



VŠCHT PRAHA

Vodárenská biologie 2018, 6. 2. 2018



ÚSTAV TECHNOLOGIE
VODY A PROSTŘEDÍ



DETEKCE GENŮ REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA NA ČOV TESTOVÁNÍ METODIKY

Dana Vejmelková

Kristýna Časarová

Eva Proková

Jana Říhová Ambrožová

**PROBLEMATIKA REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA
MOŽNOSTI DETEKCE**

ÚVOD

ANTIBIOTIKA

- látky, které usmrcují mikroorganismy nebo inhibují jejich růst a množení
- působí především proti bakteriím (dále někt. houbám, parazitickým prvokům)
- použití: humánní a veterinární medicína, k léčbě infekčních stavů, někdy též preventivně (tzv. ATB profylaxe)
- problém – chybné použití (nevhodné ATB, nevhodné dávkování, nedodržení léčby, atd.)

→ **rozvoj rezistence**

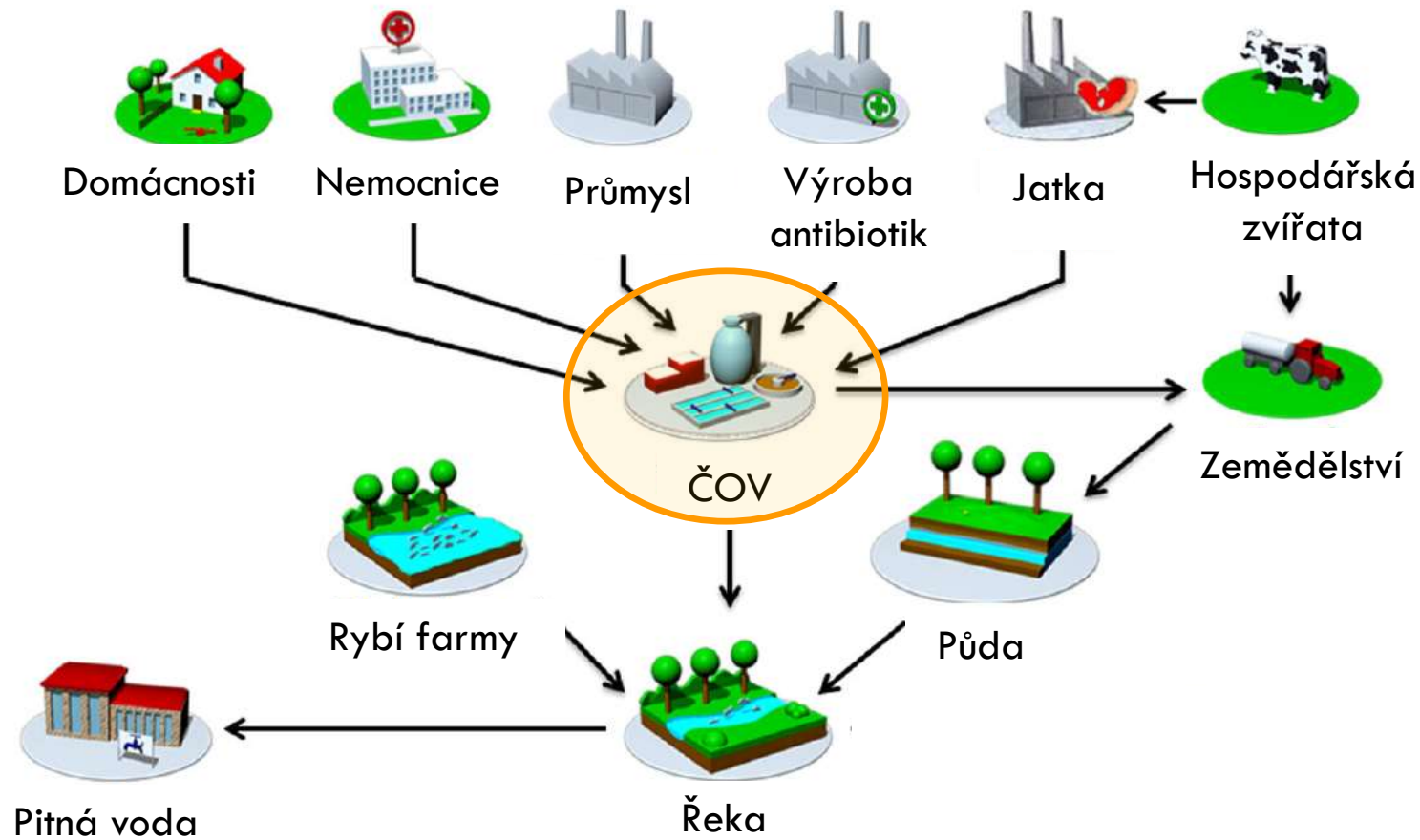
→ prodlužující se léčba, ↑ náklady na terapie, ↑ úmrtnost = **celosvětový problém ohrožujících veřejné zdraví (WHO)**

