



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně



Výzkumný ústav veterinárního lékařství



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 2020

Brno, listopad 2020



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.



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 2020

Brno, listopad 2020

Autoři:

Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D. (VÚVeL)

Mgr. Tereza Gelbíčová, Ph.D. (VÚVeL)

Mgr. Alžběta Kalová (VÚVeL)

Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D. (ÚSKVBL)

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

Bc. Aneta Veldamonová (FCH VUT)

Mgr. Šárka Poláková, Ph.D. (ÚKZÚZ)

## **OBSAH**

ABSTRAKT .....	4
1. ÚVOD .....	5
2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU .....	13
3. MATERIÁL A METODIKA .....	14
3.1 Mikrobiologická část – část A .....	14
3.2 Analytická část – část B .....	23
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	29
4.1 Mikrobiologická část – část A .....	29
4.2 Analytická část – část B .....	41
5. ZÁVĚRY .....	43
6. REFERENCE .....	46

## **ABSTRAKT**

Antibiotika jsou významným pomocníkem při léčbě bakteriálních infekcí lidí i zvířat. I při jejich racionálním využívání, má však aplikace antibiotik negativní aspekty, např. jejich kontinuální uvolňování do životního prostředí, což má nepříznivý dopad na živé organismy. V posledních letech je věnována značná pozornost výskytu reziduí antibiotik a bakterií rezistentních k antibiotikům v odpadních vodách a čistírenských kalech. Málo prostudovanou oblastí je však kontaminace půd rezidui antibiotik. Kolistin je v humánní medicíně lékem poslední volby pro léčbu infekcí způsobených multirezistentními bakteriemi zejména z čeledi *Enterobacteriaceae*. Ve veterinární medicíně je v chovech hospodářských zvířat využíván zejména k léčbě a metafylaxi gastrointestinálních infekcí způsobených bakteriemi *E. coli* citlivými ke kolistinu u selat. Většina léčiva kolistinu je však vyloučena a prostřednictvím faeces se dostává do kejdy, která je následně aplikována na zemědělské pozemky a dostává se tak do půdy. Zatímco do nedávna byla rezistence ke kolistinu u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* považována pouze za chromosomálně vázanou, nedávno byly popsány geny, které se mezi bakteriemi šíří horizontální cestou, především plasmidy.

Cílem funkčního úkolu pro rok 2020 bylo získání nových poznatků o přetrvávání bakterií *E. coli* s plasmidově vázanou rezistencí ke kolistinu a reziduí kolistinu v zemědělské půdě. Byl proveden modelový pokus šíření *E. coli* s plasmidově vázaným genem *mcr-1* z prostředí chovu prasat do půdy. Byl navržen a aplikován unikátní přístup kombinující kultivaci a metagenomiku pro detekci bakterií rezistentních ke kolistinu/genů *mcr* ve vzorcích prasečí kejdy a půdy. V rámci metagenomické analýzy byl stanoven detekční limit metody pro průkaz genu *mcr-1*. Byly rozšířeny znalosti o přežívání enterobakterií rezistentních ke kolistinu v kejdě. Výsledky stanovení reziduí kolistinu v zemědělské půdě prokázaly vysokou sorbční schopnost kolistinu v půdě komplikující jeho detekci v této matrici. Tato skutečnost je jednou z příčin nezavedení metodiky ke stanovení reziduí kolistinu v půdě tak, jak bylo předpokládáno. Na základě provedených analýz je možné definovat rizika šíření bakterií rezistentních k antimikrobikům při využívání statkových hnojiv k fertilizaci zemědělských půd.

## **1. ÚVOD**

Předkládaná zpráva je druhým dokumentem zpracovaným v rámci plnění parciálního cíle I.1.5 stanoveného v rámci realizační náplně Akčního plánu Národního antibiotického programu (AP NAP) schváleného na období 2019–2022. Náplní uvedeného cíle AP NAP je zformulovat rámec pro sledování bakteriálních kmenů rezistentních k antimikrobikům v půdě a reziduí léčivých látek používaných v chovech hospodářských zvířat s riziky pro životní prostředí a navržení vhodného způsobu monitoringu rezistence v půdách v ČR. Tato aktivita navazuje na předchozí zprávu z roku 2019, kde byly na základě údajů o spotřebách veterinárních léčiv obsahujících antimikrobika v ČR a na základě jejich rizik pro životní prostředí (zejména půdu) navrženy vybrané skupiny látek k dalšímu sledování, popsány základní analytické metody ke stanovení obsahů látek v půdě a případně dalších matricích, a v neposlední řadě byly navrženy směry studia výskytu genů rezistence k antimikrobikům v půdě. V rámci pilotní studie byly nastíněny úkony na následující rok, z nichž některé byly v rámci dostupných finančních prostředků opravdu reálně uskutečněny.

Získané výsledky shrnuje zpráva z letošního roku, která se skládá z terénních prací (získání vzorků kejdy z chovu prasat po terapeutickém podání kolistinu a aplikace těchto vzorků na pokusnou plochu) a z laboratorních experimentálních prací zaměřených na získání poznatků o perzistenci bakterií *E.coli* s plasmidově vázanou rezistencí ke kolistinu v půdě a na zavedení metody stanovení kolistinu v půdě.

Antibiotika jsou široce využívána k léčbě bakteriálních infekcí lidí i zvířat. V některých případech se ve veterinární medicíně používají u hospodářských zvířat k prevenci vzniku nebo rozšíření infekce v chovech. V globálním rámci jsou antimikrobika (včetně antibiotik) stále ještě v některých zemích světa využívána i jako stimulatory růstu a produkce (AGP) u hospodářských zvířat, i když toto používání se postupně omezuje (OIE, 2019). V Evropské unii a tím rovněž v ČR jsou AGP od počátku roku 2006 zakázány (Nařízení 1831/2003/EC). Navzdory benefitu racionálního používání, má aplikace antibiotik i negativní aspekty, a to jejich kontinuální uvolňování do životního prostředí, které má nepříznivý dopad na živé organismy. Většina antibiotik není zcela metabolizována v tělech lidí a zvířat, velká část podaných léků se tak dostává do vody a půdy prostřednictvím komunálních odpadních vod, hnoje od hospodářských zvířat a kalů z čistíren odpadních vod. Kontaminovaná voda se často používá k zavlažování vegetace a hnůj k obnově živin v zemědělských půdách. Velké množství antibiotik je z těla vylučováno močí nebo faeces, některá z nich jsou degradována procesem

čištění odpadních vod, některá však mohou přetrvávat a kontaminovat životní prostředí. Koncentrace reziduí antibiotik v hnoji, kalech z čistíren odpadních vod, upravených kalech z čistíren odpadních vod a půdě vykazuje velké rozdíly a závisí na druhu léčiva, jeho metabolismu a délce léčby. Upravené kaly jsou vedlejším produktem procesu čištění odpadních vod, které prošly dalším zpracováním snižujícím výskyt bakteriálních patogenů. Ve srovnání s hnojem obsahují mnohem menší množství antibiotik, aplikují se na zemědělskou půdu jako hnojivo ke zlepšení produktivity půd a po přepracování také k hnojení zahrad a parků.

Přítomnost antibiotik v půdě je zatím málo prostudovanou oblastí, koncentrace antibiotik v půdních matricích se pohybují od několika nanogramů do miligramů na kg půdy v závislosti na druhu antibiotika. Nejvyšší koncentrace reziduí se obvykle nacházejí v půdách ošetřených hnojem (Rasschaert et. al. 2020). Chování kolistinu v životním prostředí předurčují jeho fyzikálně-chemické vlastnosti (Tab. 1). Je vysoce rozpustný ve vodě (v organických rozpouštědlech je nerozpustný) a má vysokou hodnotu pKa. V neutrálním i kyselém prostředí jsou jeho aminoskupiny nabitě kladně. Hodnota log P předpovídá jeho hydrofilní charakter.

**Tabulka 1.** Vybrané vlastnosti kolistinu (DrugBank, Pubchem)

Molekulová hmotnost	1155,43 g/mol (E2)
	1169,46 g/mol (E1)
Rozpustnost	564 g/l
logP	-3,3
pKa při 25 °C	12,1
Index lomu	1,575
Bod varu	1537 °C

Analýza kolistinu byla do nedávna doménou především v oblasti analýzy biologických matric. K jeho stanovení je možné využít celou řadu metod. Dnes již převažuje použití kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS, LC/MS/MS) (Dagla et. al. 2019). Nejčastěji jsou publikovaná data pro analýzu kolistinu v krevní plazmě, ale třeba i v živočišných tkáních nebo mléce (Robert et. al. 2016; Wan et. al. 2006). V posledních letech se v rámci kontroly vstupu reziduí léčiv do životního prostředí rozšířil počet publikací zabývajících se sledováním výskytu antimikrobik, mezi nimi i kolistinu, ve statkových organických hnojivech (prasečí kejda) a krmivu (Ghirardini et. al. 2020; Song et. al. 2019; Wan et. al. 2006; Xia et. al. 2019). Ve všech

případech se využívá jako analytické koncovky kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Před vlastním stanovením je nutné kolistin izolovat z matrice. K tomu se vesměs využívá extrakce na tuhou fázi (SPE – solid phase extraction). Z literatury jsou dostupné různé postupy a metody. Nejčastěji se používají k separaci a zakoncentrování kolistinu SPE kolony s HLB fází (hydrofilní-lypofilní rovnováha), která je velmi efektivní i pro izolaci polárních látek (Riemenschneider et. al, 2014). Dále je možné použití SPE kolonek StrataX (Wan et. al. 2006) nebo s kationaktivní stacionární fází (Rasschaert et. al. 2020).

Zvýšené koncentrace antibiotik v půdě vedou k selekci bakterií rezistentních k těmto antibiotikům, což vede ke změnám citlivosti celých mikrobiálních populací. I velmi nízké koncentrace antibiotik v půdě mohou vést ke genetickým změnám v bakteriálních genomech, k přenosu genů rezistence (Antibiotic Resistance Genes – ARG) a souvisejících mobilních genetických elementů (Mobile Genetic Elements – MGE), např. plasmidů, transpozonů a genomových ostrovů. Koselekce a exprese genů rezistence nesená na MGE může podporovat šíření ARG, a to i mezi vzdáleně příbuznými bakteriálními druhy (Wellington et al., 2013). Autochtonní bakterie v půdě pak mohou také představovat rezervoár genů rezistence v prostředí.

Výskyt a šíření multirezistentních bakterií představují celosvětově významný problém pro veřejné zdraví. Objevuje se selhávání účinku některých antibiotik např. fluorochinolonů, aminoglykosidů a širokospektrých beta-laktamů (ESBL) a vývoj nových antibiotik, které by mohly tyto „superbakterie“ porazit, není pro velké farmaceutické firmy dostatečně ekonomicky atraktivní. Tato situace vedla k přehodnocení využívání starých antibiotik, jako jsou polymyxiny, které byly dříve považovány za toxické pro běžnou klinickou praxi. Do terapeutické praxe humánní medicíny v oblasti intenzivní medicíny se tak v polovině 90. let znovu navrací kolistin jako lék poslední volby k léčbě infekcí vyvolaných multirezistentními gramnegativními bakteriemi (El-Sayed Ahmed et al. 2020). V rámci léčivých přípravků, ať již humánních či veterinárních jsou v současné době dostupná dvě antibiotika polymyxinové řady polymyxin B a kolistin (polymyxin E). Kolistin je pak dostupný ve dvou formách jako kolistin sulfát a kolistin methát. V humánní medicíně je podáván kolistin především v lékové formě injekční a v posledních letech také inhalační pro pacienty s cystickou fibrózou (AISLP, 2020). Ve veterinární medicíně se kolistin používá k léčbě infekcí zvířat, zejména potravinových (prasat, skotu a drůbeže), ale také zájmových zvířat (Kempf et al. 2016). Ve veterinární medicíně převažuje podání perorální formou, z pohledu celkových spotřeb v rámci zemí EEA jsou pak v zanedbatelných kvantitách zastoupeny veterinární léčivé přípravky v jiných



lékových formách určených k parenterálnímu, topickému či intramamárnímu podání. Právě používání u hospodářských zvířat bylo podrobena důkladnému přezkoumání, a to především z důvodu objevu plasmidově přenosné rezistence, který upozornil na možnost epidemiologicky závažného šíření rezistence na toto antibiotikum s kritickým významem pro humánní medicínu. Kromě izolace bakterií rezistentních na kolistin ze zvířat a lidí, tak postupně přicházejí práce dokládající rezistentní izoláty z hnoje, kejdy a odpadních vod, byly zaznamenány také nálezy od divokých zvířat, včetně stěhovavých ptáků a ze zeleniny (Hölzel et al. 2010; Schwarz and Johnson, 2016, Gao et al. 2019, Guenther et al. 2017). Kromě rezistence je předmětem zájmu také přímá toxicita kolistinu pro vybrané složky životního prostředí (Bressan et al. 2013; Guo et al. 2014). Existuje studie prokazující přítomnost kolistinu v terapeutických koncentracích, zejména v odpadních vodách a v kejdě prasat a toxicitu pro bakterie oxidující amoniak (Bressan et al. 2013). Tyto bakterie oxidující amoniak se podílejí na biodegradaci xenobiotických sloučenin a na přeměně amoniaku na dusitany v čistírnách odpadních vod (Bressan et al. 2013). Ekotoxicita kolistinu byla navíc prokázána i u zástupce kroužkoců – žížaly hnojní *Eisenia fetida*; kde bylo prokázáno, že kolistin způsobil významné poškození intestinálního epitelu tohoto živočicha a způsobil indukci genové exprese související se stresem (Guo et al. 2014). O významu hodnotit tuto látku z pohledu rizik pro životní prostředí svědčí také skutečnost, že v rámci připravovaného dokumentu „EFSA opinion on the role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain“ je vymezena pasáž, která se bude věnovat determinantám rezistence s nejvyšší prioritou pro zdraví lidí (kam patří právě *mcr* geny) a hlavním rizikovým faktorům v rámci životního prostředí, které ovlivňují jejich výskyt a šíření (R. Carapeto, ústní sdělení).

### **Geny kódující plasmidově vázanou rezistenci ke kolistinu**

Dlouhou dobu byla rezistence ke kolistinu považována pouze za chromosomálně vázanou, ale od roku 2015 bylo popsáno deset různých variant genů *mcr* (*mcr-1* až *mcr-10*), které jsou mezi bakteriemi šířeny horizontální cestou přenosu, především plasmidy. Poprvé byla plasmidově vázaná rezistence ke kolistinu kódovaná genem *mcr-1* popsána v Číně u *Enterobacteriaceae* z různých zdrojů (Liu et al. 2016). Gen *mcr-1* patří v současnosti mezi nejčastěji celosvětově rozšířený gen plasmidově vázané rezistence ke kolistinu u gramnegativních bakterií izolovaných z potravinových, ale i ostatních zvířat, potravin (živočišného, ale i rostlinného původu), přírodního prostředí a od lidí (Skov and Monnet, 2016; Al-Tawfiq et al. 2017). Již o rok později byl popsán u *E. coli* izolovaných z prasat a skotu v Belgii gen *mcr-2* (Xavier et al. 2016). V roce 2017 následoval objev dalších čtyř genů: i) *mcr-3* u *E. coli* z prasat v Číně

(Yin et al. 2017); ii) *mcr-4* u *Salmonella* a *E. coli* izolovaných z prasat v Itálii, Španělsku a Belgii (Carattoli et al. 2017); iii) *mcr-5* u *Salmonella* Paratyphi B z drůbeže v Německu (Borowiak et al. 2017); a iv) *mcr-6* (původně varianta *mcr-2.2*) u *Moraxella pluranimalium* z poražených prasat ve Velké Británii (AbuOun et al. 2017). V roce 2018 byly objeveny geny *mcr-7* u *Klebsiella pneumoniae* z kuřat a *mcr-8* u *K. pneumoniae* z prasat, kuřat a od lidí v Číně (Yang et al. 2018; Wang et al. 2018c). Posledními dvěma popsányými geny kódujícími plasmidově vázanou rezistenci ke kolistinu jsou *mcr-9* detekovaný u *Salmonella* Typhimurium izolované v roce 2010 od humánního pacienta v USA (Carroll et al. 2019) a *mcr-10* detekovaný u humánního izolátu *Enterobacter roggkampii* v Číně (Wang et al. 2020).

