



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Návrh doporučeného postupu léčby brojlerů sulfamethoxazolem v kombinaci s trimethoprimem

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.

MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.

RNDr. Iva Bartejsová, VÚVeL,

Ing. Michaela Charvátová, Ph.D.

MVDr. Nikola Hodkovicová, Ph.D.

Mgr. Kristína Tošnerová

Mgr. Michaela Víšková

Mgr. Michal Petreň

Mgr. Jakub Ondrouch

Ing. Martin Jeřábek, Ph.D.

Certifikovaná metodika č. CM 147/2023

Návrh doporučeného postupu léčby brojlerů sulfamethoxazolem v kombinaci s trimethoprimem

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

RNDr. Iva Bartejsová, VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Ing. Michaela Charvátová, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

MVDr. Nikola Hodkovicová, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Mgr. Kristína Tošnerová, VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Mgr. Michaela Víšková, Tekro s.r.o., Višňová 484, 140 00 Praha 4

Mgr. Michal Petreň, Tekro s.r.o., Višňová 484, 140 00 Praha 4

Mgr. Jakub Ondrouch, Tekro s.r.o., Višňová 484, 140 00 Praha 4

Ing. Martin Jeřábek, Ph.D., Tekro s.r.o., Višňová 484, 140 00 Praha 4

Metodika byla vypracována v rámci řešení projektů Ministerstva zemědělství a Národní agentury pro zemědělský výzkum, čísla projektů QK1910057 a RO0523.

ISBN 978-80-7672-040-4

Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy ČR

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

SVS/2023/128612-G

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky:

Certifikovaná metodika č. CM 147/2023: Návrh doporučeného postupu léčby brojlerů sulfamethoxazolem v kombinaci s trimethoprimem

Autor / autoři:

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

RNDr. Iva Bartejsová, VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Ing. Michaela Charvátová, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

MVDr. Nikola Hodkovicová, Ph.D., VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Mgr. Kristína Tošnerová, VÚVeL,, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Mgr. Michaela Višková, Tekro s.r.o., Višňová 484, 140 00 Praha 4

Mgr. Michal Petreň, Tekro s.r.o., Višňová 484, 140 00 Praha 4

Mgr. Jakub Ondrouch, Tekro s.r.o., Višňová 484, 140 00 Praha 4

Ing. Martin Jeřábek, Ph.D., Tekro s.r.o., Višňová 484, 140 00 Praha 4

Název organizace/cí: **Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.**

Místo vydání: **Brno**

Rok vydání: **2023**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace č. **QK1910057 a RO0523**.

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

MVDr. Zbyněk Semerád

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ústřední ředitel

V Praze dne 18. 9. 2023

.....
Podpis/elektronický podpis zástupce
odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe: Mgr. Jan Radoš
ředitel odboru

V dne

Mgr. Jan Digitálně podepsal
Radoš Mgr. Jan Radoš
Datum: 2023.10.09
12:22:48 +02'00'

.....
Podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky Odboru precizního
zemědělství, výzkumu a vzdělávání

I) Cíl metodiky

Antimikrobika hrají v humánní i veterinární medicíně nezastupitelnou roli pro léčbu bakteriálních infekcí a v současné době nejsou k dispozici žádná alternativní léčiva, která by zajistila léčbu bakteriálních infekcí. V posledních letech došlo k výraznému poklesu objevů a zavádění nových molekul antimikrobik do klinické praxe. Z tohoto důvodu je klíčovým problémem současné medicíny zachovat účinnost v současnosti využívaných antimikrobik, která je vážně ohrožena zvyšující se prevalencí rezistence mikroorganismů. K omezení vzniku a rozvoje rezistence zásadní měrou přispívá optimálně definované dávkování antimikrobik, které je vyvozeno na základě znalosti farmakokinetických (PK) a farmakodynamických (PD) vlastností daných látek, které definují potřebné expozice antimikrobiálních látek pro maximální účinek na bakterie.

Farmakokinetika popisuje pohyb léčiva v těle v závislosti na čase, zabývá se procesy absorpce léčiva z místa podání, distribuce v těle, metabolismu, konjugace a eliminace léčiva z organismu. Mezi nejčastěji používané PK parametry patří biologická dostupnost léčiva v krevním séru nebo v místě infekce v závislosti na čase (%) nebo distribuční objem V_d , který představuje intenzitu distribuce léčiva v krevním séru nebo do tělesných tkání. Další důležitý parametr je poločas eliminace ($t_{1/2}$) – doba, za kterou koncentrace léčiva v organismu klesne na polovinu. Znalost ($t_{1/2}$) umožňuje predikci času potřebného k eliminaci léčiva z organismu nebo akumulaci léčiva při opakovaném dávkování.

PD parametry jsou definované jako vztahy mezi křivkou koncentrace antimikrobika v séru jako zástupný klinický ukazatel pro koncentrace antimikrobika v místě infekce, poměr vrcholu křivky koncentrace a MIC (minimální inhibiční koncentrace) nebo MPC (mutant preventivní koncentrace) (C_{max}/MIC nebo C_{max}/MPC), poměr plochy pod křivkou koncentrace a MIC nebo MPC (AUC/MIC nebo AUC/MPC) a doba, po kterou koncentrace antimikrobika překročí MIC nebo MPC ($T > MIC$ nebo $T > MPC$). Stanovení $T > MIC$ a $T > MPC$ je důležité u antimikrobiálních látek s účinkem závislým na čase (např. beta-laktamová antibiotika nebo makrolidy). U antimikrobik s účinkem závislým na koncentraci (např. fluorochinolony nebo aminoglykosidy) je zásadní definovat C_{max}/MIC nebo AUC/MIC .

Vědecké a klinické studie a data k určení PK a PD vlastností antimikrobiálních látek, potřebné ve veterinární medicíně k predikci účinných dávkovacích schémat pro všechny typy antimikrobik proti všem běžným infekcím a platné pro všechny druhy zvířat, nejsou v žádných databázích dohledatelné. V současné době jsou ve veterinární medicíně PK a PD vlastnosti u používaných veterinárních antimikrobik definovány v převážné většině jen pro velká hospodářská zvířata. Protože je velmi dobře známo, že se PK a PD parametry velmi liší mezi cílovými druhy zvířat, dokonce i mezi jednotlivými věkovými kategoriemi v rámci druhu, nelze definovaná data zobecnit pro všechna zvířata.

