

# *Detekce genů antibiotické rezistence v čistírenských kalech*

Klára Škodáková, Sabina Purkrtová, Jana Říhová Ambrožová, Vladimír  
Todt, Zuzana Nováková, Dana Vejmelková, Jan Bartáček

Datum: 10.2.2021

# Obsah



Úvod do  
problematiky

# Obsah



Úvod do  
problematiky

ARG a jejich  
šíření

# Obsah

Úvod do  
problematiky

ARG a jejich  
šíření

Proč se  
zaměřovat na  
kaly

# Obsah

Úvod do  
problematiky

ARG a jejich  
šíření

Proč se  
zaměřovat na  
kaly

Zvolená  
metodika, cíl  
práce

# Obsah



Úvod do  
problematiky

ARG a jejich  
šíření

Proč se  
zaměřovat na  
kaly

Zvolená  
metodika, cíl  
práce

Výsledky,  
závěr

# Antibiotika (ATB)

- používají se k léčbě onemocnění způsobené různými druhy bakterií
- ALE! vyšší a nevhodnou konzumací se snížila jejich účinnost
- přibývá počet antibiotiky neléčitelných onemocnění

# Antibiotika (ATB)

- používají se k léčbě onemocnění způsobené různými druhy bakterií
- ALE! vyšší a nevhodnou konzumací se snížila jejich účinnost
- přibývá počet antibiotiky neléčitelných onemocnění

## Antibiotická rezistence

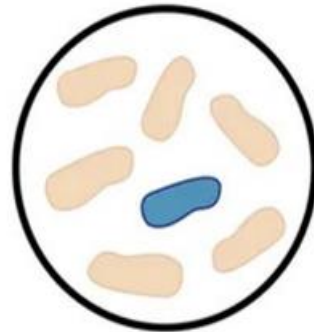
- jeden z hlavních celosvětových problémů
- zvýšená nemocnost, úmrtnost a náklady na terapie
- jak vzniká?



# Antibiotická rezistence



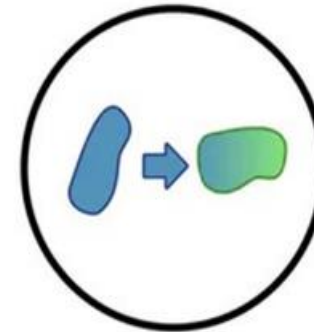
Mnoho bakterií,  
některé rezistentní na  
léky



ATB ničí citlivé bakterie,  
zároveň způsobující  
ideální prostředí pro  
rezistentní bakterie na ATB