ANTIBIOTIKA – STANOVISKO WHO

Klíčová fakta (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>)

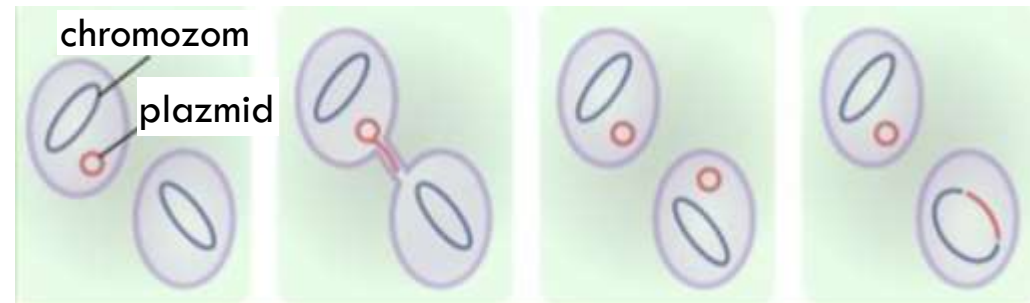
- ATB rezistence = jedna z největších hrozeb pro zdraví, bezpečnost potravin a rozvoj v globálním měřítku.
- ATB rezistence může mít vliv na každého, jakéhokoliv věku, v kterékoli zemi.
- ATB rezistence se vyskytuje přirozeně, ale zneužívání ATB v humánní a veterinární medicíně urychluje proces.
- Rostoucí počet infekcí (př. pneumonie, tuberkulóza, salmonelóza) se stává obtížněji léčitelnými, protože ATB k jejich léčbě se stávají méně účinnými.
- ATB rezistence vede k delším hospitalizacím, vyšším nákladům na léčbu a vyšší úmrtnosti.

ŠÍŘENÍ REZISTENCE – ČLOVĚK vs. PROSTŘEDÍ



ŠÍŘENÍ REZISTENCE

- rezistence k antibiotikům kódována specifickými geny (R-geny)
- nesený na bakteriálním chromozomu nebo na malých extrachromozomálních částicích (př. plazmidy,...)
- mobilní genetické elementy - oproti chromozomu menší molekulární hmotnost, jednodušší struktura → flexibilnější
- horizontální přenos genů (nezávislý na příbuznosti/podobnosti)



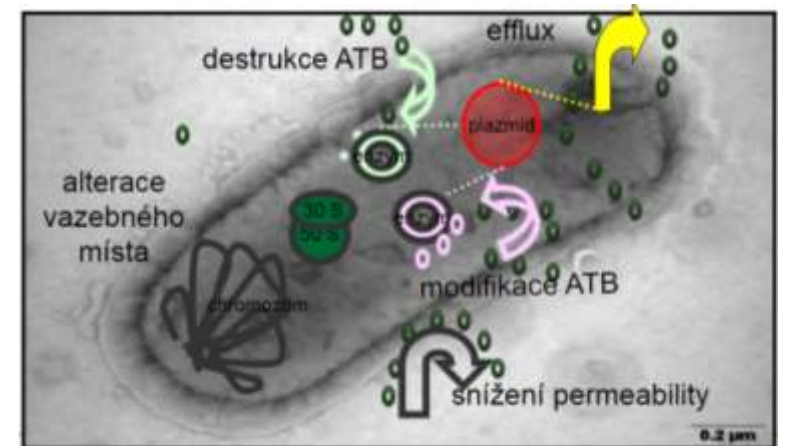
HNACÍ SÍLY ATB REZISTENCE

1. antimikrobiální látky (př. antibiotika, antivirotika)
2. těžké kovy
3. biocidy (př. desinfekční čin., povrchově aktivní látky)

- některé mechanismy rezistence společné pro biocidy/
těžké kovy a antibiotika → umožnění koselekce R-genů