U drůbeže a zejména u brojlerů kura domácího byly PK a PD vlastnosti antimikrobik definovány pouze u omezeného spektra antimikrobiálních látek a dostupná data byla generována před desítkami let, byla měřena jinými, méně přesnými metodami než je požadováno dnes podle směrnic EU. Tehdy chovaná plemena kura domácího měla jiný genetický základ v rámci šlechtění, brojleři dnes nejčastěji chovaných plemen Ross a Comb jinak využívají potravu, mají jiné denní přírůstky, což souvisí s množstvím přijímané potravy a tekutin a tím i možností medikovat krmivo nebo pitnou vodu. Z důvodů nedostatku relevantních dat nejsou možné registrace nových povolených veterinárních léčivých přípravků pro drůbež.

Situace je nyní taková, že jsou kuřatům z nutnosti podávána léčiva, která nemají požadovanou účinnost, a tím je umožněn vznik a šíření rezistentních bakteriálních populací původců nejrůznějších onemocnění nebo jsou podávána antimikrobika kategorie „B“ (rozdělení antimikrobik podle Evropské lékařské agentury), takzvaná antimikrobika 3. volby, která by měla být podávána jen v krajním případě, kdy ostatní možnosti léčby selžou a jejich možnost použití ve veterinární medicíně je ještě více omezená než v medicíně humánní. Dokonce se vážně uvažuje o jejich zákazu používání k léčbě zvířat. Jsou to účinná antimikrobika s širokým spektrem účinku, ke kterým je třeba zachovat citlivost bakteriálních populací. V případě brojlerových kuřat a drůbeže obecně se jedná především o fluorochinolony, zejména hojně používaný enrofloxacin, který je účinný na většinu vyskytujících se infekcí bakteriálního původu u kuřat, je relativně levný a má krátké ochranné lhůty. Časté používání enrofloxacinu může zvýšit prevalenci bakterií rezistentních na fluorochinolony a snížit účinnost terapie ostatními chinolony u infekcí lidí i zvířat z důvodu možné zkřížené rezistence. Přesto je aplikace enrofloxacinu v chovech drůbeže vzhledem k širokému spektru účinnosti proti infekcím různé etiologie mnohem častější v porovnání s jinými antimikrobiálními látkami. Tyto informace vycházejí z údajů o spotřebách antimikrobiálních látek v ČR, které jsou od roku 2000

v souladu se Zákonem o léčivech a Akčním plánem Národní antibiotické politiky (Usnesení vlády, 2009) shromažďovány a analyzovány v Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv v Brně (ÚSKVBL).

Cílem metodiky je poskytnout alternativní veterinární léčivo k enrofloxacinu a dalším fluorochinolonům formou doporučeného postupu léčby brojlerů sulfamethoxazolem v kombinaci s trimethoprimem. Uplatnění doporučeného postupu v praxi přispěje nejen ke snížení ekonomických nákladů chovatelů z důvodu účinné léčby bakteriálních infekcí v chovech brojlerů, ale také povede k plnění cílů Národního antibiotického programu ČR v oblasti uvážlivého používání antibiotik a předcházení nebo omezení šíření rezistencí bakteriálních populací k antibiotikům.

II) Vlastní popis metodiky

Předkládaná metodika představuje komplexní postup pro léčbu bakteriálních infekcí brojlerů od odběru klinických vzorků z nemocných brojlerů k bakteriologickému vyšetření a stanovení citlivosti/rezistence izolátů bakteriálních patogenů k antibiotikům a interpretaci výsledků, ze které vychází následná doporučená léčba.

Metodika doporučuje léčbu veterinárním léčivým přípravkem s optimalizovanou dávkou a složením antimikrobiálních substancí – kombinaci sulfamethoxazolu s trimethoprimem pro dosažení maximální účinnosti léčby bakteriálních infekcí u cílového druhu zvířete, chovných plemen brojlerů kura domácího, stanovených na základě provedených nových farmakokinetických studií a ověřených léčbou experimentální infekce brojlerů virulentním kmenem aviárně patogenní *Escherichia coli*.

II a) Odběr vzorků k laboratornímu vyšetření

Základem správné a účinné léčby bakteriálních infekcí je vždy přesná identifikace, případně další typizace původce onemocnění. Odběr klinických vzorků se provádí *in vivo* nebo *post mortem*. Místo odběru vzorků je zvoleno podle klinických příznaků onemocnění. *In vivo* je v případě brojlerů možné provést jen odběr trusu, individuální odběry, např. rektální výtěry

nebo výtěry dýchacích cest se neprovádí. *Post mortem* se odebírají podle klinických projevů onemocnění před úhynem nebo utracením a podle patologicko-anatomického nálezu změněné části postižených vnitřních orgánů, vzorky exsudátu v dutině břišní a hrudní, fibrinové nálepy z povrchu orgánů, stěry ze vzdušných vaků, obsah střev nebo vzorky kůže.

Odebrané klinické vzorky se po odběru uloží do chladicího boxu a co nejrychleji, nejpozději však do 24 hodin, se dopraví do laboratoře k dalšímu zpracování. Stěry je nutné uchovávat a převážet na tamponech s transportním médiem z důvodu krátkodobého přežívání bakterií ve vnějším prostředí. Jestliže není možné klinický materiál přepravit do laboratoře během 24 hodin po odběru, je nutné vzorky zamrazit a do laboratoře je dopravit v tomto stavu.

II b) Izolace a identifikace původce onemocnění

Odebrané vzorky se zpracují běžnými a dostupnými základními bakteriologickými kultivačními postupy a metodami – kultivací stěrů a výtěrů nebo klinického a sekčního materiálu na krevním agaru, případně na XLD agaru a McConcay agaru. Obvyklá doba inkubace primokultur je 22 - 24 hodin, při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Při podezření na nález kolonií patogenních bakterií se suspektní kolonie izolují na krevním agaru s následnou inkubací 22 – 24 hodin při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Po získání čisté bakteriální kultury následuje identifikace patogenu, pro kterou je doporučeno využití metody MALDI – TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight). Patogenní bakterie, které jsou identifikací potvrzeny jako původce onemocnění, mohou být dále podle druhu a vlastností jednotlivých patogenů dále typizovány za účelem zjištění jejich virulence. Základními typizačními metodami jsou sérologické metody (pro určení sérotypů u identifikovaného druhu bakterií, pokud jsou popsány) nebo molekulárně diagnostické metody, např. PCR (pro zjištění přítomnosti genů virulence u identifikovaného druhu bakterií, pokud jsou popsány).