Bakterie rezistentní  
na léčivo je nyní  
schopné růstu



Některé bakterie předají svoji  
rezistenci na ATB dalším  
bakteriím



Normální  
bakterie



Rezistentní  
bakterie

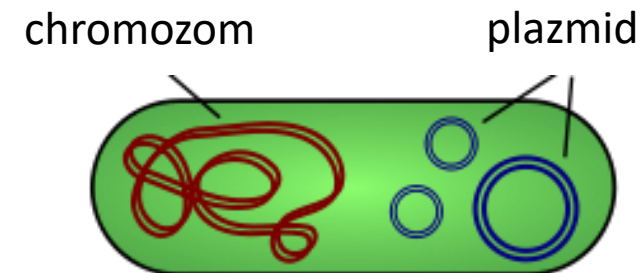


Mrtvé  
bakterie

Upraveno dle: Sayedur Rahman, 2020

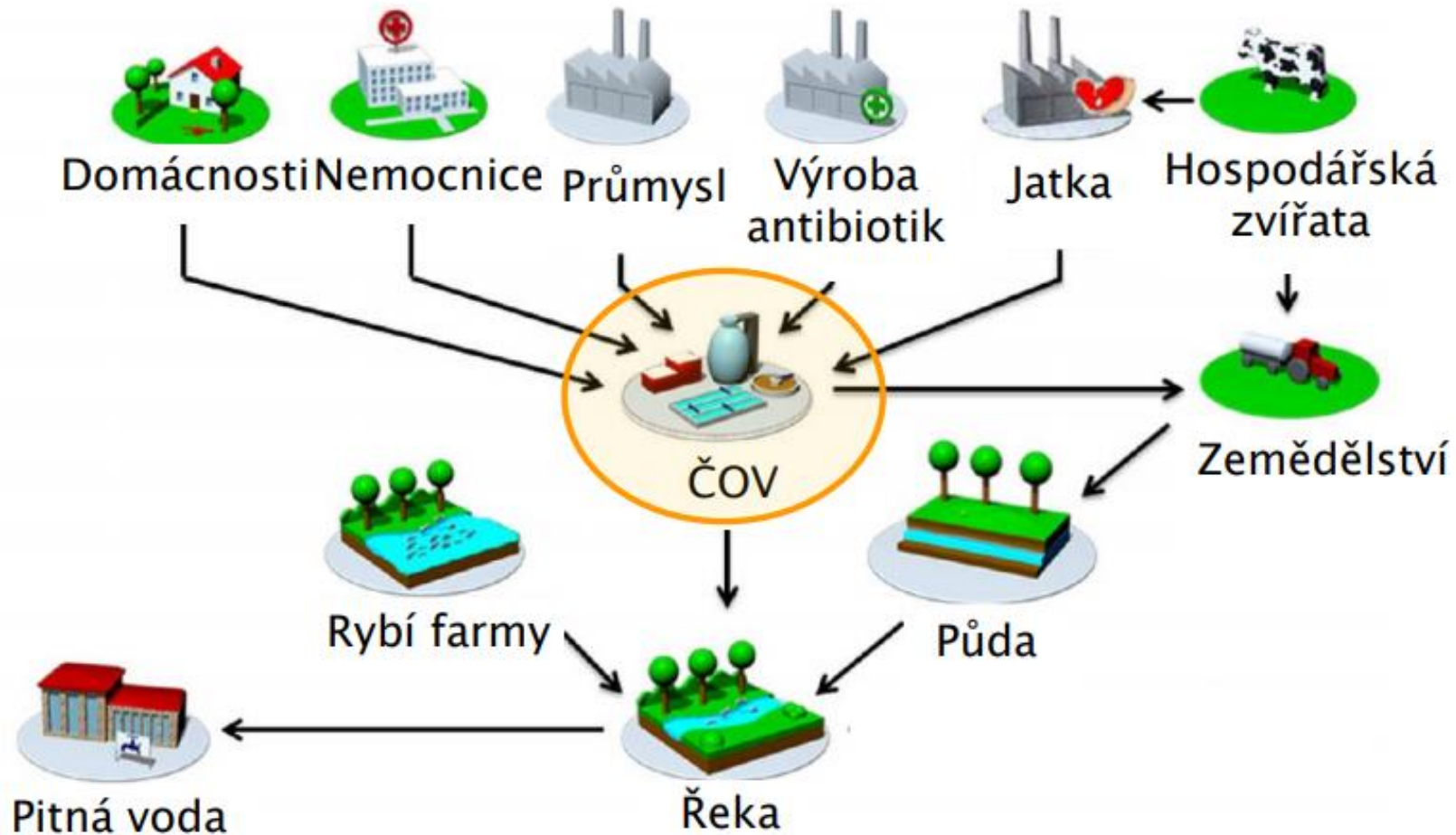
# Šíření genů antibiotické rezistence

- přenos genů mezi bakteriemi : je přenesen pouze malý úsek DNA, většinou plazmidem, chromozomem
- plazmidy- mají jednodušší strukturu, menší hmotnost= jsou flexibilnější
- horizontální přenos genů



