

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Agroekologie

Katedra: Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jan TRÁVNÍČEK, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Stanovení reziduí antibiotik v mléce léčených dojnic

Determination of antibiotic residues in the milk of cured
COWS

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Eva SAMKOVÁ, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: MVDr. Lucie HASOŇOVÁ, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Veronika STŘELEČKOVÁ

České Budějovice, 2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika STŘELEČKOVÁ**
Osobní číslo: **Z12599**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Agroekologie**
Název tématu: **Stanovení reziduí antibiotik v mléce léčených dojnic**
Zadávající katedra: **Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Rezidua inhibičních látek (RIL) jsou jedny z hlavních ukazatelů hygienické jakosti mléka a určují jeho vhodnost pro další zpracování. Jejich nejčastějším zdrojem v mléce jsou v důsledku např. léčby zánětů mléčné žlázy rezidua antibiotik.

Cílem diplomové práce bude sledování RIL v mléce dojnic léčených vybranými skupinami antibiotik a porovnání alespoň tří metod stanovení, včetně posouzení jejich výhod a nevýhod.


Diplomová práce bude zpracována na základě zásad zpracování závěrečných prací uvedených na http://www.zf.jcu.cz/copy_of_students/informace-pro-studujici/dokumenty-studijniho-oddeleni/informace-pro-studujici/Jak_vypracovat_DP.pdf podle následující rámcové osnovy:

1. **Úvod** - charakteristika a význam řešené problematiky včetně uvedení cílů práce
2. **Literární přehled** - současný stav poznání dané problematiky získaný studiem soudobé vědecké a odborné literatury
3. **Materiál a metodika** - popis použitých analytických metod včetně metod statistických
4. **Výsledky a diskuse** - tabulkové a grafické zpracování získaných dat navazující na cíl práce, jejich statistické vyhodnocení a porovnání s dostupnými literárními údaji
5. **Závěr** - stručné shrnutí výsledků vlastní práce, návrhy a doporučení vyplývající z řešené problematiky
6. **Summary** - přehled a nejdůležitější výsledky včetně klíčových slov (v anglickém jazyce)
7. **Seznam literatury** - jednotný, podle platných citačních zásad.

Rozsah grafických prací: tabulky a grafy dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 35 ? 50 stran textu
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

- LEE M.H. et al.: Public health risks: Chemical and antibiotic residues - Review. Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences, 2001, 14(3): 402-413.
- McEWEN S.A. et al.: Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra-label conditions. Canadian Veterinary Journal, 1992, 33(8): 527-534.
- NAVRÁTILOVÁ P.: Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk - a review. Czech Journal of Food Science, 2008, 26(6): 393-401.
- Databáze WOS, Česká zemědělská bibliografie, CAB Abstracts, PROQUEST, dostupné na: <http://www.lib.jcu.cz/cs/databaze>
- Vědecké a odborné články v časopisech a sbornících: př. Mlékařské listy, Mléko a sýry (Praha: VŠCHT), Ingrový dny (Brno: MENDELU)
- Zákony, vyhlášky a nařízení legislativy ČR a EU týkající se zásad a požadavků na jakost a zdravotní nezávadnost živočišných produktů.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.
Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů
Konzultant diplomové práce: MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.
Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů
Datum zadání diplomové práce: 26. března 2013
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2014


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 26. března 2013

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Stanovení reziduí antibiotik v mléce léčených dojnic“ vypracovala samostatně a použila jen zdrojů, které cituji a uvádím v přiloženém seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 25. 4. 2014

Podpis studenta:

Bc. Veronika Střelečková

Mé poděkování patří především doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D. za odborné vedení, rady, pomoc a za velkou ochotu, jež mi poskytla při zpracování této diplomové práce.

Velmi děkuji paní MVDr. Lucii Hasoňové, Ph.D. za ochotu a cenné připomínky. Také děkuji své rodině, kolegům a přátelům, kteří mě po dobu mého studia podporovali.

SEZNAM ZKRATEK

ADI	Akceptovatelný denní příjem
ATB	Antibiotika
BM	Bod mrznutí
BMK	Bakterie mléčného kysání
CPM	Celkový počet mikroorganismů
ČMK	Čisté mlékařské kultury
ČSN	Česká státní norma
EMA	Evropská léková agentura
IL	Inhibiční látky
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRL	Maximální reziduální limit
OL	Ochranná lhůta
PNC	Penicilin
PSB	Počet somatických buněk
RIL	Rezidua inhibičních látek
SOP	Standardní operační postup
SVÚ	Státní veterinární ústav
VLP	Veterinární léčivý přípravek

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1	REZIDUA INHIBIČNÍCH LÁTEK V MLÉCE A JEJICH PŘÍČINY	11
2.1.1	Veterinární léčiva	12
2.1.2	Veterinární léčiva v problematice mastitid	14
2.1.3	Faktory ovlivňující hladinu RIL v mléce	16
2.2	RIZIKA SPOJENÁ S VÝSKYTEM RIL V MLÉCE A JEJICH PREVENCE	18
2.2.1	Technologická rizika	18
2.2.2	Zdravotní rizika	19
2.3	LEGISLATIVNÍ OPATŘENÍ K VÝSKYTU RIL V MLÉCE	19
2.3.1	Maximální reziduální limity	21
2.3.2	Ochranné lhůty léčiv	21
2.4	METODY DETEKCE RIL V MLÉCE	23
2.4.1	Screeningové selektivní rychlotesty	24
2.4.2	Screeningové širokospektrální rychlotesty	24
2.4.3	Screeningové mikrobiologické plotnové metody	25
2.4.4	Fyzikálně-chemické a imunoenzymatické metody	26
3	MATERIÁL A METODIKA	27
3.1	CÍL PRÁCE	27
3.2	METODIKA EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI	27
3.3	ANALÝZA VZORKŮ	28
3.3.1	Stanovení RIL	28
3.3.1.1	Twinsensor BT	29
3.3.1.2	Delvotest SP-NT	31
3.3.1.3	Eclipse 50	32
3.3.2	Stanovení tuku, bílkovin a PSB	34
3.4	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ	34
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
4.1	VÝSLEDKY TESTŮ DETEKCE RIL V ZÁVISLOSTI NA DRUHU LÉČIVA	35
4.1.1	Vliv skupiny léčiva na výsledky testů detekce RIL	35
4.1.2	Vliv použitého VLP na výsledky testů detekce RIL	40
4.2	VÝSLEDKY TESTŮ DETEKCE RIL V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ OD APLIKACE LÉČIVA	45
4.2.1	Vliv dodržení ochranné lhůty na výsledky testů detekce RIL	46
4.2.2	Vliv doby od aplikace léčiva na výsledky testů detekce RIL	48

4.3	VÝSLEDKY TESTŮ DETEKCE RIL V ZÁVISLOSTI NA INDIKACI LÉČIVA.....	50
4.4	VÝHODY A NEVÝHODY POUŽITÝCH METOD DETEKCE RIL.....	53
5	ZÁVĚR	55
6	SUMMARY	57
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
8	SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ	64
8.1	SEZNAM TABULEK	64
8.2	SEZNAM GRAFŮ	65
8.3	SEZNAM OBRÁZKŮ	65

1 ÚVOD

Kravské mléko je pro své složení a vlastnosti velmi důležitou potravinou. Základní podmínkou kvality mléka a mléčných výrobků je hygienicky nezávadná surovina. Při hodnocení kvality syrového mléka je dle platné legislativy sledován především celkový počet mikroorganismů, počet somatických buněk a výskyt reziduí inhibičních látek.

Rezidua inhibičních látek v mléce souvisí zejména s rozšířeným používáním veterinárních léčiv, s nedodrčováním ochranných lhůt léčiv, se změnou metabolismu nemocného zvířete, popř. s nedůsledným vylučováním mléka léčených zvířat z dodávky. Případná neúměrná a neodůvodněná spotřeba antibiotik je rizikovým faktorem ve vývoji rezistencí, který může ovlivnit nejen úspěšnost terapie nemocných zvířat, ale může mít i následky na zdraví spotřebitelů a v neposlední řadě ovlivnit i ekonomické ukazatele výroby mléka.

Přítomnost reziduí, především veterinárních léčiv, přináší rovněž technologické problémy při zpracování mléka. V mlékárenském průmyslu ovlivňují aktivitu mlékařských kultur, což způsobuje problémy při výrobě sýrů, zakysávání jogurtů a dalších fermentačních procesech při zpracování mléka.

Mezi nejdůležitější preventivní opatření výskytu reziduí inhibičních látek v mléce patří striktní respektování zootechnických a veterinárních zásad aplikace a indikace léčiv a používání vhodných screeningových metod detekce reziduí inhibičních látek od farmy přes příjem mléka v příjmových laboratořích mlékáren až po finální produkty.

Cílem této práce bylo sledování přítomnosti reziduí inhibičních látek v mléce léčených dojnic a porovnání tří metod stanovení jejich přítomnosti, včetně posouzení jejich výhod a nevýhod.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Pojmem inhibiční látky jsou označovány látky, které svými baktericidními, případně bakteriostatickými účinky znesnadňují nebo úplně znemožňují zpracování mléka na mléčné výrobky, při jejichž výrobě se používají čisté mlékařské kultury (ČMK). Obecně tak mohou být označeny látky, které mají tlumivý vliv na rozvoj a aktivitu těchto mlékařských kultur (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

Inhibiční látky v mléce lze dle SAMKOVÉ (2010) rozdělit na látky přirozeně se vyskytující a látky cizorodé - kontaminanty.

Mezi přirozené inhibiční látky jsou řazeny některé antibakteriální složky mléka, které jsou součástí obranného systému mléčné žlázy, např. specifické imunoglobuliny, lysozym, laktoferin, laktoperoxidázový systém (SAMKOVÁ, 2010). Jak uvádí GAJDŮŠEK (1994), syrové mléko vždy obsahuje přirozené inhibiční látky. Jejich koncentrace závisí na stádiu laktace a na zdravotním stavu mléčné žlázy. Ve zralém mléce se vyskytují v nízkých koncentracích, ke zvýšení obsahu dochází např. v mastitidním mléce, v mlezivu nebo mléce starodojných krav. Inhibičně působí také některé lipidy a organické kyseliny, pokud jsou v mléce přítomny ve vyšších koncentracích (HOLEC, 1994).

Příkladem působení přirozených inhibičních látek je baktericidní fáze mléka, jejíž délka a účinnost je individuální, trvá 0,5 - 6 hodin po nadojení. Tyto látky jsou snadno degradovatelné pasterací na 82 - 83 °C po dobu 3 minut (SEYDLOVÁ, 1998).

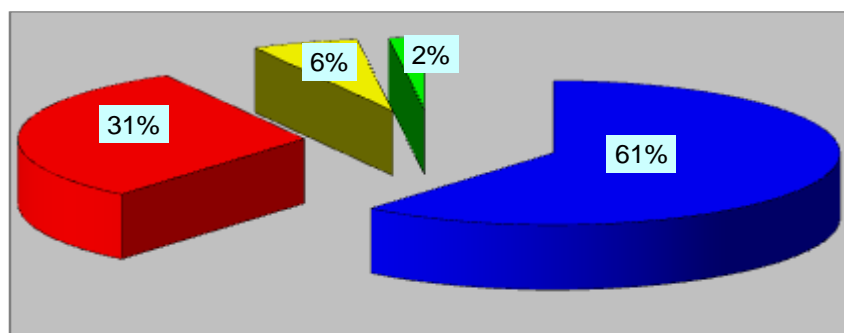
Rezidua inhibičních látek (RIL), která se do mléka dostávají z vnějšího prostředí, jsou tzv. cizorodé, kontaminující látky (NAVRÁTILOVÁ, 2002). Jejich nejvýznamnější skupinou jsou antimikrobiální látky (NAVRÁTILOVÁ, 2012). Rovněž JEŘÁBKOVÁ (2013) označuje za hlavní zdroje nežádoucích RIL v zemědělské prvovýrobě antimikrobiální látky, především antibiotika (ATB), chemoterapeutika a ostatní léčiva pocházející výhradně po léčbě a profylaxi onemocnění, dále sanitační prostředky, mykotoxiny (M1), fytoncidy, agrochemikálie a přirozené inhibitory.

2.1 REZIDUA INHIBIČNÍCH LÁTEK V MLÉCE A JEJICH PŘÍČINY

RIL v mléce a jejich výskyt je nejčastěji zapříčiněn používáním veterinárních léčivých přípravků, používaných v chovech k léčbě zvířat, dále to mohou být antiparazitární léčiva, antipyretika, analgetika aj. (SAMKOVÁ, 2010). Skutečnost, že nejčastější příčinou RIL v mléce jsou antibiotické přípravky, potvrzuje více autorů. Např. NAVRÁTILOVÁ (2012) mluví o 95 %, SAMKOVÁ (2010) o 90 %, HAUBERT et al. (1991) o 80 %, DOLEŽAL et al. (2000) uvádí, že 90 až 99 % nálezů RIL v mléce má svůj původ především v antibiotické léčbě (z toho až z 50 % penicilinové) a následném pochybení personálu při dojení.

Dle NAVRÁTILOVÉ (2008) jsou antimikrobiální látky u dojnic v laktaci využívány především v terapii mastitid, ale i dalších onemocnění (laminitid, respiračních onemocnění, metritid). Převládajícím zdrojem kontaminace mléka je intramamární aplikace léčiv. Při aplikaci antibiotik (ATB) pouze do jedné nebo několika čtvrtí přecházejí tyto i do mléka neléčených čtvrtí, a to tak, že po resorpci do krevního oběhu se vylučují mlékem i ze čtvrtí neléčených (HOLEC, 1994). NAVRÁTILOVÁ et al. (2002) upozorňují i na další způsoby kontaminace mléka a to perkutánní, intrauterinní, subkutánní, intramuskulární a intravenózní aplikací léčiv. Nejčastější příčiny nálezů RIL v mléce znázorňuje obr. 1 (SEYDLOVÁ, 1998).

Obrázek 1. Příčiny pozitivních nálezů RIL v mléce (SEYDLOVÁ, 1998)



- Nedodržení ochranné lhůty po aplikaci ATB; záměna ATB určených k aplikaci v době zapařlosti na léčení v době laktace; nedostatečné označení léčených dojnic
- Krátké období stání na sucho, předčasné otelení; Individualita vylučování ATB po ochranné lhůtě
- Injekční aplikace; ostatní ošetření; zbytky dezinfekčních prostředků; zbytky prostředků k hubení hmyzu či ochraně rostlin
- Nespecifická inhibice

2.1.1 Veterinární léčiva

Mezi nejčastější zdroje RIL v mléce patří bezesporu veterinární léčiva. Veterinární léčivé přípravky jsou farmakologicky a biologicky aktivní chemické látky určené především k léčbě a prevenci onemocnění zvířat. Všeobecně k nejpoužívanějším skupinám antimikrobiálních látek u potravinových zvířat patří skupina beta-laktamových antibiotik (peniciliny a cefalosporiny), tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy a sulfonamidy (BOTSOGLOU A FLETOURIS, 2001).

Při používání antimikrobiálních látek je důležitá zejména správná volba antimikrobiální látky, optimální a dostatečně dlouhá doba léčby, adekvátní dávkování, vhodná kombinace léčiv i monitorování antimikrobiální léčby (KOLLÁTOROVÁ, 2011).

Antibiotikum (ATB) je látka, která usmrcuje některé mikroorganismy nebo brání jejich růstu (VOTAVA, 2005). ATB působí především proti bakteriím, některá jsou však účinná také proti houbám a parazitickým prvokům (KOLLÁTOROVÁ, 2011).

ATB lze rozlišit na látky s baktericidním účinkem (usmrcují mikroorganismy) a látky s bakteriostatickým účinkem (inhibují růst mikroorganismů). ATB, která narušují proteosyntézu, zpravidla působí bakteriostaticky (LÜLMANN et al., 2004). Látky, které ovlivňují buněčnou stěnu nebo buněčnou membránu, účinkují zpravidla baktericidně, např. beta-laktamy a cefalosporiny (LEE, 2001). Mikroorganismy, především G- bakterie, rezistentní vůči této skupině ATB produkují enzym beta-laktamázu štěpící beta-laktamový kruh, čímž dochází k inaktivaci ATB.

Rozdělení na látky baktericidní a bakteriostatické ale není dle KOLLÁTOROVÉ (2011) zcela striktní, protože mnoho bakteriostatických ATB (tetracykliny, makrolidy, sulfonamidy v kombinaci s trimetoprimem) působí ve vyšších koncentracích rovněž baktericidně (beta-laktamy, aminoglykosidy). Výsledný účinek ATB ovlivňuje kromě koncentrace účinné látky také původce onemocnění.

LÜLMANN et al. (2004) uvádějí rozdělení ATB dle spektra účinnosti vůči různým druhům mikroorganismů na ATB úzkospektrální (zasahují buď G- nebo G+ bakterie, nebo dokonce jen některé bakteriální rody) a ATB širokospektrální (ničí široké spektrum mikroorganismů, včetně symbiotické mikroflóry na povrchu sliznic). V tabulce 1 je uveden stručný přehled používaných ATB, jejich zařazení do skupin, spektrum účinku, popřípadě vedlejší účinky.

Tabulka 1. Přehled antibiotik a sulfonamidů používaných ve veterinární medicíně
(ŠIMŮNEK, SMOLA, 1998)

Skupina	Zástupci	Spektrum působení // efekt	Toxicita, vedlejší účinky
BETA-LAKTAMY			
Peniciliny	Benzylpenicilin Oxacilin Kloxacilin Dikloxacilin	Úzké - G+	Obecně málo toxické, výjimečně případy přecitlivělosti
	Ampicilin Amoxicilin Karbencilin	Široké	
Cefalosporiny <i>1. a 2. generace</i>	Cefazolin, cefonicid	Střední	Potenciálně nefrotoxické
<i>3. a 4. generace</i>	Ceftiofur, cefalonium	Široké	
Karbapenemy	Imipenem, Meropenem	Široké	Nevolnost, průjem, kožní vyrážky
Monobaktamy	Aztreonam	Úzké - G-	
TETRACYKLINY	Oxytetracyklin Chlortetracyklin Tetracyklin Doxycyklin	Široké	Poruchy střevní mikroflóry, U přežvýkavců bachorové mikroflóry
POLYPEPTIDY	Bacitracin, Polymyxiny	Střední - G+, G-	Při systémovém působení: neurotoxická, nefrotoxická
GLYKOPEPTIDY	Vankomycin, Teikoplanin	Úzké - G+ (i multirezistentní kmeny)	
MAKROLIDY	Erytromycin Spiramycin	Široké (i na chlamydie a mykobakterie)	Určitá hepatotoxicita Průjem, zvracení, nevolnost Lokální podráždění v místě aplikace
LINKOSAMIDY	Linkomycin, Klindamycin	Úzké - G+	Trávící poruchy v důsledku narušení gastrointestinální mikroflóry
AMINOGLYKOSIDY	Streptomycin Kanamycin Neomycin Gentamycin	Od úzkého (G-) po široké	Vysoká nefrotoxická, ototoxická
SULFONAMIDY	Sulfadimidin Sulfanilamid Sulfurazol	Střední // Bakteriostatický	
Sulfonamidy potencované diaminopyrimidiny	Sulfadiazin a trimethoprim	Širší // Efekt až baktericidní	

Ve veterinární medicíně se smí používat pouze schválené (registrované) přípravky. Nedílnou součástí registrace je i posouzení zdravotní nezávadnosti reziduí v surovinách živočišného původu pro konzumenty (NAVRÁTILOVÁ, 2012). V chovech mléčného skotu jsou nejčastěji používána beta-laktamová ATB samostatně nebo v kombinaci s aminoglykosidy, méně často ATB tetracyklinová (COLAK, 2007).