II c) Stanovení citlivosti k antibiotikům

Vyšetření citlivosti/rezistence k antibiotikům musí být provedeno zcela v souladu se závaznými mezinárodními metodikami podle Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) nebo European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST) a na základě výsledků vyšetření

jsou izoláty zařazeny do tří kategorií citlivosti: citlivý – intermediární – rezistentní. Při provedení vyšetření je důležité dodržet podmínky přípravy inokula (hustota, čerstvost), použít správná kultivační média a dobu a podmínky kultivace, které se často podle druhu patogenů odlišují. K vyšetření je možné použít difúzní metody (disková difúzní metoda) nebo diluční metody (agarová, bujónová diluční nebo mikrodiluční metoda). Kombinací obou metod je komerčně vyráběný E-test. Při provedení difúzních metod zjišťujeme na agarech zóny inhibice kolem disků se známým obsahem antibiotik a při provedení dilučních metod zjišťujeme minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik, které zabraňují růstu jednotlivých bakteriálních populací. Pomocí E-testu zjišťujeme hodnoty MIC na základě velikosti zóny difúze kolem papírového proužku s obsahem antibiotika pomocí stupnice uvedené na proužku.

Podle velikosti zóny inhibice nebo podle zjištěné MIC stanovíme, zda je bakterie citlivá, intermediární nebo rezistentní k vyšetřovaným antibiotikům. Pokud je u vyšetřovaného bakteriálního izolátu – původce onemocnění zjištěna citlivost ke kombinaci sulfamethoxazol s trimethoprimem, můžeme zahájit léčbu onemocnění dle následujícího doporučeného postupu. Přestože je mechanismus účinků obou těchto substancí rozdílný, tak společně v kombinaci obě účinné látky blokují dva následné stupně biosyntézy DNA, které jsou zásadní pro bakterie, které si samy syntetizují kyselinu dihydrolistovou a tetrahydrolistovou. Sulfamethoxazol soutěží na základě anti-metabolické interference s para-aminobenzoovou kyselinou o enzym dihydropterát-syntetázu a brání tak tvorbě dihydropteroové kyseliny. Trimethoprim kompetitivně inhibuje enzym dihydrofolát-reduktázu a tím zabraňuje redukci kyseliny listové na dihydrolistovou a tetrahydrolistovou kyselinu. Tímto vzájemným dvojitým působením účinných substancí dochází k depleci základního kofaktoru biosyntézy nukleových kyselin (DNA). Cílem kombinovaného působení sulfamethoxazolu a trimethoprimu je snížení rizika vzniku rezistentních kmenů bakterií a dosažení maximálního synergického antimikrobiálního účinku vůči řadě grampozitivních i gramnegativních bakterií.

II d) Farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti sulfamethoxazolu a trimethoprimu

Pro provedení farmakokinetických studií byly použity tyto čisté léčivé substance Sulfamethoxazol (Registrační číslo CAS: 723-46-6) a Trimethoprim (Registrační číslo CAS:

738-70-5), v chemické čistotě odpovídající Evropskému lékopisu (Ph.Eur.). Pro kvantitativní hodnocení pohybu léčivých substancí v organismu cílového zvířete v závislosti na čase, který závisí v hlavní míře na daném léčivu, na cestě podání a na působení organismu na léčivo, a s použitím matematických přístupů, byly určeny PK parametry, které nám umožnily srovnávat léčivé substance mezi sebou a stanovit optimální dávku. PK experimenty byly provedeny na cílovém zvířeti - testovacím systému brojlerů kura domácího, hybridní linie ROSS 308. Druh hybridní linie neměl na výsledek vliv, hybridní linie ROSS byla zvolena z důvodu snadné dostupnosti brojlerů v chovech v České republice a výhodné standardizaci. Dnes jsou k výkrmu určeny speciální masné hybridy, a to převážně ROSS a COBB, kteří tak patří mezi nejrozšířenější plemena v užitkových chovech. Pro tyto hybridy jsou stanoveny propracované technologické postupy výkrmu a spočítány přesné parametry užitkovosti, které by měli jedinci v daném dni věku při dodržení stanovených podmínek dosahovat, a proto se dal pokus lépe standardizovat. Výběr biologického testovacího systému byl dále založen na získání vzorků o dostatečném objemu. Biologické testovací systémy byly zdraví jedinci cílového druhu, u nichž bylo možno očekávat bezproblémový příjem krmiva a vody, a tím zabezpečit příjem testované položky.

Do provedených studií byli zařazeni jednodenní brojleři obojího pohlaví, poměr pohlaví neměl na studii vliv. Pokusná zvířata byla krmena *ad libitum* standardní krmnou směsí dle receptury BR1 (BIOSTAN), odpovídající dané věkové kategorii bez antikokcidik z důvodu možných interferencí s testovanými léčivými látkami a ovlivnění správnosti výsledků při analýzách biologického materiálu. Krmná směs byla používána po celou dobu studií. Po celou dobu pokusu byl zajišťován welfare jednotlivých brojlerů v souladu se zákonem 246/1992 Sb. Klimatické a světelné podmínky, velikost prostor ustájení, krmení a napájení zvířat bylo nastaveno tak, aby odpovídalo požadavkům na odchov brojlerů, bylo denně kontrolováno a upravováno. Manipulace s brojlery byla šetrná a byla omezena na nejmenší možnou míru. Brojleři byli chováni ve větších skupinách, v počtech odpovídajících prostoru chovného boxu, po dobu 14 dnů potřebných k aklimatizaci. K jejich rozdělení do menších skupin došlo až v den začátku aplikace dávek testovaných léčiv (15. den studie). Průměrná živá hmotnost brojlerů v den aplikace (16. den života) dle technologického postupu činí 593 g, skutečně naměřená hmotnost byla v rozmezí 450 – 535 g. Roztok pro aplikaci byl připraven naředěním veterinárního léčivého přípravku o fixní kombinaci sulfamethoxazolu s trimethoprimu v hmotnostním poměru 5 : 1 do pitné vody, takto připravený roztok byl kuřatům jednotlivě aplikován v objemu 1 ml *per orálně* pomocí stříkačky se sondou.

Postupně byly uskutečněny dvě PK studie. První studie byla „pilotní“. V obou studiích probíhala v experimentálních stájích VÚVeL experimentální část studie se zvířaty a laboratorní část studie byla provedena ve společnosti TEKRO s.r.o. Praha.

Kinetika změny plazmatických koncentrací cílových analytů sulfamethoxazolu a trimethoprimu v závislosti na časových intervalech byla měřena na analytických zařízeních využívajících vysoce citlivých a přesných metod na základě kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií typu triple-Q (LC-MS/MS) a orbitrap s vysokým rozlišením (LC-MS/MS-HR). Použité analytické metody pro stanovení koncentrací cílových analytů ve vzorcích kuřecích sér byly validovány v plném rozsahu dle mezinárodních standardů pro biochemické metody ve veterinární medicíně: pokynu CVMP/VICH/591/98 VICH GL 2 a pokynu EMEA/CVMP/VICH/463202/2009 VICH GL 49. Základní parametry hmotnostní spektrometrie pro molekuly cílových analytů jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1) a příklad naměřeného chromatografického spektra s vyznačenými integrovanými plochami píků pro určení koncentrace analytu trimethoprimu a hmotnostního spektra v odpovídajícím retenčním čase analytu pro konfirmační identifikaci molekuly analytu je uveden na Obrázku 1.

