

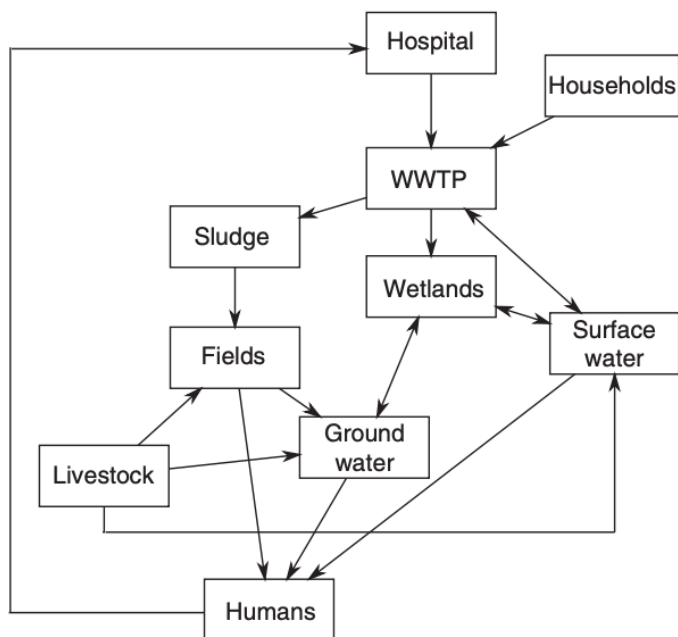


Остатъците от антимикробни средства в околната среда и животинските торове като възможен вариант за разпространение на АМР

Научна информация

През последните десетилетия прекомерната употреба и злоупотребата с антибиотици в хуманната и ветеринарната медицина се превърна в сериозен проблем за общественото здраве (СЗО, 2014; *Aidara-Kane et al., 2018*). Увеличеният брой на устойчивите патогени и коменсалните бактерии е свързан с разпространението на антибиотиците в околната среда и разпространението на гени, отговорни за АМР. Освен това разпространението на антибиотиците в околната среда може да доведе до промяна (*Han et al., 2018*) и загуба (*Chen et al., 2019*) на микробното разнообразие в почвите (*Kemper, 2008*).

Антибиотичната резистентност е проблем, който нараства в световен мащаб и е от първостепенно значение за общественото и животинското здраве. Според доста учени и проведени проучвания в областта, **третирането на почвата с оборска тор е една от основните причини за разпространението и натрупването на остатъци от антимикробни средства (АМС), резистентни бактерии (АРВ) и гени, отговорни за АМР (ARG) в околната среда и респективно в системата почва-вода.** През последните десетилетия проучванията върху въздействието на оборската тор върху почвените микробиоми се увеличиха експоненциално, по-специално върху таксономичното разнообразие и разпространението на гените, отговорни за АМР. Гените на антибиотичната резистентност често са групирани в мобилни генетични елементи (*MGE*). Хоризонталният генен трансфер към широк спектър от бактерии (включително патогени и човешки коменсални бактерии) е идентифициран като основна причина за тяхното постоянно циркулиране и разпространение в околната среда и за нарушаване на биобаланса. Този преглед анализира най-новите изследвания на разпространението на антибиотиците и *ARG* в околната среда посредством животинските отпадъци. Наскоро са **преразгледани стратегии за контрол на разпространението на ARG и устойчивостта на АМС, с цел да се идентифицират методи за мониторинг на генния трансфер и мобилните генетични елементи, отговорни за резистентността и екологичните условия, насърчаващи такава дифузия.**



Фиг. 1: Антибиотиците и гените, отговорни за АМР могат да попаднат в околната среда посредством разнообразие от пътища и начини, показани на графиката

Антибиотиците се използват в световен мащаб в животновъдството, като по този начин се увеличава рискът от разпространение на антимикробна резистентност. Когато се прилагат за профилактично лечение, антибиотиците могат директно да увеличат селективното налягане, като по този начин благоприятстват генерирането на устойчиви на антибиотици бактерии (ARB; Pruden et al., 2013; Troiano et al., 2018; Blau et al., 2019). Поради тези причини следва да бъдат приети **подобрени стратегии за управление на химичните отпадъци и остатъците от отглеждане на продуктивни животни** (т.е. диетиката, отглеждането на животните, третирането на отпадъците от производствата, използването на добавки и експлоатационните условия) **за ограничаване на употребата на антибиотици в животновъдството.**

Част от стратегиите, предприети в борбата срещу антимикробната резистентност следват подхода „Едно здраве“.

През 2017 г. Комисията прие **нов европейски план за действие в областта на здравеопазването и борбата с АМР.** Целта му е да намали появата и разпространението на АМР и да създаде нови ефективни антимикробни средства в и извън ЕС. В рамките на този план за действие ЕК се ангажира да преразгледа до 2021 г. своето решение за изпълнение 2013/652/ЕС относно мониторинга и докладването на АМР в бактериалните изолати от храни и продуктивни животни. За повече информация относно европейският план за действие срещу АМР в духа на стратегията „Едно здраве“ и основните цели, заложи в него би могло да бъде намерено на следния

линк: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_2017_action-plan.pdf

През 2021г. ЕОБХ (EFSA) създаде документа „*Zoonoses, antimicrobial resistance and food-borne outbreaks guidance for reporting 2020 data*“, който също дава ценни насоки на ДЧ за изискванията и правилата по докладване на данни, свързани с АМР. Този технически доклад на ЕОБХ представя насоките за докладване на данни на ДЧ на

ЕС и на държави, които не са членки на ЕС, като се използва обмен на данни във формат XML, в платформата *Data Collection Framework (DCF)*. Докладването обхваща: количествени данни за антимикробните средства, основани на конкретен брой изолати, данни за резистентност, както и отчитане на данни за разпространението на зоонози и микробиологични агенти и замърсители в храните, данни за огнища на инфекции, предавани от храни, данни за популации животни и данни за състоянието на заболяването. Настоящият доклад предоставя насоки за докладване на данни съобразно Директива 2003/99/ЕО, Регламент (ЕО)2017/625, Регламент за изпълнение (ЕО) 2019/627 на Комисията и Решение за изпълнение ЕО/2013/652 на Комисията. Повече информация и самият технически доклад би могъл да бъде намерен на следния линк: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-6438>

Приет през 2017 г., планът за действие срещу АМР предоставя добавена стойност

на държавите членки (ДЧ) в намирането на иновативни, ефективни и устойчиви отговори на проблема, концентрирайки се върху правилното използване на антимикробните средства при хората и животните, профилактиката и контрола на инфекциите, оценка на риска и мониторинг на зоонози и патогенни за човека бактериални щамове, както и засиленото разработване и предлагане на нови, ефективни антимикробни средства - в допълнение към други мерки за профилактика и лечение на инфекциите и засилване на сътрудничеството с ДЧ и заинтересованите страни. Целта е ЕС да се превърне в регион с най-добри практики, да се засилят научните изследвания и да се набележи глобален план за действие. Европейската комисия вече прие новите насоки на плана за разумно използване на антимикробни средства в хуманната медицина. Европейската комисия (ЕК) обедини силите си със Световната здравна организация (СЗО/WHO), Организацията за икономическо сътрудничество и развитие (ОИСР), Организацията по прехрана и земеделие (FAO), Световната организация за здраве на животните (OIE), Европейски орган по безопасност на храните (ЕОБХ/EFSA), Център за контрол и превенция на заболяванията (CDC) и други международни организации за взаимопомощ в борбата с АМР. Държавите членки единодушно решиха да изготвят индивидуални национални планове за действие срещу АМР, които да са в съответствие с Глобалния план за действие срещу АМР, както и да прилагат съответните политики и планове за предотвратяване, контрол и наблюдение на АМР. Повече информация за глобалния план за действие срещу антимикробната резистентност може да бъде намерен на следния линк: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>

Документът на OIE, FAO и WHO (тристранното споразумение) на тема: „*International instruments on the use of antimicrobials across the human, animal and plant sectors*“ (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/336379>), изготвен през 2020г. предоставя преглед и анализ на международните ръководни документи, които осигуряват стандарти, инструкции и ръководства, свързани с производството, дистрибутирането и търговията, употребата и обезвреждането и изхвърлянето на антимикробните средства (АМС). В този документ ясно са посочени и систематизирани всички стратегии и ръководни документи, свързани с **антимикробните средства и влиянието им върху околната среда и биоразнообразието**. Основният фокус на ръководните документи е доброто управление на продуктите или веществата през целия им жизнен цикъл, особено в техния последен етап, т.е. управлението на отпадъците. Освен това, като се има предвид, че факторите на водата, хигиената и отпадните води играят ключова роля за

разпространението в околната среда на АМС или метаболити и предаването на АМР, също се вземат предвид ръководните документи и инструкциите, които осигуряват **стандарт за качество на околната среда и за опазване на водата**. Както е показано в **таблица 1**, екологичните аспекти са най-вече включени в специфични за сектора ръководства и инструкции. Антимикробните вещества също биха могли да попаднат в обхвата на множество други международни ръководни документи, свързани с околната среда, но не всички те имат едно и също въздействие върху употребата на антимикробни средства. Връзката между употребата на антимикробни вещества и екологичните ръководни документи, включени в този наръчник, са две: целта на тези ръководни документи и ефекта от приложените стандарти. Целта на разглежданите документи следва да включват антимикробните вещества поради техните антимикробни свойства, а не само поради екологични причини. Ефектът от разпоредбите трябва да бъде напътстващ, и то как се използват антимикробните вещества. В това отношение **има недостиг на международни ръководни документи, които осигуряват тези екологични стандарти**.