### **Rozšíření plasmidově vázané rezistence ke kolistinu v prostředí**

Bakterie rezistentní ke kolistinu s geny *mcr* mohou být šířeny do různých typů přírodních ekosystémů zahrnujících vodní prostředí, půdu, vegetaci, divoká zvířata (Anyanwu et al. 2020). Přestože výskyt genů rezistence k antibiotikům v půdách je podporován zejména antropogenní činností a představuje potenciální nebezpečí jejich dalšího šíření, studie zabývající se touto problematikou jsou vzácné. V současnosti několik studií popisuje výskyt genů *mcr* a enterobakterií nesoucích tyto geny v statkových hnojivech zvířat a v zemědělské půdě v Asii (Zheng et al. 2017; Gao et al. 2019), Jižní Americe (Oliveira et al. 2019), Africe (Touati et al. 2020) a Evropě (Guenther et al. 2017).

### **Využívání kolistinu v zemědělské praxi**

Využívání antibiotik v zemědělské produkci zahrnující i terapii infekčních onemocnění zvířat vyvolaných bakteriálními původci je považováno za jedno z nejvýznamnějších rizik rozvoje a šíření rezistence k antimikrobiálním látkám. Studie zaměřená na posouzení výskytu kolistinu a rozšíření genu *mcr-1* u prasat po odstavu před a po zákazu podávání kolistinu jako stimulantu růstu v Číně (duben 2017) prokázala, že přítomnost kolistinu způsobuje selekční tlak pro akumulaci genu *mcr-1* v prasečí kejdě (Xia et al. 2019).

V některých státech světa byla stimulace růstu a produkce (Antimicrobial Growth Promotion; AGP) prostřednictvím přípravků obsahujících kolistin do nedávna povolena (OIE, 2019), ve vybraných státech prozatím toto použití stále zůstává. I přes skutečnost, že je velký tlak na snížení používání kolistinu, jak terapeuticky, tak zejména jako stimulantu růstu a produkce, jsou stále na světě země, které toto antibiotikum poslední volby používají jako AGP. Data ze zpráv OIE dokládají míru používání, kdy např. v roce 2017 ještě 45 zemí indikovalo používání AGP, z toho 12 používalo kolistin; v roce 2018 z celkem 28 států uvádějících použití

antimikrobik jako stimulantů růstu uvedlo 12 států, že používá kolistin jako AGP. Na druhou stranu je potěšujícím faktem, že Čína, jako země s nejvyššími dokumentovanými spotřebami antimikrobik na světě, zakázala od roku 2017 používání kolistinu jako stimulantu růstu (Hu and Cowling, 2020). V rámci Evropy, ve veterinární oblasti byl kolistin ve státech EU a EEA využíván ve formě veterinárních léčivých přípravků (VLP) s různými indikacemi (léčba, metafylaxe, profylaxe, snížení mortality, zlepšení využitelnosti krmiva nebo stimulace růstu), což je patrné z informací uvedených v rámci řízení přezkumu (EK, 2015). Tento stav byl povolen *de facto* do vydání rozhodnutí Evropskou komisí, a to na základě řízení přezkumu pro perorálně podávané kolistiny EMEA – V/A/106, v němž byla odůvodněna a navržena ke schválení pouze léčba a metafylaxe, a to po časově omezenou dobu maximálně 7 dnů. Od roku 2006 není v EU povoleno podávat antimikrobika jako stimulanty růstu a produkce, nicméně jelikož řízení přezkumu požadovalo ještě v roce 2015 výmaz indikací „production enhancement (e.g. increase of feed efficiency or growth promotion)“ ze souhrnu informací o přípravku (SPC), jeví se, že některé státy tuto indikaci měly před řízením, jehož závěry vstoupily v platnost v roce 2015, zachovánu (EK, 2015).

Jednou z nežádoucích praxí bylo v minulosti rovněž aplikování přípravků s kolistinem na podestýlku, což se dělo i v rámci EU a mohlo mít dopad na šíření rezistence prostřednictvím importů zvířat ze zemí, kde k těmto praktikám docházelo.

Ve veterinární medicíně se v rámci EU kolistin v současnosti používá hlavně k léčbě, ale také metafylaxi gastrointestinálních infekcí vyvolaných *E. coli* a *Salmonella* spp. u prasat, telat, jehňat, kůzlat, králíků a drůbeže. Způsob podání zvířatům je v drtivé většině perorální cestou přes podání v medikovaném krmivu (formou perorálního prášku do krmiva, nebo medikovaného premixu do krmiva), nebo podání v pitné/napájecí vodě (v lékových formách perorálního prášku pro podání v pitné vodě nebo perorálního roztoku). Účinnou látkou u veterinárních léčivých přípravků pro perorální podání je kolistin sulfát. V rámci EU však existují i VLP s kolistinem, kde je přípravek aplikován parenterálně, topicky nebo intramamárně. V minulosti byly registrovány i VLP, kde byl kolistin v kombinaci s jinými antimikrobiky (např. s amoxicilinem, ampicilinem, neomycinem, spiramycinem; před zákazem kombinací fluorochinolonů s dalšími antimikrobiky existovala i kombinace kolistinu s enrofloxacinem). Na základě zvážení možných rizik však v prosinci 2014 výbor Komise pro veterinární léčivé přípravky (CVMP) doporučil omezit indikace pro použití kolistinu pouze pro léčbu infekcí gastrointestinálního traktu vyvolaných citlivými neinvazivními *E. coli*, s tím, že jakékoli indikace pro profylaktické použití a zvýšení produkce měly být vyloučeny, a že doba léčby měla být omezena na minimální dobu nezbytnou pro léčbu nemoci (neměla by přesáhnout

7 dnů). Dále bylo doporučeno vyjmout koně jako cílový druh ze souhrnu údajů o přípravku (SPC). Výbor CVMP v roce 2016 doporučil zrušit všechna rozhodnutí o registraci pro všechny veterinární léčivé přípravky obsahující kolistin v kombinaci s jinými antimikrobiky určené k perorálnímu podání. (EMA/461505/2016). V roce 2019 byla rovněž zveřejněna zpráva (EMA, 2019) odborné skupiny AMEG (AntiMicrobial Expert Group) pracující při Komisi pro veterinární léčivé přípravky (CVMP) Evropské lékové agentury, včetně velmi ilustrativní infografiky (EMA, 2020), kde je patrná nová klasifikace antimikrobik při jejich používání u zvířat zohledňující rovněž rizika pro veřejné zdraví. Zde je kolistin zařazen, spolu s fluorochinolony a cefalosporiny 3. a 4. generace mezi látky s tzv. omezeným režimem podávání (kategorie “ B” restrict), což znamená, že antibiotika v této kategorii jsou kriticky významná v humánním lékařství a jejich použití u zvířat by mělo být omezeno, aby se zmírnilo riziko pro veřejné zdraví. Tato antimikrobika by se rovněž měla zvažovat pro použití pouze v případě, že neexistují žádná antibiotika méně rizikových kategorií označených jako kategorie C nebo D, která by mohla být klinicky účinná. Vždy, kdy je to možné, měl by být zástupce této skupiny zvolen na základě výsledku testování citlivosti.

V České republice je v současné době registrováno pro použití u zvířat celkem 12 VLP s léčivou látkou kolistin (11 VLP je určeno pro perorální podání, 1 VLP je pro lokální podání, jako otologikum). V roce 2019 bylo na trhu v ČR dostupných 11 VLP, jejich celkové prodeje sumárně nepřekročily EU hranici „omezeného podávání“ 1mg/PCU (spotřeba v hmotnostním objemu činila 441,73 kg kolistinu, a to sumárně za všechna VLP, včetně kolistinu z otologického VLP, který není započítán do ESVAC). V roce 2018, kdy můžeme srovnávat i s dalšími státy Evropy, byla spotřeba kolistinu v ČR 0,7 mg/PCU, přičemž nejvyšší spotřebu v tomto roce vykázal Kypr: 12,8 mg/PCU a nejnižší Dánsko a Spojené Království (<0,01 mg/PCU), nulové spotřeby kolistinu vykázalo Norsko. Perorální přípravky s kolistinem mají indikaci pro léčbu (ev. prevenci nebo metafylaxi) gastrointestinálních infekcí vyvolaných gramnegativními bakteriemi u potravinových zvířat, lokální přípravek (zde je kolistin v kombinaci s rifaximinem) je určen pro léčbu zánětů zvukovodu u psů a koček, má indikační omezení.

Jedním z přetrvávajících terapeutických způsobů používání kolistinu v ČR je používání při onemocněních gastrointestinálního traktu zejména u selat v období po odstavu, na infekce vyvolané *E.coli*. Z pohledu farmakokinetiky je vhodné uvést, že perorálně podaný kolistin sulfát se ze střeva vstřebává v naprosto minimálním rozsahu, a to pouze v případech závažné progresse onemocnění a střevních lézí. Proto jak jeho hladiny v plazmě, tak i v orgánech, ani při

závažných formách podstavových průjmů s lézemi střeva, byly téměř nedetekovatelné a nedochází ani k biologické transformaci (Rhouma et al. 2016).

Většina kolistinu je tak vyloučena v nezměněné formě prostřednictvím faeces a dostává se do kejdy, která je dále uskladněna a následně aplikována na zemědělské pozemky.

### **Koliinfekce u selat po odstavu**

Patogenní *E. coli* jsou nejčastější příčinou vzniku koliinfekcí selat po odstavu a způsobují v chovech prasat značné ekonomické ztráty v důsledku váhových úbytků prasat ve výkrmu i jejich zvýšené mortality. Mezi koliinfekce se řadí dvě hlavní nosologické jednotky: průjmové onemocnění a edémová choroba. Poodstavové průjmy vznikají nejčastěji během prvních dvou týdnů po odstavu selat a jsou způsobeny enterotoxigenními *E. coli* (ETEC). Klinické příznaky (těžké průjmy s následnou dehydratací) jsou vyvolány schopností ETEC kmenů produkovat termostabilní (STa) nebo termolabilní (LT) enterotoxiny. Infekce se mezi prasaty šíří fekálně-orální cestou, kdy rezervoárem bývají dospělí jedinci – bezpříznakoví nosiči (Alexa et al. 1997; Erume et al. 2013). Méně závažné průjmové stavy mohou být vyvolány enteropatogenními kmeny *E. coli*, tedy kmeny se schopností adherovat na enterocyty a způsobovat „vymizení“ mikroklků tj. „attaching – effacing“ léze. Tato virulentní vlastnost je kódována genem *eae* (Brand et al. 2017). STEC (Shiga Toxin-producing *E.coli*) vyvolávají edémovou chorobu prasat, která postihuje téměř výhradně selata v dobrém výživovém stavu. STEC kmeny kolonizují tenké střevo a produkují Shiga toxiny (MacLeod et al. 1991), které vstupují do krevního oběhu a narušují endotel cév, což vede k otokům očních víček, krku a hlavy. Asi v 90 % způsobí infekce smrt prasete.

## **2. CÍL FUNKČNÍHO ÚKOLU**

Cílem funkčního úkolu pro rok 2020 bylo získání nových poznatků o přetrvávání bakterií *E. coli* s plasmidově vázanou rezistencí ke kolistinu a reziduí kolistinu v zemědělské půdě na základě:

- A. modelového pokusu šíření *E. coli* s plasmidově vázaným genem *mcr-1* z prostředí chovu prasat do půdy (včetně anamnestických dat o použití antibiotik v chovu zvířat odkud pochází organické hnojivo – kejda vyvážená na pole), dílčí součástí tohoto úkolu bylo ověření vlivu mražení půdy na složení mikrobioty – řešeno ve spolupráci ÚKZÚZ, ÚSKVBL, VÚVeL;
- B. zavedení a optimalizace metodiky ke stanovení reziduí kolistinu v půdě po aplikaci organických hnojiv od medikovaných zvířat – řešeno VUT.

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Mikrobiologická část – část A

#### Charakteristika farmy prasat vybrané k odběru kejdy

Farma byla vybrána na základě informací o používání kolistinu k léčbě prasat. Jednalo se o farmu prasat z Jihomoravského kraje s chovem prasat produkčních kategorií – selata, předvýkrm, výkrm, prasnice. Odpadové hospodaření s kejdou probíhá v rámci farmy (kejda z různých hal a jejich sekcí se sbírá do společné jímky). Obrat stáda je uzavřený (mimo nákupu prasniček – budoucích chovných prasnic). Prasničky pocházely v letech 2019/2020 ze stejného zdroje. Při přijetí prasniček na farmu je vždy zahájeno karanténní období v trvání přibližně jednoho měsíce, kdy jsou prasničky ustájeny odděleně v karanténní stáji dané farmy, či na detašované farmě, odkud jsou následně přemístěny do chovu v rámci farmy, kde byly odebírány vzorky. Chov prasat je zaměřený na masnou produkci (plemeno DanBred). Produkční parametry jsou ve vztahu k porodnosti – 17,3 selat na vrh, z toho 15,3 živě narozených; ve vztahu k odstavu průměr přibližně 34 odchovaných selat na prasnici/rok a přibližně 31 selat odstavených. V roce 2020 byl průměrný počet prasnic na hospodářství, kde byly provedeny odběry kejdy 675 kusů, počet odchovaných prasat 9700 kusů ročně. Selata jsou odstavována ve stáří 26–28 dnů při hmotnosti přibližně 6,5 kg a přemístěna do předvýkrmu (samostatná sekce pro každý odstav je dále členěná na kotce). Následně po 8 týdnech v předvýkrmu (přibližně 12. týden věku) jsou prasata přemístěna do prostor pro výkrm (opět samostatné sekce rozdělené na kotce). Doba pobytu v prostorách pro výkrm činí přibližně 95 dnů (přibližně 13,5 týdnů). Celková doba výkrmu od odstavu do porážkové hmotnosti je přibližně 145 dnů (přibližně 20–21 týdnů). V chovu jsou dle potřeby (přibližně však 4x ročně) odebírány vzorky z nemocných zvířat na mikrobiologické vyšetření a vyšetření citlivosti bakterií (*Streptococcus suis* a *E. coli*) k antibiotikům a jsou zasílány k analýze do akreditované laboratoře SVÚ. V chovu/hospodářství prozatím nebyla využita vakcinace proti vybraným kmenům *E. coli* (komerční či autogenní vakcíny).

#### Medikace kolistinem u prasat

Léčba kolistinem byla aplikována u selat v předvýkrmu ve váhové kategorii do 10 kg ve stáří 6 týdnů. Celkový počet ošetřených zvířat byl 500 kusů. Léčebné podání veterinárního léčivého přípravku obsahujícího kolistin bylo indikováno z důvodu infekcí *E. coli*, přičemž těsně před podáním 55 % zvířat vykazovalo již klinické příznaky odpovídající patogenězi vyvolané daným

původcem (oteklé oči, průjem, apatie, třesavka, náhlý úhyn více kusů). V období před zahájením léčby a na počátku léčby došlo k celkovému úhynu 8,4 % prasat. Veterinární léčivý přípravek ve formě koncentrátu pro přípravu perorálního roztoku obsahujícího kolistin byl podáván zvířatům ve formě medikované napájecí vody po dobu 5 dnů (celodenní přístup k medikované napájecí vodě, denní dávka je připravovaná vždy čerstvá), v dávce odpovídající 100 000 IU kolistinu na kg živé hmotnosti a den (což odpovídá 5 mg kolistin sulfátu na kg živé hmotnosti a den). Celkové množství spotřebovaného přípravku (COLIVET perorální roztok) na léčebný kurz představovalo 1,25 litru VLP, což by po přepočtu odpovídalo 125 000 mg kolistin sulfátu jako čisté substance na léčebný kurz v rámci chovu. Kromě kolistinu, byl v daném chovu v předchozím období používán ještě amoxicilin.

