výjimečných případech vysokých úhynů a kombinovaných infekcí, či infekcí, kde původce reaguje už pouze na jednu z těchto synergických kombinací možno podat. V předmětném chovu byl perorálně do napájecí vody aplikován samostatně pouze VLP Colivet perorální roztok. Kromě naskladnění jednodenních krůťat, byly i v tomto turnusu monitorovány parametry životního prostředí zvířat (především vlhkost a teplota, funkčnost ventilátorů – s vlivem na proudění vzduchu, světlený a napájecí režim, množství amoniaku) a velmi zásadní je také kvalita krmiva (přesně vybalancované krmné směsi, dle stádia výkrmu) a kvalita napájecí vody.

Po prvních třech kritických momentech (líhnutí, transport a naskladnění) je další kritické období pro hejno výkrmových krůť při stresu z rozdělení hejna na krocany a krůty (ve stáří 48 dnů). Ve dnech těsně před rozdělením je již vysoká hustota osídlení haly (což samo o sobě je stresovým faktorem), následně je hejno vakcinováno a poté rozděleno a krocany jsou přesouváni do vedlejší vyčištěné, vydezinfikované a čistě podestlané haly. V daném zemědělském podniku probíhá přesun zvířat tunelem napojeným na druhou halu, aby se zabránilo ještě vyšší míře stresu převážením zvířat, či např. zátěží zvířat povětrnostními vlivy či vystavení zvířat riziku infekce z vnějšího prostředí. I přes obezřetný postup, i v tomto období se často vyskytují například enteritidy a pro léčbu již nemocných zvířat, zamezení dalšího šíření onemocnění, zabránění utrpení, či úhynů zvířat, jsou mnohdy podávána antibiotika. V předmětném chovu u krůť a krocany v turnusu naskladněném 7. 1. 2025 byla poprvé podána antibiotika 11.–16. 1. 2025 (6 dní VLP obsahující amoxicilin: Vetrimoxin 500 mg/g prášek pro perorální roztok, indikován byl z důvodu klostridiových infekcí), dále byl 1.–3. 2. 2025 podán VLP Baycox 25 mg/ml perorální roztok (indikován proti kokcidiím, obsahuje léčivou látku toltrazuril, což není antibiotikum) a následně ještě 4.–9. 2. 2025 (6 dní VLP obsahující linkomycin, Linco-sol 400 mg/g prášek pro podání v pitné vodě), jako poslední byl metafylakticky, z důvodů počínajících enteritid podán VLP Colivet perorální roztok, obsahující kolistin (jako colistini sulfas) 2 000 000 IU/ml. O všech podáních je vedena podrobná dokumentace v souladu s platnými právními předpisy – v knize záznamů o léčbě, včetně podaného množství a čísla šarže podaného VLP.

Charakteristika hospodářství

Do studie byl vybrán zemědělský podnik s chovem krůt z Pardubického kraje. V areálu předmětného podniku jsou umístěny dvě haly krůt, dále také haly brojlerů kura domácího a haly výkrmových prasat. Kapacita hal 1 a 2 pro krůty je do max 22 000 kusů. V hale s nastájením krůt bývá iniciálně nastájeno max 21 000 kusů. Ve věku 7 týdnů jsou rozděleni (krocanů je méně, jsou produkováni do vyššího věku a vyšší hmotnosti). V hale, ze které byly odebrány vzorky bylo na počátku nastájeno 21 000 krůt, z toho 13 250 krůt a 7750 krocanů, ke dni první léčby (11. 1. 2025, viz záznam o léčbě) se v důsledku úhynů zredukoval počet na 20 859 krůt (krůty i krocani), o měsíc později (9. 2. 2025, opět v důsledku úhynů) je v záznamu o léčbě linkomycinem uvedeno o 100 kusů krůt méně (20 759 kusů, viz záznam o léčbě).

V hale s prvoodběry podestýlky s trusem byly krůty ve stáří do 49 dní.

Do daného chovu byla navezena jednodenní krůťata plemene BUD 6 hybrid (Kartzfen) v přeprávkách většinou po 100 ks (případně po 90 ks). Neprobíhá zde sexování krůťat, ponechávají se společně krocani i krůty. Krůťata přijíždějí z líhně navakcinovaná (není k dispozici přesné vakcinační schéma).

Na farmě byl získán vzorek podestýlky k modelovému pokusu fermentace. Dále byl na farmě proveden screening výskytu genů rezistence ke kolistinu a enrofloxacinu v prostředí. Fermentace probíhala od 24. 2. do 30. 5. 2025 (celkem 14 týdnů). Pokusné políčko bylo založeno v areálu zkušební stanice ÚKZÚZ Chrlice, na fluvizemi. Po aplikaci vyzrálého hnoje byly z testovacího pozemku odebírány v pravidelných intervalech vzorky půdy.

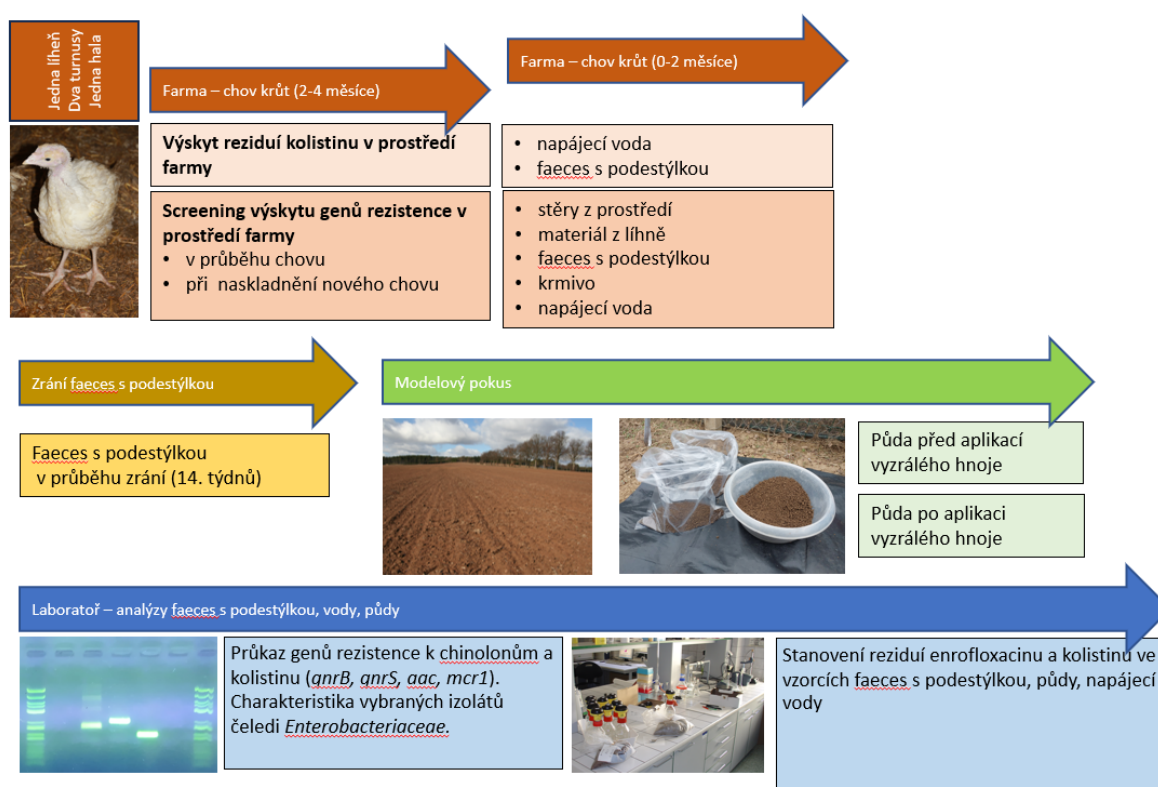
Odběry vzorků z výkrmové haly

Funkční úkol byl zahájen v chovné hale, ve které byly krůty ve věku 48 dnů, již oddělené od krocanů. Turnus byl sledován do 100. dne věku zvířat. Odběr čisté podestýlky, faeces s podestýlkou, napájecí vody a stěrů z napáječek, krmítek a stěn pod okny byl proveden dne 24. 2. 2025. Následující den (25. 2. 2025) byl krůtám podán kolistin, resp. bylo zahájeno podávání VLP Colivet, a to prostřednictvím napájecí vody.

Stěry z prostředí a odběry napájecí vody byly provedeny jednorázově, odběry vzorků faeces s podestýlkou ke stanovení genů rezistence k fluorochinolonům a kolistinu pravidelně po 2 týdnech. Stěry byly provedeny pomocí sterilní polyuretanové stěrové houbičky (World

Bioproducts, USA). Vzorky faeces s podestýlkou a krmiva byly uloženy do PE sáčků, uloženy do chladicího boxu a v den odběru předány do laboratoře. Ve stejných termínech byly odebrány vzorky faeces ke stanovení reziduí kolistinu mikrobiologickou metodou. Vzorky faeces byly odebírány z několika míst v hale z podlahy, přímo do PE sáčku.

Aby byl podchycen celý cyklus chovu krůt, tzn. i krůty ve stáří 1–48 dní, byly další odběry ve stejné chovné hale provedeny 23. 5. 2025, v den naskladnění nového turnusu. Byly odebrány stěry z napáječek, krmítek a stěn pod okny, vzorek čisté podestýlky (hoblin), vzorek napájecí vody ze začátku rozvodu a krabice z líhně, ve kterých byla kuřata převážena. Všechny tyto vzorky byly určeny ke stanovení genů rezistence k fluorochinolonům a kolistinu. Dále byly v pravidelných dvoutýdenních intervalech odebrány vzorky faeces s podestýlkou. Metodika odběru byla stejná jako u předchozího turnusu.



Obrázek 3. Aktivitty realizované v roce 2025 v rámci funkčního úkolu

4.1.1 Stanovení kolistinu (A2)

Pro stanovení koncentrace kolistinu v jednotlivých matricích (voda, půda, podestýlka s faeces) byla použita mikrobiologická difúzní plotnová metoda s referenčním kmenem sbírkového mikroorganismu (*Bordetella bronchiseptica* CCM 4416), který je vysoce citlivý ke zkoušenému antibiotiku. Na plotnách s vhodným agarovým médiem tak lze očekávat vytvoření inhibičních zón, kdy je umožněno srovnání zkoumaného antibiotika ve vzorku a jím vytvořené inhibiční zóny s inhibičními zónami vytvořenými známými koncentracemi antibiotika – standardní referenční látky (obrázek 4).

Rozsah koncentrací, které je vhodné otestovat, vycházel z toho, aby byla dodržena podmínka linearit mezi jednotlivými ředěními, a proto byly na základě předchozích analýz zvoleny následovně: 200 – 400 – 800 IU/ml. Podmínky inkubace byly 37 °C po dobu 24 h. Měření velikosti inhibičních zón bylo prováděno pomocí analyzátoru obrazu NIS-Elements (ver. 4.60), statistické vyhodnocení dat pak pomocí programu Combistats, který poskytuje EDQM.

Použité materiály a chemikálie:

Standard kolistin sulfátu (EDQM) o koncentraci 10 000 IU/ml.

Kultivační médium pro provádění mikrobiologické difúzní jamkové metody: Antibiotic Medium B (fa HiMedia) se složením odpovídajícím doporučení dle Českého Lékopisu v platném znění.

Ředicí roztoky: sterilní voda jako základní ředidlo, následná ředění pufr o pH 6,0, metanol

Použité laboratorní vybavení

Laboratorní váhy, třepačka, ultrazvuková lázeň s temperováním, centrifuga.

Laboratorní sklo, Petriho misky, automatické pipety (a jednorázové špičky), korkovrt, pinzety, nůžky, skalpel.

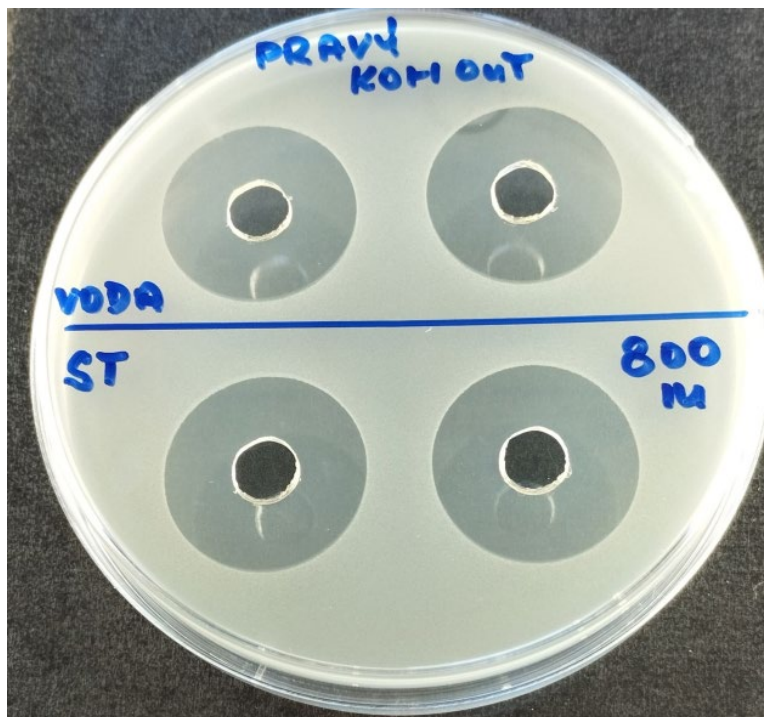
Mlýnek pro rozemletí a homogenizaci podestýlky s faeces,

Papírové filtry, stříkačkové filtry Millex 0,22µm

Měření velikosti inhibičních zón bylo prováděno pomocí sejmutí obrazu kamerovými systémem a následným vyhodnocením pomocí počítačové analýzy obrazu (analyzátor obrazu

NIS-Elements (ver. 4.60), po získání snímků kamerovým systémem (součást sestavy, obrázek 5).

Statistické vyhodnocení dat pomocí programu Combistats, který poskytuje EDQM.



Obrázek 4. *Inhibiční zóny: horní polovina testovaná napájecí voda, dolní polovina standard o známé koncentraci kolistinu 800 IU/ml. Přesné měření velikosti inhibičních zón pomocí analýzy obrazu je klíčové pro určení koncentrace kolistinu ve vzorku.*



Obrázek 5. *Systém snímání Petriho misek kamerou a napojení na Počítačovou analýzu obrazu (NIS – elements)*

Postup

S ohledem na skutečnost, že se jednalo o vyšetření matric z terénních vzorků bylo potřebné metodicky ověřit jednotlivé části postupu. Jedná se především o vyloučení přítomnosti látek interferujících s průkazem hledaného analytu – kolistinu (či modifikace metody pro vyloučení, či kvantifikaci míry interference) a také byl proveden průkaz vhodnosti dané metody (primárně nastavené na testování kolistinu v léčivých přípravcích, kde je nejen deklarována určitá koncentrace kolistinu, ale také jsou známy všechny pomocné látky a lze posoudit, v jakém rozsahu mohou s vyšetřením interferovat, rovněž je známa mikrobiologická čistota vzorku) a následně již vlastní stanovení v terénních matricích (podestýlka s faeces).

1) Vyloučení přítomnosti interferujících látek v matricích bez přítomnosti kolistinu

V první fázi byla provedena kontrola, zda ve vzorcích vody, slámy a podestýlky (sláma s faeces krůt, z daného chovu, jimž nebylo podáváno žádné antibiotikum) nejsou obsaženy látky, které by interferovaly při dalším stanovení účinnosti kolistinu tím, že by také inhibovaly referenční mikroorganismus a vytvářely na použitém živném médiu inhibiční zóny. Ze slámy a podestýlky byl připraven výluh (navážka 10 g materiálu, doplněno do 100 ml vodou), který byl ponechán při laboratorní teplotě po dobu 24 h. Výluh byl přefiltrován, přes papírový filtr a přes stříkačkový filtr, zfiltrovaný roztok se pak aplikoval do jamek v testačním médiu s referenčním kmenem *B. bronchiseptica*. U vzorků napájecí vody a výluhů se provedla aplikace do jamek po předchozí filtraci přes stříkačkový filtr Millex 0,22μm (filtry Millex byly použity proto, aby se zabránilo přerůstání kontaminující mikroflóry z vody, slámy a podestýlky do živného média, čímž by se zhoršila možnost odečtu velikosti inhibičních zón). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. Nebyla prokázána přítomnost interferujících látek v žádném z analyzovaných vzorků.