Някои международни химически конвенции (Стокхолмската конвенция за устойчивите органични замърсители; Ротердамската конвенция за процедурата по предварително информирано съгласие за определени опасни химикали и пестициди в международната търговия; Базелската конвенция за контрол на трансграничните движения на опасни отпадъци и тяхното обезвреждане (*the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants; the Rotterdam Convention on the Prior Informed Consent Procedure for Certain Hazardous Chemicals and Pesticides in International Trade; the Basel Convention on the Control of Transboundary Movements of Hazardous Waste and Their Disposal*)) са разгледани при определяне на връзката между околната среда и антимикробните вещества. Въпреки че конвенциите включват някои вещества, които се използват и като антимикробни вещества (например различни устойчиви органични замърсители, използвани като противогъбични препарати), включването им не се основава на антимикробните свойства на въпросните вещества или рисковете, които те представляват за развитието и разпространението на АМР. Тези документи обаче предоставят възможност за справяне с АМР, тъй като очертават съществуващите механизми, които уреждат използването, търговията и обезвреждането на опасни химикали, продукти и отпадъци, включително определянето, мониторинга и прилагането на националните насоки.

Антимикробните вещества могат да повлияят на екосистемите, когато те се освобождават по време на производството, консумацията, изхвърлянето и/или неподходящо изхвърляне. Освобождаването на антимикробни вещества или други химични вещества в околната среда - от домакинства, болнични отпадъчни води, оттичане на животински отпадни води и отпадъци от производствени предприятия както и употребата на торове – може да доведе до концентрации на тези вещества, главно в повърхностни води като езера и реки, но също и в отпадъчни води, подземни води, почви и торове и дори в питейна вода. **Антропогенните дейности увеличават значението на околната среда като път за експозицията на АМР на човека**. Селективното натоварване на бактериалните съобщества от към антибиотични остатъци, биоциди (или химикали с антимикробни свойства, напр. дезинфектанти, антисептици, детергенти, козметика, хранителни консерванти), тежки метали (напр. сребро, цинк, мед, хром, олово), ПАВ (полициклични ароматни въглеводороди) и антидепресанти могат да допринесат за повишаване на АМР в околната среда. Един обвързващ документ, който би могъл да обхване използването на антимикробни вещества, е Конвенцията на Икономическата комисия за Европа на ООН (UNECE

протоколи (*United Nations Economic Commission for Europe*) за оценка на въздействието върху околната среда в трансграничен контекст (известен като Конвенцията Еспо от 1991г.) и допълващия протокол за контрол на замърсяването, Протокола на ООН за стратегическа оценка на околната среда към Конвенцията за оценка на въздействието върху околната среда в трансграничен контекст (2003г.). Конвенцията *UNECE* и протоколът определят задълженията на страните да оценяват трансграничното въздействие върху околната среда на някои дейности на ранен етап от планирането. По-специално протоколът включва не само акцент върху човешкото здраве, но също така проекти, свързани с *API* и фармацевтичното производство, както и интензивното животновъдство (включително птицевъдството) и рибовъдството, както и специфични видове управление на отпадъците. Стратегическата оценка на околната среда, определена в протокола, може да бъде отправна точка за намаляване на антимикробните вещества в околната среда. Протоколът обаче е приет само от 33 държави, повечето от които са в Европа. Освен това доказателствата за въздействието на антимикробните вещества върху околната среда остават ограничени и поради това понастоящем е малко вероятно да бъдат включени в такива оценки.




Друга възможност може да се окаже задължителния протокол на Организацията на обединените нации за освобождаване и трансфер на замърсители към Конвенцията за достъп до информация, публично участие във вземането на решения и достъпа до правосъдие по въпросите за околната среда (2003г.) към Конвенцията на *UNECE* за достъп до информация, участие във вземането на решения и достъпа до правосъдие по въпросите на околната среда (известна като Конвенцията Орхус от 1998г.). Настоящият протокол изисква държавите да създават публично достъпни регистри за освобождаване и трансфер на замърсители от промишлени обекти и други източници, включително **интензивно отглеждане на продуктивни животни** и аквакултури, **торене на почвите, управление на отпадъците и водите**, както и *API* и фармацевтично производство. Въпреки че регулира информацията за замърсителите, а не пряко замърсяването, се очаква протоколът да окаже **значителен натиск за намаляване на нивата на замърсяване**, тъй като никое дружество няма да иска да бъде идентифицирано като един от най-големите замърсители. Понастоящем списъкът на замърсителите не включва антимикробни вещества. Освен това протоколът е приет от 37 държави, повечето от които са в Европа. Въпреки това системата от регистри за освобождаване и прехвърляне на замърсители може да включва и антимикробни вещества чрез допълнителен документ.

Стандартите за управление на водите не се отнасят конкретно до употребата на антимикробни вещества и *AMP*, макар че важната роля на водата, хигиената и отходните води и канализацията, включително управлението на водите, е очевидна. До момента са открити фармацевтични продукти в отпадъчните води в много страни, като се намират определени антибиотици и в питейната вода. *UNEP* е изготвила различни протоколи, предоставящи стандарти за екологосъобразно управление на ПРЗ и/или устойчиви органични замърсители, които биха могли да включват определени антимикробни вещества.

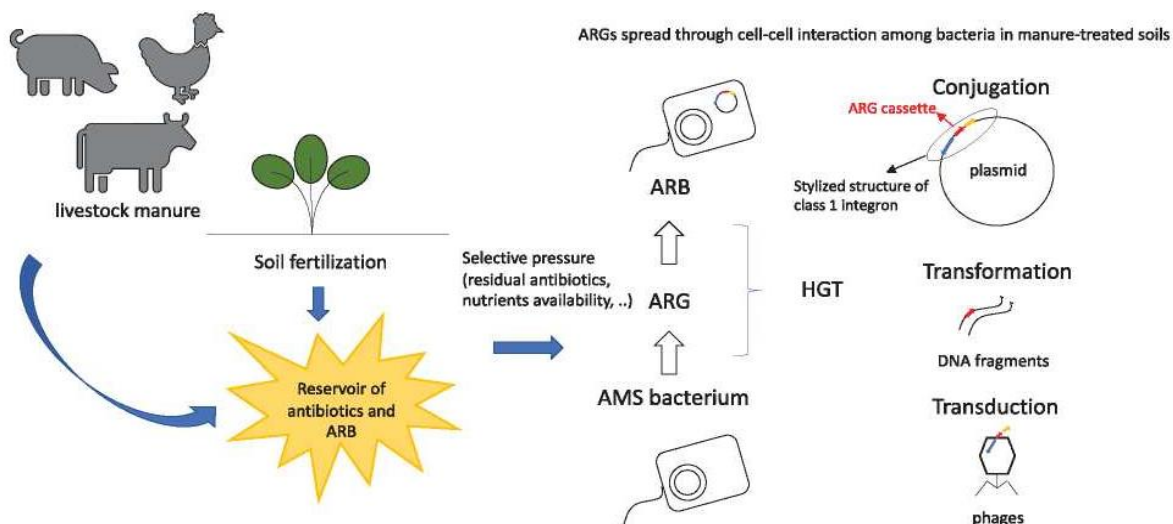
Незадължителен ръководен документ, свързан с околната среда от значение за антимикробната употреба, е **доброволческите насоки на *FAO* за устойчиво управление на почвите**, които определят общ стандарт за грижи за предотвратяване на замърсяването на почвата и поддържането на микробния живот в почвата. Накратко, някои международни документи се отнасят до определени измерения на въздействието върху околната среда на антимикробните вещества, които биха могли да повлияят на тяхната употреба, но тези документи са ограничени до човешкото, животинското и

растителното здраве. Не съществуват международни документи, които да разглеждат конкретно въздействието на антимикробните средства върху околната среда и които биха могли да повлияят на тяхната употреба.

Таблица 1: Преглед на инструментите по област на употреба със стандарти, свързани с околната среда:

Area	Instruments with standards related to the environment of antimicrobials
Human use 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ICH Q7 <i>Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients</i> [2000] / WHO <i>Good manufacturing practices for active pharmaceutical ingredients</i> (Annex 2, WHO Technical Report Series, No. 957) [2010] (adopts the ICH Q7 above and is identical) ▪ WHO <i>Good manufacturing practices for pharmaceutical products containing hazardous substances</i> (Annex 3, WHO Technical Report Series, No. 957) [2010] ▪ WHO <i>Good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles</i> (Annex 2, WHO Technical Report Series, No. 986) [2014] ▪ WHO <i>Points to consider for manufacturers and inspectors: environmental aspects of manufacturing for the prevention of antimicrobial resistance</i> (Annex 6, WHO Technical Report Series, No. 1025) [2020]
Animal use 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ VICH GL6 <i>Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) – phase 1</i> [2000] ▪ VICH GL38 <i>Environmental impact assessments (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) – phase 2</i> [2004] ▪ FAO/WHO Codex Alimentarius <i>Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance</i> (CXC 61-2005) [2005], §7 and 59 ▪ FAO <i>Aquaculture development. 8. Recommendations for prudent and responsible use of veterinary medicines in aquaculture</i> [2019] ▪ OIE <i>Terrestrial Animal Health Code</i> [2019], Chapters 6.10 and 6.11 ▪ OIE <i>Aquatic Animal Health Code</i> [2019], Chapters 6.2 and 6.5
Plant use 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FAO/WHO <i>Guidelines for the registration of pesticides</i> [2010] ▪ FAO/WHO <i>Guidelines on pesticide advertising</i> [2010] ▪ FAO <i>Guidelines on prevention and management of pesticide resistance</i> [2012] ▪ FAO/WHO <i>International code of conduct on pesticide management</i> [2014] ▪ FAO/WHO <i>Guidelines on good labelling practice for pesticides</i> [2015] ▪ FAO/WHO <i>Guidelines on pesticide legislation</i> [2015] ▪ UN <i>Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals</i> (GHS or “the Purple Book”) [8th revised edition] [2019] ▪ FAO <i>Environmental management tool kit for obsolete pesticides – Volume 1, Volume 2, Volume 3, Volume 4, Volume 5 and Volume 6</i> (respectively 2009, 2009, 2011, 2011, 2020 and 2020)

