



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

---

### Návrh doporučeného postupu léčby brojlerů amoxicilinem v kombinaci s kyselinou klavulanovou

**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 146/2023**

### **Návrh doporučeného postupu léčby brojlerů amoxicilinem v kombinaci s kyselinou klavulanovou**

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 978-80-7672-039-8

**Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy ČR**

**v y d á v á**

**O S V Ě D Ě N Í**

SVS/2023/128610-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 146/2023: Návrh doporučeného postupu léčby brojlerů amoxicilinem v kombinaci s kyselinou klavulanovou**

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  
Mgr. Jan Radoš  
**Radoš** Datum: 2023.10.02  
09:39:35 +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 amoxicilinem v kombinaci s kyselinou klavulanovou. 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 amoxicilinu s kyselinou klavulanovou 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 amoxicilin s kyselinou klavulanovou, můžeme zahájit léčbu onemocnění dle následujícího doporučeného postupu.

Amoxicilin je polosyntetické antibiotikum patřící do skupiny penicilinů, tzv. „ $\beta$ -laktamové antibiotikum“, která jsou primárně odvozená z aminokyseliny 6-aminopencilanové. Tato základní aminokyselina má ve své molekule v přírodním materiálu velmi vzácně se vyskytující  $\beta$ -laktamový kruh. Amoxicilin se vyznačuje širokým spektrem vysoké účinnosti proti řadě gram pozitivním i gram negativním mikroorganismů. Mechanismus účinků amoxicilinu a  $\beta$ -laktamových antibiotik obecně, spočívá v zásahu do biosyntézy mukopeptidu buněčné stěny bakterií. Stěna buňky bakterií je v základě tvořena polymerem mezi substituovanou muramovou kyselinou vázanou na peptid, který tvoří „spojovací můstek“ síťové struktury s další substituovanou muramovou kyselinou. Tato pevné mřížovaná síť buněčné stěny je narušována amoxicilinem, který zabraňuje vzniku příčných vazeb při tvorbě buněčné stěny bakteriální buňky v místech D-alaninu, který se tím vyřazuje z biosyntézy, tedy pevnost buněčné stěny nestačí vnitřnímu tlaku, zejména při růstu buňky, a dochází k její lýze.

Nevýhodou amoxicilinu je jeho významná citlivost vůči enzymům typu  $\beta$ -laktamáza, které v molekule amoxicilinu štěpí  $\beta$ -laktamový kruh. Účinnost amoxicilinu je od samého počátku zavedení jeho používání v medicíně primárně omezena proti původním, přírodním bakteriím (např. stafylokoky), které jsou schopny produkovat tyto typy  $\beta$ -laktamázových enzymů. Dnes

ale nabývají na závažnosti i skupiny bakterií, které si postupně během času rezistenci vytvořily a získaly vlastní schopnost produkovat tyto typy enzymů, tzv. rezistentní bakterie.

Kyselina klavulanová je nevratný (ireverzibilní) inhibitor intracelulárních a extracelulárních  $\beta$ -laktamáz, účinný proti celé řadě těchto enzymů, včetně enzymů II. až V. třídy (podle Richmonda a Sykese). Kyselina klavulanová proto účinně chrání amoxicilin před inaktivací mnoha typy  $\beta$ -laktamáz a tím rozšiřuje antibakteriální spektrum amoxicilinu, kdy většinu izolátů produkujících  $\beta$ -laktamázu činí citlivými na toto antimikrobiální léčivo. V provedených klinických studiích jsou amoxicilin/kyselina klavulanová bakteriologicky i klinicky účinnější než samotný amoxicilin a získané publikované výsledky prokazují, že jsou přinejmenším stejně účinné, jako řada jiných srovnávacích látek, jako jsou například perorálně podávané cefalosporiny, kotrimoxazol, doxycyklin, enrofloxacinu a bacampicilin, při léčbě nejběžnějších forem infekcí, se kterými se setkáváme v běžné praxi, tj. infekcí dýchacích cest, infekcích kůže a infekcí měkkých tkání.

