

Detekce rezistentních bakterií a genů rezistence v povrchových vodách ČR

Hana Zvěřinová Mlejnková, Štěpánka Šabacká, *Kateřina Sovová

Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i., Praha, *Brno

Centrum Voda: WP 8 Voda a zdraví - Studie výskytu antibiotické rezistence v povrchových vodách v ČR a určení míry rizika pro ohrožení lidského zdraví

- **meta-analýza a systematická rešerše** informací publikovaných ve vědecké literatuře z oblastí, kde je problematika antimikrobiální rezistence (AMR) již delší dobu řešena, tj. klinická a veterinární medicína a aktuálně zařazené oblasti ŽP, včetně všech typů vod
- hledání **optimálního přístupu k dohledu nad šířením AMR** vodním prostředím = identifikace vztahů mezi fenotypovým a genotypovým projevem AMR, detekované ve vodách:
 - **kultivační průkaz** výskytu rezistence u modelové bakterie *E. coli* (disková difuzní metoda) - fenotypový projev AMR
 - **qPCR detekce genů** rezistence v celém mikrobiomu sledovaných vzorků – genotypový projev AMR
 - na náhodném výběru vzorků různých typů vod (z ekonomických důvodů budou využity vzorky z probíhajících projektů VUV)
- výsledkem bude **informace o efektivním potenciálu využití obou přístupů pro dohled nad šířením AMR** vodním prostředím v podmínkách ČR.

Problém: antimikrobiální rezistence (AMR)



- ☐ ohrožení účinnosti léčby infekčních onemocnění antibiotiky = ve světě kolují nebezpečné rezistentní bakterie, na které nefungují běžná ani rezervní antibiotika
- ☐ dokážeme se bránit pouze pomocí **vyšších dávek nebo jiným druhem antibiotik**
 - ☐ omezené množství,
 - ☐ větší zatížení organismu,
 - ☐ více nežádoucích účinků,
 - ☐ bakterie si může najít cestu, jak nad antibiotiky zvítězit.
- ☐ úmrtnost v EU cca **35 000 lidí** ročně a stoupá
- ☐ předpoklad „v roce 2050 už bude na světě tolik odolných bakterií, že lidé budou na infekční onemocnění umírat mnohem častěji než dnes a zbytečně tak zemře **každý rok 10 milionů lidí**“
- ☐ www.antibiotickarezistence.cz/rizika-a-hrozby

Problém: AMR



- ❑ AMR je jedna z nejnaléhavějších **globálních hrozeb pro veřejné zdraví a environmentální udržitelnost**,
- ❑ bakterie rezistentní na antibiotika (ARB) a geny rezistence (ARG) pochází primárně od **klinických a veterinárních** pacientů,
- ❑ mohou se šířit nebo i nově vznikat **v životním prostředí** = klíčová role
- ❑ mnoho **mechanismů rezistence** (enzymatická inaktivace – betalaktamázy, karbapenamázy, efluxní pumpy, změna cílové struktury, vytvoření alternativní metabolické dráhy...),
- ❑ patogeny s kritickou prioritou dle WHO:
 - ❑ MRSA = meticilin rezistentní ***Staphylococcus aureus*** (nemocniční infekce – zápal plic, sepse!)
 - ❑ ***Escherichia coli*** rezistentní k cefalosporinům 3. generace (sepse, záněty ledvin, močové infekce)
 - ❑ ***Klebsiella pneumoniae*** rezistentní ke karbapenemům – infekce krevního řečiště, úmrtnost > 50 %!

Problém: AMR



K šíření AMR přispívá:

- ❑ **vylučování ATB** do odpadních vod (až 80 %),
- ❑ **nadužívání antibiotik v zemědělském sektoru** (do 2006, a v některých zemích mimo EU dosud - preventivní podávání ATB chovným zvířatům za účelem urychlení růstu),
- ❑ užívání **širokospektrých antibiotik** u lidí,
- ❑ **poddávkování** doporučených léčebných dávek (adaptace bakterií na nízké hladiny antibiotik),
- ❑ **nedůsledná diagnostika** původce nemocí, např. léčba virových infekcí antibiotiky.



