

## VZTAH VÝSKYTU REZIDUÍ ANTIBIOTIK A BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE V ODPADNÍCH A PŘÍRODNÍCH VODÁCH

PETR FRYČÁK

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc  
petr.frycak@upol.cz

Došlo 14.1.20, přepracováno 15.4.20, přijato 14.8.20.

Klíčová slova: rezidua antibiotik, antibiotická rezistence, geny rezistence, odpadní vody, čištění odpadních vod, přírodní vody, polutanty

### Obsah

1. Úvod
2. Původ reziduí antibiotik v životním prostředí
3. Antibiotická rezistence
4. Korelace výskytu reziduí antibiotik a rezistence – přehled původní literatury
5. Závěr

### 1. Úvod

Užívání účinných látek označovaných jako antibiotika v terapii bakteriálních infekcí se datuje od čtyřicátých let 20. století. Prvním antibiotikem nasazeným v medicínské praxi byl penicilin izolovaný z plísně *Penicillium notatum* (A. Fleming, H. Florey a E. B. Chain, Nobelova cena za fyziologii nebo medicínu, 1945) a během krátké doby následovaly další látky s podobným účinkem (gramicidin S, streptomycin, chlortetracyklin a další)<sup>1</sup>. Z hlediska terminologie je třeba poznamenat, že vymezení pojmu *antibiotikum* není zcela jednoznačné. Původně se jako antibiotika označovaly látky přírodního původu produkované mikroorganismy za účelem potlačení růstu konkurujících bakteriálních druhů. V dnešní době je v odborné literatuře používán jednak tento užší význam, nicméně podobně časté je rozšíření zmíněné definice o další stejně působící látky syntetického původu, např. sulfonamidy, používané v medicíně ještě před nástupem penicilinu, nebo fluorochinolony. Širší definice je užitá i v tomto přehledovém článku. Antibiotika (ATB) jsou podskupinou látek s antimikrobiálním působením, která zahrnuje i látky účinné vůči virům (antivirotika), houbám a plísním (antimykotika) a některým parazitům (antiparazitika).

V dnešní době registruje Světová zdravotnická organizace WHO v rámci anatomicko-terapeuticko-chemické

klasifikace ve skupině „antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci“ přes 250 chemických individuů využitelných v humánní<sup>2</sup> (ATC J01) a veterinární medicíně<sup>3</sup> (ATCvet QJ01). V humánní medicíně se ATB kromě léčby infekcí podávají i profylakticky v souvislosti s chirurgickými výkony. Veterinární užití zahrnuje profylaxi (preventivní aplikace ATB ve zdravém chovu) a metafyaxi (aplikace ATB jedincům částečně infikovaného chovu s cílem zabránit rozšíření infekce na zdravou část příp. zabránit rozvoji infekce u infikovaných, ale v danou chvíli asymptomatických jedinců). Méně známým faktem může být využití ATB jako stimulatorů růstu ve výkrmnách hospodářských zvířat. Subterapeutické dávky ATB přidávané do krmných směsí prokazatelně vedou k lepší konverzi krmiva a rychlejším váhovým přírůstkům, zřejmě prostřednictvím ovlivnění mikroflóry trávicího ústrojí<sup>4,5</sup>.

Celosvětová spotřeba ATB v roce 2002 ke všem výše uvedeným účelům byla odhadnuta na 100–200 tis. tun (cit.<sup>6</sup>). Jiný zdroj<sup>7</sup> uvádí spotřebu 97 200 tun v roce 2013 jen v Číně. Rozsáhlé využívání až nadužívání ATB, často bez dostatečného odborného dohledu, není bez nežádoucích účinků. Mezi nimi zaujímá čelní místo antibiotická rezistence<sup>8</sup> (schopnost bakterií odolávat působení jednoho nebo více antibiotik, která jsou jinak vůči danému druhu účinná). Brzy po zavedení prvních ATB do klinické praxe se ukázalo, že citlivé patogeny mohou být nahrazeny rezistentními kmeny, zejména v prostředí nemocnic s vysokou koncentrací patogenů<sup>9</sup>. V současné době je antibiotická rezistence vážným celospolečenským problémem a podílí se nezanedbatelnou měrou na úmrtnosti, především v případě multirezistentních bakteriálních kmenů (o multirezistenci se jedná, pokud je patogen odolný vůči více typům ATB). Souvisejícím problémem jsou i život ohrožující průjmová onemocnění a těžké střevní záněty způsobené bakterií *Clostridioides difficile*. Ta má schopnost se pomnožit v trávicím traktu jedince, jehož střevní mikrobiom byl oslaben předchozí antibiotickou léčbou. Americká agentura Centers for Disease Control and Prevention uvádí, že infekce rezistentními patogeny jsou zodpovědné za 36 tis. úmrtí ročně, jiný zdroj ovšem odhaduje až 162 tis. (cit.<sup>10</sup>). V Evropské unii se roční počet úmrtí v příčinné souvislosti s rezistencí odhaduje na 25 tis., celosvětový odhad činí 700 tis. úmrtí<sup>11</sup>.