Samotná kyselina klavulanová má pouze slabou antibakteriální aktivitu, s výjimkou *Legionella* spp. a určitých kmenů *Branhamella catarrhalis*, *B. fragilis* a *Neisseria gonorrhoeae*. Přidáním kyseliny klavulanové k amoxicilinu se však zvyšuje citlivost na amoxicilin rezistentních kmenů gramnegativních a grampozitivních aerobních a anaerobních bakterií, kde je rezistence způsobena produkcí  $\beta$ -laktamázy. A v důsledku užití této kombinace léčiv byla antibakteriální aktivita amoxicilinu významně obnovena, a to v době, kdy šíření zvyšující se rezistence na amoxicilin v důsledku rozšiřující se produkce  $\beta$ -laktamáz i rezistentních bakterií, vážně ohrožovalo jakékoli použití tohoto antimikrobika k léčbě infekcí.

#### **II d) Farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti amoxicilinu a kyseliny klavulanové**

Amoxicilin (Registrační číslo CAS: 26787-78-0) byl ve veterinárním léčivém přípravku použit ve formě amoxicilin trihydratu (CAS: 61336-70-7) a kyselina klavulanová (Registrační číslo CAS: 58001-44-8) ve formě draselné soli (CAS: 61177-45-5, Kalii clavulanas) nebo ve formě litné soli (CAS: 61177-44-4, Lihtium clavulanas). 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 brojlerem 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 (14. den studie). Průměrná živá hmotnost brojlerů v den aplikace (15. den života) dle technologického postupu činí 535 g, skutečně zvážená hmotnost byla v rozmezí 289,9 – 314,6 g vyjádřeno jako 95% interval spolehlivosti, průměrná živá hmotnost byla 302,2 g. Roztok pro aplikaci byl připraven naředěním veterinárního léčivého přípravku o fixní kombinaci amoxicilinu s kyselinou klavulanovou v molárním poměru 4 : 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 v analytických laboratořích VÚVeL v.v.i. Brno.

Kinetika změny plazmatických koncentrací cílových analytů amoxicilinu a kyseliny klavulanové v závislosti na časových intervalech byla měřena na analytických zařízeních využívajících vysoce citlivých a přesných metod na základě kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií typu 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 Tabulce 1 a příklad naměřeného chromatografického spektra s vyznačenými integrovanými plochami píků pro určení koncentrace analytu kyseliny klavulanové 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 amoxicilinu a kyseliny klavulanové v séru brojlerů po jednorázové a opakované orální aplikaci -  $C_{\max}$ ,  $T_{\max}$  a AUC jsou uvedeny v Tabulkách 2 a 3. Příklady grafického vyhodnocení průběhu farmakokinetických křivek je uveden na Obrázcích 2, 3 a 4.

**Tabulka 1.** Identifikace analytu amoxicilinu a kyseliny klavulanové pomocí parametru MA (mass accuracy) v hmotnostní spektrometrii s využitím vysokého rozlišení  $RP = 70\,000$  (FWHM).

Kyselina klavulanová			Tazobactam (IS)			
Elementární složení	[C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>			[C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S] <sup>-</sup>		
m/z prekursorový iont	198.04080			299.04556		
Mass accuracy precursorového ionu (ppm)	-1.62			0.10		
Fragmentační energie (eV)	17			30		
m/z identifikační produktový iont	136.0404	82.02984		255.05573	207.08875	
m/z kvantifikační produktový iont			108,04549			138.05605
Mass accuracy produktového iontu (ppm)	-2.65	-3.41	-1.20	0.74	0.29	0.65
ESI mód	negativní			negativní		
RT (min)	Acetonitrile	Plasma	Meat	Acetonitrile	Plasma	Meat
	1.34	1.26	1.29	1.38	1.27	1.38
Amoxicilin			Tazobactam (IS)			
Elementární složení	[C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S] <sup>-</sup>			[C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S] <sup>-</sup>		
m/z prekursorový iont	419.13623594			299.04556		
Mass accuracy precursorového ionu (ppm)	-1.27			0.10		
Fragmentační energie (eV)	35			30		
m/z identifikační produktový iont	136.0404	82.02984		255.05573	207.08875	
m/z kvantifikační produktový iont			108,04549			138.05605
Mass accuracy produktového iontu (ppm)	-2.65	-3.41	-1.20	0.74	0.29	0.65
ESI mód	negativní			negativní		
RT (min)	Acetonitril	Plazma	Sval	Acetonitril	Plazma	Sval
	1.34	1.26	1.29	1.38	1.27	1.38

