

DETEKCE VYBRANÝCH GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE V NEMOCNIČNÍCH ODPADNÍCH VODÁCH POMOCÍ (q)PCR

Klára Škodáková, Stanislav Gajdoš, Ivan Karpíšek,

[Dana Vejmelková](#)



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



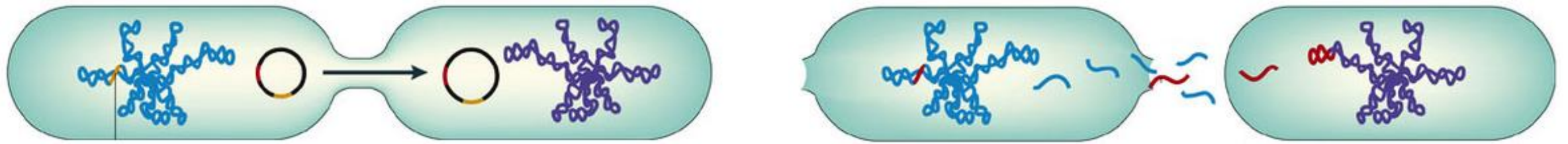
ÚSTAV TECHNOLOGIE
VODY A PROSTŘEDÍ

ÚVOD

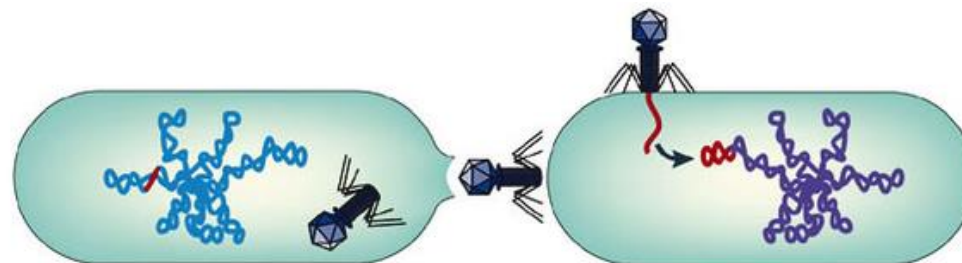
- Šíření genů ATB rezistence v prostředí
- ATB rezistence na ČOV



ŠÍŘENÍ GENŮ ATB REZISTENCE



- **Horizontální přenos** genů rezistence - považován za hlavní hnací motor narůstající rezistence k antibiotikům
- mobilní genetické elementy – kontaktně/bezkontaktně (volná DNA)
- přenos na patogenní/nepatogenní bakterie, environmentální/adaptované na člověka/zvířata
- možné šíření mezi různými ekosystémy (člověk - zvířata – prostředí; ČOV - rackové)



ATB
REZISTENCE
NA ČOV
- „hotspot“??

AKTIVOVANÝ KAL:

- vysoká koncentrace mikroorganismů/bakterií
- dostatečná doba kontaktu

HNACÍ SÍLY ATB REZISTENCE:

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

HYGIENIZACE KALU/ODTOKU Z ČOV:

- lyze buněk – uvolnění DNA do prostředí

Nemocniční OV/ČOV

- ARB (bakterie rezistentní k ATB) i ARG (geny ATB rezistence) všudypřítomné v OV
- Nemocniční OV – více koncentrované
- Nutný monitoring – vhodné dezinfekční procesy

METODIKA

- Vzorkování
- Extrakce DNA
- ARGs
- PCR



Vzorkování nemocniční čOV

- infekční přítok
- odtok po chloraci
- kal po pasterizaci



Izolace DNA

PCR

elektroforéza

Odlišná předúprava:

- Filtrace odtoku
- Filtrace/centrifugace přítoku
- Žádná předúprava pasterizovaného kalu