Stanovení základních farmakokinetických parametrů (C_{max} , T_{max} a AUC) bylo provedeno v souladu s mezinárodními standardy. Vypočtené hodnoty základních PK parametrů veterinárních léčivých substancí trimethoprimu a sulfamethoxazolu v séru brojlerů po jednorázové a opakované orální aplikaci - C_{max} , T_{max} a AUC jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tabulky 2 a 3). Příklady grafického vyhodnocení průběhu farmakokinetických křivek je uveden na Obrázcích 2 a 3.

Tabulka 1. Identifikace analytu trimethoprimu a sulfamethoxazolu pomocí parametru MA (mass accuracy) v hmotnostní spektrometrii s využitím vysokého rozlišení $RP = 70\ 000$ (FWHM).

Analyt	Elementární složení	m/z	MA (ppm)	Elementární složení produktového iontu	m/z	MA (ppm)	RT (min)
		prekurzorový iont (Da)			produktový iont (Da)		
Trimethoprim	$[C_{14}H_{19}N_4O_3]^+$	291.145 17	-1.03	$[C_{12}H_{13}N_4O_3]^+$	261.098 22	-1.91	1.53
				$[C_5H_7N_4]^+$	123.066 51	-0.08	1.53
Trimethoprim-d ₉	$[C_{14}H_{10}D_9N_4O_3]^+$	300.201 66	-2.03	$[C_{12}H_{10}D_3N_4O_3]^+$	264.117 05	-2.95	1.51
Sulfamethoxazol	$[C_{10}H_{12}N_3O_3S]^+$	254.059 39	-0.08	$[C_6H_6NO_2S]^+$	156.011 38	0.19	3.81
				$[C_6H_6NO]^+$	108.044 62	2.13	3.81
Sulfamethoxazol- ¹³ C ₆	$[C_4^{13}C_6H_{12}N_3O_3S]^+$	260.079 52	0.04	$[^{13}C_6H_6NO_2S]^+$	162.031 5	-0.06	3.82

Pozn.: FWHM = full width at half maximum; MA = mass accuracy; MS = mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie); RP = resolving power (rozlišovací schopnost); RT = retenční čas

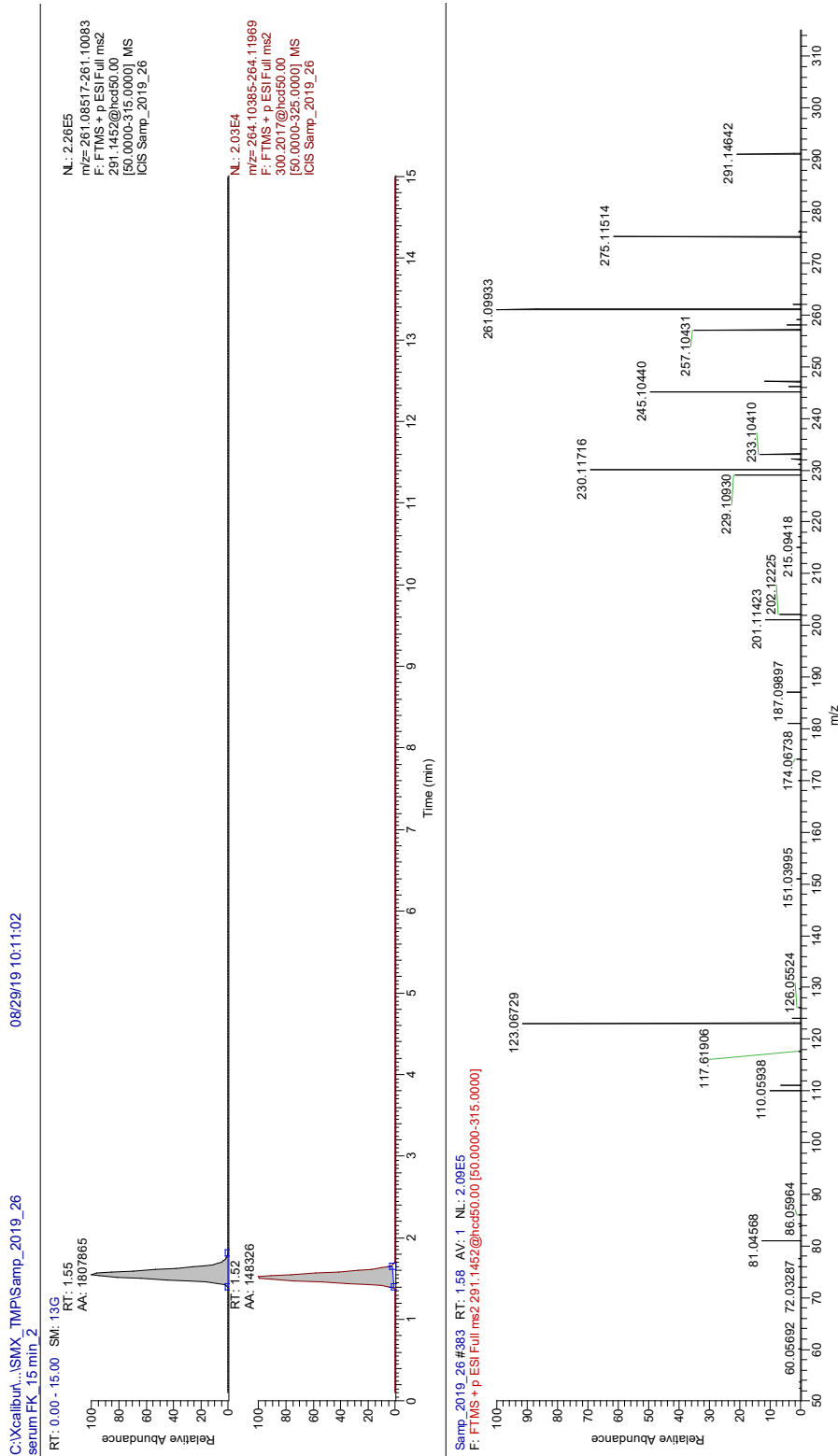
Tabulka 2. Přehled farmakokinetických parametrů fixní kombinace účinných látek Sulfamethoxazolu a Trimethoprimu při dávkování 33 mg (27,5 mg + 5,5 mg) na 1kg živé hmotnosti po jednorázovém a opakovaném podání; pilotní PK studie (C_{max} je maximální koncentrace v séru, T_{max} je čas maximální koncentrace v séru, k_{el} je rychlostní konstanta absorpce, $t_{1/2}$ značí eliminační poločas, AUC_t značí plochu pod křivkou koncentrace v čase od 0 do t, AUC_{∞} značí celkovou plochu pod křivkou koncentrace)