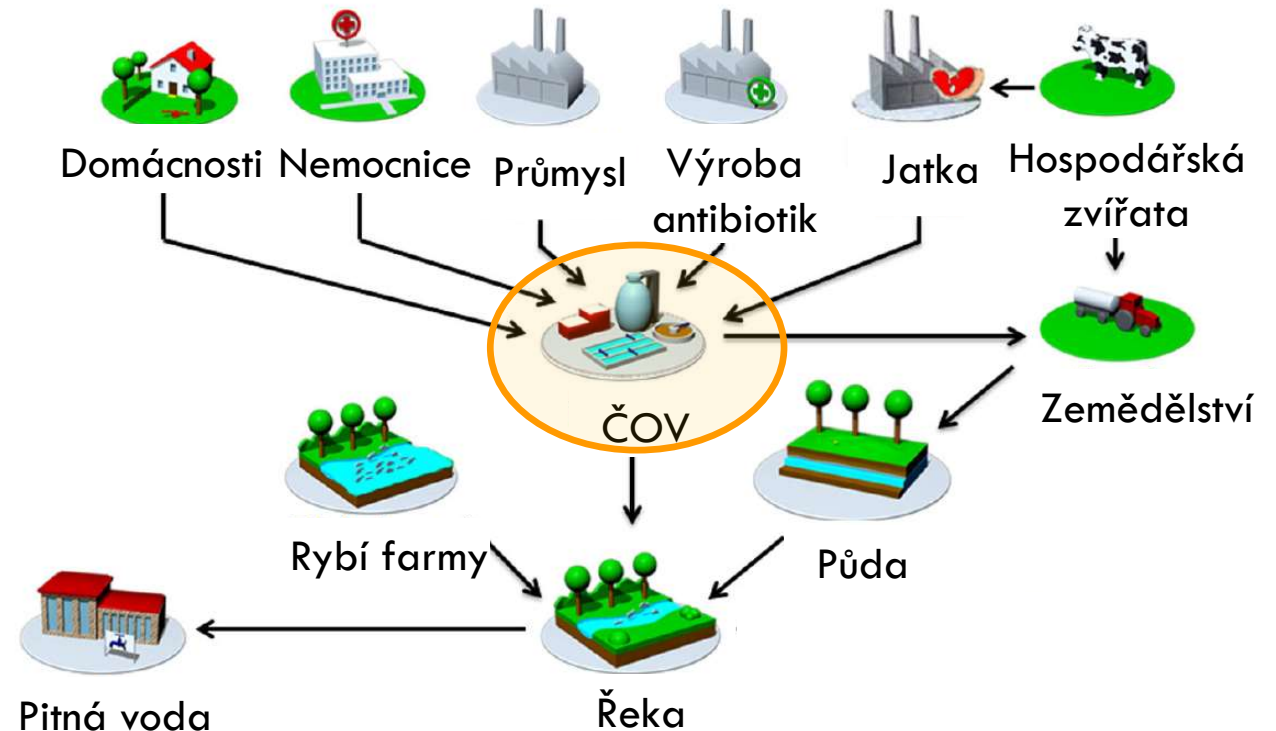
př.: efluxní pumpa (kovy: Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As; ATB: tetracyklin, chloramfenikol, β -laktamy)

snížení permeability membrány (kovy: As, Cu, Zn, Mn, Co, Ag; ATB: ciprofloxacin, tetracyklin, chloramfenikol, β -laktamy)



CO SE DĚJE NA ČOV?

- „hotspot“ rezistentních bakterií a R-genů
- vhodné prostředí pro šíření rezistence
- přítomnost antimikrobiálních látek, (těžkých) kovů, biocidů
- doba kontaktu
- vysoká koncentrace MO
- množení R-bakterií/R-genů
- korezistence – př. odolnost vůči desinfekčním činidlům



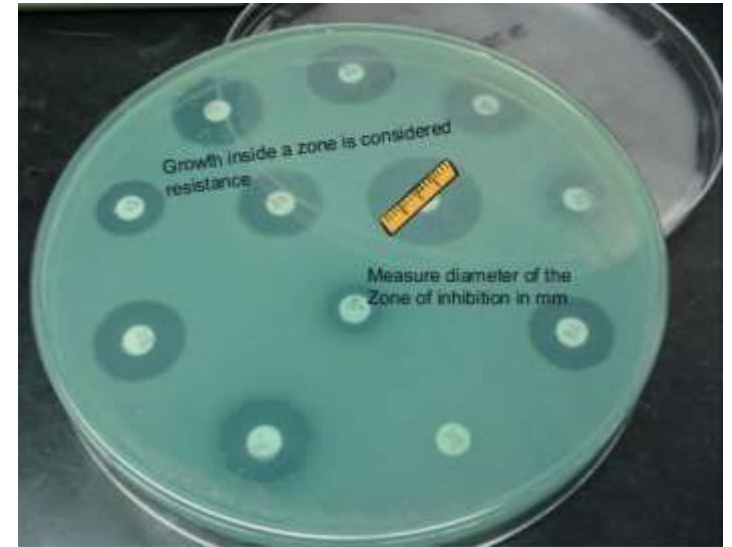
METODY DETEKCE – FENOTYPOVÉ (KULTIVAČNÍ)