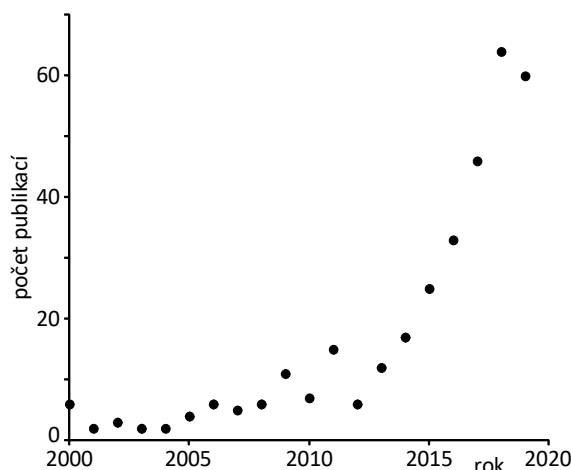
Mimořádná závažnost hrozeb spojených s antibiotickou rezistencí vyžaduje celosvětově koordinovaný přístup k implementaci vhodných opatření především v oblastech zdravotní péče a zemědělství. Jejich cílem je omezit a racionalizovat užívání ATB a bránit tak dalšímu rozšiřování rezistentních kmenů bakterií. V tomto duchu byl v roce 2015 WHO vyhlášen Global action plan on antimicrobial resistance<sup>12</sup> a byla založena expertní skupina Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance<sup>13</sup> (IACG) a globální systém sledování antimikrobiální rezis-

tence Global Antimicrobial Resistance Surveillance System<sup>14</sup> (GLASS). Na území Evropské unie řeší problematiku antibiotické rezistence agentury European Medicines Agency (EMA) provozující databázi European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption<sup>15</sup> (ESVAC), European Food Safety Authority (EFSA) a European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) provozující European Antibiotic Resistance Surveillance Network<sup>16</sup> (EARS-Net) a European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network (ESAC-Net)<sup>17</sup>. Významným krokem v boji s bakteriální rezistencí byl zákaz použití ATB jako růstových stimulatorů v Evropské unii<sup>18</sup> (platný od roku 2006) a v USA<sup>19</sup> (od 2017). V roce 2017 Evropská komise vyhlásila nový akční plán boje s antimikrobiální rezistencí založený na tzv. „One Health“ přístupu<sup>20</sup>. Tento pojem reflektuje prokázanou skutečnost, že zdraví lidských a zvířecích populací spolu neoddělitelně souvisí, infekční nemoci mohou být přenášeny ze zvířat na člověka i naopak a humánní i veterinární medicína je proto musí léčit ve vzájemné součinnosti. Současně také akcentuje roli různých složek životního prostředí jako spojovacího článku mezi populacemi a možného zdroje nových rezistentních mikroorganismů. Realizaci dohodnutých plánů a opatření na úrovni jednotlivých států provádějí příslušná národní zdravotnická a zemědělská ministerstva a agentury. V České republice jde o Ministerstvo zdravotnictví a Ministerstvo zemědělství, která byla vládou pověřena implementovat Akční plán Národního antibiotického programu<sup>21</sup> na období 2019–2022.

Odborná literatura obsahuje mnoho původních prací zabývajících se různými aspekty antibiotické rezistence. Stejně tak je široce studován výskyt reziduí ATB v životním prostředí, nevyhnutelně spojený s jejich průmyslovou výrobou a užíváním. S ohledem na předpokládaný kauzální vztah mezi expozicí patogenů antibiotikům a rezistencí je zřejmé, že pro pochopení mechanismů jejího vzniku a přenosu mezi různými mikroorganismy je třeba studovat tato témata ve vzájemné souvislosti. Jak dokládá rešerše v databázi Web of Science (obr. 1), v posledních letech strmě narůstá počet studií, které toto kritérium splňují. Následující text podává o výše zmiňované problematice základní informace. Dále jsou shrnuty poznatky publikované v rámci vybraných původních prací zaměřených na korelaci výskytu antibiotických reziduí a rezistentních patogenů.

## 2. Původ reziduí antibiotik v životním prostředí

Zdrojem zátěže životního prostředí ATB může být každá fáze jejich životního cyklu (výroba, užívání, případná likvidace). Již při výrobě je produkováno i určité množství odpadů a způsob jejich likvidace určují kromě ekonomických aspektů zejména zákonné předpisy v oblasti ochrany životního prostředí platné na daném území. Za posledních několik dekád proběhl přesun velké části objemu farmaceutické výroby do zemí s relativně benevolentním přístupem k nakládání s průmyslovými odpady (např. do Číny a Indie), což zřejmě přispívá k vysoké míře zne-



Obr. 1. Vývoj počtu publikací nalezených v databázi *Web of Science* na základě fráze „TS=(("residual antibiot\*" OR "antibiotic residu\*") AND ("antimicrobial resist\*" OR "antibiotic resist\*")) AND PY=20XX“, kde XX = 00, 01, ... 19

čištění tamních vodních toků a rezervoárů rezidui široké palety aktivních farmaceutických substancí<sup>22,23</sup>. Do životního prostředí může vstupovat i značná část z předepisovaných ATB. Z různých důvodů nemusí být vydané množství léčiva zcela spotřebováno a zbývající část, pokud není odevzdána k odborné likvidaci, končí buď na skládkách komunálního odpadu, nebo v odpadní vodě. V rámci dotazníkových šetření bylo zjištěno, že velká většina respondentů má v domácnosti nadále nevyužitelné medikamenty, rovněž velká část dotazovaných přiznává likvidaci těchto přebytků v domovním odpadu nebo do kanalizace<sup>24,25</sup>. Emise ATB související s jejich výrobou příp. likvidací lze nicméně omezit dodržováním vhodných postupů a opatření při zpracování odpadů.