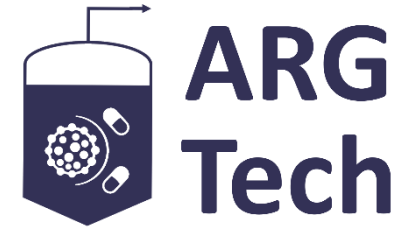
<https://cs.wikipedia.org/wiki/Plazmid>

# Šíření rezistence - člověk vs. prostředí



Upraveno dle Stalder et al. 2012

# Geny antibiotické rezistence v kalu z ČOV

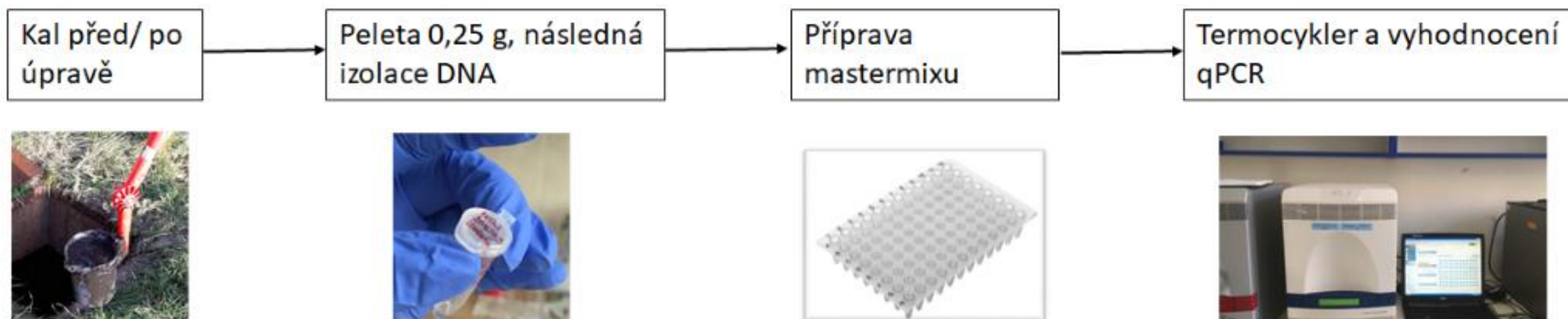


- kal je tzv. rezervoárem genů antibiotické rezistence (ARG) - vhodné podmínky pro šíření rezistence
- přítomnost antimikrobiálních látek, těžkých kovů, polutantů, pesticidní látky
- použití jako hnojiv → nebezpečí?
- geny rezistence se mohou dostávat do podzemních a povrchových vod
- chybí legislativní limity pro ARG

# Metodika práce

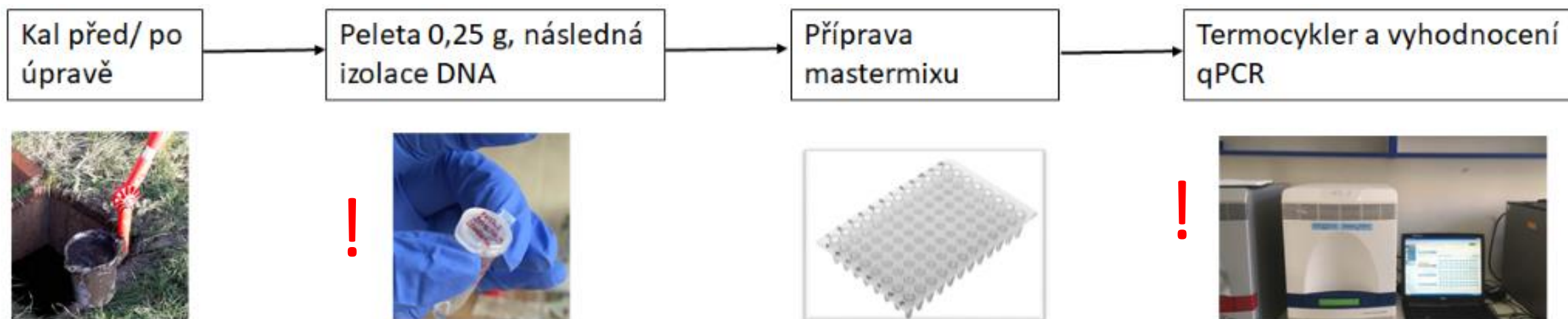


# Metodika práce



Jednotlivé kroky úpravy vzorku pro detekci ARG pomocí qPCR

# Metodika práce



Jednotlivé kroky úpravy vzorku pro detekci ARG pomocí qPCR

# Cíle práce



- 1) výběr vhodného postupu izolace DNA
- 2) kvantifikace genu *su/1* a 16S rRNA pomocí metody qPCR