■ DIFÚZNÍ A DILUČNÍ TESTY

1. Disková difúzní metoda (kvalitativní)

- Mueller-Hinton agar
- přeočkování předem vykultivované kolonie
- nanesení antibiotických disků → inkubace (16-20 h)
- ATB se postupně uvolňuje do agaru a inhibuje růst citlivých bakterií
- vytvoření inhibičních zón → změření, interpretace výsledků:

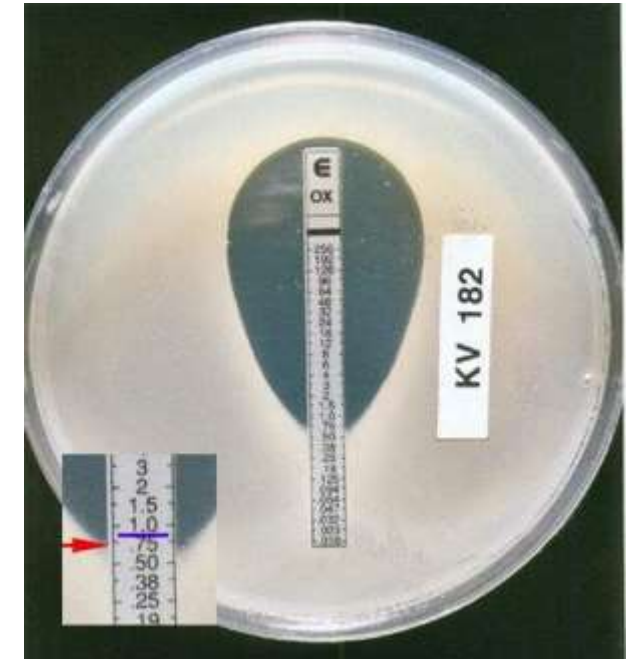
rezistentní / intermediárně rezistentní / citlivý



METODY DETEKCE – FENOTYPOVÉ (KULTIVAČNÍ)

2. Gradientová difúzní metoda (E-test) (kvantitativní)

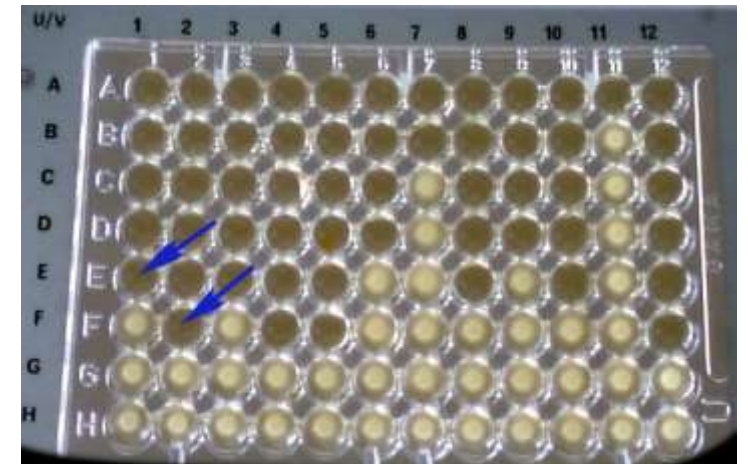
- přeočkování na agar – stejný postup
- nanesení proužku - logaritmicky klesající gradient antibiotika
- inkubace → kapkovitá inhibiční zóna
- místo, kde okraj zóny protne okraj proužku →
minimální inhibiční koncentrace (MIC)
- nevýhoda: vyšší cena



METODY DETEKCE – FENOTYPOVÉ (KULTIVAČNÍ)

3. Diluční metoda (kvantitativní)

- diluční mikrometoda – v mikrodestičce
- odstupňované koncentrace ATB (řaděné geometrickou řadou)
- smíchání s bujónem, naočkování → inkubace (24 h)
- růst buněk se projevuje zákalem
- zjištění MIC: nejnižší koncentrace, která již zabraňuje růstu



METODY DETEKCE – GENOTYPOVÉ (DNA)

DETEKCE R-GENŮ

1. Sekvenování nové generace

- vyšší cena
- znalost bioinformatiky – interpretace dat

2. DNA mikročipy

- princip hybridizace
- vyšší cena

3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- specifické primery pro detekci jednotlivých R-genů, avšak 1 ATB – více R-genů! (multiplex)
- **qPCR** - možnost kvantifikace – monitoring, porovnávání