Tabulka 2. Velikosti inhibičních zón u vzorků napájecí vody, slámy a podestýlky, odebraných před aplikací přípravku s kolistinem (= Kontrola bez antibiotika kolistinu)

Vzorek	Velikost inhibiční zóny (mm)
Voda napájecí	0
Sláma	0
Podestýlka (sláma s trusem neléčených krůt)	0

2) Spikování vzorků vody a podestýlky – průkaz vhodnosti použité metody

V další fázi bylo provedeno umělé spikování kolistinem a to přidáním známých koncentrací tohoto antibiotika do vzorků čisté napájecí vody a podestýlky (slámy s faeces neléčených krůt). Pro tyto účely byl použit standard kolistin sulfátu (EDQM) o známé koncentraci 10 000 IU/ml, který byl k matrici přidán tak, aby finální koncentrace kolistinu byla 740 IU/ml (vzorek vody), 750 IU/ml výluhu (podestýlka s faeces neléčených krůt). U vzorku podestýlky byla provedena důkladná homogenizace vzorku s přidáním standardem pomocí laboratorního mlýnku. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Metoda se ukázala jako vhodná pro stanovení kolistinu v napájecí vodě.

Dle dosažených výsledků však zřejmě není vhodná pro stanovení kolistinu v organických materiálech. V rámci testování byly zkoušeny i možné úpravy metodiky, pokud jde o ředící roztoky (např. okyselení roztoku, použití methanolu), avšak bez úspěchu. Jeví se, že molekula kolistinu má, s ohledem na svoji chemickou strukturu a rovněž pravděpodobně elektrostatické vlastnosti schopnost vazby na různé (zejména organické) matrice, dle jejich povahy. Tato schopnost pravděpodobně v různém rozsahu a dle konkrétních výsledných fyzikálně-chemických vlastností směsi organických materiálů (slámy, faeces) ovlivní i sílu vazby, či ovlivní schopnost difúze výluhu, či je schopna modifikovat míru inhibice ve vztahu k referenčnímu mikroorganismu. V odborné literatuře (*de facto* velmi limitovaný počet publikací), která byla v době přípravy a provedení studie dostupná a uváděla informace o testování kolistinu z organických matric navíc nejsou detailně popsány metodiky, či nejsou zřejmé výstupy po stránce validace metod, výtěžnosti analytu a dalších parametrů, které by mohly přispět k nastavení metody tak, aby splňovala požadavky na přesnost, správnost, opakovatelnost a reprodukovatelnost. I proto bylo obtížné, ať již na základě literatury přímo ke kolistinu, či i k jiným molekulám ze skupiny polymyxinů nalézt vhodný eluent, který by umožnil efektivně uvolnit kolistin z matrice, tak aby bylo možno provést mikrobiologické stanovení poskytující robustní výsledky.

Tabulka 3. Výsledky stanovení koncentrace kolistinu ve spikovaných vzorcích

Vzorek	Předpokládané koncentrace kolistinu (IU/ml)	Detekované koncentrace kolistinu (IU/ml)
Voda napájecí	741	742
Podestýlka (sláma s faeces neléčených krůt)	750	18*

*Nebyla splněna podmínka paralelity

3) Analýza vzorků, které byly odebrány po perorální medikaci krůt přípravkem Colivet sol. přidaného do napájecí vody (2 l přípravku do medikátoru o objemu 100 l)

a) Testování medikované vody z výpustních kohoutů

Analýze byly podrobeny vzorky napájecí vody z výpusti na začátku napájecího systému a dále z výpustních kohoutů v pravé a levé části haly, a to 3. den medikace a poté 48 h po poslední medikaci. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. Koncentrace kolistinu byla v době medikace ve všech výpustních místech srovnatelná. 48h po ukončení medikace se již předpokládalo, že vzorky vody nebudou obsahovat kolistin, ale to bylo potvrzeno jen na začátku napájecího zařízení, v pravém výpustním kohoutu byl prokázán kolistin pod limitem kvantifikace (pod 100 IU/ml), ve vzorku z levého výpustního kohoutu byl kolistin stanoven v hladině 252 IU/ml. Možným důvodem těchto rozdílů mohl být různý tlak vody v každém rameni napájecího systému, či nečistoty/biofilm, který může nárazově uvolnit zachycené látky (včetně léčiva), či nerovnoměrnost rozvodu vody.

Tabulka 4. Výsledky stanovení koncentrace kolistinu v napájecí vodě během medikace a po jejím ukončení

Vzorek	Detekované koncentrace kolistinu (IU/ml)
3. den medikace	
Voda napájecí – výpusť na začátku	1034 IU/ml
Voda napájecí – pravý kohout	1000 IU/ml
Voda napájecí – levý kohout	988 IU/ml
48 h po ukončení medikace	
Voda napájecí – výpusť na začátku	Nedetkováno
Voda napájecí – pravý kohout	detekováno pod limitem kvantifikace
Voda napájecí – levý kohout	252 IU/ml

b) Testování vzorků podestýlky

Vzorky podestýlky s faeces z chovné haly byly odebrány 3. den medikace ze tří různých částí chovné haly. Jelikož se podaný kolistin ze střeva krůt nevstřebává a vlastní léčivo v nemetabolizované formě působí pouze ve vnitřním prostoru střeva a střevního obsahu a následně se vylučuje ve faeces, znamená to, že kolistin byl nejméně 48 hodin s faeces všech zvířat vylučován do podestýlky.

Navážka vzorku (podestýlka s faeces léčených krůt) byla 10 g, doplněno vodou do objemu 100 ml, třepáno 30 minut na třepačce, poté 30 minut v UTZ lázni při 35 °C, následně znovu ještě 10 minut na třepačce. Byla provedena centrifugace (3000 ot./5 min), supernatant byl zfiltrován

přes papírový filtr a poté přes filtr Millex 0,22 µm. Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulce 5.

Stanovení koncentrace kolistinu mikrobiologickou difúzní metodou v podestýlce s faeces se ukázalo jako nevhodné, neboť nebyla dostupná volná frakce vyvolávající antimikrobní působení na testační referenční kmen, které by způsobilo výskyt adekvátních inhibičních zón. Lze tedy předpokládat, že dochází k vazbě kladně nabitého polypeptidového antibiotika se záporně nabitými organickými látkami v podestýlce, navíc hydrofobní část molekuly kolistinu umožňuje další sorpci na organické částice, a proto i v případě, kdy se do výluhu uvolní jen velmi malé množství, nelze výsledky analýz brát v úvahu jako validní. Pro uvolnění kolistinu z vazby na organické materiály by zřejmě bylo potřeba použít speciální extrakční metody.

Prováděno bylo i spikování podestýlky přípravkem Colivet sol. (2 000 000 IU/ml) ve vyšší koncentrační hladině – k 10 g se přidalo 10 ml přípravku, vše bylo důkladně zhomogenizováno a naředěno vodou na objem 200 ml (předpokládaná koncentrace kolistinu ve výluhu tedy byla 100 000 IU/ml), detekováno bylo 31700 IU/ml, tedy asi 3x méně. I z tohoto výsledku vyplývá, že v rámci mikrobiologického stanovení se na tvorbě inhibičních zón může podílet pouze „volná frakce kolistinu“, která zůstane poté, kdy jsou „vazebná místa“ organické hmoty již obsazena.

Vzhledem k výsledkům, které byly získány při zkouškách a validaci metody, nebyly další vzorky podestýlky odebrané po ukončení medikace již testovány.

Tabulka 5. Výsledky stanovení koncentrace kolistinu v podestýlce 3. den medikace medikace

Vzorek	Stanovená koncentrace kolistinu (IU/ml)
Podestýlka pravá část haly	Nedetekováno
Podestýlka levá část haly	Nedetekováno
Podestýlka střední část haly	Nedetekováno

Analyzovány byly i fermentované vzorky podestýlky s půdou (po 2,5 měsících zrání) – ke 2 kg podestýlky a půdy (poměr 1:1) bylo na počátku přidáno 400 ml přípravku Colivet sol., předpokládaná koncentrace kolistinu tedy byla 400 000 IU/g. Vzorek byl zpracován tak, jak bylo uvedeno výše (ve výluhu byla pak očekávaná koncentrace kolistinu 40 000 IU/ml). Kolistin byl sice detekován, ale jeho obsah se pohyboval na hladině limitu kvantifikace (100 IU/ml), což svědčí o ještě nižší míře přítomnosti volné/aktivně inhibující složky kolistinu.

Z výše uvedených údajů je patrné, že použitá metoda není vhodná pro stanovení koncentrace kolistinu v podestýlce, či v podestýlce s faeces před ani po fermentaci. Z tohoto důvodu není možné metodu použít ani pro stanovení kolistinu v půdě, kam byla zapracována fermentovaná podestýlka s trusem. Podestýlka s faeces je složitá směs, která obsahuje organické látky rostlinného původu (sláma), organické látky živočišného původu (faeces, obsahující u drůbeže i složku moči) a také zbytky krmiva s případnými aditivy (organické či anorganické povahy). Všechny tyto složky mohou s kolistinem interagovat, vázat ho a ovlivňovat extrakci volné aktivní frakce kolistinu schopné inhibovat růst testovacího mikroorganismu, čímž se znesnadňuje přesné měření. Pevná vazba kolistinu na organické látky však zároveň může podstatně ztížit jeho degradaci a tím prodloužit jeho perzistenci v půdním ekosystému a potenciální dopady na životní prostředí.

4.1.2 Stanovení enrofloxacinu (B)

V rámci provedeného experimentu byly analyzovány dva typy vzorků – faeces s podestýlkou a půda před a po aplikaci drůbežního hnoje. Všechny vzorky byly po odběru až do analýzy uskladněny v mrazícím boxu při -80 °C pro minimalizaci ztráty analytů.

Použité materiály a chemikálie

Milli-Q voda; acetonitril čistoty min. 99,9% pro LC-MS (VWR); methanol čistoty min. 99,9% pro LC-MS (VWR); kyselina mravenčí čistoty min. 98% , (Sigma Aldrich), kyselina citronová monohydrát čistoty min. 99,5% (Lach-Ner); hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát čistoty min. 98% (Lach-Ner); Chelaton III čistoty min 99% (Lach-Ner); dusičnan hořečnatý hexahydrát (VWR); 25% vodný roztok amoniaku (VWR); enrofloxacin čistoty min. 99 %, CRM (Sigma Aldrich); ciprofloxacin čistoty min. 98%, CRM (Sigma Aldrich); Enrofloxacin – d5 hydrochloride čistoty min. 99% (Sigma Aldrich); Ciprofloxacin - d8 hydrochloride hydrate čistoty min. 99% (Sigma Aldrich).

Použité laboratorní vybavení

Přístroj pro přípravu Milli-Q vody Milli-Q Millipore, Academic; kapalinový chromatograf UHPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies; kolona (Luna® Omega Polar C18 Phenomenex, 100 x 2.1 mm; 1.6 µm); hmotnostní spektrometr Bruker Evoq LC/TQ; Analytické váhy

RADWAG AS 220.R2 PLUS; ultrazvuková lázeň Kraintek 5; centrifuga Eppendorf 5804, rotor type F-34-6-38; vortex; automatické mikropipety (Eppendorf); PP/PE zkumavky 50 ml; stříkačkové nylonové filtry 0,22 μm (Chromservis); stříkačky pro filtrování; běžné laboratorní sklo a pomůcky.

Použité plyny

Argon o čistotě 5.0 (SIAD Czech spol. s.r.o).

Postup extrakce fluorochinolonů ze vzorků krůtí podestýlky

Byla využita validovaná metoda extrakce (Fučík et al, 2024), která byla optimalizovaná pro vyšší koncentrace fluorochinolonů ve vzorcích podestýlky (≈ 1 g/kg). Byl navážen $1,00 \pm 0,05$ g zhomogenizovaného a rozmělněného vzorku podestýlky do PP/PE centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Následně byly ke vzorku ve zkumavce přidána extrakční činidla: 0,6 g EDTA 7,5 ml McIlvaine pufr pH=8, 7,5 ml ACN, 4,8 ml roztok 2 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a 0,2 ml 2,5% roztoku NH_3 . Takto připravená směs byla promíchána 30 sekund na vortexu, následně ihned vložena na 10 min do ultrazvukové lázně při teplotě 35 °C. Po extrakci byl vzorek odstředěn pomocí centrifugy při 4 800 otáček za minutu, po dobu 8 min. Extrakt byl následně slit do vialky o objemu 30 ml. Extrakce byla provedena ještě jedenkrát s polovičními objemy extrakčních činidel a bez přídavku EDTA (tj. 3,75 ml McIlvaine pufr pH=8, 3,75 ml ACN, 2,4 ml roztoku 2 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a 0,1 ml 2,5% roztoku NH_3) a supernatant byl slit do vialky k předchozímu supernatantu. Extrakt byl přefiltrován přes stříkačku s nylonovým filtrem (0,22 μm) a 100x zředěn směsí 0,1% HCOOH s ACN v poměru 95:5 pro následnou analýzu pomocí UHPLC-MS/MS nebo UHPLC-DAD.

Kvantifikace fluorochinolonů ve vzorcích faeces s podestýlkou

Pro analýzu pomocí UHPLC-MS/MS bylo k 995 μl zředěného extraktu ve 2 ml vialce přidáno 5 μl směsi vnitřních standardů deuterovaného ciprofloxacinu a enrofloxacinu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ ke kompenzaci matričních efektů. Pro kvantifikaci ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích faeces s podestýlkou byla použita metoda externí kalibrace zahrnující izotopicky značené vnitřní standardy enrofloxacin – d5 a ciprofloxacin – d8. Množství analytů bylo určeno

pomocí kalibrace na základě poměru intenzity signálu analytu a příslušného vnitřního standardu.

Pro kvantifikaci ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích faeces s podestýlkou pomocí UHPLC-DAD byla použita metoda externí kalibrace.

Analýza každého vzorku, včetně extrakce, byla provedena v 5 opakováních. Výťažnost metody byla testována na koncentracích 0,1; 1; 10 a 2 500 mg/kg. Dosažené výťažnosti jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6. Výťažnosti extrakční metody (RR) na jednotlivých koncentračních hladinách

	CIP	ENR
RR 0,1 mg·kg ⁻¹ [%]	112±17	134±17
RR 1 mg·kg ⁻¹ [%]	100±2	91±4
RR 10 mg·kg ⁻¹ [%]	109,4±1,2	110±6
RR 2 500 mg·kg ⁻¹ [%]	94±4	102,2±1,2

Tabulka 7. Limity detekce a kvantifikace UHPLC-MS/MS metody pro analýzu ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích faeces s podestýlkou

	CIP	ENR
LoD [ng·ml ⁻¹]	0,8	0,3
MLOD [mg·kg ⁻¹]	2	1,0
LoQ [ng·ml ⁻¹]	2,4	1,0
MLOQ [mg·kg ⁻¹]	7,1	3,0

Tabulka 8. Limity detekce a kvantifikace UHPLC-DAD metody pro analýzu ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích faeces s podestýlkou

	CIP	ENR
LoD [ng·ml ⁻¹]	2,9	2,8
MLOD [mg·kg ⁻¹]	8,8	8,4
LoQ [ng·ml ⁻¹]	8,9	8,4
MLOQ [mg·kg ⁻¹]	27	25,3

4.1.3 Sledování abundance vybraných genů rezistence (C)

Příprava selektivních kultivačních médií

Sledování abundance vybraných genů kódujících plazmidově vázanou rezistenci k chinolonům a rezistenci ke kolistinu bylo přednostně zaměřeno na bakterie rodu *Escherichia coli* a zástupce

skupiny koliformních bakterií. Ke kultivaci bylo použito kultivační médium EC/col-NAL, tj. Chromatic™ Coliform Agar (Liofilchem, IT) suplementovaný kyselinou nalidixovou (Sigma-Aldrich, D) o finální koncentraci 16 mg/l a dále EC/col-KOL, tedy Chromatic™ Coliform Agar Chromatic™ Coliform Agar s přidavkem kolistin sulfátu (Discovery Fine Chemicals, UK) ve finální koncentraci 3,5 mg/l. Selektivita připravených médií byla kontrolována růstem bakteriálních kmenů k antibiotickým suplementům rezistentních a citlivých.