# Výběr vhodného postupu izolace DNA

## Kity:

- a) DNeasy PowerSoil kit
- b) FastDNA Spin Kit for Soil

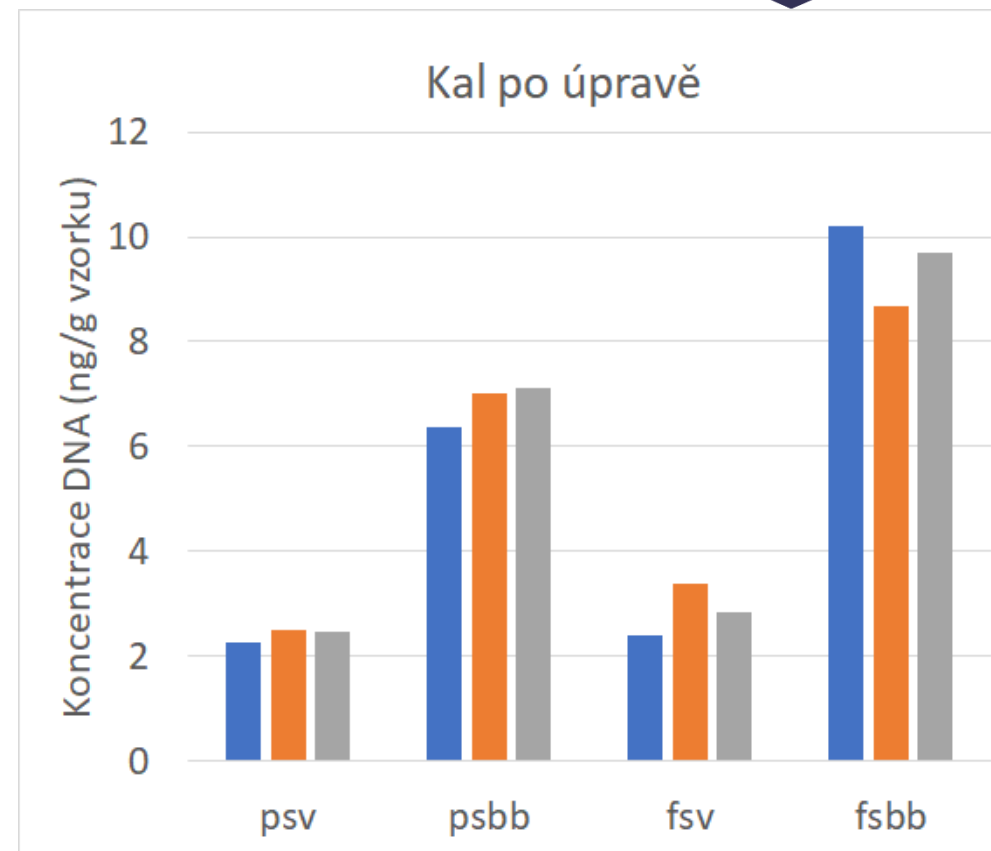
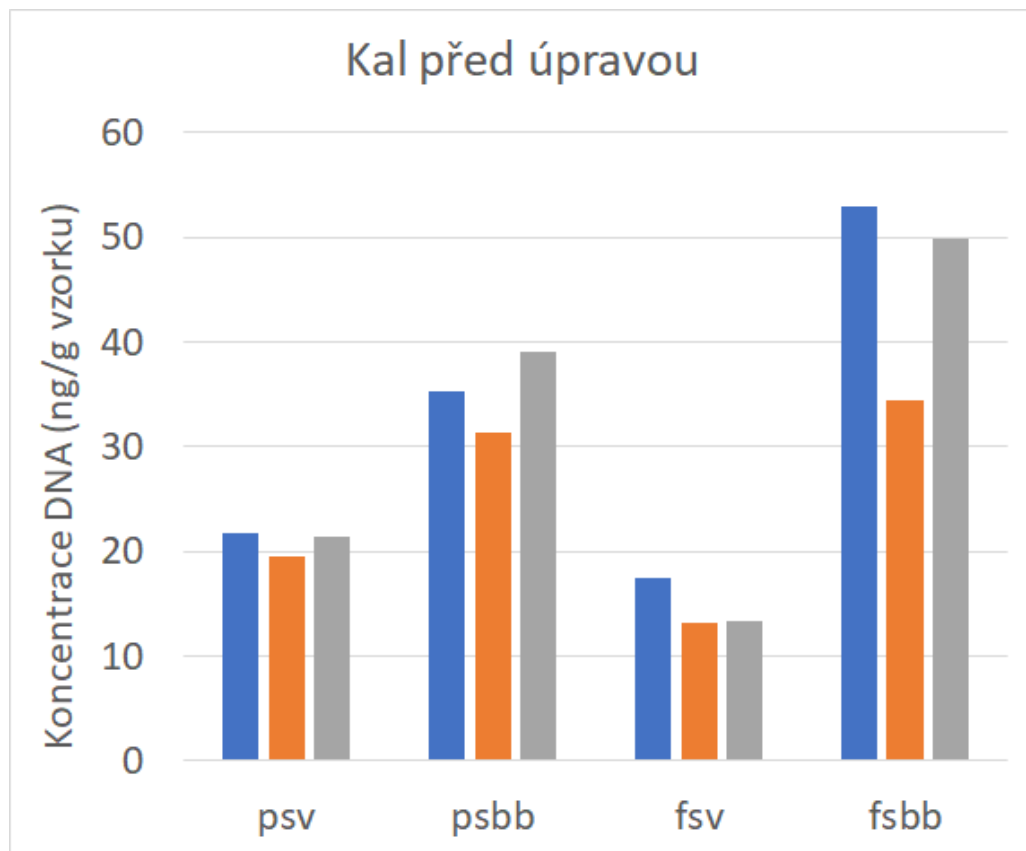