**DETEKCE R-GENŮ NA ČOV, POLOPROVOZNÍ
AnMBR JEDNOTKY, ZHODNOCENÍ METODIKY**

CÍL PRÁCE

VZORKOVÁNÍ
KULTIVAČNÍ METODY, DNA ANALÝZA - PCR

METODIKA

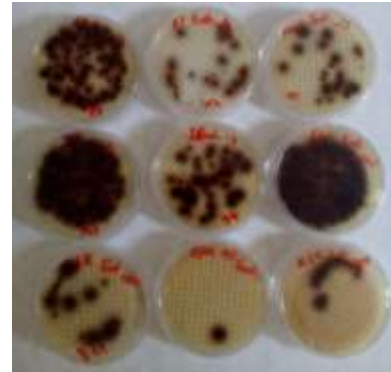
VZORKOVÁNÍ: ČOV + PILOTNÍ JEDNOTKA AnMBR

- přítok ČOV
- AnMBR kal
- odtok mikrofiltrace (0,05 μm)
- odtok ultrafiltrace (0,002 μm)
- odtok ČOV



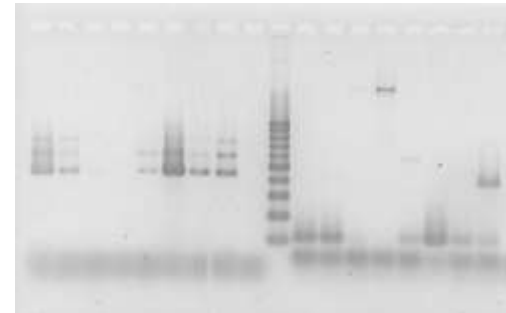
KULTIVACE

- dle norem: koliformní bakterie, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Clostridium perfringens*
- kultivace 1 – 2 dny, potvrzení
- odběr kolonií na PCR



POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

- zakoncentrování vzorku (filtrace/centrifugace)
- izolace DNA (PowerSoil kit), zahřátí+zamražení
- PCR se specifickými primery
 - detekce genů rezistence: β -laktamy (bla-SHV, TEM, CTX-M), sulfonamidy (sul1, sul2)



VÝSLEDKY

VÝSLEDKY – PCR

| | bla-SHV | bla-TEM | bla-CTX-M | sul1 | sul2 |
|----------------------------|----------------|----------------|------------------|-------------|-------------|
| přítok ČOV | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| odtok ČOV | -/+ | +/+ | -/+ | +/+ | +/+ |
| AnMBR kal | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| odtok ultrafiltrace | -/- | -/- | -/- | +/+ | +/+ |
| odtok mikrofiltrace | -/- | -/- | -/- | +/+ | +/+ |

VÝSLEDKY – KULTIVACE, ZÍSKANÉ KOLONIE

| | <i>E. coli</i> | koliformy | <i>C. perfringens</i> | enterokoky |
|----------------------------|----------------|-----------|-----------------------|------------|
| přítok ČOV | ANO/ANO | ANO/ANO | NE /ANO | ANO/ANO |
| odtok ČOV | ANO/ANO | ANO/ANO | NE /ANO | ANO/ANO |
| AnMBR kal | ANO/ANO | ANO/ANO | ANO/ANO | ANO/ANO |
| odtok ultrafiltrace | NE/ANO | ANO/ANO | NE/NE | NE/ANO |
| odtok mikrofiltrace | ANO/ANO | ANO/ANO | NE/NE | NE/ANO |

VÝSLEDKY – *E. coli*

| | bla-SHV | bla-TEM | bla-CTX-M | sul1 | sul2 |
|----------------------------|----------------|----------------|------------------|-------------|-------------|
| přítok ČOV | +/- | +/+ | -/+ | +/- | +/+ |
| odtok ČOV | +/- | +/+ | +/- | +/+ | +/- |
| AnMBR kal | -/+ | +/- | +/- | -/- | -/- |
| odtok ultrafiltrace | NE/+ | NE /+ | NE /- | NE /+ | NE /+ |
| odtok mikrofiltrace | -/- | +/+ | -/- | -/+ | -/+ |

VÝSLEDKY – KOLIFORMY

| | bla-SHV | bla-TEM | bla-CTX-M | sul1 | sul2 |
|----------------------------|----------------|----------------|------------------|-------------|-------------|
| přítok ČOV | -/- | -/+ | -/+ | +/- | -/+ |
| odtok ČOV | -/- | +/+ | +/+ | +/+ | -/- |
| AnMBR kal | +/- | -/- | +/+ | -/- | -/- |
| odtok ultrafiltrace | -/- | -/- | -/- | +/- | +/- |
| odtok mikrofiltrace | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- |

VÝSLEDKY – *C. perfringens*

| | bla-SHV | bla-TEM | bla-CTX-M | sul1 | sul2 |
|-------------------|----------------|----------------|------------------|-------------|-------------|
| přítok ČOV | NE /+ | NE /+ | NE /- | NE /+ | NE /- |
| odtok ČOV | NE /+ | NE /- | NE /- | NE /- | NE /- |
| AnMBR kal | -/+ | +/- | -/- | -/- | -/- |