### **Uchovávání a manipulace s prasečí kejdou na farmě**

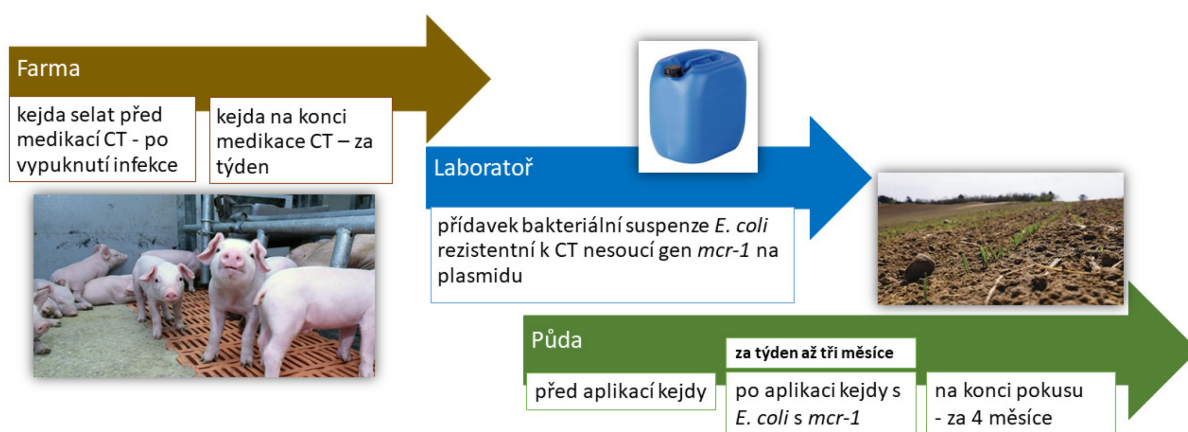
Ve vztahu ke zpracování kejdy lze shrnout, že je uchovávána v nádržích jako směsná kejda z různých hal. Aplikace na pole probíhá dle ročního období, nicméně kejda je v průměru v nádržích uchovávána přibližně 3 měsíce. Bývá odčerpána část z objemu nádrže, průběžně se přidává další kejda a jiná se odebírá dle požadavků na její aplikaci. Přibližně 2x ročně je nádrž kompletně vyprázdněna.

### **Experimentální část**

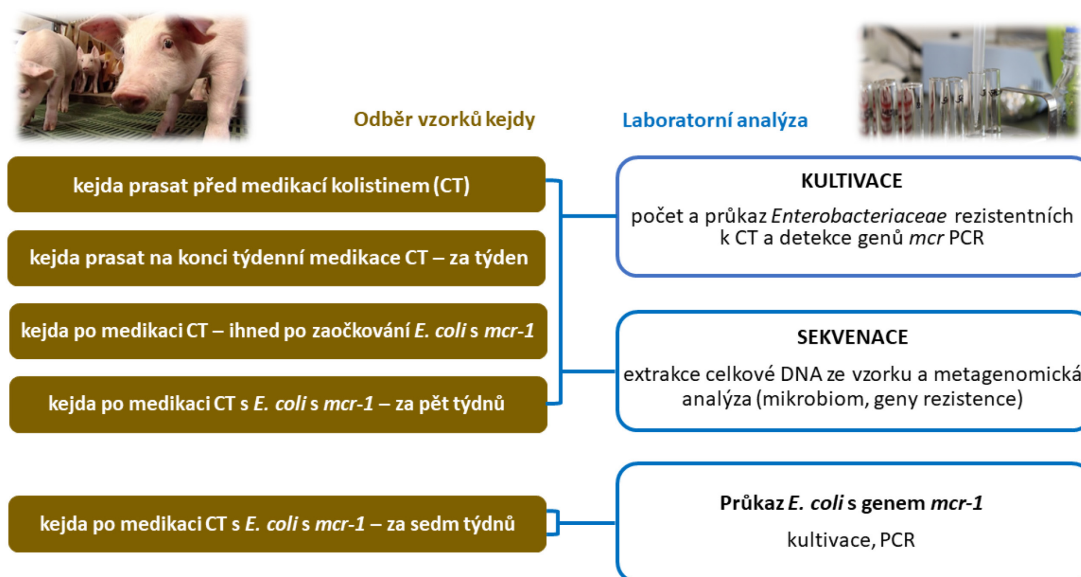
Tato část byla rozdělena do tří úrovní – farma prasat, polní pokus a laboratoř. Na farmě byly odebrány vzorky kejdy, ze kterých byla nejdříve provedena charakteristika pravděpodobného původce koliinfekce prasat a poté byly použity k modelovým pokusům. Polní pokus zahrnoval přípravu pokusného pole, aplikaci kejdy, osev pole svazenkou a odběry vzorků půdy po dobu 4 měsíců. V laboratoři byla prováděna kultivace bakterií, analýza mikrobiomu a modelové pokusy zaměřené na přežívání kmenů *E. coli* nesoucích gen *mcr1* v kejdě a v půdě. Harmonogram realizovaných aktivit na farmě a na poli včetně odběrů vzorků je zobrazen na obrázku 1. U odebraných vzorků kejdy a půdy bylo provedeno: i) kultivační vyšetření na stanovení počtu enterobakterií rezistentních ke kolistinu a průkaz genů *mcr* metodou PCR u získaných bakteriálních kultur a dále ii) metagenomická analýza zaměřená na stanovení složení mikrobiomu a detekci genů rezistence po extrakci celkové DNA ze vzorku kejdy (Obr. 2) a půdy (Obr. 3).



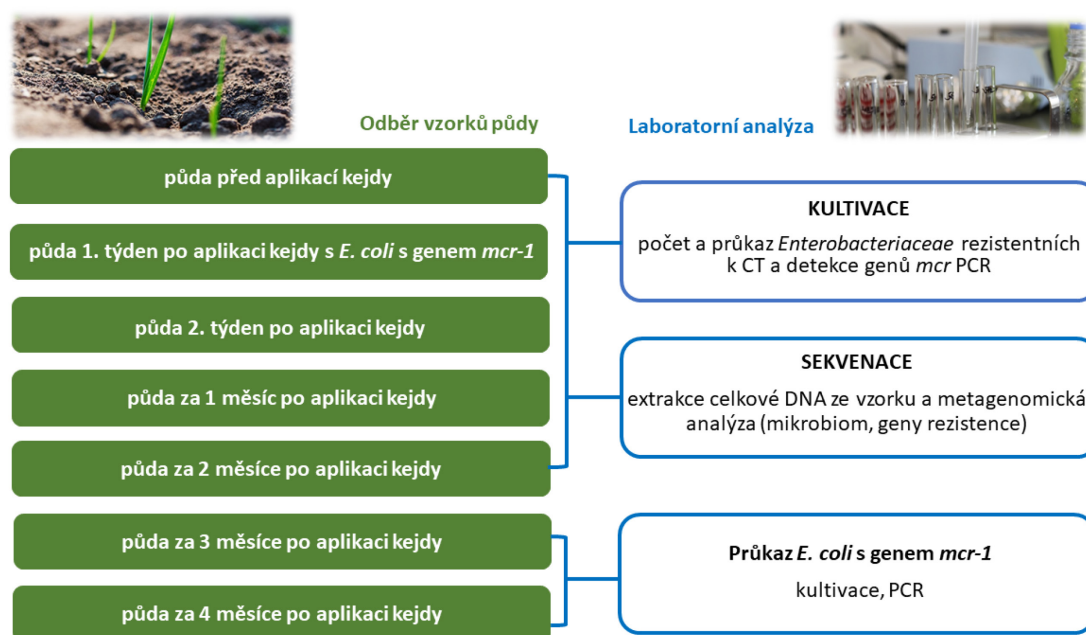
**Obrázek 1.** Aktivity realizované na farmě prasat a na pokusném poli



**Obrázek 2.** Schéma odebraných vzorků a provedených laboratorních analýz u kejdy prasat



**Obrázek 3.** Schéma odebraných vzorků a provedených laboratorních analýz u vzorků půdy



### Vzorky kejdy

V rámci modelového pokusu zaměřeného na výskyt a přežívání bakterií *E. coli* s plasmidově vázanou rezistencí ke kolistinu byl proveden odběr kejdy v chovu prasat s výskytem koliinfekcí léčených kolistinem. První odběr byl proveden u odstávčat po objevení se prvních klinických příznaků koliinfekce, a to ještě před zahájením medikace zvířat kolistinem. Druhý odběr kejdy byl proveden po ukončení týdenní medikace kolistinem. Kejda byla odebírána do 5 litrových odběrových nádob a neprodleně byla převezena do laboratoří k dalšímu zpracování.

### Průkaz přítomnosti patogenních kmenů *E. coli* v kejdě

Vzorky kejdy byly zhomogenizovány v pufrované peptonové vodě. Suspenze byla po homogenizaci vyočkována na krevní agar a MacConkey agar s následnou inkubací přes noc při teplotě 37 °C za aerobních podmínek. Ze získané bakteriální kultury byla připravena směsná DNA (lýzou varem) a metodou PCR sledována přítomnost vybraných genů virulence. K detekci genů pro produkci enterotoxinů STa a LT byla použita PCR metoda autorů Alexa et al. (1997). Průkaz genů pro produkci Shiga toxinů (*stx1* a *stx2* geny) a adhezenčního faktoru intiminu (*eae* gen) byl proveden dle PCR metodiky autorů Panton and Panton (1998). U izolátů s nesoucími některý ze sledovaných genů byla sledována příslušnost k vybraným O-antigenům metodou aglutinace (Salajka et al. 1992).

### **Inokulace kejdy kmenem *E. coli* s plasmidově neseným genem *mcr-1***

Pro modelový pokus byl použit kmen *E. coli* (LEV 1287/17/E1) nesoucí gen *mcr-1* na plasmidu typu IncX4. Mimo plasmidově vázané rezistence ke kolistinu nesl testovaný kmen *E. coli* ve svém genomu také geny rezistence k aminoglykosidům, beta-laktamům, chinolonům, makrolidům, amfenikolům, sulfonamidům, tetracyklinu, trimethoprimu, bacitracinu a aminokumarinu. Výchozí bakteriální suspenze *E. coli* s *mcr-1* (OD<sub>600</sub>=0,65, počty 1,2 x 10<sup>8</sup> KTJ/ml suspenze) byla připravena pomnožením přes noc v pufrované peptonové vodě při teplotě 37 °C za aerobních podmínek. Kejda poslední den před ukončením týdenní medikace odstávat kolistinem byla zaočkována testovacím kmenem *E. coli* v poměru 1:10.

### **Aplikace kejdy na půdu**

Kejda inokulovaná kmenem *E. coli* s genem *mcr-1* v koncentraci cca log 7 KTJ/g byla aplikována ručně (4. 6. 2020) v množství odpovídajícím 120 kg N/ha. Dle přílohy č. 3, vyhlášky č. 377/2013 Sb. byl pro potřeby výpočtu nutného množství kejdy uvažován průměrný obsah N v kejdě prasat (výkrm, prasničky) 4,8 kg/t a 6 % sušiny. Výsledná aplikace činila 3,5 kg inokulované kejdy na 1 m<sup>2</sup> půdy.

### **Vzorky půdy**

Vzorky půdy byly odebírány na pozemku v areálu zkušební stanice ÚKZÚZ Chrlice, který nebyl před ani během pokusu chemicky ošetřen, na začátku byl pouze upraven rotátorem (Obr. 4). Z hlediska půdních podmínek se jednalo o půdu střední zrnitosti, velmi dobře zásobenou živinami, s neutrální půdní reakcí (Tab. 2). Celkové obsahy rizikových prvků v půdě uvádí tabulka 3. Jednalo se o vzorek půdy před aplikací kejdy a vzorky půd po aplikaci kejdy inokulované kmenem *E. coli* s plasmidově vázanou rezistencí ke kolistinu v intervalech jeden týden po aplikaci, za dva týdny, za měsíc, za dva, tři a čtyři měsíce. Aby se modelový pokus maximálně přiblížil půdním podmínkám v orné půdě během vegetačního období, byla 11. 6. 2020 na plochu vyseta svazanka (Obr. 5), která byla odebrána po 2 měsících od aplikace kejdy na půdu a vyšetřena na přítomnost *E. coli* s genem *mcr-1*. Všechny vzorky byly odebrány Edelmanovým vrtákem. Půdní vzorek byl tvořen smícháním 15 dílčích vzorků odebraných z hloubky 0–15 cm. Vzorek půdy byl na místě promíchán, proset na 5mm síť a uložen do PE sáčků. Vzorky na bakteriologickou a metagenomickou analýzu byly přepraveny v chlazeném boxu v den odběru do laboratoře. Pro chemickou analýzu byly vzorky uloženy v mrazáku při teplotě -18 °C do vlastního testování.

V rámci pokusu ověření vlivu mražení půdy na složení mikrobioty byl odebraný vzorek rozdělen na dílčí podjednotky a zamražen při teplotě cca  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U takto zamražených vzorků půdy byla provedena bakteriologická a metagenomická analýza po dvou, čtyřech a šesti měsících.

**Tabulka 2.** Agrochemické parametry půdy

pH/CaCl <sub>2</sub>	K	Ca	Mg	P	C	N
	[mg.kg <sup>-1</sup> ]				[%]	
6,8	328	5050	473	179	1,838	0,185

**Tabulka 3.** Celkové obsahy rizikových prvků v půdě (extrakce lučavkou královskou, mg.kg<sup>-1</sup>, Hg celková AMA)

As	Be	Cd	Co	C	Cu	Ni	Pb	Zn	V	Hg <sub>tot</sub>
11,5	1,37	0,38	16,8	61,9	32,2	45,2	31,9	112	56,5	0,135

### **Hydrometeorologické podmínky po aplikaci kejdy na zkušební půdu**

Ve sledovaném období od aplikace kejdy na půdu (4. 6. 2020) až po ukončení pokusu (23. 9. 2020) byla dle dat sondy Brno, Hroznová, ÚKZÚZ průměrná teplota vzduchu  $18,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (min.  $6,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , max.  $34,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), průměrná přízemní teplota  $19,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (min.  $5,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , max.  $44,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a průměrná teplota půdy 10 cm pod povrchem  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (min.  $14,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , max.  $26,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Srážky se v daném období pohybovaly od 0,35 mm do 59,5 mm (<http://a.la-a.la/>).

**Obrázek 4.** Testovací pozemek v areálu zkušební stanice ÚKZÚZ Chrlice



**Obrázek 5.** Testovací pozemek s pokryvem svazenky (zkušební stanice ÚKZÚZ Chrlice)



#### **Kultivační vyšetření bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních ke kolistinu**

Ze vzorků kejdy a půdy bylo v laboratoři za sterilních podmínek odebráno 25 g každého vzorku a smícháno s trypton soja bujónem (TSB) v poměru 1:9. Z takto připraveného vzorku byla připravena řada desetinásobného ředění až po  $10^{-4}$ . Stanovení počtu bakterií čeledě *Enterobacteriaceae* bylo provedeno za využití chromogenního média Brilliance™ UTI Clarity™ agar (Oxoid, UK). Použité chromogenní médium umožnilo současné odlišení kolonií *E. coli* na základě  $\beta$ -galaktosidasové aktivity. Selektivní kultivace kolistin rezistentních bakterií

bylo dosaženo přidavkem kolistin sulfátu (Discovery Fine Chemicals, UK) k UTI Clarity agaru na finální koncentraci 3,5 mg/L. Z každého ředění byl proveden roztěr 1 ml vzorku na povrch tří misek UTI Clarity agaru s kolistinem. Kultivace probíhala přes noc při 37 °C za aerobních podmínek. Průkaz *E. coli* s genem *mcr-1* byl proveden pomnožením výchozího ředění ( $10^{-1}$ ) v TSB při 37 °C přes noc s následným vyočkováním na UTI Clarity agar s kolistinem a kultivací za stejných podmínek.

Z počítatelného ředění byl stanoven počet suspektních kolonií kolistin rezistentních *E. coli*. Morfologicky odlišné typy kolonií z UTI Clarity agaru byly po přeočkování na krevní agar a kultivaci přes noc při 37 °C identifikovány metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Německo) s využitím Biotyper software (verze 3.1, Bruker Daltonik GmbH, Německo).