Parametr \pm SD	Jednorázové podání		Opakované podání (3 dny)	
	Sulfamethoxazol	Trimethoprim	Sulfamethoxazol	Trimethoprim
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	47,1 \pm 15,3	2,1 \pm 1,0	35,58	1,59
T_{max} (h)	1	1,5	1	2,2
k_{el} (1/h)	0.004 6 \pm 0.000 3	0.009 \pm 0.001	-	-
$t_{1/2}$ (h)	1,92	0,88	1,64	0,75
AUC_t ($\mu\text{g.h/ml}$)	89,676 \pm 26,9	2,901 \pm 1,4	85,86 \pm 24,1	2,702 \pm 1,2
AUC_{∞} ($\mu\text{g.h/ml}$)	94,612 \pm 28,4	2,907 \pm 1,5	91,10 \pm 25,2	2,705 \pm 1,2

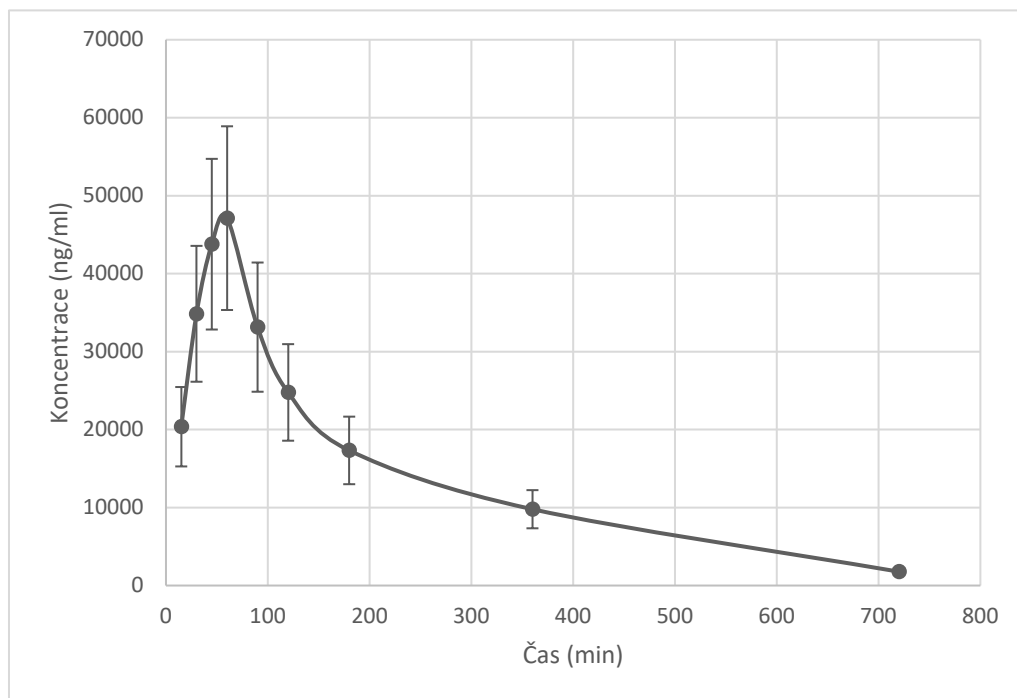
Tabulka 3. Přehled farmakokinetických parametrů fixní kombinace účinných látek Sulfamethoxazolu a Trimethoprimu při dávkování 45 mg (37,5 mg + 7,5 mg) na 1kg živé hmotnosti po jednorázovém a opakovaném podání; PK druhé studie (C_{max} je maximální koncentrace v séru, T_{max} je čas maximální koncentrace v séru, k_{el} je rychlostní konstanta absorpce k_a je rychlostní konstanta eliminace, $t_{1/2}$ značí eliminační poločas, AUC značí plochu pod křivkou koncentrace, V_D značí distribuční objem, Cl značí clearance)

Parametr \pm SD	Jednorázové podání		Opakované podání	
	Sulfamethoxazol	Trimethoprim	Sulfamethoxazol	Trimethoprim
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	58,657	1,289	95,790	1,133
T_{max} [min]	65,51	47,30	49,28	36,37
k_e [min^{-1}]	0,00415 \pm 0,00018	0,00755 \pm 0,00036	0,00462 \pm 0,00018	0,00802 \pm 0,00053
k_a [min^{-1}]	0,03793 \pm 0,00582	0,04554 \pm 0,00898	0,05481 \pm 0,01227	0,06597 \pm 0,01557
$t_{1/2}$ [min]	167,06 \pm 6,08	91,80 \pm 3,56	149,94 \pm 4,89	86,45 \pm 4,66
AUC (SMX [$\mu\text{g/ml/min}$] TMP [ng/ml/min])	12,79 \pm 2,93	176,55 \pm 38,03	14,90 \pm 3,35	149,77 \pm 72,82
V_D [ml]	267,3 \pm 33,6	2092,8 \pm 257,9	175,8 \pm 22,4	2676,7 \pm 411,3
Cl [ml/min]	1,109	15,799	0,813	21,457