Гените за резистентност могат да влязат и да се задържат в екосистемата чрез множество пътища. Те се разпространяват в почвата (*Binh et al., 2007*), насаждения и култури (*Su et al., 2015*) и сред дивите микробни съобщества и циркулират между диви и домашни животни и хората. **Разпространението на генните пулове, отговорни за АМР се осъществява чрез хоризонтален генен трансфер (HGT) на мобилни генетични елементи (MGE), като фаги, плазмиди (Fondi u Fani, 2010), транспозони или интегронни генни касети.** Придобиването на АМР при бактерии може да се дължи на спонтанни мутации (*Woodford Ellington, 2007*) или, по-често чрез получаване на специфични ARG от други бактерии чрез HGT. Високата плътност на микробните клетки в присъствието на антимикробни съединения и хранителни вещества, които могат да се наблюдават при оборската тор (*Blauet et al., 2018*), предизвикват HGT събития сред бактериалните съобщества, като по този начин се дава селективно предимство на



гостоприемниците. Мутациите са от съществено значение за непрекъснатото развитие на ARG, създавайки стотици варианти, които едва ли могат да бъдат идентифицирани и които са все по-застрашаващи околната среда и биоразнообразието (Woodford u Ellington, 2007).

Фиг. 2: Разпространение на ARG и ARB в околната среда

„Резистома“, т.е. общото количество резистентни гени, свързани с екосистемата (Finley et al., 2013), обикновено се медуира от конюгативни плазмиди. Резистома осигурява резистентност на антибиотици и тежки метали на микроорганизмите, като по този начин повишава оцеляването им в неблагоприятна среда (Song et al., 2017). *INCP-1*, обща екологична плазмидна група, е известна до голяма степен с ефективния си потенциал за конюгативна трансгенеза и стабилна репликация в широк спектър от Грам-отрицателни бактерии (Heuer et al., 2012). Обратно, плазмиди *INCF* (Villa et al., 2010), *INCI* (Blau et al., 2018) и *IncQ* (Rawlings Tietze, 2001) показват по-тесен обхват на хоста. Счита се, че тези плазмиди са важни за разпространението на ARG при *Escherichia coli* и други *Enterobacteriaceae* (Suzuki et al., 2010; Heuer et al., 2012; Van Houdt et al., 2013). Като доказателство, изследването на механизмите за разпространение на тези плазмиди (Teuber, 2001) и еволюцията на съвместимостта с широк или тесен диапазон гостоприемници следва да дадат възможност за прогнозиране на ARG трансфера.

Интегроните играят ключова роля в бързото разпространение на детерминантите за устойчивост към антибиотици. Това са генетични елементи, съставени от ген, кодиращ интеграза и интеграза за екзогенни генни касети, които могат да бъдат придобити и преобразувани във функционални и експресиращи се гени (Mazel, 2006). Интегроните могат да се движат хоризонтално в бактериалните популации чрез честа интеграция в плазмидите или транспозоните (Rowe-Magnus, Mazel, 2002). Според тяхната аминокиселинна последователност, интегразите са разделени на няколко класа. Класове 1, 2 и 3 (*Inti1*, *Inti2*, *Inti2*, *Inti3*) са първите идентифицирани като свързани с MGE, докато клас 4 (*Inti4*) е свързан с хромозомната интеграция (Deng et al., 2015). Сред елементите, които улесняват трансфера на ДНК, клас 1 интегрони (*Inti*) е най-често идентифицираният като отговорен за разпространението на детерминанти на антибиотична резистентност сред

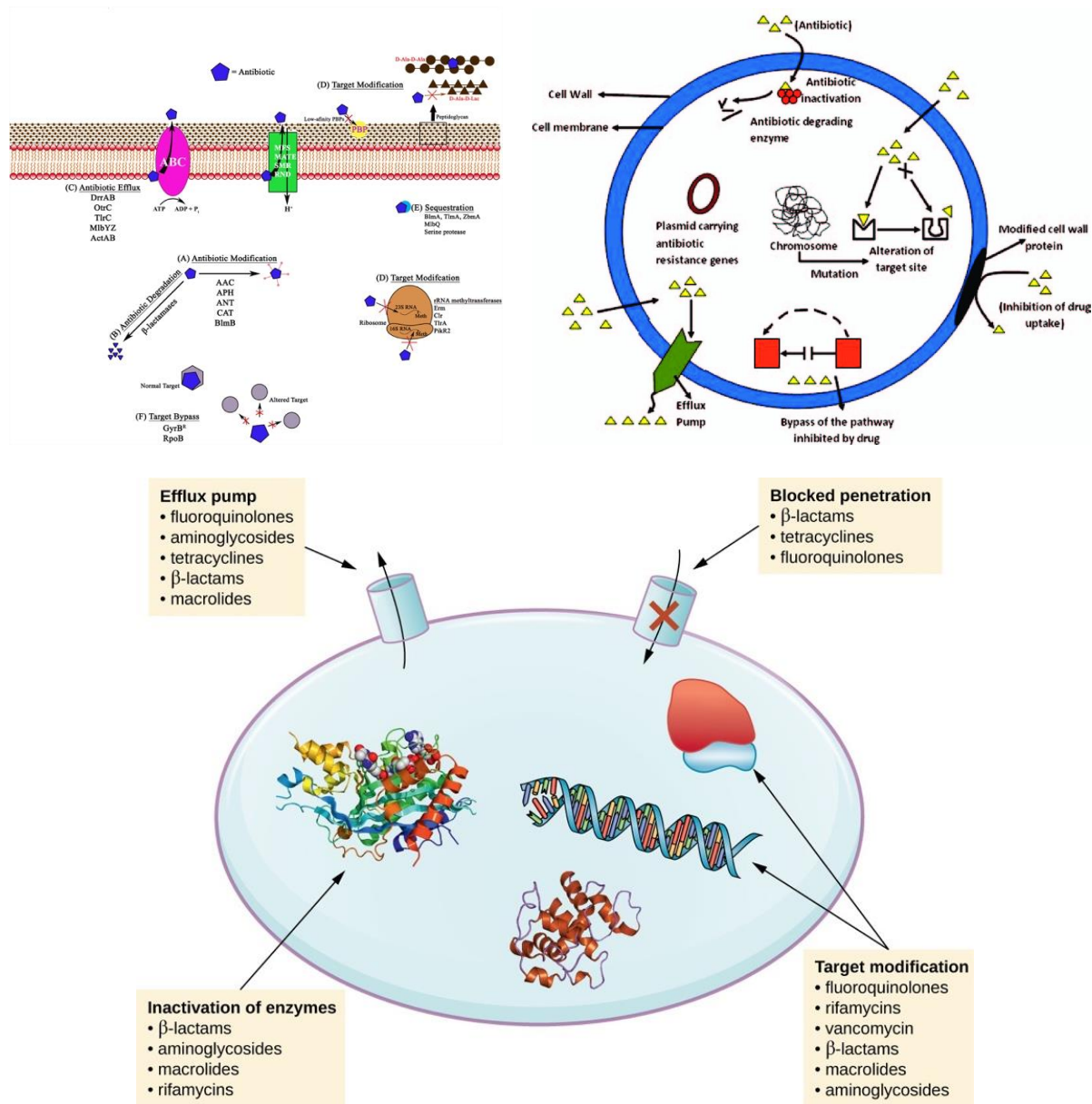
коменсалните и патогенните за хората и домашните животни микроорганизми. Освен това интегронни касети са намерени в различни среди, като прясна вода, седименти и утайки (Collis u Hall, 199; Hall and Collis, 1998; Nardelli et al., 2012; BORRUSO et al., 2016), което показва значителни положителни корелации с относителното изобилие на ARG (Zhao et al., 2019).

Остатъците от АМС, след като попаднат в почвата чрез оборската тор, могат да подобрят устойчивостта и HGT на ARG (Binh et al., 2007; Zhao et al., 2019) чрез плазмиди и интегрони (Gotz & Smalla, 1997; Smalla et al., 2000; Sengelov et al., 2003) и да насърчат разпространението на ARB в околната среда и така да бъде засегнат състава на микробните съобщества (Chen et al., 2019). Въпреки че бактериите от оборска тор не винаги могат да се адаптират към новите условия на средата, антимикробните вещества могат да благоприятстват обогатяването на разнообразието от специфични бактериални таксони в почвите (чрез положителен подбор) и да потискат другите (Ding et al., 2014). Освен това концентрацията на АМС в оборската тор, обикновено на ниво подинхибитори, може да повлияе на взаимодействията между щамовете и въздействието върху генната експресия и регулация (Gillings, 2013; Jechalke et al., 2014; Brussow, 2015).