Obtížněji zvladatelným problémem je exkrece ATB z organismu léčených jedinců následující po terapeutické aplikaci. Ne všechna ATB jsou po perorálním podání plně absorbována a nevstřebaná frakce se vylučuje se střevním obsahem. ATB, která přejdou do krevního oběhu, často nepodléhají kompletní biotransformaci a určitá část se pak v původní formě vylučuje především ledvinami. V úhrnu jde často o nadpoloviční většinu podaného množství<sup>26</sup>. Rezidua ATB proto bývají nacházena v kanalizačních systémech a čistírnách odpadních vod z lidských sídel, ale i ve statkových hnojivech produkovaných v rámci živočišné výroby (hnůj, kejda, močůvka).

Povrchové vody jsou před běžným komunálním znečištěním chráněny prostřednictvím čistíren odpadních vod (ČOV). Proces čištění sestává ze dvou až tří fází<sup>27</sup> – primární mechanické oddělení hrubých nečistot a masné frakce je v druhé fázi následováno odstraněním biologicky odbouratelných organických látek a jemných suspendovaných částic. Sekundární biologické čištění působením bakterií je zpravidla prováděno v tzv. aktivačním procesu, případně v membránových bioreaktorech. Může následo-

vat i terciární čištění, jehož cílem je další zlepšení ukazatelů čistoty efluentu, např. odstranění zbytkových suspendovaných částic, mikroorganismů nebo chemických antropogenních polutantů (léčiv, hormonů, složek přípravků osobní hygieny) prostřednictvím filtrace příp. desinfekčních činidel (chlor, ozón, UV záření). Účinnost odstranění reziduí ATB je dána jejich fyzikálně chemickými vlastnostmi a použitou technologií čištění<sup>28</sup>. Obecně může být eliminace reziduí dosaženo chemickou degradací nebo adsorpcí na částice aktivovaného kalu<sup>29</sup>. Dle řady experimentálních studií je úplná eliminace reziduí ATB spíše výjimečná. V některých případech dokonce bývá po sekundárním čištění dosaženo i negativních hodnot eliminační účinnosti, což může být vysvětleno uvolněním frakce vázané ve fekálních částicích v souvislosti s jejich rozkladem nebo zpětnou přeměnou metabolitů na původní formy působením mikrobiálních enzymů v aktivačním procesu<sup>30</sup>. I v případě pokročilého terciárního čištění zůstává v čistírenském efluentu část původního množství (většinou jednotky až desítky procent), která vstupuje do povrchových vod.

Pouze částečně jsou odbourávána rezidua ATB i v procesu fermentace statkových hnojiv<sup>31</sup>. Ta jsou velkoplošně aplikována na zemědělskou půdu za účelem zvýšení obsahu organické hmoty a živin (dusík, fosfor). Se stejným účelem se za určitých podmínek používají i kaly produkované v ČOV (cit.<sup>32,33</sup>). Kapalný podíl hnojiv představuje přímý zdroj kontaminace zemědělské půdy reziduí ATB; ta mohou být splachem půdy a loužením dešťovou vodou transportována do vodních toků a nádrží. Pevná frakce hnojiv a čistírenské kaly mohou rezidua do půdy uvolňovat desorpcí. Mechanismy a podmínky spojené s (de)sorpčními procesy v těchto komplexních maticích a biologické účinky adsorbovaných reziduí nejsou zatím příliš probádanou oblastí<sup>34</sup>.

Hydrosféra a zemědělská půda mohou být dále kontaminovány v důsledku používání ATB v akvakulturách a v rostlinné výrobě (ovocnářství, pěstování zeleniny a okrasných rostlin). Údaje o celkovém objemu ATB spotřebovaných k těmto účelům ukazují, že jde spíše o minoritní zdroj<sup>35</sup>.

### 3. Antibiotická rezistence

Rezistenci vůči ATB lze dělit na přirozenou (daný bakteriální druh nespádá do spektra působení daného ATB) a získanou (citlivý druh se adaptuje a stává rezistentním). Tento článek se zabývá výhradně získanou rezistencí. Rezistentní mikroorganismy existovaly již před érou klinického užívání ATB. To souvisí s přírodním původem řady ATB, která jsou produkována rozličnými druhy mikroorganismů, aby jim poskytla konkurenční výhodu v boji o zdroje, přežití a životní prostor. Podobně výhodné je disponovat schopností působení ATB odolávat, tj. projevovat rezistenci. Globální mikrobiom proto obsahuje mnoho genů rezistence vyvinutých v průběhu evoluce<sup>36</sup>. Na molekulární úrovni je rezistence zprostředkována řadou různých mechanismů<sup>37,38</sup>. Obecně se jedná o deaktivaci

ATB prostřednictvím enzymu, snížení permeace ATB do buňky nebo aktivní transport ven z buňky, příp. různé způsoby ochrany cílové buněčné struktury proti působení ATB.

Genom bakterií je velmi variabilní a kromě vertikálního přenosu genů na jedince vznikající dělením hraje velmi významnou úlohu i vznik genů rezistence *de novo* (náhodnými mutacemi) a přenos horizontální. Ten je charakterizován šířením genetické informace nezávisle na procesu rozmnožování a bez ohledu na druhovou příbuznost a jeho účelem je umožnit pružnou adaptaci na měnící se životní podmínky. Horizontální přenos probíhá několika mechanismy prostřednictvím tzv. mobilních genetických elementů:

1. Konjugace: bakterie obsahující plazmid (kruhová molekula DNA schopná vlastní replikace a existující nezávisle na bakteriálním chromozomu) jej přeneše do bakterie, která dosud plazmid neobsahovala. Konjugace je zahájena spojením obou bakterií skrze tzv. *pilus* (vlásečovitý výběžek na povrchu bakteriální buňky) a následně vytvoření cytoplazmatického můstku, jímž je plazmid přenesen. Plazmidy nesoucí geny rezistence se označují jako R-plazmidy.