ECDC: Roční epidemiologická zpráva 2023

Bacterial species	Antimicrobial group/agent	Estimated incidence ^a of isolates from bloodstream infections with resistance phenotype (n per 100 000 population)						
		2019	2020	2021	2022	2023	Trend 2019-2023 ^b	Change 2019-2023 (%) ^c
<i>E. coli</i>	Aminopenicillin (amoxicillin/ampicillin) resistance	22.51	18.45	17.63	21.87	26.48	-	+17.6
	Third-generation cephalosporin (cefotaxime/ceftriaxone/ceftazidime) resistance	6.56	4.65	4.94	6.25	8.15	-	+24.2
	Carbapenem (imipenem/meropenem) resistance	0.00 ^a	0.02 ^a	0.00 ^a	0.04 ^a	0.00 ^a	-	NA
	Fluoroquinolone (ciprofloxacin/levofloxacin/ofloxacin) resistance	9.49	7.07	6.75	7.73	8.81	-	-7.2
	Aminoglycoside (gentamicin/netilmicin/tobramycin) resistance ^d	4.71	3.57	3.29	3.99	5.01	-	+6.4
<i>K. pneumoniae</i>	Combined resistance to third-generation cephalosporins, fluoroquinolones, and aminoglycosides ^d	2.70	1.88	1.93	2.06	2.49	-	-7.8
	Third-generation cephalosporin (cefotaxime/ceftriaxone/ceftazidime) resistance	9.18	7.90	9.39	9.65	10.19	↑	+11.0
	Carbapenem (imipenem/meropenem) resistance	0.09 ^a	0.07 ^a	0.16 ^a	0.24 ^a	0.26 ^a	↑	+188.9
	Fluoroquinolone (ciprofloxacin/levofloxacin/ofloxacin) resistance	8.82	7.62	8.08	8.40	8.34	-	-5.4
	Aminoglycoside (gentamicin/netilmicin/tobramycin) resistance ^d	8.64	7.33	7.86	7.76	8.06	-	-6.7
<i>P. aeruginosa</i>	Combined resistance to third-generation cephalosporins, fluoroquinolones, and aminoglycosides ^d	7.12	5.96	6.40	6.36	6.23	-	-12.5
	Piperacillin-tazobactam resistance	1.60	1.31	1.48	1.91	1.89	↑	+18.1
	Ceftazidime resistance	1.56	1.24	1.34	1.75	1.65	-	+5.8
	Carbapenem (imipenem/meropenem) resistance	1.00	1.03	1.13	1.58	1.62	↑	+62.0
	Fluoroquinolone (ciprofloxacin/levofloxacin) resistance	2.32	1.86	1.86	2.13	1.83	-	-21.1
<i>Acinetobacter</i> species	Aminoglycoside (gentamicin/netilmicin/tobramycin) resistance ^e	1.50	0.86	0.88	1.27	1.07	NA	-28.7
	Combined resistance to ≥3 antimicrobial groups (among piperacillin-tazobactam, ceftazidime, carbapenems, fluoroquinolones and aminoglycosides) ^e	1.29	0.99	1.06	1.34	1.23	NA	-4.7
	Carbapenem (imipenem/meropenem) resistance	0.34	0.32	0.76	0.39	0.45	-	+32.4
	Fluoroquinolone (ciprofloxacin/levofloxacin) resistance	0.36	0.34	0.76	0.42	0.46	-	+27.8
	Aminoglycoside (gentamicin/netilmicin/tobramycin) resistance ^d	0.37	0.33	0.72	0.38	0.42	-	+13.5
<i>S. aureus</i>	Combined resistance to carbapenems, fluoroquinolones and aminoglycosides ^d	0.32	0.29	0.72	0.37	0.41	-	+28.1
	MRSA ^f	3.06	2.28	2.51	2.15	2.92	-	-4.6
	Penicillin non-wild-type ^g	0.22	0.11	0.15	0.30	0.26	-	+18.2
<i>S. pneumoniae</i>	Macrolide (azithromycin/clarithromycin/erythromycin) resistance	0.46	0.16	0.28	0.48	0.65	-	+41.3
	Combined penicillin non-wild-type and resistance to macrolides ^g	0.10	0.05	0.09	0.12	0.08	-	-20.0
<i>E. faecalis</i>	High-level gentamicin resistance	1.92	2.06	3.42	2.33	2.47	-	+28.6
<i>E. faecium</i>	Vancomycin resistance	0.80	0.79	0.85	0.89	1.10	↑	+37.5