Когато оборска тор се използва за торене при производството на растителни култури, както увеличеният товар на ARB, така и съдържащите се в торта остатъци от АМС могат да имат отрицателно въздействие върху развитието на растенията и качеството на хранителните продукти (Verraes et al., 2013; Mirza et al., 2020; Muhammad et al., 2020). Освен това **антибиотичните остатъци могат да продължат и да се натрупват в околната среда (Jechalke et al., 2014) чрез адсорбция върху твърдите фази на почвата (Du u Liu, 2012).**

По-голямата част от АМС са естествено произведени от микроорганизмите като механизъм за защита срещу други микроорганизми. Гените, отговорни за резистентността винаги са присъствали в околната среда, като гени, кодиращи устойчивост към голям набор от антибиотици, например такива са открити при 30000-годишни бактериални видове (D'Costa et al., 2011; Berglund, 2015). Когато присъстват в околната среда при концентрация на субинхибитори, антибиотиците често играят роля в регулирането на транскрипцията и обмена на сигнали между клетките (Reygaert, 2018).

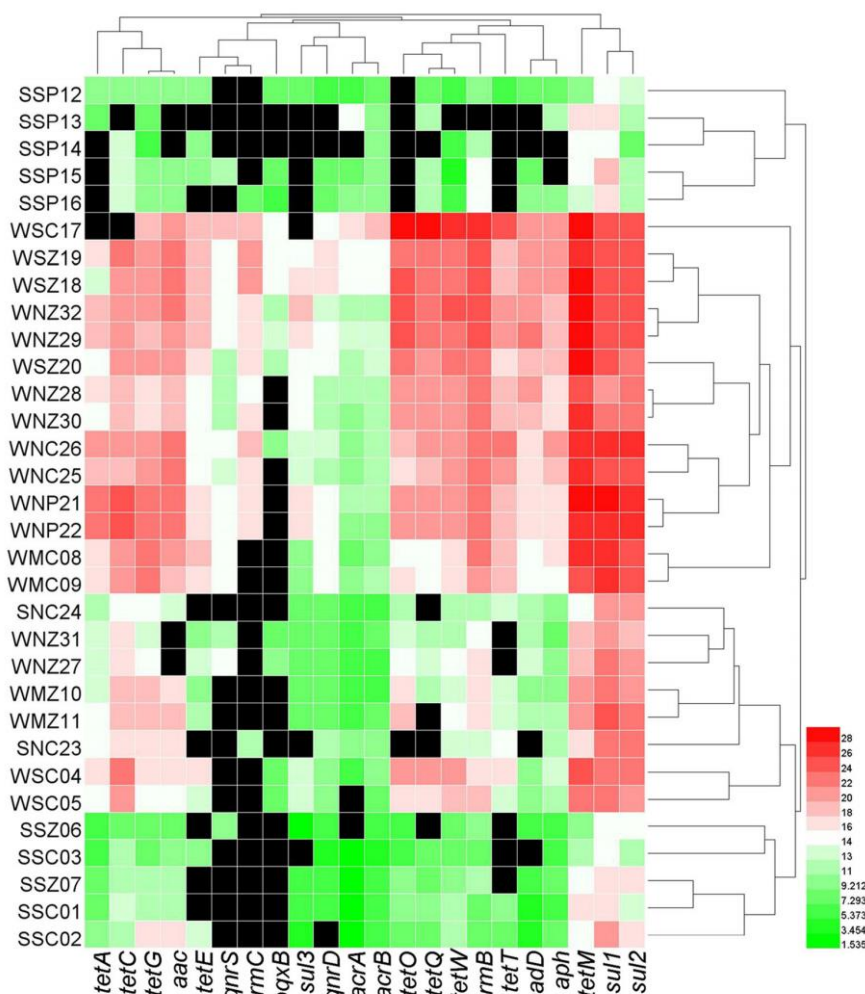
Антибиотичната резистентност се състои от голямо разнообразие от механизми, като например инактивиране чрез специфични разцепващи ензими, изключване от клетките чрез ефлукс помпи, смущения в синтеза на протеини, ограничаване на поглъщането на лекарството, промяна на антибиотичната цел и др.



Фиг. 3: Механизми на антимикробната резистентност при бактериите и групите антимикробни средства към които всеки механизъм на резистентност действа

Резистентността, придобита чрез *MGE* и плазмидите, е отговорна за последните два механизма, при които степента на резистентност зависи от бактериалните видове и придобитите *ARG* (Reygaert, 2018; Kraemer et al., 2019). Антибиотичният селективен натиск, задвижващ придобитата резистентност, определя точната специализация на *ARG*, което прави околната среда потенциален резервоар. Антропогенните фактори засягат разпространението на антибиотиците и *ARG* с донякъде предвидими ефекти (Vikesland et al., 2017). **В животновъдството употребата на антибиотици варира в зависимост от вида и мястото на отглеждане, което оказва значително въздействие върху концентрацията на *ARG*.** Сред най-често срещаните *ARG* при животновъдството, тези, свързани с резистентност към сулфонамид (*sul*), са особено разпространени във водите (Chen et al., 2015; Makowska et al., 2016). В повърхностните и пресните води сулфонамид резистентните гени са открити в групата *IncQ* плазмиди

(Skold, 2001; Berglund, 2015). Подобно, диаминопиримидин резистентните гени (**dfr**), които придават резистентност към антимикуробни средства като триметоприм, са идентифицирани както в клас 1, така и в клас 2 интегрони (Deng et al., 2015). По същият начин, гените на хинолонова резистентност (**qnr**) често са били свързвани с различни плазмидни групи. Както *dfr*, така и *qnr* гените лесно се разпространяват в околната среда, попаднали в повърхностни води (Berglund, 2015), отпадъчни води и водите, използвани за напояване и в почви (Dalkmann et al., 2012). Тетрациклиновите резистентни гени (**tet**) са широко разпространени в различни патогенни и екологични бактерии (Roberts, 2005) и често се откриват в пречиствателни станции, почвата и повърхностните и подпочвените води (Chee- Sanford et al., 2001; Berglund, 2015). В същата среда са изолирани и гените, които кодират резистентността към макролидите.



Фиг. 4: Схема на гените, кодиращи резистентността на бактериите към тетрациклини, макролиди, сулфонамиди, хинолони и др.

По същество, дифузията на ARG се свързва със стресов отговор, активиран чрез излагане на антибиотици, както и с мобилизирането на няколко интегративни и конюгативни елемента. Поддръжката на ARG зависи от циклите на размножаване на бактериите, за да бъдат запазени множество копия на същите тези гени, кодиращи резистентност и да се запази контролът на експресията на гените в MGE (Bengtsson-Palme et al., 2017). Освен това богатите на хранителни вещества среди могат да

повлияят положително на разпространението на ARG и да улеснят взаимодействията на клетъчно ниво (Manaiá et al., 2018).

Във ветеринарната медицина антимикробните средства могат да се използват като терапевтични средства и/или стимулатори на растежа. Антибиотични стимулатори за растеж (AGPS) са антимикробни вещества, прилагани в подтерапевтична доза за продължителен период от време, като основната цел е подобряване на процента на преработване и усвояване на фуражите, особено при младите животни, повишаване на икономическата печалба на земеделските производители. **От 2006 г. както Европейският съюз, така и Австралия забраниха използването на AGPS,** въпреки това в повечето други държави все още е разрешено използването им (Guardabassiet al., 2009).

Сред промишлените стопанства за продуктивни животни, особено свиневъдния и птицевъдния сектор, по-голямата част от антибиотиците са прилагани за терапевтична или профилактична цел (Ungemach, 2000; Kim et al., 2011), което води до изобилие от ARG в сравнение с други направления в промишленото животновъдство. Няколко проучвания потвърждават, че **свиневъдството е „гореща точка“ за ARB и ARG** (Rosen, 1995; Cromwell, 2002; de Greeff et al., 2019; Petrin et al., 2019). Наскоро научната общност проучи разпространението, изобилието и евентуалната мобилизация на ARG в свиневъдството и остатъците от AMC в околната среда (Holzelet al., 2010; Petrin et al., 2019; Van den Meersche et al., 2019; Wu et al., 2019).