Zpracování stěrů prostředí

Stěry z prostředí farmy byly ihned po transportu do laboratoře zpracovány. K polyuretanové stěrové houbičce bylo přidáno 20 ml pufované peptonové vody (PPV) a provedena homogenizace na přístroji typu stomacher (Interscience, F). Následně byly vzorky inkubovány při 37 °C po dobu 18–24 h. Z pomnožené PPV byl odebrán 1 ml k extrakci DNA a průkazu genů rezistence metodou PCR. Vzorek vyočkován na půdy EC/col-NAL a EC/col-KOL a po inkubaci (37 °C/ 18-24 h) bylo izolováno z každé půdy až pět kolonií s morfologií typickou pro *E. coli*, případně koliformní bakterie. Ty byly dále testovány na přítomnost vybraných genů.

Zpracování vzorků faeces s podestýlkou a krmiva

Ze vzorků podestýlky a krmiva bylo v laboratoři naváženo 25 g, homogenizováno s 225 ml PPV a inkubováno při 37 °C po dobu 18–24 h. Po ukončení inkubace byl 1 ml použit k extrakci DNA a ke stanovení přítomnosti genů rezistence. Suspenze byla dále vyočkována na půdy EC/col-NAL a EC/col-KOL a inkubována při 37 °C/18–24 h. Vzorek vyočkován na půdy EC/col-NAL a EC/col-KOL a po inkubaci (37 °C/ 18-24 h) bylo izolováno z každé půdy až pět kolonií s morfologií typickou pro *E. coli*, případně koliformní bakterie. Ty byly dále testovány na přítomnost vybraných genů.

Zpracování vzorků vody

Napájecí voda byla analyzována metodou membránové filtrace (Sartorius, D) s použitím membránových filtrů o velikosti pórů 0,45 µm (Millipore, USA). Pro každé použité kultivační médium (EC/col-NAL a EC/col-KOL) byl filtrován objem 100 ml vzorku. Inkubace probíhala při 37 °C/18–24 h. Vzorek vyočkován na půdy EC/col-NAL a EC/col-KOL a po inkubaci (37

°C/18–24 h) bylo izolováno z každé půdy až pět kolonií s morfologií typickou pro *E. coli*, případně koliformní bakterie. Ty byly dále testovány na přítomnost vybraných genů.

Extrakce DNA z pomnožených vzorků

Z pomnožené PPV byl odebrán 1 ml, centrifugován 10 min při 8 000 rpm, peletka byla promyta v 500 µl fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (PBS, Sigma-Aldrich, USA), následně znovu centrifugována 5 min při 8 000 rpm. Peletka byla následně resuspendována v 180 µl ATL pufru z extrakčního kitu DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, UK). Další postup probíhal dle pokynů výrobce.

Příprava DNA z bakteriálních kultur

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

Stanovení přítomnosti genů PMQR

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

Extrakce DNA pro celogenomové sekvenování (WGS)

K izolaci bakteriální DNA byl použit DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (QIAGEN, D). Postup extrakce vycházel z protokolu výrobce s úpravou v počáteční fázi, kdy byla 24hodinová čistá kultura přenesena přímo do PowerBead zkumavky. Další kroky izolace probíhaly dle postupu daného výrobcem.

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

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

Sekvenční analýzy a zpracování dat

Příprava sekvenačních knihoven a sekvenace na platformě Illumina (NovaSeq) byly provedeny externí firmou (Institute of Applied Biotechnologies a.s., CZ). Získaná data ze sekvenace byla následně *de novo* sestavena pomocí assembleru SKESA (verze 2.4.0), který je součástí softwaru MBioSEQ Ridom Typer (verze 11; Bruker, D) (Jünemann a kol, 2013).

Charakteristika kmenů (WGS)

Stanovení příslušnosti k séro skupině (*E. coli*), identifikace sekvenčního typu (*E. coli* dle Achtmana), sledování vybraných genů rezistence k antimikrobikům a přítomnosti plazmidů

byla provedena porovnáním získaných sekvenačních dat s alelami z databází SerotypeFinder 2.0 (Joensen et al. 2015), MLST 2.0 (Larsen et al. 2012), ResFinder 4.7.2 (Feldgarden et al. 2019) pomocí softwaru MBioSEQ Ridom Typer a PlasmidFinder 2.1 (Carattoli et al. 2014, Robertson et al. 2018).

4.2 Modelový pokus

4.2.1 Popis modelového pokusu

Odběry vzorků z období zrání mrvy

Dne 24. 2. 2025 byla na farmě odebrána podestýlka s faeces určená k vyžrání a následné aplikaci na pokusný pozemek. Z podestýlky byla odstraněna nadbytečná a suchá sláma, poté byla podestýlka o celkové hmotnosti 27,6 kg dočasně uložena do dvou sudů. Dne 7. 4. 2025 byla podestýlka přeložena do větší nádoby a inokulována modelovými kmeny *Escherichia coli* (CT246, CT280) s geny rezistence k chinolonům a kolistinu (*qnrB*, *qnrS*, *mcrI*). Současně byl materiál obohacen o 270 ml VLP Enrogal. Obohacení feaces s podestýlkou enrofloxacinem bylo provedeno ve vyšších dávkách, které jsou environmentálně relevantní a dosud nebyly zkoumány. Z mrvy před a po inokulaci byl odebrán vzorek k mikrobiologickým analýzám. Během zrání byla směs zavlažována deionizovanou vodou. Zrání mrvy probíhalo po dobu 14 týdnů. V průběhu zrání bylo ze směsi odebráno dalších 15 vzorků zrající mrvy.

Vzorky určené k mikrobiologickým analýzám byly asepticky odebrány do PE sáčků a v den odběru předány do laboratoře. Vzorky určené ke stanovení obsahu reziduí enrofloxacinu a ciprofloxacinu byly ukládány do PE sáčků a buď ihned předány do laboratoře, nebo zamrazeny na -18 °C a předány později.

Polní pokus

Modelový pokus byl založen na pozemku zkušební stanice ÚKZÚZ v Chrlicích (4 m²) 30. května 2025. Vyzrálý hnůj byl tuhé konzistence a na pokusnou plochu byl aplikován ručně. Z políčka se skrylo přibližně 10 cm ornice, hnůj byl rovnoměrně rozprostřen na pokusnou plochu a nakonec bylo políčko opět zakryto ornici. Vedle políčka byly umístěny dvě vaničky – v jedné byly 2 kg půdy a 400 ml VLP Colivet, ve druhé 1 kg půdy, 1 kg hnoje a 400 ml Colivet. Dne 10. 6. 2025 byla na pokusnou plochu aplikována suspenze s modelovými bakteriálními

kmeny o denzitě 2×10^8 KTJ/ml v objemu 5 l. V týž den byla na políčko i do vaniček vyseta svazenka vratičolistá (*Phacelia tanacetifolia*).

Tabulka 10. Parametry statkového hnojiva – drůbežího hnoje na konci zrání

parametr	jednotka	hodnota
sušina	%	24,4
spalitelné látky v sušině	%	66,1
celkový dusík jako N v suš.	%	3,2
celkový fosfor jako P_2O_5 v suš.	%	3,9
draslík jako K_2O v suš.	%	5,4
pH/ H_2O	-	9,0
C:N	-	12
Draslík celkový v suš.	mg/kg	44900
fosfor celkový v suš.	mg/kg	17100
arsen celkový v suš.	mg/kg	3,14
kadmium celkové v suš.	mg/kg	0,336
chrom celkový v suš.	mg/kg	17,2
měď celková v suš.	mg/kg	118
rtuť celková v suš.	mg/kg	0,011
molybden celkový v suš.	mg/kg	5,74
nikl celkový v suš.	mg/kg	18,6
olovo v suš.	mg/kg	<1,5
zinek celkový v suš.	mg/kg	458

Půda

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

Tabulka 11. Agrochemické vlastnosti půdy – obsah přístupných živin (Mehlich 3) a obsah celkového dusíku (N_{tot}) a celkového organického uhlíku (TOC) v půdě (elementární analýza)

pH/ $CaCl_2$	P	K	Mg	Ca	N_{tot}	TOC
	Přístupné živiny (mg.kg ⁻¹)				%	
7,13	171,4	315	292	4519	0,17	1,73



Obrázek 6. Příprava políčka k aplikaci suspenze. Vpravo odebraný půdní vzorek a vzorek prosátý na 5 mm síť.

První půdní vzorky ke stanovení enrofloxacinu byly z modelového políčka odebrány v den založení pokusu, a to těsně před aplikací vyzrálého hnoje a těsně po jeho aplikaci. Půdní vzorek k mikrobiologickým analýzám byl odebrán před aplikací hnoje a poté po aplikaci suspenze, necelé dva týdny po založení pokusu. Další vzorkování probíhalo pravidelně v čtrnáctidenních intervalech. Poslední analyzovaný vzorek byl z 8. září 2025.

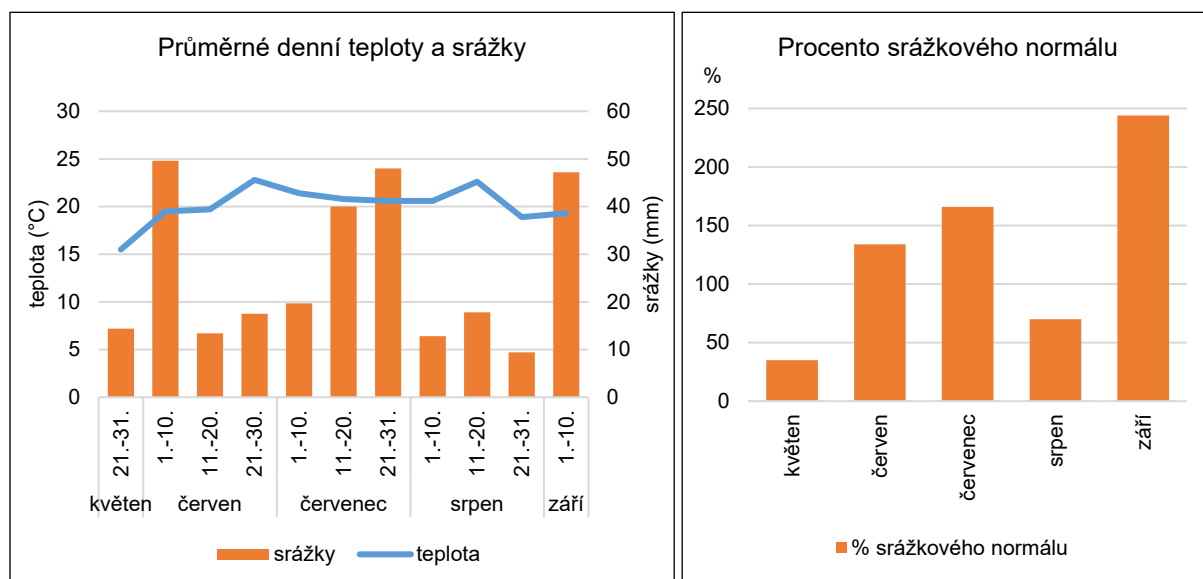
Tabulka 12. Celkové obsahy rizikových prvků v půdě na ZS Chrlice a v půdách dlouhodobých programů ÚKZÚZ – v Registru kontaminovaných ploch a v dlouhodobém monitoringu půd (lučavka královská, mg.kg-1 suš., půdy ostatní)

	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
Chrlice	13,2	1,28	0,65	17,2	57,3	33,1	44,4	33,9	59,0	113	0,124
Registr kontaminovaných ploch	11,8	1,04	0,29	11,6	40,2	21,5	24,2	28,5	48,7	75,8	0,100
Dlouhodobý monitoring zem. půd (2019)	9,13	0,95	0,24	11,6	38,8	20,1	25,4	25,6	40,5	70,4	0,065

K odběru vzorků sloužil Edelmanův vrták. Z plochy byl odebrán jeden směsný vzorek, který tvořilo 15–18 individuálních vzorků o hmotnosti přibližně 70 g. Na místě byl proveden prosev na 5 mm síť. Takto upravený vzorek byl rozdělen na dva, vložen do PE sáčků a transportován do laboratoří MUNI a VUT.

Meteorologické podmínky na pokusném pozemku

Na ZS Chrlice je umístěna automatická meteostanice. Podle údajů z této stanice činilo rozpětí teplot od zahájení (30. 5. 2025) do ukončení pokusu (8. 9. 2025) 6,0–36,8 °C, přičemž průběh průměrných denních teplot v jednotlivých dekádách je graficky zachycen na obrázku 7. Měsíční srážkové úhrny činily pouhých 18 mm v květnu až 107 mm v červenci a září.



Obrázek 7. Průběh průměrných denních teplot a srážek na zkušební pozemku

Tabulka 13. Přehled základních termínů

týden (kalendářní)	týden (trvání)	datum	stáří zvířat (dny)	FARMA (krůty, hala 1: 48-100 dní)			FERMENTACE PODESTÝLKÝ	
				geny rezistence (MUNI)	kolistin mikrobiální metodou (USKVBL)	enrofloxacin - chemická rezidua (VUT)	geny rezistence (MUNI)	enrofloxacin - chemická rezidua (VUT)
9	1	24.02.	49	faeces, voda, stěry	voda, čistá podestýlka	faeces	podestýlka z farmy - začátek zrání	
		27.02.	52		voda, faeces			
11	3	11.03.	64	faeces, krmivo 1, 2, 3	faeces			
13	5	25.03.	78	faeces	faeces			
15	7	07.04.					FERM	FERM
		08.04.	92	faeces krmivo 4	faeces			
		11.04.						FERM
16	8	14.04.						FERM
		16.04.						FERM
		17.04.						FERM
17	9	22.04.					FERM	FERM
		25.04.						FERM
18	10	28.04.						FERM
		30.04.						FERM
		02.05.						FERM
19	11	05.05.					FERM	FERM
		07.05.						FERM
		09.05.						FERM
20	12	12.05						FERM
				FARMA (krůty, hala 1: 1-48 dní)				
21	13	19.05.						FERM
		23.05.	1	krmivo 5, 6, krabice z líhně, čistá podestýlka				
22	14	26.05.						FERM
		30.05.					POLNÍ POKUS	
23	15	03.06.	12	faeces		faeces	půda	půda
24	16	10.06.					půda	půda
25	17	16.05.					půda	půda
		17.06.	26	faeces		faeces		
27	19	30.06.					půda	půda
29	21	14.07.					půda	půda
31	23	28.07.					půda	půda
33	25	11.08.					půda	půda
35	27	25.08.					půda	půda
37	29	08.09.					půda	půda

4.2.2 Stanovení fluorochinolonů ve vzorcích půdy

Postup extrakce fluorochinolonů ze vzorků půdy

Byl navážen $1,00 \pm 0,05$ g zhomogenizovaného vzorku půdy do PP/PE centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Následně byly ke vzorku ve zkumavce přidány extrakční činidla: 0,6 g EDTA, 7,5 ml McIlvaine pufr pH=8, 7,5 ml ACN, 4,8 ml roztoku 2 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a 0,2 ml 2,5% roztoku NH_3 . Takto připravená směs byla promíchána 30 sekund na vortexu, následně ihned vložena na 10 min do ultrazvukové lázně při teplotě 35 °C. Po extrakci byl vzorek odstředěn pomocí centrifugy při 4 800 otáček za minutu, po dobu 8 min. Extrakt byl následně slit do vialky o objemu 30 ml. Extrakce byla provedena ještě jedenkrát s polovičními objemy extrakčních činidel a bez přídavku EDTA (3,75 ml McIlvaine pufr pH=8, 3,75 ml ACN, 2,4 ml roztoku 2 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a 0,1 ml 2,5% roztoku NH_3) a supernatant byl slit do vialky k předchozímu supernatantu. Extrakt byl přefiltrován přes stříkačku s nylonovým filtrem (0,22 μm).