### **Průkaz genů *mcr* metodou PCR**

Ze směsné bakteriální kultury na UTI Clarity agaru s kolistinem byla izolována DNA kitem Blood and Tissue (Qiagen, Německo) a následně provedena metodou klasické PCR detekce genů *mcr-1* až *mcr-10*. Ověření přítomnosti genu *mcr-1* u izolátů *E. coli* získaných z inokulované kejdy a půdy byla provedena PCR detekce tohoto genu po izolaci DNA lýzou varem. Geny *mcr-1* až *mcr-9* byly detekovány metodou PCR dle původně popsanych primerů (Liu et al. 2016; Xavier et al. 2016; Borowiak et al. 2017; Carattoli et al. 2017; Yin et al. 2017, AbuOun et al. 2017; Yang et al. 2018; Wang et al. 2018, Kieffer et al. 2019). Pro PCR detekci genu *mcr-10* byly použity vlastní primery (*mcr-10\_916\_F*: ACA CCC GCC ATC GTT TTC TT; *mcr-10\_1115\_R*: CCA GCA AAA TCG ATG GCG TT) navržené dle původní sekvence genu *mcr-10* (Wang et al. 2020). Uměle syntetizované pozitivní kontroly *mcr-1* až *mcr-10* (GeneArt Strings synthesis, ThermoFisher Scientific, USA) pro PCR byly připraveny dle originálních sekvencí (Liu et al. 2016; Xavier et al. 2016; Borowiak et al. 2017; Carattoli et al. 2017; Yin et al. 2017, AbuOun et al. 2017; Yang et al. 2018; Wang et al. 2018, Kieffer et al. 2019; Wang et al. 2020).

### **Metagenomická analýza**

Metagenomická analýza byla zaměřena na stanovení složení mikrobiomu a genů rezistence ve vzorcích kejdy před a po medikaci kolistinem, v kejdě po inokulaci testovacím kmenem *E. coli* s *mcr-1* ihned po zaočkování a po pěti týdnech skladování, v půdě před aplikací kejdy a v půdě po jednom týdnu, dvou týdnech, jednom měsíci a dvou měsících po aplikaci kejdy. Izolace

DNA byla stejně jako kultivační vyšetření provedena v den odběru vzorků kejdy a půdy. Celková DNA byla izolovaná pomocí kitu DNeasy PowerSoil (Qiagen, Německo) dle instrukcí výrobce. Sekvence byla provedena pomocí platformy Oxford Nanopore Technologies (ONT). Knihovny pro MinION byly připraveny pomocí Rapid PCR Barcoding Kit a sekvenovány na #FLO-MIN106 flow cell. Hrubá sekvenační data ve formátu fast5 byla pomocí softwaru Guppy v 4.0.15+56940742 (ONT) převedena do formátu fastq. V programu EPI2ME byla data rozdělena pomocí barcodů po jednotlivých vzorcích. Po kontrole kvality sekvenačních dat, byly dále analyzovány pouze vzorky s ready se skóre >7, počet readů na vzorek byl minimálně 200 000.

Po kontrole kvality sekvenačních dat byla provedena taxonomická klasifikace mikrobiomu pomocí Kaiju (<http://kaiju.binf.ku.dk/server>) s využitím databáze NCBI BLAST nr +euk (dle přednastavených parametrů), která obsahuje non-redundantní proteinovou databázi bakterií, archeí, virů, hub a mikrobiálních eukaryot.

Geny rezistence byly vyhledávány oproti databázi CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, <https://card.mcmaster.ca/>) a ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Databáze CARD byla prohledávána pomocí programu EPI2ME na základě detekce proteinových homologů, tedy sekvence genů antimikrobiální rezistence, které nezahrnují mutace jako determinanty rezistence. Databáze ResFinder byla prohledávána pomocí KMA (*k*-mer alignment) na základě detekce genů získané rezistence. Jako pozitivní nález genu rezistence byl hodnocen gen s pokrytím (coverage) 90 % a identitou 80 % při hloubce pokrytí >2.

## 3.2 Analytická část – část B

V rámci modelové studie byla vyvíjena metoda pro stanovení kolistinu ve vzorcích půdy. Nejdříve byla ověřena analytická metoda a nastavení přístroje LC/MS. Dále byla provedena řada experimentů pro extrakci kolistinu ze vzorku půdy, jeho izolaci a zakoncentrování pomocí SPE. V následujících tabulkách a obrázcích budou shrnuty všechny testované metody. V rámci provedených laboratorních experimentů se dosud nepodařilo vyvinout metodu, která by byla vyhovující pro analýzu reziduí kolistinu v půdě. Důvody budou diskutovány dále.

Přístroje:

- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, hmotnostní spektrometr Agilent Ion Trap 6320 LC/MS, kolona LUNA Omega 3  $\mu\text{m}$  Polar C18 (100x2,1 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) s předkolonou SecurityGuard ULTRA Cartridges (UHPLC C18 2,1 mm) od Phenomenex
- Odstředivka
- Ultrazvuk

Chemikálie:

- Colistin sulfát (Sigma Aldrich)
- Colistin E1 (Sigma Aldrich)
- Colistin E2 (Sigma Aldrich)
- Methanol, Acetonitril (LC/MS, VWR)
- Kyselina mravenčí (LC/MS, Merck)
- MilliQ voda
- Kyselina chlorovodíková, EDTA, kyselina trichloroctová, pevný  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , NaOH, kyselina citrónová,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (běžné chemikálie, čistota p.a.)

SPE kolony:

- Oasis HLB (Waters, 6 ml, 200 mg)
- Oasis WCX (Waters, 6 ml, 150 mg)
- SAX (Supelco, 6 ml, 200 mg)
- StrataX (Phenomenex, 3 ml, 200 mg)



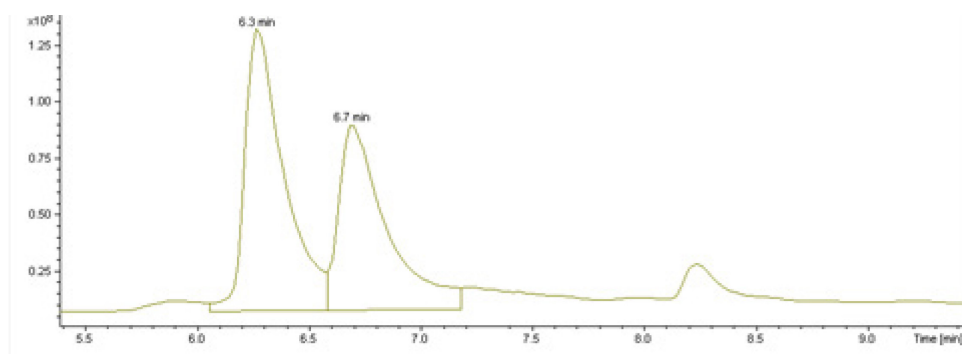
### HPLC/MS metoda

Pro optimalizaci metody HPLC/MS byl použit standard kolistinu o koncentraci 10 ug a 1 ug/ml. V rámci optimalizace bylo postupováno podle dostupné literatury, kde většina autorů používá jako mobilní fázi kyselinu mravenčí a acetonitril, používané kolony jsou na bázi C18 s různými rozměry podle daných systémů. V našem případě byla zvolena mobilní fáze A 0,01M HCOOH a B ACN. Eluce byla gradientová (Tab. 4). Bylo ověřeno i použití methanolu jako mobilní fáze, retenční čas se při zachování gradientu prodloužil asi o 2 minuty a píky byly širší než při použití acetonitrilu. Pro optimalizaci metody byly testovány 4 kolony (Phenomenex: Kinetex C18, Biphenyl, Kinetex PSC18 a LUNA Omega Polar C18). Nejlepší separace byla dosažena na koloně LUNA Omega Polar C18 (Obr. 6). Dva píky odpovídají kolistinu E1 a E2. Na obrázku 7 jsou vidět hmotnostní spektra. Jednotlivé popsané hmoty odpovídají více násobně nabitě molekule kolistinu. Pro další měření byly hodnoty m/z 385,9 a 390,6 zvoleny jako kvantifikační a další dvě odpovídající dvoj a čtyřnásobně nabitě molekuly byly zvoleny jako konfirmační (Tab. 5). V použitém LC/MS systému nebylo možné využít sledování produktových iontů. V literatuře jsou často uvedeny sledované přechody 578,59 → 101,46 a 585,56 → 101,46. Značený standard pro kolistin není na trhu k dispozici. Kvantifikace byla provedena se sadou kalibračních standardů kolistinu v 20% methanolu v 0,01M kyselině mravenčí v koncentracích 0,05 µg/ml – 1 µg/ml. Kalibrační roztoky byly pravidelně připravovány ze zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml a byly vždy uchovávány při teplotě -20°C.

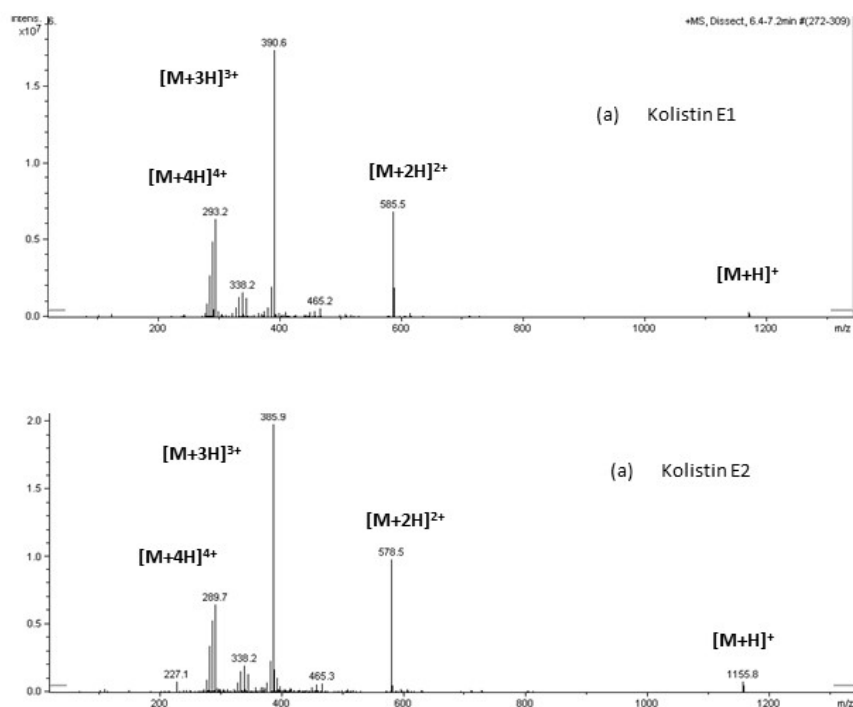
**Tabulka 4.** Gradient mobilní fáze

čas (min)	A	B
0	5	95
15	80	20
17	80	20
20	5	95

**Obrázek 6.** Chromatogram (TIC) standardu kolistinu o koncentraci 1 µg/ml



**Obrázek 7.** Hmotnostní spektrum kolistinu E1 (a) a E2 (b)



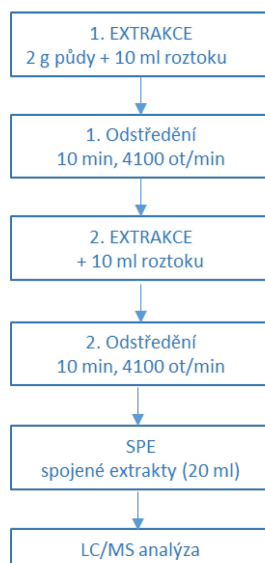
**Tabulka 5.** Významné hodnoty m/z v hmotnostním spektru kolistinu E1 a E2

	E1 (B)	E2 (A)
retenční čas (min)	6,7	6,3
Mr	1169,46	1155,43
[M+2H] <sup>2+</sup>	578,5	586,5
[M+3H] <sup>3+</sup>	385,9	390,6
[M+4H] <sup>4+</sup>	289,7	293,2

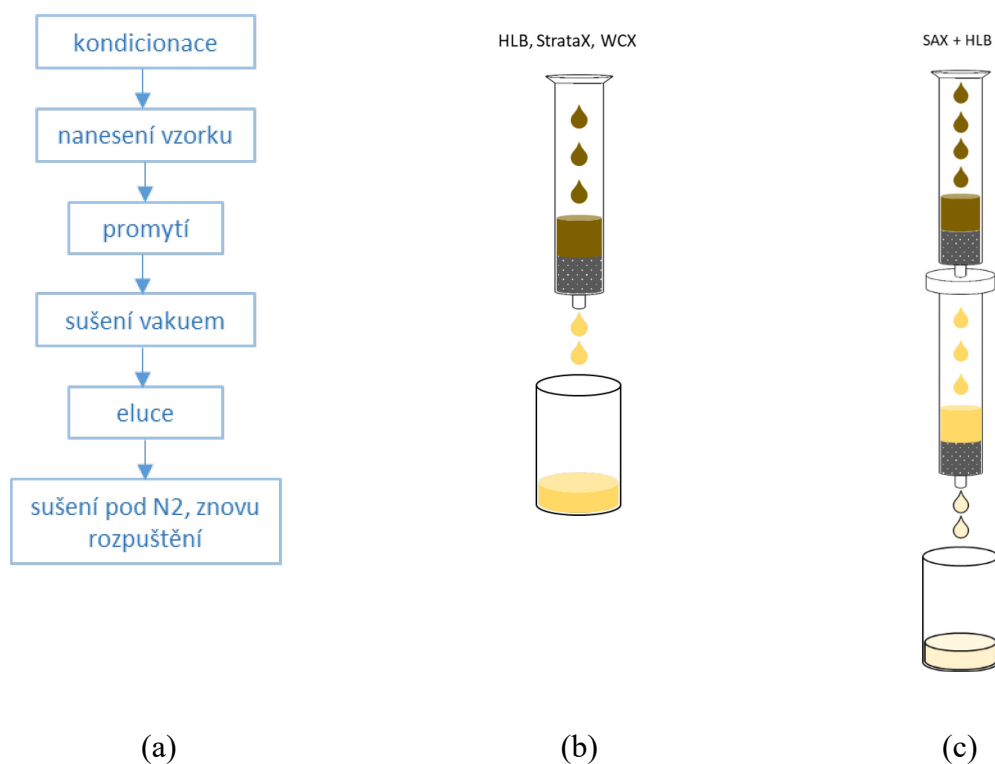
### **Postup analýzy vzorků půdy**

Dle dostupné literatury byl zvolen postup pro extrakci vzorků půdy. Nejdříve byly provedeny jen modelové experimenty. Pro tuto optimalizaci byl použit vzorek půdy před aplikací kolistinu. Část vzorku půdy, který byl uchováván při  $-20^{\circ}\text{C}$ , byl rozmražen a vysušen při laboratorní teplotě (24 hod). Ke 2 g půdy v extrakční zkumavce byl přidáván kolistin v příslušném množství (1  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  a 100  $\mu\text{g}$ ) a půda byla promíchána a nechána půl hodiny stát. Byly taky provedeny extrakce bez přídavku kolistinu (test vlivu matrice). Vzorek byl přelit 10 ml extrakčního roztoku (Tab. 6) a promíchán 1 min na vortexu. Byl umístěn do ultrazvuku na 10 min, poté odstředěn (10 min, 4600 ot/min) a tekutina nad půdou byla odlita do vialky. Postup se ještě jednou opakoval a byl získán spojený extrakt o objemu 20 ml. Tento extrakt byl přímo analyzován nebo byla využita technika SPE pro zakoncentrování a přečištění vzorku. Pro metodu SPE bylo použita celá řada postupů (Tab. 6) Vše je schematicky nakresleno na obrázku 9.