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

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

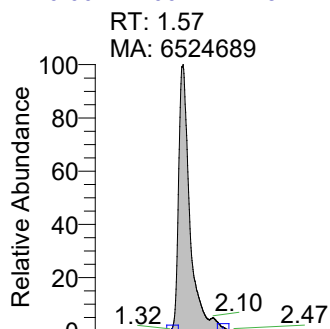
Stanovení základních farmakokinetických parametrů ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$  a AUC) bylo provedeno v souladu s mezinárodními standardy. Vypočtené hodnoty základních PK parametrů veterinárních léčivých substancí amoxicilinu a kyseliny klavulanové v séru brojlerů po jednorázové a opakované orální aplikaci -  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  a AUC jsou uvedeny v Tabulkách 2 a 3. Příklady grafického vyhodnocení průběhu farmakokinetických křivek je uveden na Obrázcích 2, 3 a 4.

**Obrázek 1:** Chromatogram a hmotnostní spektrum kyseliny klavulanové v reálném vzorku plazmy a v čase  $T_{max}$  farmakokinetické křivky po orální aplikaci brojleru kura domácího. Všechna naměřená chromatografická data byla automaticky integrována a kvantitativní koncentrace byly stanoveny na základě matricové (sérum) kalibrační křivky s přidavkem interního standardu Tazobactam (IS).

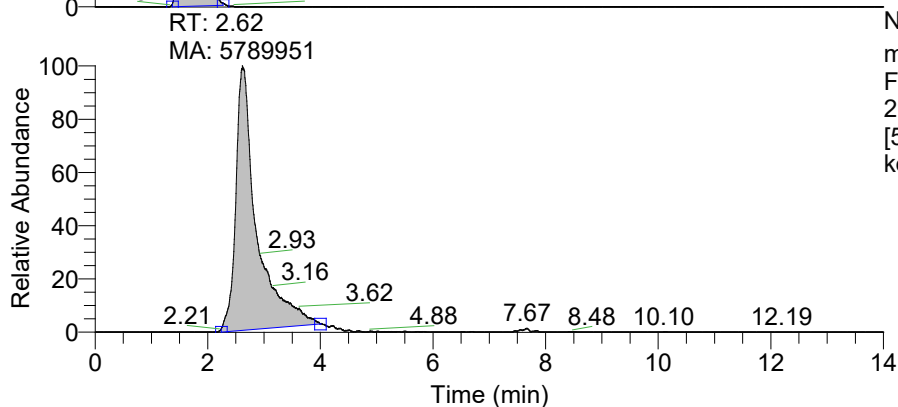
D:\data\...\Kontrola QC\kontrola\_QC\_03

02/23/22 15:17:13

RT: 0.00 - 14.00 SM: 15B



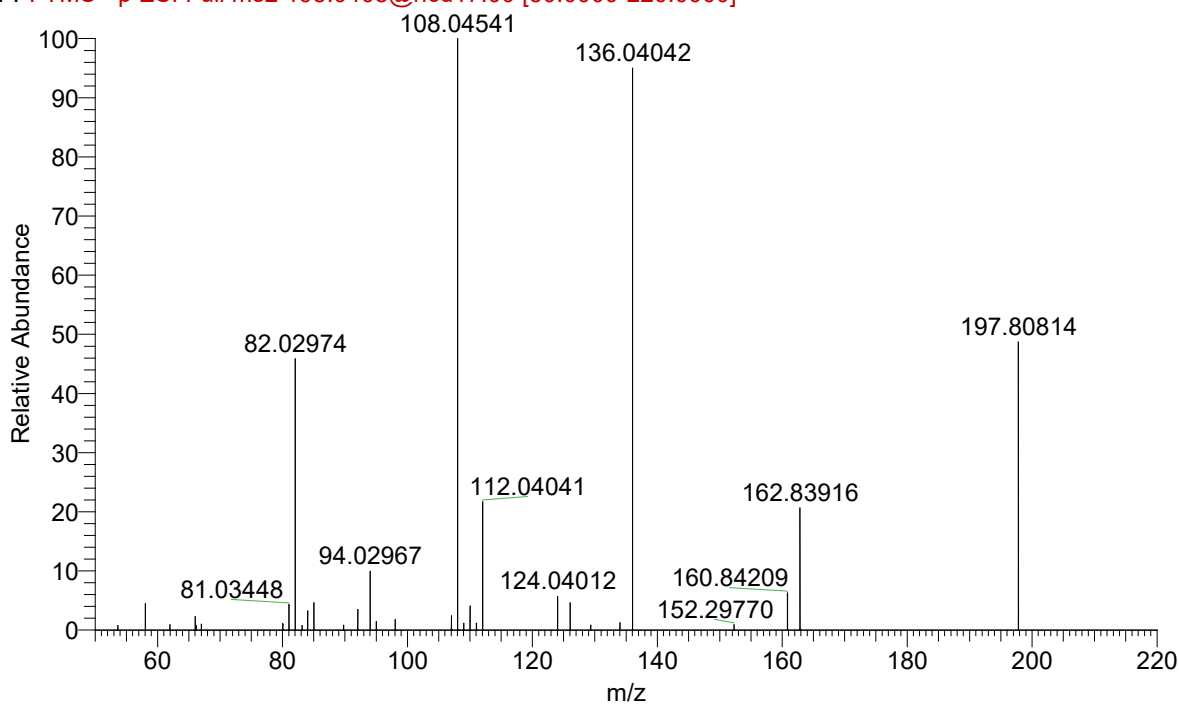
NL: 4.75E5  
m/z= 108.04441-108.04657  
F: FTMS - p ESI Full ms2  
198.0408@hcd17.00  
[50.0000-220.0000] MS  
kontrola\_QC\_03