Zdroje AMR v životním prostředí

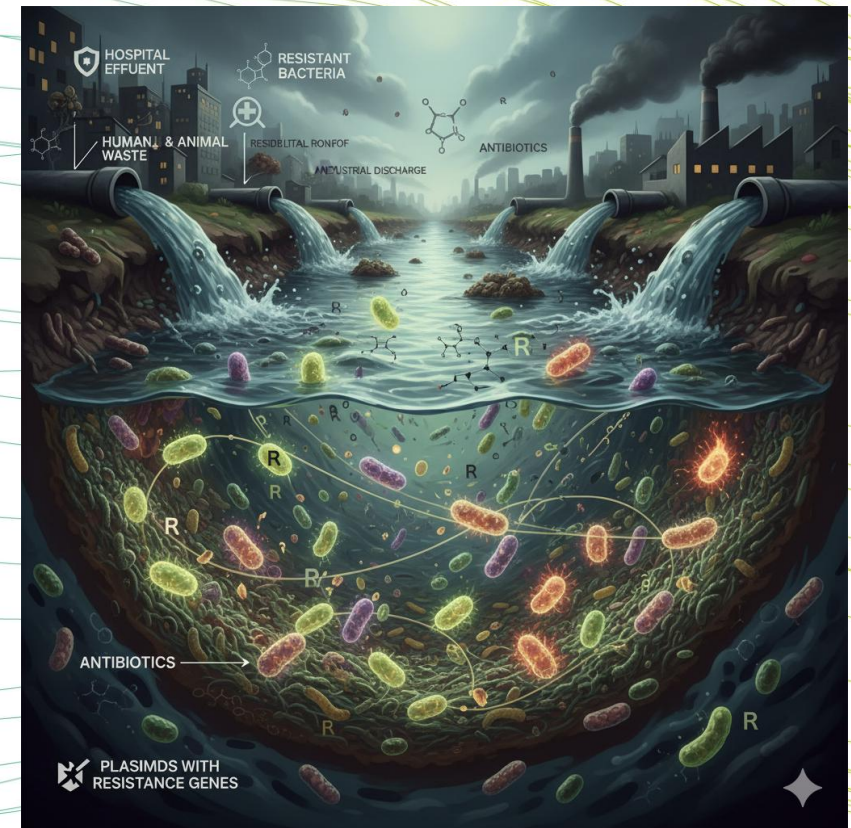


Zdroje AMR = shodné se zdroji mikrobiálního znečištění vod:

- ☐ odpadní vody z ČOV (komunální, nemocniční)
- ☐ volné výusti kanalizací,
- ☐ splachy z půd
- ☐ zemědělství

Nové rezistence:

- ☐ vertikální přenos (mutace a jejich přenos)
- ☐ horizontální přenos genů (vzájemné předávání genů)
 - konjugace (plazmidy)
 - transdukce (bakteriofágy)
 - transformace (volná DNA z mrtvých bakterií)



Proč řešíme AMR v životním prostředí?