Používání ATB při léčbě by se mělo řídit pravidly, která stanovuje antibiotická politika České republiky. Antibiotická politika je soubor opatření pro účinné a bezpečné používání ATB. Jejím cílem je zajistit vysokou odbornou úroveň antimikrobiální léčby, omezit vznik a šíření rezistentních mikroorganismů, a tak zachovat co nejdelší účinnost ATB (NOVOTNÁ et al., 2006). Antibiotická politika vychází z Návrhu subkomise České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (z 6. 10. 1999) pro antibiotickou politiku a je společná pro oblast humánní a veterinární (HERA et al., 2002). Antimikrobiální léčiva ve veterinární medicíně se dělí do dvou skupin, a to na léčiva volná a léčiva s indikačním omezením. Od roku 2000 probíhá v České republice monitoring rezistence vybraných bakteriálních kmenů k vybraným antibiotikům a monitoring spotřeby antimikrobiálních látek ve veterinární medicíně (HERA et al., 2002).

Z výsledků studie zabývající se kontaminací mléka rezistentními mikroorganismy Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně vyplynulo, že např. *Staphylococcus aureus* je nejčastěji rezistentní vůči penicilinu (50 %), streptomycinu (30 %), tetracyklinu (30 %), pokud se jedná o koaguláza negativní stafylokoky, přidává se navíc rezistence i vůči oxacilinu (25 %). U *Escherichia coli* byla dle NOVOTNÉ et al. (2006) nejvíce zastoupena rezistence ke streptomycinu (30 %), tetracyklinu (20 %) a ampicilinu (10 %).

2.1.2 Veterinární léčiva v problematice mastitid

Nejčastějším onemocněním dojnic, které je příčinou přítomnosti reziduí veterinárních léčiv v mléce, jsou mastitidy. Ostatní příčiny lze označit za méně významné. Mastitidy jsou dle epidemiologie rozlišovány na:

1. **infekční (kontagiózní) mastitidy** - primárním rezervoárem patogenních mikroorganismů je infikovaná mléčná žláza, mezi nejčastější původce těchto mastitid patří *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus dysgalactiae*;
2. **environmentální mastitidy** - primárním rezervoárem původců je životní prostředí zvířat. Nejčastějšími původci těchto mastitid jsou *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Yersinia spp.* (HUML A PAŠKOVÁ, 2003; SEYDLOVÁ, 2006; HOFÍREK et al., 2009; BRZDIL, 2011).

Před zahájením antibiotické léčby mastitid by měl být odebrán vzorek mléka z postižené mléčné žlázy k bakteriologickému vyšetření. Na důležitost vyšetření mléka před zahájením léčby a stanovení citlivosti patogenních mikroorganismů k ATB upozorňují TICHÁČEK et al. (2007). Rovněž dle HOFÍRKA et al. (2009) není cílené nasměrování antimikrobiální terapie bez těchto vyšetření možné. Dále je nutné vybrat přípravek, který obsahuje vhodnou antimikrobiální účinnou látku nebo jejich kombinaci, vedoucí k baktericiditě. Zároveň je třeba uvážit délku ochranné lhůty, správný způsob aplikace a délku trvání léčby (POKLUDOVÁ et al., 2007).

Ideální ATB by mělo mít nízkou minimální inhibiční koncentraci (MIC), což je koncentrace ATB, která již viditelně inhibuje růst mikroorganismů. ATB by mělo být co nejlépe rozpustné v lipidech, s vysokou biologickou dostupností, s krátkou ochrannou lhůtou a minimálními nežádoucími účinky (NOVOTNÁ et al., 2006).

Jak upozorňují TICHÁČEK et al. (2007) ve většině chovů se stala antibiotická léčba rutinní záležitostí, především v období zaprahování. Pokud při aplikaci ATB nejsou dodržována základní pravidla jejich používání, případně v podmínkách dlouhodobého nekontrolovaného profylaktického užití právě při zaprahování, vzrůstá dle HOFÍRKA et al. (2004) ve stájích problém se získanou rezistencí mikroorganismů. NOVOTNÁ et al. (2006) také upozorňují na riziko používání stále stejných ATB (nebo příbuzných látek, kde se vyskytuje zkřížená rezistence), jelikož vede k selekčnímu tlaku a dalšímu nárůstu rezistence bakterií.

Léčba mastitid může být volena lokální nebo celková. K lokální (intramamární) patří léčba antibiotická, enzymová, vtírání mastí a fytotherapie. K aplikaci intramamárních přípravků se přistupuje u klinických mastitid, u subklinických mastitid na konci laktace nebo jako prevence nových infekcí, kdy je přípravek aplikován do vemene po posledním dojení na počátku zaprahování dojníc (POKLUDOVÁ et al., 2007). Celková léčba zahrnuje používání parenterálních ATB, které lze u středních a těžších forem kombinovat s ATB lokálními (HOFÍREK et al., 2009). SCOTT et al. (2011) doporučují využívat kombinovanou léčbu u mastitid vyvolaných bakteriemi *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*.

Podle TICHÁČKA et al. (2007), je při léčbě mastitid uplatňována v první řadě aplikace intramamárních ATB. Z účinných látek jsou ve všech intramamárních přípravcích nejčastěji zastoupena beta-laktamová ATB (zejména kloxacilin), ale také ATB z jiných tříd (aminoglykosidy, cefalosporiny, tetracykliny), z dalších antimikrobiálních látek lze jmenovat kolistin, novobiocin, linkomycin, pirlimycin a také kombinaci sulfonamid - trimetoprim (NOVOTNÁ et al., 2006; POKLUDOVÁ et al., 2007).

Aplikace ATB v době zaprahování může eliminovat až 80 % existujících infekcí a může být i významným preventivním opatřením nových infekcí získaných v období stání na sucho. Avšak terapeutická hladina ATB v mléčné žláze nepřetrvává po celé období stání na sucho (KRATOCHVÍL, 2006).

Způsob zaprahování se dle SEYDLOVÉ (2011) liší:

- pokud během laktace nebyly zaznamenány žádné problémy se zdravotním stavem mléčné žlázy a počet somatických buněk (PSB) dosahoval hodnot do 200 tisíc v 1 ml mléka, pak lze podle SEYDLOVÉ (2011) volit neantibiotický způsob zaprahování;
- pokud jsou hodnoty PSB vyšší než 200 tisíc v 1 ml, ale bez klinického nálezu mastitidy, je vhodné aplikovat do jednotlivých struků ATB určené k zaprahování, dle citlivosti na patogeny a doplnit jej strukovou zátkou neantibiotického prostředku;
- pokud je zjištěna aktuálně mastitida, je nutné se pokusit ji přeléčit ATB určenými na léčbu v laktaci a poté dojnici zaprahnout ATB na zaprahování a aplikovat neantibiotický prostředek.

U přípravků určených pro období zaprahování jsou účinné látky zaměřené spíše na G+ bakterie, s prodlouženou dobou udržení účinné koncentrace (a také delší ochranné lhůty). Nejčastěji používanými jsou přípravky obsahující kloxacilin. Jak POKLUDOVA et al. (2007) uvádějí, jsou tyto přípravky obvykle aplikovány pouze jednorázově, přičemž v porovnání s přípravky indikovanými v laktaci je obsah účinné látky relativně vyšší.

2.1.3 Faktory ovlivňující hladinu RIL v mléce

Hladiny reziduí veterinárních léčiv jsou ovlivněny farmakokinetikou v organismu zvířete - absorpcí, distribucí ve tkáních, metabolismem a vylučováním léčiva. Stupeň absorpce léčiva závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech podávané látky (elektrolytické vlastnosti, lipofilita) a na způsobu podání (VELÍŠEK A HAJŠLOVÁ, 2009).

Kontaminanty se do těla dostávají krevním oběhem a poté cestou v důsledku galaktopoézy do mléka (SEYDLOVÁ, 1998). I po ukončení medikace jsou rezidua léčiv ještě po určitou dobu mlékem vylučována. Délku vylučování léčiva mlékem ovlivňuje druh a rozsah patologických procesů, způsob aplikace léčiva, frekvence vydojování a rychlost restitučních procesů. HAUBERT et al. (1991) upozorňují rovněž na vliv koncentrace účinné látky, způsobu dávkování, místa a četnosti aplikace a vliv stanovené ochranné lhůty (OL). Nejvyšší koncentrace ATB se nachází v mléce po intramamární nebo intracisternální aplikaci léčiv.

Je třeba si uvědomit, že OL léčiv jsou stanovovány u zdravých zvířat, ovšem farmakokinetika u zvířat nemocných může být změněná. HAUBERT et al. (1991) poukazují na přítomnost RIL v mléce i po ukončení OL léčiva, a to zejména při opakované intramamární aplikaci ATB nebo při aplikaci vyšších dávek léčiva než je doporučeno. Významnou roli při intramamární aplikaci hraje míra poškození tkáně. Bylo zjištěno, že s mírou narušení tkáně stoupá pravděpodobnost dlouhodobějšího záchytu RIL v mléce, dokonce i po skončení OL.

Antimikrobiální látky zastoupené v intramamárních přípravcích se liší spektrem účinnosti, ale také farmakokinetickými vlastnostmi (ROURKE A BAGGOT, 2004). Intramamární preparáty, které se užívají v době laktace, obsahují takové složení látek, které způsobuje rychlé uvolnění antimikrobiální substance a její rychlý zásah v místě infekce, což závisí mimo jiné na chemické charakteristice přítomných látek a především na schopnosti distribuce do postižené tkáně. Obvykle jsou v těchto přípravcích zastoupeny vodorozpustné soli antimikrobiálních látek s nízkým stupněm vazby na mléko a bílkoviny tkání mléčné žlázy (POKLUDOVÁ et al., 2007).

Farmakokinetické chování přípravku má vliv nejen na rychlou distribuci, ale odráží se také v rychlosti eliminace reziduí, což se finálně projevuje také v délce OL (POKLUDOVÁ et al., 2007). S farmakokinetikou souvisí také distribuce intramamárně podávaných ATB. Dobrou distribucí se vyznačují amoxicilin, ampicilin, cefalexin, novobiocin, rifaximin, pirlimycin a z kombinací amoxicilin + klavulanát a kombinace sulfametoxazol + trimetoprim; středně dobrá distribuce je charakteristická pro penicilin, kloxacilin, cefapirin, cefacetril, cefquinom a tetracykliny a slabá distribuce je popisována u dihydrostreptomycinu, gentamicinu, neomycinu a polymyxinů (ROURKE A BAGGOT, 2004).

Množství reziduí v mléce rovněž závisí na rozpustnosti ATB v tukách. ATB s vyšší schopností rozpouštět se v tucích jsou z mléčné žlázy rychleji vyloučena, a to nejspíš vlivem tkáňové absorpce (NOVOTNÁ et al., 2006).

GRIEGER A HOLEC (1990) uvádějí skutečnost, že v důsledku tepelného ošetření mléka může dojít k částečné inaktivaci ATB. Například LOKSUWAN (2002) zjišťoval působení dlouhodobé pasterace (63 °C, 30 minut) na rezidua tetracyklinů v mléce. Rezidua oxytetracyklinu byla významně redukována až o 79 - 87 %, zatímco rezidua tetracyklinu byla inaktivována v rozmezí 23 - 55 %. U chlortetracyklinu došlo po tepelném ošetření mléka pouze k 3,7 - 9,5 % degradaci. Dle SHALAKA et al. (2009) závisí kvantitativní obsah tetracyklinů v mléce rovněž na počtu aplikací přípravku a také může být ovlivněn užitkovým typem skotu.

2.2 RIZIKA SPOJENÁ S VÝSKYTEM RIL V MLÉCE A JEJICH PREVENCE

Výskyt RIL a rizika s tímto spojená lze posuzovat z různých hledisek. Sledování přítomnosti RIL v mléce má význam především z hygienického a technologického pohledu. Podle NAVRÁTILOVÉ (2011) jsou hlavní důvody kontroly mléka na RIL především etické (zabránění nedobrovolné expozici konzumentů terapeutickým dávkám léčiv v potravinách), hygienické (ochrana před možnými škodlivými účinky reziduí na zdraví konzumenta), technologické (v mlékárenském průmyslu) a ekologické.

Mezi nejdůležitější cíle detekce výskytu RIL v mléce patří tedy především zajištění zdravotní nezávadnosti mléka, zajištění kvalitní suroviny pro mlékárenské zpracování a ochrana životního prostředí.

Prevence výskytu RIL závisí především na dodržování základních chovatelských a veterinárních opatření při používání léčiv a přípravků, dále na technologické kázní v prvovýrobě a pravidelné a striktní kontrole mléka týkající se přítomnosti RIL od prvovýroby až po zpracování a to využitím různých screeningových metod detekce. Dle HANUŠE (1994) spočívá prevence kontaminace mléka v prvovýrobě ve striktním oddělení mléka léčených dojnic po dobu trvání léčby a OL, v dodržování OL použitých léčiv, v kontrole mléka léčených dojnic na přítomnost RIL před zařazením do dodávky mlékárně a důsledné vyřazování mléka v pozitivním případě (existuje riziko přetrvání inhibice po ochranné lhůtě, zejména u metabolicky nevyrovnaných jedinců).

2.2.1 Technologická rizika

Nejčastější technologické problémy při zpracování mléka jsou zapříčiněny právě přítomností antimikrobiálních látek v syrovém mléce.

Bakteriostatické nebo baktericidní účinky inhibičních látek na mikroorganismy mlékařských kultur a zákysů se projevují narušením technologie výroby fermentovaných mléčných výrobků, tvarohů, sýrů, másla vyráběného ze zakysané smetany (HEESCHEN A BLÜTHGEN, 1991). Pokud je koncentrace antimikrobiální látky v mléce vyšší, než je MIC způsobující inhibici růstu specifického kmene mlékařské kultury, projeví se toto negativně v kvalitě finálního výrobku (GRIEGER A HOLEC, 1990). Citlivost mlékařských kultur k RIL závisí na druhu kultury, jejím složení a na druhu antimikrobiální látky (TAMIME A ROBINSON, 1999). Stanovené hladiny MRL u ATB jsou obecně nižší než hladiny, které způsobují inhibici růstu bakterií mléčného kvašení, bifidobakterií a propionových bakterií.

2.2.2 Zdravotní rizika

Rezidua ATB přítomná v surovinách živočišného původu mohou mít přímý toxický vliv na zdraví člověka. Z farmakologicko-toxikologických účinků jsou dále uváděny možné karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky. I velmi nízké koncentrace reziduí veterinárních léčiv mohou vyvolat u senzibilovaných osob alergickou reakci. Nejčastěji peniciliny, ale i např. sulfonamidy, neomycin, nitrofurany, erytromycin, spiramycin, novobiocin, tetracykliny jsou za určitých podmínek schopné vyvolat alergickou reakci (BOTSOGLOU A FLETOURIS, 2001).

Mezi hlavní hygienická rizika spojená s výskytem RIL patří riziko vzniku a šíření bakteriální rezistence, negativní vliv na střevní mikroflóru, alergické reakce a toxické účinky (NAVRÁTILOVÁ, 2012). Příjem reziduí veterinárního léčiva s účinnou látkou antimikrobiální povahy může dle NOVOTNÉ et al. (2006) představovat dvojí riziko pro lidské zdraví. Je to jednak narušení kolonizace normální intestinální mikroflóry a dále možné zvýšení populace rezistentních bakterií buď v důsledku získání rezistence dříve citlivých kmenů, nebo relativním zvýšením podílu méně citlivých mikroorganismů. Rezistentní mikroorganismy se mohou šířit a snižovat účinnost terapie ve veterinární i humánní medicíně. NAVRÁTILOVÁ (2011) rovněž upozorňuje na toto nebezpečí při opakovaném příjmu malých dávek léčiv.

Nejčastější cesty šíření rezistentních bakterií ze zvířat na člověka jsou následující - přímý kontakt se zvířaty, prostřednictvím potravního řetězce a přenos genů rezistence mezi jednotlivými druhy bakterií (BILLOVÁ et al., 2007).

2.3 LEGISLATIVNÍ OPATŘENÍ K VÝSKYTU RIL V MLÉCE

Zásady používání veterinárních léčivých přípravků (VLP) u zvířat určených k produkci potravin podléhají v zemích EU přísným pravidlům, které jsou ustanoveny legislativními předpisy. Problematiku MRL v potravinách řeší tato dvě Nařízení:

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 ze dne 6. května 2009, kterým se stanoví postupy Společenství pro stanovení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu.

Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle MRL v potravinách živočišného původu. Farmakologicky účinné látky jsou uvedeny v jediné příloze, kde jsou vytvořeny dvě tabulky:

1. látky povolené (antibiotika, sulfonamidy, ostatní veterinární léčiva - MRL stanoven, farmakologicky účinné látky - MRL nestanoven);

2. látky zakázané (podražec a výrobky z něj, kolchicin, chloramfenikol, chlorpromazin, dapson, dimetridazol, metronidazol, nitrofurany včetně furazolidonu a ronidazol).

Obě nařízení jsou závazná v celém rozsahu a přímo použitelná ve všech členských zemích a zároveň jsou nadřazená národní legislativě. Mezi legislativu, týkající se jakosti potravin včetně problematiky RIL, patří i tzv. hygienický balíček obsahující:

- *Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 852/2004*, o hygieně potravin;

- *Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 853/2004*, kterým se stanoví specifické hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu;

- *Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 854/2004*, kterým se stanoví specifická pravidla pro organizaci úředních kontrol výrobků živočišného původu určených pro lidskou spotřebu;

- *Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 882/2004*, o úředních kontrolách za účelem ověřování, zda se dodržují právní předpisy o krmivech a potravinách a ustanovení o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat;

- *Směrnici Evropského parlamentu a Rady č. 2004/41/EHS*, která ruší směrnice týkající se hygieny potravin a zdravotní nezávadnosti pro produkci a uvádění do oběhu potravin živočišného původu určených pro lidskou spotřebu a pozměňuje Směrnici Rady č. 89/662/EHS a 91/67/EHS a rozhodnutí Rady č. 92/118/EHS.

Další související legislativa provádějící předpisy:

Zákon č. 166/1999 Sb. ze dne 13. července 1999 o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), úplné znění - *Zákon č. 332/2008 Sb.*

Vyhláška č. 291/2003 Sb., o zákazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí, a o sledování (monitoringu) přítomnosti nepovolených látek, reziduí a látek kontaminujících, pro něž by živočišné produkty mohly být škodlivé pro zdraví lidí, u zvířat a v jejich produktech, ve znění pozdějších předpisů (poslední aktualizace Vyhláškou č. 129/2009 Sb.).

Vyhláška 289/2007 Sb., o veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky

V oboru mlékařství je také zachována soustava národních norem (ČSN), které jsou doporučující, platné, ale nezávazné. Dle ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování (1993): „*stanovení reziduí látek inhibujících růst mlékárenských kultur musí být negativní*”.

2.3.1 Maximální reziduální limity

Maximálním reziduálním limitem se rozumí maximální koncentrace reziduí farmakologicky účinných látek, jež může být povolena v potravinách živočišného původu. Mezi tato rezidua patří všechny farmakologicky účinné látky vyjádřené v mg/kg nebo µg/kg živé tkáně, ať už účinné složky, pomocné látky nebo produkty rozkladu a jejich metabolity, které zůstávají v potravinách získaných ze zvířat. Při překročení MRL již potraviny nebo suroviny nejsou považovány za zdravotně nezávadné (NAVRÁTILOVÁ, 2011).