## Dezintegrace buněk:

- a) vortex (5 min)
- b) bead beater (6 min)



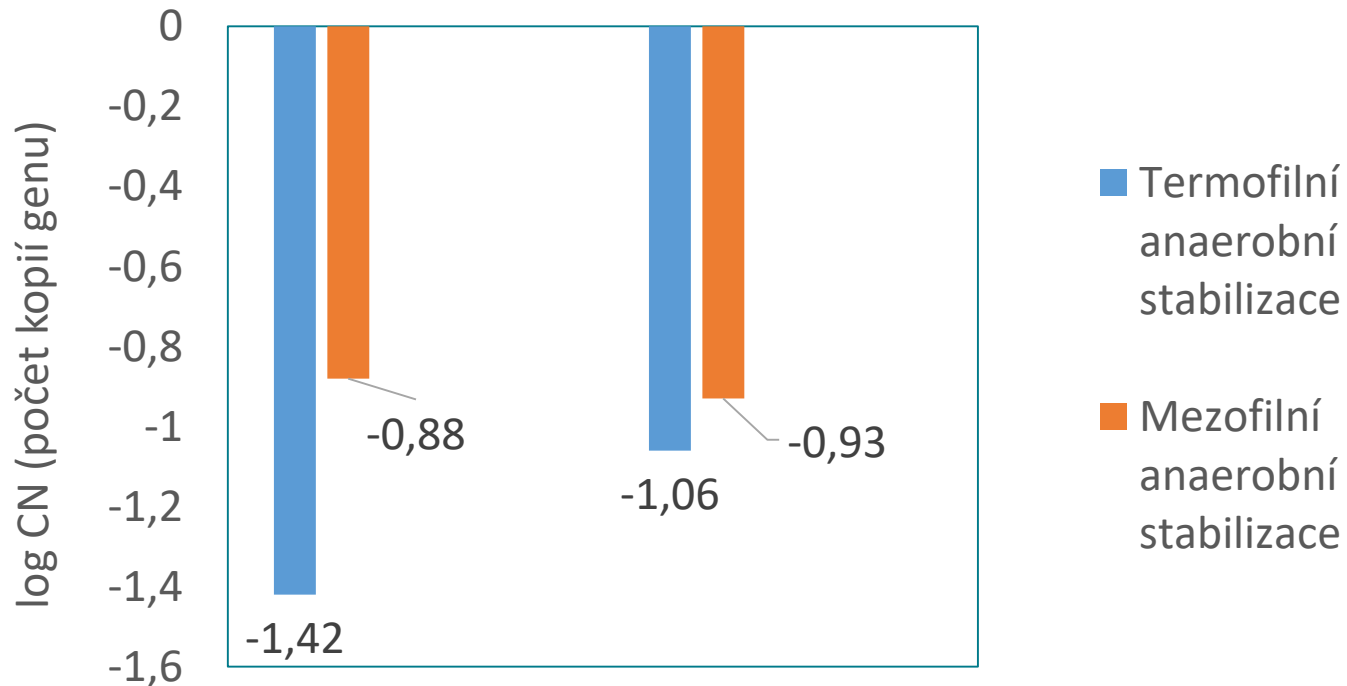
# Výběr vhodného postupu izolace DNA



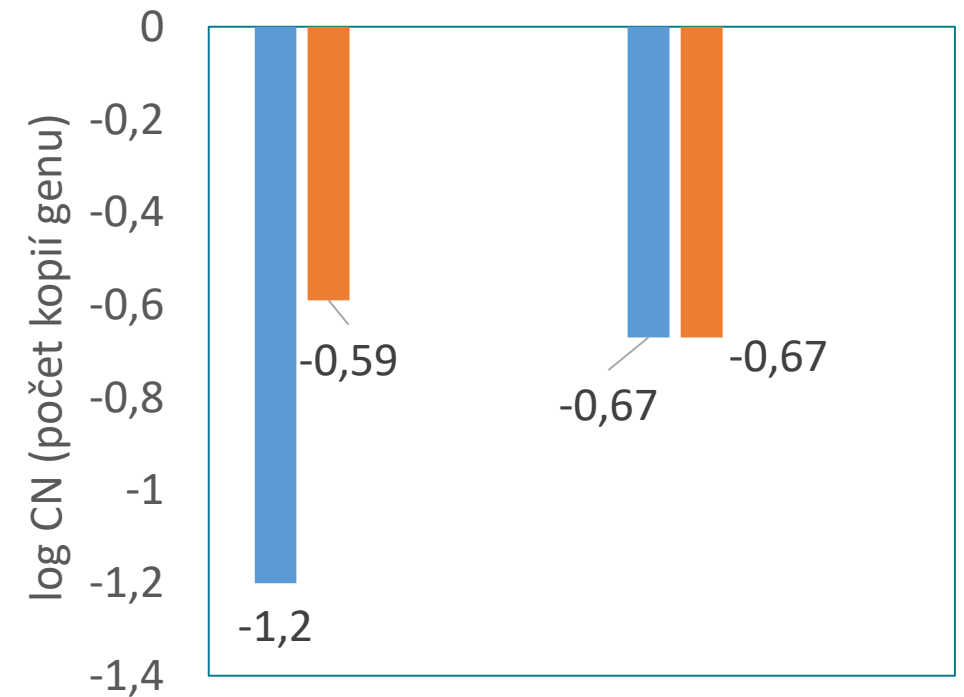
**Vysvětlivky:** psv = DNeasy PowerSoil kit + vortex, psbb = DNeasy PowerSoil kit+ bead beater, fsv = FastDNA Spin Kit for Soil+ vortex, fsbb = FastDNA Spin Kit for Soil+ bead beater

# Kvantifikace genu *su/1*

Redukce CN/g vzorku (logCN)