Izolace DNA

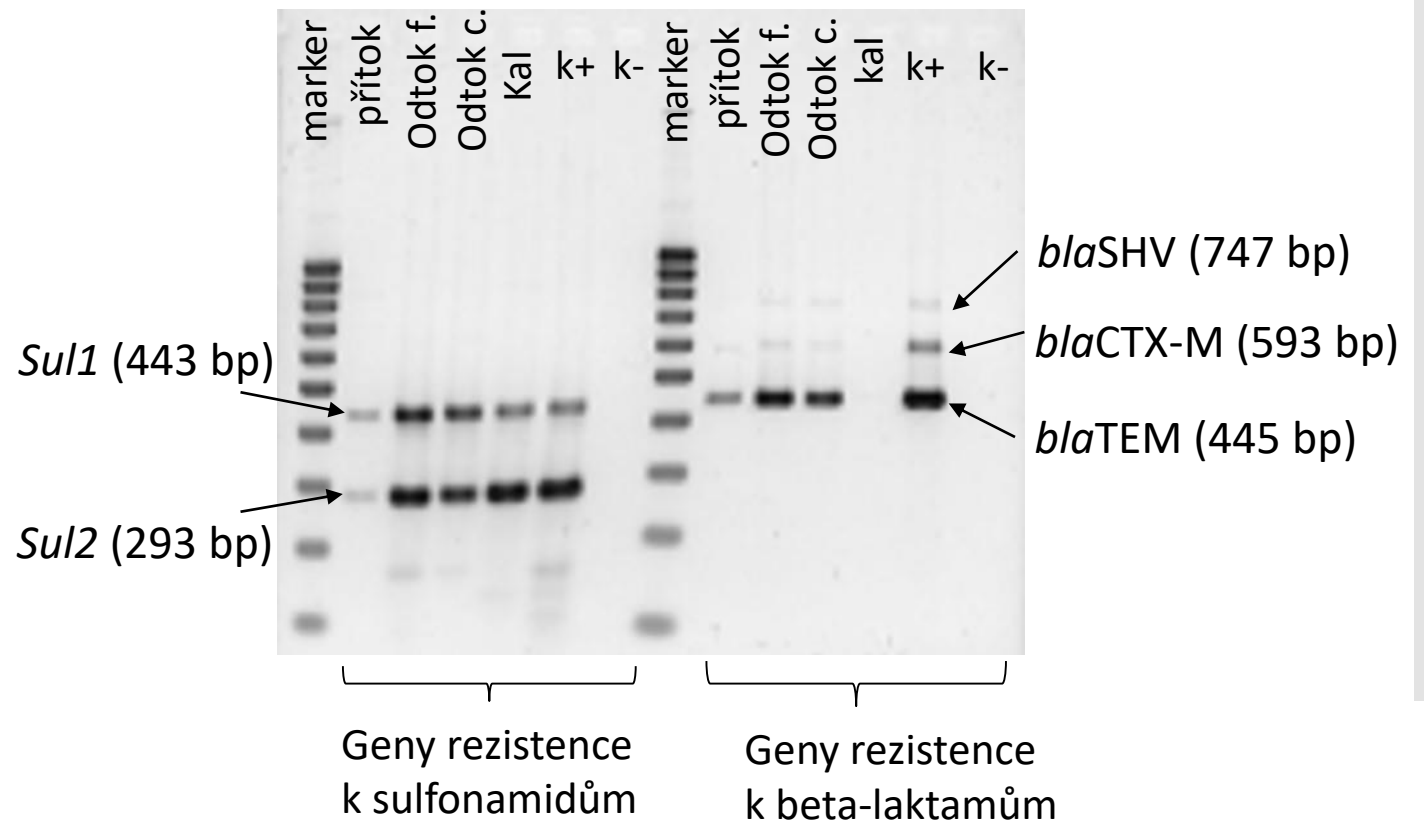
- DNeasy PowerSoil kit (Qiagen)

PCR

- 3 multiplex reakce

PCR
- 3 multiplex
reakce
elektroforéza

- *sul1* + *sul2* (rezistence k sulfonamidům)
- *blaTEM* + *blaCTX-M* + *blaSHV* (rez. k betalaktamům tř. A)
- *blaVIM* + *blaNDM* (rezistence ke karbapenemům)

