

## Prohlášení

Diplomová práce s názvem „Stanovení reziduí antibiotik v mléce léčených dojnic“ (Determination of antibiotic residues in the milk of cured cows) nemůže být vložena do systému STAG vzhledem ke skutečnosti, že zveřejnění dat obsažených ve výše zmíněné práci v dubnu 2014 by bránilo publikování těchto dat ve vědeckém časopisu.

Diplomová práce bude v tištěné podobě k dispozici v Akademické knihovně JU.

Vedoucí diplomové práce


doc. Ing. Eva SAMKOVÁ, Ph.D.



.....

Autor diplomové práce

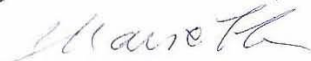
Bc. Veronika STŘELEČKOVÁ



.....

Vedoucí katedry

doc. Ing. Miroslav MARŠÁLEK, CSc.



.....

V Českých Budějovicích, dne 25. 4. 2014

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](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 lécených dojnic“ vypracovala samostatně a použila jen zdrojů, které cituji a uvádím v příloženém 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 jejich 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: *Kuomita Stěhlová*

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

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>10</b>
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
<b>3</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ</b> .....	<b>36</b>
4.1	SEZNAM TABULEK .....	36
4.2	SEZNAM GRAFŮ .....	37
4.3	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	37



## 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).

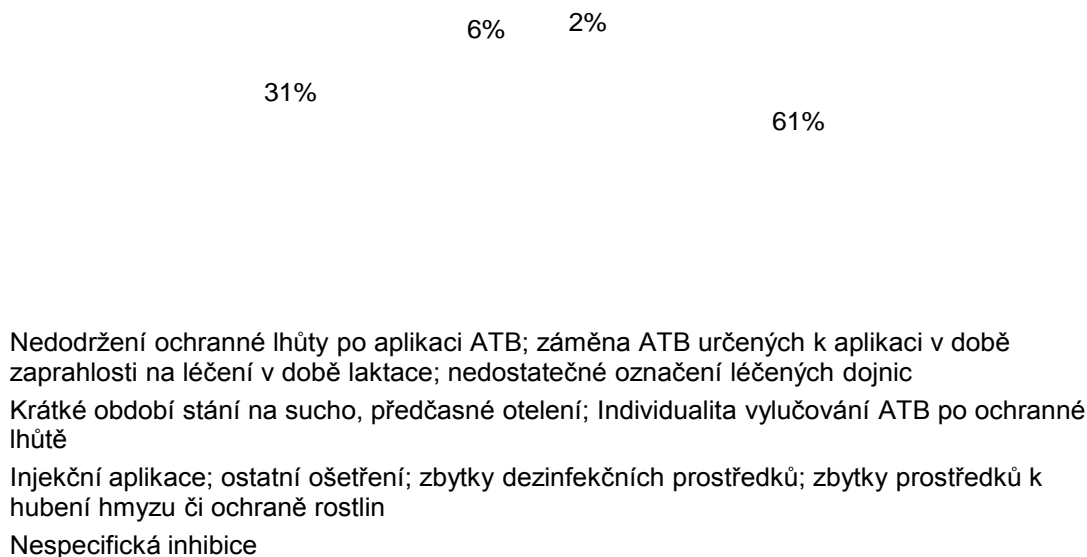
Rezidua inhibičních látek (RIL), která se do mléka dostávají z vnějšího prostředí, jsou tzv. cizorodé, kontaminující látky (NAVRÁTILOVÁ, 2002). Jejich nejvýznamnější skupinou jsou antimikrobiální látky (NAVRÁTILOVÁ, 2012). Rovněž JEŘÁBKOVÁ (2013) označuje za hlavní zdroje nežádoucích RIL v zemědělské 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)



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

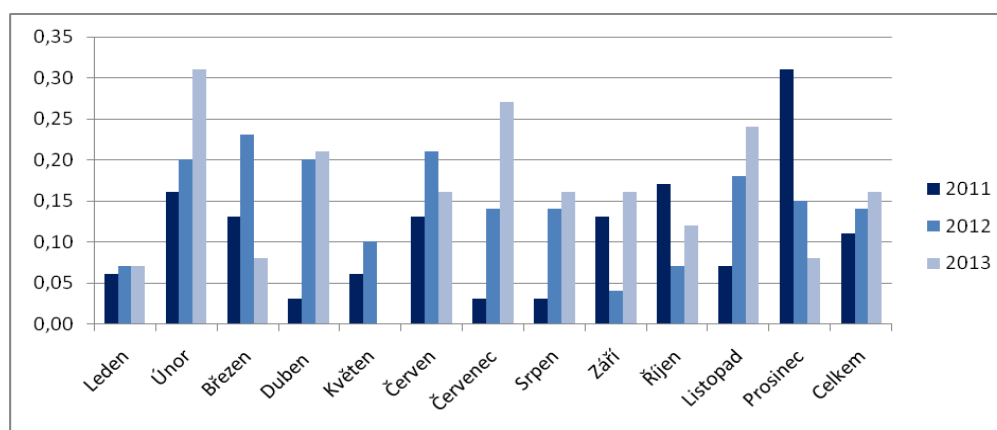
1. plošné monitorování - používají se testy umožňující rychlé stanovení přítomnosti IL. Tento požadavek splňují komerčně vyráběné screeningové testy (selektivní a širokospektrální rychlotesty). Přítomnost RIL lze prokázat i mikrobiologickými plotnovými metodami;
2. cílené vyšetřování - používají se metody na identifikaci a konfirmaci 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).