Kvantifikace fluorochinolonů ve vzorcích půdy

Pro analýzu pomocí UHPLC-MS/MS bylo k 995 μl extraktu ve 2 ml vialce přidáno 5 μl směsi vnitřních standardů deuterovaného ciprofloxacinu a enrofloxacinu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ ke kompenzaci matričních efektů. Pro kvantifikaci ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích půdy byla použita metoda externí kalibrace zahrnující izotopicky značené vnitřní standardy enrofloxacin – d5 a ciprofloxacin – d8. Množství analytů bylo určeno pomocí kalibrace na základě poměru intenzity signálu analytu a příslušného vnitřního standardu.

Pro analýzu pomocí UHPLC-DAD byl extrakt 5x zředěn směsí 0,1% HCOOH a ACN v poměru 95:5. Pro kvantifikaci ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích půdy byla použita metoda matriční kalibrace, za účelem kompenzace matričního efektu.

Analýza každého vzorku, včetně extrakce, byla provedena v 5 opakováních. Výtěžnost metody byla ověřena pro koncentraci 10 mg/kg. Bylo dosaženo výtěžnosti $75,2 \pm 0,5$ % pro ciprofloxacin a 82 ± 8 % pro enrofloxacin.

Tabulka 14. Limity detekce a kvantifikace UHPLC-MS/MS metody pro analýzu ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích půdy

	CIP	ENR
LoD [ng·ml ⁻¹]	6,2	4,4
MLOD [mg·kg ⁻¹]	0,18	0,13
LoQ [ng·ml ⁻¹]	18,7	13,4
MLOQ [mg·kg ⁻¹]	0,560	0,403

Tabulka 15. Limity detekce a kvantifikace UHPLC-DAD metody pro analýzu ciprofloxacinu a enrofloxacinu ve vzorcích půdy

	CIP	ENR
LoD [ng·ml ⁻¹]	3,6	4,3
MLOD [mg·kg ⁻¹]	0,54	0,64
LoQ [ng·ml ⁻¹]	11,0	12,9
MLOQ [mg·kg ⁻¹]	1,65	1,94

Tabulka 16. Parametry metody na UHPLC-MS/MS pro kapalinový chromatograf

Objem nástřiku	7 µl	
Průtok mobilní fáze	0,5 ml·min ⁻¹	
Teplota	35 °C	
Mobilní fáze	A: 0,1 % HCOOH ve vodě	
	B: Acetonitril	
Gradient mobilní fáze	t [min]	B [%]
	0,0	10
	0,5	10
	13,00	65
	13,10	95
	15,50	10
	15,90	10
POST time na ekvilibraci kolony	2 min	

Tabulka 17. Parametry metody na UHPLC-MS/MS pro hmotnostní spektrometr

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

Tabulka 18. Parametry metody na UHPLC-DAD pro kapalinový chromatograf

Objem nástřiku	4 µl	
Průtok mobilní fáze	0,5 ml·min ⁻¹	
Teplota	35 °C	
Mobilní fáze	A: 0,1 % HCOOH ve vodě	
	B: Acetonitril	
Gradient mobilní fáze	t [min]	B [%]
	0,0	10
	0,5	10
	6,0	35
	6,1	95
	10,50	10
	10,90	10
POST time na ekvilibraci kolony	1 min	
Excitační vlnová délka	280 nM	

Tabulka 19. MRM přechody pro ciprofloxacin a enrofloxacin a jejich deuterované standardy (IS)

		RT (min)	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Kolizní energie (eV)
Ciprofloxacin	kvant. přechod	3,10	332,4	314,20	10
	kval. přechod	3,10	332,4	288,20	10
Enrofloxacin	kvant. přechod	3,50	360,4	316,2	10
	kval. přechod	3,50	360,4	342,20	20
Ciprofloxacin Deut.	kvant. přechod	3,10	340,4	322,1	15
	kval. přechod	3,10	340,4	296,1	15
Enrofloxacin Deut.	kvant. přechod	3,50	365,4	321	10
	kval. přechod	3,50	365,4	346,8	20

4.2.3 Přežívání kmenů *Escherichia coli* s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům a kolistinu ve fermentované podestýlce s faeces z krutí farmy

Výběr bakteriálních kmenů

Přežívání bakterií s plazmidově vázanými geny rezistence k chinolonům a kolistinu bylo sledováno s využitím modelových kmenů *E. coli* získané v rámci rutinní praxe mikrobiologické laboratoře MUNI. V obou případech se jednalo o kmeny s méně obvyklým vzorcem rezistence k antimikrobikům. Detailní charakteristika kmenů je uvedena v tabulce 20.

Tabulka 20. Původ a charakteristika modelových kmenů *Escherichia coli*

Označení	Původ	Sérotyp	Geny rezistence	Antibiogram
CT246	odpadní voda (ČR)	O30:H25	<i>qnrS, mcr1</i>	AMP, AMC, C, S, Su, SXT, W, TE
CT280	krutí játra (ČR)	O100:H28	<i>qnrB, mcr1</i>	AMP, AMC, S, K, N, Su, SXT, W, TE, NA, CIP, ENR

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

Příprava inokula

Modelové kmeny *E. coli* CT246 a CT280 byly uchovány ve formě kryokonzerv v hlubokomrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro oživení byly rozmrazeny, vyočkovány na

Columbia krevní agar (Labmediaservis, ČR) a inkubovány po dobu 18–24 h při 37 °C. U takto připravených kultur byla ověřena jejich čistota a potvrzena přítomnost genů rezistence metodou PCR. Následně byly kmeny použity pro přípravu inokula. Příprava probíhala samostatně pro každý kmen. Do lahve o objemu min. 500 ml bylo přidáno 300 ml pufrované peptonové vody (PPV, Oxoid, UK), do které byly inokulovány modelové bakteriální kmeny v množství cca ¼ kultury na Petriho misce. Směs byla inkubována 72 h při 37 °C za stálého třepání rychlostí 100 rpm (IKA, D). Po ukončení kultivace byla kontrolně změřena optická denzita (OD) kultur (Denovix, USA), přidáno cca 200 ml sterilní PPV a prodloužena inkubace o dalších 24 h. Po ukončení inkubace byla upravena finální koncentrace bakteriálních kmenů tak, aby výsledná denzita odpovídala řádově počtu 10^6 KTJ/ml. Z finální suspenze o objemu 1 l byl odebrán 1 ml k extrakci DNA a ověření přítomnosti genů metodou PCR a 1 ml k ověření počtu KTJ/ml kultivační metodou.

Zpracování vzorků fermentované podestýlky a půdy

U vzorků fermentované podestýlky s faeces a půdy bylo provedeno kvantitativní i kvalitativní vyšetření. Navážka 25 g vzorku byla zhomogenizována s 225 ml PPV, 100 µl výchozí suspenze vzorku nebo jejího desetinasobného ředění bylo inokulováno na povrch kultivačních médií EC/col-NAL a EC/col-KOL a inkubováno při 37 °C po dobu 18–24 h. U vybraných kolonií nebo jejich směsi byla následně provedena konfirmace přítomnosti genů rezistence *qnrB*, *S* a *mcrI*. Připravená výchozí suspenze byla následně pomnožena a zpracována jako vzorky faeces s podestýlkou z farmy.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Prostředí faremního chovu

Vzhledem k tomu, že v průběhu sledování nebyl ve sledovaném chovu aplikován žádný VLP s enrofloxacinem, byla pozornost zaměřena především na sledování výskytu genů rezistence v prostředí farmy.

5.1.1 Abundance vybraných genů rezistence na farmě (C)

Celkem bylo na přítomnost vybraných plazmidově vázaných genů rezistence k chinolonům a kolistinu vyšetřeno 22 vzorků. Jednalo se o vzorky z prostředí farmy, konkrétně podestýlka před naskladněním zvířat (1), stěry z prostředí haly (6), napájecí voda odebíraná z napáječek na začátku a konci rozvodu (2), krmivo před nasypáním do sila (6) a dále odběry faeces s podestýlkou v různých fázích výkrmu (7).

Ze sledovaných genů byly ve většině vzorků potvrzeny geny *qnrS* (12), *aac(6')-Ib-cr* (11) a *qnrB* (10). Geny *qnrA*, *qepA* a *mcr1* nebyly na farmě prokázány v žádném z testovaných vzorků. Přehled nálezů je uveden v tabulkách 21 a 22.

Z pozitivních vzorků bylo izolováno 88 kolonií s morfologií *E. coli* nebo koliformních bakterií. U 25 (28 %) z nich byl potvrzen některý ze sledovaných genů. Nejčastěji to byly geny *qnrS* (14), v devíti případech gen *qnrB* a u dvou izolátů z prostředí (voda a stěr z napáječky) byly prokázány geny *qnrB* v kombinaci s *aac(6')-Ib-cr*.

Celkem osm izolátů bylo vybráno k detailní typizaci metodou celogenomového sekvenování. Jednalo se o šest izolátů *E. coli* a dva izoláty ze skupiny koliformních bakterií (*Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*). Izoláty byly vybírány tak, aby pocházely z podestýly s faeces zvířat z různých odběrových termínů. V rámci stejného odběru byly sekvenovány pouze izoláty, u kterých byly na základě prvotního screeningu zjištěny rozdíly ve sledovaných genech rezistence. Bylo zjištěno, že vybrané izoláty *E. coli* náležely ke čtyřem různým sérotypům. Ve dvou po sobě jdoucích odběrech byly izolovány stejné sérotypy O101:H33 a O184:H30 (tabulka 23). Z fylogenetické analýzy vyplynulo, že se v rámci sérotypů jedná o blízce příbuzné kmeny. U ostatních izolátů *E. coli* nebyla žádná souvislost zjištěna (obrázek 8). Průkaz různých sérotypů naznačuje, že na farmě se vyskytuje rozsáhlá populace *E. coli*, přičemž opakovaný nález kmenů se stejnými charakteristikami svědčí o tom, že se v dané lokalitě vyskytují dlouhodobě.

Analýza genů rezistence k antimikrobiálním látkám prokázala u všech testovaných izolátů mutaci v chromozomálně vázaných genech *gyrA*, *parC* a v jednom případě také *parE*. Dále byly potvrzeny také plazmidově vázané geny rezistence k chinolonům, a to v kombinaci *qnrB4* a *aac(6')-Ib-cr5* u *C. freundii* a varianty genu *qnrS* u ostatních izolátů (tabulka 23A).

Ve sledovaných kmenech bylo identifikováno 16 různých typů plazmidů (tabulka 23B). Celkem 10 typů patřilo do skupiny IncF, vždy jedenkrát byly prokázány plazmidy Col (*E. coli*) a pKPC (*C. freundii*). Sledované geny rezistence k chinolonům byly u různých kmenů detekovány na různých plazmidech (tabulka 23B), ve všech případech se ale jednalo o konjugativní plazmidy, tedy s možností horizontálního šíření.

Autorský kolektiv Horie et al. (2021) provedl v letech 2014 a 2016 rozsáhlou studii s cílem sledovat rizikové faktory, které ovlivňují výskyt genů rezistence u výkrmových krůt. Do studie bylo zahrnuto celkem 60 farem ze tří evropských zemí (Německo, Francie, Španělsko). Na všech farmách byly zjištěny geny rezistence k tetracyklinům, makrolidům a aminoglykosidům, na většině také geny rezistence k chinolonům, ale s výrazně nižší abundancí. Bylo dále prokázáno, že genetický profil rezistence k antimikrobiálním látkám byl mezi jednotlivými farmami podobný, a to i navzdory rozdílům v používání antibiotické terapie, včetně farem, které ji vůbec nevyužívaly. Současně nebylo ani potvrzeno, že by nízká úroveň biosekurity byla v úzké souvislosti s abundancí genů rezistence. To vede k hypotéze, že jakmile bakteriální kmeny prostředí farmy osídlí, složení mikrobioty zůstává relativně stabilní. To naznačují i výsledky této studie. V materiálu, který do chovu vstupoval (krmivo, podestýlka, jednodenní krůťata), nebyly sledované geny rezistence prokázány, ale vyskytly se u vzorků z prostředí haly, a to jak před naskladněním zvířat, tak v průběhu výkrmu. Současně byly geny *aac(6')-Ib-cr* a *qnrB*, *qnrS* prokázány ve všech vzorcích faeces s podestýlkou odebraných v průběhu výkrmu.

Rezistence vůči ciprofloxacinu je indikátorem rezistence k chinolonům obecně. Popisována je také u komenzálních kmenů *E. coli* v chovech hospodářských zvířat, včetně chovu masných krůt (Ceccarelli et al. 2020). Vzniká různými mechanismy, z nichž nejčastější jsou mutace v genech pro enzymy DNA gyrázu (*gyrA*) a topoizomerázu IV (*par*). To snižuje afinitu chinolonů k příslušným enzymům a zvyšuje schopnost bakterií účinek terapeutické látky přežívat (Slettemeås et al. 2019). I výsledky této studie ukazují, že mutace v genech *gyr* a *par* je velmi častá, byla prokázána u všech testovaných kmenů.

Z pohledu možnosti horizontálního šíření, jsou významné zejména geny rezistence k chinolonům vázané na plazmidech. Geny *qnr* byly popsány na plazmidech různých typů a tato pestrost pravděpodobně přispěla i k rozmanitosti bakteriálních hostitelů, u nichž se PMQR

vyskytuje. Byly identifikovány u mnoha zástupců z kmene *Proteobacteria* i *Firmicutes*. Některá z variant genů *qnr* byla prokázána např. u rodů *Bacillus*, *Enterococcus*, *Stenotrophomonas* nebo psychrofilních bakterií rodu *Aeromonas*, *Shewanella* a *Vibria*. U grampozitivních bakterií, jsou tyto geny ale vázány i chromozomálně (Jacoby et al. 2014).

Mezi hlavní skupiny plazmidů, které jsou u čeledi *Enterobacteriaceae* popisovány, patří plazmidy typu IncF, IncI a IncN. V naší studii nejčastěji prokázané plazmidy IncF jsou nejčastěji detekovaným typem u *E. coli* humánního i veterinárního původu. Často nesou geny pro produkci karbapenemáz, enzymů modifikujících aminoglykosidy a také geny pro plazmidově vázanou rezistenci k chinolonům. Typicky se tyto plazmidy vyskytují ve více replikonech, a to i v kombinaci s jinými skupinami plazmidů (Rozwandowicz et al., 2018), stejně jako ukazují výsledky této studie. Ve dvou případech byly také potvrzeny specifické plazmidy typu pKPC a Col, které kromě genů rezistence mohou nést geny pro produkci bakteriocinů (Kandi et al. 2024).