2. Transdukce: přenos DNA do bakteriální buňky prostřednictvím virů (bakteriofágů). Části DNA infikované bakterie mohou být ve vzácných případech začleněny do genomu nově se tvořících virionů, které ji následně přenesou do jiné bakteriální buňky. Za příznivých okolností se DNA donorové bakterie stává součástí genomu příjemce.

3. Transformace: přímá absorpce exogenní DNA bakteriemi prostupem přes buněčnou membránu. Prostředí, v němž bakterie žijí, obsahuje velké množství DNA pocházející z rozkládajících se odumřelých organismů. Volná DNA je také uvolňována nebo aktivně vylučována i žijícími bakteriemi. DNA z těchto zdrojů může být bakteriemi absorbována a začleněna do bakteriálního genomu. Schopnost podstoupit transformaci je u bakterií vyvolána většinou omezenou dostupností živin nebo působením činitelů poškozujících DNA.

Rozšiřování rezistence je způsobeno evoluční selekcí. Geny rezistence dostupné v rámci globálního bakteriomu se předávají v rámci bakteriálních populací a v závislosti na podmínkách v daném prostředí může působením selekčního tlaku dojít k přednostnímu rozmnožení rezistentních kmenů.

Vznik rezistence selekcí je hypoteticky možný v každém prostředí, kde se mikroorganismy s ATB setkávají. Vzhledem k praktické všudypřítomnosti bakterií jde o všechna prostředí, kterými ATB během svého životního cyklu procházejí. Podle dnes již překonaného paradigmatu je selekce rezistentních kmenů možná v prostředí, kde je koncentrace ATB větší než minimální inhibiční koncentrace (MIC) citlivého kmene a menší než MIC rezistentního kmene<sup>39</sup>. Pokud malá frakce výchozí populace bakterií nese genetickou výbavu spojenou s fenotypovými znaky rezistence, po eliminaci senzitivních jedinců působením ATB může dojít k obnově populace pomnožením přeživší rezistentní frakce. Rozšiřování populací rezistentních kmenů se dá dle této představy předpokládat v trávicím traktu

nebo jiné části infikovaných organismů, kde je vysoká koncentrace ATB i bakterií.

Koncepce MIC se ale ukázala jako příliš zjednodušující. Po podání ATB se v souladu s jeho farmakokinetickými vlastnostmi v organismu vytváří prostorový a časový gradient koncentrace, takže různé části populace infikující daný organismus jsou vystaveny různým koncentračním úrovním od hluboce subinhibičních přes inhibující (bakteriostatické) až po baktericidní (letální). Subletální koncentrace lze předpokládat i v případech nesprávně stanovené dávky, špatné compliance pacienta, použití ATB jako růstových stimulátorů nebo v prostředí *ex vivo* (kanalizace, ČOV, hydrosféra, půda). Experimentální studie dokládají, že i velmi nízké subletální koncentrace řádově v  $\mu\text{g l}^{-1}$  vykazují nezanedbatelný selekční tlak<sup>40,41</sup>. Vedle MIC je proto vhodné zavést i minimální selektivní koncentraci (MSC), která je v některých případech až o dva řády nižší než MIC. Dynamika selekce pozorovaná u letálních a subletálních koncentrací je navíc navzájem odlišná. Letální koncentrace např. vede k výběru relativně vzácných mutantních variant s vysokou úrovní rezistence, které v populaci existovaly již před aplikací ATB. Subletální koncentrace působí mechanismem zpomalení množení citlivé subpopulace a vedou k výběru širšího spektra různých mutantních variant s relativně nižší úrovní rezistence.

Rezistentní bakterie a geny rezistence jsou v životním prostředí prakticky všudypřítomné. Od počátku masového používání ATB roste počet lokálních populací s vysokým zastoupením rezistentních jedinců. Klinicky významné jsou rezistentní kmeny druhů, které v lidském organismu běžně žijí (komezální bakterie) nebo jsou schopné jej infikovat (patogeny)<sup>42,43</sup>. Velkou hrozbu představují zejména kmeny disponující obrannými mechanismy proti více třídám ATB (multirezistentní bakterie). Ohniskem intenzivního přenosu rezistentních bakterií jsou nemocnice<sup>44</sup> (tzv. nozokomiální infekce), nicméně k nákaze může dojít i mimo zdravotnická zařízení. Šíření rezistentních bakterií na velké vzdálenosti napomáhá i stále rostoucí objem osobní letecké dopravy. Z důvodu snadného přenosu rezistence jak mezi mikroorganismy, tak v lidských a zvířecích populacích se geografická distribuce rezistentních fenotypů neustále vyvíjí; zainteresované agentury vydávají s určitou časovou periodou přehledové zprávy o aktuální situaci<sup>42,43,45</sup>.

#### 4. Korelace výskytu reziduí antibiotik a rezistence – přehled původní literatury

V tab. I jsou uvedeny původní práce zahrnující současně stanovení genů nebo znaků rezistence a stanovení reziduí ATB<sup>46–62</sup>. Rezidua byla ve všech citovaných pracích stanovena technikou spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie po předchozím přečištění a zakoncentrování vzorku extrakcí na pevné fázi (SPE). Díky své univerzálnosti pro různé druhy ATB a matric, nízkým mezím stanovitelnosti a vysoké selektivitě se tento postup stal standardem<sup>63,64</sup> a jiný způsob stanovení je v současné době spíše ojedinělý.