PŘÍMÁ PCR vs. KULTIVACE-PCR

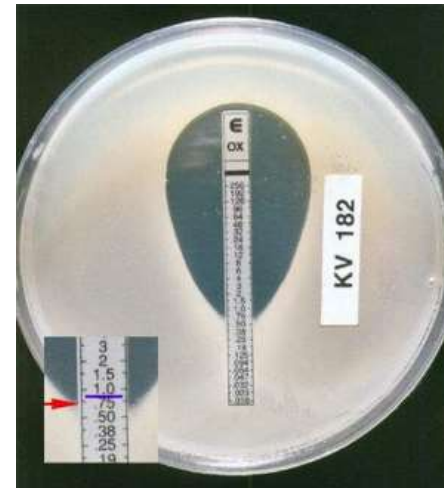
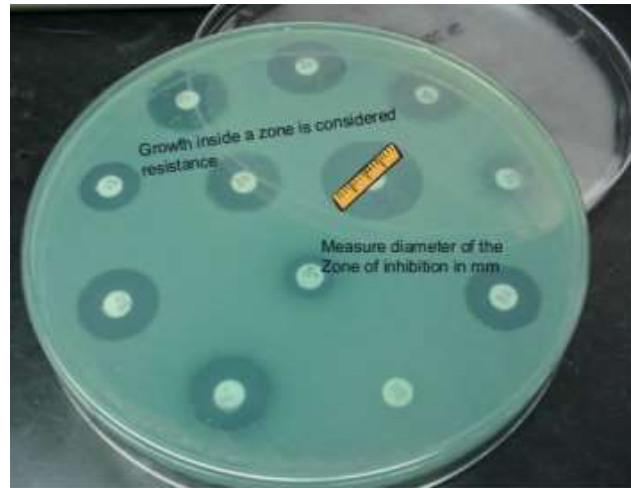
| PCR K-PCR | bla-SHV | bla-TEM | bla-CTX-M | sul1 | sul2 |
|---------------------|---------|---------|-----------|-------|-------|
| přítok ČOV | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + |
| | + / + | + / + | - / + | + / + | + / + |
| odtok ČOV | - / + | + / + | - / + | + / + | + / + |
| | + / + | + / + | + / + | + / + | + / - |
| AnMBR kal | + / + | + / + | + / + | + / + | + / + |
| | + / + | + / - | + / + | - / - | - / - |
| odtok ultrafiltrace | - / - | - / - | - / - | + / + | + / + |
| | - / + | - / + | - / - | + / + | + / + |
| odtok mikrofiltrace | - / - | - / - | - / - | + / + | + / + |
| | - / - | + / + | - / - | - / + | - / + |

JAKÉ POUŽÍT METODY?

- vzorek → **kultivace** → **disková/gradientová difúzní metoda**

výstup: vykultivovaný druh bakterie – rezistentní/citlivý na dané ATB/ MIC

hodnoty pouze pro některé druhy (klinicky významné)



Enterobacteriaceae

Tabulka klinických breakpointů EUCAST v. 7.1 platná od 2017-03-10

Disková difuze (Standardizovaná disková difuzní metoda EUCAST).

Půda: Mueller-Hinton agar.

Inokulum: McFarland 0,5.

Inkubace: Normální atmosféra, 35±1 °C, 18±2h.

Hodnocení: Průměr inhibiční zóny od okrajů nevykazujících růst se měří v odraženém světle na spodní straně misky, umístěné na tmavém pozadí.

Kontrola kvality: *Escherichia coli* ATCC 25922 (CNCTC 5276, CCM 3954). Pro kontrolu složky inhibitoru v discích obsahujících kombinaci inhibitoru s beta-laktamem lze užít *Escherichia coli* ATCC 35218 (CNCTC 5321) nebo *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