Tabulka 21. Sledování přítomnosti vybraných genů rezistence v prostředí farmy (celková DNA z pomnožené pufrované peptonové vody)

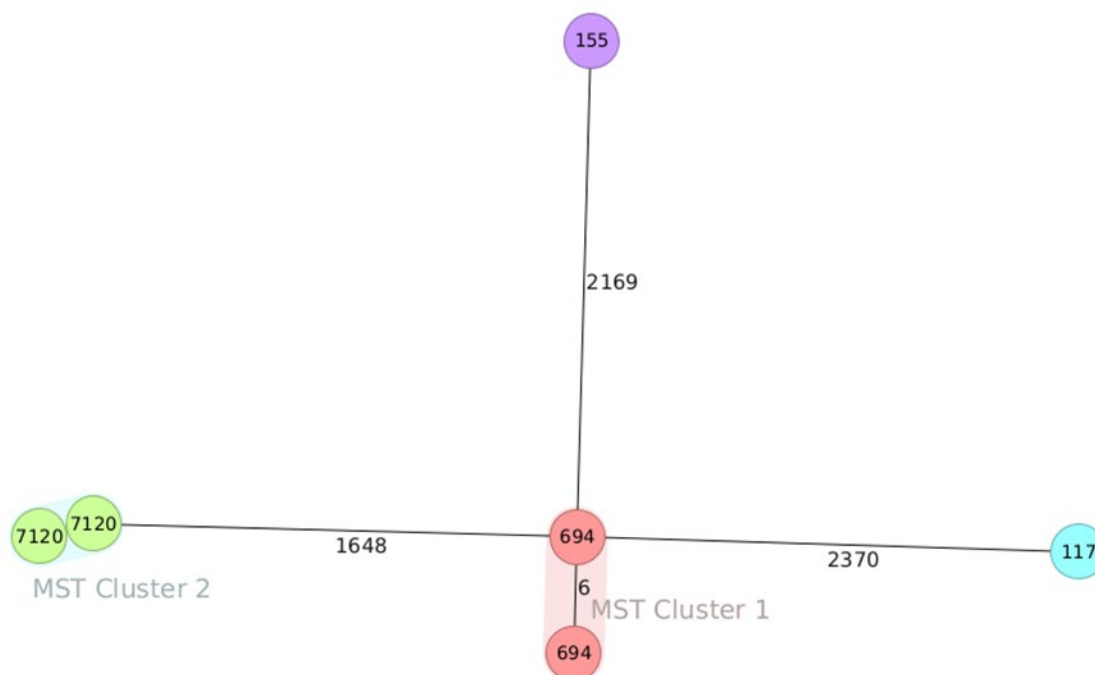
Věk zvířat (dny)	Vzorek	Geny rezistence					
		<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac</i>	<i>qepA</i>	<i>mcr1</i>
0	hoblíny	-	-	-	-	-	-
0	napáječka	-	-	+	+	-	-
0	krmítko	-	-	+	+	-	-
0	stěry pod okny	-	-	-	-	-	-
49	stěr stěna	-	+	+	+	-	-
49	krmítko	-	+	+	+	-	-
49	napáječka	-	+	+	+	-	-
49	voda - začátek rozvodu	-	+	+	+	-	-
49	voda - konec rozvodu	-	+	-	+	-	-

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

Tabulka 22. Sledování přítomnosti vybraných genů rezistence ve faeces z farmy (celková DNA z pomnožené pufované peptonové vody)

Věk zvířat (dny)	Vzorek	Geny rezistence					
		<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac</i>	<i>qepA</i>	<i>mcr1</i>
1	faeces/podkladové papíry	-	-	-	-	-	-
12	faeces/podestýlka	-	+	+	-	-	-
26	faeces/podestýlka	-	-	+	+	-	-
49	faeces/podestýlka	-	+	+	+	-	-
64	faeces/podestýlka	-	+	+	+	-	-
78	faeces/podestýlka	-	+	+	+	-	-
92	faeces/podestýlka	-	+	+	-	-	-

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



Obrázek 8. Minimum spanning tree pro vizualizaci vztahů mezi 6 izoláty Escherichia coli založený na porovnání 2513 genů v rámci core genome MLST. Detekční limit příbuznosti byl nastaven na rozdíl maximálně 10 alel. Barevně jsou zvýrazněny různé sekvenční typy.

Tabulka 23. Charakteristika vybraných bakterií izolovaných z podestýlky s faeces zvířat z farmy; A - přehled genů rezistence dle databáze ResFinder 4.7.2, B – přehled detekovaných plazmidů dle databáze PlasmidFinder2.1

A přehled genů rezistence dle databáze ResFinder 4.7.2

Věk zvířat (dny)	12	26	49	64	78	78	92	92
Bakteriální druh	<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Sérotyp	O11:H4	x	?H45	O101:H33	O184:H30	O101:H33	O184:H30	x
MLST	117	18	155	694	7120	694	7120	525
aminoglykosidy	<i>aph(3')-Ia</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>aadA1</i>	1	1	0	1	0	1	0
	<i>aadA5</i>	0	1	0	0	0	0	0
betalaktamy	<i>blaEC (AmpC)</i>	1	0	1	1	1	1	0
	<i>blaCMY (AmpC)</i>	0	1	0	0	0	0	0
	<i>blaDHA-1 (AmpC)</i>	0	1	0	0	0	0	0
	<i>blaTEM-1</i>	1	1	1	0	1	0	1
	<i>blaCARB-2</i>	0	0	0	1	0	1	0
	<i>blaOXA-1</i>	0	1	0	0	0	0	0
chinolony	<i>gyrA_S83L</i>	1	1	1	1	1	1	1
	<i>gyrA_D87N</i>	0	0	0	1	1	1	0
	<i>parC_S80I</i>	0	1	0	1	1	1	1
	<i>parE_S458A</i>	0	0	0	0	0	1	0
	<i>aac(6)-Ib-cr5</i>	0	1	0	0	0	0	0
	<i>qnrB4</i>	0	1	0	0	0	0	0
	<i>qnrS</i>	0	0	0	1	1	0	1
	<i>qnrS1</i>	0	0	1	0	0	1	0
	<i>qnrS13</i>	1	0	0	0	0	0	0
tetracyklin	<i>tet(A)</i>	1	0	0	0	0	0	1
inhibitory syntézy kyseliny listové	<i>sul1</i>	0	1	0	0	0	0	1
	<i>sul3</i>	0	0	0	1	0	1	0
	<i>dfrA1</i>	1	1	0	0	0	0	1
	<i>dfrA12</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>dfrA16</i>	0	0	0	1	0	1	0
	<i>dfrA17</i>	0	1	0	0	0	0	0
	<i>dfrA50</i>	0	0	0	0	0	0	1
	<i>dfrA51</i>	0	1	0	0	0	0	0
kolistin	<i>mcr-1.1</i>	0	0	0	0	0	0	0

B přehled detekovaných plazmidů dle databáze PlasmidFinder2.1

Věk zvířat (dny)	12	26	49	64	78	78	92	92
Bakteriální druh	<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Sérotyp	O11:H4	X	?H45	O101:H33	O184:H30	O101:H33	O184:H30	X
MLST	117	18	155	694	7120	694	7120	525
IncFIA(HI1)	0	0	0	1	0	1	0	0
IncFIB(AP001918)	0	0	1	1	0	1	0	0
IncFIB(pB171)	1*	0	0	0	0	0	0	0
IncFIB(K)	0	0	0	0	0	0	0	1
IncFIB(pKPHS1)	0	0	0	0	0	0	0	1
IncFIB(pHCM2)	0	1	0	0	0	0	0	0
IncFII	1	0	0	0	0	0	0	0
IncFII(K)	0	0	0	0	0	0	0	1*
IncFII(pSDP9R)	0	0	0	0	0	0	0	1*
IncFII(pSE11)	0	0	1	1	0	1	0	0
IncI1-I(Alpha)	0	0	1*	1*	0	1*	0	0
IncN	0	0	0	0	1*	0	1*	0
IncP1	0	0	1	0	0	0	0	0
IncR	0	1†	0	1	0	1	0	0
Col8282	0	0	1	0	0	0	0	0
pKPC-CAV1321	0	1	0	0	0	0	0	0

MLST – multilokusová sekvenční typizace; X – nestanovováno; 1/0 gen (plazmid) detekován/nedetekován; * umístění genu *qnrS*,

† umístění genu *qnrB*

5.2 Modelový pokus (D)

5.2.1 Přežívání kmenů *Escherichia coli* s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům a kolistinu ve fermentované podestýlce s faeces z krutí farmy

Fermentace inokulované faeces s podestýlkou probíhala 53 dnů. Vzorky ke stanovení vybraných genů rezistence byly odebírány na začátku pokusu, ihned po inokulaci, a dále po 14 a 27 dnech od přidání suspenze modelových kmenů. U vzorků bylo provedeno kvantitativní i kvalitativní vyšetření. Výsledky (tabulka 24) ukázaly, že podestýlka z farmy neobsahovala izoláty *E. coli* nebo koliformních bakterií se shodným antibiotickým profilem jako modelové kmeny. Stejně jako na farmě byly však v celkové DNA ze vzorků pomnožených v peptonové vodě detekovány geny *qnrB*, *aac(6')-Ib-cr* a *qnrS*, nesené jinými bakteriálními rody než z čeledi *Enterobacteriaceae*. Aplikací bakteriální suspenze o denzitě 1×10^6 KTJ/ml v objemu 1 litru do 26,7 kg podestýlky bylo dosaženo finální koncentrace modelových kmenů v pokusné podestýlce s faeces v hodnotě 9×10^5 KTJ/g. Následné sledování kvantity inokulovaných kmenů ukázalo, že po 14 dnech fermentace jejich počet klesl pod hodnotu 100 KTJ/g. Gen rezistence specifický pro modelové kmeny (*mcrI*) nebyl prokázán ani po pomnožení vzorků, což naznačuje, že modelové kmeny *E. coli* v podmínkách fermentačního procesu nepřežívaly. Obdobný průběh byl pozorován i v předchozím experimentu s fermentací podestýlky z farmy výkrmu kuřecích brojlerů (UKZUZ 2023).

Během fermentace dochází v substrátu k výrazným fyzikálním a chemickým změnám. Za nejvýznamnější faktor je považována teplota, která se v průběhu procesu v závislosti na použité technologii může zvyšovat až na hodnoty nad 50 °C. Bylo prokázáno, že tak dochází ke změnám mikrobiomu, včetně genů rezistence. Vyšší teploty vedou k denaturaci proteinů, narušení buněčných struktur a inhibici enzymatických systémů, což zásadně omezuje životaschopnost mezofilních bakterií, včetně *E. coli* (Wang et al. 2022).

Na změnách mikrobiomu při zrání podestýlky se podílejí i další faktory. Obecně mezi ně patří změny pH, aktivita vody nebo vzájemné vztahy mezi mikroorganismy jako je antagonismus či kompetice (Wilkinson et al. 2011). V důsledku tvorby amoniaku během zrání se pH drůbeží podestýlky posouvá do alkalického rozmezí. V této studii byla potvrzena hodnota pH 9, což je faktor, který neumožňuje dlouhodobé přežití většiny zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* (Koziel et al. 2017).

Faeces s podestýlkou z chovů drůbeže obsahuje velké a rozmanité množství mikroorganismů, jejichž koncentrace může dosahovat až 10^{10} KTJ/g. Hlavní složku tvoří grampozitivní bakterie z kmene *Firmicutes* a *Actinobacteria*, v průběhu zrání se jejich zastoupení ale snižuje a převažují zástupci gramnegativních bakteí z kmene *Proteobacteria* (Chen et al. 2014). Jedná se zejména o psychrofilní bakterie z čeledí *Pseudomonadaceae* a *Aeromonadaceae*. Z dříve provedené studie metagenomu drůbeží podestýlký vyplývá, že abundance *E. coli* a koliformních bakterií je nejvyšší v podestýlce s faeces z farmy, v průběhu fermentace se jejich relativní četnost snižuje (UKZUZ 2023).

Tabulka 24. Stanovení počtu modelových kmenů *Escherichia coli* a průkaz genů rezistence v průběhu pokusu fermentace podestýlky

Datum odběru	Vzorek	Stanovení počtu modelových <i>E. coli</i>	Geny rezistence	
			stanovení počtu	po pomnožení
08.04.2025	fermentovaná podestýlka s faeces	<100 KTJ/g	-	<i>qnrB</i> , <i>aac</i> , <i>qnrS</i>
08.04.2025	podestýlka zaočkovaná modelovými kmeny	$9,3 \times 10^5$ KTJ/g	<i>qnrB</i> , <i>aac</i> , <i>qnrS</i> , <i>mcr1</i>	<i>qnrB</i> , <i>aac</i> , <i>qnrS</i> , <i>mcr1</i>
22.04.2025	podestýlka zaočkovaná kmeny, výsledek po 14 dnech fermentace (inokulace 8.4.)	<100 KTJ/g	-	<i>qnrB</i> , <i>aac</i>
05.05.2025	podestýlka zaočkovaná kmeny, výsledek po 27 dnech fermentace (inokulace 8.4.)	<100 KTJ/g	-	<i>qnrB</i> , <i>aac</i> , <i>qnrS</i>

aac = *aac(6')-Ib-cr*; - negativní

5.2.2 Přežívání kmenů *Escherichia coli* s plazmidově vázanou rezistencí k chinolonům a kolistinu v půdě

Stanovení počtu *E. coli* a koliformních bakterií a průkaz sledovaných genů rezistence k chinolonům a kolistinu ve vzorku půdy před zahájením polního pokusu neprokázalo přítomnost sledovaných bakterií (<100 KTJ/g) ani vybraných genů rezistence. Potvrzen byl pouze výskyt genu *qnrB*. Vzhledem k tomu, že koliformní bakterie ani *E. coli* nebyly ve vzorku zjištěny, a to ani po pomnožení, zřejmě byl tento gen nesen jinými čeleděmi mikroorganismů. Protože modelové kmeny nepřežily fermentační proces, byla dne 10. 6. 2025 provedena inokulace půdy nově připravenou suspenzí modelových kmenů *E. coli* CT246 a CT280 v denzitě $1,1 \times 10^8$ KTJ/ml v objemu pět litrů. Přežívání kmenů bylo sledováno po dobu 13 týdnů s intervalem odběru vzorků 14 dní. Z výsledků uvedených v tabulce 25 vyplývá, že

aplikace modelových kmenů do půdy byla úspěšná a tyto *E. coli* byly v půdě detekovatelné v kvantitě vyšší než 100 KTJ/g po dobu 7 týdnů. Výjimkou byl 3. týden od inokulace, kdy byly modelové kmeny prokázány pouze po pomnožení vzorku. Z obrázku 7 je patrné, že ve druhé polovině června byl srážkový úhrn nižší než v následujícím období. To v kombinaci s vyššími teplotami mohlo mít na modelové kmeny baktericidní účinek. Současně následná změna počasí a úhrn srážek výrazně nad srážkovým normálem pravděpodobně umožnila opakované pomnožení modelových kmenů nad detekční limit. Geny rezistence, specifické pro modelové kmeny (*mcrI*), byly ale ve vzorcích půdy po pomnožení prokazatelné i po 13 týdnech od inokulace. Je tak pravděpodobné, že jsou modelové kmeny v půdě stále přítomny, i když v minimální kvantitě.

Kromě genů *qnrS* a *mcrI*, které se do půdy dostaly suplementací kmeny *E. coli*, byly ve vzorcích prokázány i geny *qnrB* a *aac(6')-Ib-cr*. Vzhledem k tomu, že z půdy nebyly izolovány jiné typy *E. coli* nebo koliformních bakterií než modelové kmeny, musely být tyto geny nesený zástupci jiných bakteriálních rodů. V literatuře jsou popisovány tyto geny také u grampozitivních bakterií nebo psychrofilních bakterií např. rodu *Aeromonas* (Jacoby et al. 2014), jejich sledování ale nebylo v naší studii prováděno.

Aplikace organického hnojiva do půdy má nesporné výhody jako je doplnění prvků nezbytných pro růst rostlin nebo zlepšení půdní struktury. Nese ale i určitá rizika zejména s ohledem na možný obsah bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám včetně genů rezistence. Nedávné studie prokázaly, že antibiotika nebo jejich rezidua v podestýlce s faeces negativně ovlivňují proces kompostování hnoje, kdy dochází k pomalejšímu rozkladu organické hmoty. Tento jev je pravděpodobně způsoben změnami v diverzitě půdních mikroorganismů a inhibicí enzymů, jako jsou dehydrogenázy a ureázy. Výsledkem je snížená mikrobiální aktivita v půdě, která omezuje rozklad organické hmoty a narušuje přirozené půdní procesy (Abolhassani et al. 2023; Wyszowska et al. 2025). Vlivem hnojení na diverzitu mikroorganismů a šíření genů rezistence v půdě a rostlinách se zabývala i studie autorů Ransirini et al. (2025). V experimentu s půdou obohacenou podestýlkou s faeces z chovu krůt a s půdou takto neošetřenou bylo zjištěno, že geny rezistence k různým antimikrobikům byly přítomny pouze ve vzorcích hnojené půdy, a to včetně genů rezistence k fluorochinolonom (*aac(6')-Ib-cr*). Dále sledovali výskyt genů rezistence také u endofytů z kořene a listů ředkvičky seté (*Raphanus sativus*) pěstované na těchto typech půd a prokázali geny rezistence v listech rostlin z hnojených půd. To naznačuje možný přenosu genů do konzumních částí rostlin, a tedy riziko šíření genů rezistence v potravinovém řetězci.

