

PILOTNÍ MONITORING ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE U *ESCHERICHIA COLI* VE VLTAVĚ POD PRAHOU

Adam Šmída¹⁾, Hana Zvěřinová Mlejnková¹⁾, Kateřina Sovová²⁾

¹⁾ Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i., Podbabská 30, Praha,
e-mail: adam.smida@vuv.cz, hana.mlejnkova@vuv.cz,

²⁾ Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i., Mojžírovo nám. 16, Brno,
e-mail: katerina.sovova@vuv.cz

Souhrn

Antibiotická rezistence je celosvětovým problémem, který zásadním způsobem ovlivňuje lidské zdraví. Vlivem enormního užívání antibiotik dochází k podpoře vzniku rezistentních kmenů bakterií, které se stále častěji stávají odolnější vůči běžné léčbě. I přesto, že se problematika antibiotické rezistence týká zejména klinické a veterinární medicíny, hraje při jejím přenosu významnou roli i vodní prostředí. V rámci této pilotní studie byla sledována antibiotická rezistence kmenů *Escherichia coli* v povrchových vodách s ohledem na možné ovlivnění vypouštěnými odpadními vodami z blízkých čistíren odpadních vod. Zjištěné výsledky ukázaly v analyzované sadě vzorků vysoký výskyt antibiotické rezistence, z celkem analyzovaných 182 kmenů *E. coli* z 53 vzorků byla u 68 % detekována rezistence. Výrazně převažovaly kmeny vyznačující se rezistencí k jednomu antibiotiku. Nejčastěji byla zjištěna rezistence ke gentamicinu (54 %), fosfomycinu (17 %) a k cefuroximu. Rezistentní kmeny byly nalezeny na všech lokalitách, byly izolovány i kmeny multirezistentní. Mezi lokality s nejvyššími počty antibiotik, ke kterým byla zjištěna rezistence, patřily Vltava-Rožtoky a Dražanský potok. Jediný profil bez sledované multirezistence byl Vltava-Sedlec. Ve vzorcích z ÚČOV byly nalezeny ve větší míře rezistentní i multirezistentní kmeny. Multirezistentní převažovaly na odtoku, kde byl zjištěn i kmen rezistentní současně k 6 antibiotikům. Naše pilotní studie potvrdila velký význam vodního prostředí z pohledu výskytu a šíření antibioticky rezistentních mikroorganismů, kterému bude nutné se nadále intenzivně věnovat.

Klíčová slova: antibiotická rezistence; antibiotika; AMR; mikrobiální kontaminace; povrchové vody; *Escherichia coli*, čistírny odpadních vod

Summary

Antibiotic resistance is a worldwide problem that has a major impact on human health. The enormous use of antibiotics is contributing to the emergence of resistant strains of bacteria, which are increasingly becoming more resistant to conventional treatments. Although antibiotic resistance is mainly a clinical and veterinary issue, the aquatic environment also plays an important role in its transmission. In this pilot study, the antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains in surface waters was investigated with regard to the potential impact of discharges from nearby wastewater treatment plants. The results showed a high prevalence of antibiotic resistance in the set of samples analysed, with 68% of the total 182 *E. coli* strains analysed from 53 samples having resistance detected. Strains characterized by resistance to one antibiotic were significantly predominant. Resistance to gentamicin (54%), fosfomycin (17%) and cefuroxime were the most frequently detected. Resistant strains were found at all sites, and multiresistant strains were also isolated. The sites with the highest numbers of antibiotics to which resistance was found were Vltava-Rožtoky and Dražanský stream. The only profile without observed multiresistance was Vltava-Sedlec. Both resistant and multiresistant strains were found to a greater extent in the samples from the WWTP. Multiresistant ones were predominant at the outflow, where a strain resistant simultaneously to 6 antibiotics was also detected. Our pilot study confirmed the great importance of the aquatic environment in terms of the occurrence and spread of antibiotic resistant microorganisms, which will need to be intensively addressed in the future.