Potenciální rizika při kontaktu/požítí kontaminované vody

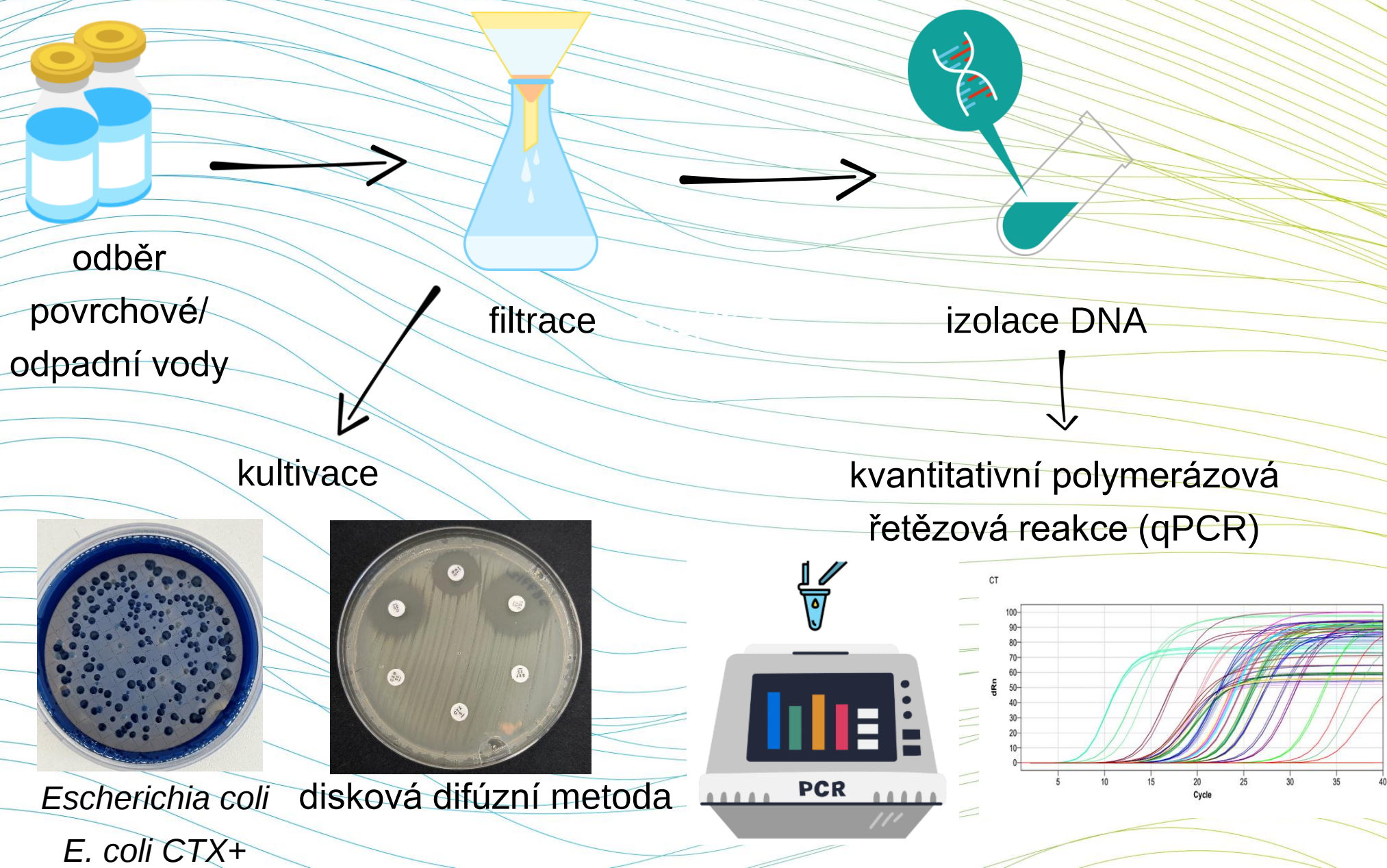
- ☐ pitná voda,
- ☐ rekreace,
- ☐ závlaha.

Vznik a šíření nových rezistencí

- ☐ ČOV - **biologické aktivační nádrže**
 - vysoká koncentrace bakterií z různých zdrojů (nemocniční, environmentální...),
 - selekční tlak – subinhibiční koncentrace ATB,
- ☐ ČOV - **anaerobní vyhnívací nádrže** pro stabilizaci kalu
 - extrémně vysoká koncentrace bakterií, genů rezistence, dalších stresorů (těžké kovy),
- ☐ **povrchové vody** – pod výústěmi ČOV – kontakt s environmentálními bakteriemi,
- ☐ **dnové sedimenty**,
- ☐ **biofilmy**,
- ☐ **zemědělské plochy** hnojené statkovými hnojivy a kaly
- ☐ akvakultury.



Metodika stanovení AMR ve vzorcích vod

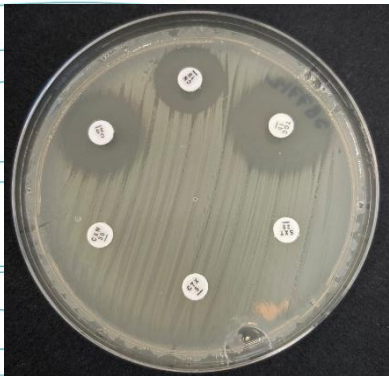


Testovaná rezistence: antibiotika a geny

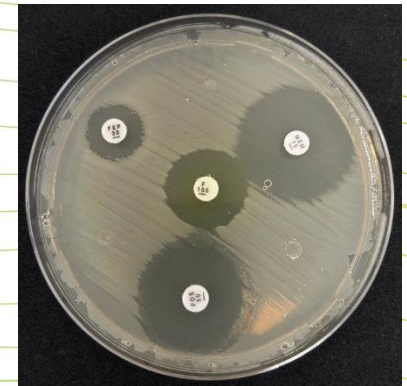
ATB	zkratka	skupina
cefuroxim*	CXM	cefalosporiny 2. generace
cefotaxim*	CTX	cefalosporiny 3. generace
cefepim*	FEP	cefalosporiny 4. generace
meropenem*	MEM	karbapenemy
gentamicin	CN	aminoglykosidy