Sledování rezistence lze obecně provádět na fenotypové úrovni kultivačními metodami nebo detekcí a stanovením genů rezistence. Kultivaci za přítomnosti ATB byl metodami počítání kolonií a metodou nejpravděpodobnějšího počtu stanovován počet rezistentních bakterií. Výsledek byl vztažen k celkovému počtu zjištěnému kultivací bez ATB. Rezistence bakteriálních izolátů, příp. MIC, byla určována i Kirby-Bauerovou diskovou difuzní metodou<sup>65</sup> nebo gradientní proužkovou metodou na podobném principu.

Pro průkaz genů rezistence byla využívána polymerázová řetězová reakce (PCR) s následnou detekcí produktů po separaci elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Kvantifikace genů byla prováděna kvantitativní PCR (qPCR). Množství genů rezistence bylo většinou vztaženo vůči celkovému množství genu pro 16S ribozomální RNA (pro amplifikaci byla v takovém případě vybrána evolučně konzervovaná oblast *16S rRNA*, aby produkt amplifikace reprezentoval celkové množství bakterií ve vzorku). Některé studie uvedly absolutní počet kopií genů rezistence ve vzorcích<sup>50,52,53,55,56,61,62</sup>. K charakterizaci druhového složení bakteriálních komunit bylo použito sekvenování hypervariabilních oblastí *16S rRNA*, příp. polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) a elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE).

Nálezy genů a fenotypových projevů rezistence byly porovnávány se zjištěnou koncentrací reziduí ATB s cílem objasnit významné faktory přispívající k šíření rezistence do životního prostředí. V tomto ohledu je jednou z důležitých otázek význam selekce rezistentních kmenů v kanalizaci a ČOV v porovnání s přísunem rezistentních bakterií preselektovaných v trávicích traktech obyvatelstva a pacientů v nemocnicích. Některé práce využívaly ke zpracování experimentálních dat pokročilých statistických metod<sup>49–51,54,56,57,59–62</sup>, v jiných se autoři omezili na kvalitativní slovní rozbor zjištěných skutečností. Je třeba poznamenat, že každá studie je svým provedením originál, což je problematické z hlediska vzájemného porovnání a vyvozování obecných závěrů. Byly voleny jiné množiny stanovovaných ATB i genů rezistence, příp. jiné bakteriální druhy v testech fenotypových znaků rezistence. Každý z odebraných vzorků vod reprezentoval do značné míry unikátní systém daný lokalitou odběru a tedy i určitou prostorovou a časovou distribucí přísunu ATB reziduí ale i dalších faktorů, které mohly ovlivňovat přítomnou mikrobiotu. Žádná ze studií nesledovala konkrétní systém dlouhodobě a kontinuálně, jde tedy o informace popisující daný systém v jednom nebo několika málo časových okamžicích.

V celkovém pohledu jsou výsledky studií nejednoznačné. V některých případech byla prokázána korelace mezi hladinami ATB a příslušnou rezistencí<sup>48–51,56,57,61,62</sup>, v mnoha případech však korelace pro stejnou skupinu ATB pozorována nebyla a to často i v rámci jedné studie pro různé vzorky. Auguet a spol. pozorovali korelaci rezistence s druhovým složením mikrobioty spíše než s koncentrací ATB<sup>54</sup>. Významným faktorem může být i koselekce antibiotické rezistence s rezistencí vůči těžkým kovům<sup>53</sup>. Karkman a spol.<sup>66</sup> na základě analýzy metagenomických dat odpadních a přírodních vod prosazují hypotézu

Tabulka I

Přehled literatury zahrnující současně stanovení genů nebo znaků rezistence a stanovení reziduí ATB (řazeno dle roku uveřejnění)

Literatura, cit. č.	Studovaný systém	Lokalita	ATB <sup>a</sup>	Sledované geny rezistence <sup>b,c</sup>
46	odpadní vody z nemocnic, voda z nemocniční ČOV	Hanoj, Vietnam	FC	n.a.
47	odpadní voda z nemocnice	Ujjain, Indie	AG, BL, FC	n.a.
48	řiční voda, řiční voda za výtokem z ČOV	řeka Jiulong, Čína	AM, FC SA, TC	n.a.
49	odpadní voda z nemocnice, odpadní voda z městské ČOV	Porto, Portugalsko	BL, FC, SA, TC	n.a.
50	odpadní vody z farmaceutické výroby na vstupu, během čištění a na výtoku z ČOV	Čína	BL, SA, TC	<i>bla<sub>AmpC</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>bla<sub>mecA</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-10</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>ogxB</i> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetT</i> , <i>tetW</i> <i>intI1</i> , <i>16S rRNA</i>
51	řiční voda před a za ČOV, voda v ČOV v různých fázích čištění	Peking, Čína	FC, SA, TC	<i>gryA</i> , <i>parC</i> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrD</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetB(P)</i> , <i>tetC</i> , <i>tetE</i> , <i>tetM</i> , <i>tetT</i> , <i>tetW</i> , <i>tetZ</i> <i>16S rRNA</i>
52	odpadní voda z veterinární nemocnice	Barcelona, Španělsko	BL, FC, ML, NI, SA, TC, TP	<i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>ermB</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i> , <i>tetW</i> <i>16S rRNA</i>
53	řiční voda, jezerní voda, odpadní voda na vstupu a na výtoku z ČOV	řeky Seco, Seke, Pallina, Katari, jezero Titicaca El Alto, Bolívie	SA, TP	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> <i>16S rRNA</i>
54	odpadní voda a biofilm z tlakového kanalizačního potrubí	Palamós, Španělsko	BL, FC, LA, ML, SA, TC, TP	<i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>ermB</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetM</i> , <i>tetW</i> <i>intI1</i> , <i>16S rRNA</i>
55	řiční voda před a za ČOV	řeka Ter Girona, Španělsko	FC, LA, ML, NI, SA	<i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>ermB</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i> , <i>tetO</i> , <i>tetW</i> , <i>vanA</i>
56	odpadní voda na vstupu, během čištění a na výtoku z ČOV	Singapur	AM, BL, FC, GP, LA, ML, SA, TC, TP	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>cfr</i> , <i>dfrA</i> , <i>ermB</i> , <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>vanA</i> <i>intI1</i> , <i>16S rRNA</i>
57	odpadní voda a rybniční voda používané k zavlažování	delta Perlové řeky, Čína	SA, TC	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> , <i>tetE</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>tetS</i> , <i>tetX</i> <i>16S rRNA</i>
58	odpadní vody z farmaceutické výroby, odpadní voda z nemocnice	Hanoj, Vietnam	BL, FC, ML, SA	n.a.
59	voda z přehradní nádrže v blízkosti ČOV, nemocnic, zemědělské a průmyslové činnosti	přehradní nádrž Tři Soutěsky, Čína	FC, SA, TC	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrD</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> , <i>tetG</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetW</i> <i>intI1</i> , <i>16S rRNA</i>