**Obrázek 8.** *Schema postupu experimentu*



**Obrázek 9.** Postup pro SPE extrakci (a), provedení SPE s kolonkami HLB, StrataX, WCX (b), kombinace dvou SPE kolonek (SAX + HLB) v jedné extrakci (c)





## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Mikrobiologická část – část A

#### Detekce virulentních kmenů *E. coli* v kejdě

V kejdě odstávat po objevení se klinických příznaků koliformní infekce před medikací kolistinem byla detekována směs enterotoxigenních kmenů *E. coli* s geny virulence kódující termostabilní i termolabilní enterotoxiny STa (n=1), LT (n=1) a genem *eae* kódující adhezní faktor intimin (n=1). Na konci medikace kolistinem byly v kejdě rovněž detekovány kmeny *E. coli* pozitivní na STa, LT a *eae* gen. Všechny získané virulentní kmeny *E. coli* (n=6) byly na základě stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) určeny jako citlivé ke kolistinu (MIC  $\leq$  0,25 mg/L). Kmen *E. coli* nesoucí *eae* gen izolovaný z kejdy před medikací kolistinem patřil k seroskupině O:153, kmen *E. coli* s genem kódujícím enterotoxin LT patřil k seroskupině O:7. U ostatních získaných kmenů *E. coli* s geny virulence s použitím dostupných antisér nebylo možné seroskupinu určit. Shigatoxigenní kmeny *E. coli* (STEC) nesoucí geny *stx1* a *stx2*, nebo samotná přítomnost těchto genů, v kejdě prasat před ani po medikaci kolistinem prokázána nebyla.

#### Výskyt enterobakterií s rezistencí ke kolistinu kódovanou geny *mcr* v kejdě prasat a v půdě před aplikací kejdy

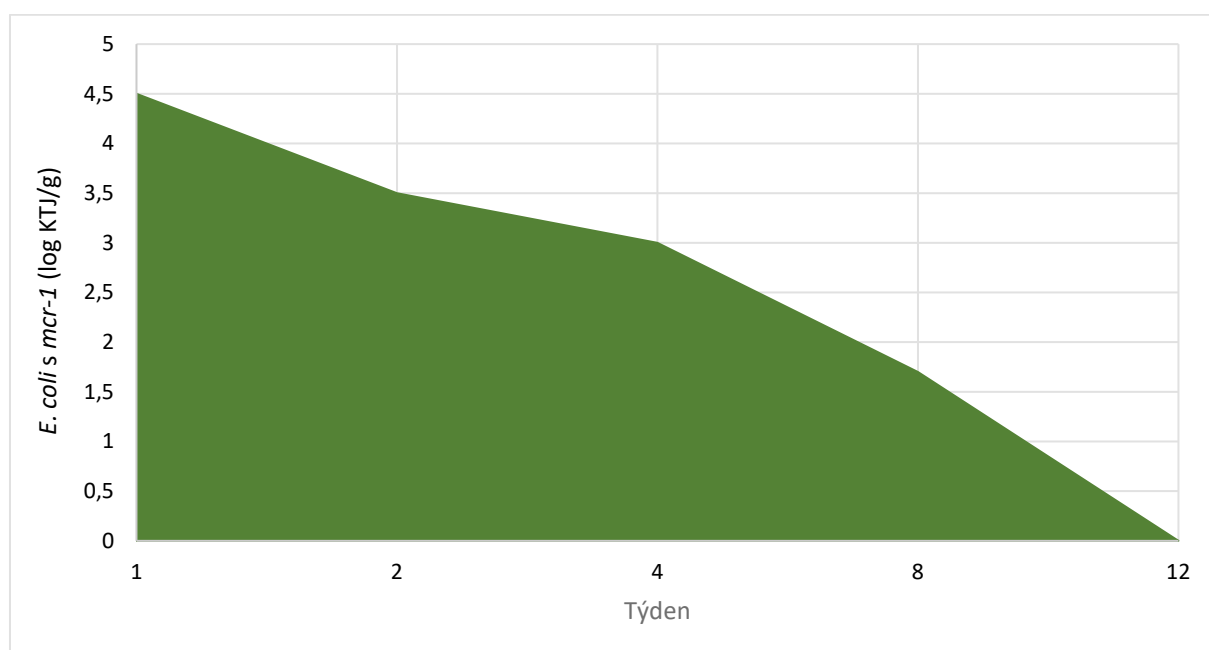
Chov hospodářských zvířat je považován za významný rezervoár genů kódujících rezistenci ke kolistinu (Anyanwu et al. 2020). V rámci této studie nebyla v kejdě prasat z vybrané české farmy před zahájením medikace kolistinem, ani po ukončení této medikace kultivačně a metodou PCR prokázána přítomnost enterobakterií rezistentních ke kolistinu nesoucích geny *mcr-1* až *mcr-10*. Ve vzorku půdy odebrané z pokusného pole před aplikací kejdy rovněž nebyla zjištěna přítomnost kolistin rezistentních enterobakterií nesoucích geny *mcr-1* až *mcr-10* (tabulka 7). Metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS byly na UTI Clarity agaru s kolistinem detekovány ve vzorcích kejdy bakterie rodů *Providencia*, *Morganella* a *Bacillus*, které jsou přirozeně rezistentní ke kolistinu. Ve vzorcích půd byly z primokultivace na médiu s kolistinem rovněž detekovány přirozeně rezistentní bakterie rodů *Morganella*, *Bacillus* a *Paenibacillus*.

Výskyt bakterií s plasmidově vázanou rezistencí ke kolistinu v chovech prasat v České republice nebyl doposud popsán. Příčinou může být omezené používání kolistinu k léčbě v českých chovech prasat nebo málo studií zabývajících se touto tematikou. Ani v rámci národního programu sledování rezistencí k antimikrobikům u veterinárně významných patogenů nebyly v roce 2019 detekovány, fenotypovou metodou stanovení MIC bez předchozí pre-selekcce *E.coli* s rezistencí ke kolistinu ani u prasat, ani u skotu či drůbeže (NMR, 2019).

### Přežívání *E. coli* s genem *mcr-1* v půdě

Výchozí počet *E. coli* s genem *mcr-1* v kejdě na konci týdenní medikace odstávkat kolistinem po inokulaci testovacím kmenem byl log 7 KTJ/g. Týden po aplikaci takto inokulované kejdy v množství 3,5 kg kejdy na 1 m<sup>2</sup> půdy byl počet *E. coli* s genem *mcr-1* v půdě log 4 KTJ/g. Za dva měsíce po aplikaci kejdy klesl počet kolistin rezistentních *E. coli* s *mcr-1* o tři logaritmické řády (Obr. 10). Po třech měsících již byly bakterie *E. coli* s *mcr-1* kultivačně prokázány pouze po pomnožení vzorku. Testovaný kmen *E. coli* nesoucí gen *mcr-1* byl schopen ve vyšetřované půdě přetrvávat ještě téměř po čtyřech měsících od aplikace inokulované kejdy (Tab. 7). Dva měsíce po aplikaci kejdy na půdu byl současně s půdou proveden i odběr svazenky narostlé na pokusném poli. Ve vzorku svazenky však nebyla kultivačně prokázána přítomnost *E. coli* s *mcr-1*. Metodou PCR také nebyl detekován gen *mcr-1* z celkové DNA přímo z pomnoženého vzorku svazenky.

**Obrázek 10.** Přežívání *E. coli* s genem *mcr-1* v půdě po aplikaci inokulované kejdy na pokusné pole



**Tabulka 7. Výsledky stanovení počtu a průkazu enterobakterií rezistentních ke kolistinu nesoucích geny *mcr* v kejdě a půdě**

Číslo vzorku VÚVeL	Původní označení ÚKZUZ	Popis vzorku	Datum odběru	Počet <i>Enterobacteriaceae</i> rezistentních k CT	Identifikace (MALDI TOF MS)	Průkaz genů <i>mcr-1</i> až <i>mcr-10</i> z primokultivace	Průkaz <i>E. coli</i> s <i>mcr-1/IncX4</i> po pomnožení
473/20	K/20200529	kejda před medikací CT	29. 5. 2020	< 10 KTJ/g	ND	negativní	ND
499/20	K/20200604	kejda po medikaci CT	4. 6. 2020	< 10 KTJ/g	ND	negativní	ND
467/20	P/20200526	půda před aplikací kejdy	26. 5. 2020	< 10 KTJ/g	ND	negativní	ND
532/20	P/20200611	půda-týden po aplikaci kejdy	11. 6. 2020	3,0 x 10 <sup>4</sup> KTJ/g	<i>E. coli</i>	<i>mcr-1</i>	pozitivní
613/20	P/20200618	půda-2 týdny po aplikaci kejdy	18. 6. 2020	3,0 x 10 <sup>3</sup> KTJ/g	<i>E. coli</i>	<i>mcr-1</i>	pozitivní
711/20	P/20200702	půda-měsíc po aplikaci kejdy	2. 7. 2020	1,0 x 10 <sup>3</sup> KTJ/g	<i>E. coli</i>	<i>mcr-1</i>	pozitivní
808/20	P/20200730	půda-2 měsíce po aplikaci kejdy	30. 7. 2020	5,0 x 10 <sup>1</sup> KTJ/g	<i>E. coli</i>	<i>mcr-1</i>	pozitivní
985/20	P/20200903	půda-3 měsíce po aplikaci kejdy	3. 9. 2020	< 10 KTJ/g	ND	negativní	pozitivní
1054/20	P/20200923	půda-4 měsíce po aplikaci kejdy	23. 9. 2020	< 10 KTJ/g	ND	negativní	pozitivní

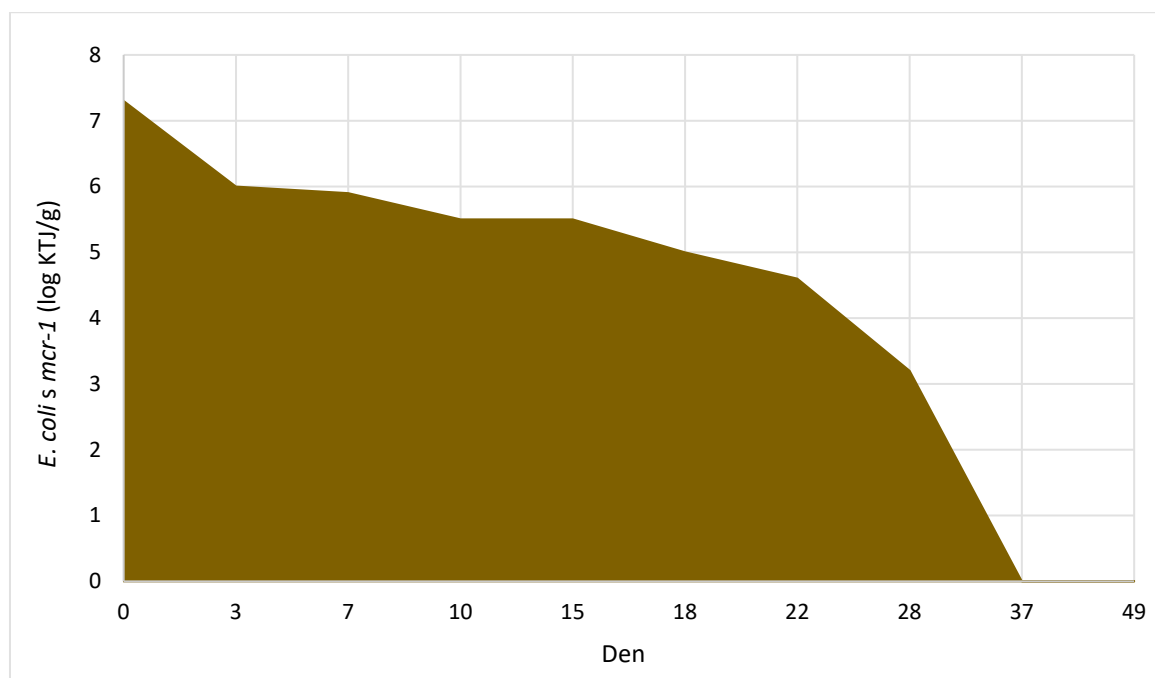
ND – nedetekováno, CT – kolistin



Výsledky této studie potvrzují dostupné výsledky ze zahraničí popisující zemědělské půdy jako významný zdroj genu *mcr-1* zejména v souvislosti s používáním organických hnojiv zvířat. V Číně, kde byl kolistin do roku 2017 povolen i jako růstový stimulant zvířat, byl gen *mcr-1* detekován u 11 % (6/53) ESBL produkujících *E. coli* izolovaných z půdy s intenzivní zemědělskou produkcí (Zheng et al. 2017). ESBL produkující *Enterobacteriaceae* tvoří významnou skupinu multirezistentních bakterií, které představují hrozbu pro veřejné zdraví. Výskyt *mcr-1* v půdě v čínských provinciích s intenzivní zemědělskou produkcí odpovídá i nálezům tohoto genu (31 % pozitivních vzorků, 16/51) ve vzorcích hnoje z čínských farem skotu a drůbeže (Gao et al. 2019). V Brazílii, kde byl kolistin až do listopadu 2016 povolen jako růstový stimulant u zvířat, byl metodou real-time PCR gen *mcr-1* detekován nejen ve vzorcích půd s intenzivní rostlinnou produkcí, ale také v půdách s původní vegetací odebraných v tomto roce. Za hlavní zdroj genu *mcr-1* v zemědělské půdě byla určena aplikace nekompostované drůbeží podestýlky na půdu. Výskyt genu *mcr-1* v půdách s přirozeným vegetačním pokryvem pravděpodobně odrážel kontaminaci z blízké zemědělské produkce (Oliveira et al. 2019). V zemědělské půdě severního Alžírka byly prokázány bakterie *E. coli* nesoucí gen *mcr-1* u 6 % (3/52) a gen *mcr-3* u 4 % (2/52) vyšetřených vzorků (Touati et al. 2020). Informace o výskytu genů *mcr* a bakteriálních nositelích těchto genů v zemědělských půdách v Evropě chybí, přestože jsou kmeny s geny rezistence popisovány v evropských chovech zejména drůbeže (Irrgang et al. 2016) a prasat (Dugett et al. 2018).

### **Přežívání *E. coli* s genem *mcr-1* v kejďe**

V rámci modelového pokusu přežívání *E. coli* s plasmidově vázanou rezistencí ke kolistinu v půdě byla testována také schopnost přežívání *E. coli* s *mcr-1* v kejďe prasat po medikaci kolistinem. Při výchozích počtech *E. coli* s *mcr-1*  $\log 7$  KTJ/g byly kolistin rezistentní *E. coli* schopné přežít v kejďe při pokojové teplotě pět týdnů. Po čtyřech týdnech došlo k poklesu *E. coli* s *mcr-1* o čtyři logaritmičké řády, 37. den (5. týden) byly *E. coli* prokázány pouze po pomnožení vzorku (Obr. 11). Negativní kultivace *E. coli* s *mcr-1* po pomnožení vzorku byla zjištěna 49. den (7. týden) od zaočkování kejdy testovaným kmenem. Z celkové DNA extrahované přímo z pomnoženého vzorku kejdy na konci pokusu (49. den) byl však metodou PCR prokázán gen *mcr-1*.

**Obrázek 11.** Přežívání *E. coli* s genem *mcr-1* v kejdě při pokojové teplotě

### Metagenomická analýza kejdy a půdy

#### Geny rezistence k antibiotikům v kejdě

Hnůj je cenné půdní hnojivo zlepšující fyzikální, chemické i biologické vlastnosti půdy, ale na druhou stranu je považován také za zdroj reziduí antibiotik a genů rezistence k antibiotikům. Ve vzorcích kejdy prasat před i po ukončení medikace kolistinem byly na základě metagenomické analýzy detekovány geny rezistence k aminoglykosidům, beta-laktamům, makrolidům, linkosamidům, oxazolidinonům, fenikolům, sulfonamidům a tetracyklinům (obrázek 5). S výjimkou skupiny oxazolidinonů (jejíž zástupce není pro veterinární medicínu registrován), se jedná o skupiny antibiotik, využívané k terapii ve veterinární medicíně, včetně používání u prasat. Národní data ve vztahu ke spotřebám antimikrobik ve veterinární oblasti dlouhodobě (v přesných údajích již stabilizovaného systému sledování od roku 2003) indikují, že nejvíce jsou v chovech v ČR používány tetracykliny, sulfonamidy a beta-laktamy (zejména aminopeniciliny). Skupina makrolidů *de facto* zaujímá páté místo, i když spotřeby jsou obdobné jako u skupiny pleuromutilinů, které však v posledních čtyřech letech zaujaly čtvrtou pozici (ÚSKVBL, 2019). Aminoglykosidy jsou používány u prasat zejména kombinace penicilin/dihydrostreptomycin v injekční lékové formě u prasnic, nicméně v posledních letech se znovu začaly využívat i perorálně podávané VLP s apramycinem a neomycinem, a to i v období po odstavu, čímž narostly hmotnostní spotřeby této skupiny a došlo i ke zvýšení tlaku na rozvoj rezistencí (Černý, ústní sdělení, EAAD, Praha 2019). Florfenikol, stejně jako

lincomycin (zejména v kombinaci se spektinomycinem) jsou pro léčbu prasat rovněž dostupné, a to jak v perorální, tak v injekční formě, celkový rozsah jejich používání je však významně nižší než u prvních tří výše uvedených skupin (data ÚSKVBL).