NL: 2.26E5  
m/z= 138.05467-138.05743  
F: FTMS - p ESI Full ms2  
299.0456@hcd30.00  
[50.0000-325.0000] MS  
kontrola\_QC\_03

kontrola\_QC\_03 #739 RT: 1.64 AV: 1 NL: 3.03E5

F: FTMS - p ESI Full ms2 198.0408@hcd17.00 [50.0000-220.0000]



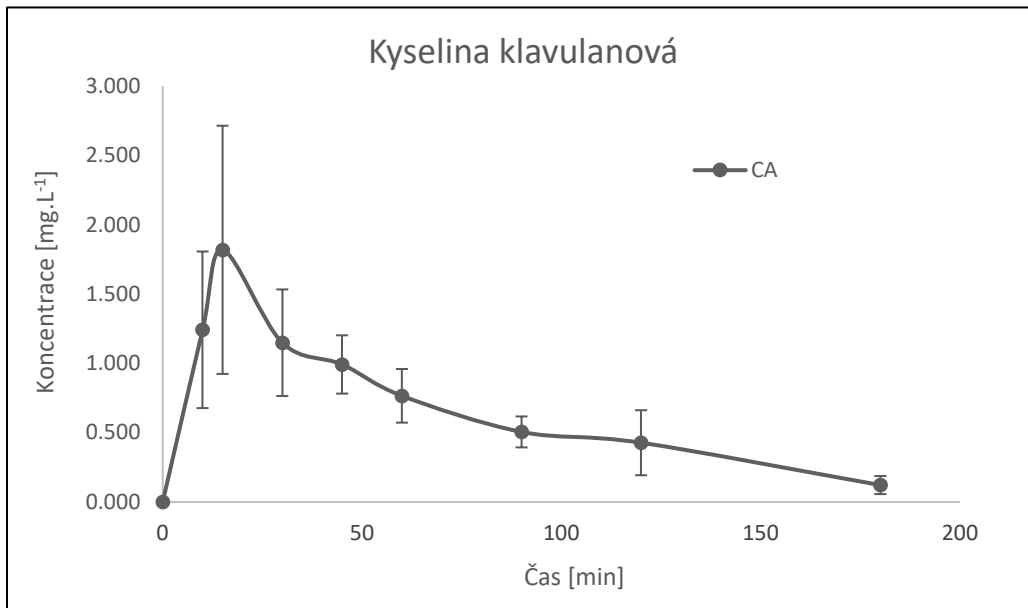
**Tabulka 2.** Shrnutí získaných farmakokinetických parametrů kyseliny klavulanové a amoxicilinu v poměru 4 : 1 a dávce 10 mg amoxicilinu (ve formě soli trihydrátu) a 2,5 mg kyseliny klavulanové (ve formě draselné soli) na 1 kilogram živé hmotnosti v první „pilotní“ studii:  $C_{max}$  – maximální koncentrace,  $T_{max}$  – čas dosažení maximální koncentrace,  $T_{1/2}$  – biologický poločas eliminace,  $K_{el}$  – eliminační konstanta, AUC – plocha pod křivkou koncentrací léčiva