Izolát *E. coli* ze vzorku odebraném 11. týdnů po inokulaci byl odeslán ke kontrolní celogenomové sekvenaci. Bylo zjištěno, že izolát svojí charakteristikou odpovídá modelovému kmeni CT280 (tabulka 26A,B), i když shoda není úplná. Kmeny náleží ke stejnému sérotypu, nesou shodné plazmidy, mírně se ale liší v detekovaných genech rezistence. U izolátu z půdy nebyl prokázán gen pro produkci aminoglykosidázy (*aad2*) ani gen *tetA*, kódující rezistenci k tetracyklinu. Naopak na rozdíl od původního kmene nově nese gen *qnrS*. Obecně ke změnám genetické výbavy bakterií dochází např. vlivem selekčního tlaku prostředí. Vzhledem k tomu, že modelové kmeny byly sekvenčně charakterizovány v roce 2013, nelze s jistotou vyloučit vliv metodických faktorů jako je nízká coverage sekvenace nebo aktualizace bioinformatických softwarů použitých k analýze.

Tabulka 25. Stanovení počtu modelových kmenů *Escherichia coli* v průběhu polního pokusu

Datum odběru	Vzorek	Stanovení počtu modelových <i>E. coli</i>	Geny rezistence	
			stanovení počtu	po pomnožení
30.05.2025	půda před aplikací kmenů	<100 KTJ/g	-	<i>qnrB</i>
10.06.2025	půda po inokulaci	2 x 10 ⁵ KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
16.06.2025	půda 1 týden po aplikaci	3 x 10 ³ KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, mcr1</i>	<i>qnrB, aac, mcr1</i>
30.06.2025	půda 3 týdny po aplikaci	<100 KTJ/g	-	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
14.07.2025	půda 5 týdnů po aplikaci	1,6 x 10 ³ KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, mcr1</i>	<i>qnrS, aac, mcr1</i>
28.07.2025	půda 7 týdnů po aplikaci	1 x 10 ² KTJ/g	<i>qnrB, qnrS, mcr1</i>	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
11.08.2025	půda 9 týdnů po aplikaci	<100 KTJ/g	-	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
25.08.2025	půda 11 týdnů po aplikaci	<100 KTJ/g	-	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>
08.09.2025	půda 13 týdnů po aplikaci	<100 KTJ/g	-	<i>qnrB, qnrS, aac, mcr1</i>

aac = *aac(6')-Ib-cr*; - negativní

Tabulka 26. Charakteristika kmenů *Escherichia coli* z modelového pokusu; A -přehled genů rezistence dle databáze ResFinder 4.7.2; B – přehled detekovaných plazmidů dle databáze PlasmidFinder2.1

A přehled genů rezistence dle databáze ResFinder 4.7.2

Označení vzorku		CT246	CT280	721.25.1
Původ izolátu		odpadní voda	krůtí játra	pole
Bakteriální druh	ZDE SLOUČIT BUNKY, AŽ NA ÚPLNÝ ZYVÉR	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Sérotyp		O30:H25	O100:H28	O100:H28
MLST Achtman		11339	1196	x
MLST Pasteur		x	632	632
aminoglykosidy	<i>aph(3)-Ia</i>	1	1	1
	<i>aph(6)-Id</i>	1	0	0
	<i>aadA1</i>	0	1	1
	<i>aadA2</i>	0	1	0
betalaktamy	<i>blaTEM-1</i>	0	1	1
	<i>blaTEM-různé</i>	1	0	0
chinolony	<i>gyrA_S83L</i>	1	1	1
	<i>gyrA_D87N</i>	1	1	1
	<i>parC_S80I</i>	1	1	1
	<i>qnrB19</i>	0	1	1
	<i>qnrS1</i>	1	0	1
tetracyklin	<i>tet(A)</i>	1	1	0
inhibitory syntézy kyseliny listové	<i>sul2</i>	1	0	0
	<i>sul3</i>	0	1	1
	<i>dfrA12</i>	0	1	1
	<i>dfrA14</i>	1	0	0
kolistin	<i>mcr-1.1</i>	1	1	1

X – nestanoveno; 1/0 gen (plazmid) detekován/nedetekován

B přehled detekovaných plazmidů dle databáze PlasmidFinder2.1

Označení vzorku	CT246	CT280	721.25
Původ izolátu	odpadní voda	krůtí játra	pole
Bakteriální druh	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Sérotyp	O30:H25	O100:H28	O100:H28
MLST Achtman	11339	1196	x
MLST Pasteur	x	632	632
IncFIB(AP001918)	0	1	1
IncFIB(H89-PhagePlasmid)	0	1	1
IncFII(pCoo)	0	1	1
IncHI2	0	1	1
IncHI2A	0	1	1
IncP1	1	0	0
IncR	0	1	1
p0111	1	0	0
Col(pHAD28)	0	1	1

X – nestanoveno; 1/0 gen (plazmid) detekován/nedetekován

5.2.3 Analýza vzorků podestýlky v průběhu fermentace

Byla provedena analýza enrofloxacinu a jeho metabolitu ciprofloxacinu ve feaces s podestýlkou před a v průběhu fermentace. Podestýlka byla naspikována VLP Enrogal a podrobena fermentaci za účelem sledování odstranění enrofloxacinu před její následnou aplikací na zemědělskou půdu. (Obhacení faeces s podestýlkou enrofloxacinem bylo provedeno ve vyšších dávkách enrofloxacinu, které jsou environmentálně relevantní a dosud nebyly zkoumány.) Průběžně během fermentace byly odebírány vzorky podestýlky, která byla směsí slámy a drůbežího trusu. Každý vzorek byl vždy homogenizován, poté podroben extrakci

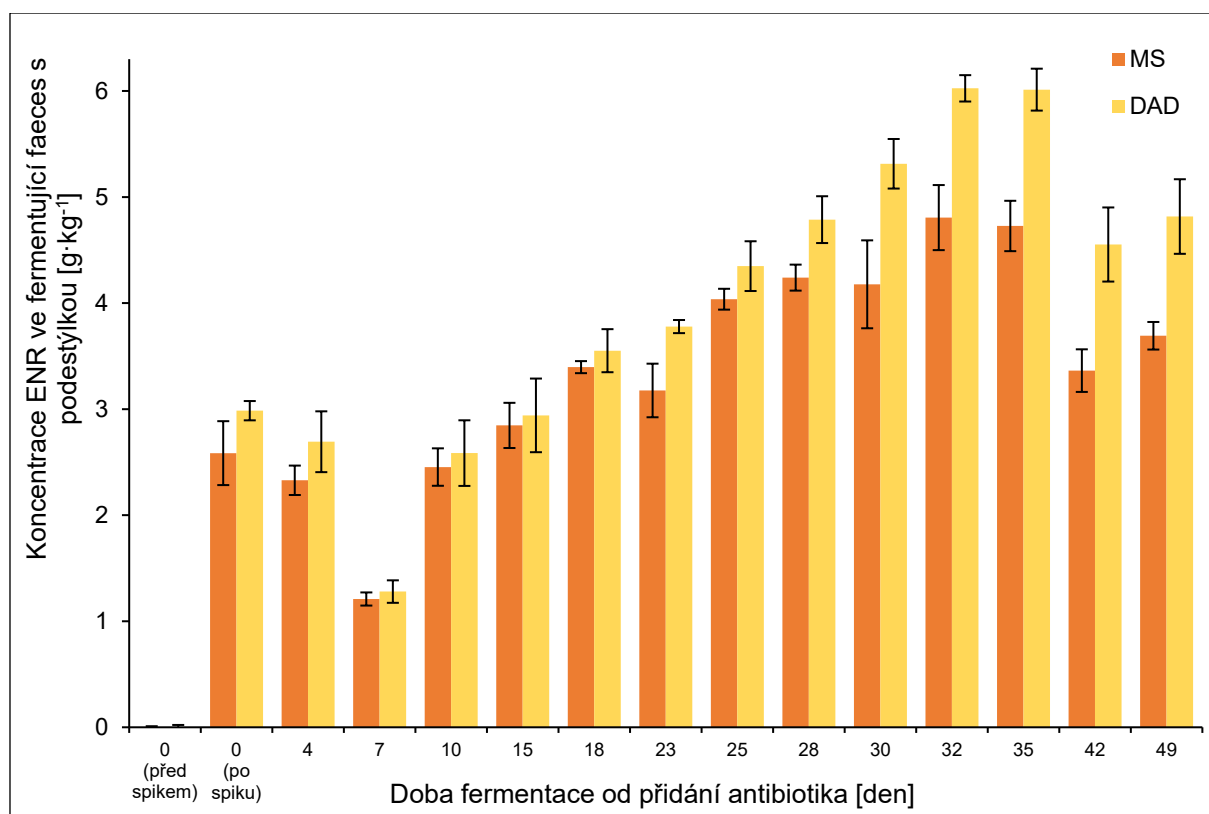
a následně analyzován metodami kapalinové chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) a s detekcí pomocí UV/VIS (LC-DAD).

Analýza každého vzorku byla provedena v 5 opakováních. U každého vzorku byla stanovena sušina a výsledky jsou uvedeny jako koncentrace antibiotika přepočtená na sušinu fermentované mrvy v $\text{dw g}\cdot\text{kg}^{-1}$ resp. $\text{dw mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

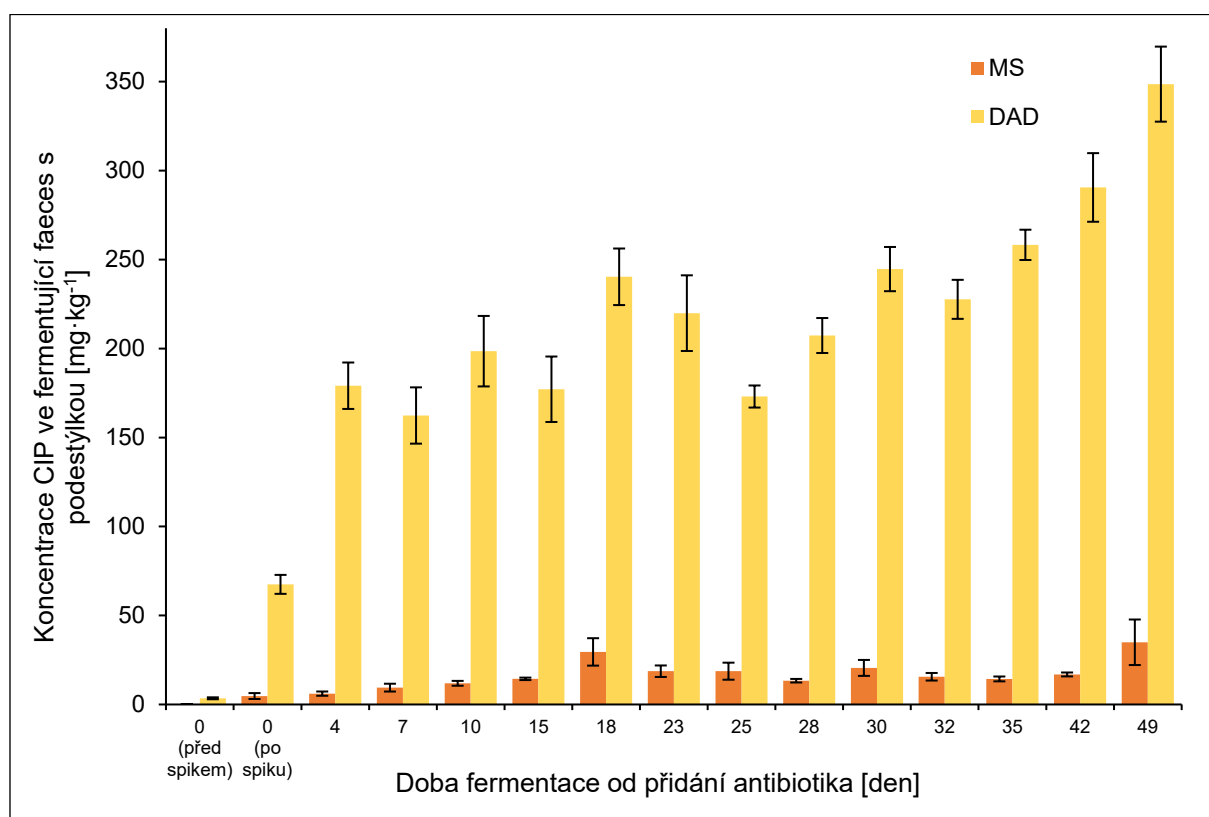
Fermentace krůtí podestýlky probíhala od 24. 2. 2025 do 30. 5. 2025 (celkem 14 týdnů). Dne 7. 4. 2025 bylo do rozfermentované podestýlky přidáno 270 ml přípravku Enrogalu ($T=0$ den na obrázku 9), což odpovídá dávce 27 g enrofloxacinu na 27 kg podestýlky, tedy přibližně $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ enrofloxacinu na mokrou váhu krůtí podestýlky (sušina vzorku v $T=0$ byla stanovena na 45 %). Naměřené koncentrace enrofloxacinu v čase T_0 odpovídají předpokladům s ohledem na extrakční výtěžnosti naší analytické metody a byly zvoleny vyšší z důvodu záměru následné aplikace na půdu, kde dochází ke zředění koncentrace.

Během fermentace byly analyzovány vzorky feaces s podestýlkou v rozmezí 0–49 dnů. Enrofloxacin jako výchozí látka, i jeho metabolit ciprofloxacin, byly detekovány oběma metodami ve všech analyzovaných vzorcích. Pomocí LC-DAD byly naměřeny vyšší koncentrace enrofloxacinu o 3–26 % v jednotlivých vzorcích a vyšší koncentrace ciprofloxacinu o 87–97 %. Naměření vyšších koncentrací pravděpodobně způsobilo velké množství matrice ve vzorku a s tím související matriční efekty, jelikož při LC-DAD nebyly matriční efekty kompenzovány oproti LC-MS/MS, kde byly využity interní standardy. U LC-DAD mohou být detekovány látky absorbující při stejné vlnové délce jako enrofloxacin a ciprofloxacin. Výhodou LC-DAD je oproti LC-MS/MS nízká pořizovací cena a nízké náklady na údržbu. Výsledný trend vývoje koncentrací v čase je obdobný při využití obou metod. Pro vyhodnocení byly vybrány výsledky z LC-MS/MS

Před přidáním Enrogalu byly hodnoty enrofloxacinu a ciprofloxacinu pod limitem detekce (obr. 9 a 10). Enrogal byl přidán v čase T_0 a jeho koncentrace stanovena pomocí LC-MS/MS byla $2,6\pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. V průběhu fermentace se koncentrace enrofloxacinu naměřené na LC-MS/MS pohybovaly v rozmezí $1\text{--}5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Koncentrace enrofloxacinu se během prvního týdne snižovala na 86 % koncentraci vůči koncentraci v čase T_0 . Následně, až do 35. dne se koncentrace zvýšila až o 53 % vůči koncentraci v T_0 a opět začala klesat. Koncentrace metabolitu ciprofloxacinu naměřené na LC-MS/MS se od počátku fermentace ($T=0$) zvýšila z $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ až o 300 % do konce fermentace. Koncentrace ciprofloxacinu se tedy pohybovaly v rozmezí $5\text{--}32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, což je představuje pouze 0,2–1 % koncentrace enrofloxacinu v jednotlivých vzorcích.