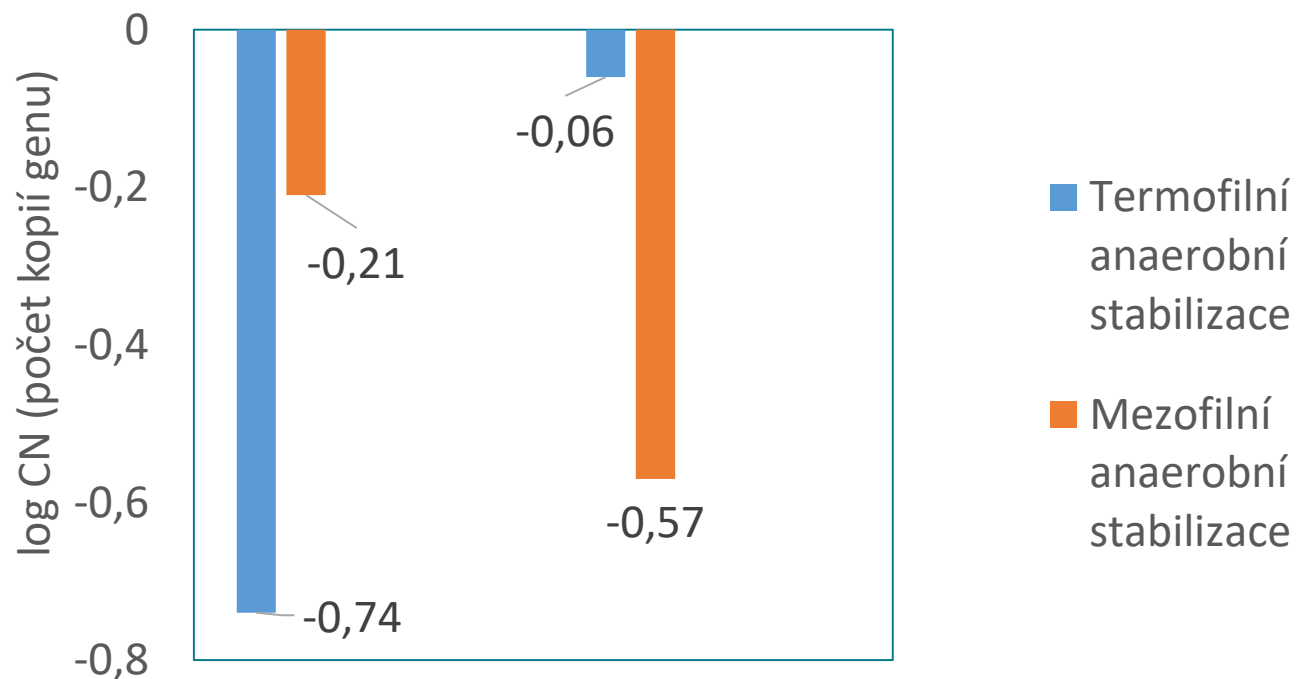


Redukce CN/g sušiny vzorku (logCN)

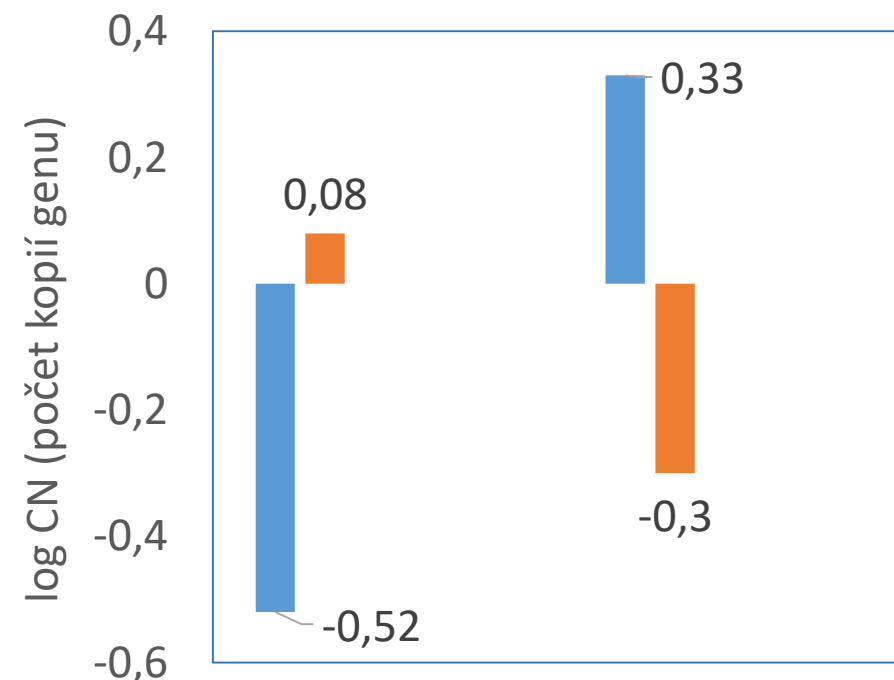


# Kvantifikace genu 16S rRNA

Redukce CN/g vzorku (logCN)



Redukce CN/g sušiny vzorku (logCN)



# Shrnutí

- výběr vhodného postupu izolace DNA
  - nejvyšší výtěžek DNA byl získán při kombinaci bead beateru a FastDNA Spin Kit for Soil
- kvantifikace genu *su1* a 16S rRNA
  - termofilní a mezofilní anaerobní stabilizace mohou sloužit pro částečné omezení šíření antibiotické rezistence do prostředí
- chybí potřebná legislativa

# Plány do budoucna

- vzorkování kalů z více lokalit
- optimalizace primerů pro 10 vybraných genů rezistence
- provést kvantitativní PCR pro vybrané geny
- selekce zkoumaných genů antibiotické rezistence: z pohledu klinické významnosti, nejčastěji přítomné geny a důležité geny dle WHO

# Poděkování



Příspěvek vznikl za finanční podpory projektu TAČR SS01020112-Technologie pro odstranění antibiotické resistance z čistírenských kalů aplikovaných v zemědělství. Za poskytnutí některých vzorků děkujeme PVK, a.s.



## Děkuji za pozornost