Parametr	Hodnota		Jednotka
	Kyselina klavulanová	Amoxicilin	
$C_{max}$	1,82 ± 0,90	11,39 ± 2,75	mg.L <sup>-1</sup>
$T_{max}$	0,25	0,25	hod
$T_{1/2}$	0,80	0,98	hod
$K_{el}$	0,87 ± 0,04	0,70 ± 0,01	hod <sup>-1</sup>
AUC <sub>0-1440</sub>	2,39	13,33	mg.hod.L <sup>-1</sup>
AUC <sub>1440-∞</sub>	0,01	0,01	mg.hod.L <sup>-1</sup>
AUC <sub>0-∞</sub>	2,40	13,40	mg.hod.L <sup>-1</sup>

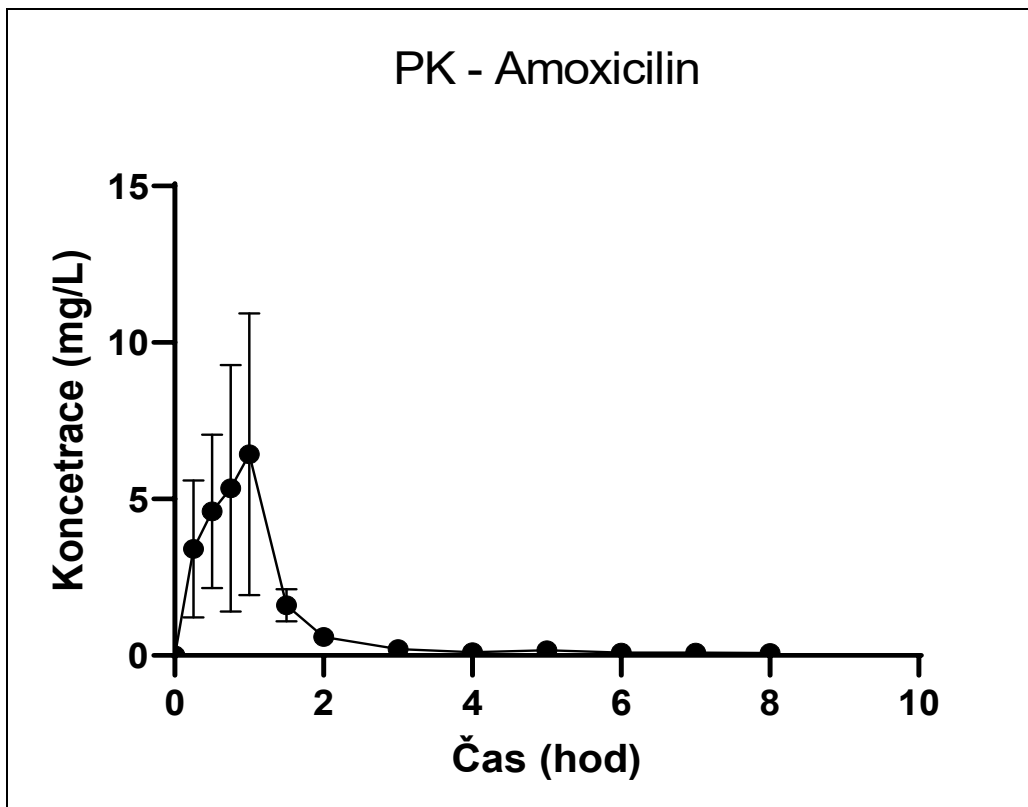
**Tabulka 3.** Shrnutí získaných farmakokinetických parametrů kyseliny klavulanové a amoxicilinu v poměru 4 : 1 a dávce 10 mg amoxicilinu (ve formě soli trihydrátu) a 2,5 mg kyseliny klavulanové (ve formě draselné soli) na 1 kilogram živé hmotnosti v druhé studii:  $C_{max}$  – maximální koncentrace,  $T_{max}$  – čas dosažení maximální koncentrace,  $T_{1/2}$  – biologický poločas eliminace,  $K_{el}$  – eliminační konstanta, AUC – plocha pod křivkou koncentrací léčiva

PK parametr	Kyselina klavulanová	Amoxicilin	Jednotka
$C_{max}$	2,58	6,43	mg.l <sup>-1</sup>
$T_{max}$	0,5	1	hod
$T_{1/2}$	0,41	0,86	hod
AUC	3,52	7,69	mg.hod.l <sup>-1</sup>
Interval spolehlivost 95% AUC	(1,65; 5,39)	(4,59; 10,80)	mg.hod.l <sup>-1</sup>
$K_{el}$	1,67	0,9	hod <sup>-1</sup>

**Obrázek 2:** Příklad výsledné farmakokinetické křivky antimikrobika (kyselina klavulanová) po perorální aplikaci brojlerovým kuřatům.