Keywords: antimicrobial resistance; antibiotics; AMR; microbial contamination; surface waters; *Escherichia coli*; wastewater treatment plants

Úvod

Antibiotická rezistence (AMR) je problém celosvětové úrovně, který si získává čím dál více pozornosti. Nadužívání nebo také nesprávné užívání antibiotik (ATB) vede k vytváření selekčního tlaku, a tím rozvoji rezistentních kmenů. Relevantní riziko představují hlavně klinicky patogenní rezistentní bakterie. Postupná ztráta funkčních léků by mohla zapříčinit, že běžné bakteriální infekce se stanou pro

člověka mnohem nebezpečnějšími, než byly doposud. Přestože je problematika AMR úzce spjata s klinickým nebo veterinárním prostředím, panuje shoda, že dynamika přenosu a šíření je mnohem širší a hraje zde důležitou roli i životní prostředí, nicméně přesný mechanismus zatím není znám.

Jeden z největších zdrojů bakteriální kontaminace životního prostředí představují čistírny odpadních vod (ČOV). I přes současné vyspělé technologie čištění a dočišťování odpadních vod (např. UV dezinfekce) se z ČOV dostává do recipientů velké množství bakterií fekálního původu. Právě ČOV vytváří ideální prostředí pro množení bakterií i pro horizontální přenos genů rezistence. Zároveň se zde nachází zbytky léčiv, které mohou pozitivně působit na selekční tlak. Tím jsou ČOV často označovány za tzv. hotspoty šíření AMR do životního prostředí [1]. Bakterie s AMR se pak mohou dále šířit vodním tokem, která může být i dále využívána pro rekreaci nebo zavlažování v zemědělství. Mohou se tak dostávat do životního prostředí a napomoci v šíření rezistence [2]. Tato studie slouží jako pilotní monitoring stavu antibiotické rezistence v povrchových vodách v úseku Vltavy pod Prahou a jejích přítocích.

Metodika

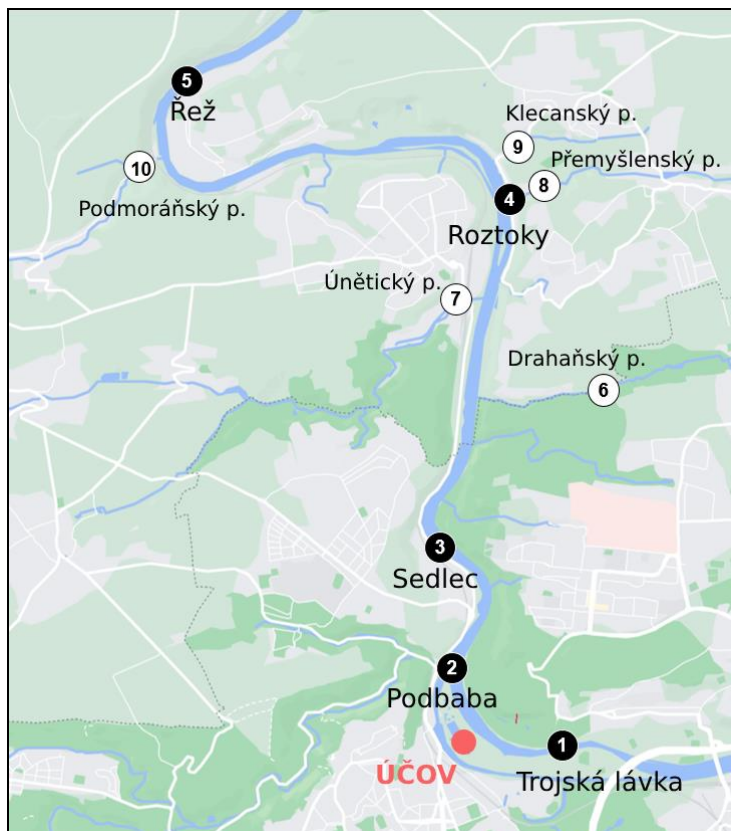
Odběry vzorků probíhaly průběžně od prosince 2022 do listopadu 2023. Monitorován byl úsek Vltavy dlouhý přibližně 10 km po proudu od zaústění Ústřední čistírny odpadních vod (ÚČOV) Praha – od Trojské lávky po pěší lávku v Řeži. Dále byly monitorovány přítoky v tomto úseku, na které jsou napojené menší lokální čistírny odpadních vod. Jednalo se o potoky Dražanský, Únětický, Přemyslský, Klecanský a Podmoránský. Mapa s místy odběrů je vyznačena na obr. 1, jejich bližší charakteristika je v tabulce 1.