Tabulka I  
Pokračování

Literatura, cit. č.	Studovaný systém	Lokalita	ATB <sup>a</sup>	Sledované geny rezistence <sup>b,c</sup>
60	říční voda v sídelní oblasti, odpadní vody z nemocnice, jatek, zoo	řeky Larut a Sangga Besar Taiping, Malajsie	SA	<i>sul1, sul2, sul3</i> <i>16S rRNA</i>
61	mořská voda (pobřežní sídelní a průmyslová oblast)	Čína (provincie Guangdong)	SA, TC	<i>aac, aadD, acrA, acrB, aph, ermB, ermC, oqxB, qnrD, qnrS, sul1, sul2, sul3, tetA, tetC, tetE, tetG, tetM, tetO, tetQ, tetW</i>
62	říční voda za výtokem z ČOV	řeka Chaobai Peking, Čína	SA	<i>sul1, sul2</i> <i>int11, 16S rRNA</i>

<sup>a</sup> Jeden nebo více zástupců skupin: AG – aminoglykosidy, AM – amfenikoly, BL –  $\beta$ -laktamy, FC – fluorochinolony (příp. chinolony), GP – glykopeptidy, LA – linkosamidy, ML – makrolidy, NI – nitroimidazoly, SA – sulfonamidy, TC – tetracykliny, TP – trimethoprim; <sup>b</sup> n.a. – geny rezistence nebyly analyzovány; <sup>c</sup> informace o funkci jednotlivých genů lze získat z cit.<sup>36</sup>

zu, že zásadním zdrojem rezistence jsou bakterie vnesené do vod s lidskými fekáliemi.

Riziko šíření rezistence je kromě koncentrace ATB reziduí dáno i mobilitou příslušného genu prostřednictvím horizontálního přenosu. V některých studiích<sup>50,54,56,59,62</sup> je genová mobilita charakterizována stanovením genu *int11* pro enzym DNA integrasu. Tento gen je nezbytnou komponentou integronů – mobilních genetických elementů umožňujících přenos genů existujících společně s *int11* v tzv. genových kazetách. Pro některé z genů rezistence byla zjištěna korelace s *int11* (cit.<sup>50,56,59,62</sup>), což dokládá význam horizontálního přenosu v šíření rezistence. Le-kunberri a spol. podrobněji studovali úlohu horizontálního přenosu separací DNA přítomné ve vzorcích na chromozomální, plazmidovou a fágovou frakci<sup>55</sup>. Pozorované zvýšení koncentrace některých genů rezistence za ČOV bylo spojené zejména se snadno přenositelnou plazmidovou a fágovou DNA.

## 5. Závěr

Jak dokazuje široká pozornost věnovaná antibiotické rezistenci, jde o urgentní problém zásadního významu s celospolečenským a globálním dopadem. Je zřejmé, že řešení bude ekonomicky náročné a je třeba, aby mu předcházela důkladná analytická fáze, která umožní vybrat opatření s co nejvýhodnějším poměrem prospěchu a nákladů. Jedním z důležitých aspektů problematiky rezistence je působení stopových koncentrací ATB reziduí v životním prostředí. Důležitým zdrojem emisí ATB jsou čistírny odpadních vod. Studium výskytu ATB a rezistentních bakterií resp. genů rezistence v odpadních vodách, ČOV a přilehlých vodních tocích by mělo poskytnout relevantní informace pro rozhodování o případné modifikaci čistícího

procesu nebo zařazení těchto polutantů mezi sledované parametry čistírenského efluentu. Některé již existující technologie terciárního čištění umožňují snižovat koncentraci ATB, ale i eliminovat přítomné bakterie. Namísto masového zavádění takových technologií ve stávajících ČOV je ovšem možné investice směřovat i do vývoje nových ATB, zavádění rychlejší diagnostiky, která zamezí nevhodnému užívání nebo pomůže určit vhodné ATB, nebo alternativních terapeutických postupů (fágová terapie aj.).