Ve vzorku kejdy ihned po zaočkování kmenem *E. coli* s plasmidově vázaným genem *mcr-1* byla kromě genů rezistence k výše uvedeným antibiotikům potvrzena přítomnost genu *mcr-1*. Současně byly navíc od genů rezistence k antibiotikům v kejdě již přítomných detekovány geny rezistence k chinolonům, aminokumarinům a bacitracinu (Obr. 14). Geny rezistence k těmto třem skupinám antimikrobiálních látek byly součástí genomu testovaného kmene *E. coli* s *mcr-1* přidaného do kejdy. Po pěti týdnech (37. den) při ponechání inokulované kejdy při pokojové teplotě již geny rezistence ke kolistinu (*mcr-1*), chinolonům, aminokumarinům a bacitracinu nebyly v kejdě prokázány. To odpovídá skutečnosti, že pět týdnů od zaočkování kejdy testovaným kmenem již byly počty *E. coli* s *mcr-1* v kejdě nižší než 10 KTJ/g.

### **Geny rezistence k antibiotikům v půdě**

Půda ve srovnání s kejdou obsahovala na základě metagenomické analýzy sekvenačních dat pouze geny rezistence k beta-laktamům (*bla<sub>TEM-1</sub>* gen) a tetracyklinům (*tet(C)* gen). V zastoupení genů rezistence k antibiotikům v půdě před a po aplikaci inokulované kejdy nebyl zjištěn rozdíl (Tab. 8). Při počtech log 4 KTJ/g *E. coli* s *mcr-1* v půdě týden po aplikaci kejdy již výsledky metagenomické analýzy neodhalily přítomnost genu *mcr-1*, ani dalších genů rezistence k antibiotikům přítomných v kejdě.

Použitá technika metagenomické analýzy je při počtech *E. coli* s *mcr-1* log 4 KTJ/g pod detekčním limitem dané metody, což potvrdily i výsledky metagenomické analýzy vzorků půd s různým obsahem *E. coli* s *mcr-1*. Při počtech *E. coli* s *mcr-1* log 7 KTJ/g půdy byly metagenomickou analýzou detekovány řádově stovky kopií genu *mcr-1* (cca 200x) při zastoupení *Enterobacterales* 19 %, *Enterobacteriaceae* 18 % *E. coli* 8 % všech přítomných bakterií. Při počtech *E. coli* s *mcr-1* log 5 KTJ/g půdy výsledky metagenomické analýzy rovněž prokázaly přítomnost genu *mcr-1*, ale pouze jednotky kopií genu (cca 4x). Současně došlo k výraznému poklesu detekovaných sekvencí identifikovaných jako *Enterobacterales* (0,50 %), *Enterobacteriaceae* (0,40 %) a *E. coli* (0,10 %). Při počtech *E. coli* s *mcr-1* v půdě log 2 KTJ/g již nebyl gen *mcr-1* v půdě detekován, sekvence *Enterobacterales* (0,3 %), *Enterobacteriaceae* (0,2 %) a *E. coli* (0,03 %) tvořily méně jak půl procenta všech přítomných bakterií.

**Tabulka 8.** Distribuce genů kódujících rezistenci k různým skupinám antibiotik v kejdě a půdě

Skupina antibiotik	Kejda				Půda				
	před medikací CT	po medikaci CT	s EC/mcr-1 t=0	s EC/mcr-1 t=5 týdnů	před aplikací kejdy	po aplikaci kejdy, t=1 týden	po aplikaci kejdy, t=2 týdny	po aplikaci kejdy, t=1 měsíc	po aplikaci kejdy, t=2 měsíce
Kolistin									
Aminoglykosidy									
Beta-laktamy									
Makrolidy									
Linkosamidy									
Oxazolidiny									
Fenikoly									
Sulfonamidy									
Trimethoprim									
Tetracykliny									
Chinolony									
Aminokumariny									
Bacitracin									

CT – kolistin, EC – *E. coli*, t – čas vyšetření,

šedě – pozitivní výskyt genů rezistence k antibiotiku, bíle – negativní výskyt genů k antibiotiku

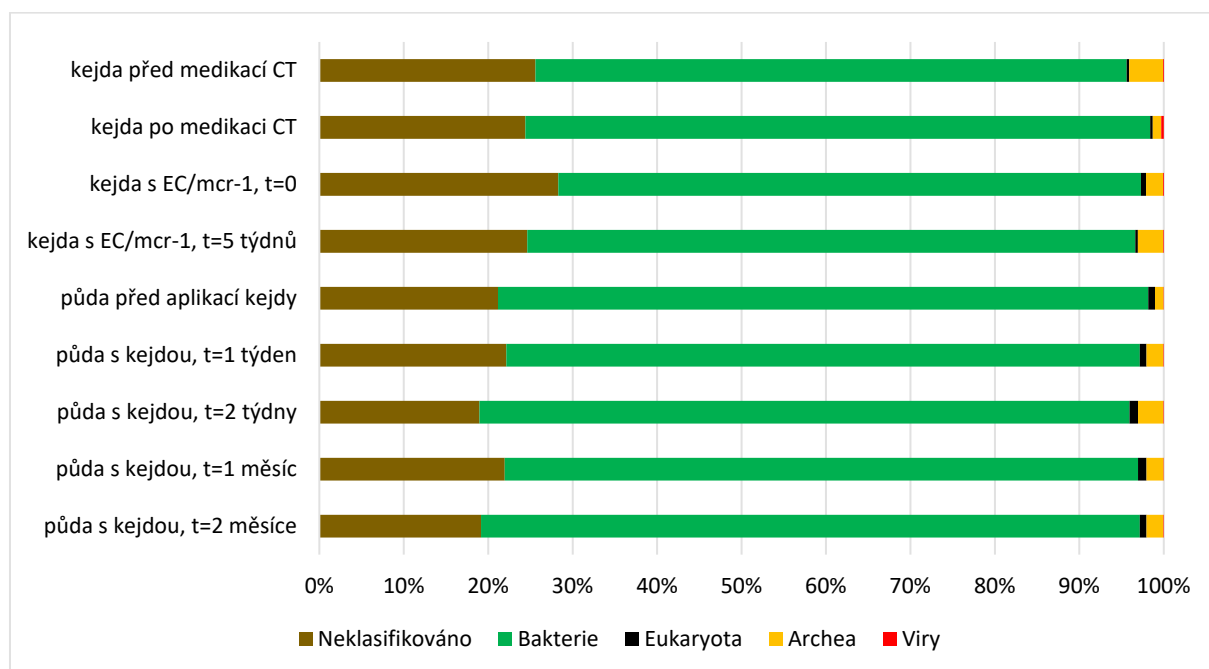
### Složení mikrobiomu kejdy a půdy

Z celkové DNA vyšetřovaných vzorků kejdy a půdy bylo na základě použitých analytických nástrojů neklasifikováno v průměru 36 % (28–57 %) získaných sekvencí. Mezi vzorky kejdy a půdy nebyly zjištěny rozdíly v zastoupení bakterií (69–78 %), eukaryot (0,3–1 %), archeí (1–4 %) a virů (0,04–1 %) (Obr. 12).

Z bakterií byla nejčastěji detekována skupina bakterií *Fibrobacteres*, *Chlorobi*, *Bacteroidetes* (FCB skupina), a to jak ve vzorcích půdy, kde byla zastoupena v rozmezí 28–33 % všech bakterií, tak ve vzorcích kejdy, kde byl její podíl vyšší (43–51 %) (Obr. 13 a 14). Na druhém místě byly ve vzorcích půd detekovány *Proteobacteria* (průměr 21 %, rozmezí 19–22 %), následované zástupci *Acidobacteria* (průměr 18 %, rozmezí 17–19 %), *Terrabacteria* (průměr 14 %, rozmezí 13–14 %), bakteriemi patřícími do PVC (*Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*) skupiny (průměr 7 %, rozmezí 6–7 %) a *Spirochaetes* (průměr 0,3 %, rozmezí 0,2–0,3 %). Dominantní zastoupení uvedených taxonomických kmenů bakterií bylo zjištěno také v rámci metagenomické analýzy půd v rámci naší pilotní studie provedené v roce 2019.

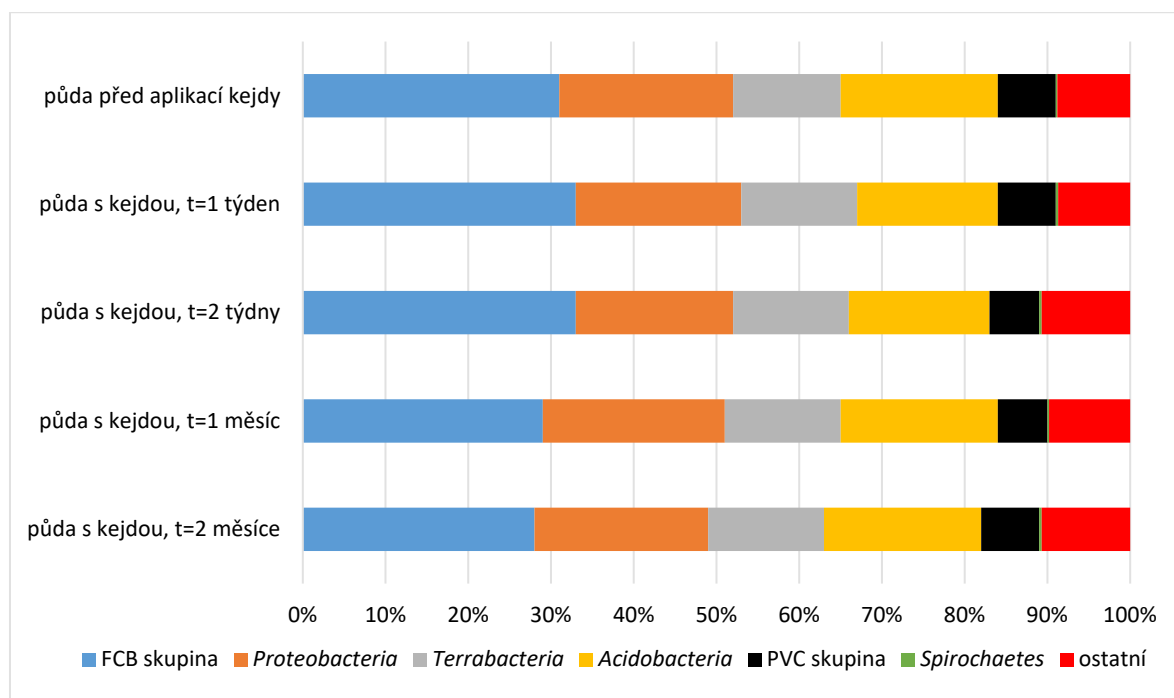
Ve vzorcích kejdy bylo zastoupení výše uvedených skupin bakterií odlišné. Po bakteriích FCB skupiny byly nejčastěji detekovány *Terrabacteria* (průměr 19 %, rozmezí 16–19 %), následované *Proteobacteria* (průměr 17 %, rozmezí 12–23 %). Větší rozdíly byly zaznamenány v přítomnosti *Acidobacteria*, které ve srovnání se vzorky půd tvořily v průměru pouze 0,3 % bakterií a *Spirochaetes*, které byly naopak ve větší míře (průměr 5 %, rozmezí 2–8 %) zastoupeny ve vzorcích kejdy (graf 5). Vyšší výskyt acidobakterií ve vyšetřované půdě ve srovnání s kejdou neodpovídal vyšší aciditě půdy, která se vyznačovala neutrální půdní reakcí (tabulka 1). Kejda měla dle orientačního měření indikátorovým papírkem pH neutrální až slabě alkalické (pH 7–8).

**Obrázek 12.** Podíl neklasifikovaných, buněčných organismů a virů ve vyšetřovaných vzorcích kejdy a půdy



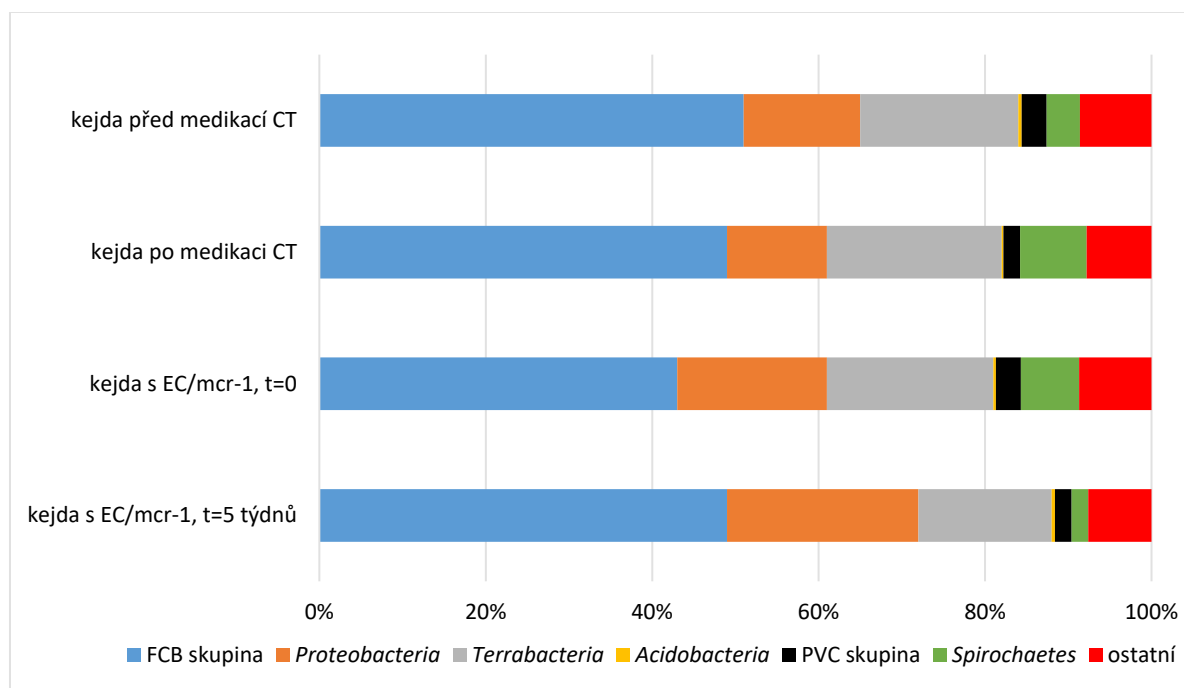
CT – kolistin, EC – *E. coli*, t – čas vyšetření

**Obrázek 13.** Nejčastější skupiny bakterií v mikrobiomu vyšetřovaných vzorků půdy



FCB skupina – *Fibrobacteres*, *Chlorobi*, *Bacteroidetes*; PVC skupina – *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, CT – kolistin, EC – *E. coli*, t – čas vyšetření

**Obrázek 14.** Nejčastější skupiny bakterií v mikrobiomu vyšetřovaných vzorků kejdý



FCB skupina – *Fibrobacteres*, *Chlorobi*, *Bacteroidetes*; PVC skupina – *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, CT – kolistin, EC – *E. coli*, t – čas vyšetření

## **Změny mikrobiomu půdy a kejdy ve vztahu k přítomnosti genů rezistence k antibiotikům**

V rámci taxonomického kmene *Proteobacteria*, nebyly ve vzorku půdy před aplikací kejdy ani ve vzorcích půd po aplikaci inokulované kejdy v různých odběrových termínech zjištěny rozdíly v zastoupení bakteriálních tříd *Alphaproteobacteria* (27–31 %), *Betaproteobacteria* (21–24 %), *Gammaproteobacteria* (21–23 %) a *Delta- a Epsilonproteobacteria* (21–25 %) (Obr. 15). Aplikace kejdy na pokusnou půdu neovlivnila množství enterobakterií natolik, aby se změna mikrobiomu půdy projevila ve výsledcích sekvenčních dat na základě aplikovaného analytického přístupu. Přestože na základě kultivace a PCR byly bakterie *E. coli* s genem *mcr-1* obsaženy v půdě ještě čtyři měsíce po aplikaci inokulované kejdy, metagenomická analýza nepotvrdila přítomnost genu *mcr-1*. Nepřítomnost genu *mcr-1* v půdě již týden po aplikaci inokulované kejdy při počtech *E. coli* s *mcr-1* v půdě log 4KTJ/g korelovala s velice nízkou detekcí sekvenčních úseků odpovídajících bakteriím řádu *Enterobacterales* (0,3 % všech bakterií), které patří do třídy *Gammaproteobacteria*.