Tab. 1: Charakterizace odběrových profilů s počty izolovaných kmenů *E. coli*

Profil	Název odběrového profilu	Popis odběrových profilů	ČOV nad profilem	Počet izolovaných kmenů <i>E. coli</i>
1	Vltava - Trojská lávka	střed toku, cca 900 m nad ÚČOV Praha	menší pražské ČOV	10
2	Vltava - Podbaba	levý břeh Vltavy pod výpustí ÚČOV Praha na konci Císařského ostrova; voda není promíchána	ÚČOV Praha	18
3	Vltava - Sedlec	levý břeh Vltavy poblíž malé pláže, cca 2 km pod ÚČOV	ÚČOV Praha	8
4	Vltava – Roztoky	střed toku cca 6 km pod ÚČOV (odběr z přívozu)	ÚČOV Praha, ČOV Roztoky	21
6	Vltava - Řež	střed toku cca 10 km pod ÚČOV (odběr z lávky)	menší ČOV na přítocích, ÚČOV Praha, ČOV Roztoky	19
7	Dražanský potok	pravostranný přítok Vltavy	ČOV Dolní Chabry	8
11	Únětický potok	levostranný přítok Vltavy	ČOV Tuchoměřice, ČKV+ČOV Sever	11
8	Přemyslský potok	pravostranný přítok Vltavy	ČOV Zdiby	12
9	Klecanský potok	pravostranný přítok Vltavy	ČOV Klecany	17
10	Podmoránský potok	levostranný přítok Vltavy	ČOV Velké Přílepy	8
11	ÚČOV odtok	směsné průtokově závislé 24h vzorky		36
12	ÚČOV přítok	směsné průtokově závislé 24h vzorky		14

Povrchové vody byly odebírány jako prosté vzorky přímo do vzorkovnice. Vzorky od ÚČOV Praha byly jednou měsíčně odebírány pracovníky čistírny jako směsné průtokově závislé 24h vzorky. Po odběru byly vzorky ihned převezeny do mikrobiologické laboratoře a zpracovány standardní kultivační metodou pro stanovení *E. coli* [3]. Z každého vzorku byly izolovány 4 kmeny *E. coli*, u kterých byla zjišťována AMR diskovou difúzní metodou. Počty izolovaných kmenů se u jednotlivých

odběrových profilů z technických důvodů lišily. Z jednotlivých kmenů byly vytvořeny suspenze, které byly rovnoměrně nanесeny na misky s Mueller-Hinton agarem. Poté byly pomocí aplikátoru na agar umístěny disky obsahující antibiotika o různých koncentracích (tabulka 2). Po 24hodinové inkubaci při 36 °C byly odečteny inhibiční zóny jednotlivých antibiotik. Výběr antibiotik, jejich koncentrace a breakpoint průměry zón rezistence byly zvoleny podle tabulek Evropské komise EUCAST [4].



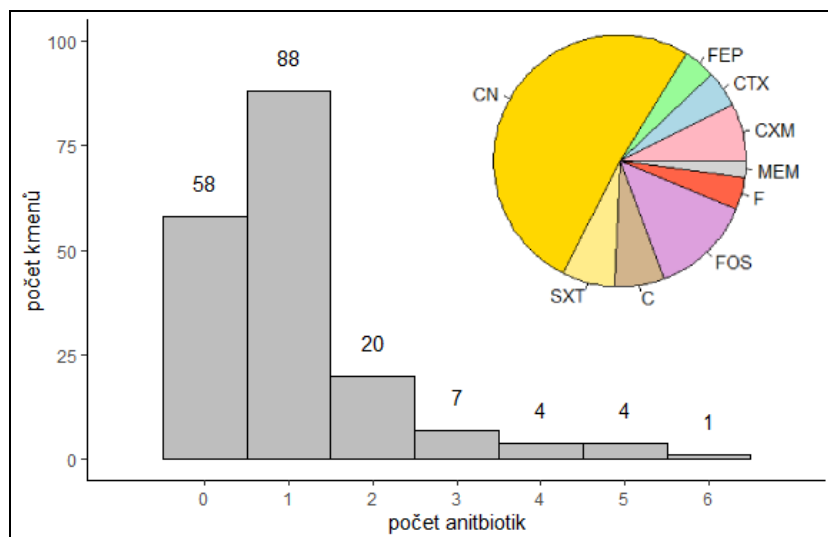
Obr. 1: Mapa s vyznačenými odběrovými lokalitami