Obrázek 9. Koncentrace enrofloxacinu (ENR) stanovené pomocí LC-MS/MS (oranžové sloupce) a LC-DAD (žluté sloupce) ve faeces s podestýlkou v průběhu fermentace



Obrázek 10. Koncentrace metabolitu ciprofloxacinu (CIP) stanovené pomocí LC-MS/MS (oranžové sloupce) a LC-DAD (žluté sloupce) ve faeces s podestýlkou v průběhu fermentace

Výsledky tedy naznačují, že nedocházelo k dostatečné degradaci enrofloxacinu, čemuž odpovídají nízké koncentrace jeho metabolitu ciprofloxacinu. Kolísání koncentrací v průběhu fermentace může být přisouzeno odchylkám analytické metody, nehomogenitě vzorku v nádobě, kde probíhala fermentace, nebo variabilitě obsahu vody v průběhu procesu. Avšak docházelo ke zvyšování koncentrace enrofloxacinu se statistickou významností dle hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu $r=0,754$ a $p=0,000$, kdy hodnota r je vyšší než 0,5, což naznačuje silně pozitivní korelaci mezi dobou fermentace a koncentrací enrofloxacinu. Koncentrace ciprofloxacinu se zvyšovala úměrně s koncentrací enrofloxacinu. Kinetika degradace antibiotika obecně závisí na jeho vlastnostech jako jsou disociační konstanty (pK_A), rozdělovací koeficienty oktanol-voda (K_{OW}), rozpustnost ve vodě či polarita (Biel-Maeso et al., 2019). Jejich degradaci při fermentaci ovlivňuje teplota, doba fermentace, množství sušiny, mikrobiální společenstvo (Zubair et al., 2023). Zvyšující trend enrofloxacinu při fermentaci v čase je rozdílný oproti výsledkům, které jsou uvedeny v předchozí zprávě zabývající se degradací enrofloxacinu z roku 2023 (UKZUZ 2023), kdy byly ovšem koncentrace v jednotkách $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ čerstvé podestýlky. To naznačuje, že degradace enrofloxacinu při fermentaci závisí na jeho počáteční koncentraci. Vysoké koncentrace antibiotika mohly být toxické pro přítomné mikroorganismy, a tím omezit biodegradaci v procesu fermentace. Obvyklé koncentrace jsou $1\text{--}10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, případně až $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Zubair et al., 2023), ale vysoké koncentrace $>1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ENR byly v reálných vzorcích naměřeny v kuřecím trusu v Číně až $1,42 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Zhao et al., 2010).

I jiné studie uvádí fluorochinolony jako stabilní (Zhang & Li, 2018) anaerobní digesce čistírenského kalu s obsahem fluorochinolonů v jednotkách $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ probíhala 30 dní při mezofilní teplotě ($35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). Fluorochinolony se v systému anaerobní digesce rozkládaly nejpomaleji a nejméně účinně ze všech sledovaných antibiotik — zatímco tetracykliny a většina makrolidů byly odstraněny z více než 80 %, fluorochinolony se snížily jen o 35–40 % a zůstaly převážně adsorbovány v kalu.

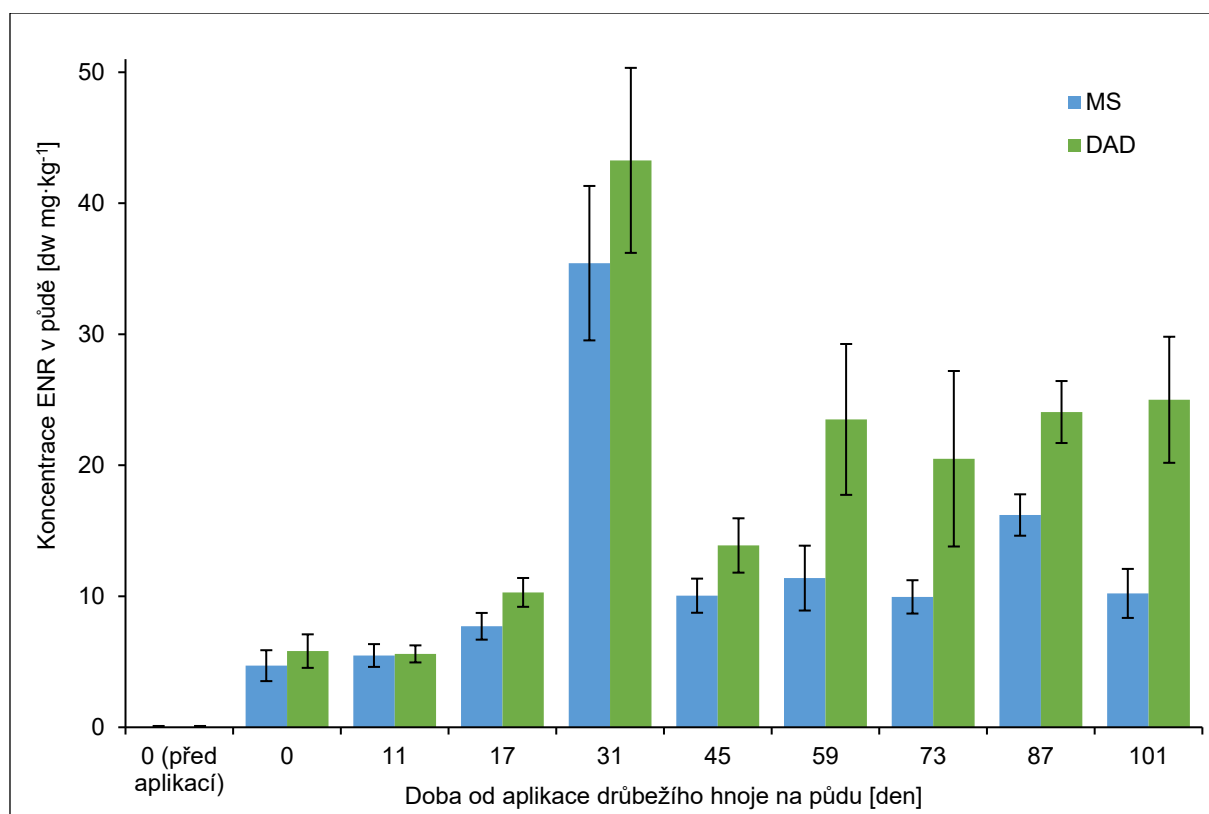
Fluorochinolony se ve vysoké míře adsorbují na pevné částice, což souvisí s lipofilitou enrofloxacinu ($\log K_{ow} = 1,1$) (Wang et al., 2017) a elektrostatickými interakcemi (Zhang & Li, 2018). To by mohlo vysvětlovat nárůst koncentrace enrofloxacinu v čase, kdy mohlo docházet postupně k desorpci pevně vázané frakce léčiva. Navíc je pouze nízký podíl enrofloxacinu v matrici rozpuštěný, a to snižuje rychlost degradace (Zhang & Li, 2018).

5.2.4 Analýza vzorků půdy

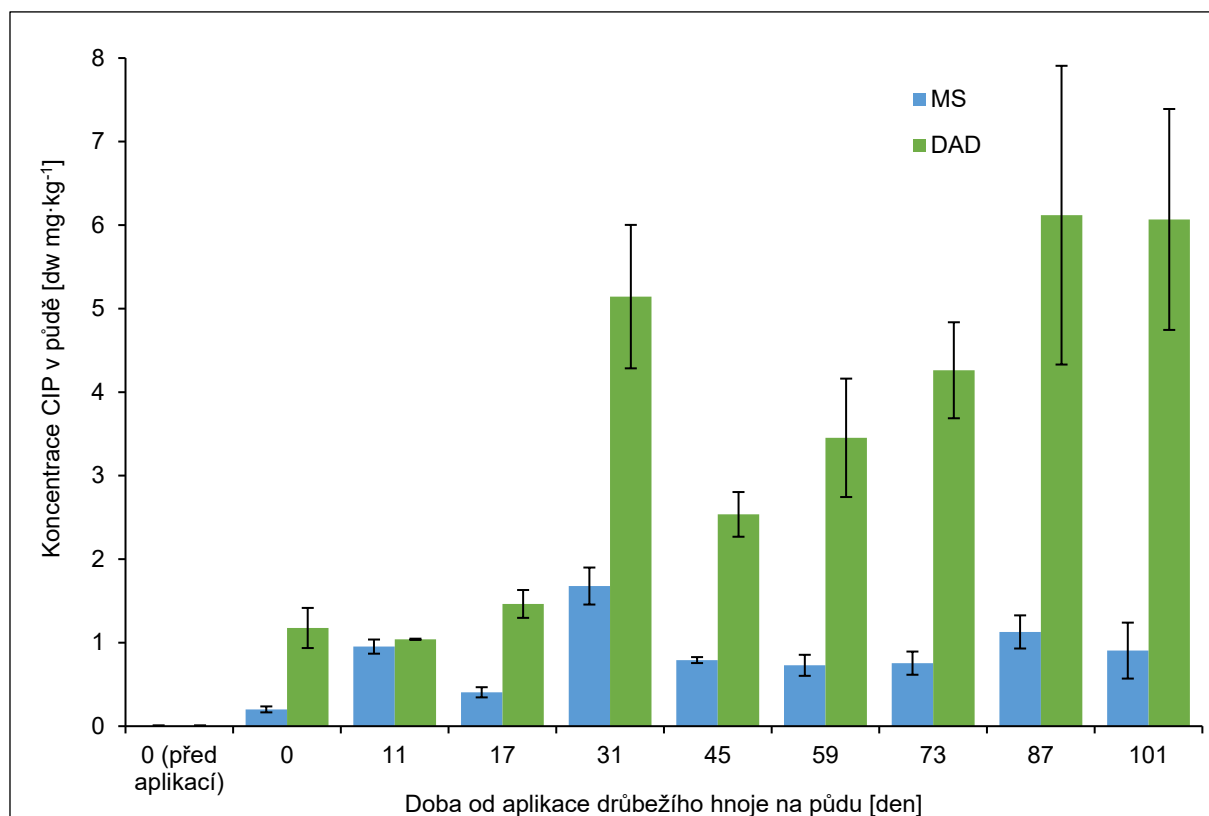
Analýza enrofloxacinu a jeho metabolitu ciprofloxacinu byla provedena na vzorcích půdy, které byly odebrány před a po aplikaci drůbežího hnoje s Enrogalem (obrázek 11). Každý vzorek půdy byl nejprve homogenizován, poté podroben extrakci a následně analyzován metodou LC-MS/MS a LC-DAD. Dále byla u každého půdního vzorku stanovena sušina (ca 80 %), a výsledky jsou uvedeny jako koncentrace enrofloxacinu přepočtená na sušinu půdy v $\text{dw} \cdot \text{kg}^{-1}$ (obrázek 11).

Dne 30. 5. 2025 byl na půdu aplikován drůbeží hnůj. Půdní vzorky byly odebrány a analyzovány v rozmezí 0–101 dnů. Ve všech vzorcích půdy byl naměřen enrofloxacin i jeho metabolit ciprofloxacin oběma metodami (obrázek 11 a 12). DAD metoda vykazovala vyšší směrodatné odchylky, protože mohly být detekovány i jiné látky absorbující při 280 nm. Tato metoda měla proto nižší preciznost a nižší reprodukovatelnost. To odpovídá skutečnosti, že metoda měření pomocí DAD je méně specifická než MRM mód v MS/MS (Gumustas et al, 2013). Pomocí LC-DAD byly naměřeny vyšší koncentrace enrofloxacinu o 19–59 % v jednotlivých vzorcích a vyšší koncentrace ciprofloxacinu o 67–85 %. Důvodem vyšších hodnot i vyšších odchylek naměřeného množství ciprofloxacinu v půdě metodou LC-DAD mohly být také vyšší limity detekce a kvantifikace této metody, jelikož naměřené koncentrace byly blízko hodnotám těchto limitů ($\text{MLoD}=0,54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{MLoQ}=1,65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Jako relevantnější proto byly vybrány výsledky z LC-MS/MS.

Na počátku byla koncentrace enrofloxacinu v půdě pod limitem detekce u obou metod. Po aplikaci drůbežího hnoje v čase T_0 byla naměřena koncentrace $4,7 \pm 1,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, což je stále environmentálně relevantní koncentrace (Pan & Chu, 2017, Matamoros et al., 2022), která byla testována i v dalších studiích (Yang et al., 2012, Chung et al., 2017). Následně byly v průběhu 101 dnů naměřeny koncentrace enrofloxacinu v rozmezí $5,98\text{--}38 \text{ dw} \cdot \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. V průběhu těchto 101 dnů nebylo pozorováno snížení koncentrace enrofloxacinu, které by bylo možné přisoudit jeho degradaci, či odplavu vlivem naměřených srážek na stanici ÚKZÚZ (viz meteorologická data na obrázku 7). Došlo ke zvýšení koncentrace enrofloxacinu téměř 3krát vůči koncentraci v čase T_0 . Koncentrace metabolitu ciprofloxacinu naměřené na LC-MS/MS se od počátku $T=0$ během 101 dnů zvýšila z $0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $0,9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Koncentrace ciprofloxacinu odpovídala v průběhu experimentu 4–9 % koncentrace enrofloxacinu v jednotlivých vzorcích, což je vyšší relativní množství, než bylo v průběhu fermentace.



Obrázek 11. Koncentrace enrofloxacinu (ENR) ve vzorcích půdy po aplikaci stanovené pomocí LC-MS/MS (modré sloupce) a LC-DAD (zelené sloupce).



Obrázek 12. Koncentrace ciprofloxacinu (CIP) ve vzorcích půdy po aplikaci drůbežího hnoje stanovené pomocí LC-MS/MS (modré sloupce) a LC-DAD (zelené sloupce).

Z výsledků vyplívá, že enrofloxacin je v půdě perzistentní. Rychlost a míra degradace léčiv v půdě závisí na jejich struktuře či dalších vlastnostech (M_w , $\log P$, pK_a). Taktéž závisí na typu přítomných mikroorganismů (tedy i rostlin), pH, teplotě, vlhkosti, salinitě, přítomnosti kyslíku a dalších faktorech (Shaheen et al., 2022).

Výsledky degradace jsou opět odlišné proti výsledkům v předchozí zprávě zabývající se degradací enrofloxacinu z roku 2023 (UKZUZ 2023), kde původní množství enrofloxacinu v půdě po prvním týdnu kleslo na polovinu. Koncentrace se ovšem pohybovaly v řádu desítek $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Obdobně jako v případě degradace při fermentaci může být důvodem persistence enrofloxacinu relativně vyšší koncentrace ($\approx 5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), která omezila degradaci. I v dalších studiích klesala rychlost degradace s rostoucí počáteční koncentrací fluorochinolonu (Pan & Chu, 2016, Yang et al., 2012). V jedné publikaci po 42 dnech zdegradovalo 62, 48 nebo 40 % norfloxacinu o počátečním obsahu 5, 10 nebo 30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Yang et al., 2012). Odolnost fluorochinolonů vůči biodegradaci byla výsledkem i dalších studií a důvodem může být také silná kinetická adsorpce enrofloxacinu (nízký $\log K_{ow} \approx 0$), která s rostoucí dobou kontaktu v půdě snižuje biologickou dostupnost antibiotik, čímž je chrání před biodegradací (Chung et al., 2017). To by mohlo obdobně jako v případě podestýlky vysvětlovat zdánlivě zvyšující koncentraci enrofloxacinu v čase.

6. ZÁVĚRY

- **Spotřeba antimikrobik, s důrazem na celkové spotřeby enrofloxacinu a kolistinu a u krůt pro produkci masa:** Celkové spotřeby (prodeje) antimikrobik u potravin produkujících zvířat v ČR dlouhodobě klesají (za období od roku 2018 do roku 2024) o 25 %. Nicméně je nutné sledovat nejen celkovou kvantitu, ale také kvalitativní stránku, tedy portfolio používaných antimikrobik. U kolistinu je spotřeba v ČR dlouhodobě nízká (specificky pro krůty byla pro celou ČR v roce 2023 9,8 kg kolistinu, což vztaženo na biomasu krůt bylo 0,92 mg/kg biomasy), v roce 2024 pak klesla u krůt na nulu. U enrofloxacinu je celková spotřeba zejména u drůbeže v rámci ČR vysoká (nejvyšší je u brojlerů kura domácího, následují krůty). V roce 2023 u krůt činila 7,18 mg/kg biomasy, v roce 2024 poklesla na 5,90 mg/kg biomasy – tedy téměř o 18 %. V hmotnostních objemech, pak u krůt v roce 2023 bylo použito 76,31 kg enrofloxacinu, zatímco v roce 2024 o téměř 13 kg enrofloxacinu méně tedy 63,77 kg.