* β -laktamy

ATB	zkratka	skupina
chloramfenikol	C	amfenikoly
nitrofurantoin	F	nitrofurany
fosfomicin	FOS	fosfonová atb
sulphameth./trimeth.	SXT	sulfonamidy
tigecyklin	TGC	glycylcykliny



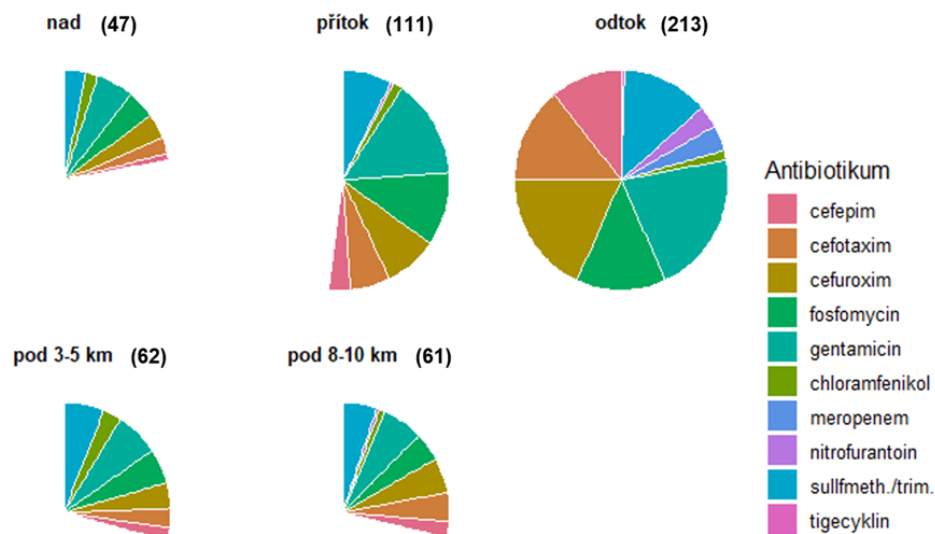
Geny antimikrobiální rezistence (ARG)



16S rDNA	<i>intI1</i>	<i>aadA1</i>	<i>ermB</i>	<i>blaCTX-M1</i>	<i>vanA</i>	<i>sul1</i>	<i>tetW</i>	<i>blaKPC</i>
odhad bakteriálního oživení	potenciál genového přenosu	rezistence k aminoglykosidům	rezistence k makrolidům	rezistence k β -laktamům	rezistence k vankomycinu	rezistence k sulfonamidům	rezistence k tetracyklinům	rezistence ke karbapenemům

Naše výsledky – disková difúzní metoda

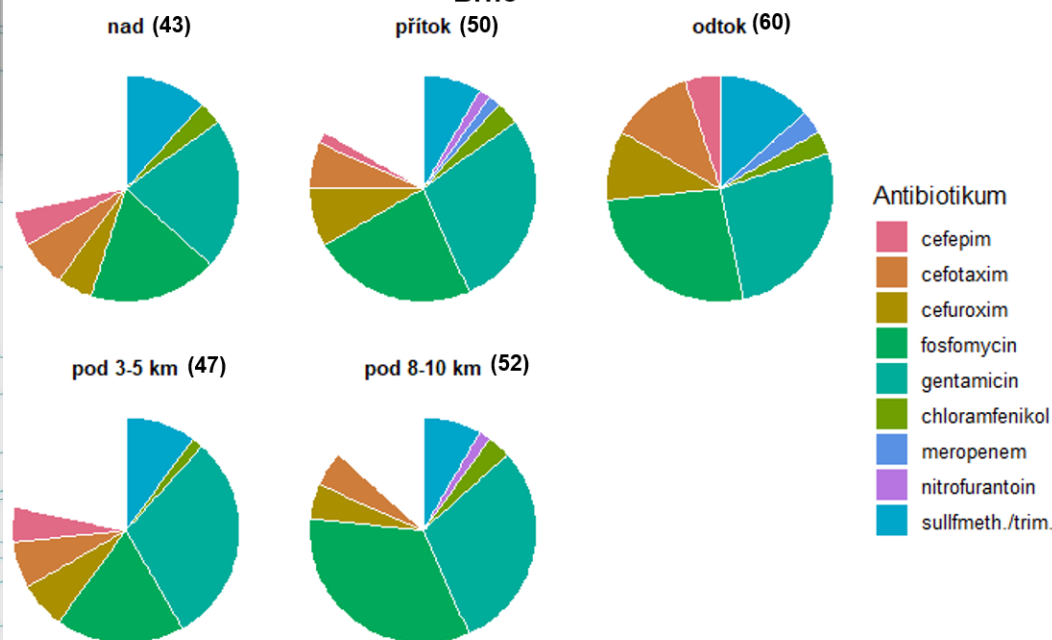
Počty rezistencí a rezistentních izolátů
Praha