Ke všem farmakologicky účinným látkám, určeným k použití v EU ve veterinárních léčivých přípravcích podávaným zvířatům určeným k produkci potravin, musí být vydáno stanovisko Evropské agentury pro léčivé přípravky (EMA), týkající se MRL a vypracované Komisí pro veterinární léčivé přípravky (NAVRÁTILOVÁ, 2012). Stanovisko agentury vychází z vědeckého hodnocení rizika, kdy je posuzován druh a množství reziduí, jež se považují za bezpečné pro lidské zdraví a následně rizika toxikologických, farmakologických a mikrobiologických účinků u člověka (HERA et al., 2012).

Vědecké hodnocení rizika zvažuje metabolismus a vylučování farmakologicky účinných látek u příslušných druhů zvířat a druh reziduí a jejich množství, jaké může člověk v průběhu života přijmout bez jakéhokoli citelného zdravotního rizika, vyjádřené jako akceptovatelný denní příjem (ADI - Acceptable Daily Intake). MRL jsou stanoveny tak, aby celkové množství reziduí denně konzumovaných v potravinách nepřesáhlo ADI (NAVRÁTILOVÁ, 2013). Dle NOVOTNÉ et al. (2006) je hlavní farmakologický účinek v případě antimikrobiálních látek zaměřen proti bakteriím, a proto je MRL založeno na akceptovatelném denním příjmu. ADI představuje maximální množství reziduí, které může být denně přijímáno v potravě člověka bez zdravého rizika. Hodnoty ADI jsou vyjadřovány obvykle v mg příslušné látky na kg tělesné hmotnosti na den.

2.3.2 Ochranné lhůty léčiv

Podle Zákona č. 166/1999 Sb. (veterinární zákon) zvířata, kterým byly podány doplňkové látky, léčivé přípravky a další přípravky zanechávající nežádoucí rezidua v živočišných produktech, mohou být využívána k získávání nebo výrobě produktů určených k výživě lidí až po uplynutí ochranné lhůty stanovené výrobcem nebo příslušným orgánem.

Ochranná lhůta (OL) je definována jako předem stanovená doba od ukončení aplikace veterinárního léčiva, po kterou nesmí být získané potraviny a suroviny živočišného původu použity k výživě lidí tak, aby v těchto nebyl překročen MRL dle platné legislativy.

Pro minimalizaci nebo eliminaci rizik spojených s RIL je nutné pro každé veterinární léčivo stanovit správnou OL. Délka OL může být od několika dnů až po několik týdnů (VELÍŠEK A HAJŠLOVÁ, 2009). OL je specifická pro jednotlivé přípravky, zatímco MRL je hodnota specifická pro účinnou látku (BILLOVÁ et al., 2007).

Ochranná lhůta je stanovována pro každý VLP obsahující např. ATB a musí být dodržována v souladu s platnými právními předpisy. Stanovení OL je výsledkem odborného hodnocení daného VLP, který musí být před uvedením na trh v rámci ČR registrován v Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv v Brně (HERA et al., 2012). OL se zavádí pro danou lékovou formu, druh zvířete a surovinu. Je třeba zdůraznit, že přesně stanovená OL se řídí nejen typem antimikrobiální látky, eventuelně kombinacemi antimikrobiálních látek v přípravku, ale závisí také na přesném složení přípravku a jeho farmakokinetických a farmakodynamických vlastnostech (NOVOTNÁ et al., 2006).

Pokud není u příslušného léčiva pro daný druh nebo kategorii zvířat OL stanovena, stanoví veterinární lékař nejméně standardní OL - pro mléko platí 7 dnů (NAVRÁTILOVÁ, 2011). OL u přípravků podávaných dojnícím musí být specifikována jak pro maso (včetně vnitřností), tak pro mléko (POKLUDOVÁ et al., 2007). U přípravků indikovaných v době zaprahování je OL specifikována ve vztahu k délce zaprahování a termínu otelení. Dostupné registrované intramamární přípravky indikované v laktaci mají OL kratší v porovnání s přípravky aplikovanými v době zaprahování. OL se u těchto přípravků pohybuje v rozmezí 3-10 dojení (NOVOTNÁ et al., 2006).

Studie perzistence ATB v organismu krav po léčbě mastitid doložily, že v 15 - 30 % případů dochází k překročení OL o 1 až 7 dnů. Toto zjištění platí jak pro ATB v laktaci, tak pro dlouze působící ATB při terapii během zaprahování (DOLEŽAL et al., 2000).

2.4 METODY DETEKCE RIL V MLÉCE

System stanovení RIL v mléce lze rozdělit do dvou na sobě závislých kroků:

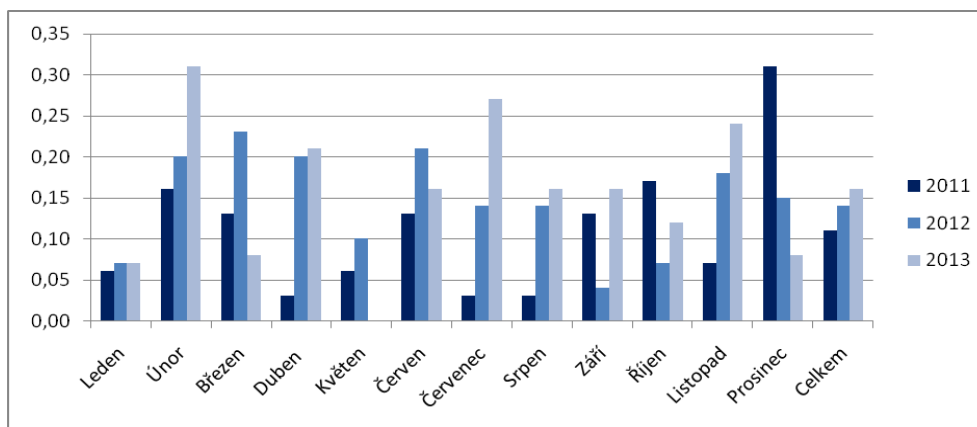
1. plošné monitorování - používají se testy umožňující rychlé stanovení přítomnosti IL. Tento požadavek splňují komerčně vyráběné screeningové testy (selektivní a širokospektrální rychlotesty). Přítomnost RIL lze prokázat i mikrobiologickými plotnovými metodami;
2. cílené vyšetřování - používají se metody na identifikaci a confirmaci inhibiční látky (zjištění konkrétního druhu a koncentrace léčiva - např. fyzikálně chemické metody, ELISA metody).

JEŘÁBKOVÁ (2012), NAVRÁTILOVÁ (2011) poukazují na porovnání citlivostí jednotlivých testů a doporučují kombinovat různé metody detekce: mikrobiologické metody, identifikační fyzikálně-chemické metody a jejich vzájemné kombinace. Pozitivní výsledky screeningových testů na přítomnost RIL dle HERY et al. (2012) ještě neznamenají, že rezidua antimikrobiálních látek jsou v množství překračující stanovené MRL, vždy by mělo následovat vyšetření vzorku přesnou instrumentální technikou (konfirmační analýza).

V ČR i ostatních zemích mezi nejčastěji detekovaná rezidua v mléce patří beta-laktamová ATB (COLAK, 2007). Podle NAVRÁTILOVÉ et al. (2008) by plošné monitorování nemělo být zaměřeno jen na beta-laktamová ATB, ale i na skupinu tetracyklinových ATB.

V ČR se procento pozitivních vzorků na přítomnost RIL v letech 2002-2010 pohybovalo mezi 0 - 0,53 %. Měsíční porovnání výskytu RIL zjištěných v laboratoři Českomoravského svazu chovatelů (ČMSCH) v letech 2011-2013 uvádí obr. 2. (<http://www.cmsch.cz/store/prehledy-vysledku-za-rok-2013.pdf>; staženo 2013-02-02)

Obrázek 2. Procentuální podíl RIL pozitivních vzorků (KOPUNECZ, 2013)



2.4.1 Screeningové selektivní rychlotesty

Použití screeningových metod je rozšířené zejména v prvovýrobě a v mlékárnách. V prvovýrobě mléka může veterinární lékař nebo zootechnik testem prováděným přímo u lčené dojnice zkontrolovat hladinu přítomnosti reziduí léčiva v mléce po ukončení OL a tím zabránit případnému znehodnocení celé dodávky mléka. V příjmových laboratořích mlékáren je těmito metodami prvotně kontrolována surovina pro výrobu, především vyšetřením cisternových vzorků.

Selektivní rychlotesty umožňují detekci beta-laktamových ATB spolu s cefalosporiny, tetracyklinů a aminoglykosidů, tylosinu, sulfonamidů, chinolonů a chloramfenikolu. Jedná se o receptorovou nebo enzymatickou analýzu. Jak uvádí JEŘÁBKOVÁ (2013), některé tyto testy detekují pouze jednu skupinu ATB, některé umožňují detekci dvou skupin najednou (např. Twinsensor BT, Charm ROSA Test), nebo detekují i tři až čtyři skupiny léčiv současně. Výhodou těchto testů je jednoduchost a rychlost stanovení RIL. Jedná se však pouze o kvalitativní průkaz přítomnosti RIL na hladině použitého testu (JEŘÁBKOVÁ, 2012).

2.4.2 Screeningové širokospektrální rychlotesty

U širokospektrálních testů je spojen princip agarové difuze se změnou barvy indikátoru v důsledku změny pH půdy způsobené růstem testovacího kmene (JEŘÁBKOVÁ, 2012). Tyto mikrobiologické inhibiční metody využívají standardní kulturu testačního mikroorganismu, nejčastěji *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, v pevném nebo tuhém médiu (NAVRÁTILOVÁ, 2008).

Mezi nejčastěji používané širokospektrální rychlotesty patří dle JEŘÁBKOVÉ (2013) Eclipse 50, Delvotest® SP-NT, Kalidos MP, TB test. Výhodou těchto metod je široké detekční spektrum, jednoduchost, nízká nákladnost, možnost vyšetření více vzorků najednou. Nevýhodou je nemožnost identifikace ATB a dlouhá inkubační doba. Jsou vysoce citlivé vůči beta-laktamovým ATB, především vůči penicilinu, cefalosporinům, sulfonamidům, tetracyklinům, méně citlivé k ostatním antimikrobiálním látkám jako jsou aminoglykosidy nebo makrolidy. JEŘÁBKOVÁ (2013) dále upozorňuje na to, že i u těchto testů se jedná pouze o kvalitativní průkaz přítomnosti /nepřítomnosti IL na hladině citlivosti použitého testu. Použití širokospektrálních testů je rozšířeno v prvovýrobě, v centrálních laboratořích, Státních veterinárních ústavech a zpracovatelských závodech (kontrola bazénových vzorků dodavatelů, kontrola negativy finálních mlékárenských výrobků, potvrzení pozitivních výsledků rychlotestů používaných v příjmových laboratořích).

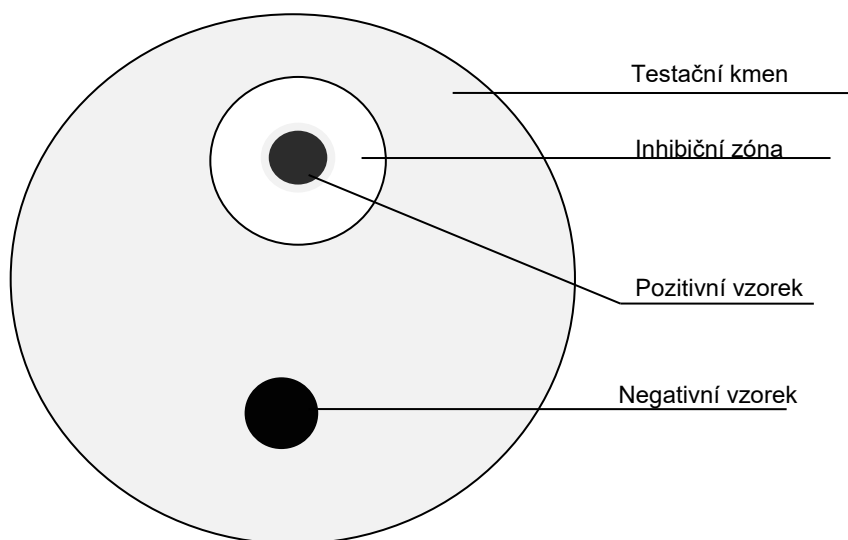
2.4.3 Screeningové mikrobiologické plotnové metody

Standardizované plotnové metody detekují antibakteriální látky za použití citlivých bakteriálních kmenů. Plotnové metody umožňují skupinovou identifikaci inhibiční látky, provádí se jako agar difuzní test. Vzorky se umístí na plotnu s půdou inokulovanou testovacím kmenem. Difuze antibakteriální látky se projeví formou tvorby zón inhibice růstu testovacího kmene, jak je znázorněno na obr. 3. Podle velikosti inhibiční zóny je možný i odhad přibližné koncentrace RIL (tabulka 2).

Tabulka 2. Plotnové metody - metoda čtyř ploten (č. 1-4), metoda šesti ploten (č. 1-6)

Plotna	Použitý kmen	Detekce	Inkubace	Vyhodnocení inhibiční zóny
č. 1.	<i>Bacillus subtilis</i>	tetracykliny	30 °C 18-24 h	negativní <2mm pozitivní ≥ 2mm
č. 2.	<i>Bacillus subtilis</i>	aminoglykosidy	30 °C 18-24 h	negativní <2mm pozitivní ≥ 2mm
č. 3.	<i>Kocuria rhizophila</i>	makrolidy beta-laktamy	37 °C 18-24 h	negativní <2mm pozitivní ≥ 2mm
č. 4.	<i>Bacillus subtilis</i>	sulfonamidy	30 °C 18-24 h	negativní <2mm pozitivní ≥ 2mm
č. 5.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> v.c. 953	beta-laktamy aminoglykosidy	64 °C 5 h	negativní <1mm pozitivní ≥ 1mm
č. 6.	<i>Escherichia coli</i>	chinolony	37 °C 18-24 h	negativní <2mm pozitivní ≥ 2mm

Obrázek 3. Schéma plotnové metody



2.4.4 Fyzikálně-chemické a imunoenzymatické metody

Na screeningové metody navazují metody fyzikálně-chemické a imunoenzymatické. Předpokládaná oblast použití je dohledávání druhu inhibiční látky jako druhý krok po plošném monitorování. Umožňují identifikaci hledané látky a její částečnou nebo exaktní kvantifikaci (JEŘÁBKOVÁ, 2012).

Fyzikálně chemické metody

- Gelová elektroforéza (ELFO) s mikrobiální detekcí - umožňuje identifikaci IL i semikvantitativní stanovení této látky;
- Radioimunolanalýza (RIA) - CHARM II. - rychlý semikvantitativní testovací systém. Pracuje na principu RIA metody, využívá se efektu vazby detekované látky a látky značené radioizotopy ^{14}C nebo ^3H na vazebný receptor nebo specifickou protilátku. Analyzátozem Charm II. se stanovují beta-laktamová ATB spolu s cefalosporiny, tetracyklinová ATB, kloxacilin, oxacilin, gentamycin + neomycin, erytromycin a tylosin, sulfonamidy, streptomycin a chloramfenikol;
- Chromatografické metody - konfirmační stanovení RIL se provádí metodami kapalinové (LC) a plynové chromatografie (GC). Nejvíce používanou metodou na konfirmaci a kvantifikaci IL je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS/MS). Tuto metodu lze použít jako screeningovou, umožňuje identifikaci širokého spektra léčiv v jedné analýze. Metoda je hlavně používána k cílenému stanovení léčiva a jeho následné kvantifikaci (JEŘÁBKOVÁ, 2012).

ELISA metody

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je imunochemická metoda sloužící v analýze potravin k rozpoznání přítomnosti antigenu (analytu) ve vzorku prostřednictvím jeho biospecifické interakce s protilátkou. K detekci veterinárních léčiv se používají komerční kompetitivní ELISA testy (JEŘÁBKOVÁ, 2013). Metoda umožňuje kvalitativní i kvantitativní stanovení IL (dle použitého testu), využívá se ke stanovení streptomycinu, neomycinu, gentamycinu, tetracyklinu, chinolonů, sulfonamidů, chloramfenikolu, penicilinu. Výsledky jsou odečítány pomocí speciálního spektrofotometru (JEŘÁBKOVÁ, 2011). ELISA metody se používají zejména na stanovení streptomycinu při monitoringu cizorodých látek, neboť ten na úrovni MRL není detekovatelný předchozími screeningovými metodami. Dále jsou tyto metody používány při stanovení chloramfenikolu, který rovněž není na hladině $< 0,1$ ppb detekovatelný předchozími screeningovými metodami (JEŘÁBKOVÁ, 2011).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo sledování přítomnosti reziduí inhibičních látek (RIL) v mléce dojnic léčených vybranými skupinami antibiotik a porovnání alespoň tří metod detekce RIL, včetně posouzení jejich výhod a nevýhod.

3.2 METODIKA EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

V období od října 2012 do října 2013 byla sledována přítomnost RIL v mléce dojnic léčených (n = 82), příp. zaprahovaných pomocí ATB (n = 26). V různých časových intervalech po aplikaci léčiva bylo od těchto dojnic získáno celkem 161 vzorků, které byly odebírány vždy z ranního nádoje, a to v šesti chovech - tabulka 3. Data byla utříděna do dvou souborů, přičemž druhý soubor zohlednil kombinovanou léčbu dojnic, kdy byly použity dva VLP.

Tabulka 3. Rozdělení a počty vzorků podle chovů a indikace použití léčiva

	Mastitis	Zaprahování	Ostatní léčba	Celkový počet vzorků podle:			
				skupiny léčiv		léčiva	
Doba po aplikaci léčiva	1 - 16	21 - 98	1 - 11				
				n	%	n	%
Chov I.	42	0	0	42	26	62	32
Chov II.	40	25	4	69	43	71	37
Chov III.	20	0	5	25	16	34	18
Soukromé chovy	13	12	0	25	16	25	13
Celkem	115	37	9	161	100	192	100

Pro každý vzorek byly sledovány následující ukazatele:

- místo odběru (3 velkokapacitní kravíny, 3 soukromě hospodařící zemědělci);
- skupina použitého VLP (tetracykliny, beta-laktamy, cefalosporiny, sulfonamidy, kombinace);

- použité VLP (18 přípravků: ENGEMYCIN, ALAMYCIN, TETRA DELTA, ORBENIN DC, KLOXERATE, SHOTAPEN, NOROBITIN, NOROCILIN, NOROCLAV, SYNULOX LC, AMPICLOX, DRYCLOXA-KEL, MASTIPLAN, COBACTAN, CEFTIOCYL, NOROSTREP, DUOFAST);
- indikace (léčba - mastitis, léčba - ostatní, zaprahování);
- doba po aplikaci léčiva (1. - 5. den; 6. - 10. den; 11. - 16. den; 21. - 46. den; 47. - 71. den; 72. den a více)
- doba ochranné lhůty (stanovení RIL před a po skončení OL)
- detekce přítomnosti RIL (0 - negativní; 1 - pozitivní)
- obsah tuku a bílkovin, PSB (tabulka 8)

3.3 ANALÝZA VZORKŮ

Vzorky byly analyzovány v Centrální laboratoři MADETA a.s., která je akreditována pro chemické analýzy a mikrobiologické zkoušky mléka dle ČSN EN ISO/IEC 17025 : 2005.

3.3.1 Stanovení RIL

Stanovení RIL se provádí podle platných standardních operačních postupů (SOP) zpracovaných dle návodu výrobce testů. Přítomnost RIL byla analyzována pomocí třech různých screeningových metod, a to selektivním receptorovým testem TWINSENSOR BT 020 (SOP 02, 2011) a širokospektrálními testy ECLIPSE 50 (SOP 03, 2012) a DELVOTEST SP-NT (SOP 08, 2012) založenými na mikrobiologickém principu.