Tab. 2: Seznam použitých antibiotik a jejich obsah

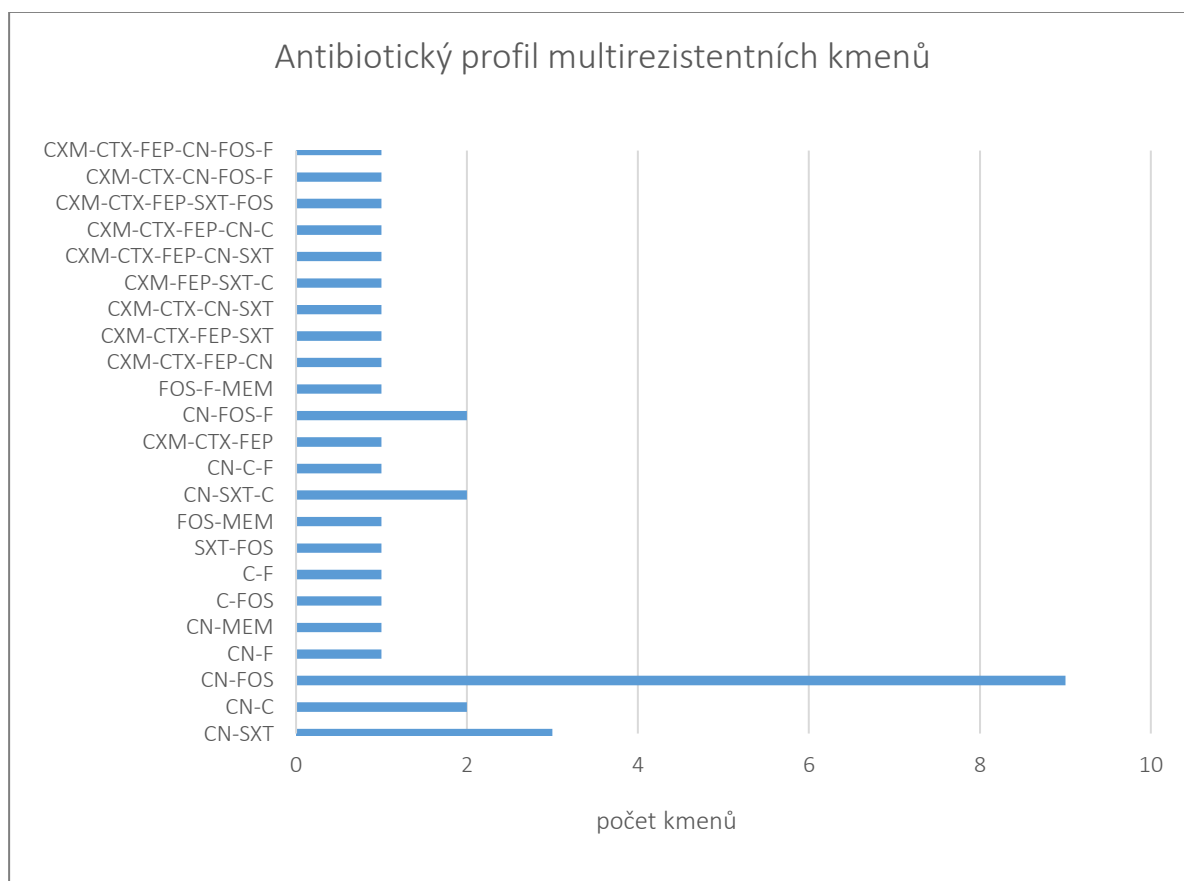
Antibiotikum	Zkratka	Obsah antibiotika v disku (µg)
Cefuroxime	CXM	30
Cefotaxime	CTX	5
Cefepime	FEP	30
Gentamicin	CN	10
Sulphamethoxazole/Trimethoprim	SXT	25
Chloramphenicol	C	30
Fosfomycin	FOS	50
Nitrofurantoin	F	100
Meropenem	MEM	10