Přestože selekce rezistentních bakterií při subinhibičních koncentracích ATB je prokázáným faktem<sup>40</sup>, dostupná literatura v tuto chvíli neposkytuje jasný důkaz, že by majoritním zdrojem antibiotické rezistence byl selekční proces probíhající v komunálních a nemocničních odpadních vodách, ČOV, efluentech z ČOV a vodních tocích při koncentracích ATB běžně se vyskytujících v těchto prostředích. Většina autorů zdůrazňuje nutnost provedení dalších studií, což v kontextu výše uvedených skutečností nevyznívá jen jako obvyklá fráze nalézaná v závěru mnoha publikací. Největší přínos je možné očekávat především od statisticky kvalitně zpracovaných dlouhodobých studií sledujících paralelně ATB rezidua, geny rezistence a jejich lokalizaci, fenotypové projevy rezistence a druhové složení bakteriální komunity.

*Publikace vznikla s podporou grantu „Epidemiologie vankomycin-rezistentních enterokoků v České republice: One Health concept“ (NV18-05-00340, Ministerstvo zdravotnictví ČR).*

## LITERATURA

1. Powers J. H.: Clin. Microbiol. Infect. 10, 23 (2004).
2. [https://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index](https://www.whocc.no/atc_ddd_index), staženo 12. 1. 2020.

3. [https://www.whocc.no/atcvet/atcvet\\_index](https://www.whocc.no/atcvet/atcvet_index), staženo 12. 1. 2020.
4. Moore P. R., Evenson A., Luckey T. D., McCoy E., Elvehjem C. A., Hart E. B.: *J. Biol. Chem.* **165**, 437 (1946).
5. Luckey T. D.: *Br. Med. J.* **1963**, 1284.
6. Wise R.: *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 585 (2002).
7. Zhang Q. Q., Ying G. G., Pan C. G., Liu Y. S., Zhao J. L.: *Environ. Sci. Technol.* **49**, 6772 (2015).
8. Davies J., Davies D.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 417 (2010).
9. Barber M., Rozwadowska-Dowzenko M.: *Lancet* **252**, 641 (1948).
10. Burnham J. P., Olsen M. A., Kollef M. H.: *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **40**, 112 (2019).
11. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/antimicrobial-resistance>, staženo 12. 1. 2020.
12. World Health Organization: Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization, 2015. ISBN: 9789241509763.
13. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/en>, staženo 12. 1. 2020.
14. <https://www.who.int/glass/en>, staženo 12. 1. 2020.
15. <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac>, staženo 12. 1. 2020.
16. <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>, staženo 12. 1. 2020.
17. <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/surveillance-and-disease-data/database>, staženo 12. 1. 2020.
18. Regulation of the European Parliament and the Council of the European Union 1831/2003/EC on additives for use in animal nutrition.
19. <https://www.fda.gov/animal-veterinary/antimicrobial-resistance/timeline-fda-action-antimicrobial-resistance>, staženo 12. 1. 2020.
20. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). Evropská komise, 2017. COM/2017/0339.
21. Usnesení Vlády České republiky ze dne 28. ledna 2019 č. 75 o Akčním plánu Národního antibiotického programu České republiky na období 2019–2022. [https://www.mzcr.cz/Verejne/obsah/akcni-plan-2926\\_5.html](https://www.mzcr.cz/Verejne/obsah/akcni-plan-2926_5.html), staženo 12. 1. 2020.
22. Larsson D. G. J., de Pedro C., Paxeus N.: *J. Hazard. Mater.* **148**, 751 (2007).
23. Ur R. M. S., Rashid N., Ashfaq M., Saif A., Ahmad N., Han J. I.: *Chemosphere* **138**, 1045 (2015).
24. Wiczkorkiewicz S. M., Kassamali Z., Danziger L. H.: *Ann. Pharmacother.* **47**, 482 (2013).
25. Bound J. P., Voulvoulis N.: *Environ. Health Perspect.* **113**, 1705 (2005).
26. Kim K. R., Owens G., Kwon S. I., So K. H., Lee D. B., Ok Y. S.: *Water Air Soil Pollut.* **214**, 163 (2011).
27. Wanner J.: <http://vodnihospodarstvi.cz/cistenio-podpadnich-vod-cr>, staženo 12. 1. 2020.
28. Burch K. D., Han B. S., Pichtel J., Zubkov T.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* **26**, 6301 (2019).
29. Kümmerer K.: *Chemosphere* **75**, 417 (2009).
30. Blair B., Nikolaus A., Hedman C., Klaper R., Grundl T.: *Chemosphere* **134**, 395 (2015).
31. Massé D. I., Saady N. M. C., Gilbert Y.: *Animals* **4**, 146 (2014).
32. Vyhláška č. 437/2016 Sb o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady. Sbirka zákonů 2016, částka 178, str. 6994.
33. Stránský V.: <http://vodnihospodarstvi.cz/kaly-a%20E2%80%AFsedimenty/>, staženo 12. 1. 2020.
34. Zhi D., Yang D. X., Zheng Y. X., Yang Y., He Y. Z., Luo L., Zhou Y. Y.: *J. Environ. Manage.* **251**, 109598 (2019).
35. Hollis A., Ahmed Z.: *N. Engl. J. Med.* **369**, 2474 (2013).
36. van Hoek A. H. A. M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Robert A. P., Aarts H. J. M.: *Front. Microbiol.* **2**, 203 (2011).
37. Walsh C.: *Nature* **406**, 775 (2000).
38. Munita J. M., Arias C. A.: *Microbiol. Spectr.* **4**, VMBF-0016-2015 (2016).
39. Drlica K., Zhao X.: *Clin. Infect. Dis.* **44**, 681 (2007).
40. Andersson D. I., Hughes D.: *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 465 (2014).
41. Bengtsson-Palme J., Larsson D. G. J.: *Environ. Int.* **86**, 140 (2016).
42. European Centre for Disease Prevention and Control: Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. ECDC, Stockholm, 2019. ISBN 978-92-9498-387-9.
43. Centers for Disease Control and Prevention: Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA, USA, 2019.
44. David S. a 87 spoluautorů: *Nat. Microbiol.* **4**, 1919 (2019).
45. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control): *EFSA J.* **16**, 5182 (2018).
46. Duong H. A., Pham N. H., Nguyen H. T., Hoang T. T., Pham H. V., Pham V. C., Berg M., Giger W., Alder A. C.: *Chemosphere* **72**, 968 (2008).
47. Diwan V., Tamhankar A. J., Khandal R. K., Sen S., Aggarwal M., Marothi Y., Iyer R. V., Sundblad-Tonderski K., Stalsby-Lundborg C.: *BMC Public Health* **10**, 414 (2010).
48. Zheng S. L., Qiu X. Y., Chen B., Yu X. G., Liu Z. H., Zhong G. P., Li H. Y., Chen M., Sun G. D., Huang H., Yu W. W., Freestone D.: *Chemosphere* **84**, 1677 (2011).
49. Varela A. R., André S., Nunes O. C., Manaia C. M.: *Water Res.* **54**, 327 (2014).
50. Wang J., Mao D., Mu Q., Luo Y.: *Sci. Total Environ.* **526**, 366 (2015).
51. Xu J., Xu Y., Wang H. M., Guo C. S., Qiu H. Y.,