Таблица 2 обобщава основните класове антибиотици и най-използваните AMC при животни за терапевтична употреба:

Antibiotic family	Most used	Animal Farming	Use	Contrasted bacteria and recognized main targets	Resistance mechanism	Main ARGs	
Macrolides	Tylosin	Cattle	Gastrointestinal and respiratory infections	Gram-positive bacteria.	Interference with protein synthesis (sequestration of mRNA ribosome-binding site)	<i>erm, msr, mef</i> genes	
	Erythromycin Clarithromycin	Pig Poultry		Main target: <i>Lawsonia intracellularis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>			
Sulfonamides	Sulfamethazine	Cattle	Urinary tract infections	Gram-positive and Gram-negative bacteria. Main target: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pasteurellaceae</i>	Interference with folic acid synthesis competing for the enzyme DHPS	<i>sulI, sulII</i> genes	
		Pig Poultry	Respiratory infections				
Tetracyclines	Chlortetracycline	Cattle	Systemic and local infections	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Interference with efflux pump systems	<i>tet</i> genes	
	Oxytetracyclines	Pig	Gastrointestinal and respiratory infections				
Quinolones	Doxycycline	Poultry					
	Fluoroquinolones (Enrofloxacin, Danofloxacin, Marbofloxacin)	Pig	Intestinal infections	Gram-positive and Gram-negative bacteria, including mycobacteria, and anaerobes	Mutations in the genes encoding quinolone target DNA gyrase and topoisomerase IV, interference with efflux pump systems	<i>qnr</i> genes	
β-lactams	Penicillins (Amoxycilline, Ampicillines) Cephalosporins, Carbapenems	Cattle					
		Pig	Respiratory diseases	Gram-positive and Gram-negative bacteria	Interference with cell wall synthesis and permeability, inactivation through β-Lactamase enzyme	<i>bla, amp, pen</i> genes,	
		Cattle Poultry Dog Cat	Necrotic enteritis				
		Pig	Intestinal infections	Gram-positive, and Gram-negative bacteria, if aerobic	Inhibition of protein synthesis (ribosome interference)	<i>aac, aad, aad aph</i> genes	
Phenolics	Chloramphenicol	Poultry Pig	Respiratory disease, foot rot	Broad spectrum. Main target: <i>Photobacterium, Salmonella, E. coli</i>	Enzymatic modification of antibiotic molecules	<i>cat, pp-flo, flo</i> genes	
	Thiamphenicols (thiamphenicol, florfenicol)						
Diaminopyrimidines	Trimethoprim	Horse	Post-weaning scours	Gram-positive and many Gram-negative bacteria. Main target: <i>Enterobacteriaceae</i>	Interference with folic acid synthesis by binding the enzyme DHFR	<i>dhfr</i> genes	
		Pig					

Polypeptides	Bacitracin, Colistin	Pig	Intestinal diseases	Gram-positive (Bacitracin) or Gram negative (Colistin) bacteria. Main Gram negative target: <i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , or <i>Acinetobacter</i> .	LPS modification, efflux pump systems regulation	<i>pmr</i> , <i>pho</i> , <i>mcr</i> , <i>kpn</i> genes
Lincosamides	Lincomycin	Poultry Pig	Respiratory and Intestinal infections	Main Gram positive target: <i>Campylobacter</i> Gram positive bacteria, most anaerobic and some mycoplasma species. Main target: <i>Staphylococcus aureus</i>	Alteration of the antibiotic target site	<i>lnu</i> , <i>lin</i> , <i>erm</i> genes
Pleuromutilins	Tiamulin Valnemulin	Poultry Cattle Pig Poultry	Respiratory and Intestinal infections	<i>Pasteurellaceae</i> , <i>Brachyspira</i> , <i>Mycoplasma</i>	Alteration/protection of the antibiotic target site	<i>vga</i> , <i>sal</i> , <i>lsa</i> genes

В днешно време в животновъдството се използват над 150 антимикробни съединения. Остатъците неизбежно попадат в околната среда поради внасяне на оборска тор в земеделските земи (Baguer et al., 2000). За пример, през 2010 г. повече от 63 000 тона антимикробни средства са използвани терапевтично при продуктивни животни по целия свят. Прогнозираният растеж на световното население води до прогнозно увеличение на консумацията на антибиотици до 105 000 тона до 2030 г. (Tasho and Cho, 2016). Поради тази причина са определени конкретни планове за действие за намаляване на употребата на антибиотици като терапевтични средства за ветеринарна употреба и всяка държава членка е задължена да има национален план за действие срещу нарастващият проблем – АМР, базиран на подхода „Едно здраве“ и съобразно Глобалния план за действие срещу АМР.

Освен директното събиране и обработване в аеробни или анаеробни условия и съоръжения, оборската тор може да бъде подложена на сушене или разделяне на течна от твърда фаза. Твърдата фаза на оборската тор, както и цялата тор, традиционно се компостира за производство на биоторове. Понастоящем анаеробното разграждане и биологичното третиране на животинската тор често се предприемат в промишлени животновъдни стопанства (Van Epps & Blaney, 2016). Компостирането като процес може значително да намали антибиотичния товар, особено по време на термофилната фаза (Zhang et al., 2019), но за съжаление някои антибиотични средства и остатъците от тях се натрупват в компостните продукти и в почвата (Bohreret al., 2019; Zang et al., 2019). Общото намаляване на ARG (0,7-2,0 log намаляване) се получава чрез термофилно компостиране на тор от свине, говеда и птици, в зависимост от вида на оборската тор и условията на експлоатация (He et al., 2020).

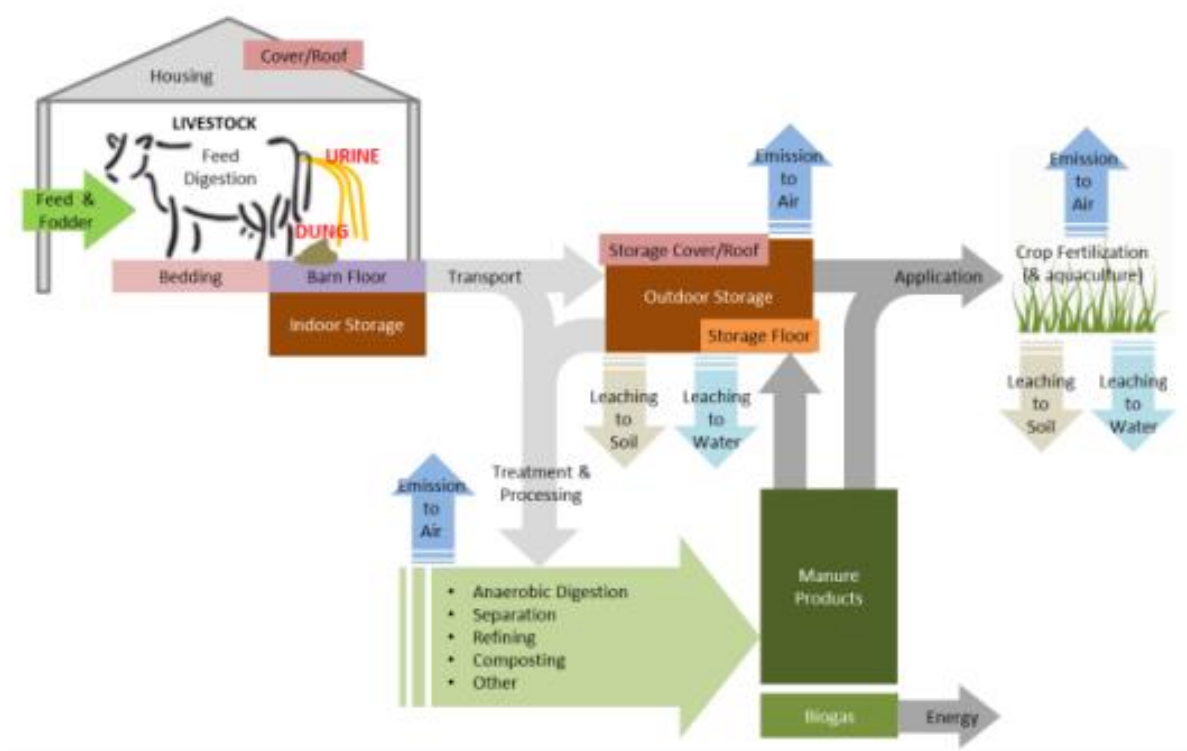
Биологичното обработване на животинска тор и отпадъчни води водят също до намаляване на количествата на нитратите в околната среда, както и до леко намаляване на нивата на антибиотични остатъци и количеството патогенни бактерии (Van den Meersche et al., 2019). Редукцията на гени, отговорни за АМР е 0.1-3.3 log и е изследвано при свинска тор, след третиране (He et al., 2020).

Аеробното разграждане (AD) се прилага за стабилизиране на оборската тор при производството на метан (Fubin et al., 2016, 2017). Наблюдавано е намаляване с 0.352 log на ARG при преработката на отпадните води от отглеждането на свине (Heet al., 2020). Интересното е, че колкото по-високо е съдържанието на летливи твърди вещества в торта и скоростта на смесване, толкова по-голям е броят на ARG в сместа (Turker et al., 2018). Комбинираната пастьоризация и AD на свинска тор намалява съдържанието на сообщества археи в почвата, докато само AD засяга сообществата на бактериите и археите (Fubinet al., 2020). Предварителната обработка на оборската тор с бактериални щамове е ефективна при разграждане на антибиотиците (Liu et al., 2019) и

повишаване на производството на биогаз, но цялостно въздействие върху *ARB* и *ARG* не е наблюдавано.

Изградените специални зони за събиране и съхранение на торта са водни системи, които могат да бъдат пригодени за пречистване на отпадъчни води и селскостопански отходни води (*Lavrnic et al., 2018*). Способността им да намаляват *ARG* в отпадните води от отглеждането на свине водят до намаление с $0.18-3 \log$ (*He et al., 2020*).

Окислението (постобработка) като **озониране** или **условия на Fenton** може да се използват в животински или обработени отпадъчни води за **разграждане на антибиотици и бактерии, благодарение на активността на кислорода** (*Balcioglu Otker, 2003; Ikehata et al., 2006; Uslu u Balcioglu, 2009*). Напредналите технологични процеси на обработка като окисление и йонизиращи лъчения са известни със способността им да унищожават микробната ДНК. Следователно комбинации от йонизиращо лъчение и окисление позволяват разграждане на антибиотиците и *ARG* в органичните матрици, въпреки че с висок биологичен и екологичен риск (*Chu et al., 2019, 2020*).