Výsledky

Celkem bylo analyzováno 182 kmenů *E. coli* z 53 vzorků, z nichž u 68 % byla detekována rezistence. Výrazně převažovaly kmeny vyznačující se rezistencí k jednomu antibiotiku. U 36 kmenů (20 %) byly detekovány multirezistence, jejich přehled je zobrazen na obr. 2 a 4. Nejčastější antibiotikum, ke kterému byla zaznamenána rezistence, byl gentamicin (CN), rezistence se vyskytovala u 98 kmenů (54 %). K antibiotiku fosfomycin (FOS) byla zjištěna rezistence u 23 kmenů (17 %), k cefuroximu (CXM) u 14 kmenů (8 %). Rezistence k dalším testovaným antibiotikům byla následující: SXT 13 kmenů (7 %), C 12 kmenů (6,5 %), CTX 9 kmenů (5 %), FEP a F 8 kmenů (4 %), MEM 4 kmeny (2 %). Přehled antibiotického profilu multirezistentních kmenů je uveden na obr. 3.



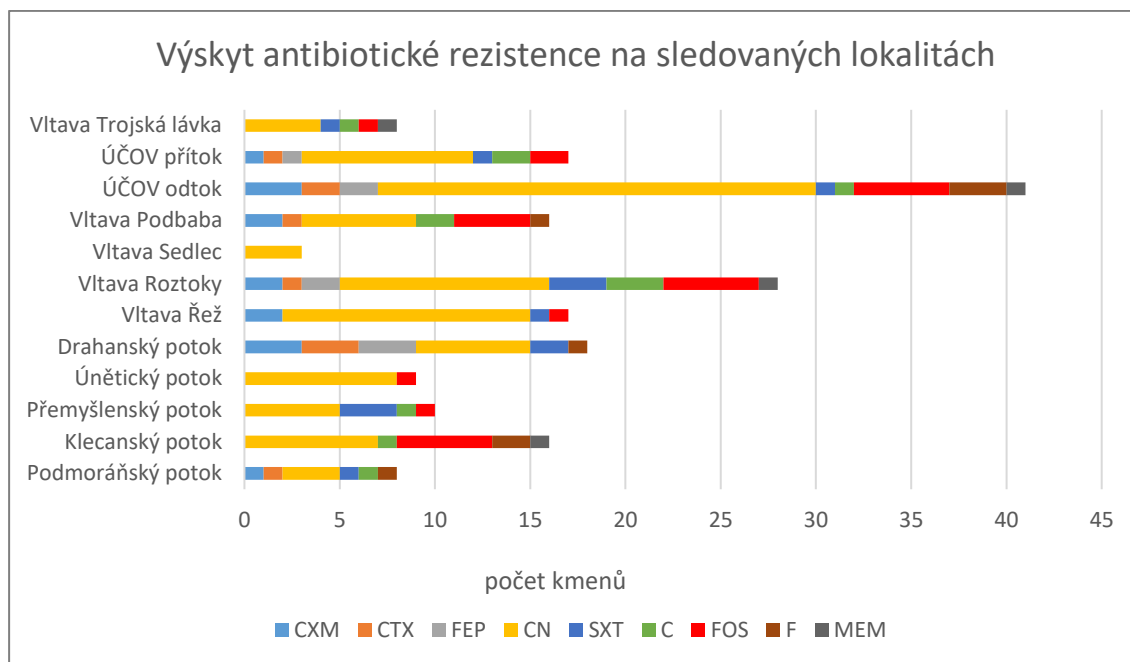
Obr. 2: Rozdělení analyzovaných kmenů *E. coli* podle počtu antibiotik, na která byla zjištěna rezistence (vlevo). Četnost výskytu AMR k jednotlivým antibiotikům u izolovaných kmenů *E. coli* (vpravo)