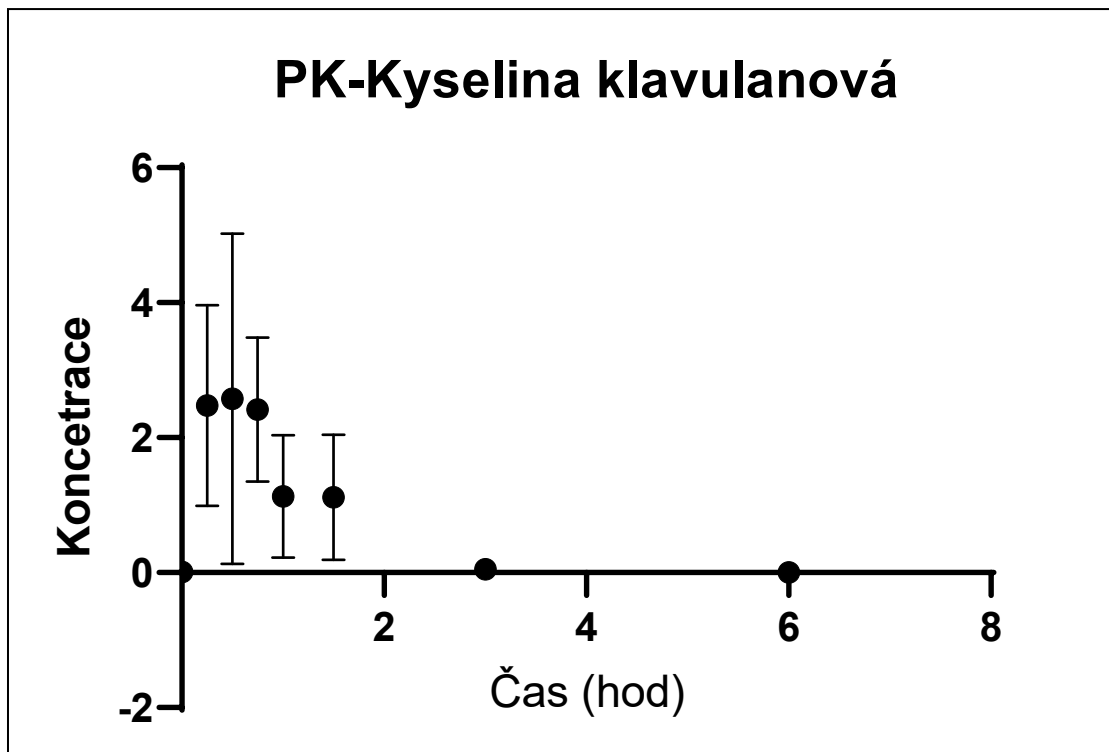


**Obrázek 3:** Grafické vyhodnocení průběhu farmakokinetické křivky, závislosti koncentrace amoxicilinu v plazmě (mg/l) na čase po jednorázové perorální aplikaci brojlerovým kuřatům.





**Obrázek 4:** Grafické vyhodnocení průběhu farmakokinetické křivky, závislosti koncentrace kyseliny klavulanové v plazmě (mg/l) na čase po jednorázové perorální aplikaci brojlerovým kuřatům.



#### *Farmakokinetické vlastnosti (experimentálně ověřené v provedených studiích)*

##### Absorpce

Léčivé substance amoxicilin a kyselina klavulanová, které jsou aplikovány ve formě solí, mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti (amoxicilin  $pK_a=2,8$ ; kyselina klavulanová  $pK_a=2,7$ ) a z pohledu farmakokinetiky se chovají velmi podobně. Po perorálním podání brojlerům se obě léčivé substance rychle a velmi dobře absorbují z gastrointestinálního traktu do systémové cirkulace. Amoxicilin i kyselina klavulanová jsou biologicky dostupny z přibližně 65 - 70 %.