Uvedené testy mají odlišné citlivosti pro jednotlivé účinné látky - léčiva obsažená ve VLP. Porovnání hodnot MRL (Nařízení č. 470/2009) a citlivostí použitých testů (dle výrobce) pro účinné látky, které se vyskytovaly v použitých VLP představuje tabulka 4.

Tabulka 4. Hodnoty MRL a porovnání citlivostí jednotlivých použitých testů (dle výrobce) na vybrané účinné látky (µg/kg)

	MRL	Twinsensor BT	Delvotest SP - NT	Eclipse 50
Penicilin	4	2 - 3	2 - 3	3 - 4
Ampicilin	4	3 - 5	6 - 7	4 - 5
Kloxacilin	30	6 - 8	20 - 30	35
Cefacetril	125	30 - 40		
Cefquinome	20	30 - 40		
Cefapirin	60	6 - 8	6-8	8
Oxytetracyklin	100	50 - 60	800	100
Neomycin	1500		300 - 600	1500

3.3.1.1 Twinsensor BT

Tabulka 5. Selektivní rychlotesty - Twinsensor BT

TWINSENSOR BT	
CHARAKTERISTIKA	Test ve formátu ponorného proužku pro selektivní detekci ATB, umožňuje současnou detekci ATB beta-laktamových spolu s cefalosporiny a tetracyklinová ATB.
PRINCIP	Receptorová analýza. Test se skládá ze dvou prvků. 1. mikrojamka obsahující přesné množství obou receptorů a protilátek vázaných na částice zlata, 2. ponorný proužek vytvořený z membrán, tvořících testovací linky umístěné z obou stran kontrolní Twinsensor BT linky. Linka zachytávající peniciliny se nachází pod kontrolní linkou, zatímco linka specifická pro tetracykliny nad kontrolní linkou.
DOBA STANOVENÍ	6 minut
VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKU	1. vizuální - kvalitativní (ANO-NE), porovnáváním poměru zabarvení kontrolní a testovací linky. 2. semikvantitativní - pomocí čtecího zařízení ReadSensor.
TYPY TESTU	<i>BT 020</i> - detekce tetracyklinových ATB - 100 µg/kg (100 ppb) <i>BT 034</i> - detekce tetracyklinových ATB - 10 µg/kg (10 ppb)

ATB - antibiotika

Obrázek 4. Twinsensor BT s příslušenstvím - inkubační jednotka (vlevo), tiskárna s klávesnicí, ReadSensor



Pracovní postup:

1. Vzorek mléka o obsahu 200 μ l se napipetuje do mikrojamky testu, promíchá s obsahem jamky a následně inkubuje po dobu 3 minut při 40 °C.
2. Po zaznění signálu inkubátoru se do každé jamky ponoří testovací proužek a vzorek se opět nechá inkubovat 3 minuty při 40 °C. Testovaný vzorek začne vzlínat po proužku přes záchytné zóny. Jestliže je vzorek prostý ATB, objeví se barevné linky v daných zónách, které indikují nepřítomnost daného analytu ve vzorku mléka. Opačně, jestliže jsou ve vzorku přítomna ATB, neobjeví se v daných záchytných zónách barevné linky.
3. Po skončení inkubace se vyhodnotí barevná intenzita linek vizuálně nebo pomocí ReadSensoru.

Vizuální vyhodnocení výsledků:

1. Nejprve je nutno zkontrolovat, zda je přítomna prostřední kontrolní linka. Jestliže není, test je považován za neplatný a nevyhodnocuje se.
2. Jestliže je prostřední linka přítomna, vyhodnocují se další dvě linky.
3. Hodnotí se nejprve jedna linka (např. spodní beta-laktamová) a porovná se s kontrolní prostřední linkou:
 - Je-li testovací linka výraznější než kontrolní linka, je mléko **NEGATIVNÍ** pro dané ATB. Tzn., že v rámci citlivosti dané testem, obsahuje vzorek mléka méně ATB než je hranice citlivosti testu udávaná výrobcem.

- Je-li testovací linka stejně nebo méně výrazná než kontrolní linka, vzorek mléka je POZITIVNÍ. Tzn., že v rámci citlivosti dané testem, obsahuje vzorek mléka stejně nebo více ATB než je hranice citlivosti testu udávaná výrobcem.
4. Tento postup vyhodnocení se provede i pro druhou linku (např. horní linku tetracyklinů). Vyhodnocení by mělo být provedeno do 15 minut od dokončení testu.

3.3.1.2 Delvotest SP-NT

Tabulka 6. Širokospektrální rychlotesty - DELVOTEST SP-NT

DELVOTEST SP-NT	
CHARAKTERISTIKA	Standardní difuzní test umožňuje detekci širokého spektra ATB, sulfonamidů i dezinfekčních látek.
PRINCIP	Agarové živné médium (umístěné v ampulích či mikrotitračních destičkách) obsahuje přesně definované množství spor mikroorganismů <i>Bacillus stearothermophilus</i> v. c. C953, který je velice citlivý na RIL. V případě negativního vzorku se uvedený kmen během inkubace pomnožuje, produkuje kyseliny, mění se pH média, což způsobuje změnu zabarvení média.
DOBA STANOVENÍ	3 hodiny - nekonzervované vzorky při 64 °C. 3,5 hodiny u konzervovaných (např. Heschenovým činidlem).
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	Pozitivní - médium zůstává fialové až modrofialové. Negativní - barva média se mění na žlutou.
TYPY TESTU	DELVOTEST SP-NT 5 PACK - mikrotitrační destičky DELVOTEST SP-NT ampule

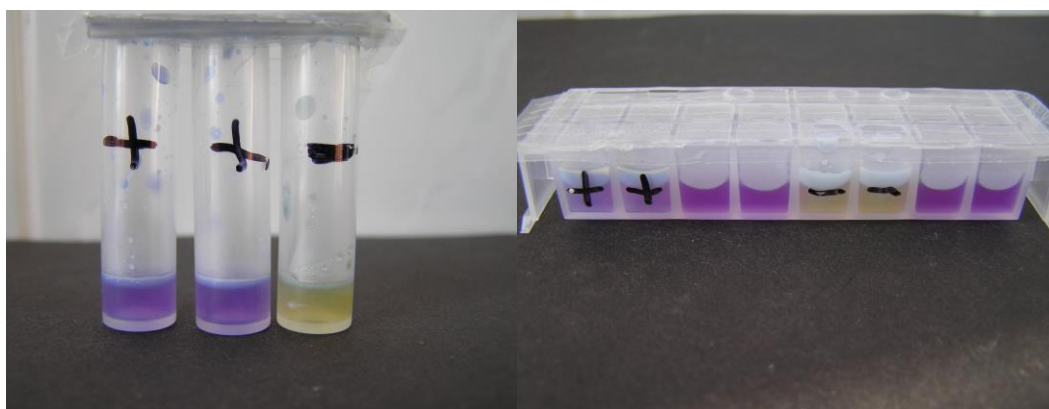
ATB - antibiotika; RIL - rezidua inhibičních látek

Pracovní postup:

1. Z mikrodestičky se nejprve odstraní hliníková folie, chránící médium před vyschnutím.
2. Jako kontrolní test se napipetuje do 1 mikrojamky 0,1 ml obnoveného sušeného mléka, které neobsahuje antibakteriální rezidua (1 g sušeného mléka rozpustí v 9 ml destilované vody).
3. Do dalších mikrojamek se napipetuje vždy 0,1 ml testovaného vzorku mléka. Pro každý vzorek je nutné použít vždy čistou pipetu.

4. Destička se důkladně přelepí proužky samolepicí pásky a vloží se vrchem nahoru do termostatu s teplotou $64 \pm 0,5$ °C.
5. Inkubace probíhá 3 hodiny a je ukončena při změně barvy mikrojamky s kontrolním negativním vzorkem. Test se při hodnocení obrátí dnem vzhůru a výsledky se vyhodnocují dle barevné stupnice.
 - ŽLUTÉ zbarvení - výsledek NEGATIVNÍ - nejsou přítomna ATB nad stanovený limit.
 - FIALOVÉ zbarvení - výsledek POZITIVNÍ přítomnost antibiotik, jejichž koncentrace překračuje stanovený limit. ŽLUTÁ / FIALOVÁ barva ukazuje přítomnost ATB v koncentraci ležící okolo uváděného limitu.

Obrázek 5. Delvotest ampule a mikrodestička, pozitivní (+) a negativní (-) vzorek



3.3.1.3 Eclipse 50

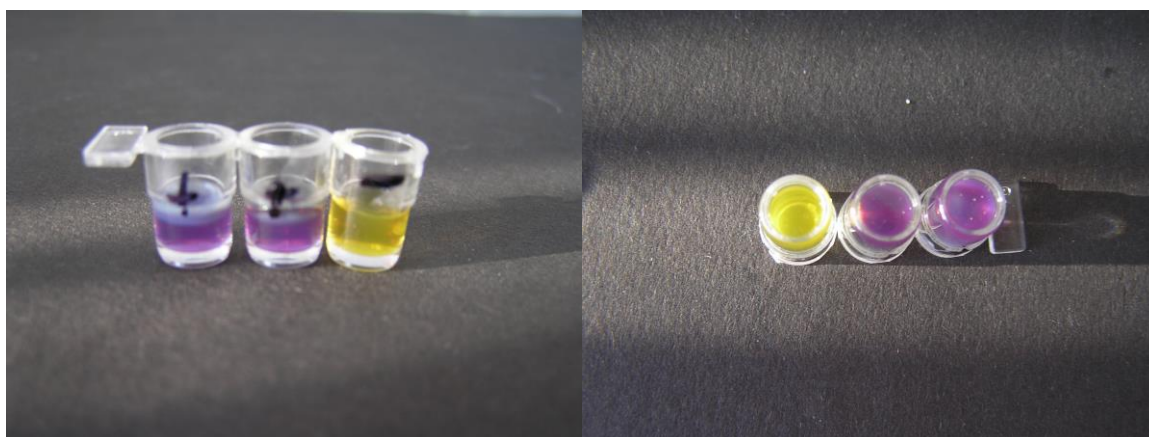
Tabulka 7. Širokospektrální rychlotesty - ECLIPSE 50

ECLIPSE 50	
CHARAKTERISTIKA	Standardní difuzní test, umožňuje detekci širokého spektra antibiotik a sulfonamidů.
PRINCIP	Spočívá v inhibici mikrobiálního růstu a agarové difuze spojené se změnou barvy indikátoru v důsledku změny pH agaru, způsobené růstem testačního kmene (<i>Bacillus stearothermophilus</i>).
DOBA STANOVENÍ	2,15-2,45 hodiny při 64 °C.
VYHODNOCENÍ VÝSLEDKU	Pozitivní - agar barvu nemění, zůstává modrofialová. Negativní - změna barvy agaru z modrofialové na žlutavou.
TYPY TESTU	ECLIPSE 50 ECLIPSE 100

Pracovní postup:

1. Nejprve se oddělí požadované množství mikrojamek a odstraní se ochranná folie.
2. Do mikrojamek se napipetuje 50 μ l vzorku mléka a negativní a pozitivní kontrolní vzorek mléka.
3. Mikrojamky se důkladně zalepí adhezivní fólií a poté se inkubují při 65 °C. Inkubace je ukončena, jakmile se změní barva negativní kontroly na žlutou (přibližně 2.15 až 2.45 hod). Jako referenční slouží inkubační časy uvedené v certifikátu produktu.
4. Po změně barvy negativní kontroly na žlutou, se otočí destička dnem nahoru a odstraní se zbytek vzorku. Jamky se mohou promýt destilovanou vodou a následně vyprázdnit otočením destičky dnem nahoru, jemným poklepáním či adsorpčním papírem.
5. Odečtení výsledku je shodné s testem DELVOTEST SP-NT.
 - NEGATIVNÍ kontrola - při vyhodnocení musí být medium zcela žluté.
 - POZITIVNÍ kontrola - pomocí kontrolního pozitivního testu nebo s obnoveným sušeným mlékem, které obsahuje inhibiční látky.

Obrázek 6. Eclipse 50, mikrodestička, pozitivní (+) a negativní (-) vzorek



3.3.2 Stanovení tuku, bílkovin a PSB

Stanovení základních složek mléka podléhá normě ČSN 57 0536, stanovení PSB normě ČSN EN ISO 13 366-3. Vzorky pro stanovení základních složek mléka (tuk a bílkoviny) a PSB byly analyzovány na přístroji COMBIFOSS FT 6000, který je tvořen propojením přístrojů Milcoscan 6000 FT a Fossomatic 5000. Analýza vzorků mléka na infračerveném absorpčním analyzátoru Milcoscan 6000 FT je založena na FTIR technologii, přístroj Fossomatic 5000 je založen na principu průtokové cytometrie.

Základní statistické charakteristiky pro obsah tuku a bílkovin a PSB u vzorků odebraných v rámci této diplomové práce v jednotlivých chovech jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8. Stanovení počtu somatických buněk (PSB), obsahu tuku a bílkovin u sledovaných vzorků

	n	PSB (tis./1 ml)		Tuk (%)		Bílkoviny (%)	
		$\bar{x} \pm s_x$	min. - max.	$\bar{x} \pm s_x$	min. - max.	$\bar{x} \pm s_x$	min. - max.
Chov I.	42	382 ± 475	38 - 2315	3,07 ± 1,65	0,48 - 7,56	3,48 ± 0,37	2,77 - 4,32
Chov II.	69	1715 ± 2427	44 - 10580	4,34 ± 1,55	1,42 - 9,02	3,92 ± 1,23	2,29 - 10,45
Chov III.	25	2749 ± 4692	27 - 19193	3,49 ± 1,35	1,96 - 7,71	4,11 ± 1,03	2,89 - 6,27
Soukromé chovy	25	1949 ± 4437	12 - 22000	2,69 ± 1,66	0,85 - 6,32	3,64 ± 0,68	1,54 - 5,26
Celkem	161	1564 ± 3072	12 - 22000	3,62 ± 1,69	0,48 - 9,02	3,79 ± 0,98	1,54 - 10,45

\bar{x} / průměrná hodnota

s_x / směrodatná odchylka

3.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Při statistickém zpracování dat byly využity programy Microsoft Excel a Statistica Cz 6.0 (Statsoft ČR). V programu Microsoft Excel byla získaná data utříděna podle skupin VLP (n = 161) a podle jednotlivých VLP (n = 192) do dvou souborů.

V programu Statistica 6.0 byly u vybraných proměnných vypočítány základní statistické charakteristiky, příp. byly použity kontingenční tabulky (kvalitativní proměnné).

K ověření statistické průkaznosti závislosti kvalitativních proměnných v rámci kontingenčních tabulek (nezávislé vzorky) byl zvolen chí-kvadrát test (χ^2). Pro posouzení rozdílů mezi jednotlivými metodami detekce RIL (závislé vzorky) byla využita neparametrická Friedmanova ANOVA a Wilcoxonův párový test.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Požadavek rychlého stanovení RIL v mlékárenské praxi a prvovýrobě nejlépe splňují komerčně vyráběné screeningové rychlotesty. V současné době existuje poměrně široká nabídka screeningových selektivních rychlotestů, umožňujících detekci beta-laktamových ATB spolu s cefalosporiny, tetracyklinových ATB, aminoglykosidových ATB, tylosinu, sulfonamidů, chinolonů a chloramfenikolu. Některé testy detekují jen jednu skupinu ATB, jiné dvě a více skupin. Širokospektrální rychlotesty detekují široké spektrum veterinárních léčiv, u některých testů je uváděna i citlivost k dezinfekčním prostředkům (HANUŠ et al., 2012).

V této diplomové práci byly sledovány výsledky testů detekce RIL ze tří metod (selektivní rychlotest TWINSENSOR BT, širokospektrální rychlotesty DELVOTEST® SP-NT a ECLIPSE 50) v závislosti na použitém VLP, skupině léčiva, indikaci a časovém intervalu od aplikace léčiva.

Výše uvedené širokospektrální rychlotesty jsou schválené k detekci RIL v mléce a uvedené v Seznamu veterinárních přípravků schválených dle Zákona č. 166/1999 Sb. o veterinární péči. Rozhodnutí o schválení vydal Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv Brno (JEŘÁBKOVÁ, 2013).

4.1 VÝSLEDKY TESTŮ DETEKCE RIL V ZÁVISLOSTI NA DRUHU LÉČIVA

4.1.1 Vliv skupiny léčiva na výsledky testů detekce RIL

Použitý druh léčiva je bezesporu jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujícím výsledky testů, které mají různé limity detekce na jednotlivá léčiva i celé skupiny ATB. Jak uvádí JEŘÁBKOVÁ (2012), z porovnání citlivostí jednotlivých testů jednoznačně vyplývá, že žádný test nedetekuje rezidua všech ATB s vyhovující citlivostí vzhledem k MRL, a proto je třeba používat více testů a metod a jejich vzájemné kombinace. U většiny širokospektrálních testů je však citlivost pro nejvíce používaná léčiva vzhledem k MRL vyhovující.

V rámci experimentální části této diplomové práce bylo odebráno a testováno celkem 161 vzorků mléka, které pocházely od dojnic léčených, případně zaprahovaných pomocí 18 VLP. Tabulka 9 a graf 1 znázorňují zastoupení jednotlivých skupin léčiv v použitých VLP u těchto 161 vzorků, v grafu 1 jsou navíc shrnuty počty vzorků pocházející z kombinované léčby, tj. léčby, kdy byly použity dvě skupiny VLP.

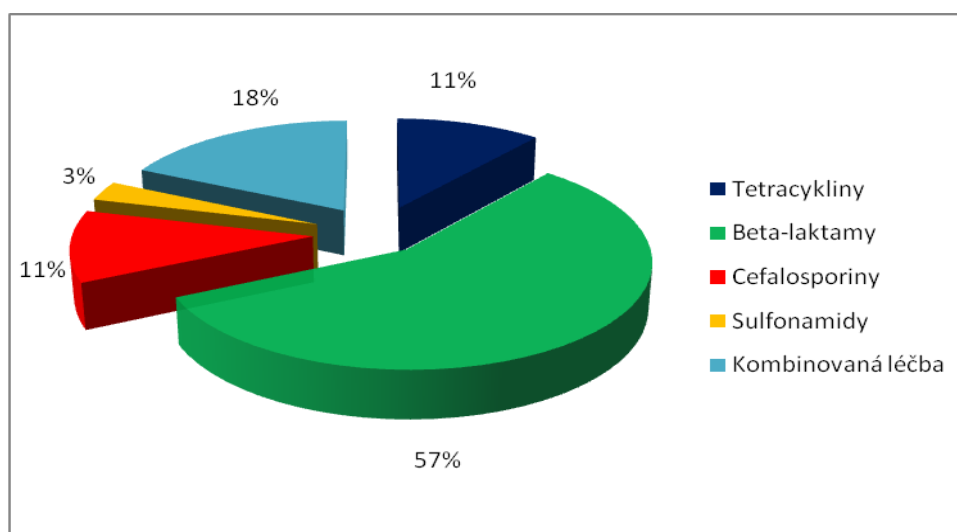
Tabulka 9. Četnost použití jednotlivých skupin léčiv v testovaných vzorcích

Skupina léčiv	Absolutní četnost	Relativní četnost %
Tetracykliny	18	11
Beta-laktamy	92	57
Cefalosporiny	17	11
Sulfonamidy	5	3
Beta-laktamy + tetracykliny	11	7
Beta-laktamy + cefalosporiny	6	4
Beta-laktamy + aminoglykosidy	1	1
Tetracykliny + cefalosporiny	11	7
Celkem	161	100

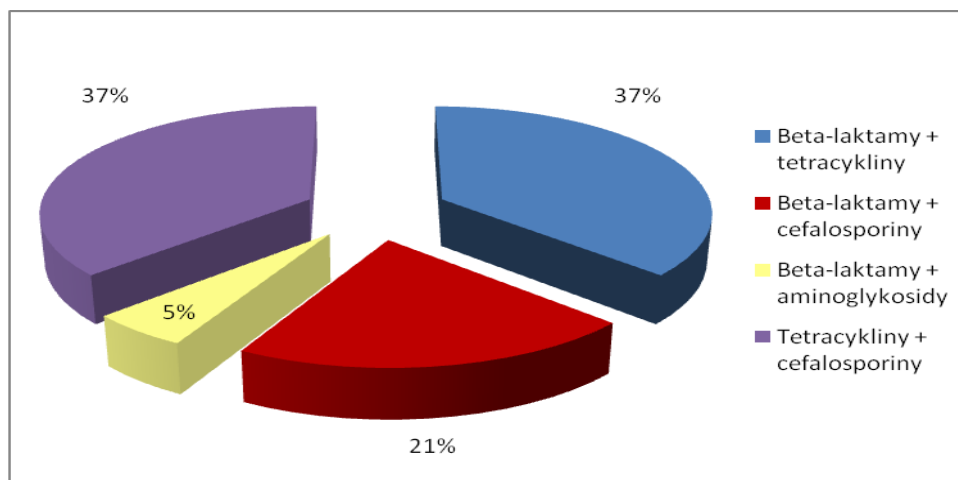
Z tabulky 9 i grafu 1 je patrné, že nejčastěji využívanými VLP byla beta-laktamová ATB, a to u 92 vzorků (57 %), dále tetracykliny - 18 vzorků (11 %) a cefalosporiny - 17 vzorků (11 %).