Фиг. 5: Схематично представен процеса по събиране, съхраняване и процесите на обработка на торта и крайните продукти от тази обработка, които се получават

Въпреки че до голяма степен са изследвани АМР нивата, постигнати в околната среда посредством употребата на животинска тор (*Dolliver et al., 2008; Selvam et al., 2012*), съществува противоречива информация относно съдбата на *ARG* (*Selvam et al., 2012; Wang et al., 2015; Xie et al., 2016*). Нарастващата **необходимост от контрол върху разпространението на ARG** накарва научната общност да създаде и валидира утвърдени молекулярни методи за изследване на динамиката на разпространението на *ARG* сред микробните общности в околната среда. Както

16S rRNA ампликон, така и нецелевото секвениране могат да се считат за изчерпателни методи за изследване на структурата на микробните съобщества в оборската тор, в почвите и в земеделските отпадъци. Няколко проучвания на дифузията на резистома в пречиствателните станции за отпадъчни води, съоръженията за компостиране и градските отпадни води използват **метагеномния подход** (Hendriksen et al., 2019) при мониторинга на ARG по време на процедури и сезонни промени. Скорошно проучване на Han et al., 2018 показва, че промяната в почвените бактериални съобщества, причинени от употребата на оборска тор, води до промени в почвеният бактериален резистом.

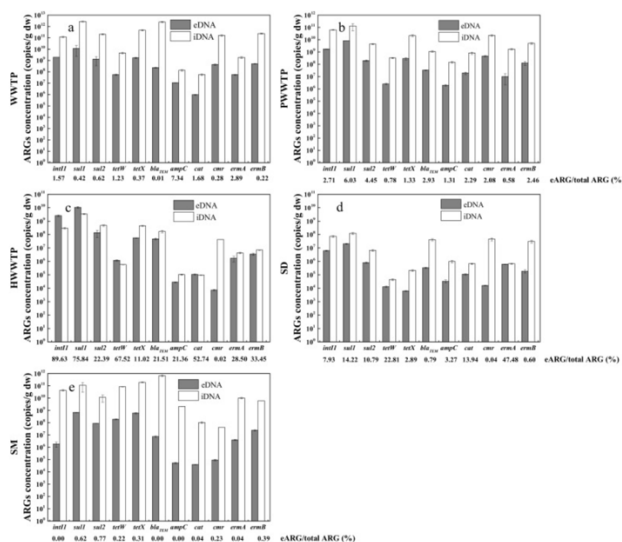
Наскоро проучванията за откриване на генетични маркери, свързани с AMP (транспозаза и интегрон-интегразни гени от клас 1) и ARG се увеличават значително. Количественото определяне на ARG в почвите, третирани с оборска свинска тор в проучването на Brooks et al., 2014; Tao et al., 2014, е проведено с високо специфичен qPCR анализ. Резултатите от това проучване показват **висока честота на откриване на ARG в отпадни води и почви, третирани със свинска тор**, показани на **фиг. 6:**

FarmType	16S	Camp-16s.	spaQ	tetA	tetB	mecA	intI	ermA	ermF
Sow	17/17 100%	9/17 53%	16/17 94%	17/17 100%	9/17 53%	2/17 12%	17/17 100%	16/17 94%	17/17 100%
Nursery	10/10 100%	8/10 80%	8/10 80%	10/10 100%	9/10 90%	3/10 30%	10/10 100%	8/10 80%	10/10 100%
Finisher	10/10 100%	10/10 100%	10/10 100%	9/10 90%	7/10 70%	0/10 0%	9/10 90%	9/10 90%	9/10 90%
Total	37/37 100%	27/37 73%	34/37 92%	36/37 97%	25/37 68%	5/37 14%	36/37 97%	33/37 89%	36/37 97%

В неотдавнашно проучване на Dong et al., от 2019 са количествено определени както вътреклетъчната, така и извънклетъчната ДНК, съдържаща ARG, в утайки и са съответно около 10^{10} и 10^{12} копия на грам.

Sample	eDNA yield (µg/g)	iDNA yield (µg/g)	Reference
Aquatic sediment	77–116.8 ^b	63.7–89.7	Mao et al. (2014)
Aquatic sediment	6.7–24.3 (dw)	NA ^c	Corinaldesi et al. (2005)
LWMS ^a sludge	0.6–9.2 (dw)	190.9–1005.3 (dw)	Zhang et al. (2013)
Forest soil	2.2–41.1 ^b	NA ^c	Agnelli et al. (2004)
Marine sediment	0.0047–5.6 (dw)	0.8–21.0 (dw)	Corinaldesi et al. (2008)
Urban lake sediment	5.6–11.4 (dw)	24.9–46.2 (dw)	This study
Sludge	10.5–119.1 (dw)	335.4–2047.4 (dw)	This study
Swine manure	8.6–9.7 (dw)	179.0–295.4 (dw)	This study

- a Livestock waste management structures sediment.
b Wet weight or dry weight not specified.
c NA: not available.

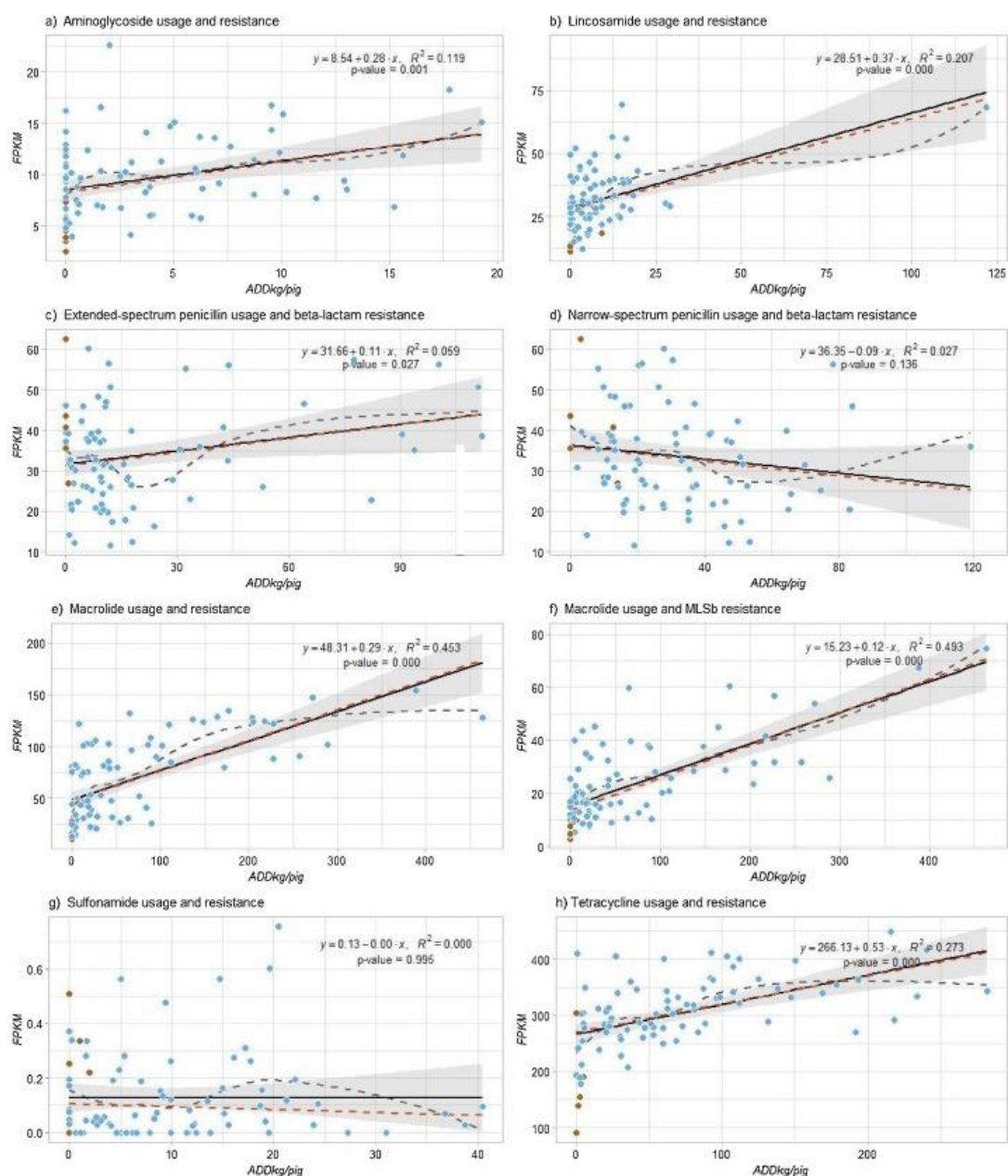


Това проучване оценява изобилието на eARG в проби от околната среда и трансформиращата способност на eARG. Установено е, че разнообразните eARG са повсеместни в околната среда. **Голямото изобилие на intI1 и ARG може да увеличи възможността за разпространение на ARG в околната среда чрез хоризонтален трансфер на гени.** Резултатите показват, че в утайките е установено по-голямо изобилие от eARG, отколкото при iARG, което показва, че eARG могат да представляват до голяма степен пренебрегвана част от резистома на околната среда.

Като се има предвид, че *eDNA* може да продължи да съществува в околната среда поради своята адсорбция и поради нейната готовност за трансформация, е необходимо да се оцени до каква степен *eARG* допринасят за разпространението на антибиотичната резистентност в околната среда. Затова препоръките в това проучване включват по-добро разбиране на значението на *eARG* в околната среда, изисква се да се проследи не само концентрацията и локализацията им, но и адсорбцията им и мобилността им в местни бактериални съобщества.