Kolistin a enrofloxacin jsou ve veterinární medicíně zařazeny mezi antimikrobika poslední volby (AMEG B kategorie), proto by měly být zvoleny pro léčbu zvířat až v situacích, kdy méně riziková antimikrobika není možno použít. Zatímco spotřeby kolistinu jsou trvale nízké, u krůt dokonce klesly v roce 2024 na nulu, u enrofloxacinu je nutno hledat nástroje, jak jeho spotřeby u drůbeže, včetně krůt snižovat.

- **Stanovení kolistinu mikrobiologickou metodou:** Použitá mikrobiologická metoda je vhodná pouze pro stanovení kolistinu v napájecí vodě a lze ji tak využít pro potvrzení, že je léčivo rovnoměrně distribuováno v celém rozsahu napájecího systému. Toto se však v případě haly chovu krůt nepotvrdilo, neboť detekované koncentrace nebyly na obou výpustích ramen napájecího systému shodné. Mikrobiologická metoda stanovení kolistinu však není vhodná pro stanovení obsahu kolistinu v podestýlce, či v podestýlce s faeces před ani po fermentaci. Z tohoto důvodu není možné metodu použít ani pro stanovení kolistinu v půdě, kam byla zapracována fermentovaná podestýlka s faeces. Podestýlka s faeces je po stránce fyzikálně chemických vlastností složitá směs, která obsahuje organické látky rostlinného původu (sláma), organické látky živočišného původu (faeces, obsahující u drůbeže i složku moči) a také zbytky krmiva s případnými aditivy (organické či anorganické povahy). Všechny tyto složky mohou s kolistinem interagovat, vázat ho a ovlivňovat extrakci volné aktivní frakce kolistinu schopné inhibovat růst testovacího mikroorganismu, čímž se znesnadňuje přesné měření. Pevná vazba kolistinu na organické

látky však zároveň může podstatně ztížit jeho degradaci a tím prodloužit jeho perzistenci v půdním ekosystému a potenciální dopady na životní prostředí.

- **Abundance vybraných genů rezistence na farmě:** Ve vzorcích z farmy byla prokázána přítomnost genů *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* a *qnrB*. Zjištěny byly ve stěrech z prostředí farmy, a to i ve vzorcích odebraných před naskladněním nových zvířat. Dále byly v potvrzeny ve vzorcích faeces s podestýlkou po celou dobu výkrmu. Žádný se sledovaných genů ale nebyl potvrzen u jednodenních krůťat nebo v podestýlce bez faeces a krmivu. To podporuje hypotézu, že bakterie rezistentní k chinolonům nepochází z externích zdrojů, ale jsou součástí mikrobiální populace prostředí farmy. Geny kódující plazmidově přenášenou rezistenci ke kolistinu, nebyly prokázány v žádném z testovaných vzorků.
- **Charakteristika bakterií rezistentních k chinolonům z farmy:** Detailní charakteristika vybraných zástupců koliformních bakterií rezistentních k chinolonům metodou celogenomového sekvenování ukázala, že diverzita detekovaných izolátů je velká. Izoláty *E. coli* náležely k různým sérotypům, současně ale byly kmeny se shodnou charakteristikou izolovány v různých termínech odběrů. To naznačuje, že se v prostředí farmy udržují dlouhodobě. U všech testovaných izolátů byly prokázány mutace v chromozomálních genech *gyrA*, *parC*, které zodpovídají za rezistenci vůči chinolonům, ale současně byly potvrzeny také geny rezistence k chinolonům vázané na plazmidech. Identifikováno bylo několik typů plazmidů, z nichž ty, které nesly geny rezistence, byly konjugativní. To podporuje hypotézu o možném horizontální šíření genů rezistence i mezi jiné bakteriální rody a druhy.
- **Změny obsahu enrofloxacinu v průběhu fermentace chlévské mrvy:** Analýza vzorků faeces s podestýlkou obohacenou vysokou dávkou Enrogalu ukázala, že proces fermentace začal snižovat koncentraci enrofloxacinu až po 35 dnech. Při kratší době fermentace byl pozorován dokonce nárůst koncentrace enrofloxacinu. Tento výsledek naznačuje rozdílnou dostupnost enrofloxacinu pro jeho extrakci v matrici faeces s podestýlkou. Tyto výsledky jsou odlišné od předchozích, získaných pro nízké koncentrace enrofloxacinu.

- **Perzistence enrofloxacinu v půdním prostředí:** Po aplikaci drůbežího hnoje na testovací pole ÚKZÚZ byla v půdě naměřena koncentrace enrofloxacinu $4,7 \pm 1,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sušiny. Následné analýzy vzorků v období 0–101 dnů po aplikaci ukázaly, že koncentrace reziduí v půdě zůstává stabilní, dokonce se zvyšuje. Koncentrace aktivního metabolitu ciprofloxacinu se také pozvolna zvyšovala. Zvyšování koncentrace enrofloxacinu může být vysvětleno postupnou absorpcí enrofloxacinu na jednotlivé půdní komponenty. Tento výsledek potvrzuje dlouhodobou perzistenci antibiotika a jeho aktivního metabolitu v půdním prostředí při jeho aplikaci v relativně vysokých koncentracích. Při nižších koncentracích byla v naší předchozí studii z roku 2023 pozorována jeho částečná degradace. U vyšších koncentrací dochází k vyšší odolnosti fluorochinolonů vůči biodegradaci.
- **Přežívání kmenů *E. coli* při procesu fermentace:** Z pokusu fermentace faeces s podestýlkou vyplynulo, že modelové kmeny *E. coli* proces fermentace nepřežívají. V podestýlce klesl jejich počet pod limit detekce ($<100 \text{ KTJ/g}$) po 14 dnech. Specifický gen rezistence *mcrI* nebyl prokazatelný ani po pomnožení vzorků. V celkové DNA byly sice detekovány geny rezistence *qnrB*, *aac(6')-Ib-cr* a *qnrS*, avšak pravděpodobně je nesly jiné bakterie než modelové kmeny. To naznačuje jejich širší výskyt v mikrobiomu podestýlky. Tyto výsledky potvrzují, že fermentace podestýlky představuje účinný nástroj pro redukci patogenních i rezistentních bakterií a má významný hygienický i ekologický přínos pro nakládání s živočišnými odpady.
- **Přežívání kmenů *E. coli* v půdě:** Experiment s aplikací suspenze rezistentních bakterií přímo do půdy ukázal, že v tomto prostředí mohou mikroorganismy přežívat dlouhodobě, a to v závislosti na klimatických podmínkách. V provedené studii byly modelové kmeny detekovatelné i po více než 13 týdnech.

Z výsledků lze usuzovat, že geny rezistence k chinolonům tvoří běžnou součást mikrobiomu farmy. Aplikací statkových hnojiv na půdu může docházet k její kontaminaci a obecně životního prostředí bakteriemi nesoucími determinanty rezistence k antimikrobikům. Účinný prostředek ke snížení rizika biologické kontaminace půdy představuje řádná fermentace faeces s podestýlkou. Také chinolony jsou degradovány fermentací, i když jejich rozložení na neaktivní látky je dlouhodobý proces. Dodržování zásad při zpracování a výrobě statkových hnojiv může tedy významně přispívat k ochraně zdraví půdy.

Čerpání finančních prostředků k funkčnímu úkolu „AMR v půdě a případně dalších částech životního prostředí“ za rok 2025

(FCH VUT) Optimalizace metodiky a vlastní stanovení obsahů vybraných látek (enrofloxacinu a ciprofloxacinu) v podestýlce, ve zrající mrvě a v půdě po aplikaci vyzrálé mrvy	200 000 Kč
(ÚSKVBL) Analýza dostupných dat o spotřebách antibiotik používaných u krůt chovaných na maso v České republice, včetně rešerše recentně publikovaných dat k možnému vlivu používání kolistinu a fluorochinolonů na bakterie, zhodnocení trendových dat k rezistenci ke kolistinu a fluorochinolonům u izolátů z krůt a ko-rezistenci k dalším antimikrobikům v rámci ČR, horizontálně přenosnou rezistenci a případně perzistenci fluorochinolonů v životním prostředí.	140 000 Kč
Vývoj metodiky pro detekci kolistinu a případně kvantifikaci obsahu kolistinu v napájecí vodě, podestýlce, ve zrající mrvě a v půdě po aplikaci vyzrálé mrvy od medikovaných zvířat mikrobiologickou metodou	
Spotřební materiál	
(MUNI) Abundance vybraných genů zodpovědných za rezistenci k fluorochinolonům a kolistinu se zaměřením na geny významné z pohledu horizontálního přenosu rezistence ve faeces, podestýlce, stěrech z prostředí farmy a v půdě	250 000 Kč
Spotřební materiál	
(ÚKZÚZ) Nákup spotřebního materiálu, ostatních služeb, PHM, ostatní	60 000 Kč
Celkem	650 000 Kč

7. REFERENCE

- Abolhassani, M., Derafshi, M., Hassani, A., et al. (2023). Impacts of the application of enrofloxacin-containing poultry manure on the soil microbial activities. *Environ Process.* 10, 30.
- Biel-Maeso, M., González-González, C., Lara-Martín, P. A., & Corada-Fernández, C. (2019). Sorption and degradation of contaminants of emerging concern in soils under aerobic and anaerobic conditions. *Science of The Total Environment*, 666, 662.
- BIO Intelligence Service. (2013). Study on the environmental risks of medicinal products. Final Report prepared for Executive Agency for Health and Consumers. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/environment/study_environment.pdf
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.J., Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 60:394-397.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F.M., Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(7), 3895–3903.
- Ceccarelli, D., Hesp, A., van der Goot, J., Joosten, P., Sarrazin, S., Wagenaar, J.A., Dewulf, J., Mevius, D.J., on behalf of the EFFORT consortium. (2020). Antimicrobial resistance prevalence in commensal *Escherichia coli* from broilers, fattening turkeys, fattening pigs and veal calves in European countries and association with antimicrobial usage at country level. *J Med Microbiol.* 69(4).
- Corada-Fernández, C., Candela, L., Torres-Fuentes, N., Pintado-Herrera, M. G., Paniw, M., & González-Mazo, E. (2017). Effects of extreme rainfall events on the distribution of selected emerging contaminants in surface and groundwater: The Guadalete River basin (SW, Spain). *Science of The Total Environment*, 605–606, 770.
- Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D.H., Prasad, A.B., Slotta, D.J., Tolstoy, I., Tyson, GH., Zhao, S., Hsu, CH., McDermott, P.F., Tadesse, D.A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J.P., Klimke, W. (2019). Validating the AMR Finder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 63.

Fučík, J., Amrichová, A., Brabcová, K., Karpíšková, R., Koláčková, I., Pokludová, L., Poláková, Š., & Mravcová, L. (2024). Fate of fluoroquinolones in field soil environment after incorporation of poultry litter from a farm with enrofloxacin administration via drinking water. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(13), 20017.

Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Hooper DC. (2006). Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis*. 43(3):297-304.

Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B. and Ozkan S.A. (2013). UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia* 76, 1365.

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

Horie, M., Yang, D., Joosten, P., Munk, P., Wadepohl, K., Chauvin, C., Moyano, G., Skarzyńska, M., Dewulf, J., Aarestrup, F.M., et al. (2021). Risk factors for antimicrobial resistance in turkey farms: A cross-sectional study in three European countries. *Antibiotics*. 10, 820.

Chen, Z., Jiang, X. (2014). Microbiological safety of chicken litter or chicken litter-based organic fertilizers: A review. *Agriculture*. 4, 1–29.

Chung, H. S., Lee, Y. -J., Rahman, M. M., Abd El-Aty, A. M., Lee, H. S., Kabir, M. H., Kim, S. W., Park, B. -J., Kim, J. -E., Hacımuftuoğlu, F., Nahar, N., Shin, H. -C., and Shim, J. -H. (2017). Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish. *Science of The Total Environment*, 605-606, 322.

Jacoby, G.A., Strahilevitz, J., Hooper, D.C. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr*. 2(5).

Joensen, K.G., Tetzschner, A.M., Iguchi, A., Aarestrup, F.M., Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* using whole genome sequencing (WGS) data. *J Clin Microbiol*. 53(8), 2410–2426.

Jünemann, S., Sedlazeck, F.J., Prior, K., Albersmeier, A., John, U., Kalinowski, J., Mellmann, A., Goesmann, A., von Haeseler, A., Stoye, J., Harmsen, D. (2013). Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol.* 31, 294-6

Kandi, V., Shahapur, P.R., Suvvari, T.K., Bharadwaj, V.G., P, C.R., Shahapur, R., Podaralla, E., Godishala, V. (2024). Molecular characterization of *Escherichia coli* causing urinary tract infections through next-generation sequencing: A comprehensive analysis of serotypes, sequence types, and antimicrobial and virulence genes. *Cureus.* 16(3), e55556.

Koziel, J.A., Frana, T.S., Ahn, H., Glanville, T.D., Nguyen, L.T., Van Leeuwen, J. (2017). Efficacy of NH₃ as a secondary barrier treatment for inactivation of *Salmonella* Typhimurium and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in digestate of animal carcasses: proof-of-concept. *PLoS ONE.*

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

Larsen, M.V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R.L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D.W., Aarestrup, F.M., Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total genome sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 50(4), 1355–1361.

Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, h., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet. Infectious diseases.* 16(2):161-168.

Matamoros, V., Casas, M. E., Mansilla, S., Tadić, Đ., Cañameras, N., Carazo, N., Portugal, J., Piña, B., Díez, S., & Bayona, J. M. (2022). Occurrence of antibiotics in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) and Radish (*Raphanus sativus* L.) following organic soil fertilisation under plot-scale conditions: Crop and human health implications. *Journal of Hazardous Materials*, 436.

Pan, M., and Chu, L. M. (2017). Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Science of The Total Environment*, 599-600, 500.

Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. (2006). Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(11):3953-3955.

Ransirini, A.M., Elżbieta, M.S., Joanna, G., et al. (2025). Aged turkey manure shapes microbial diversity and antibiotic resistance genes in soil and plants under fertilization. *Sci Rep.* 15, 20463.

Robertson, J., Nash, J.H.E. (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb Genom.* 4. PMID: 30052170

Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D.J., Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 73, 1121–1137.

Shaheen, J. F., Sizirici, B., and Yildiz, I. (2022). Fate, transport, and risk assessment of widely prescribed pharmaceuticals in terrestrial and aquatic systems: A review. *Emerging Contaminants*, 8, 216.

Slettemeås, J.S., Sunde, M., Ulstad, C.R., Norström, M., Wester, A.L., Urdahl, A.M. (2019). Occurrence and characterization of quinolone resistant *Escherichia coli* from Norwegian turkey meat and complete sequence of an IncX1 plasmid encoding qnrS1. *PLoS ONE.* 14(3), e0212936.

UKZUZ. (2023). Antimikrobiální rezistence v půdě a případně dalších částech životního prostředí. Zpráva z funkčního úkolu MZe za rok 2023.

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

Wang, L., Qiang, Z., Li, Y., and Ben, W. (2017). An insight into the removal of fluoroquinolones in activated sludge process: Sorption and biodegradation characteristics. *Journal of Environmental Sciences*, 56, 263.

Yang, J. -F., Ying, G. -G., Liu, S., Zhou, L. -J., Zhao, J. -L., Tao, R., & Peng, P. -A. (2012). Biological degradation and microbial function effect of norfloxacin in a soil under different conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47(4), 288.

Wilkinson, K.G., Tee, E., Tomkins, R.B., Hepworth, G., Premier, R. (2011). Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. *Poult Sci.* 90(1), 10–18.

Wyszkowska, J., Mikulski, D., Borowik, A., Zaborowska, M., Kucharski, J., Kozłowski, K., Bilecka, M., Gajda, A., Pietruk, K., Jedziniak, P., Ognik, K., Jankowski, J. (2025). The microbiological and biochemical parameters of manure from antibiotic-treated turkeys. *Ann Anim Sci.*

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

Zhang, X., & Li, R. (2018). Variation of antibiotics in sludge pretreatment and anaerobic digestion processes: Degradation and solid-liquid distribution. *Bioresource Technology*, 255, 266.

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

Zubair, M., Li, Z., Zhu, R., Wang, J., Liu, X., & Liu, X. (2023). The Antibiotics Degradation and Its Mechanisms during the Livestock Manure Anaerobic Digestion. *Molecules*, 28(10), 4090.