- He Y., Zhang Y., Li X. C., Meng W.: *Chemosphere* 119, 1379 (2015).
52. Lucas D., Badia-Fabregat M., Vicent T., Caminal G., Rodriguez-Mozaz S., Balcazar J. L., Barcelo D.: *Chemosphere* 152, 301 (2016).
  53. Archundia D., Duwig C., Lehembre F., Chiron S., Morel M. C., Prado B., Bourdat-Deschamps M., Vince E., Aviles G. F., Martins J. M. F.: *Sci. Total Environ.* 576, 671 (2017).
  54. Auguet O., Pijuan M., Borrego C. M., Rodriguez-Mozaz S., Triado-Margarit X., Della Giustina S. V., Gutierrez O.: *Sci. Total Environ.* 605, 1047 (2017).
  55. Lekunberri I., Villagrasa M., Balcazar J. L., Borrego C. M.: *Sci. Total Environ.* 601, 206 (2017).
  56. Le T. H., Ng C., Tran N. H., Chen H. J., Gin K. Y. H.: *Water Res.* 145, 498 (2018).
  57. Pan M., Chu L. M.: *Sci. Total Environ.* 624, 145 (2018).
  58. Thai P. K., Ky L. X., Binh V. N., Nhung P. H., Nhan P. T., Hieu N. Q., Dang N. T. T., Tam N. K. B., Anh N. T. K.: *Sci. Total Environ.* 645, 393 (2018).
  59. Yan M., Xu C., Huang Y., Nie H., Wang J.: *Sci. Total Environ.* 631-632, 840 (2018).
  60. Lye Y. L., Bong C. W., Lee C. W., Zhang R. J., Zhang G., Suzuki S., Chai L. C.: *Sci. Total Environ.* 688, 1335 (2019).
  61. Xu K. H., Wang J., Gong H., Li Y. Z., Zhou L., Yan M. T.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 186, 109796 (2019).
  62. Zhang N., Liu X., Liu R., Zhang T., Li M., Zhang Z., Qu Z., Yuan Z., Yu H.: *Front. Environ. Sci. Eng.* 13, 8 (2019).
  63. Kim C., Ryu H. D., Chung E. G., Kim Y., Lee J. K.: *J. Environ. Manage.* 217, 629 (2018).
  64. Szymanska U., Wiergowski M., Soltyszewski I., Kuzemko J., Wiergowska G., Wozniak M. K.: *Microchem. J.* 147, 729 (2019).
  65. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 8.0 (January 2020). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020.
  66. Karkman A., Parnanen K., Larsson D. G. J.: *Nat. Commun.* 10, 80 (2019).

**P. Fryčák** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc*): **Relationship between Occurrence of Antibiotic Residues and Bacterial Resistance in Waste and Natural Waters**

Antibiotic resistance presents an ever increasing threat to human health. Dissemination of resistance is related to the widespread use of antibiotics in human as well as veterinary medicine. Selection of resistant bacterial strains may occur upon contact with low concentrations of antibiotics including subinhibitory levels. Sewage system, waste water treatment plants and receiving watercourses comprise an environment where large bacterial populations are exposed to anthropogenic antibiotic residues. According to some hypotheses, selection taking place in such environment is a significant source of resistant pathogens. This review article provides pertinent information on antibiotic resistance and origin of antibiotic residues in the environment and summarizes relevant original articles reporting determination of antibiotic residues along with resistant phenotypes or genetic markers of resistance in municipal waste waters and anthropogenically impacted aquatic environment. The original literature is discussed in terms of judging the significance of the selection process in these environments.

**Keywords:** antibiotic residues, antibiotic resistance, resistance genes, waste waters, waste water treatment, natural waters, pollutants

#### *Acknowledgments*

*This work was supported by a grant from the Ministry of Health of the Czech Republic (Grant number: NV18-05-00340).*