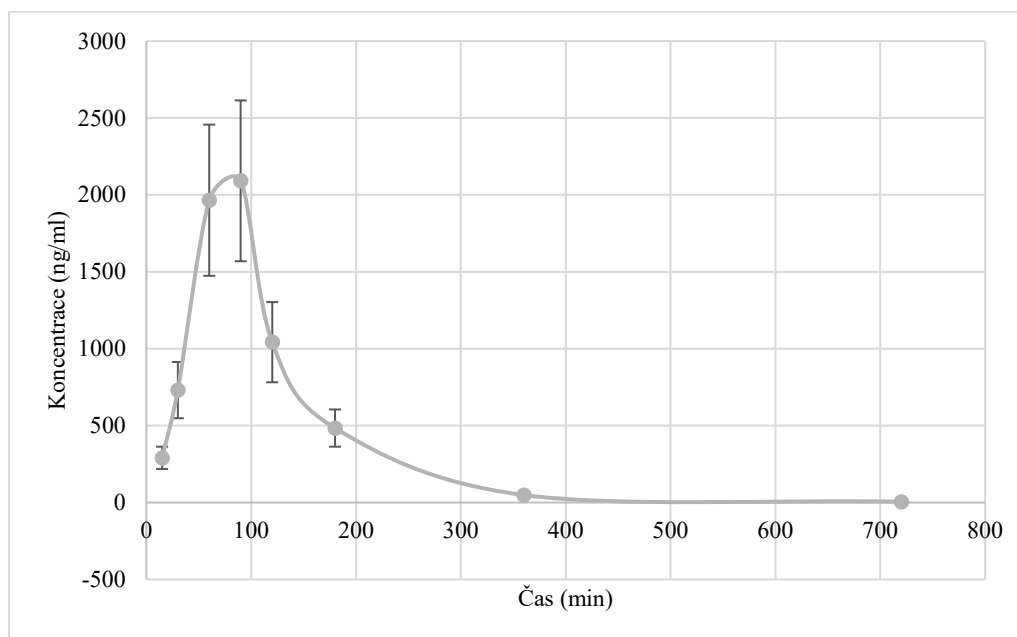
Obrázek 1: Chromatogram a hmotnostní spektrum trimethoprimu v reálném vzorku séra a v čase T_{max} farmakokinetické křivky po orální aplikaci brojleru kura domácího. Všechny naměřené chromatografické data byly automaticky integrovány a kvantitativní koncentrace byly stanoveny na základě matricové (sérum) kalibrační křivky s přidávkem izotopicky značených interních standardů Trimethoprim-D9 a Sulfamethoxazole-13C6.



Obrázek 2: Časový průběh PK křivky pro změnu koncentrace v séru brojlerů po jednorázové orální aplikaci Sulfamethoxazolu, dávkování 27,5 mg/kg živé hmotnosti (body na křivce představují průměr \pm SD).



Obrázek 3: Časový průběh PK křivky pro změnu koncentrace v séru brojlerů po jednorázové orální aplikaci Trimethoprimu, dávkování 5,5 mg/kg živé hmotnosti (body na křivce představují průměr \pm SD).



Farmakokinetické vlastnosti (experimentálně ověřené v provedených studiích)

Absorpce

Po perorálním podání brojlerům se obě léčivé látky rychle a velmi dobře absorbují z gastrointestinálního traktu do systémové cirkulace.

Distribuce

Maximální koncentrace (C_{\max}) každé složky v séru bylo dosaženo za krátkou dobu po jednorázovém podání: hodnoty T_{\max} se pohybují okolo 1 hodiny. Maximální sérové koncentrace vykazují výrazné rozdíly u každého ošetřeného zvířete, naměřeny byly na hladinách $C_{\max} = 1,3$ až $2,1 \mu\text{g/ml}$ pro trimethoprim, resp. C_{\max} v rozmezí $47\text{--}59 \mu\text{g/ml}$ sulfamethoxazolu. Distribuce obou účinných složek byla u brojlerů rozdílná; trimethoprim má více lipofilní fyzikálněchemický charakter, tedy lépe pronikal do tkání, naopak sulfamethoxazol má více hydrofilní charakter, z tohoto důvodu se lépe distribuoval v intersticiálním prostoru a v séru byly naměřeny výrazně vyšší koncentrace. Distribuční objem V_d sulfamethoxazolu byl 267 ml a trimethoprimu byl 2093 ml po jednorázové aplikaci, a 176 ml u sulfamethoxazolu a 2677 ml u trimethoprimu po opakované aplikaci (3 dny).

Biotransformace

Obě složky kombinace byly primárně metabolizovány v játrech, sulfamethoxazol hlavně acetylací a konjugací s kyselinou glukuronovou, trimethoprim hlavně oxidací a hydroxylací.

Eliminace

Obě léčivé substance a jejich metabolity se vylučují ledvinami a díky jejich fyzikálně chemickým vlastnostem (hydrofilitě/lipofilitě) byla eliminace ze séra rychlejší u trimethoprimu v porovnání s sulfamethoxazolem. Eliminační poločas $t_{1/2}$ byl u trimethoprimu $< 1,5$ hodiny, zatímco eliminační poločas $t_{1/2}$ sulfamethoxazolu byl v rozmezí $2\text{--}3$ hodiny. A v souladu s tím byly i odpovídající vyčíslené hodnoty Cl (clearance), vyšší u trimethoprimu $15,8 \text{ ml/min}$ po jednorázové aplikaci, $21,5 \text{ ml/min}$ po opakované aplikaci a nižší u sulfamethoxazolu $1,1 \text{ ml/min}$ po jednorázové aplikaci, respektive $0,8 \text{ ml/min}$ po opakované aplikaci. Měřitelné koncentrační hladiny na úrovni LOQ (Limit kvantifikace daný použitou analytickou metodou) těchto substancí v krvi (séru) brojlerů, lze nalézt ještě v čase 6 hodin u trimethoprimu, v čase 14 hodin, po jednorázové aplikaci odpovídající dávky.

Inhibiční účinnost kombinace trimethoprimu a sulfamethoxazolu byla hodnocena stanovením MIC této kombinace u 114 terénních izolátů aviárně patogenní *Escherichia coli* (APEC) provedením bujónové mikrodiluční metody podle mezinárodně závazných metodik vydaných EUCAST a CLSI (Tabulka 4).

V mikrotitračních destičkách byla v ředící řadě 1:2 naředěna kombinace trimethoprimu a sulfamethoxazolu v hmotnostním poměru 1:19. Testované koncentrace trimethoprim/sulfamethoxazol byly v rozmezí 0,5/9,5 mg/l – 64/1216 mg/l. Do každé jamky bylo podle přesně uvedeného postupu (EUCAST, CLSI) inokulováno požadované množství bakteriální kultury o požadované denzitě. Po následné kultivaci 18 hodin při 35 °C byly odečítány výsledky. Jako MIC byla zaznamenána první koncentrace testované kombinace trimethoprimu a sulfamethoxazolu v ředící řadě, která viditelně zabránila růstu bakteriální kultury (čirá jamka bez zákalu). Jako kontrola kvality testování bylo provedeno souběžné testování referenčního kmene *E. coli* ATCC 25922, u kterého je stanoveno odpovídající rozmezí naměřené koncentrace pro kombinaci trimethoprimu a sulfamethoxazolu.

Rozdělení izolátů do kategorií citlivosti (citlivé a rezistentní) bylo provedeno podle interpretačních kritérií (= breakpointů) uvedených pro *E. coli* (Enterobacterales) v EUCAST. Citlivé izoláty mají MIC v rozmezí od $\leq 0,5/9,5$ mg/l do 2/38 mg/ml a rezistentní izoláty mají hodnotu MIC vyšší než 4/76 mg/l.