##### Distribuce

Maximální plazmatické koncentrace každé složky bylo u brojlerů dosaženo za krátkou dobu po jednorázovém podání: hodnoty  $T_{max}$  se pohybovaly v rozmezí 0,25 až 1 h. Maximální plazmatické koncentrace vykazovaly výrazné rozdíly u každého jednotlivě ošetřeného zvířete, naměřeny byly na hladinách  $C_{max} = 1,82$  až  $2,58$  mg/l pro kyselinu klavulanovou, resp.  $C_{max}$  v rozmezí  $6,34$ – $11,39$  mg/l u amoxicilinu. Obě látky se jen mírně váží na plazmatické proteiny a

rychle se distribuují do tělních tekutin a tkání. Nízká vazba na plazmatické proteiny urychluje a usnadňuje vlastní distribuce do všech tkání. Zdánlivý distribuční objem  $V_d$  byl okolo 0,3 až 0,4 l/kg pro amoxicilin a okolo 0,2 l/kg pro kyselinu klavulanovou a to i po opakovaném podání (5 dnů).

### Biotransformace

Obě použité léčivé substance byly primárně metabolizovány v játrech, metabolismus amoxicilinu byl v menší míře omezen na hydrolyzu beta-laktamového kruhu a byl transformován na neúčinnou kyselinu penicilanovou v množstvích ekvivalentních až 10 až 25 % počáteční dávky a v této formě vyloučen. Kyselina klavulanová je z menší části (do 10%) metabolizována na 1-amino-4 hydroxybutan-2-one.

### Eliminace

Obě léčivé substance a jejich metabolity se vylučují ledvinami, většina podané dávky byla eliminována v aktivní formě a díky jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem, byla eliminace z plazmy velmi rychlá. Eliminační poločas  $t_{1/2}$  byl u amoxicilinu  $< 0,8$  hodiny, eliminační poločas  $t_{1/2}$  kyseliny klavulanové byl 0,4–0,8 hodiny. A v souladu s tím byly i odpovídající hodnoty eliminačních konstant:  $K_{el} = 0,7 \text{ hod}^{-1}$  pro amoxicilin a  $K_{el} = 0,8 \text{ hod}^{-1}$  pro kyselinu klavulanovou. Měřitelné plazmatické koncentrační hladiny na úrovni LOQ (Limit kvantifikace daný použitou analytickou metodou) těchto substancí v krvi brojlerů, lze analyzovat ještě v rozmezí 4 až 6 hodin u amoxicilinu, v čase 3 hodin u kyseliny klavulanové, po jednorázové aplikaci odpovídající dávky.

### ***Mikrobiologická účinnost***

Inhibiční účinnost kombinace amoxicilinu a kyseliny klavulanové byla hodnocena stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) této kombinace u 114 terénních izolátů aviárně patogenní *Escherichia coli* (APEC) provedením bujónové mikrodiluční metody podle mezinárodně závazných metodik vydaných European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Tabulka 4).

V mikrotitračních destičkách byla v ředící řadě 1:2 naředěna kombinace amoxicilinu a kyseliny klavulanové (v molárním poměru 2:1, který je stanoven pro testování citlivosti/rezistence bakterií). Pro testování byl použit trihydrát amoxicilinu a draselná sůl kyseliny klavulanové. Testované koncentrace amoxicilinu byly v rozmezí 0,125 mg/l – 32mg/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 amoxicilinu a kyseliny klavulanové 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 amoxicilinu a kyseliny klavulanové.

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 pro amoxicilin v rozmezí od  $\leq 0,125$  mg/l do 8 mg/ml, intermediární izoláty mají hodnotu MIC 16 mg/l a rezistentní izoláty mají hodnotu MIC vyšší než 32 mg/l.

**Tabulka 4.** Distribuce MIC u izolátů APEC ( $n = 114$ )

Koncentrace amoxicilin/kyselina klavulanová (mg/l)*	Počet izolátů	Vyjádřeno v %
>32	1	0,9
16	1	0,9
8	2	1,8
4	49	43,0
2	30	26,3
1	28	24,6
0,5	3	2,6
0,25	0	0
$\leq 0,125$	0	0

\*koncentrace v tabulce platí pro amoxicilin

## **II e) Doporučený postup léčby brojlerů amoxicilinem v kombinaci s kyselinou klavulanovou**

Pro úspěšnost terapie je nejdůležitější včasné zahájení parenterální léčby nemocných kuřat 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 poměr léčivých látek a zároveň upravit dávkování za různých podmínek (různá dávka, jednorázová nebo opakovaná aplikace).