V případech akutních mastitid se často přistupuje k léčbě kombinované (NOVOTNÁ et al., 2006). Ve vzorcích testovaných po kombinované léčbě (společná aplikace intramamárních a parenterálních léčiv), kterých bylo testováno celkem 29 (18 % z celkového počtu aplikací), se nejčastěji objevila kombinace beta-laktamy + tetracykliny a tetracykliny + cefalosporiny. Obě skupiny tvořily shodně 37 % z celkového počtu vzorků po kombinované léčbě (graf 2).

Graf 1. Četnost a zastoupení skupin léčiv v testovaných vzorcích



Graf 2. Četnost a zastoupení skupin léčiv v testovaných vzorcích při aplikaci kombinované léčby



Použití určité skupiny léčiv při léčbě dojnic závisí především na indikaci (léčba mastitid v laktaci či v době zaprahování, popř. jiného onemocnění bakteriálního původu), původci onemocnění, způsobu chovu a bohužel také pravděpodobně na rutinní praxi jednotlivých chovatelů a veterinářů. Např. ZELINKOVÁ (2012) upozorňuje na úspěšnost léčby chronicky infikovaných dojnic v období zaprahování, oproti léčbě těchto dojnic v období laktace, kdy by tato léčba měla být založena na kombinaci intramamární a celkové terapie.

Porovnání jednotlivých skupin léčiv na výsledky testů detekce RIL znázorňuje tabulka 10, graf 3 pak prezentuje pouze pozitivní výsledky detekce přítomnosti RIL. Z porovnání je patrné, že zatímco detekce RIL v případě Twinsensoru BT je statisticky významně závislá na použité skupině ATB ($p = 0,0039$), v případě testů Delvotest SP-NT a Eclipse 50 tomu tak není. Z výsledků také jednoznačně vyplývá, že nejvyšší citlivost u všech skupin léčiv má Twinsensor BT. V porovnání s tímto testem se jeví zbývající dva testy jako méně citlivé.

V případě testu Twinsensor BT bylo tedy v mléce dojnic léčených ATB ze skupiny tetracyklinů zjištěno 67 % pozitivních vzorků, u dojnic léčených beta-laktamovými ATB 50 % a dojnic léčených cefalosporiny 47 % pozitivních vzorků.

Detekce RIL u obou širokospektrálních testů (Delvotest SP-NT, Eclipse 50) byla v případě tetracyklinových ATB shodná (22 %), ovšem u beta-laktamových ATB a cefalosporinů byl testem Eclipse 50 detekován vyšší počet pozitivních vzorků (29 %, resp. 41 %) než Delvotestem SP-NT (16 %, resp. 24 %).

Ze skupiny sulfonamidů (celkem 5 vzorků) nebyl vyhodnocen pozitivní vzorek u žádného ze tří testů.

U vzorků mléka od dojníc po kombinované léčbě byl pozitivní výsledek přítomnosti RIL zaznamenán nejčastěji Twinsensorem BT (23 vzorků; tj. 79 %), dále pak Delvotestem SP-NT (9 vzorků; 31 %) a testem Eclipse (11 vzorků; 38 %). Vzhledem k tomu, že testem Twinsensor BT byl z celkového počtu 23 pozitivních vzorků označen jako „tetracyklin pozitivní“ pouze jeden vzorek, ostatní vzorky (22) byly „beta-laktam pozitivní“ (data v tabulce neuvedena). Z toho lze usoudit, že po i.m. aplikaci tetracyklinů zůstávají rezidua léčiv v mléce kratší dobu, než po i.mam. aplikaci beta-laktamových ATB.

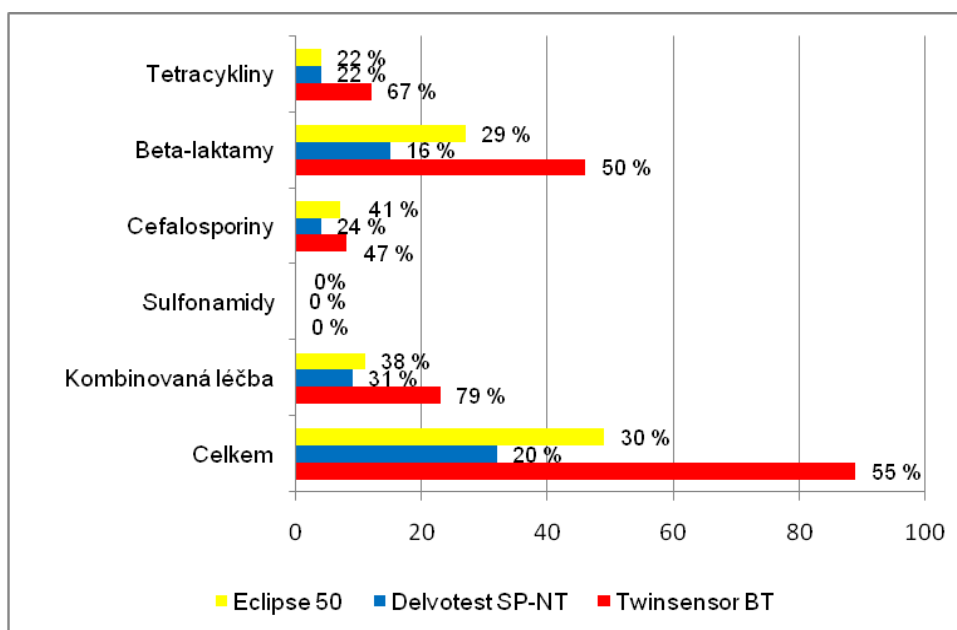
Tabulka 10. Vliv skupiny léčiva na výsledky testů detekce RIL

	Výsledky	Twinsensor BT		Delvotest SP-NT		Eclipse 50	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
Tetracykliny	+	12	67	4	22	4	22
	-	6	33	14	78	14	78
Beta-laktamy	+	46	50	15	16	27	29
	-	46	50	77	84	65	71
Cefalosporiny	+	8	47	4	24	7	41
	-	7	53	13	76	10	49
Sulfonamidy	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	100	5	100	5	100
Kombinovaná léčba	+	23	79	9	31	11	38
	-	6	21	20	69	18	62
p			0,0039		0,3486		0,3415

+ / pozitivní výsledek RIL

- / negativní výsledek RIL

Graf 3. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na skupině léčiva



Rozdíly vyplývají již ze vzájemného srovnání hranic citlivostí jednotlivých testů uváděných výrobcí testů (kapitola 3.3.1, tabulka 4), přičemž u žádného z testů není citlivost na všechna nejčastěji používaná ATB na hranici MRL požadovaného EU. U většiny beta-laktamových ATB jsou limity detekce všech tří použitých testů srovnatelné a odpovídající MRL. U ATB ze skupiny cefalosporinů jsou však mezi testy značné rozdíly. Twinsensor BT má limity detekce oproti limitům MRL podstatně nižší, u Delvotestu SP-NT udává výrobce limit jen pro Ceftiofur a Cefapirin, a to na hranici MRL, Eclipse 50 má dle výrobce limity detekce u sledovaných cefalosporinů na hranici MRL.

Tetracykliny na hranici MRL detekuje pouze Eclipse 50, částečně pak Twinsensor BT, u Delvotestu SP-NT naopak limity detekce požadavkům EU nevyhovují. Vzhledem k tomu, že si výrobce byl této skutečnosti vědom, byl registrován v roce 2013 Delvotest T, u kterého jsou limity detekce vyhovující i pro tuto skupinu léčiv.

Tyto úvahy potvrzuje i následující tabulka 11, kde je uvedeno statistické vyhodnocení jednotlivých použitých testů v souvislosti s detekcí RIL. Vzhledem k nízkému počtu vzorků nejsou uvedeny výsledky statistického porovnání ze vzorků mléka dojníc léčených sulfonamidy.

Tabulka 11. Statistické vyhodnocení vlivu jednotlivých použitých testů na detekci RIL

	p	Twinsensor BT vs. Delvotest SP-NT	Twinsensor BT vs. Eclipse 50	Eclipse 50 vs. Delvotest SP-NT
Tetracykliny	0,0016	0,0117	0,0117	0,6171
Beta-laktamy	<0,001	<0,001	0,0003	0,0047
Cefalosporiny	0,1146	0,0679	0,6858	0,1088
Kombinovaná léčba	<0,001	0,0009	0,0047	0,1797

Vliv použitého testu na detekci RIL v případě tetracyklinových ATB byl statisticky vysoce významný ($p = 0,0016$), přičemž statisticky významné rozdíly byly zjištěny především při porovnávání výsledků Twinsensoru BT a Delvotestu SP-NT, resp. testu Eclipse 50 (shodně $p = 0,0117$). Statisticky významné rozdíly mezi Delvotestem SP-NT a testem Eclipse 50 zjištěny nebyly ($p = 0,6171$).

V případě beta-laktamových ATB byly ve sledovaném souboru zjištěny statisticky významné rozdíly nejen mezi Twinsensorem BT a Delvotestem SP-NT ($p < 0,001$), resp. testem Eclipse 50 ($p = 0,0003$), ale také mezi testy Eclipse 50 a Delvotest SP-NT ($p = 0,0047$). Naopak v detekci RIL v případě cefalosporinů statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými testy zjištěny nebyly. V případě kombinované léčby byly výsledky statistického porovnávání obdobné jako u tetracyklinových ATB.

4.1.2 Vliv použitého VLP na výsledky testů detekce RIL

Výběr ATB pro účinnou léčbu závisí především na druhu onemocnění, jeho původci, celkovém zdravotním stavu zvířete, ale i na úrovni a způsobu veterinární péče v jednotlivých chovech. Nejčastěji používaným léčivem v testovaných vzorcích byl VLP TETRA DELTA (56), ENGEMYCIN (31), COBACTAN (16), což jsou léčiva určená pro léčbu mastitidy v době laktace a ORBENIN DC (25) a KLOXERATE (11) určené k léčbě mastitid v době zaprahování (tabulka 12). Jako účinná látka v těchto léčivech je uváděn novobiocin a neomycin (TETRA DELTA), oxytetracyklin (ENGEMYCIN, ALAMYCIN), cefquinomum (COBACTAN), kloxacilin (ORBENIN DC, KLOXERATE), ampicilin (KLOXERATE, NOROBITIN) a cefapirin (MASTIPLAN). Mezi testovanými vzorky byly dále zastoupeny cefacetil, rifaximin (CEFAXIMIN), ceftiofur (CEFTIOCYL), trimethoprim, sulfadiazin (DUOFAST), penicilin (NOROCILIN) a amoxicilin (NOROCLAV, SYNULOX).

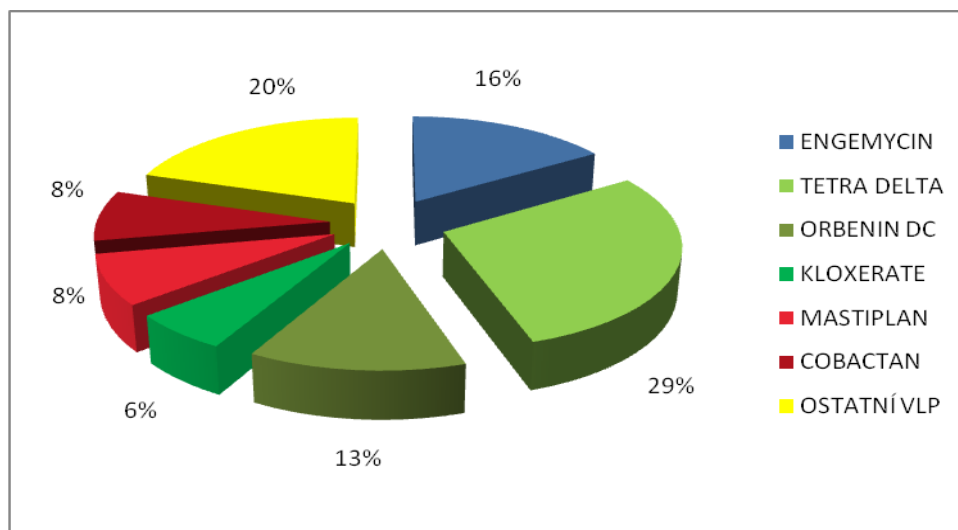
Tabulka 12. Četnost a zastoupení použitých veterinárních léčiv v testovaných vzorcích

Léčivo	Počet	Četnost ve skupině (%)	Celková četnost (%)
Tetracykliny			
ENGEMYCIN	31	78	16
ALAMYCIN	9	22	5
Beta-laktamy			
TETRA DELTA	56	50	29
ORBENIN DC	25	22	13
KLOXERATE	11	10	6
SHOTAPEN	3	3	2
NOROBRTIN	7	6	4
NOROCILIN	3	3	2
NOROCLAV	3	3	2
SYNULOX	2	2	1
AMPICLOX	1	1	1
DRYCLOXA-KEL	1	1	1
Cefalosporiny			
MASTIPLAN	15	44	8
COBACTAN	16	47	8
CEFAXIMIN	2	6	1
CEFTIOCYL	1	3	1
Aminoglykosidy			
NOROSTREP	1	100	1
Sulfonamidy			
DUOFAST	5	100	3

V případech akutních mastitid se často přistupuje k léčbě celkové i lokální (i. m. + i. mam.). Od takto léčených dojnic bylo testováno 29 vzorků, nejčastěji se jednalo o kombinaci beta-laktam (TETRA DELTA - i.mam.) + tetracyklin (ENGEMYCIN - i.m.) nebo tetracyklin (ENGEMYCIN - i.m.) + cefalosporin (COBACTAN, MASTIPLAN - i.mam.). Toto zjištění je zajímavé, vzhledem k nedoporučení vzájemné kombinace tetracyklinových léčiv spolu s beta-laktamy (POKLUDOVÁ et.al, 2007; NOVOTÁ et. al., 2006).

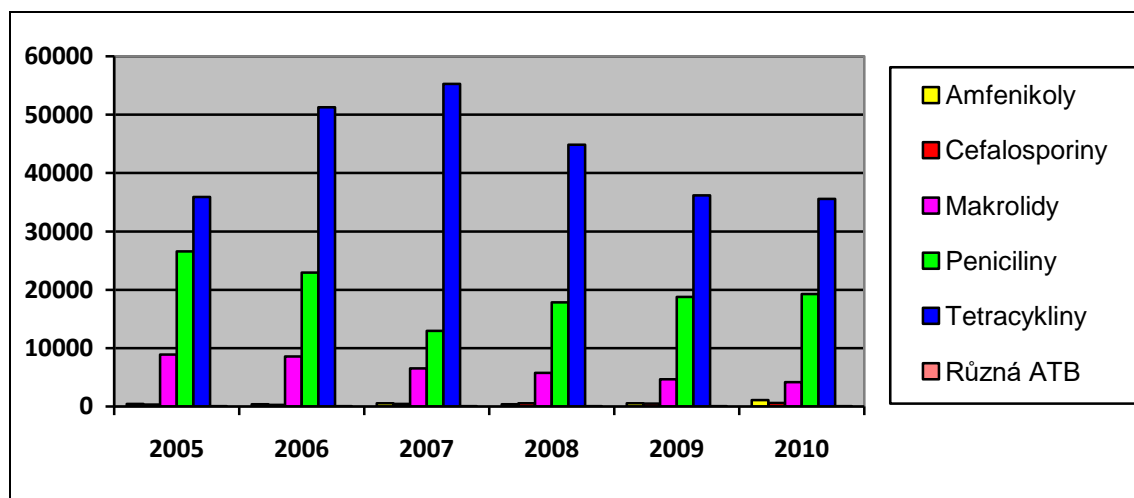
Z grafu 4 vyplývá, že k nejvíce používaným VLP ve sledovaných chovech dojnic patřil beta-laktamový přípravek TETRA DELTA, který byl využit celkem ve 29 % případů, a to aplikovaný samostatně nebo v různých kombinacích. Při zaprahování dojnic se často využívaly také beta-laktamové přípravky ORBENIN DC a KLOXERATE (13 %, resp. 6 %). Ve sledované době byla vysoká i spotřeba tetracyklinového přípravku ENGEMYCIN (16 %) a přípravků MASTIPLAN a COBACTAN ze skupiny cefalosporinů - shodně po 8 %.

Graf 4. Četnost a zastoupení nejčastěji používaných veterinárních léčiv v testovaných vzorcích



S výše uvedenými výsledky koresponduje do určité míry i vývoj používání ATB ve veterinární praxi v letech 2005 - 2010 znázorněný na obr. 7. Vývoj vypovídá o stálé oblibě penicilinů, klesající tendenci spotřeby tetracyklinových ATB a zvyšujícím se zájmu o cefalosporiny a amfenikoly. Jak upozorňuje NAVRÁTILOVÁ (2011), k tomuto trendu je třeba přihlídnout i při používání jednotlivých testů detekce RIL a pečlivě vybírat druh i citlivost jednotlivých rychlotestů.

Obrázek 7. Spotřeba ATB v kg, v letech 2005 - 2010 (NAVRÁTILOVÁ, 2011)



Rozdíly v detekci RIL mezi jednotlivými testy u nejčastěji použitých VLP u sledovaného souboru vzorků znázorňují tabulka 13 a graf 5. Pro sledovaná léčiva byla opět nejvyšší četnost pozitivních vzorků v případě testu Twinsensor BT a nejnižší u Delvotestu SP-NT. Podobně jako při vyhodnocení jednotlivých skupin léčiv na výsledky testů detekce RIL, je třeba i zde vzít do úvahy hranice detekce jednotlivých testů oproti požadavkům EU na MRL (kapitola 3.3.1, tabulka 4).