| | Peniciliny ¹ | Breakpoint MIC (mg/l) | | Obsah disku (µg) | Breakpoint průměru zóny (mm) | | Poznámky |
|----|---------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | C ≤ | R > | | C ≥ | R < | |
| 7 | Benzylpenicilin | - | - | - | - | - | <p>Poznámky označené číslem se vztahují k obecným komentářům anebo k breakpointům MIC.</p> <p>Písmena se vztahují k diskové difuzní metodě.</p> <p>1/A. Enterobacteriaceae divokého typu jsou kategorizovány jako citlivé k aminopenicilinům. V některých zemích kategorizují divoké typy izolátů <i>E. coli</i> a <i>P. mirabilis</i> jako intermediárně rezistentní, a používají breakpoint MIC C ≤ 0,5 mg/l a odpovídající breakpoint pro průměr inhibiční zóny C ≥ 50 mm.</p> <p>2. Pro účely vyšetření citlivosti se používá fixní koncentrace 4 mg/l sulbaktamu.</p> <p>3. Pro účely vyšetření citlivosti se používá fixní koncentrace 2 mg/l klavulanové kys.</p> <p>4. Pro účely vyšetření citlivosti se používá fixní koncentrace 4 mg/l tazobaktamu.</p> <p>5. Breakpointy závisí na schválení licence pro dávky 2 g x 3.</p> <p>6. Referenční metoda pro MIC mecilinamu je agarová diluce.</p> <p>B. Růst, který se na některých šaržích MH agaru jeví jako úzká vnitřní zóna, se ignoruje.</p> <p>C. Citlivost se odvozuje od ampicilinu.</p> <p>D. Při testování <i>E. coli</i> se ignorují kolonie rostoucí uvnitř inhibiční zóny.</p> |
| 8 | Ampicilin | 8 ¹ | 8 | 10 | 14 ^{A,B} | 14 ^B | |
| 9 | Ampicilin-sulbaktam | 8 ^{1,2} | 8 ² | 10-10 | 14 ^{A,B} | 14 ^B | |
| 10 | Amoxicilin | 8 ¹ | 8 | - | Poznámka ^C | Poznámka ^C | |
| 11 | Amoxicilin-klavulanová kys. | 8 ^{1,3} | 8 ³ | 20-10 | 19 ^{A,B} | 19 ^B | |
| 12 | Amoxicilin-klavulanová kys. (pouze nekomplikované IMC) | 32 ^{1,3} | 32 ³ | 20-10 | 16 ^{A,B} | 16 ^B | |
| 13 | Piperacilin | 8 | 16 | 30 | 20 | 17 | |
| 14 | Piperacilin-tazobaktam | 8 ⁴ | 16 ⁴ | 30-6 | 20 | 17 | |
| 15 | Tikarcilin | 8 | 16 | 75 | 23 | 23 | |
| 16 | Tikarcilin-klavulanová kys. | 8 ³ | 16 ³ | 75-10 | 23 | 23 | |
| 17 | Temocilin | Poznámka ⁵ | Poznámka ⁵ | - | Poznámka ⁵ | Poznámka ⁵ | |
| 18 | | | | | | | |
| 19 | Fenoxymetylpencilin | - | - | - | - | - | |
| 20 | | | | | | | |
| 21 | Oxacilin | - | - | - | - | - | |
| 22 | Cloxacilin | - | - | - | - | - | |

Grampozitivní anaeroby

kromě *Clostridium difficile*

Tabulka klinických breakpointů EUCAST v. 7.1 platná od 2017-03-

10

Kritéria pro vyšetření citlivosti anaerobů diskovou difuzí nebyla stanovena a měla by se vyšetřit MIC. Při použití komerční metody MIC je nutno dodržovat pokyny výrobce.

Tato skupina bakterií zahrnuje mnohé druhy. Nečastěji izolovanými grampozitivními anaeroby jsou: *Clostridium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Eggerthella*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* a anaerobní grampozitivní koky.

Anaeroby nejčastěji charakterizuje nulový růst v prostředí obohaceném CO₂, avšak některé grampozitivní, nesporulující tyčky jako *Actinomyces* spp, většina kmenů *P. acnes* a některé *Bifidobacterium* spp. mohou vyrůst v CO₂ a mohou tolerovat nebo dokonce špatně růst na vzduchu, stále však patří mezi anaerobní bakterie. Některé druhy *Clostridium*, zahrnující *C. carnis*, *C. histolyticum* a *C. tertium*, mohou růst na vzduchu ale v něm nesporulují. Citlivost všech uvedených druhů je nutno vyšetřit v anaerobním prostředí.

| 7 | Peniciliny | Breakpoint MIC (mg/l) | | Poznámky Poznámky označené číslem se vztahují k obecným komentářům anebo k breakpointům MIC. |
|----|------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | 8 C ≤ | R > | |
| 9 | Benzylpenicilin ¹ | 0,25 | 0,5 | 1. Citlivost k ampicilinu, amoxicilinu, piperacilinu a tikarcilinu bez inhibitorů beta-laktamázy lze odvodit od citlivosti k benzylpenicilinu. 2. Pro účely vyšetření citlivosti se používá fixní koncentrace 4 mg/l sulbaktamu. 3. Pro účely vyšetření citlivosti se používá fixní koncentrace 2 mg/l klavulanové kys. 4. Pro účely vyšetření citlivosti se používá fixní koncentrace 4 mg/l tazobaktamu. |
| 10 | Ampicilin ¹ | 4 | 8 | |
| 11 | Ampicilin-sulbaktam | 4 ² | 8 ² | |
| 12 | Amoxicilin ¹ | 4 | 8 | |
| 13 | Amoxicilin-klavulanová kys. | 4 ³ | 8 ³ | |
| 14 | Piperacilin ¹ | 8 | 16 | |
| 15 | Piperacilin-tazobaktam | 8 ⁴ | 16 ⁴ | |
| 16 | Tikarcilin ¹ | 8 | 16 | |
| 17 | Tikarcilin-klavulanová kys. | 8 ³ | 16 ³ | |
| 18 | Temocillin | - | - | |
| 20 | Fenoxymetylpenicilin | IE | IE | |
| 22 | Oxacilin | - | - | |