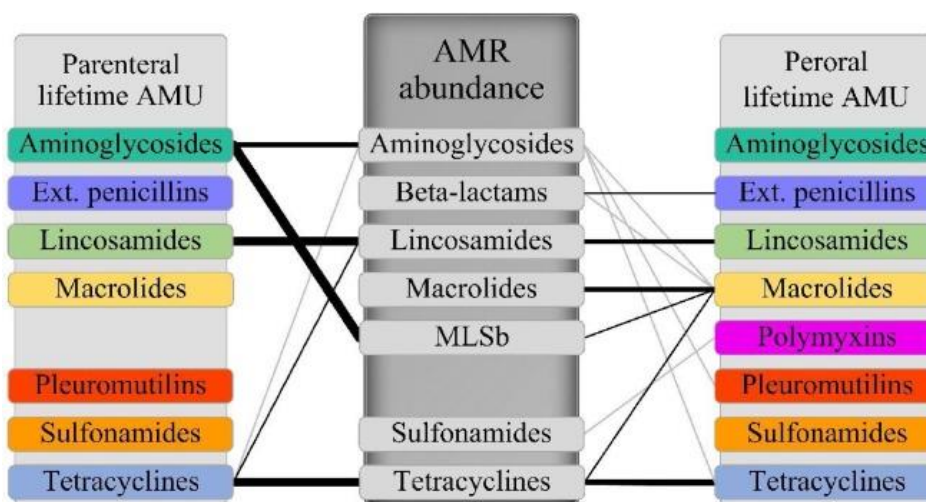
Няколко проучвания на *Hu et al., 2016* и *Blau et al., 2018, 2019* върху различни видове оборска тор, са фокусирани върху количественото определяне на целевите гени *intI1* и *intI2* за класове 1 и 2, интегро-интегразните гени и ген *Korb*, специфични за *IncP1* плазмидите, заедно с *ARG*. Както бе описано, разпространението на плазмидните *ARG* често се използва, особено за установяване на ролята на плазмидите в бързата бактериална адаптация и повишаването на устойчивостта им (*Smalla et al., 2000*). Екзогенните плазмидни изолационни техники (*Bale et al., 1988*) показват как плазмидите се разпространяват в различни среди. Наскоро са анализирани плазмидите от утайки от отпадъчни води и гостоприемниците за трансгенните елементи чрез екзогенна изолация (*Blau et al., 2018; Wolters et al., 2018*). По отношение на пробите от свинска тор, четири подобни на *IncQ* плаزمиди са изолирани от гостоприемникови щамове: *Pseudomonas putida UWC1*, *Acinetobacter* sp., *Ralstonia eutropha*, *Agrobacterium tumefaciens* и *E. coli*. Плазмидната преносимост в щамовете *E. coli* не е ефективна, в основата на широк, но високоспецифичен гостоприемников диапазон (*Smalla et al., 2000*).

Наскоро са приложени опростени математически модели за прогнозиране и количествено определяне на разпространението на *ARG* в животинските чревни микробиоми (*Andersen et al., 2020*) и в селскостопанските отпадъци (*Baker et al., 2016*).



Фиг. 7: Симулации, проведени посредством линейни математически прогнозни модели

Това проучване на Andersen et al., 2020 показва, че връзката между AMU (antimicrobial usage – употреба на антимикробни средства) и AMP в реални условия може да бъде описана чрез линейни модели.



Фиг. 8: Схематично представени линейните математически модели, които са използвани в проучването

Това проучване също така разкрива, че този модел може да се приложи при прогнозно моделиране за огромна популация животни, в случая свине, където могат да бъдат тествани потенциални сценарии. Само по себе си това предоставя **важен инструмент за властите и други заинтересовани страни, но също така показва какво е възможно и кои данни ще са необходими, за да се дадат насоки за вземане на политически и целенасочени решения, засягащи здравето и благосъстоянието на животни и хора в световен мащаб.** По този начин, това проучване предоставя стабилна рамка за по-нататъшно развитие, което в крайна сметка може да помогне за намаляване на АМР.

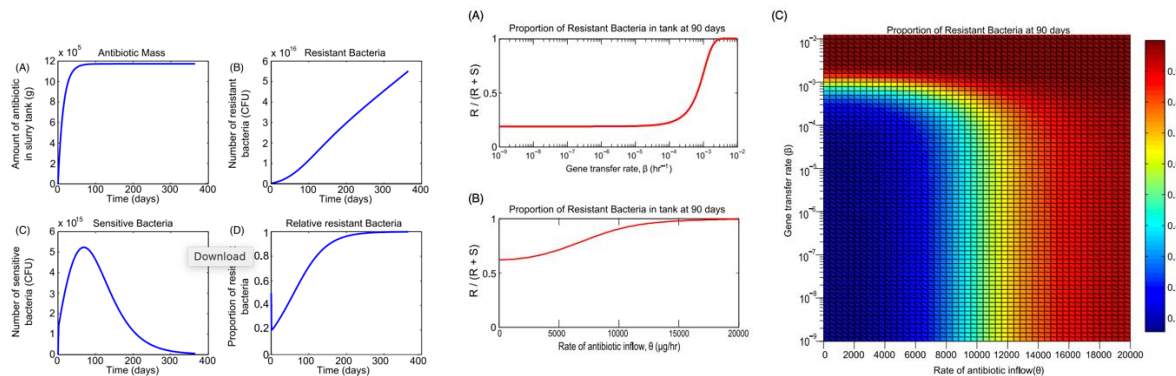
В проучването на *Baker et al., 2016* е разработен модел за описване на популации от чувствителни на антимикробни средства и устойчиви бактерии във ферми за млечни продукти в Обединеното кралство. Включени са термини за прираст на популацията, разходи, хоризонтален генен трансфер и селективно налягане поради употребата на антибиотици. Моделът може да бъде адаптиран и за други видове продуктивни животни и ферми, където се съхранява оборска тор, например свине или домашни птици. **Моделът прогнозира, че делът на бактериите, показващи АМР, се увеличава през период на съхранение на торта.** Това увеличение се дължи отчасти на хоризонтален генен трансфер и отчасти на селекция, както е видно от **фиг. 9**. Дори при липса на употреба на антибиотици, **делът на устойчивите на антибиотици бактерии се прогнозира да достигне 60%.** Чрез анализ на едно- и двупараметрични вариации в модела, е показано, че **скоростта на хоризонтален генен трансфер е от решаващо значение** както за процента на резистентност, така и за ефективността на промените в други параметри. Ако скоростта на генен трансфер е висока, тогава резистентността се контролира най-добре чрез нейното намаляване, а намаляването на селективния натиск чрез употребата на антибиотици има малко въздействие. Ако обаче скоростта на генен трансфер е ниска, тогава резистентността се контролира най-добре чрез намаляване на употребата на антибиотици и тогава намаляването на генния трансфер има малко въздействие.

Въпреки **прецизно разработените прогнозни модели, за съжаление вариабилността на живите организми (бактерии, гостоприемников организъм и др.) и многото параметри, които трябва да включва модела, все още не дават съвсем**

надеждни резултати от тези симулации. Прогнозирането на генния трансфер вероятно също ще бъде изключително сложен, с включване на вариации от параметри като различни видове/щамове, различни подвижни генетични елементи, бактериофаги, плазмиди, интегрони, както и поради вариабилност във факторите на околната среда като температура, рН и др. (Johnsen u Kroer 2007; Subbiah et al. 2011; Bellanger et al. 2014). Очаква се, че **ще бъде оправдано по-подробно моделиране**, което включва биологична, екологична и пространствена сложност и ще даде **резултати с по-голяма прогнозна точност** (Krone et al. 2007; Hellweger and Bucci 2009; Merkey et al. 2011). Един от **най-чувствителните параметри** на модела е параметърът за **скорост на генен трансфер**.

Освен това факторите на околната среда, загубата на сегрегация, темпът на растеж и концентрацията на антибиотици, могат също да окажат влияние върху нивата на хоризонталния генен трансфер. Тези фактори не са включени в този модел от проучването и тяхното включване може да доведе до повишени нива на резистентността.

Поради тази причина е важно **бъдещото моделиране да вземе предвид всички тези пречки в публикуваните проучвания, и прогнозното моделиране да бъде обвързано с експериментални данни, за да бъдат постигнати по-надеждни и точни резултати**. От съществено значение е да се изгради точен модел на популационната динамика на бактериите в складирания оборска тор и да се включат подобни параметри, за да се разработят **ефективни мерки за контрол**. Този теоретичен модел **показва, че възникващата АМР в оборска тор и компост са основателна грижа**.



Фиг.9: Резултати от проучването на тема „Mathematical modelling of antimicrobial resistance in agricultural waste highlights importance of gene transfer rate“ на Michelle Baker et al.

В такива среди (оборска тор, подпочвени води, отпадни води, компост и др.) променливите, участващи в разпространението на ARG, са безброй и зависят от широк спектър от вътрешни и външни фактори, като генетични механизми на ARB репликация, динамика на HGT, фактори на околната среда и стресови условия и състоянието на микробиома и резистоста. Поради това **бъдещите изследвания следва да се съсредоточат върху подобряването на прогнозните модели на механизма за разпространение на ARG**, които могат да бъдат използвани за целенасочени проучвания, могат да **бъдат използвани при вземане на ръководни решения**, свързани с управлението на отпадъците от отглеждането на продуктивни животни и в предотвратяването на разпространението на АМР .