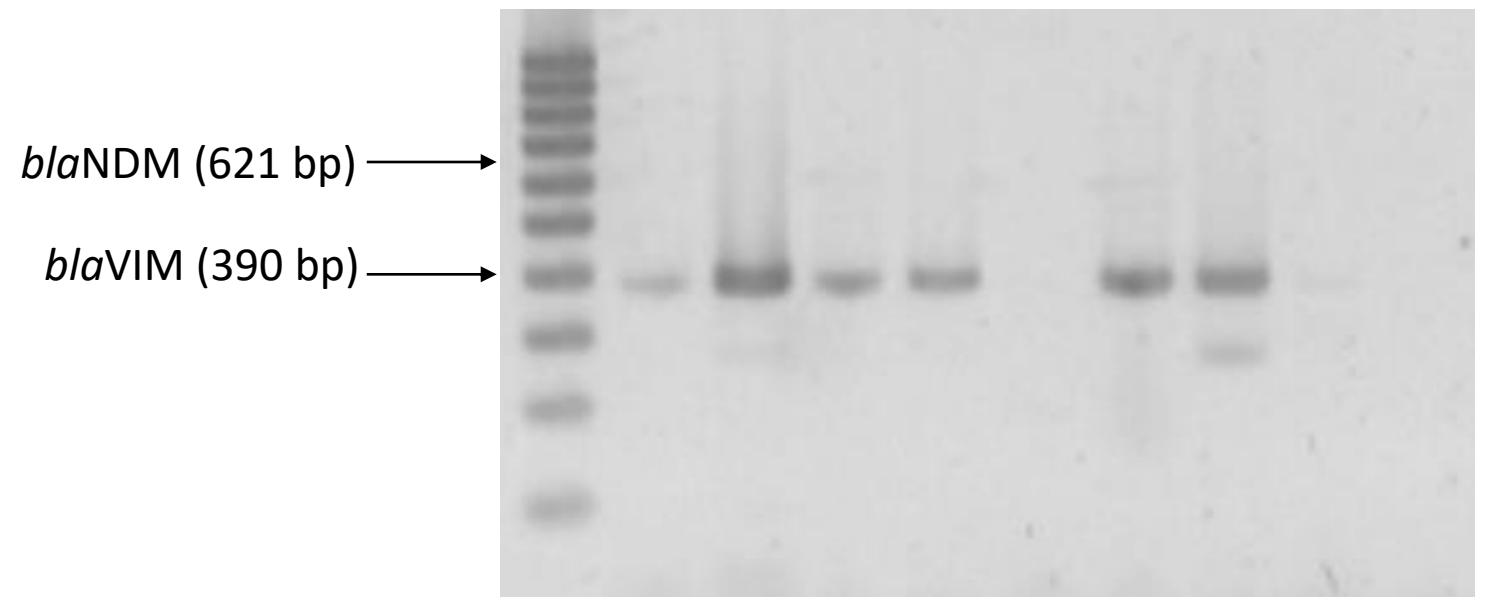


PCR
- 3 multiplex
reakce

elektroforéza

Výběr ARGs:

- častý výskyt na ČOV
- pro ověření funkčnosti metodiky
- zaměření se na beta-laktamová antibiotika poslední volby a jejich geny rezistence *blaVIM* a *blaNDM*



Geny rezistence ke karbapenemům

VÝSLEDKY



Výsledky PCR

4 odběry: 17. 10. 2019/5. 11. 2019/7. 1. 2020/21. 1. 2020

	Sulfonamidy		Betalaktamy			
			třída A			třída B- karbapenemy
Vzorek	sul1	sul2	bla-SHV	bla-CTX-M	bla-TEM	bla-VIM
infekční přítok	+/+//+//+	+/+//+//+	-/-/-/-	-/-/-/-	+/+//+//+	+/+//+//+
odtok po chloraci	+/+//+//+	+/+//+//+	-/+//+//+	-/+//+//+	+/+//+//+	+/+//+//+
kal po pasterizaci	+/+//+//nd	+/+//+//nd	-/-/-/-nd	-/-/-/-nd	-/-/+//nd	-/+//+//nd

bla-NDM = negativní (nutnost pozitivní kontroly)

DISKUZE

Pasterizace kalu (nemocniční ČOV)

- Při 85 °C
- Zahřívání trvá hodiny (až 10 h)
- 1,5-2 h při 85 °C
- Chladnutí – na teplotu okolí 7 – 10 dní
- 1x měsíčně

DISKUZE

Pasterizace kalu (nemocniční ČOV)

- Značně nehomogenní materiál
- Vzkovávání – více bodových vzorků (3 – 5, SZU)
- Stanovení vázané i volné DNA (z usmrcených buněk) x vodné vzorky – odstranění volné DNA při filtraci/centrifugaci
- Volná DNA nás zajímá – potenciální zdroj ARGs pro šíření ATB rezistence

PLÁNY DO BUDOUCNA

Pasterizace kalu (nemocniční ČOV)

- Odběr triplikátů
- Častější vzorkování kalu po pasterizaci – během chladnutí a po vychladnutí
- Kvantifikace ARGs pomocí qPCR
- Zkoumat vliv chlorace a pasterizace na výskyt ARGs

DĚKUJI TÝMU a
TA ČR Zéta -
MICROGENEL

DĚKUJI ZA
POZORNOST