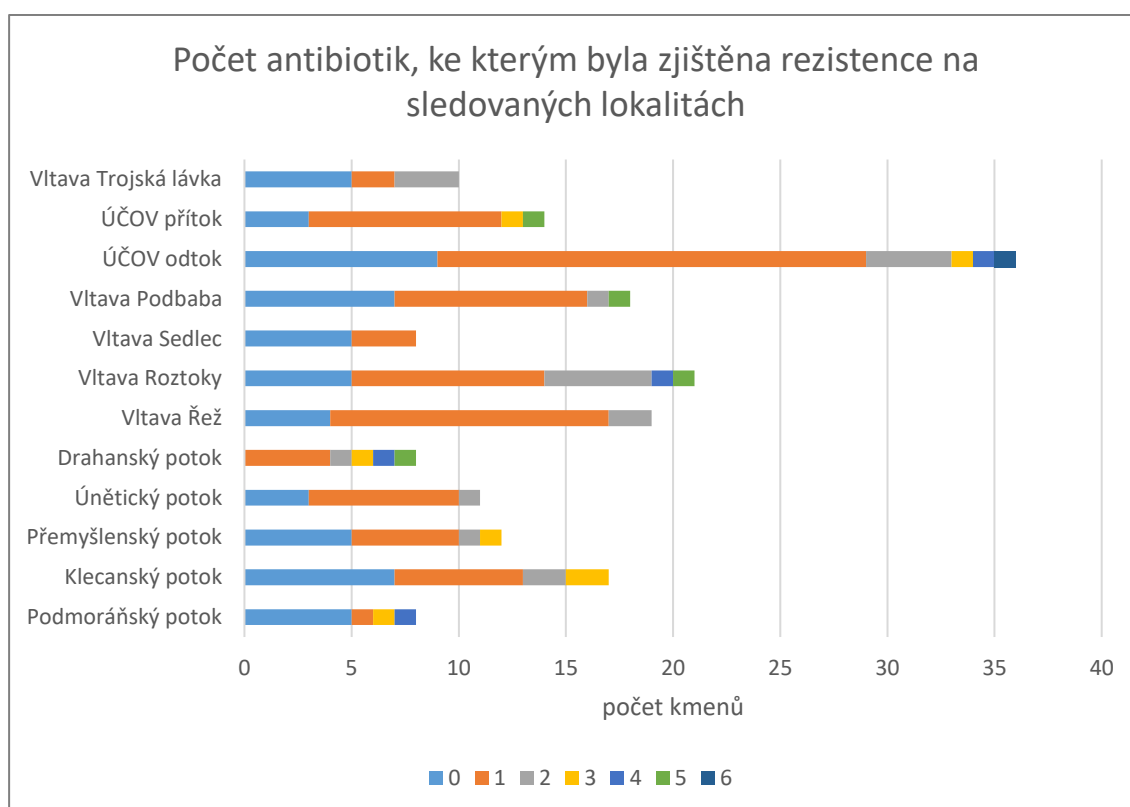
Obr. 3: Antibiotický profil analyzovaných kmenů *E. coli* s kombinacemi multirezistence

Bližší pohled na kmeny, u kterých byla zjištěna rezistence na více antibiotik, ukazuje velkou variabilitu v jednotlivých kombinacích (obr. 3). Nejčastěji se vyskytoval multirezistentní kmen s kombinací gentamicin-fosfomycin s počtem výskytů 9. Druhá nejčastější kombinace byla gentamicin-sulphamethoxazole/trimethoprim u 3 kmenů.

Společným rysem pro kmeny, rezistentní vůči více jak třem antibiotikům, byla rezistence vůči cefuroximu. S jednou výjimkou (lokalita Vltava-Roztoky) tomu tak bylo i u cefotaximu. Jediný profil bez sledované multirezistence byl Vltava-Sedlec (obr. 4 a 5).