Tabulka 4. Distribuce MIC (minimální inhibiční koncentrace) u izolátů APEC ($n = 114$)

koncentrace trimethoprim/sulfamethoxazol	Počet izo- látů	Vyjádřeno v %
>64/1216	20	17,6
64/1216	2	1,8
32/608	0	0
16/304	0	0
8/152	0	0
4/76	1	0,9
2/38	1	0,9
1/19	3	1,6
$\leq 0,5/9,5$	87	76,3

II e) Doporučený postup léčby brojlerů sulfamethoxazolem v kombinaci s trimethoprimem

Pro úspěšnost terapie je nejdůležitější včasné zahájení parenterální léčby nemocných prasat vhodnými antimikrobiálními látkami. Je třeba nezapomenout, že je antibiotickou léčbu zapotřebí kombinovat s dobrou zoohygienickou praxí – zejména je důležitá čistota prostředí a vybavení stájí, správné větrání a dostatek prostoru pro zvířata.

Použití klinicky aplikované farmakokinetiky na cílovém druhu zvířete bylo hlavním nástrojem k predikci koncentrace léčiva v ustáleném stavu, druhým nástrojem bylo použití hodnocení antimikrobní účinnosti „*in vitro*“. Na základě těchto použitých experimentálních přístupů bylo možno optimalizovat a individualizovat dávkování za různých podmínek (různá dávka, jednorázová nebo opakovaná aplikace). Porovnáním C_{max} a AUC s mikrobiologickou účinností každé ze zkoumaných účinných látek byla stanovena účinná dávka jejich kombinace a opakovaná dávka.

Navržené **nové složení** a dávkování veterinárního léčivého přípravku obsahujícího sulfamethoxazol v kombinaci s trimethoprimem je pro brojlera kura domácího podané:

Sulfamethoxazolu + trimethoprim v hmotnostním poměru 4 : 1. Další výhodou je v tomto případě dávkování 20 mg (v kombinaci 16 mg sulfomethoxazolu + 4 mg trimethoprimu) na 1 kg živé hmotnosti.

Přípravek může být podaný v jedné dávce nebo v opakované dávce po dobu 3 – 5 dnů. Je vhodný zejména pro podávání při léčbě bakteriálních infekcí brojlerů v rané fázi výkrmu drůbeže, optimálně po prvních 14 dnech života drůbeže, ale lze ho podat i v pozdějších dnech v průběhu celého cyklu výkrmu za předpokladu dodržení předepsaných ochranných lhůt. Bakteriálními infekcemi se rozumí zejména infekce dýchacích cest, infekce kůže a infekce měkkých tkání u drůbeže.

Přípravek lze podávat optimálně v pitné vodě nebo krmivu. Pro dosažení homogenního pokrytí celého hejna je však vhodnější aplikace léčiva v pitné vodě. Veterinární léčivý přípravek může dále obsahovat alespoň jednu pomocnou látku, vybranou ze skupiny zahrnující nosiče, jako

jsou přírodní polymery (například chitosan, kyselina alginová, karageny, arabská guma, pektiny) nebo syntetické polymery (například kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, deriváty poly(ethylen glykolu)) nebo látky upravující chuťové vlastnosti (například cukry: laktózu, maltózu, kyselinu citronovou).

Veterinární léčivý přípravek dle předkládaného technického řešení lze připravit prostým smícháním sulfamethoxazolu s trimethoprimem ve výše uvedeném poměru, popřípadě jejich rozpuštěním ve vodě nebo fyziologickém roztoku. Případně může být k účinné složce přidána pomocná látka, jako jsou přírodní polymery (například chitosan, kyselina alginová, karageny, arabská guma, pektiny) nebo syntetické polymery (například kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, deriváty poly(ethylen glykolu)) nebo látky upravující chuťové vlastnosti (například cukry: laktózu, maltózu, kyselinu citronovou).

Takto je poskytnuta přesně definovaná a bezpečná léčivá směs s optimálně stanoveným dávkováním, vhodná pro masné i nosné linie drůbeže, která ve vysoké účinnosti dosahuje maximálního synergického antimikrobiálního účinku vůči řadě gram pozitivních i gram negativních bakterií a zároveň významně snižuje rizika vzniku rezistentních kmenů těchto bakterií. Účinnost navrhované léčby je ověřena léčbou experimentální infekce 10-denních brojlerů aviárně patogenními kmeny *E. coli*.

Pro srovnání:

Nyní používané složení registrovaných veterinárních přípravků obsahujících sulfamethoxazol a trimethoprim:

Sulfamethoxazol + trimethoprim v hmotnostním poměru 5 : 1. Doporučené dávkování 30 - 45 mg na 1 kg živé hmotnosti (dle doporučeného dávkování u konkrétního přípravku).

Dodržování ochrany zvířat

V provedených PK studiích byl dále uplatněn:

- Zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání v platném znění
- Vyhláška č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat v platném znění
- Experimentální část studie proběhla v prostorách experimentálních stájí VÚVeL na základě oprávnění k používání experimentálních zvířat rozhodnutím Ministerstva zemědělství č.j. 5050/2020-MZE-18134, spisová značka 16OZ15806/2019-18134, jehož platnost je do 24. 3. 2025.

- Experimentální část studie proběhla dle schválených projektů pokusů VÚVeL 23-2018, č.j. 39317/2019-MZE-18134 a 24-2018, č.j. 75253/2018-MZE-17214.

Použité postupy získávání dat pro vývoj léčiv byly v souladu s mezinárodními standardy na provedení farmakokinetických studií, průkaz účinnosti antibiotik a kombinací léčiv.

III) Srovnání „novosti postupů“

Stanovené nové složení veterinárního léčiva určeného k léčbě brojlerů je navrženo na základě provedení přesných PK a PD studií dle závazných postupů, které definuje Evropská léková agentura (EMA), laboratorní analýzy odebraných vzorků ze zvířat byly provedeny novými a moderními metodami s využitím hmotnostní spektrometrie.

U drůbeže a zejména u brojlerů kura domácího byly PK a PD vlastnosti antimikrobik definovány pouze u omezeného spektra antimikrobiálních látek a dostupná data byla generována před desítkami let, byla měřena jinými, méně přesnými metodami než je požadováno dnes podle směrnic EU. Tehdy chovaná plemena kura domácího měla jiný genetický základ v rámci šlechtění, brojleři dnes nejčastěji chovaných plemen Ross a Comb jinak využívají potravu, mají jiné denní přírůstky, což souvisí s množstvím přijímané potravy a tekutin a tím i možností medikovat krmivo nebo pitnou vodu. Z důvodů nedostatku relevantních dat nebyly možné registrace nových povolených veterinárních léčivých přípravků pro drůbež.