JAKÉ POUŽÍT METODY?

- vzorek → **kultivace** → **disková/gradientová difúzní metoda**

výstup: vykultivovaný druh bakterie – rezistentní/citlivý na dané ATB/ MIC

hodnoty pouze pro některé druhy (klinicky významné) – nevhodné pro „environmentální“ účely?

- vzorek → extrakce DNA (RNA) → **PCR** → přítomnost/nepřítomnost určitého druhu bakterie nebo určitého genu rezistence
- vzorek → extrakce DNA (RNA) → **qPCR** → počet kopií určitého genu rezistence, možnost porovnání (odstranění vs. namnožení)
- vzorek → **kultivace** → extrakce DNA (RNA) → **PCR** → přítomnost/nepřítomnost určitého genu rezistence v konkrétním druhu bakterie

! omezeno jen na kultivovatelné bakterie !

SOUČASNÁ SITUACE

- zatím žádné legislativní opatření týkající se ATB rezistence
- žádné standardizované metody týkající se ATB rezistence
- PCR metody nejsou standardizovány v oboru technologie vody (normy pro potravinářství)
- kultivační metody – standardizovány EUCAST, CLSI – spíše pro klinické účely?
- potřeba vytvořit postupy pro analýzy bakterií rezistentních na ATB/ geny rezistence pro obor technologie vody/životní prostředí → podrobná analýza koloběhu genů rezistence ovlivňujícího člověka

SHRNUTÍ
PLÁNY DO BUDOUCNA

ZÁVĚR

SHRNUTÍ A PLÁNY DO BUDOUCNA

- zatím pouze 2 sady vzorků
- R-geny jsou na ČOV „všudypřítomné“
- dlouhodobé sledování (min. 1 rok)
- více odběrových míst na ČOV, potenciál membránové filtrace?
- kvantifikace pomocí qPCR
- hledání vhodné metodiky!

SPECIÁLNÍ PODĚKOVÁNÍ: Dr. Josef Máca, Ing. Petr Dolejš, Ing. Jakub Hejnic, Ing. Vojtěch Kouba, Doc. Jan Bartáček



DĚKUJI ZA POZORNOST |

VÝSLEDKY – KULTIVACE vs. PCR

| | Vzorek | <i>E. coli</i> | | enterokoky | | <i>C. perfringens</i> | |
|-------|-----------|----------------|-----|------------|-----------|-----------------------|-----|
| | | Kultivace | PCR | Kultivace | PCR | Kultivace | PCR |
| AnMBR | přítok | + | + | + | + | +/- (2/2) | - |
| | kal | + | + | + | + | +/- (3/2) | - |
| | odtok M | +/- (3/3) | - | +/- (2/4) | +/- (3/3) | - | - |
| | odtok U | +/- (4/2) | - | +/- (3/3) | +/- (3/3) | +/- (1/4) | - |
| ČOV | odtok UN | + | + | + | + | + | - |
| | An AK | + | + | + | + | + | - |
| | Aer AK | + | + | + | + | - | - |
| | odtok ČOV | + | + | + | + | +/- (1/1) | - |

VÝSLEDKY – PCR

| Vzorek | <i>E. coli</i> | enterokoky | <i>C. perfringens</i> | β-laktamové R-geny | | | Sulfonamid. R-geny | |
|-----------|----------------|------------|-----------------------|--------------------|-----------|-----------|--------------------|------|
| | | | | bla-SHV | TEM | CTX-M | Sul1 | Sul2 |
| přítok | + | + | - | + | + | + | + | + |
| kal | + | + | - | +/- (4/2) | + | +/- (4/2) | + | + |
| odtok M | - | +/- (3/3) | - | - | +/- (5/1) | - | + | + |
| odtok U | - | +/- (3/3) | - | - | +/- (3/3) | - | + | + |
| odtok UN | + | + | - | + | + | + | + | + |
| An AK | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Aer AK | + | + | - | + | + | + | + | + |
| odtok ČOV | + | + | - | + | + | + | + | + |