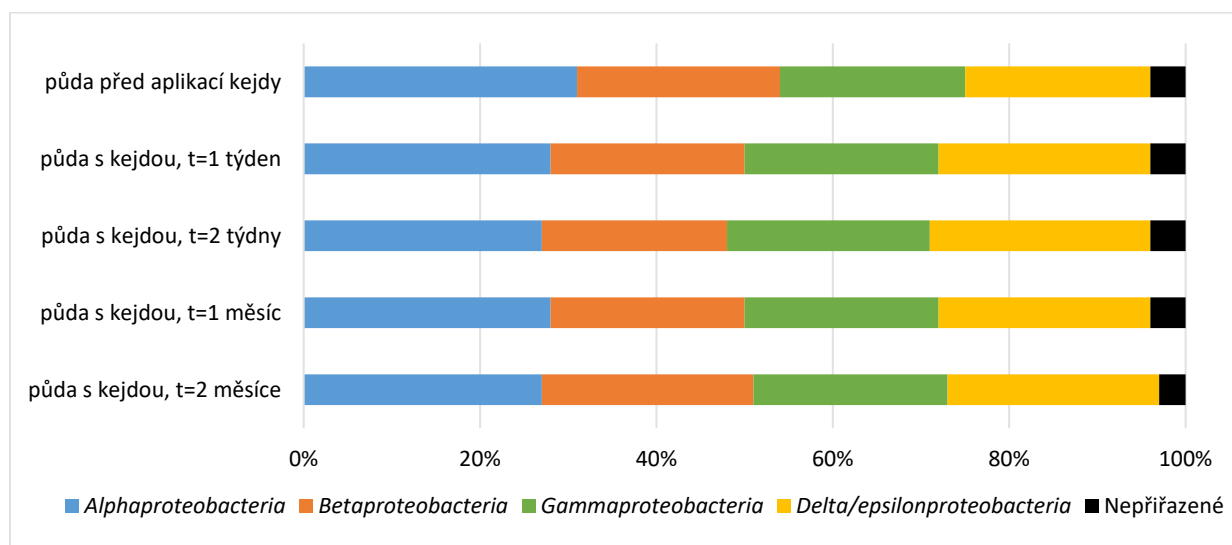
V zahraničí byly metagenomickou analýzou veřejně dostupných sekvencí vzorků půd a mořské vody identifikovány jako převažující bakteriální nositelé genů rezistence k antibiotikům rody *Alteromonas*, *Vibrio* a *Proteobacteria*. Naopak ve vzorcích střevního traktu drůbeže a prasat, ve kterých byl detekován i gen *mcr-1*, byli jako hlavní bakteriální nositelé genů rezistence k antibiotikům určeni zástupci *Escherichia*, *Bacteroides* a *Clostridium* (Zeng et al. 2019).

V průběhu sledování přežívání *E. coli* s genem *mcr-1* v kejdě při pokojové teplotě byl zaznamenán posun v zastoupení bakteriálních tříd patřících do kmene *Proteobacteria* (Obr. 16). Ihned po přidavku testovaného kmene *E. coli* s *mcr-1* do kejdy po medikaci prasat kolistinem došlo ke zvýšení podílu *Gammaproteobacteria* na 41 % v porovnání s nezaočkovanou kejdou po medikaci (27 %). Po pěti týdnech, kdy došlo k poklesu *E. coli* s genem *mcr-1* v kejdě z log 7 KTJ/g na méně než 10 KTJ/g, došlo ke snížení podílu *Gammaproteobacteria* (17 %) ve prospěch *Delta- a Epsilonproteobacteria* (63 %). V kejdě prasat ihned po přidavku *E. coli* s genem *mcr-1* bylo 5 % bakterií identifikováno jako zástupci řádu *Enterobacterales*. Za pět týdnů, kdy již na základě metagenomické analýzy nebyl v inokulované kejdě gen *mcr-1* prokázán, bylo do řádu *Enterobacterales* zařazeno jen 0,3 % bakterií.

Zastoupení *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* a *Delta- a Epsilonproteobacteria* po pěti týdnech od zaočkování kejdy se přiblížilo stavu v kejdě prasat

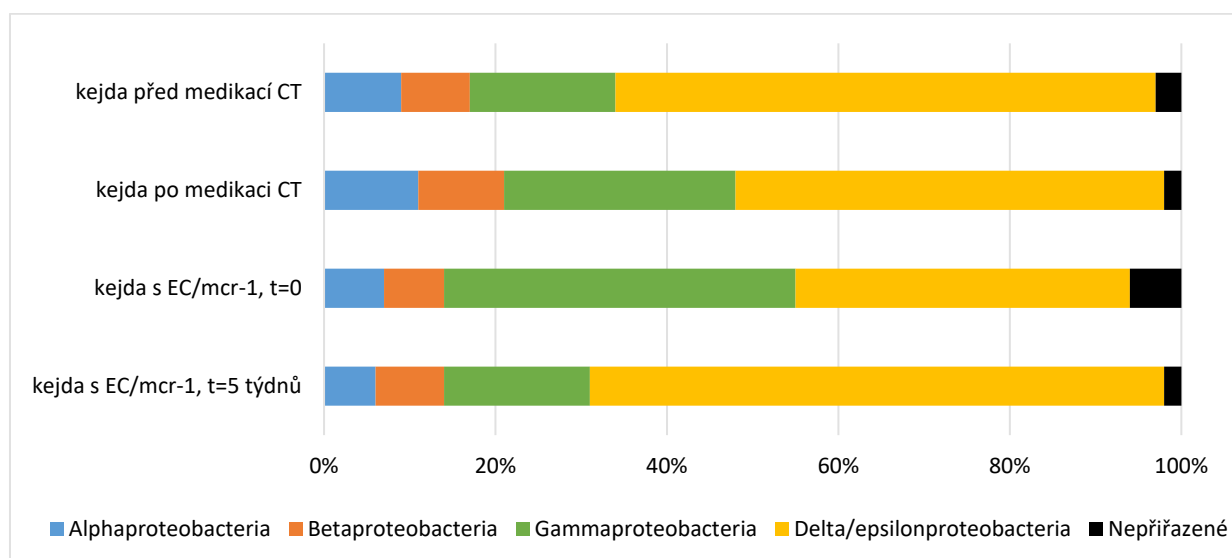
před medikací kolistinem (Obr. 16). Mezi *Delta-* a *Epsilonproteobacteria* byly detekovány jednak aerobní bakterie *Myxococcales*, ale zejména anaerobní bakterie řádů *Desulfobacterales*, *Desulfuromonadales*, *Syntrophobacterales* a mikroaerofilní bakterie *Campylobacterales*. V průběhu skladování inokulované kejdy po medikaci kolistinem, tak pravděpodobně docházelo k anaerobním procesům a poklesu obsahu kolistinu vedoucím k rozvoji zejména anaerobních sulfid redukujících bakterií, které převažovaly i v kejdě odebrané na farmě před zahájením medikace prasat.

**Obrázek 15.** Podíl bakteriálních tříd v rámci *Proteobacteria* v půdě před a po aplikaci kejdy



CT – kolistin, EC – *E. coli*, t – čas vyšetření

**Obrázek 16.** Podíl bakteriálních tříd v rámci *Proteobacteria* v kejdě před a po medikaci kolistinem a během skladování kejdy inokulované *E. coli* s genem *mcr-1*



CT – kolistin, EC – *E. coli*, t – čas vyšetření



Výsledky zahraničních studií ukazují, že nakládání s organickými hnojivy zvířat před jejich aplikací na půdu může mít vliv na přetrvávání genu *mcr-1* v hnoji nebo kejdě a další šíření tohoto genu do půdy. Gao et al. (2019) ve své studii prokázali, že kompostování kravského hnoje vedlo k redukci genu *mcr-1*, která korelovala se snížením počtu potenciálních bakteriálních nositelů tohoto genu, *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas*. Během kompostování, byla metodou kvantitativní PCR zjištěna > 90 % eliminace *mcr-1* během 15 dní při teplotách 44–65 °C, za 22 dní byl gen *mcr-1* nedetekovatelný. V další studii kombinace výsledků kvantitativní PCR pro detekci genu *mcr-1* a 16S rRNA sekvenování prokázala, že zastoupení bakterií *Enterobacteriaceae*, které představují hlavní nositele *mcr-1*, se zvyšuje přirozeným vysoušením prasečích exkrementů a naopak snižuje jeho ošetřením anaerobními rozkladnými procesy (Xia et al. 2019).

### **Změny mikrobiomu půdy vlivem mražení**

Při sledování vlivu mražení na složení mikrobiomu půdy bylo zjištěno, že zamrazování nemá významný vliv na složení mikrobiomu. Drobné rozdíly byly pozorovatelné u bakterií skupiny FCB a *Acidobacteria*, kdy postupem času mírně klesaly počty bakterií skupiny FCB (*Chitinophagaceae* + *Flavovacteria* + *Sphingobacteria* + *Cytophagales*), oproti tomu počty *Acidobacteria* (*Blastocatellia* + *Acidobacteriales*) mírně stoupaly. Zastoupení kmene *Proteobacteria* se mezi vzorky nelišily, vliv na námi sledovanou čeleď *Enterobacteriaceae* tedy zamrazování vzorků nemá. Z pohledu sledované mikrobioty byly bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* v malých množstvích kultivačně detekovány ve všech vzorcích, přestože při metagenomické analýze bylo procentuální zastoupení této čeledi ve všech vyšetřovaných vzorcích nízké (~0,1 %).

## **4.2 Analytická část – část B**

První experimenty byly provedeny s HLB kolonkami, protože jejich využití je v dostupných publikacích nejčastější. Jako extrakční činidlo byla zvolena kyselina mravenčí v různých koncentracích a také v kombinaci s methanolem, protože kolistin je vysoce polární sloučenina s velkou rozpustností ve vodě. Při kyselém pH bude jeho molekula kladně nabitá. Tyto postupy se osvědčily, pokud byl připraven modelový roztok kolistinu do příslušné extrakční směsi (bez extrahované půdní matrice). Výtěžnost potom dosáhla 72 % pro 0,2% kyselinu mravenčí.

Na modelových vzorcích byl testován vliv matrice na kvantifikaci kolistinu. K 1 ml extraktu z půdy byl přidán 1 µg kolistinu. Byly porovnány intenzity signálu v čisté extrakční směsi a v extraktu. Došlo ke snížení signálu na kvantifikačních hmotách ve směsi s kyselinou mravenčí o 35–40 %. Naopak v čisté vodě došlo k navýšení signálu o 10–15%. Z tohoto důvodu, pokud je to možné, je vhodné dělat matriční roztoky standardů. V dalších měřeních toto doporučení nebylo dodrženo, protože se testovalo velké množství různých extrakčních činidel. Pokud by byla vybrána vhodná extrakční směs, byly by vzorky připraveny do příslušného matričního roztoku.

Posledním krokem bylo ověřit metodu na modelových vzorcích, kdy do vzorku půdy před aplikací kejdý byl v laboratoři přidáván kolistin. Podle dostupné literatury byly zvoleny různé metody pro izolaci a zakoncentrování kolistinu pomocí SPE (Tab. 6). Extrakce byly opakovány vícekrát. Na začátku bylo pracováno s přídávkem kolistinu 1 µg. Poté bylo přistoupeno k navýšení koncentrace a extrakce byly prováděny s přídávkem 10 a 100 µg.

Jak již bylo zmíněno v úvodu, je nejčastěji využívanou SPE kolonkou kolonka s HLB stacionární fází. Proto byla použita jako první a bylo s ní provedeno nejvíce experimentů. Byly vyzkoušeny různé extrakční směsi, včetně McIlvainaova pufru s kyselinou EDTA. Tato metoda se využívá pro extrakci jiných antibiotik z půdy. Ani v jednom případě ze všech ověřovaných postupů nedošlo k izolaci a detekci kolistinu. Možným důvodem bylo vytvoření komplexu s huminovými látkami a díky tomu nedošlo k zachycení na HLB kolonce. Z tohoto důvodu bylo použito dvojnásobné extrakce (Obr. 9c). Na kolonce s anionaktivním iontoměničem (SAX) – předpoklad sorpce organických kyselin z extraktu a dále kontinuálním převodem již prošlého roztoku na HLB kolonku - předpoklad účinnější sorpce kolistinu. Eluce a analýza byla provedena jen z frakce z HLB. Ani tento postup se neosvědčil a kolistin nebyl detekován.

Posledním typem SPE, kde je využíván další typ stacionární fáze, je kolonka WCX se slabým kationtoměničem. V tomto případě byl předpoklad takový, že kladně nabitý kolistin se zachytí

na stacionární fázi a bude poté eluován příslušným elučním činidlem. Při následné analýze se ani u této metody nepodařilo kolistin detekovat.

Kolistin se nepodařilo z půdy vyextrahovat a detekovat. Důvodů, proč tomu tak bylo, může být více. Je to sorpce na půdní organickou hmotu, vytvoření komplexů s huminovými látkami, snížení signálu při ionizaci vlivem matrice. Neúspěch při analýze bude zřejmě ve spojení všech těchto faktorů. Kolistin je velmi polární molekula s aminoskupinami, které jsou v širokém rozmezí pH nabitě kladně. V půdě se nachází celá řada huminových látek, které mají záporně nabitě funkční skupiny (karboxylové kyseliny). Molekula kolistinu potom může vytvářet velmi silné vazby, které se až mohou podobat vazbám kovalentním. Davis ve svojí práci zkoumal sorpci peptidových antimikrobik, mezi nimi i kolistin, na půdu a stanovoval hodnoty koeficientu  $K_d$  (Davis et. al., 2020). Tento koeficient popisuje distribuci v systému voda x půda (sediment, kal). Je důležitým parametrem pro hodnocení předpovědi pohybu látek v životním prostředí. Zejména pro velmi polární molekuly je vedle koeficientu  $\log P$  (koeficient n-oktanol/voda) dalším důležitým faktorem pro toto posouzení. Hodnota  $\log P$  pro kolistin je -3,3 (Pubchem), podle které by se dalo usoudit, že bude kolistin dobře dostupný v půdním roztoku. V tomto ohledu je významnější hodnota  $K_d$ , která ukazuje na efekt zcela opačný. Experimentálně stanovená hodnota  $K_d$  pro kolistin E1 byla 111 (LUFA, pH 4,7) a víc jak 52 (LUFA, pH 6,88); pro kolistin E2 byla 256 (LUFA, pH 4,7) a víc jak 185 (LUFA, pH 6,88), což ukazuje na velmi silnou sorpci v půdě a nízkou biodostupnost (Davis et. al., 2020). Autor se také zmiňuje, že kolistin z půdy nebylo možné kvantitativně vyextrahovat celou řadou rozpouštědel. Podle jeho pozorování vykazuje velkou sorpci na PTFE a také fotooxidaci (Davis et. al., 2020).