Vzorkování POV a ODP (Praha, Brno) vod – 2023-2025 – 1× měsíčně:

- nad ČOV
- pod ČOV (3-5 a 8-10 km)
- přítok ČOV
- odtok ČOV
- potoky – přítoky Vltavy

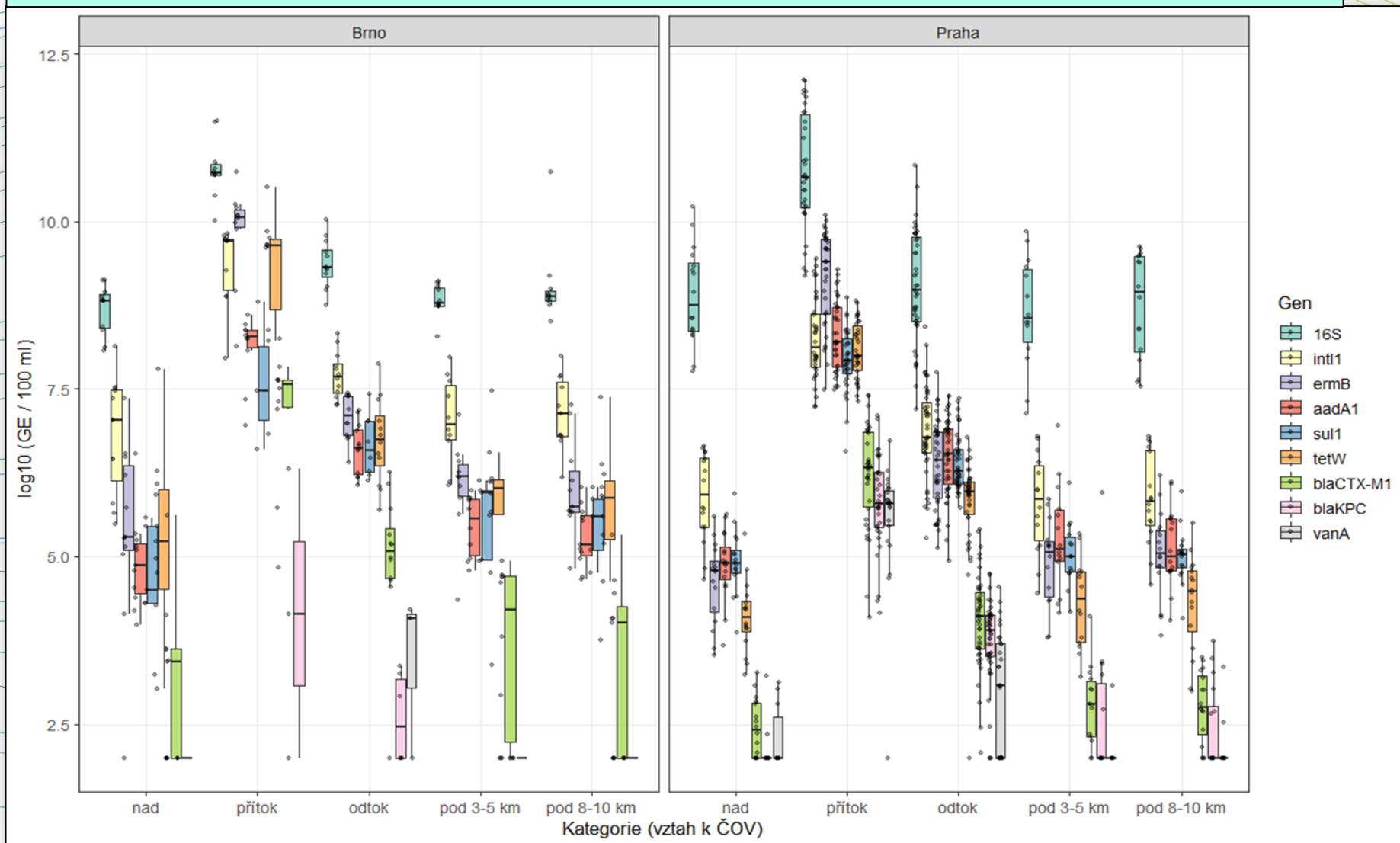
Počty rezistencí a rezistentních izolátů
Brno