Porovnáním C<sub>max</sub> a AUC s mikrobiologickou účinností každé ze zkoumaných účinných látek byla stanovena účinná dávka jejich kombinace a opakovaná dávka. Jako optimální poměry a optimální dávkování bylo pro brojlera kura domácího stanoveno následující:

- 1) V molárním poměru 3 : 1 (amoxicilin : kyselina klavulanová) to je 8 mg kombinace na 1 kg živé hmotnosti**, podané ve čtyřech nebo šesti dávkách denně po dobu 5 dnů,
- 2) V molárním poměru 2 : 1 (amoxicilin : kyselina klavulanová) to je 9 mg kombinace na 1 kg živé hmotnosti**, podané ve čtyřech nebo šesti dávkách denně po dobu 5 dnů.

Přípravek může být podán ve čtyřech nebo šesti dávkách denně po dobu 5 dnů (počet dávek závisí na věku kuřat). 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 pro dosažení homogenního pokrytí celého hejna. 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(ethylenglykolu)) nebo látky upravující chuťové vlastnosti (například cukry: laktózu, maltózu, kyselinu citronovou).

Veterinární léčivý přípravek dle předkládaného technického řešení lze připravit prostým smícháním amoxicilinu a kyseliny klavulanové ve výše uvedeném molárním poměru, popřípadě jejich rozpuštěním ve vodě nebo fyziologickém roztoku. Případně mohou být k účinné složce přidány pomocné látky, 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(ethylenglykolu)) 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 antimikrobního 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*.

#### *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 pro kyselinu klavulanovou, která významně potencuje účinnost širokospektrálních penicilinových antibiotik, používanou zejména v kombinaci s amoxicilinem jako inhibitor beta-laktamáz, nebyly tyto studie na cílovém druhu zvířat – kur domácí - brojler, dosud provedeny vůbec, a proto nebylo možné registrovat k léčbě brojlerů léčivo, obsahující kombinaci těchto látek. Metodika proto vychází z unikátní PK studie, kterou autoři jako první zveřejnili v loňském roce formou užitého vzoru.

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 brojlery 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 amoxicilinu a kyseliny klavulanové 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 přispěje 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**

Cazorla-Reyes R, Romero-Gonzalez R, Frenich AG, Maresca MAR, Vidal JLM. Simultaneous analysis of antibiotics in 334 biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2014;89:203-12. doi: 10.1016/j.jpba.2013.11.004

European Medicines Agency:

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC50004355.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC50004355.pdf)

European Medicines Agency:

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2016/02/WC500200984.pdf](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](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](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](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl46-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals_en.pdf)

EMEA/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.

Reyns T, De Baere S, Croubels S, De Backer P. Determination of clavulanic acid in calf plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2006;41(11):1414-20. doi: 10.1002/jms.1106.

Reyns T, De Boever S, De Baere S, De Backer P, Croubels S. Quantitative analysis of clavulanic acid in porcine tissues by 331 liquid chromatography combined with electrospray



ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 332 2007;597(2):282-9. doi: 10.1016/j.aca.2007.06.056.

Yoon KH, Lee SY, Kim W, Park JS, Kim HJ. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by 317 HPLC-ESI mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 318 2004;813(1-2):121-7. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.09.018.

Zhang JH, Wang YF, Xie H, Wang R, Jia ZP, Men XD, et al. Pharmacokinetics Study of Amoxicillin and Clavulanic acid (8:1)-320 A New Combination in Healthy Chinese Adult Male Volunteers Using the LC-MS/MS Method. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 321 2013;65(3):363-72. doi: 10.1007/s12013-012-9440-4.

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

Ginterová P., Žouželková P., Petreň M., Víšková M., Jeřábek M., Peč J., Nedbalcová K. Kvantitativní stanovení amoxicilinu v požitelných tkáních kura domácího v rámci depleční studie. *Veterinářství* 2020;70(11), 721-726.

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., Stastny K.: Mass spectrometric identification and quantification of the antibiotic clavulanic acid in broiler chicken plasma and meat as a necessary analytical tool in finding ways to increase the effectiveness of currently used antibiotics in the treatment of broiler chickens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2021, April 14, doi: 10.1007/s00216-021-03307-6.

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 amoxicilinu a kyseliny klavulanové určený pro drůbež. Užité vzor CZ 3626 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.

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic  
Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)