Tabulka 13. Vliv použitých veterinárních léčiv na výsledky testů detekce RIL

	Výsledek	Twinsensor BT		Delvotest SP-NT		Eclipse 50	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
ENGEMYCIN	+	23	74	6	19	7	23
	-	8	26	25	81	24	77
ALAMYCIN	+	8	89	3	33	3	33
	-	1	11	6	67	6	67
TETRA DELTA	+	27	48	10	18	12	21
	-	29	52	46	82	44	79
ORBENIN DC	+	14	56	4	16	9	36
	-	11	44	21	84	16	64
KLOXERATE	+	7	64	1	9	3	27
	-	4	36	10	91	8	73
SHOTAPEN	+	3	100	3	100	3	100
	-	0	0	0	0	0	0
NOROBRITIN	+	4	57	4	57	5	71
	-	3	43	3	43	2	29
NOROCILIN	+	2	67	0	0	2	67
	-	1	33	3	100	1	33
NOROCLAV	+	3	100	0	0	1	33
	-	0	0	3	100	2	67
SYNULOX LC	+	1	50	1	50	1	50
	-	1	50	1	50	1	50
AMPICLOX	+	0	0	0	0	0	0
	-	1	100	1	100	1	100
DRYCLOXA-KEL	+	0	0	0	0	0	0
	-	1	100	1	100	1	100
MASTIPLAN	+	11	73	4	27	5	33
	-	4	27	11	73	10	67
COBACTAN	+	9	56	6	37	8	50
	-	7	44	10	62	8	50
CEFAXIMIN	+	1	50	0	0	2	100
	-	1	50	2	100	0	0

pokračování Tabulky 13

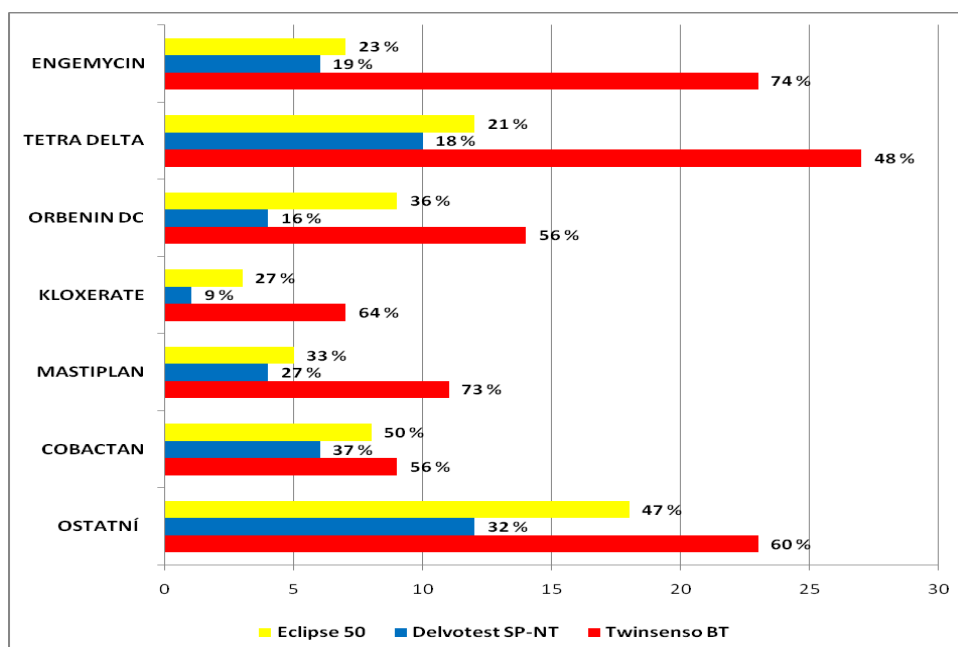
	Twinsensor BT			Delvotest SP-NT		Eclipse 50	
	Výsledek	Počet	%	Počet	%	Počet	%
CEFTIOCYL	+	0	0	0	0	0	0
	-	1	100	1	100	1	100
NOROSTREP	+	1	100	1	100	1	100
	-	0	0	0	0	0	0
DUOFAST	+	0	0	0	0	0	0
	-	5	100	5	100	5	100

+ / pozitivní výsledek RIL

- / negativní výsledek RIL

Jak vyplývá z tabulky 13 i grafu 5, výsledky testů Delvotest SP-NT a Eclipse 50 byly vzhledem k použitým léčivům velmi podobné, větší rozdíly byly ale zaznamenány oproti Twinsensoru BT. Především v případě tetracyklinových ATB (ALAMYCIN, ENGEMYCIN) má Twinsensor BT vyšší citlivost na oxytetracyklin zastoupený v těchto přípravcích. Např. v případě ENGEMYCINU bylo vzorků pozitivních na RIL stanoveno testem Twinsensor BT 74 %, Delvotestem SP-NT 19 % a testem Eclipse 50 23 %.

Graf 5. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na použitém veterinárním léčivu



U vzorků po léčbě TETRA DELTOU detekoval Twinsensor BT pozitivní výsledek u 48 % vzorků, Delvotest SP-NT pouze u 18 % a Eclipse 50 u 21 % vzorků. Rovněž v případě léčiva KLOXERATE PLUS DC byly rozdíly v % pozitivních výsledků mezi těmito testy obdobné. Twinsensor BT detekoval přítomnost RIL u 64 %, Delvotest SP-NT u 9 % a Eclipse 50 u 27 % vzorků. Větší rozdíly mezi výsledky jednotlivých testů byly zjištěny také u CEFAXIMINU (účinná látka cefacetril), patřící do skupiny cefalosporinů.

Účinná látka obsažená v každém ATB je při používání určitého testu (metody) rozhodující pro potvrzení či nepotvrzení přítomnosti RIL ve vzorcích mléka. BRETON et al. (2007) při porovnávání dvou testů založených na mikrobiologickém principu (Delvotest SP-NT a Copan Milk test) zjistili, že oba testy byly schopny odhalit penicilin, kloxacilin, sulfamethazine, sulfadiazine, cephalixin a gentamicin na hranici nebo pod hranicí MRL, zatímco oxytetracyklin, dihydrostreptomycin, trimethoprim a cefchinom zjištěny nebyly, nebo jen s nízkou citlivostí. Autoři nicméně tyto typy doporučují, neboť z hlediska evropských legislativních předpisů (MRL) jsou plně dostačující.

Posouzením citlivosti detekce mikrobiálních testů (Star - screeningový test s testovacím kmenem *Bacillus subtilis* BGA, Delvotest SP-NT, Kalidos TB a Kalidos MP s testem kmen *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) se zaměřením na aminoglykosidy (gentamicin, neomycin, streptomycin, kanamycin a spectinomycin) se zabývali také SÝKOROVÁ et al. (2012). Autoři zjistili, že Kalidos TB byl na většinu sledovaných účinných látek nejcitlivější.

TOUŠLOVÁ, DRAGOUNOVÁ (2004) sledovali RIL ve vzorcích mléka po léčbě sedmi VLP a zjistily nejvyšší procento pozitivních vzorků v mléce dojnic léčených NOVOCILLINEM (100 %), TYLOSINEM (60 %) a NOROSTREPEM (25 %).

4.2 VÝSLEDKY TESTŮ DETEKCE RIL V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ OD APLIKACE LÉČIVA

K dalším významným faktorům ovlivňujícím přítomnost RIL v mléce patří dodržování OL jednotlivých VLP. ATB jsou vylučována mlékem po určitou dobu od ukončení medikace. Krátce po aplikaci je koncentrace ATB v mléce nejvyšší a postupně se snižuje až do vymizení. Délku vylučování ovlivňuje druh a rozsah patologických procesů, způsob podání léčiva, frekvence vydojování a rychlost restitučních procesů (NAVRÁTILOVÁ, 2013). Podle SEYDLOVÉ (1998) sehrává velmi důležitou roli rovněž individualita dojnic.

Ochranná lhůta VLP v rámci diplomové práce ve sledovaném souboru se pohybovala od 0 do 46 dní (tabulka 14). U VLP použitých k léčbě dojníc v době laktace byla průměrná OL 4,2 dne s rozpětím od 0 (CEFTIOCYL) do 7 dní (ALAMYCIN). Nejčastěji se vyskytovala OL 4,5 dne, kterou má VLP TETRA DELTA. U VLP použitých při zaprahování dojníc byla nejčastější doba OL 46 dní zároveň nejvyšší hodnotou z důvodu širokého používání VLP ORBENIN DC, nejkratší 39 dní (DRYCLOXA-KEL).

S ukončením OL léčiva úzce souvisí také doba, která uplynula od aplikace léčiva ke dni, kdy byl vzorek odebrán. Tento ukazatel do určité míry vyjadřuje schopnost vylučování ATB z organismu dojnice.

Tabulka 14. Charakteristiky sledovaných vlivů (ochranná lhůta a doba od aplikace léčiva) - ve dnech

		x	s _x	minimum	maximum	modus
Ochranná lhůta	laktace	4,2	1,4	0	7	4,5
	zaprahování	45,5	1,2	39	46	46
Doba od aplikace	laktace	6,27	2,8	1	16	6
	zaprahování	61,8	19,2	21	98	51

x/ průměrná hodnota

s_x/ směrodatná odchylka

4.2.1 Vliv dodržení ochranné lhůty na výsledky testů detekce RIL

Vzorky mléka dojníc léčených ATB byly ke stanovení přítomnosti RIL odebrány nejen po skončení OL (n = 128), ale některé ještě před koncem OL (n = 33). Ještě před ukončením OL (v průměru 3 dny) nebyla v některých vzorcích zjištěna přítomnost RIL (tabulka 15). U nejcitlivějšího testu (Twinsensor BT) to bylo ve 30 % případů. Ve všech těchto případech se jednalo o i.mam. aplikaci VLP a s výjimkou dvou případů o VLP TETRA DELTA.

Tabulka 15. Vliv dodržení ochranné lhůty (OL) na výsledky testů detekce RIL

Odběr vzorků	Doba (dny)*	Výsledek	Twinsensor BT		Delvotest SP-NT		Eclipse 50	
			Počet	%	Počet	%	Počet	%
Před OL	-3,2	+	23	70	11	33	14	42
		-	10	30	22	67	19	58
Po OL	7,5	+	66	52	21	16	35	27
		-	62	48	107	84	93	73
p			0,0617		0,0298		0,0932	

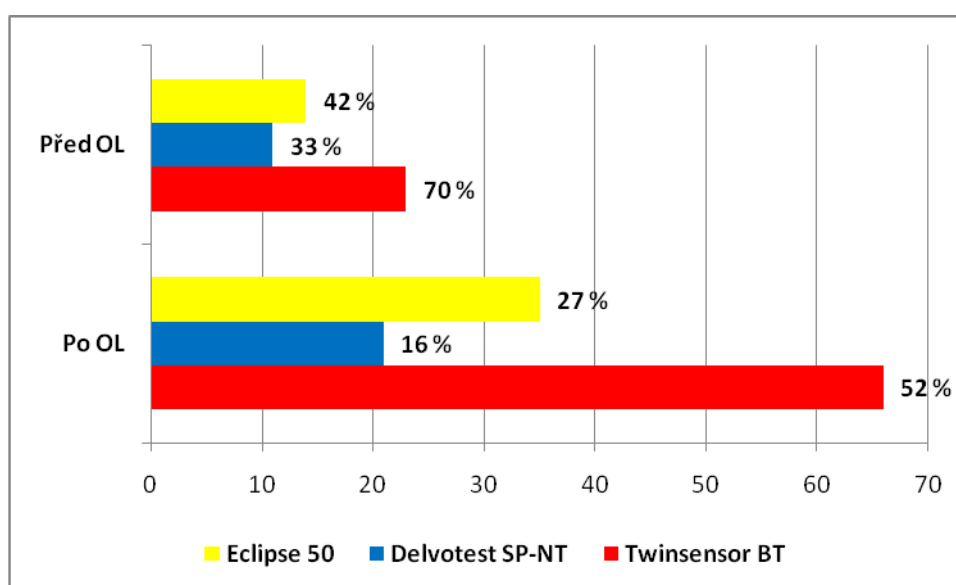
+ / pozitivní výsledek RIL

- / negativní výsledek RIL

* průměrný počet dní před/po OL léčiva ke dni odběru vzorků

Jak znázorňuje tabulka 15 a graf 6, po ukončení OL (v průměru 7,5 dne) byl počet negativních a pozitivních vzorků zjištěný Twinsensorem vyrovnaný (48 %, resp. 52 %), zatímco u Delvotestu SP-NT a testu Eclipse 50 počet negativních vzorků (84 % a 73 %) výrazně přesahoval počet vzorků pozitivních (16 % a 27 %). Z výsledků jasně vyplývá, že délka OL není v mnoha případech dostačující. Zejména testem Twinsensor BT byla detekována rezidua léčiv v téměř polovině vzorků a také druhé dva testy (Delvotest SP-NT, Eclipse 50) měly procento pozitivních výsledků vysoké.

Graf 6. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na dodržení ochranné lhůty



Na skutečnost prodlouženého vylučování RIL mlékem ještě po skončení OL upozorňují TOUŠLOVÁ, DRAGOUNOVÁ (2004), a to v souvislosti s onemocněním více čtvrtí mléčné žlázy nebo většího množství aplikovaných ATB. Při OL léčiv 6 dní bylo testem Delvotest SP zjištěno pozitivních vzorků 18 % (2 vzorky), při OL 7 dní 28 % (4 vzorky). Z celého souboru 25 testovaných vzorků byla v 6 případech OL nedostačující, z čehož vyplývá nutnost nejen dodržovat předepsané OL léčiv, ale i provádět pravidelná vyšetření na přítomnost RIL v mléce před jeho zařazením do dodávky.

Na druhé straně KNAPPSTEIN et al. (2004) sledovali přítomnost RIL v mléce dojnic v systémech automatizovaného dojení a zjistili, že u COBACTANU ® LC, léčivou s účinnou látkou cefchinom, nepřekročila doba vylučování stanovenou OL 5 dní.

4.2.2 Vliv doby od aplikace léčiva na výsledky testů detekce RIL

Pro posouzení významu tohoto vlivu byly sledovány zvláště dojnice léčené v době laktace (n = 124) a zvláště dojnice, kde byly VLP užity při zaprahování (n = 37). Vzorky byly utříděny do šesti skupin, podle počtu dnů uplynulých od aplikace ATB do odběru vzorků (tabulka 16).

Testy Delvotest SP-NT a Eclipse 50 byl zaznamenán podstatně nižší počet pozitivních výsledků RIL oproti negativním, a to ve všech skupinách vzorků, pouze u Twinsensoru BT byl počet negativních a pozitivních výsledků rozborů vyrovnaný, kromě skupiny vzorků odebíraných 11. - 16. den a skupiny 21. - 46. den po aplikaci.

Tabulka 16. Vliv doby po aplikaci léčiva na výsledky testů detekce RIL

Dny po aplikaci	Doba (dny)*	Výsledek	Twinsensor BT		Delvotest SP-NT		Eclipse 50	
			Počet	%	Počet	%	Počet	%
Období laktace								
1. - 5. den	4	+	28	52	13	24	19	35
		-	26	48	41	76	35	65
6. - 10. den	7	+	34	55	12	19	16	26
		-	28	45	50	81	46	74
11. - 16. den	13	+	6	75	2	25	2	25
		-	2	25	6	75	65	75
p			0,4706		0,8067		0,5199	
Období zaprahování								
21. - 46. den	39	+	8	89	3	33	5	56
		-	1	11	6	67	4	44
47. - 71. den	59	+	8	50	1	6	4	25
		-	8	50	15	94	12	75
od 72. dne	83	+	5	42	1	8	3	25
		-	7	58	11	92	9	75
p			0,0744		0,1338		0,2344	

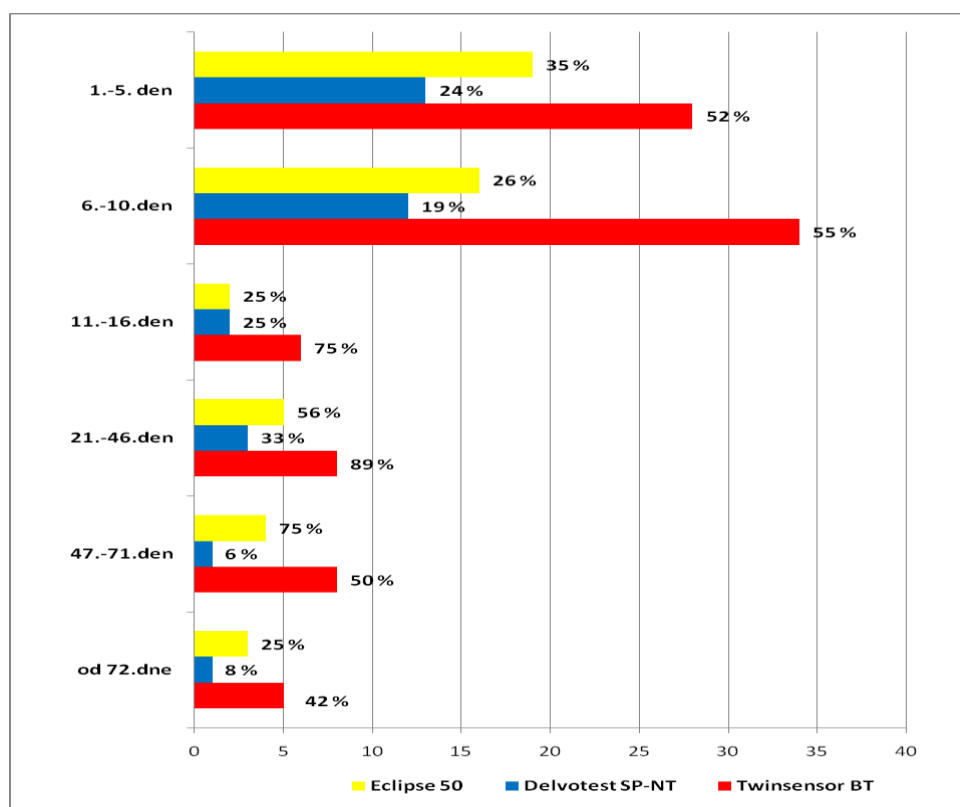
+ / pozitivní výsledek RIL

- / negativní výsledek RIL

* průměrný počet dní od aplikace léčiva ke dni odběru vzorků

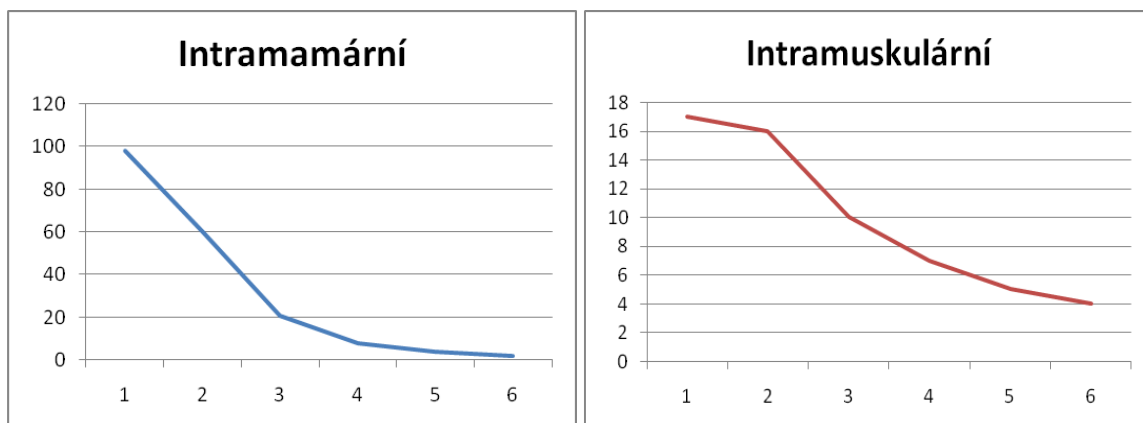
Z této tabulky a následujícího grafu 7 opět vyplývá vysoká citlivost testu Twinsensor BT. Ve všech skupinách vzorků byl nejvyšší počet pozitivních výsledků přítomnosti RIL zjištěn právě tímto testem. Při porovnávání výsledků testů v závislosti na době uplynulé od aplikace léčiva ve skupině dojnic léčených v době laktace bylo zjištěno, že Twinsensor BT se stejnou intenzitou detekoval RIL prvních pět dní po aplikaci léčiva (52 %), jako i 6. až 10. den po aplikaci (55 %). Na druhé straně Delvotest SP-NT i Eclipse 50 detekovaly s postupujícím časem RIL se snižující se intenzitou. Delvotest SP-NT 24 % a 19 % pozitivních vzorků, Eclipse 50 35 % a 26 % pozitivních vzorků.