- nejčastěji – gentamicin, fosfomycin, cefotaxim, cefuroxim
- výskyt multirezistence (>3 skupiny ATB)
- výskyt kmenů s produkcí betalaktamáz (1–2 %)

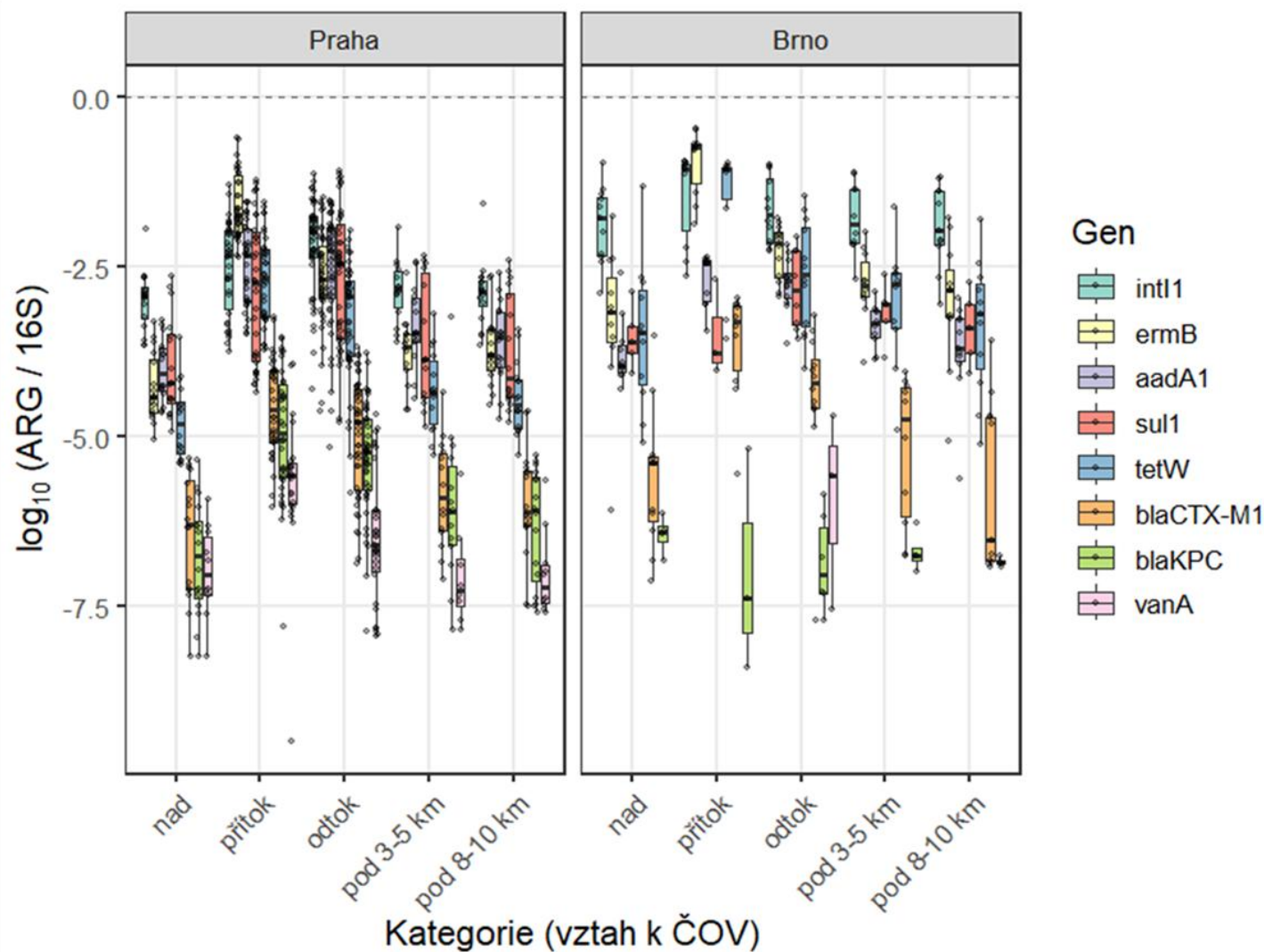
Výsledky stanovení ARG pomocí qPCR

- nejméně ARG nad ČOV (množství i zastoupení skupin ATB)
- řádově více přítoky ČOV
- řádově méně odtoky ČOV
- všechny skupiny vč. genů rezistence k vankomycinu a genu pro karbamenemázy (nejméně často)
- v toku podobně, ale vyšší přítomnost klinicky významných genů než nad ČOV
- více v Brně



Výsledky stanovení ARG pomocí qPCR

- vztaženo na 16S rDNA
- vztah k celkovému bakteriálnímu oživení vzorku
- podobné jako předchozí vyjádření
- přítoky a odtoky ČOV – řádově stejně – odpovídá snížení počtů bakterií na odtocích
- recipient pod ČOV Praha – snížení o řád
- recipient pod ČOV Brno – méně významné snížení – odpovídá vysokému počtu bakterií, danému nízkým naředěním v málo vodném recipientu



Souhrn

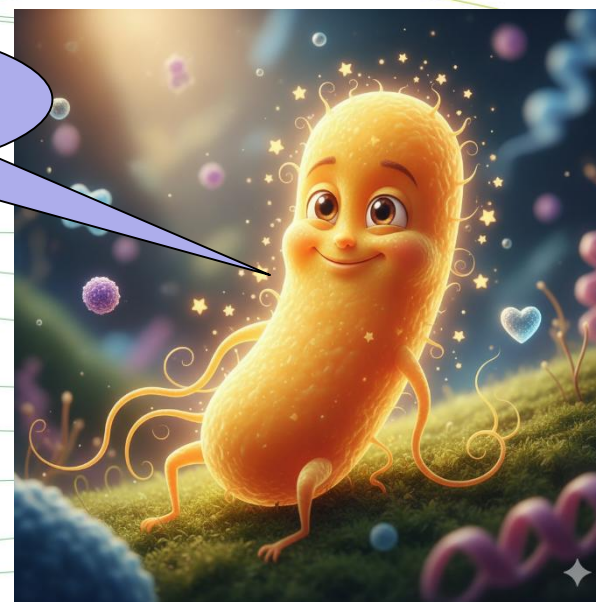
- AMR byla detekována ve všech sledovaných typech vod!
- zaznamenány multirezistentní mikroorganismy!