Obr. 4: Výskyt rezistence k jednotlivým antibiotikům na sledovaných lokalitách

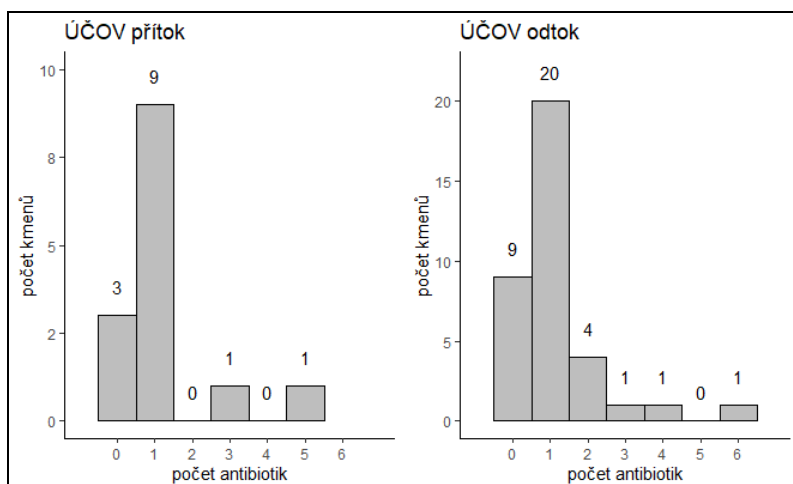


Obr. 5: Počet antibiotik, ke kterým byla zjištěna rezistence u kmenů izolovaných na sledovaných lokalitách

Na obr. 4 je zobrazen výskyt rezistence k jednotlivým testovaným antibiotikům na všech sledovaných lokalitách. Na obr. 5 jsou zobrazeny počty antibiotik, na něž byla zjištěna rezistence a multirezistence. Rezistentní kmeny byly nalezeny na všech lokalitách.

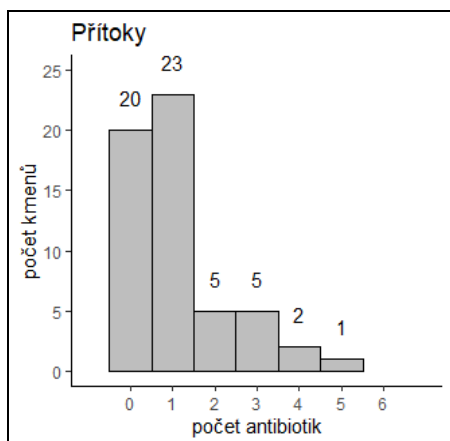
Na obr. 6 jsou zobrazeny počty ATB rezistentních kmenů u vzorků na přítoku a odtoku z ÚČOV Praha. U přítoku i odtoku jsou nejčastěji zastoupeny kmeny s rezistencí na jedno ATB, což bylo zjištěno

i u celého analyzovaného souboru izolátů. U odtoku byl zaznamenán větší počet nerezistentních kmenů oproti přítoku, nicméně přečištěná voda obsahovala vyšší počet multirezistentních kmenů. Byl zde detekován kmen s rezistencí vůči šesti antibiotikům, což je nejvyšší hodnota ze všech analyzovaných kmenů.



Obr. 6: Výskyt rezistentních kmenů *E. coli* u přítoku a odtoku z ÚČOV

Situaci u přítoků Vltavy zachycuje obr. 7. Opět je zde nejčastěji zachycena rezistence vůči jednomu antibiotiku. Dražanský potok byl jediný ze všech sledovaných lokalit, u kterého nebyl detekován kmen bez rezistence.



Obr. 7: Výskyt rezistentních kmenů *E. coli* u přítoků Vltavy

Diskuze a závěr

Tato pilotní studie analyzuje pouze malý úsek z celkové dynamiky šíření AMR ve vodním prostředí. Slouží jako počáteční vhled do problematiky výskytu antibiotické rezistence v povrchových vodách v této oblasti se zaměřením na možné vlivy ÚČOV a přítoků s napojenými menšími lokálními čistírnami. Počet kmenů s prokázanou rezistencí na alespoň jedno antibiotikum není zanedbatelný. Z celkem 182 analyzovaných kmenů byla zjištěna rezistence u 68 %, přičemž každý druhý kmen byl rezistentní vůči gentamicinu (CN). Gentamicin byl použit jako jedno z prvních širokospektrých antibiotik ze skupiny aminoglykosidů, které je dodnes používáno jako silné a značně toxické léčivo proti vážným infekcím, často je podáváno v kombinaci s dalšími beta-laktamovými antibiotiky a je využíván především v chirurgii [5]. Je znám pro svůj pravidelný výskyt rezistence [6]. Původ přítomnosti druhé nejčastěji detekované rezistence k fosfomycinu je pochopitelnější. Jedná se o běžné antibiotikum používané pro léčení nekomplikovaných urinálních infekcí způsobené i *E. coli*. Využívá se také proti již rezistentním kmenům bakterií [7].