Graf 7. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na době po aplikaci léčiva



Zajímavé sledování prováděli McEWEN et al. (1992), kteří stanovovali přítomnost RIL po skončení léčby vybranými ATB (beta-laktamů, cefalosporinů, tetracyklinů), a to pomocí BR testu a plotnové metody. Vzorky byly testovány v denních intervalech od 1. dne až po 6. den po ukončení léčby, přičemž procento pozitivních vzorků kleslo v rozmezí těchto dnů z 91,3 % na 6,5 %. Autoři dále sledovali přítomnost RIL v těchto vzorcích v závislosti na způsobu aplikace léčiva (graf 8 a graf 9).

Graf 8., 9. Počet pozitivních vzorků dle na způsobu aplikace v denních intervalech po skončení léčby



Zdroj dat (Mc EWEN et al., 1992), upraveno

Z těchto grafů je zřejmá klesající tendence počtu pozitivních vzorků, a to při nejčastěji používaných způsobech aplikace VLP v chovech dojnic. U VLP aplikovaných intramamárně cestou je rychlý pokles počtu pozitivních vzorků podstatně zřetelnější než u VLP aplikovaných intramuskulárně. U vzorků mléka po ukončení léčby intramamárně aplikovaných léčiv prokázali autoři pomocí BR testu prudký pokles počtu pozitivních vzorků od prvního do třetího dne z 98 vzorků (1. den), na 21 vzorků (3. den), oproti tomu u vzorků mléka po intramuskulární aplikaci VPL byl pokles počtu pozitivních vzorků pozvolnější (1. den - 17 vzorků; 3. den - 10 vzorků).

Snižující se frekvenci výskytu pozitivních vzorků potvrzuje i ANDREW et al. (2009). Autoři odebírali vzorky mléka od léčených prvotetek při 3., 6. a 10. dojení po porodu a stanovili počty pozitivních vzorků v těchto intervalech ve 28 %, 9 %, resp. 4 % případů.

ROOSTITA et al. (2012) sledovali přítomnost RIL ve vzorcích mléka s použitím testu Beta Star 25. Vzorky pozitivní na RIL (28 %) byly dále testovány plotnovou metodou a výsledky rovněž prokázaly klesající koncentraci reziduí ATB od 1. do 3. dne.

4.3 VÝSLEDKY TESTŮ DETEKCE RIL V ZÁVISLOSTI NA INDIKACI LÉČIVA

Přítomnost RIL v mléce ve vzorcích byla sledována u dojnic také v závislosti na indikaci léčiva. Soubor testovaných vzorků představovalo 115 vzorků dojnic, u kterých byla léčena mastitida v době laktace, 37 vzorků dojnic po zaprahování ATB a 9 vzorků dojnic po jiné léčbě (tympenie bachoru, léčba pohybového aparátu).

I když z četností pozitivních a negativních výsledků testů vyplývá opět výrazný rozdíl ve vyhodnocení RIL mezi jednotlivými testy, samotný vliv indikace byl vyhodnocen jako statisticky nevýznamný ($p = 0,9780$; $p = 0,3841$; $p = 0,9294$) - tabulka 17, graf 10.

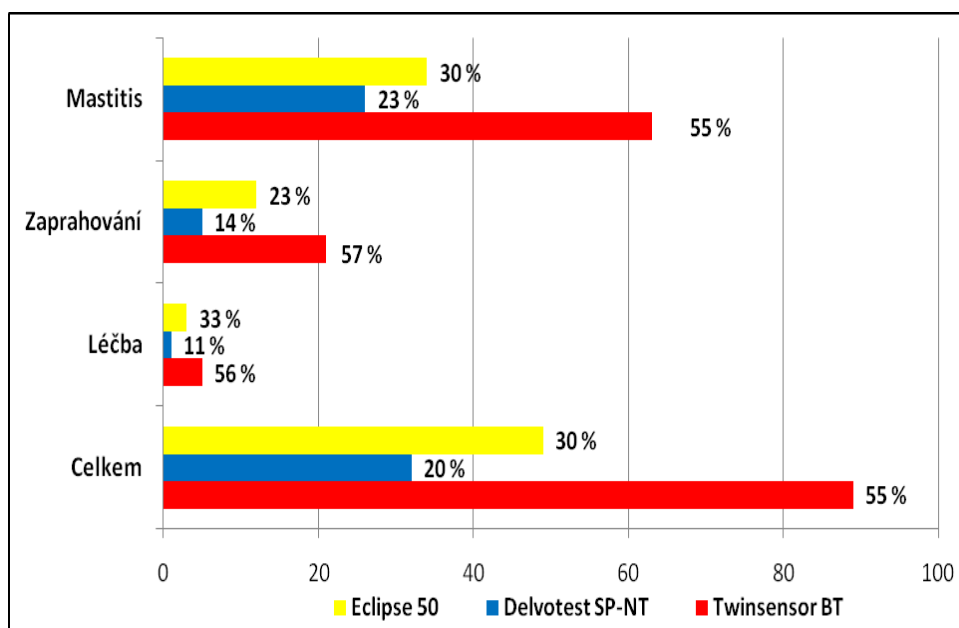
Tabulka 17. Vliv indikace léčby na výsledky testů detekce RIL

	Výsledek	Twinsensor BT		Delvotest SP-NT		Eclipse 50	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
Mastitis	+	63	55	26	23	34	30
	-	52	45	89	77	81	70
Zaprahování	+	21	57	5	14	12	32
	-	16	43	32	86	25	68
Léčba	+	5	56	1	11	3	33
	-	4	44	8	89	6	67
Celkem	+	89	55	32	20	49	30
	-	72	45	129	80	112	70
p		0,9780		0,3841		0,9294	

+ / pozitivní výsledek RIL

- / negativní výsledek RIL

Graf 10. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na indikaci léčby



Indikace léčiva v době laktace z důvodu léčby akutních mastitid patří k nejčastějším důvodům použití ATB v chovech dojnic. U chronicky infikovaných dojnic je léčba v laktaci většinou neúspěšná (ZELINKOVÁ, 2012). Ve vzorcích po léčbě mastitid v období laktace byly v této práci Twinsensorem BT zjištěny pozitivní výsledky RIL v 55 % vzorků, Delvotestem SP-NT ve 23 % a Eclipskem 50 ve 30 % testovaných vzorků.

Důvodem indikace léčiva dojnicím v době zaprahování je především léčba subklinických mastitid a prevence nových infekcí v nejrizikovějším období, což je zejména první a poslední čtvrtina období zaprahování (ZELINKOVÁ, 2012; KRATOCHVÍL, 2006). Jak uvádí KRATOCHVÍL (2006), antibiotická léčba se v tomto období stala běžnou praxí u velké části chovatelů. Používané intramamární přípravky obsahují kombinace a formy účinných a pomocných látek, které způsobují dlouhodobé pozvolné uvolňování účinné látky, a tím i terapeutické působení v průběhu doby stání na sucho (POKLUDOVA et al., 2007). Ve vzorcích s indikací léčby mastitid v období zaprahování detekoval v této diplomové práci Twinsensor BT přítomnost RIL v 57 %, Delvotest SP-NT v 14 % a Eclipse 50 ve 32 %.

Rozdíl mezi počtem pozitivních a negativních výsledků testů je podstatný u Delvotestu SP-NT a u testu Eclipse 50, u Twinsensoru BT je tento poměr vyrovnaný a je patrný mezi všemi sledovanými skupinami (mastitis, zaprahování, léčba).

Na přítomnost a koncentraci RIL v mléce má rovněž vliv také aplikace a způsob léčby. Jak uvádí NAVRÁTILOVÁ (2013), nejvyšší koncentrace ATB se nachází v mléce po intramamární nebo intracisternální aplikaci při terapii mastitid. ATB jsou v mléce prokazatelná i po nitrosvalovém (i.m.) nebo nitrožilním (i.v.) podání. Po intramamární aplikaci do jedné čtvrti mohou být ATB vylučována i z neléčených čtvrtí, prakticky ve stejných koncentracích jako ze čtvrti léčené (HOLEC, 1994). Tuto skutečnost potvrdili i McEWEN et. al (1992), viz kapitola 4.2.2, (graf 8, graf 9).

Mezi další vlivy působící na výsledky testů mohou patřit také např. tzv. baktericidní fáze mléka, PSB, doba a způsob uchování vzorků od náběru po rozbor (zamražení, zchlazení), případně tepelné ošetření mléka před vlastním stanovením. Na falešně pozitivní výsledky, zejména při testování jednotlivých krav vlivem nespecifických antibakteriálních faktorů zvýšených u mastitid a mleziva, upozorňují HONKANEN-BUZALSKI A SUHREN (2000).

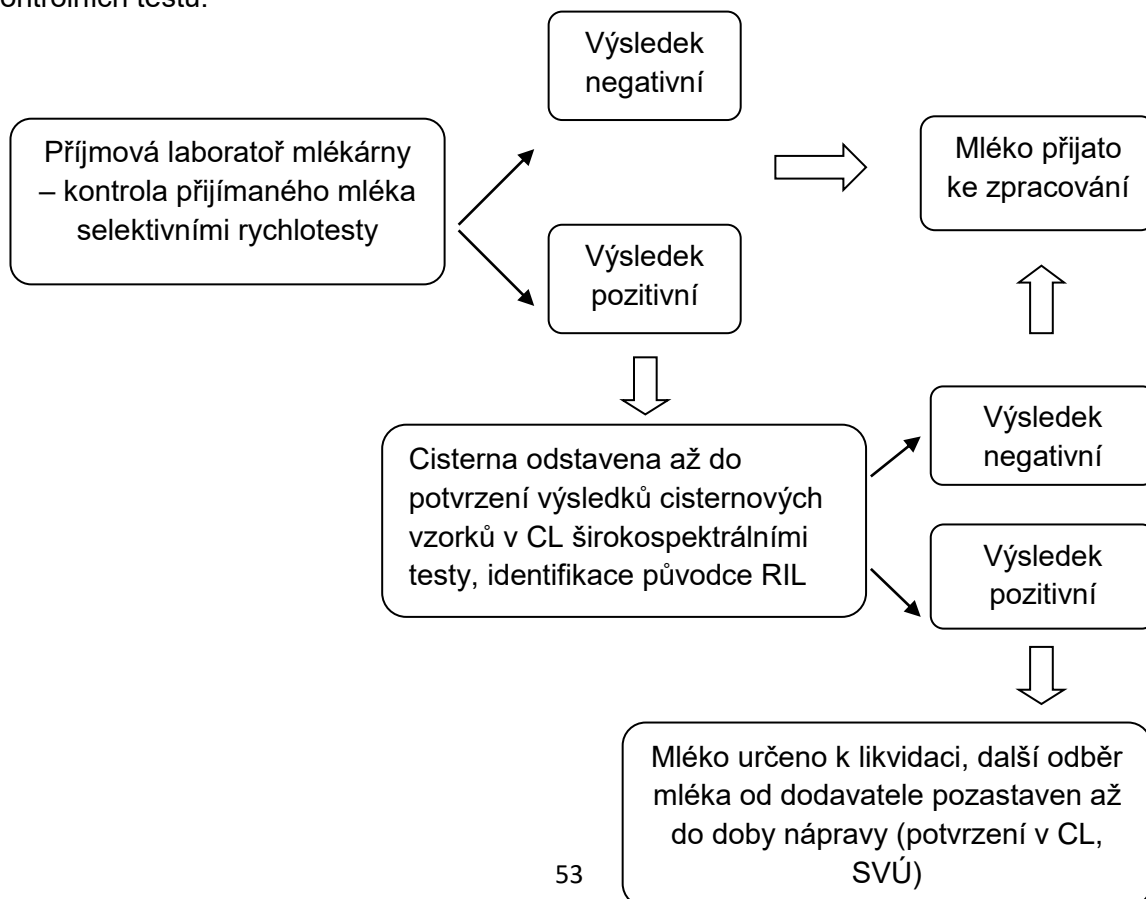
TOUŠOVÁ, DRAGOUNOVÁ (2004) sledovaly RIL pomocí Delvotestu SP ve vzorcích mléka po skončení OL léčiv. Při porovnávání výsledků získaných z odlišných laboratoří zjistily 60 %, resp. 24 % pozitivních vzorků. Vyšší počty pozitivních výsledků přičítají autorky pravděpodobně vlivu přirozených IL obsažených v nepasterovaném mléce. V jedné z laboratoří totiž bylo prováděno tepelné ošetření mléka (85 °C, po dobu 10 minut), které tyto látky inaktivuje.

4.4 VÝHODY A NEVÝHODY POUŽITÝCH METOD DETEKCE RIL

Screeningové testy použité při testování individuálních vzorků dojnic se liší principem (Delvotest SP-NT, Eclipse 50 - růst mikrobiálního kmenu v živném agaru, Twinsensor BT - receptorová analýza), dobou analýzy, citlivostí zejména při detekci cefalosporinů a tetracyklinových ATB. V současné době však neexistuje metoda, která by byla schopna detekovat všechny tyto látky na úrovni stanovených MRL (NAVRÁTILOVÁ, 2008).

Na trhu je v současné době značné množství testů různých výrobců, lišících se zejména v oblasti citlivosti jednotlivých detekovaných ATB, v závislosti na požadavcích zákazníků. Vzhledem ke stále se rozšiřujícímu exportu mléčných výrobků do zemí Ruské federace a zejména odlišným požadavkům Ruské federace týkajících se MRL oproti požadavkům EU, jsou v mlékárnách zaměřených na export do RF používány selektivní rychlotesty s vyšší citlivostí především na tetracyklinová ATB (Twinsensor BT 034, CHARM ROSA RF test). Při zjištění pozitivních výsledků vzorků přijímaného mléka jsou tyto potvrzovány v Centrální laboratoři širokospektrálními rychlotesty (Delvotest T, Eclipse 50).

Systém kontrol a vyšetření mléka na RIL v mlékárenském závodě: v následném schématu jsou znázorněny cesty syrového mléka závislé na výsledcích jednotlivých kontrolních testů.



Tabulka 19 uvádí porovnání citlivostí testů používaných v Centrální laboratoři MADETA a.s.

Tabulka 19. Porovnání citlivostí screeningových testů dle výrobců v jednotkách ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

	Twin 020	Twin 034	Charm Rosa EU	Charm Rosa RF	Eclipse	Delvo test SP-NT	Delvo test T	MRL
Beta-laktamy								
Penicilin	2-3	2-3	2-3	1,5-2,5	3-4	2-3	2	4
Ampicilin	3-5	3-5	2,5-4	3-4	4-5	6-7	3-4	4
Amoxicilin	3-5	3-5	2,5-4	3-4			4	4
Kloxacilin	6-8	6-8	25-35	10-20	35	20-30	5-6	30
Oxacilin	12-18	12-18					30	30
Nafcilin	30-50	30-50						30
Cefalosporiny								
Cefalexin	>750	>750			75		20-30	100
Cefacetril	30-40	30-40		30-50				125
Cefalonium	3-5	3-5		3-5	20			20
Cefazolin	18-22	18-22	12-20	15-30	35			50
Cefoperazone	3-4	3-4		1-2			40	50
Cefquinome	20-30	20-30	15-20	15-20			40	20
Ceftiofur	10-15	10-15	30-60	40-70	100	50-100	20	100
Cefapirin	6-8	6-8	6-10	6-10			5-6	60
Tetracykliny								
Chlortetracyklin	30-40	5-7	50-100	6-10			150-152	100
Doxycyklin	10-15	2-3		6-10			40-50	100
Oxytetracyklin	50-60	7-9	50-100	6-10	100	800	80-100	100
Tetracyklin	80-100	8-10	20-40	6-10	100	800	70-75	100
Neomycin								
Neomycin					1500	300-600	60-110	1500
Gentamycin								
Gentamycin					400	200		100
Streptomycin								
Streptomycin					2000		400	200
Linkomycin								
Linkomycin					150-300		180-220	150
Erytromycin								
Erytromycin					400-800		150-160	40

EU - Evropská unie

RF - Ruská federace

5 ZÁVĚR

Současná celosvětová snaha o zvyšování kvality potravin se týká i mléka a mléčných výrobků. Důležitým ukazatelem kvality mléka jsou rezidua inhibičních látek (RIL), která se v mléce vyskytují nejčastěji v důsledku používání veterinárních léčiv. Každé indikované léčivo má stanovenou ochrannou lhůtu, po kterou nesmí být mléko zařazeno do dodávky mlékárnám, a po jejímž skončení by měla být provedena kontrola přítomnosti RIL. V současné době je zdůrazňován velký význam používání screeningových metod detekce inhibičních látek (tzv. rychlotestů), které mohou rychle a včas zamezit výskytu RIL v mléce. Cílem diplomové práce bylo sledování RIL v mléce dojníc léčených vybranými skupinami antibiotik pomocí tří detekčních metod včetně porovnání jejich výhod a nevýhod.

Selektivní rychlotest Twinsensor BT, jehož princip je založen na receptorové analýze vzorků, se ukázal jako nejcitlivější na všechny použité skupiny léčiv (beta-laktamová antibiotika včetně cefalosporinů, tetracyklinová antibiotika a sulfonamidy). Z celkového počtu 161 vzorků mlék od léčených dojníc byla tímto testem detekována přítomnost RIL u 55 % vzorků. Vzhledem k jeho jednoduchému použití a krátké době vyšetření (6 minut) je velmi spolehlivým testem vhodným jak pro prvovýrobu, tak i pro mlékárenské laboratoře. Nevýhodou tohoto testu je vysoká citlivost, protože nastavené limity detekce účinných látek obsažených ve veterinárních léčivech jsou u tohoto testu nižší než limity dané legislativními předpisy. Vysoká citlivost testu by mohla být problematická především z pohledu výrobce mléka, zatímco pro konzumenta by tato skutečnost byla přínosná.

U použitých širokospektrálních testů Delvotest SP-NT a Eclipse 50, založených na principu mikrobiologického růstu testačních kmenů bakterií, je předností rovněž detekce širokého spektra veterinárních léčiv a jednoduchost vlastního stanovení. Nevýhodou testů se však jeví delší doba inkubace (2,45 - 3 hodiny) a nedostatečná citlivost pro některé skupiny veterinárních léčiv (např. tetracyklinová antibiotika u Delvotestu SP-NT) dle požadavků legislativy EU. Ve sledovaném souboru byla Delvotestem SP-NT detekována přítomnost RIL u 20 % vzorků a testem Eclipse 50 u 30 % vzorků. Zatímco při sledování vlivu skupiny léčiva byla citlivost testů Delvotest SP-NT a Eclipse 50 v případě tetracyklinů srovnatelná, u beta-laktamových antibiotik i cefalosporinů byl v případě Delvotestu SP-NT zaznamenán nižší počet pozitivních vzorků než u testu Eclipse 50.