- potvrzeny klinicky významné geny a typy rezistencí!
- metody kultivační (fenotypový projev) i molekulárně- biologické = PCR (genotypový projev) dávají dobré výsledky
- pro získání komplexních informací nutno kombinovat oba metodické přístupy

Plány

- pokračování v rámci Centra Voda II,
- výzkum zaměřený na hodnocení míry rizika pro veřejné zdraví a životní prostředí:
 - zaměření na širší spektrum mikroorganismů a genů,
 - hodnocení sezónních vlivů, fyzikálně-chemických faktorů, rozdílných technologií čistírenských procesů,
 - vznik a šíření v prostředí
- aplikace postupů a metodik, navržených EU pro Směrnici Evropského parlamentu a Rady (EU) 2024/3019 o čištění městských odpadních vod (UWWTD):
 - ČOV nad 100 tis. EO,
 - měsíčně na přítoku a odtoku ČOV,
 - 24 genů, qPCR,
 - první reporting 2030.

Děkuji za pozornost

...tak co,
kdo z koho?



Příspěvek vznikl za podpory WP 8 „Voda a zdraví“ financovaného z operativního výzkumu Centra Voda SS02030027 „Vodní systémy a vodní hospodářství v ČR v podmínkách změny klimatu“ a za podpory institucionálních prostředků VÚV TGM poskytovaných MŽP.