Заклучение:

гр. София, 1618, бул. ”Цар Борис III” № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
 тел. 02/4273056



Въпреки че силно се препоръчва намаляване на употребата на антибиотици в животновъдството, прекомерната употреба на антибиотици остава важен въпрос за решаване. Неконтролираното разпространение на *ARB* и *ARG* в околната среда поради обработването на почвата е сериозен проблем, бъдещ немалка загриженост. Много проучвания подчертават циркулирането на *ARG* в микробните общности, изолирани от животинска тор и обработвани селскостопански полета въпреки подобрените стратегии за управление на отпадъците, за отглеждане на продуктивни животни и стратегиите за намаляване на АМР. **Необходимо е спазване на всички тези ръководни документи и законодателството и пълен контрол на изпълнението на изискванията, за да се ограничи разпространението на ARG в агрохранителната верига.** През последните тридесет години знанията за пътищата на разпространението на *ARG* от животински отпадъци до околната среда са обогатени от **мултидисциплинарни изследователски подходи** и хиляди проучвания по темата. В светлината на сегашните знания, изследването на динамиката на разпространението на АМР и *ARG* следва да съчетава **молекулярни и функционални генетични стратегии с прогнозно моделиране за разпространението на MGE (интегрони и плаزمиди) и метагеномни изследвания и биоинформатични анализи на данните, за да последват научно обусловени, независими, точни и информативни оценки на риска и взимане на своевременни, адекватни и точни решения и мерки за борба с АМР в подхода „Едно здраве“.**

Изготвил:

Красимира Захариева,
Главен експерт в дирекция ОРХВ, ЦОХВ

Използвана литература:

- Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., Bialvaei, A. Z., Mahmood, S. S., Tanomand, A., et al. (2019). Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. doi: 10.2147/idr.s199844
- Aidara-Kane, A., Angulo, F. J., Conly, J. M., Minato, Y., Silbergeld, E. K., McEwen, S. A., et al. (2018). World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals.
- Andersen, V. D., Aarestrup, F. M., Munk, P., Jensen, M. S., de Knecht, L. V., Bortolaia, V., et al. (2020). Predicting effects of changed antimicrobial usage on the abundance of antimicrobial resistance genes in finisher gut microbiomes. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104853
- Bager, A. J., Jensen, J., and Krogh, P. H. (2000). Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. doi: 10.1016/S0045-6535(99)00449-X
- Baker, M., Hobman, J. L., Dodd, C. E. R., Ramsden, S. J., and Stekel, D. J. (2016). Mathematical modelling of antimicrobial resistance in agricultural waste highlights importance of gene transfer rate. doi: 10.1093/femsec/fiw040
- Balcioğlu, I. A., and Ötoker, M. (2003). Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes.
- Bale, M. J., Day, M. J., and Fry, J. C. (1988). Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon. doi: 10.1128/aem.54.11.2756-2758.1988
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., and Larsson, D. G. J. (2017). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



- Blau, K., Bettermann, A., Jechalke, S., Fornefeld, E., Vanrobaeys, Y., Stalder, T., et al. (2018). The transferable resistome of produce.
- Blau, K., Samuel, J., Su, J.-Q., Zhu, Y.-G., Smalla, K., and Jechalke, S. (2019). Manure and doxycycline affect the bacterial community and its resistome in lettuce rhizosphere and bulk soil.
- Borruso, L., Harms, K., Johnsen, P. J., Nielsen, K. M., and Brusetti, L. (2016). Distribution of class 1 integrons in a highly impacted catchment.
- Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems - Brooks, J. P., Adeli, A., McLaughlin, M.R. (2014). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135414002073?via%3Dihub>
- Brüssow, H. (2015). Microbiota and the human nature: know thyself.
- Chen, B., Hao, L., Guo, X., Wang, N., and Ye, B. (2015). Prevalence of antibiotic resistance genes of wastewater and surface water in livestock farms of Jiangsu Province. China.
- Chen, Q.-L., An, X.-L., Zheng, B.-X., Gillings, M., Peñuelas, J., Cui, L., et al. (2019). Loss of soil microbial diversity exacerbates spread of antibiotic resistance.
- Chu, L., Chen, D., Wang, J., Yang, Z., and Shen, Y. (2019). Degradation of antibiotics and antibiotic resistance genes in erythromycin fermentation residues using radiation coupled with peroxymonosulfate oxidation.
- Chu, L., Chen, D., Wang, J., Yang, Z., Yang, Q., and Shen, Y. (2020). Degradation of antibiotics and inactivation of antibiotic resistance genes (ARGs) in Cephalosporin C fermentation residues using ionizing radiation, ozonation and thermal treatment.
- Collis, C. M., and Hall, R. M. (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., et al. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons.
- Ding, G.-C., Radl, V., Schloter-Hai, B., Jechalke, S., Heuer, H., Smalla, K., et al. (2014). Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine.
- Dolliver, H., Gupta, S., and Noll, S. (2008). Antibiotic degradation during manure composting. <https://europepmc.org/article/med/30711653>
- Dong P, Wang H, Fang T, Wang Y, Ye Q - Assessment of extracellular antibiotic resistance genes (eARGs) in typical environmental samples and the transforming ability of eARG.
- Du, L., and Liu, W. (2012). Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro- ecosystems. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2010.02295.x>
- Fubin, Y., Dong, H., Zhang, W., Zhu, Z., and Shang, B. (2020). Additional function of pasteurisation pretreatment in combination with anaerobic digestion on antibiotic removal.
- Fubin, Y., Ji, C., Dong, H., Tao, X., and Chen, Y. (2016). Research progress on effect of antibiotic on anaerobic digestion treatment in animal manure.
- Fubin, Y., Zifu, L., Saino, M., and Hongmin, D. (2017). Performance of alkaline pretreatment on pathogens inactivation and sludge solubilization.
- Gillings, M. R. (2013). Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome.
- Guardabassi, L., Jensen, L. B., and Kruse, H. (2009). *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. New York, NY: John Wiley & Sons.
- Hall, R. M., and Collis, C. M. (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons.
- Han, X.-M., Hu, H.-W., Chen, Q.-L., Yang, L.-Y., Li, H.-L., Zhu, Y.-G., et al. (2018). Antibiotic resistance genes and associated bacterial communities in agricultural soils amended with different sources of animal manures.
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R., et al. (2020). Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment.
- Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., Van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., et al. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage.
- Heuer, H., Binh, C. T. T., Jechalke, S., Kopmann, C., Zimmerling, U., Krögerrecklenfort, E., et al. (2012). IncP-1ε plasmids are important vectors of antibiotic resistance genes in agricultural systems: diversification driven by class 1 integron gene cassettes.
- Hölzel, C. S., Schwaiger, K., Harms, K., Küchenhoff, H., Kunz, A., Meyer, K., et al. (2010). Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria.

- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., and Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil.
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment.
- Kim, K.-R., Owens, G., Kwon, S.-I., So, K.-H., Lee, D.-B., and Ok, Y. S. (2011). Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment.
- Makowska, N., Koczura, R., and Mokracka, J. (2016). Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water.
- Manaia, C. M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullo, F., et al. (2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box.
- Muhammad, J., Khan, S., Su, J. Q., Hesham, A. E. L., Ditta, A., Nawab, J., et al. (2020). Antibiotics in poultry manure and their associated health issues: a systematic review.
- Nardelli, M., Scalzo, P. M., Ramírez, M. S., Quiroga, M. P., Cassini, M. H., and Centrón, D. (2012). Class 1 integrons in environments with different degrees of urbanization.
- Pruden, A., Larsson, D. J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K. K., Graham, D. W., et al. (2013). Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment.
- Rawlings, D. E., and Tietze, E. (2001). Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria.
- Rosen, G. D. (1995). "Antibacterials in poultry and pig nutrition"
- Rowe-Magnus, D. A., and Mazel, D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., and Walsh, T. R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production.
- Selvam, A., Xu, D., Zhao, Z., and Wong, J. W. C. (2012a). Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure.
- Smalla, K., Heuer, H., Götz, A., Niemeyer, D., Krögerrecklenfort, E., and Tietze, E. (2000). Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids.
- Su, J.-Q., Wei, B., Ou-Yang, W.-Y., Huang, F.-Y., Zhao, Y., Xu, H.-J., et al. (2015). Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting.
- Suzuki, H., Yano, H., Brown, C. J., and Top, E. M. (2010). Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature.
- Tasho, R. P., and Cho, J. Y. (2016). Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: a review.
- Thomas, C. M., and Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria.
- Van den Meersche, T., Rasschaert, G., Haesebrouck, F., Van Coillie, E., Herman, L., Van Weyenberg, S., et al. (2019). Presence and fate of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and zoonotic bacteria during biological swine manure treatment.
- Van Epps, A., and Blaney, L. (2016). Antibiotic residues in animal waste: occurrence and degradation in conventional agricultural waste management practices.
- Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., and Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview.
- World Health Organization (2014). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. Geneva: WHO.
- Xie, W.-Y., Yang, X.-P., Li, Q., Wu, L.-H., Shen, Q.-R., and Zhao, F.-J. (2016). Changes in antibiotic concentrations and antibiotic resistome during commercial composting of animal manures.
- Yadav, S., and Kapley, A. (2019). Exploration of activated sludge resistome using metagenomics.
- Zhang, M., He, L.-Y., Liu, Y.-S., Zhao, J.-L., Liu, W.-R., Zhang, J.-N., et al. (2019). Fate of veterinary antibiotics during animal manure composting.
- Zhao, X., Wang, J., Zhu, L., and Wang, J. (2019). Field-based evidence for enrichment of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in manure-amended vegetable soils.
- https://ec.europa.eu/health/antimicrobial-resistance/eu-action-on-antimicrobial-resistance_en
- <https://apps.who.int/iris/handle/10665/336379>