## 5. ZÁVĚRY

Funkční úkol přinesl nové poznatky v oblasti přežívání bakterií *E. coli* s plasmidově vázanou rezistencí ke kolistinu v zemědělském prostředí.

Byl navržen a aplikován unikátní přístup kombinující kultivaci a metagenomiku pro detekci bakterií rezistentních ke kolistinu/genů *mcr* ve vzorcích prasečí kejdy a půdy. V rámci metagenomické analýzy byl stanoven detekční limit metody pro průkaz genu *mcr-1*.

Modelový pokus přežívání kmene *E. coli* s genem *mcr-1* prokázal jeho perzistenci v kejdě po dobu 5 týdnů a v půdě po dobu 4 měsíců. Dosažené výsledky dokazují, že aplikace organických hnojiv živočišného původu z chovů, kde byl použit kolistin, jednoznačně vede ke zvýšenému výskytu rezistentních bakterií v půdě.

Nebyla prokázána přítomnost genů rezistence *mcr-1* v rostlinách pěstovaných na půdě, kde byla aplikována kejda z předmětného chovu.

Při zohlednění výše uvedeného je při aplikaci organických hnojiv živočišného původu na zemědělskou půdu potřebné zvažovat nejen benefity, které tato aplikace přináší, např. obohacení půdy o organické živiny, ale rovněž rizika přenosu a šíření rezistence plynoucí ze zapracování hnojiv pocházejících z chovů, kde byla zvířata ošetřena antibiotiky.

Bylo zjištěno, že zamrazování vzorků půd nemá na složení půdního mikrobiomu významný vliv.

V rámci přípravy metody pro detekci kolistinu v půdě byla vyzkoušena celá řada metod extrakce a zakoncentrování kolistinu ze vzorku půdy. Žádná z těchto metod nevedla k pozitivním výsledkům, a proto nebyly dále analyzovány vzorky půdy odebrané v časovém horizontu po aplikaci kejdy. Podle vlastností kolistinu lze předpokládat jeho velmi silnou sorpci v půdě a tím sníženou biodostupnost. Je otázkou, jestli nebo jak se podaří kolistin kvantitativně stanovit. Nicméně je vhodné pokračovat s danými experimenty se zvýšenou koncentrací modelových vzorků, zkusit také sorpční experiment s roztokem a půdou před aplikací kejdy k ověření předpokladu významné sorpce kolistinu v půdě. Dalším krokem by mohlo být využití citlivějšího přístroje LC/MS/MS a zkusit tak analýzu bez jakékoliv úpravy extraktu (pouze filtrace). Zde mohou být nevýhodou velké matriční efekty, na jejichž vliv je potřeba klást důraz.

S ohledem na získané informace je důležité rozšířit znalosti o přežívání rezistentních bakterií v různých typech zemědělských odpadů živočišného původu. Rovněž zátěž půdy rezidui (zbytky) antimikrobních léčiv patří mezi oblasti, kde by bylo vhodné získat data z podmínek v ČR. Záměrem je primárně věnovat pozornost třem majoritním druhům hospodářských zvířat, které jsou chovány ve vnitřních prostorách hal a stájí, z nichž pocházejí statková hnojiva následně aplikovaná na půdu. Na základě mikrobiologických analýz zaměřených na rezistentní bakterie a chemických analýz zaměřených na rezidua bude možné zpřesnit definování rizik šíření antimikrobiální rezistence a případně zátěže rezidui vlastních léčivých látek (případně jejich mikrobiologicky aktivních metabolitů) při využívání prasečí kejdy, podestýlky drůbeže, močůvky a hnoje skotu k fertilizaci zemědělských půd. Z letošního roku (2020) jsou z provedených prací dostupné výsledky pro kolistin a to především ve vztahu k rezistenci a perzistenci bakterií s plasmidově vázanou rezistencí ke kolistinu v půdě. Na rok 2021 je v plánu pokračovat se studií podestýlky a půdy se zapracovanou podestýlkou pocházející z chovů kura domácího po aplikaci VLP s enrofloxacinem, který je u drůbeže frekventně používán a zároveň patří mezi kriticky významná antimikrobika z pohledu ochrany zdraví člověka.

### Čerpání finančních prostředků k funkčnímu úkolu „AMR v půdě a případně dalších částech životního prostředí“ za rok 2020

Metagenomická analýza vzorků půdy a kejdy včetně vyhodnocení a interpretace výsledků (VÚVeL)	34 041 Kč
<hr/>	
Analýzu reziduí kolistinu ve vzorcích půdy:	
- optimalizace LC/MS metody	170 000 Kč
- analýza reálných vzorků půdy po aplikaci kejdy (FCH VUT)	
<hr/>	
Zpracování podkladů a expertní posouzení, podíl na sestavení zprávy ve vztahu k:	
- datům o spotřebě antimikrobik se zaměřením na spotřeby kolistinu v ČR (sumarizace pro účely sledování zátěže životního prostředí)	20 000 Kč
- spolupráci na výběru farmy, analýze a interpretaci dat z farmy s ohledem na používaná VLP, včetně kolistinu a možným dopadům na rezistence a rezidua a jejich přenos do půdy (ÚSKVBL)	
<hr/>	
Ostatní osobní výdaje – DPP (48 hodin á 300 Kč/hod.)	14 400 Kč
<hr/>	
PHM	1 718 Kč
<hr/>	
Náklady na odběr půdních vzorků	14 956 Kč
<hr/>	
Chemikálie a laboratorní pomůcky	240 498,12 Kč
<hr/>	
<b>Celkem</b>	<b>495 613,12 Kč</b>

Relevantní daňové doklady jsou k dispozici v účetnictví ÚKZÚZ.

## 6. REFERENCE

- AbuOun, M., Stubberfield, E. J., Duggett, N. A., Kirchner, M., Dormer, L., Nunez-Garcia, J., et al. (2017). *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J. Antimicrob. Chemother.* 73:2904.
- AISLP (2020) Automatizovaný Informační systém Léčivých Přípravků, Infarmex, elektronický nosič, verze 2020/3
- Anyanwu, M. U., Jaja, I. F., Nwobi, O. C. (2020). Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (*mcr*) gene-containing isolates from the environment: a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17:1028.
- Alexa, P., Rychlik. I., Nejezchleb, A., Hamrik, J. (1997). Identification of enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* by PCR and biological methods. *Vet. Med.* 42:97-100.
- Al-Tawfiq, J., Laxminarayan, R., Mendelson, M. (2017). How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *Int. J. Infect. Dis.* 54:77-84.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., Malorny B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* B. *J. Antimicrob. Chemother.* 72:3317-3324.
- Brand, P., Gobeli, S., Perreten, V. (2017). Pathotyping and antibiotic resistance of porcine enterovirulent *Escherichia coli* strains from Switzerland (2014-2015). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 159:373-380.
- Bressan, C., Kunz, A., Schmidell, W., and Soares, H. (2013). Toxicity of the colistin sulfate antibiotic used in animal farming to mixed cultures of nitrifying organisms. *Water Air Soil Pollut.* 224, 1–9.

Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., et al. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22:30589.

Dagla, Ioanna, Evangelia Karkoula, Eirini Baira, Anthony Tsarbopoulos, and Evangelos Gikas. (2019). Analytical Methodologies Used for the Determination of Colistin in Biological Fluids. Is It Still a Challenge? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 164:777–88. doi: 10.1016/j.jpba.2018.11.044

Davis, Caroline A., and Elisabeth M. L. Janssen. (2020). Environmental Fate Processes of Antimicrobial Peptides Daptomycin, Bacitracins, and Polymyxins. *Environment International.* 134 (September 2019):105271. doi: 10.1016/j.envint.2019.105271

DrugBank, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00803>, navštíveno 28.10. 2020

Duggett, N. A., Sayers, E., AbuOun, M., Ellis, R. J., Nunez-Garcia, J., Randall, L., et al. (2017). Occurrence and characterization of *mcr-1* harbouring *Escherichia coli* isolated from pigs in Great Britain from 2013 to 2015. *J. Antimicrob. Chemother.* 72:691-695.

EK (2015), Přílohy Prováděcího rozhodnutí Komise, ze dne 16.3.2015, týkající se registrací všech veterinárních léčivých přípravků obsahujících kolistin k perorálnímu podání, v rámci článku 35 směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/82/ES [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150316130649/anx\\_130649\\_cs.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2015/20150316130649/anx_130649_cs.pdf) Navštíveno 25. října 2020

El-Sayed Ahmed, M. A. E., Zhong, L. L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., Tian, G. B. (2020). Colistin and its role in the era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg. Microbes Infect.* 9:868-885.

EMA (2019) Categorisation of antibiotics in the European Union: Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals (EMA/CVMP/CHMP/682198/2017) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf) Navštíveno 25. října 2020



EMA (2020) EMA Kategorizace antibiotik za účelem jejich uvážlivého a zodpovědného používání u zvířat (Verze v českém jazyce) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use_cs.pdf) Navštíveno 25. října 2020

Erume, J., Wijemanne, P., Berberov, E. M., Kachman, S. D., Oestmann, D. J., Francis, D. H., et al. (2013). Inverse relationship between heat stable enterotoxin-b induced fluid accumulation and adherence of F4ac-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* in ligated jejunal loops of F4ab/ac fimbria receptor-positive swine. *Vet. Microbiol.* 161:315–324.

Gao, Y., Lu, C., Shen, D., Liu, J., Ma, Z., Yang, B. et al. (2019). Elimination of the risks of colistin resistance gene (*mcr-I*) in livestock manure during composting. *Environ. Int.* 126:61-68.

Ghirardini, A., V. Grillini, and P. Verlicchi. (2020). A Review of the Occurrence of Selected Micropollutants and Microorganisms in Different Raw and Treated Manure – Environmental Risk Due to Antibiotics after Application to Soil. *Science of the Total Environment.* 707:136118. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.136118

Guenther, S., Falgenhauer, L., Semmler, T., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Roesler, U., et al. (2017). Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-I* from German swine farms. *J. Antimicrob. Chemother.* 72:1289-1292.

Guo, R., Ding, X., Zhong, X., Gao, S., and Sun, Y. (2014). Molecular and ultrastructural insights into the earthworm *Eisenia fetida* of the assessment of ecotoxicity during colistin exposure. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 13405–13411.

Hölzel, C. S., Schwaiger, K., Harms, K., Küchenhoff, H., Kunz, A., Meyer, K., et al. (2010). Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environ. Res.* 110, 318–326.

Hu Y.J., Cowling B.J. (2020) Reducing antibiotic use in livestock, China, Bulletin of the World Health Organization, <https://www.who.int/bulletin/volumes/98/5/19-243501/en/> Navštíveno 24.10.2020

Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B. A., Grobbel, M., Skladnikiewicz-Ziemer, T., Thomas, K., et al. (2016). Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010-2015. *Plos One*. 11:e0159863.

Kempf, I., Jouy, E., Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 48:598-606.

Kieffer, N., Royer, G., Decousser, J. W., Bourrel, A. S., Palmieri, M., Ortiz De La Rosa, J. M. et al. (2019). *mcr-9*, an inducible gene encoding an acquired phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 63:e00965-19.

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet. Infect. Dis*. 16:161-168.

Matar, Kamal M., and Batool Al-Refai. (2020). Quantification of Colistin in Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to a Pharmacokinetic Study. *Scientific Reports* 10(1):1–15. doi: 10.1038/s41598-020-65041-w

NMR (2019) Národní program sledování rezistencí k antimikrobikům u veterinárně významných patogenů; <https://www.svscr.cz/wp-content/files/dokumenty-a-publikace/Zprava-RL-2019.pdf>

OIE (2019) World organisation for animal health: OIE annual report on use of antimicrobial agents intended for use in animals. 4th report. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/A\\_Fourth\\_Annual\\_Report\\_AMR.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_Fourth_Annual_Report_AMR.pdf)

Oliveira, C., Lopes, E. S. Barbosa, D. R., Pimenta, R. L. Sobrinho, N. M. B. A., Coelho, S. M. O. et al. (2019). Occurrence of the colistin resistance *mcr-1* gene in soils from intensive vegetable production and native vegetation. *Eur. J. Soil Sci*. 70:876-881.

Paton, A. W., Paton, J. C. (1998). Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx(1)*, *stx(2)*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb(O111)*, and *rfb(O157)*. *J. Clin. Microbiol.* 36:598-602.

Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Colistin>, navštíveno 28.10. 2020

Rasschaert, Geertrui, Daan Van Elst, Lander Colson, Lieve Herman, Helena Cardoso de Carvalho Ferreira, Jeroen Dewulf, Johan Decrop, Jurgen Meirlaen, Marc Heyndrickx, and Els Daeseleire. (2020) Antibiotic Residues and Antibiotic-Resistant Bacteria in Pig Slurry Used to Fertilize Agricultural Fields. *Antibiotics* 9(1). doi: 10.3390/antibiotics9010034

Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W. and Letellier, A. (2016) Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front. Microbiol.* 7:1789.

Riemenschneider, C., W. Zerr, N. Vater, H. Brunn, S. A. I. Mohring, and G. Hamscher. (2014) Analysis and Behavior of Colistin during Anaerobic Fermentation. *Bioresource Technology* 170:303–9. doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.100

Robert, Christelle, Pierre Yves Brasseur, Michel Dubois, Philippe Delahaut, and Nathalie Gillard. (2016) Development and Validation of Rapid Multiresidue and Multi-Class Analysis for Antibiotics and Anthelmintics in Feed by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 33(8):1312–23. doi: 10.1080/19440049.2016.1207808

Salajka, E., Salajkova, Z., Alexa, P., Hornich, M. (1992). Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P2 in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhea in pigs. *Vet. Microbiol.* 32:163–175.

Schwarz, S., and Johnson, A. P. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2066–2070.

Skov, R. L., Monnet, D. L. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 21:30155.

Song, Xuqin, Qiwen Huang, Yingxia Zhang, Meiyu Zhang, Jingmeng Xie, and Limin He. (2019) Rapid Multiresidue Analysis of Authorized/Banned Cyclopolypeptide Antibiotics in Feed by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Based on Dispersive Solid-Phase Extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 170:234–42. doi: 10.1016/j.jpba.2019.03.050

Touati, M., Hadjadj, L., Berrazeg, M., Baron, S. A. (2020). Emergence of *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *mcr-3* genes in North West Algerian farmlands. *J. Glob. Antimicrob. Res.* 21:132-137.

ÚSKVBL (2019) Spotřeba antimikrobik ve veterinární medicíně v ČR: Detailní komentované srovnání spotřeb antimikrobik 2010-2017, p.1 - 39, [www.uskvbl.cz](http://www.uskvbl.cz) Navštíveno 25. října 2020

Wan, Eric Chun Hong, Clare Ho, Della Wai Mei Sin, and Yiu Chung Wong. (2006) Detection of Residual Bacitracin A, Colistin A, and Colistin B in Milk and Animal Tissues by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385(1):181–88. doi: 10.1007/s00216-006-0325-5.

Wang, X., Wang, Y., Zhou ,Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., et al. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg. Microbes Infect.* 7:122.

Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., Zong Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg. Microbes Infect.* 9:508-516.

Wellington, E. M. H., Boxall, A. B. A., Cross, P., Feil E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., et al. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet.* 13:155-161.

Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhel, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., et al. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June, 2016. *Euro Surveill.* 21:30280.

Xia, X., Wang, Z., Fu, Y., Du, X. D., Gao, B., Zhou, Y. et al. (2019). Association of colistin residues and manure treatment with the abundance of *mcr-1* gene in swine feedlots. *Environ. Int.* 127:361-370.

Yang, Y. Q., Li, Y. X., Lei, C. W., Zhang, A. Y., Wang, H. N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 73:1791–1795.

Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., et al. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio* 8:e00543-17.

Zeng, J., Pan, Y., Yang, J., Hou, M., Zeng, Z., Xiong, W. (2019). Metagenomic insights into the distribution of antibiotic resistome between the gut-associated environments and the pristine environments. *Environ. Int.* 126:346-354.

Zheng, B., Huang, C., Xu, H., Guo, L. Zhang, J., Wang, X. et al. (2017). Occurrence and genomic characterization of ESBL-producing, MCR-1 harboring *Escherichia coli* in farming soil. *Front. Microbiol.* 8:2510.