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující přítomnost RIL v mléce patří bezesporu dodržování ochranných lhůt. I když na jedné straně v části vzorků odebraných již v době před ukončením ochranné lhůty nebyla detekovaná přítomnost RIL, mnohem zarážející je skutečnost, že značný počet pozitivních vzorků byl potvrzen i v době po ukončení ochranné lhůty. V případě testu Twinsensor BT to bylo u 52 % vzorků, u Delvotestu SP-NT 16 % a u testu Eclipse 50 27 %, z čehož vyplývá, že stanovená ochranná lhůta příslušných veterinárních léčiv nemusí být vždy dostatečně dlouhá.

Vzhledem k tomu, že limity detekce jsou u většiny selektivních rychlotestů nižší než hodnoty MRL pro dané léčivo, měly by být vzorky, které jsou těmito testy vyhodnoceny jako pozitivní, dále podrobeny analýze širokospektrálním testem, avšak s vyhovující citlivostí pro nejčastěji používaná léčiva.

6 SUMMARY

One of the most important areas of dairy farming is the issue of mastitis. Their treatment is mainly based on the use of antibiotics (ATB), both in the lactation period and during drying off. The occurrence of residues of inhibitory substances (RIL) in milk is dealing with widespread use of veterinary medicines, non-compliance with withdrawal periods drug metabolism changes with an infected animal or inconsistent with the secretion of milk from treated animals deliveries.

The aim of the thesis has been to study the RIL in the milk of cows treated with selected groups of ATB and comparison of three methods of determining (selective rapid test Twinsensor BT, broad Rapid Eclipse 50 and Delvotest SP-NT), including an assessment of their advantages and disadvantages. In the file of 161 milk samples was detected by Delvotest SP-NT the RIL presence only 20 % and the assay Eclipse 50 to 30 %. Twinsensor BT contrast sensed RIL in 55 % of test samples. During the monitoring impact of time from drug administration was in the samples after the trade deadline established the presence of drugs RIL by Twinsensor BT in 52 %, by test Eclipse 50 in 27 % and Delvotest SP-NT in 16 % of cases. During the monitoring the impact of drug used or the indication was clearly demonstrated high sensitivity of the test by Twinsensor BT as comparable sensitivity tests Eclipse 50 Delvotest SP-NT. Results of RIL in the reference sample set limits correspond to the sensitivity of the tests, as it was declared by the manufacturer. For most of the tests are selective detection limits lower than the MRL for the drug, it would be useful if a positive result can also use a broad-spectrum test with satisfactory sensitivity relative to the MRL.

Key words:

Milk, inhibitory substances, antibiotic residues, maximum residue limits, Twinsensor BT, Eclipse 50, Delvotest SP-NT

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ANDREW S. M., MOYES K. M., BORM A. A., FOX L.K., LESLIE K.E., HOGAN J.S., OLIVER S.P., SCHUKKEN Y.H., OWENS M.Y., NORMAN C.: Factors associated with the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy. *Vet Microbiol.* 2009, 134 (1-2).
2. BILLOVÁ V., HERA A., NOVOTNÁ P.: Minimalizace rizik používání vybraných skupin antimikrobiálních léčiv u potravinových zvířat. Brno: ÚSKVBL a VÚVL, 2007, 16 s.
3. BOTSOGLOU N. A., FLETOURIS D. J.: Drug residues in Foods. *Pharmacology, Food Safety and Analysis* New York, Marcel Dekker, 2001, 541-548.
4. BRZDIL J.: Sezónnost výskytu vybraných patogenů mléčné žlázy skotu. *Veterinářství*, 2011, 60, (1), 38-42.
5. COLAK H., HAMPIKYAN H., BINGOL E. B.: Some residues and contaminants in milk and dairy products. *Asian Journal of Chemistry*, 2007, 19 (3), 1789-1796.
6. DOLEŽAL O., HLÁSNÝ J., JÍLEK F., HANUŠ O., VEGRICHT J., PYTLOUN J., MATOUŠ E., KVAPILÍK J.: *Mléko, dojení, dojírny*. 1. vyd. Praha: Agrospoj, 2000. 241 s, 39-42.
7. GAJDŮŠEK, S.: Problémy v technologické zpracovatelnosti mléka, zejména v jeho kysací schopnosti. In: Sborník ze semináře "Inhibiční látky v mléce.", VÚCHS Rapotín 1994, 19-20.
8. GRIEGER C., HOLEC J.: *Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov*. 1.vyd. Bratislava: Priroda, 1991, 399 s.
9. HANUŠ O., VYLETĚLOVÁ M., JEŘÁBKOVÁ J.: Kontrola jakosti mléka: Kontrola RIL. In Samková, E (ed.). *Mléko: Produkce a kvalita*. 1.vyd., České Budějovice: JU ZF 2012. 240 s, 196-203.
10. HANUŠ O.: Systém rutinní identifikace inhibičních látek v mléce, praktické důvody výskytu inhibice a jeho prevence. In *Inhibiční látky v mléce*. Šumperk: Vegaprint, 1994, 37-41.
11. HAUBERT V., BROUZA M., LÁTOVÁ J.: Inhibiční látky v potravinách - současné problémy. *Veterinářství*, 1991 (41), 127-128.

12. HEESCHEN W. H., BLÜTCHEN A.: Veterinary drugs and pharmacologically active compounds. In *Monograph on residues and contaminants in milk and milk products*. Brusel, IDF, 1991, p. 13-69.
13. HERA A., BUREŠ J., POKLUDO VÁ L., DRÁPAL J., SLÁMOVÁ V., ČERNÝ T.: Antibiotika a živočišná produkce Fakta místo senzace - díl I. - II. *Náš chov*, 2012 (9, 10), 5-8.
14. HERA A., BILLOVÁ V., NOVOTNÁ P.: Antibiotická politika ve veterinární medicíně. *Veterinářství*, 2002 (52), 248-251.
15. HOFÍREK B., SMOLA J., ČÍŽEK A., MANSTELD D., HAAS R., SUSANNE S.: Záněty mléčné žlázy. In: *Nemoci skotu*. Brno: Noviko a.s., 2009, 603 -700.
16. HOFÍREK B., PECHOVÁ A. R., DOLEŽAL O., PAVLATA R., DVOŘÁK P., FLEISCHER P.: *Produkční a preventivní medicína v chovech mléčného skotu*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2004, 184 s.
17. HOLEC J.: Výskyt inhibičních látek v mléce a jeho hygienická a technologická rizika. In: *Inhibiční látky v mléce*. VÚCHS Rapotín, 1994, 11-15.
18. HONKANEN - BUZALSKI T., SUHREN G.: Residue of Antimicrobial Agents in Milk and Their Significance to Public Health and Milk processing, *Quality & Safety of Raw Milk*, 2000 (345): 1-12.
19. HUML O., PAŠKOVÁ J.: Environmentální mastitidy v chovech skotu. In *Mastitidy skotu*. Brno: MZLU, 2003.
20. JEŘÁBKOVÁ J.: Rezidua inhibičních látek (RIL). In *Seminář Novinky v testování reziduí inhibičních látek v mléce*. Brno, 2013, 1-24.
21. JEŘÁBKOVÁ J.: Screeningové testování inhibičních látek v mléce. In *Seminář RIL, IR a NIR technologie*. Brno: MZLU, 2011, 1-15.
22. LEE M. H., LEE H. J., RYU P. D.: Public Health Risks: Chemical and Antibiotic Residues - Review. *Asian: Australasian Journal of Animal Sciences*, 2001, 14 (19), 402-413.
23. LEVY STUART B.: *Antibiotický paradox*. 1.vyd. Praha: ACADEMIA, 2007, 312 s, 361-387.
24. LOKSUWAN J.: The effect of raring on multiple residue of tetracyclines in milk. *Thammasat Int. J. Sc.Tech.*, 2002, 7:17-22.

25. LÜLMANN H., MOHR K., WEHLING M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2.vyd. Praha: GRADA PUBLISHING, a.s., 2004, 728 s, 489-520.
26. McEWEN S. A., BLACK W. D., MEEK A. H.: Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra-label conditions. *Can Vet J*, 1992, (33), 527-534.
27. NAVRÁTILOVÁ P.: Jakostní ukazatele mléka: Rezidua inhibičních látek. In Samková, E (ed.). *Mléko: produkce a kvalita*. 1. vyd., České Budějovice: JU ZF 2012. 240 s, str. 141-150.
28. NAVRÁTILOVÁ P.: Rezidua antimikrobiálních látek v mléce a jejich význam. In *Seminář RIL, IR a NIR technologie*. Brno: MZLU, 2011, 1-11.
29. NAVRÁTILOVÁ P.: Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk - a review. *Czech J. Food Sci.*, 2008, (26), 393-401.
30. NAVRÁTILOVÁ P.: Problematika reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce. *Veterinářství*, 2002, (52), 478-481.
31. NAVRÁTILOVÁ P.: Rezidua inhibičních látek v mléce. In *Produkce a zdravotní nezávadnost mléka III*. České Budějovice: JU ZF, 2012, 11-22.
32. POKLUDOVÁ L., NOVOTNÁ P., HERA A.: Současné možnosti terapie mastitis v ČR. *Veterinářství*, 2007, (57), 28-35.
33. ROOSTITA L. B., ELLIN H., VIVI V.: Detection of antibiotik residues and concentrations in cows milk taken from local dairy farmers in Lembang sub distrikt. *Lucrări Științifice - seria Medicină Veterinară*, 2012, (55), 234-237.
34. O'ROURKE D. J., BAGGOT D. J.: Antimicrobial therapy of mastitis. In: A. H. Andrews, H. Boyd, R. W. Blowey, R. Eddy *Bovine medicine: Diseases and husbandry of cattle*. 2nd ed. 2004, 391-403.
35. SAMKOVÁ E.: Inhibiční látky v mléce. In *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků*. Brno: MZLU, 2010.
36. SCOTT R. P., PENNY D. C., MACRAE A.: *Cattle medicine*. London, Manson Publishing The Veterinary press, 2011, 352 s.
37. SEYDLOVÁ R.: Jakostní ukazatele mléka: Počet somatických buněk. In Samková, E. (ed.). *Mléko: Produkce a kvalita*. 1.vyd., České Budějovice: JU ZF 2012. 240 s, str. 128-140.
38. SEYDLOVÁ R.: Inhibiční látky v mléce. *Mlékařské listy*, 1998, (45), 9-10.

39. SEYDLOVÁ R.: Lze řešit zdravotní stav mléčné žlázy v období zaprahování. *Náš chov*, 2011, (2), 72-74.
40. SEYDLOVÁ R., SNÁŠELOVÁ J.: Současný stav mikrobiologické a bakteriologické kvality syrového mléka. *Mlékařské listy*, 2010, (121), XXXI-XXXV.
41. SÝKOROVÁ GOFFOVÁ Z., KOŽÁROVÁ I., MÁTÉ D., MARCINČÁK S., GONDOVÁ Z., SOPKOVÁ D.: Comparison of Detection Sensitivity of Five Microbial Inhibition Tests for the Screening of Aminoglycoside Residues in Fortified Milk. *Czech J. Food Sci*, 2012 (30), No. 4:314-320.
42. ŠIMŮNEK J., SMOLA J.: Antibiotika, sulfonamidy a chinolony ve veterinární medicíně, 1.vyd. Tišnov: Vydavatelství potravinářské literatury LAST STEINHAUSER, 1998, 133.
43. TAMIME A. Y., ROBINSON R. K.: *Yoghurt Science and Technology*. 2nd ed., Cambridge: Woodhead Publishing, 1999, 619 pp.
44. TICHÁČEK A., BJELKA M., Hanuš O., KOPUNECZ P., OLEJNÍK P., PAVLATA L., PECHOVÁ A., PONÍŽIL A.: *Poradenství jako nástroj bezpečnosti v prvovýrobě mléka - (Metodika pro praxi)*. 1. vyd. Šumperk: AGRITEC, 2007, 86 s.
45. VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J.: *Chemie potravin I., II.* 3.vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 580s.
46. VOTAVA M.: *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s.
47. ZELINKOVÁ G. : Management dojnic s chronicky infikovanou mléčnou žlázou. *Veterinářství*, 2012 (62), 38-40.

Internetové zdroje:

1. KNAPPSTEIN K., SUHREN G., WALTE H. G., SLAGHUIS B. A., FERWERDA-van ZONNEVELD R. T.: Prevence reziduí antibiotik. Patříčné řízení antibiotické léčby krávy na automatické systémy dojení [online]. 2004 [cit. 2013-08-21]. Dostupné <http://www.automaticmilking.nl/projectresults/reports/DeliverableD12.pdf>
2. KOLLÁTOROVÁ H.: ATC Antiinfektiva [online]. 2011 [cit. 2013-06-05]. Dostupné:http://www.szsemb.cz/admin/upload/sekce_materialy/ATC_Antiinfektiva.pdf
3. KOPUNECZ P.: Inhibiční látky - Podíly pozitivních vzorků (v %) [online]. 2013 [cit. 2013-02-02]. Dostupné: <http://www.cmsch.cz/store/prehledy-vysledku-za-rok-2013.pdf>

4. KRATOCHVÍL J.: Kombinace antibiotické a neantibiotické léčby v zapařlosti - cesta ke snížení výskytu mastitid [online]. In *Mastitidy skotu*. 2006 [cit. 2013-06-13]. Dostupné: http://www.buiatrie.cz/attachments/038_Mastitidy%20skotu_1111-2006.pdf
5. MZE (2009-2011). Ministerstvo zemědělství ČR. Hygienický balíček. eAGRI. Potraviny. [online]. © 2009-2011. [cit. 2012-07-15]. Dostupné na: <http://eagri.cz/public/web/mze/potravin/hygienicky-balicek/konsolidovana-zneni/>.
6. NOVOTNÁ P., POKLUDOVÁ L., BUREŠ J., HERA A.: Problematika terapie mastitid s ohledem na zásady správného používání antibiotik [online]. In *Mastitidy skotu*. 2006 [cit. 2011-07-22]. Dostupné: http://www.buiatrie.cz/attachments/038_Mastitidy%20skotu_1111-2006.pdf
7. SEYDLOVÁ R.: Řešení problematiky environmentálních mastitid v zemědělských provozech antibiotik [online]. In *Mastitidy skotu*. 2006 [cit. 2013-06-12]. Dostupné: http://www.buiatrie.cz/attachments/038_Mastitidy%20skotu_1111-2006.pdf
8. SHALAK M. V., MARUSITCH A. G., KAMINSKAJA O. V.: Vliv přípravků tetracyklinové řady na obsah antibiotik v mléce [online]. 2009 [cit. 2011-08-04]. Dostupné: <http://asau.ru/doc/nauka/conf/2010/part3/seminar6.pdf>
9. TOUŠOVÁ R., DRAGOUNOVÁ H.: Obsah inhibičních látek v mléce v návaznosti na ochrannou lhůtu léčiv [online]. 2004 [cit. 2013-08-18]. Dostupné: http://www.agris.cz/Content/files/main_files/76/154458/26_Tousova.pdf

Legislativní předpisy a normy:

1. SOP 02: Detekce reziduí inhibičních látek selektivním rychlotestem (TWINSENSOR BT), Centrální laboratoř MADETA a.s., 2011, 4 s.
2. SOP 03: Detekce reziduí inhibičních látek v mléce a mlékárenských výrobcích komerčními testy dle návodu výrobce ECLIPSE, Centrální laboratoř MADETA a.s., 2012, 5 s.
3. SOP 08: Detekce reziduí inhibičních látek komerčně dodávaným testem (DELVOTEST), Centrální laboratoř MADETA a.s., 2012, 6 s.
4. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 ze dne 6. května 2009, kterým se stanoví postupy Společenství pro stanovení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu

5. *Nařízení Komise (EU) č. 37/2010* ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle MRL v potravinách živočišného původu
6. *Zákon č. 166/1999 Sb.*, o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů
7. *ČSN EN ISO 13366 - 2 Stanovení počtu somatických buněk Část 2: Návod pro ovládání fluoro-opto-elektronického přístroje*. 1. vyd. Praha: Český normalizační institut, 2007, 16 s.
8. *ČSN 57 0536 Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem*, 1. vyl. Praha: Český normalizační institut, 1999, 12 s.
9. *ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování*. 2. vyd. Praha: Český normalizační institut, 1993, 8 s.

Příslušné legislativní předpisy a jejich plné znění jsou uvedeny v kapitole 2

8 SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ

8.1 SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Základní rozdělení antimikrobiálních léčiv

Tab. 2. Plotnové metody - metoda čtyř ploten (č.1-4), metoda šesti ploten (č.1-6)

Tab. 3. Rozdělení a počty vzorků podle chovů a indikace použití léčiva

Tab. 4. Hodnoty MRL a porovnání citlivostí jednotlivých použitých testů (dle výrobce) na vybrané účinné látky ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Tab. 5. Selektivní rychlotesty - Twinsensor BT

Tab. 6. Širokospektrální rychlotesty - DELVOTEST SP-NT

Tab. 7. Širokospektrální rychlotesty ECLIPSE 50

Tab. 8. Stanovení počtu somatických buněk (PSB), obsahu tuku a bílkovin v testovaných vzorcích

Tab. 9. Četnost použití jednotlivých skupin léčiv v testovaných vzorcích

Tab. 10. Vliv skupiny léčiva na výsledky testů detekce RIL

Tab. 11. Statistické vyhodnocení vlivu jednotlivých použitých testů na detekci RIL

Tab. 12. Četnost a zastoupení použitých veterinárních léčiv v testovaných vzorcích

Tab. 13. Vliv použitých veterinárních léčiv na výsledky testů detekce RIL

Tab. 14. Charakteristiky vybraných vlivů (ochranná lhůta a doba od aplikace léčiva) - ve dnech

Tab. 15. Vliv dodržení ochranné lhůty (OL) na výsledky testů detekce RIL

Tab. 16. Vliv doby po aplikaci léčiva na výsledky testů detekce RIL

Tab. 17. Vliv indikace léčby na výsledky testů detekce RIL

Tab. 19. Porovnání citlivostí screeningových testů dle výrobců v jednotkách ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

8.2 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Četnost a zastoupení skupin léčiv v testovaných vzorcích

Graf 2. Četnost a zastoupení skupin léčiv v testovaných vzorcích při aplikaci kombinované léčby

Graf 3. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na skupině léčiva

Graf 4. Četnost a zastoupení nejčastěji použitých veterinárních léčiv v testovaných vzorcích

Graf 5. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na použitém veterinárním léčivu

Graf 6. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na dodržení ochranné lhůty

Graf 7. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na době po aplikaci léčiva

Graf 8., 9. Počet pozitivních vzorků dle na způsobu aplikace v denních intervalech po skončení léčby

Graf 10. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na indikaci léčby

8.3 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Příčiny pozitivních nálezů RIL v mléce (SEYDLOVÁ, 1998)

Obr. 2. Procentuální podíl RIL pozitivních vzorků (KOPUNECZ, 2013)

Obr. 3. Schéma plotnové metody

Obr. 4. Twinsensor BT s příslušenstvím - inkubační jednotka (vlevo), tiskárna s klávesnicí, ReadSensor

Obr. 5. Delvotest SP-NT ampule a mikrodestička, pozitivní (+) a negativní (-) vzorek

Obr. 6. Eclipse 50, mikrodestička, pozitivní (+) a negativní (-) vzorek

Obr. 7. Spotřeba ATB v kg, v letech 2005 - 2010