V naší studii bylo analyzováno 182 kmenů *E. coli* z 53 vzorků, z nichž u 68 % byla detekována rezistence. Výrazně převažovaly kmeny vyznačující se rezistencí k jednomu antibiotiku. Nejvyšší počet antibiotik, ke kterým byla zaznamenána rezistence u jednoho bakteriálního kmene, bylo 6. Jednalo se o kmen izolovaný ze vzorku odtoku ÚČOV Praha. Mezi další lokality s nejvyššími počty antibiotik, ke kterým byla zjištěna multirezistence, jsou Vltava-Roztoky, Dražanský potok nebo přítok ÚČOV. Jedná se tedy o lokality spjaté s ústřední čistírnou, přítoky ale i místo na řece již poměrně vzdálené (6 km) od vyústění ÚČOV.

Celkově vycházely průměrné počty zjištěných rezistencí k jednomu antibiotiku nejvyšší u přítoku i odtoku z pražské ÚČOV. Naopak úseky považované za nejčistší z pohledu mikrobiální kontaminace (Trojská lávka a Vltava-Řež) neobsahovaly kmeny vykazující rezistenci k více jak 2 antibiotikům najednou.

Čistírny odpadních vod jsou obecně považovány za hotspotsy AMR. I přes velkou redukci znečištění vod (a tím i redukci AMR) se odtud dostává množství rezistentních bakterií a jejich genů rezistence do recipientů [8]. Kmeny *E. coli* rezistentní k vybraným antibiotikům byly detekovány v celém sledovaném úseku Vltavy a v jejích přítocích. S výjimkou lokality Vltava-Sedlec byly vždy nalezeny multirezistentní i kmeny.

S ohledem na pilotní typ studie, v níž dosud nebylo možné systematicky zpracovat reprezentativní sady vzorků, nelze naše závěry zobecnit a přiřadit konkrétním zdrojům. Nicméně zjištěný vysoký výskyt antibioticky rezistentních *E. coli* je alarmující a problematice by měla být nadále věnována patřičná pozornost.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory institucionálních prostředků VÚV TGM, poskytovaných MŽP a projektu SS02030008 Centrum environmentálního výzkumu: Odpadové a oběhové hospodářství a environmentální bezpečnost (CEVOOH).

Literatura

- [1] RIZZO, LUIGI, ET AL. (2023): "Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review." *Science of the total environment* 447 (2013): 345-360.
- [2] KARKMAN A., DO T. T., WALSH F., VIRTA, M. P. (2018): Antibiotic-resistance genes in waste water. *Trends in microbiology*, 26(3), 220-228.
- [3] ČSN 75 7835 Jakost vod - Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*, duben 2009, 12 stran.
- [4] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>.
- [5] RANDALL S., EDSON M. D., CHRISTINE L., TERRELL, M. D. (199): "The aminoglycosides." *Mayo Clinic Proceedings*. Vol. 74. No. 5. Elsevier.
- [6] DAVIES J., GERARD D. WRIGHT (1997): "Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics." *Trends in microbiology* 5.6, 234-240.
- [7] FALAGAS M. E., VOULOUMANOU E. K., SAMONI, G., VARDAKAS, K. Z. (2016): Fosfomycin. *Clinical microbiology reviews*, 29(2), 321-347.
- [8] BURIÁNKOVÁ I., KUČTA P., MOLÍKOVÁ A., SOVOVÁ K., VÝRAVSKÝ D., RULÍK M., ... VÍTEŽOVÁ M. (2021): Antibiotic resistance in wastewater and its impact on a Receiving River: a case study of WWTP Brno-Modřice, Czech Republic. *Water*, 13(16), 2309.