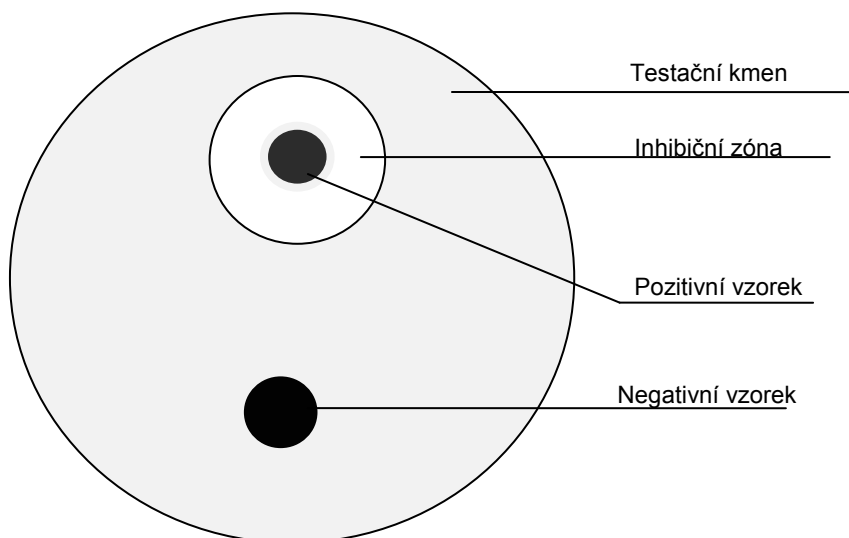
### 2.4.3 Screeningové mikrobiologické plotnové metody

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  $^{14}\text{C}$  nebo  $^3\text{H}$  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).

Následující pasáž „MATERIÁL A METODIKA“ o rozsahu 8 stran je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

Následující pasáž „VÝSLEDKY A DISKUSE“ o rozsahu 20 stran je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

Následující pasáž „ZÁVĚR“ o rozsahu 2 stran je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

Následující pasáž „SUMMARY“ o rozsahu 1 strana je vypuštěna z důvodu budoucí publikace těchto dat v odborné literatuře a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

### 3 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 pharmacologicall aktive compounds. In *Monograph on residues and contaminants in milk and milk products*. Brusel, IDF, 1991, p. 13-69.

13. HERA A., BUREŠ J., POKLUDOVÁ 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. Mc EWEN 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 s.
43. TAMIME A. Y., ROBINSON R. K.: *Yoghurt Science and Technology*. 2<sup>nd</sup> 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](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 zaprahlosti - 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](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/potraviny/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](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](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](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 analyzátořem, 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*

## **4 SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ**

### **4.1 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. Vliv indikace na výsledky testů detekce RIL

Tab. 15. Četnost testovaných vzorků po léčbě mastitid v době laktace

Tab. 16. Četnost testovaných vzorků po léčbě nebo prevenci mastitid v době zaprahování

Tab. 17. Četnost testovaných vzorků po jiné léčbě

Tab. 18. Vliv dodržení ochranné lhůty na výsledky testů detekce RIL

Tab. 19. Vliv doby po aplikaci léčiva na výsledky testů detekce RIL

Tab. 20. Účinnost ochranné lhůty u jednotlivých antibiotik

Tab. 21. Počet pozitivních vzorků na BR testu v denních intervalech po skončení léčby

Tab. 22. Porovnání výsledků rozborů mezi jednotlivými použitými testy

Tab. 23. Porovnání citlivostí screeningových testů dle výrobců v jednotkách ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

#### **4.2 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 indikaci léčby

Graf 7. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na dodržení ochranné lhůty

Graf 8. Pozitivní výsledky testů detekce RIL v závislosti na době po aplikaci léčiva

Graf 9. Pozitivní výsledky testů detekce RIL

#### **4.3 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