Léčba nově navrženým veterinárním léčivým přípravkem má oproti všem podobným, doposud používaným produktům, tyto technické výhody:

- obsahuje kombinaci antimikrobiálních léčivých látek volně použitelných ve veterinární medicíně bez jakýchkoli restrikcí, částečných omezení či zákazu použití,
- doporučené dávkování je optimalizováno pro drůbež, zejména pro brojlerů kura domácího, v závislosti na dosažené hmotnosti a souvisejícím věku a vede k významnému snížení užívání (nadužívání) antimikrobik,
- použití stanoveného optimálního složení přípravku a optimálních dávek (významně snížených oproti zavedené praxi) může přispět k omezení rozvoje a především šíření rezistence bakterií ke kombinaci trimethoprimu a sulfamethoxazolu vlivem selekčního tlaku,

- navržené významné snížení účinné dávky antimikrobik vede k celé řadě pozitivních efektů v rámci využívání těchto léčiv ve veterinární medicíně, například: účinnou ochranu kura domácího s minimalizovanou zátěží jeho organismu, zkrácením ochranné lhůty pro použití v potravinovém řetězci, snížení reziduální zátěže životního prostředí po vyloučení zbytků léčiv a jejich metabolitů z organismu na farmách a jejich okolí, zejména užití u odpadních vod.

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika má sloužit veterinárním lékařům a chovatelům kuřat pro účel konzultace možné nově navržené léčby bakteriálních infekcí brojlerů. Uplatnění metodiky se projeví ve zkvalitnění terapie infekcí brojlerů bakteriálního původu kontrolovaným cíleným dávkováním navržených antimikrobik s řízenou optimalizovanou účinností, zlepšením zdravotní situace v chovech kuřat a v dlouhodobém horizontu může přispět k omezení nadužívání antibiotik ve veterinární medicíně a tím omezit šíření nežádoucích rezistencí bakteriálních populací k antibiotikům.

V) Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou minimální, metody izolace, identifikace, typizace a testování antimikrobiálních rezistencí je u jiných bakteriálních původců onemocnění zvířat ve veterinárních diagnostických laboratořích běžně prováděno a je cenově dostupné.

Ekonomický přínos uplatňování doporučených léčebných postupů je významný pro chovatele hospodářských zvířat, kterým se zlepšením zdravotní situace v chovu sníží náklady na léčbu nemocných zvířat a zvýší ekonomické výnosy v důsledku produkce kvalitních potravin.

VI) Seznam použité a související literatury

Baert K., De Baere S., Croubels S., De Backer P. Pharmacokinetics and oral bioavailability of sulfadiazine and trimethoprim in broiler chickens. *Vet Res Commun* 2003;27:301-309.

Bedor D.D.G., Goncalves T.M.M.L.L, Ferreira M.L.L, De Sousa C.E.M., Menezes A.L., Oliveira E.J., De Santana D.P. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis: Comparison of HPLC with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B* 2008;863:46-54.

European Medicines Agency:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004355.pdf

European Medicines Agency:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/02/WC500200984.pdf

European Medicines Agency:

https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-development-fixed-combination-medicinal-products-revision-2_en.pdf

European Medicines Agency:

VICH GL27 Guidance on the pre-approval information for registration of new veterinary medicinal products for food-producing animals with respect to antimicrobial resistance:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004308.pdf

European Medicines Agency:

VICH GL46: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: metabolism study to determine the quantity and identify the nature of residues:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl46-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals_en.pdf

EMA/CVMP/EWP/133/199-Rev.1 (Draft): Guideline on conduct of pharmacokinetic studies in target animal species.

Goetting V., Lee K.A., Tell L.A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residue in eggs: a review of the literature. J Vet Pharmacol Therap 2011;34:521-556.

Mistri H.N., Jangid A.G., Pudage A., Shah A., Shrivastav P.S. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in microgram quantities from low plasma volume by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Microchem J 2010;94:130-138.

Sumano H., Hernandez L., Gutierrez, Bernad-Bernad M.J. Sustained availability of trimethoprim in drinking water to achieve higher plasma sulphonamide-trimethoprim antibacterial activity in broilers. Br Poult Sci 2005;46:114-118.

Wang X., Zhang Y., Qin K., Nian S., Xiao T., Zhang Q., Wang X., Ma J. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in rat plasma by LC-ESI-MS and its application to a pharmacokinetic study. J Liq Chromatogr Relat Technol 2012;35:951-962.

Yang YA, Liu XW, Li B, Li SH, Kong XJ, Qin Z, Li JY. Simultaneous determination of diaveridine, trimethoprim and ormetoprim in feed using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Chem. 2016 Dec;212(1):358-66.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice / Výstupy z originální práce

Ginterová P., Žouželková P., Petreň M., Víšková M., Nedbalcová K.: Stanovení obsahu trimethoprimu a sulfamethoxazolu v požitelných tkáních kura domácího v rámci depleční studie. Chemagazín 2020, 5, 12-14.

Ginterová P., Jeřábek M., Zapletal T., Víšková M., Žouželková P., Nedbalcová K. Kvantitativní stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu v krevním séru kura domácího v rámci farmakokinetické studie. Veterinářství 2021;71(1), 40-44.

Nedbalcová, K., Stolář, P., Bzdil, J., Šenk, D., Sládeček, V., Papoušková, A., Matiašková, K., Zouharová, M.: Sledování rezistence k antimikrobikům u aviárně patogenních izolátů *Escherichia coli* z jednodenních kuřat v chovech v ČR v roce 2021. Veterinářství 2022;72(4):213-217.

Putecova K., Nedbalcova K., Bartejsova I., Zouharova M., Matiaszkova K., Jeklova E., Viskova M., Zouzelkova P., Jerabek M., Stastny K.: Experimental determination of the pharmacokinetic properties of trimethoprim and sulfamethoxazole combination in the blood serum of broiler chickens. Veterinarni Medicina 2021;66(6):248-256.

Šťastný, K., Nedbalcová, K., Zouharová, M., Matiašková K., Bartejsová, I., Charvátová, M., Tošnerová, K., Víšková, M., Petreň, M., Jeřábek, M., Ondrouch, J.: Veterinární léčivý přípravek na bázi trimethoprimu a sulfamethoxazolu určený pro drůbež. Užitený vzor CZ 3625 U1, zapsáno u Úřadu průmyslového vlastnictví 29. 11. 2022.

OPONENTI:

1. doc. Ing. Petr Sláma, Ph.D., MENDELU Brno
2. MVDr. Tomáš Jarosil, Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy

Dedikace:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství RO0523 a Národní agentury pro zemědělský výzkum č. QK1910057.

VU^{Ve}L 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz