

## Problematika antimikrobiální rezistence ve vodním prostředí ČR

HANA ZVĚŘINOVÁ MLEJNKOVÁ, KATEŘINA SOVOVÁ, ŠTĚPÁNKA ŠABACKÁ  
ADAM ŠMÍDA

**Klíčová slova:** antimikrobiální rezistence – povrchové a odpadní vody – disková difuzní metoda – multirezistence – antibiotika – ESBL

### ABSTRAKT

Antimikrobiální rezistence (AMR) se v posledních desetiletích dostala mezi celosvětové problémy s vysokou prioritou. Její závažnost spočívá v kriticky se zvyšujícím počtu patogenních bakterií, které nesou geny rezistence na dříve běžně fungující antibiotika (ATB), čímž se stávají zdravotní hrozbou. Výskyt rezistence je důsledkem dlouhodobého nesprávného užívání ATB v humánní a veterinární praxi (s nejvýznamnějším přispěním rozvojových zemí). V roce 2017 upozornila OSN, že se problém netýká jen uvedených oblastí a že významným rezervoárem a vektorem šíření AMR může být i životní prostředí. Problematika AMR byla zařazena do iniciativy „One Health“, která je založena na společném přístupu v boji s AMR napříč sektory zdravotnictví, zemědělství a životního prostředí. AMR se do vodního prostředí dostává ve formě rezistentních bakteriálních kmenů (ARB) nebo genů rezistence (ARG) vylučovaných pacienty přes komunální čistírny odpadních vod (ČOV), splachy nebo zemědělskými odpady.

V naší studii byl proveden screening výskytu antibiotické rezistence na vybraná ATB (cefuroxim, cefotaxim, cefepim, gentamicin, sulphamethoxazol/trimethoprim, fosfomycin, nitrofurantoin a meropenem) u indikátorové bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*), izolované z povrchových vod a odpadních vod na přítocích a odtocích z ČOV. K detekci rezistence byla použita kultivační disková difuzní metoda. *E. coli* s prokázanou rezistencí byla stanovena téměř ve 100 % testovaných vzorků s výjimkou rezistence na nitrofurantoin a meropenem ve vzorcích kategorie nad zaústěním ČOV. Nejvyšší podíly rezistentních *E. coli* byly zjištěny pro gentamicin, a to ve všech kategoriích. Prokázán byl také výskyt multirezistentních kmenů a kmenů s produkcí širokospektrých beta-laktamáz (ESBL).

Záchyty vysokých počtů rezistentních či multirezistentních kmenů *E. coli* v čištěných odpadních vodách a pod jejich zaústěním ukazují na významnost vodního prostředí při šíření AMR, což může být důsledkem možného přenosu rezistence mezi bakteriálními kmeny v

podmínkách ČOV. Závěry screeningu ukazují na potřebu detailního studia AMR v životním prostředí, které je nezbytné pro úspěch ve snahách o snížení aktuálních zdravotních hrozeb představovaných antibiotickou rezistencí v ČR i ve světě.

## ÚVOD

Antimikrobiální rezistence (AMR) je schopnost bakterií odolávat účinku ATB, tj. látek, které je dokážou usmrtit nebo zastavit jejich růst. Přirozená vlastnost každého organismu, včetně bakterií, je přežít a množit se. Pokud jim v tom brání kontakt s ATB, pokusí se najít způsob, jak se jejich negativnímu účinku vyhnout. Takto dochází ke vzniku mutací a genetických přenosů, které způsobují, že se původně citlivé bakterie stávají vůči působení ATB částečně nebo zcela odolné. Hlavní příčinou je nadměrný kontakt bakterií s ATB způsobený jejich nesprávným nebo nevhodným užíváním a výskyt ATB v prostředí. Důsledkem je fakt, že se dnes ve světě vyskytují nebezpečné rezistentní bakterie, na které nefungují běžná ani rezervní ATB. V současné době se proti nim dokážeme bránit pouze pomocí vyšších dávek nebo jiným druhem ATB, kterých je však omezené množství, což pro pacienty může znamenat větší zatížení organismu a více nežádoucích účinků. Současně i zde existuje možnost, že si bakterie najde cestu, jak nad ATB zvítězit. Uvádí se, že v EU každoročně zemře přes 35 000 lidí v souvislosti s AMR [1, 2].

K šíření AMR přispívá vylučování ATB do odpadních vod (až 80 %) a nadužívání ATB v zemědělském sektoru, kde do roku 2006 – a v některých zemích mimo EU dosud – bylo praktikováno preventivní podávání ATB chovným zvířatům za účelem urychlení růstu. Dosud málo prozkoumaným zdrojem AMR je vznik rezistentních bakterií v životním prostředí kontaminovaném ATB. V klinickém sektoru přispívá ke vzniku AMR užívání širokospektrých ATB, jež působí proti širokému spektru bakterií, poddávkování doporučených léčebných dávek, které způsobí adaptaci bakterií na nízké hladiny ATB, a nedůsledná diagnostika původce nemocí, např. léčba virových infekcí ATB.

Působení ATB komplikuje také schopnost některých bakterií, včetně *E. coli*, produkovat širokospektré beta-laktamázy (Extended Spectrum Beta-Lactamases – ESBL), jež hydrolyzují často používaná ATB (mj. peniciliny a cefalosporiny).

Studiu AMR a dopadům jejího šíření se intenzivně věnuje klinická a veterinární medicína na evropské i světové úrovni. V roce 2019 zařadila WHO AMR mezi deset nejvýznamnějších zdravotních hrozeb, v roce 2022 Evropská komise spolu s členskými státy EU označila AMR za jednu ze tří prioritních zdravotních hrozeb [3]. V červnu 2023 přijaté doporučení Evropské

radu o posílení opatření EU pro boj proti antimikrobiální rezistenci v rámci přístupu "One Health" [4] nově obsahuje konkrétní cíle, jichž by měl každý členský stát do roku 2030 dosáhnout. Pro ČR jsou cíle uvedeny ve *Strategii Národního antibiotického programu České republiky na období 2024–2030*:

a) snížení celkové spotřeby ATB o 9 % (ve srovnání s rokem 2019), přičemž alespoň 65 % používaných ATB by ve všech státech EU měla tvořit základní, úzkospektrální ATB; b) snížení celkové incidence infekcí krevního řečiště, jež jsou způsobeny bakteriemi rezistentními vůči ATB; incidence by měla klesnout u meticilin rezistentních *Staphylococcus aureus* o 6 %, u *E. coli* rezistentních k cefalosporinům 3. generace o 5 % a u *Klebsiella pneumoniae* rezistentních ke karbapenemům o 2 %.

Problematika AMR v životním prostředí donedávna nepatřila mezi prioritní zájmy. Poznatky prokazující její význam byly akceptovány v roce 2017 ve studii OSN *Frontiers 2017* [5–7]. Profesor W. Gaze upozornil, že vypouštění ATB je přehlíženým problémem, který však může být klíčový při rozvoji rezistentních kmenů, a vyvolal příslib řešit AMR napříč sektory, jenž vyústil v iniciativu "One Health". Riziko spočívá v tom, že většina ATB se v nemetabolizované formě společně s rezistentními bakteriemi (ARB) dostává do vody a půdy, kde se setkává s environmentálními bakteriemi a vznikají zde podmínky pro vzájemnou výměnu genetické informace. K přenosu dále přispívají podmínky prostředí a další kontaminanty (těžké kovy, dezinfekční prostředky, aj.), které mohou zvýšit selekční tlak, a tím potenciál vzniku velkého množství nových rizikových rezistencí. Byly nalezeny patogenní bakterie s klinicky významnými geny, pocházejícími z životního prostředí [7]. Dosud byly rezistentní i multirezistentní bakterie, tj. ty, jež nesou rezistenci k více než třem skupinám ATB, nalezeny ve všech typech vod včetně podzemních. Kontaminace rezistentními bakteriemi nebo geny rezistence je riziková pro zdroje pitných vod a povrchové vody využívané ke koupání, kde může dojít k přenosu fekálně-orální cestou do lidského těla. Kontaminace potravinového řetězce AMR může nastat u vod k zavlažování, akvakultur a aplikaci čistírenských kalů i statkových hnojiv na zemědělskou půdu [8]. Mechanismy možné kontaminace vodního prostředí AMR jsou schematicky znázorněny na *obr. 1*.

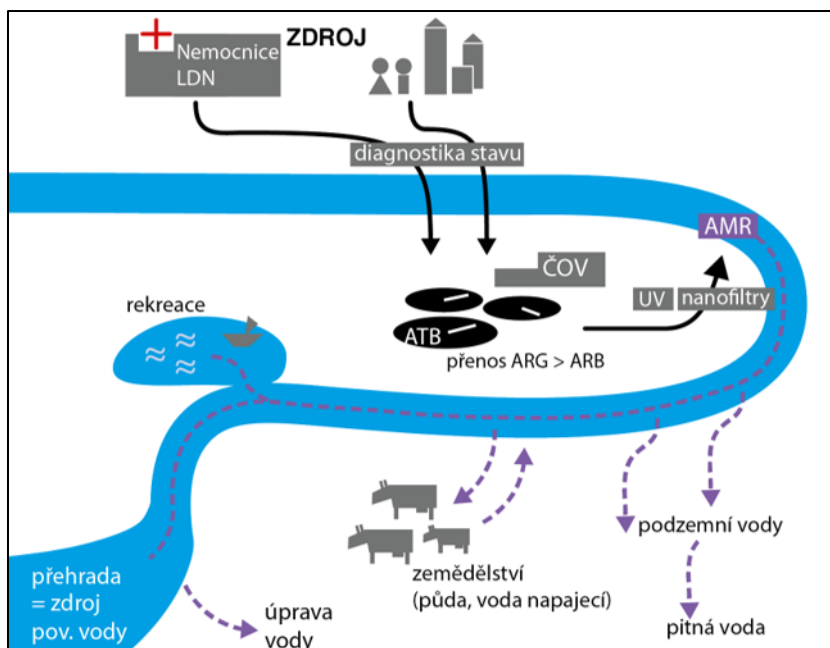
Vodní prostředí je kontaminováno rezistentními bakteriemi primárně přes čistírny odpadních vod (ČOV), které jsou považovány za hot-spot pro šíření AMR ve vodním prostředí. Do ČOV se ARB dostávají spolu s ATB z trávicího a vylučovacího ústrojí člověka a jsou zde – v závislosti na jejich stabilitě ve vodním prostředí – přítomna v různém stupni metabolizace. I přes vysokou účinnost stávajících čistírenských technologií, jež dosahuje při odstraňování mikrobiálního znečištění hodnot kolem 99 %, je do recipientu uvolňováno velké množství ARB

a ARG. V čištěných komunálních odpadních vodách a odpadních vodách z výroby léčiv vypouštěných do vodních toků je spolu s málo známými produkty jejich rozkladu přítomno také velké množství ATB, jež nelze současnými technologiemi odbourat. Pro doplnění informací o výskytu AMR v populaci napojené na jednotlivé ČOV [4] se využívají také údaje získané při monitoringu surových odpadních vod na principu WES (Wastewater and Environmental Surveillance).

Znalost aktuálního stavu výskytu AMR v životním prostředí v ČR je na velmi nízké úrovni a je nezbytné, v návaznosti na aktivity dalších zemí EU, přispět k jejímu rozšíření, aby byly získány podklady pro účinnou ochranu zdraví lidí a životního prostředí.

V ČR aktuálně neprobíhá žádný systematický monitoring vodních toků s ohledem na výskyt AMR. Informace o stavu lze odvodit pouze z výzkumných aktivit několika vědeckých týmů, které se touto problematikou z různých pohledů zabývají (např. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, Univerzita Pardubice, Veterinární univerzita, Brno, Státní zdravotní ústav, Praha). Zájem o problematiku AMR podporuje aktualizovaná směrnice o čištění městských odpadních vod 271/91/EHS, která vejde v platnost na podzim 2024. V rámci této směrnice se očekává řada změn, jež pomohou zvýšit kvalitu povrchových vod a snížit zdravotní rizika spojená s jejich užíváním. Postupně by měl být zaveden monitoring látek, které mohou mít vliv na lidské zdraví, kam je vedle AMR zařazen např. monitoring virů, PFAS (perfluorované a polyfluorované alkylové látky) a mikroplastů. Problematika by měla být v budoucnu zařazena i do Rámcové směrnice o ochraně vod 2000/60/ES.

Naším cílem bylo získat prvotní informace o výskytu AMR v povrchových a odpadních vodách v ČR. Screening byl zaměřen na zjištění výskytu antibiotické rezistence na vybraná ATB u indikátorové bakterie *E. coli*, izolované z povrchových a odpadních vod na přítocích a odtocích z ČOV pomocí diskové difuzní metody.



Obr. 1. Mechanismy možného šíření AMR vodním prostředím

Fig. 1. Mechanisms of potential spread of AMR in the water environment

## METODIKA

### Odběr vzorků

Pro možnost porovnání vlivu ČOV byly do studie vybrány lokality povrchových vod z páteřních vodních toků nad a pod zaústěním komunálních odpadních vod z velkých městských aglomerací s jednotnou kanalizací a vzorky povrchových vod z menších vodních toků zaústěných do Vltavy. Současně byly analyzovány vzorky odpadních vod na přítoku a odtoku z těchto ČOV. Vzorky byly odebírány průběžně v letech 2022–2024 a byly zařazeny do kategorií NAD (13 vzorků z vodních toků nad velkými komunálními ČOV), POD (53 vzorků z toků pod zaústěním čištěných odpadních vod z velkých komunálních ČOV ve vzdálenosti 500 m až 10 km), PŘÍTOK (19 vzorků z přítoků do ČOV po hrubém mechanickém předčištění), ODTOK (26 vzorků čištěných odpadních vod na odtocích z ČOV s různými technologiemi čištění) a POTOK (20 vzorků z různě vodných přítoků Vltavy, do nichž jsou zaústěny menší ČOV a další výpustě). Celkem bylo do studie zahrnuto 131 vzorků. Vzorky byly odebírány standardním způsobem odběrů pro mikrobiologickou analýzu.

### Postup izolace *E. coli* a stanovení citlivosti na antibiotika diskovou difúzní metodou

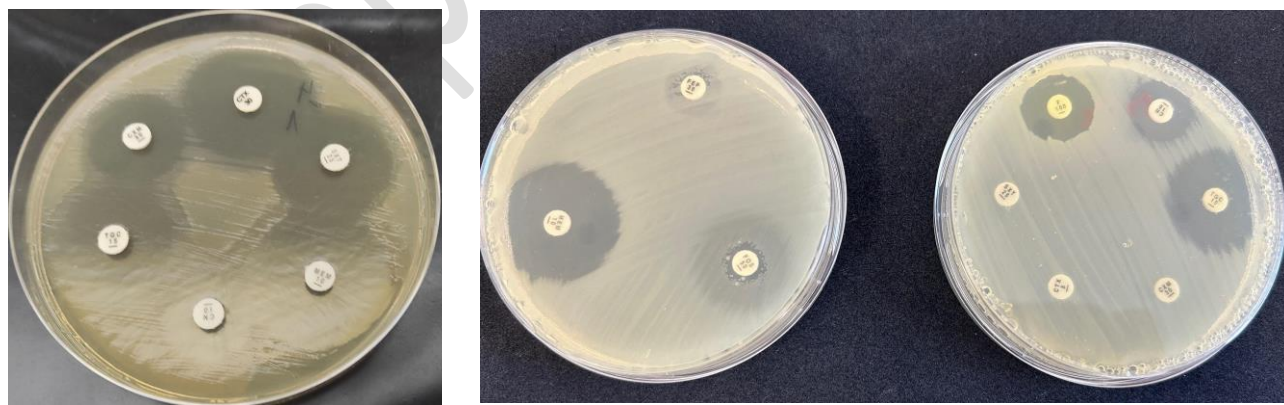
Ve vzorcích byly kultivačně na mFC agaru stanoveny bakterie *E. coli* [9]. Z každého vzorku byly, v optimálním případě vybrány a izolovány, čtyři typově odlišné kmeny *E. coli*, u nichž

byla zjišťována AMR diskovou difúzní metodou. Čistá bakteriální kultura vyrostlá přes noc na pevně neselektivní půdě (Trypton Yeast Extract Agar) byla rozsuspendována ve fyziologickém roztoku do stupně zákalu  $0,5 \pm 0,1$  dle McFarlandovy zákalové stupnice, tj.  $1-2 \times 10^8$  buněk/ml. Suspenze byla rovnoměrně nanášena na misky s Mueller-Hinton agarem, na které byly následně pomocí aplikátoru umístěny disky obsahující ATB o různých koncentracích (tab. 1). Po  $18 \pm 2$  hodinové inkubaci při  $36 \pm 2$  °C byly odečteny inhibiční zóny jednotlivých ATB (breakpoint průměry inhibičních zón byly zvoleny podle tabulek EUCAST [10]), viz obr. 2. ATB a jejich koncentrace byly vybrány na základě informací o výskytu rezistence v klinické oblasti, používání ATB v ČR a vlastností ATB ve vodním prostředí tak, aby bylo pokryto co nejvíce skupin ATB (zdroj: NRL pro ATB SZÚ, EUCAST [10]).

Tab. 1. Seznam použitých ATB a jejich koncentrace v discích

Tab. 1. List of used antibiotics and their concentration in the discs

antibiotikum	zkratka	koncentrace antibiotika v disku ( $\mu\text{g}$ )	skupina
cefuroxim	CXM	30	cefalosporiny 2. generace
cefotaxim	CTX	5	cefalosporiny 3. generace
cefepim	FEP	30	cefalosporiny 4. generace
gentamicin	CN	10	aminoglykosidy
sulphamethoxazol/trimethoprim	SXT	25	sulfonamidy
fosfomycin	FOS	50	širokospektrá ATB
nitrofurantoin	F	100	nitrofurany
meropenem	MEM	10	karbapenemy



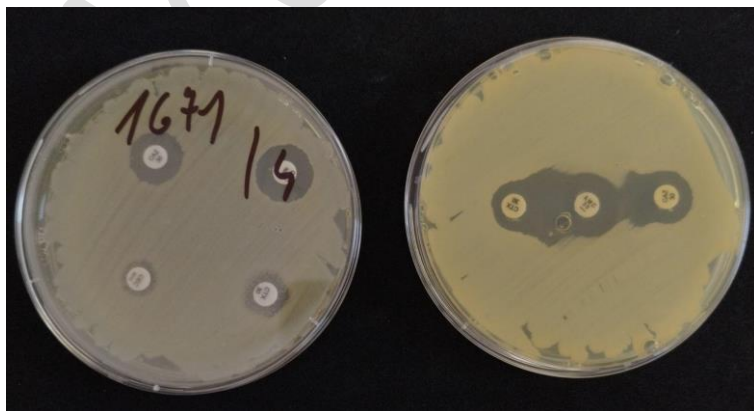
Obr. 2. Inhibiční zóny testovaného kmene *E. coli*, příklad citlivého (zřetelná inhibiční zóna kolem disku s ATB) a rezistentního kmene (malá nebo žádná inhibiční zóna kolem disku s ATB); velikost inhibiční zóny je uvedena v EUCAST

Fig. 2. Inhibition zones of the tested *E. coli* strain, example of a sensitive (obvious inhibition zone around the antibiotics disc) and resistant strain (small or none inhibition zone around the antibiotics disc); the size of inhibition zones is given in EUCAST

### Stanovení *E. coli* s produkcí širokospektrých beta-laktamáz

Stanovení rezistence *E. coli* na vybraná ATB byla doplněna detekcí produkce širokospektrých beta-laktamáz (ESBL).

Zvolený objem vzorku (obvykle 1–100 ml) byl přefiltrován přes sterilní nitrocelulóзовý membránový filtr o porozitě 0,45 µm, který byl poté umístěn na misku s TBX agarem (Tryptone Bile X Glukoronide agar) s přidavkem cefotaximu (4 µg/ml). TBX agar bez ATB sloužil ke zjištění celkového počtu *E. coli* ve vzorku vody. Kultivace probíhala v termostatu při teplotě  $36 \pm 1$  °C po dobu  $21 \pm 3$  hod. Z každého vzorku byly čtyři presumptivní kolonie ESBL pozitivních kmenů *E. coli* podrobeny dvěma testům – CDT (Combination Disc Diffusion Test) a DDST (Double Disk Synergy Test) podle postupu provedení a interpretace výsledků [11], viz obr. 3. Průkaz ESBL využívá inhibici hydrolyzy ATB kyselinou klavulanovou. U CDT se používají cefalosporinové disky s obsahem cefotaximu a ceftazidimu a kombinované disky cefotaxim/kyselina klavulanová a ceftazidim/kyselina klavulanová. Na jeden izolát se použijí čtyři disky (dva cefalosporiny a dva kombinované disky). Interpretace výsledků CDT testu (obr. 3) je založena na odečtu velikosti inhibičních zón každého cefalosporinu zvlášť v porovnání s kombinací cefalosporinu a kyseliny klavulanové. U DDST se používají cefalosporinové disky a klavulanový disk. Principem je použití cefalosporinových disků vedle klavulanového disku se vzdáleností 20 mm od středu. Po inkubaci se sleduje interakce mezi jednotlivými cefalosporiny a kyselinou klavulanovou (obr. 3).



Obr. 3. Průkaz produkce širokospektrých beta-laktamáz u *E. coli* (vlevo: CDT test, vpravo: DDST test)

Fig. 3. Establishment of extended-spectrum beta-lactamase production by *E. coli* (left: CDT test, right: DDST test)

### Hodnocení výsledků

Vzorky byly pro vyhodnocení orientačního výskytu AMR v povrchových a odpadních vodách rozděleny do pěti kategorií. Byly porovnány vzorky odebrané na přítocích (PŘÍTOK) a odtocích (ODTOK) z velkých ČOV, ve vodních tocích nad (NAD) a pod (POD) zaústěním čištěných odpadních vod z ČOV a v menších vodních tocích (POTOK), na nichž jsou lokalizovány menší ČOV. Získané výsledky byly vyhodnoceny v rámci jednotlivých kategorií a graficky zpracovány. Hodnocení bylo provedeno pro „relativní procentuální podíl kmenů s prokázanou rezistencí“ na jednotlivá ATB. Ten byl získán dopočtem reálně otestovaného podílu kmenů do celkového počtu *E. coli* ve vzorku.

Přesnost výsledků je zatížena relativně nízkým podílem testovaných kmenů (0,00004–0,19 %) daným vysokým mikrobiálním zatížením vzorků povrchových a odpadních vod. Samostatně byl hodnocen podíl ESBL pozitivních a multirezistentních kmenů, tj. kmenů se současnou rezistencí nejméně vůči třem skupinám ATB, přičemž cefalosporiny 3. a 4. generace jsou považovány za jednu skupinu.

### VÝSLEDKY

V průběhu let 2022–2024 bylo otestováno 131 vzorků vod z pěti kategorií. Počty vzorků v jednotlivých kategoriích přináší *tab. 2* a *3*. V *tab. 2* jsou dále uvedeny relativní procentuální podíly kmenů *E. coli* s prokázanou antibiotickou rezistencí na testovaná ATB v jednotlivých kategoriích, *tab. 3* ukazuje počty vzorků s prokázanou antibiotickou rezistencí na testovaná ATB v jednotlivých kategoriích. Výsledky jsou graficky znázorněny na *obr. 4*.

Nejvíce vzorků bylo testováno z kategorie POD, do níž byly zařazeny recipienty odpadních vod v různých vzdálenostech (500 m až 10 km) od jejich ústí. V této kategorii bylo otestováno 201 kmenů *E. coli* z celkově detekovaných více než 400 000. Byla nalezena rezistence na všechna testovaná ATB, v porovnání s ostatními kategoriemi byl vysoký podíl kmenů rezistentních na fosfomycin (22 %), v podobném podílu jako u kategorií PŘÍTOK a ODTOK (17–24 %). Nejčastější byla rezistence na gentamicin (55 %), nejméně se, stejně jako u ostatních kategorií, vyskytovala rezistence na meropenem (1 %).

Nižší podíly antibioticky rezistentních kmenů byly zjištěny v kategorii NAD, kam byly zařazeny profily větších vodních toků nad ústím ČOV. Tato kategorie sloužila ke kontrolnímu porovnání stavu nad vůči stavu pod ústím velkých ČOV, které jsou považovány za významné



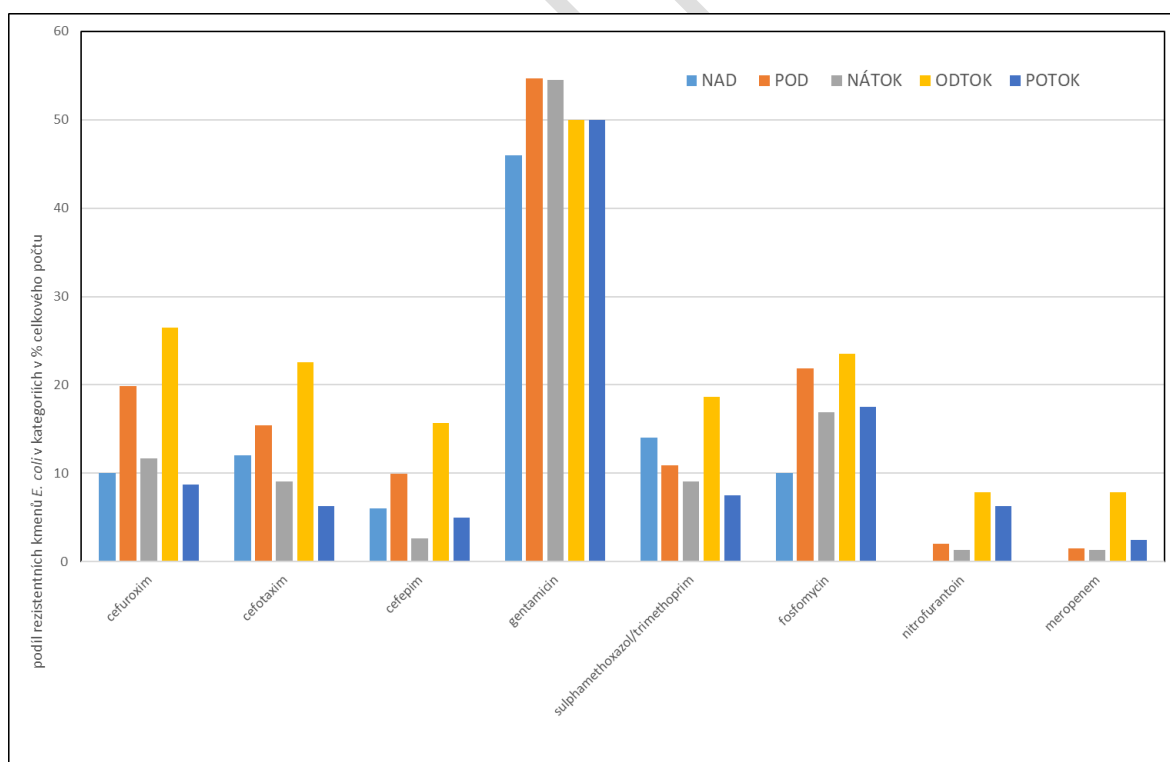


	or ků	<i>E.</i> <i>col</i> <i>i</i>	kme nů <i>E.</i> <i>coli</i>	kme nů <i>E.co</i> <i>li</i>								
		KT J/1 00 ml	KTJ /100 ml	%	relativní procentuální podíl kmenů s prokázanou rezistencí							
NA D	13	26 07 5	50	0,19	10	12	6	46	14	10	0	0
PO D	53	40 4 04 3	201	0,05	20	15	10	55	11	22	2	1
PŘ ÍT OK	19	19 9 30 0 00 0	77	0,00 004	12	9	3	55	9	17	1	1
OD TO K	26	1 00 5 92 9	102	0,01	26	23	16	50	19	24	8	8
PO TO K	20	1 09 4 56 0	80	0,01	9	6	5	50	8	18	6	3

Tab. 3. Počty vzorků v jednotlivých kategoriích s prokázanou AMR u *E. coli*

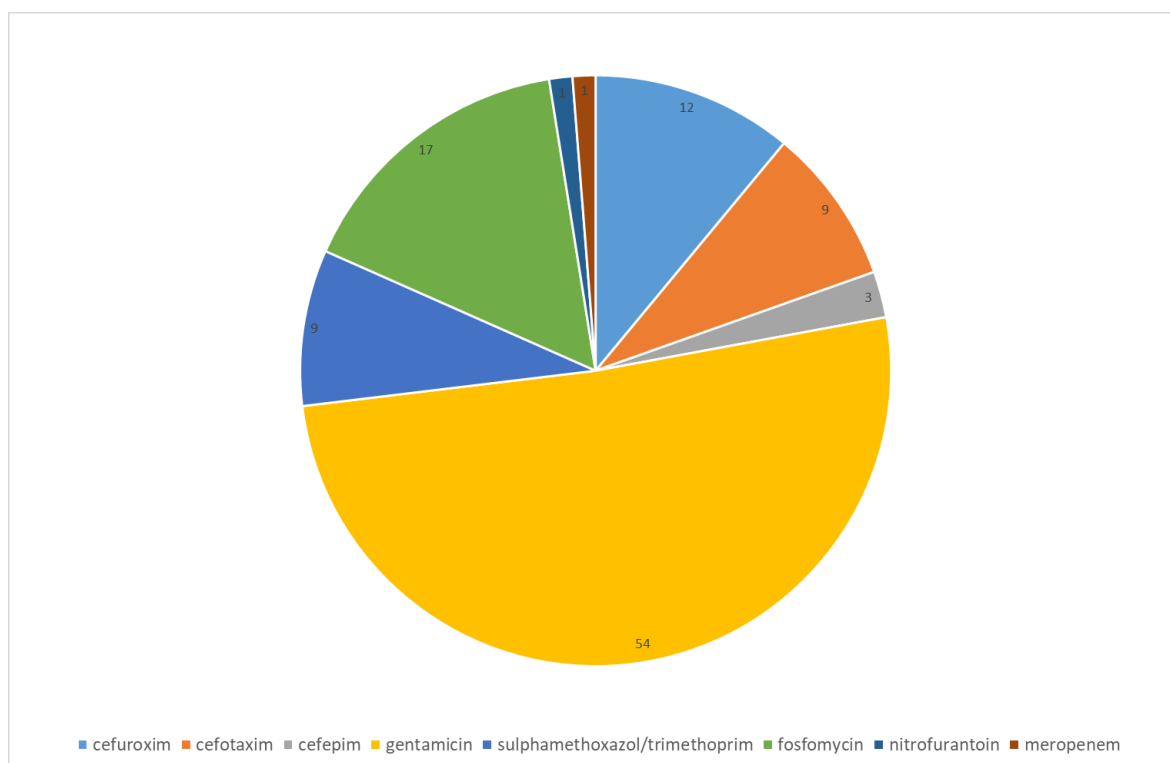
Tab. 3. Numbers of samples in each category with demonstrated AMR in *E. coli*

kategorie vzorků	počet vzorků	cefuroxim	cefotaxim	cefepim	gentamicin	sulphamethoxazol /trimethoprim	fosfomycin	nitrofurantoin	meropenem
		% pozitivních vzorků							
NA D	13	23	23	15	77	38	31	0	0
POD	53	38	30	17	81	23	55	38	6
PŘÍ TOK	19	32	26	11	84	32	42	37	5
ODT OK	26	54	42	35	81	38	50	42	15
POT OK	20	25	15	10	85	20	50	45	10



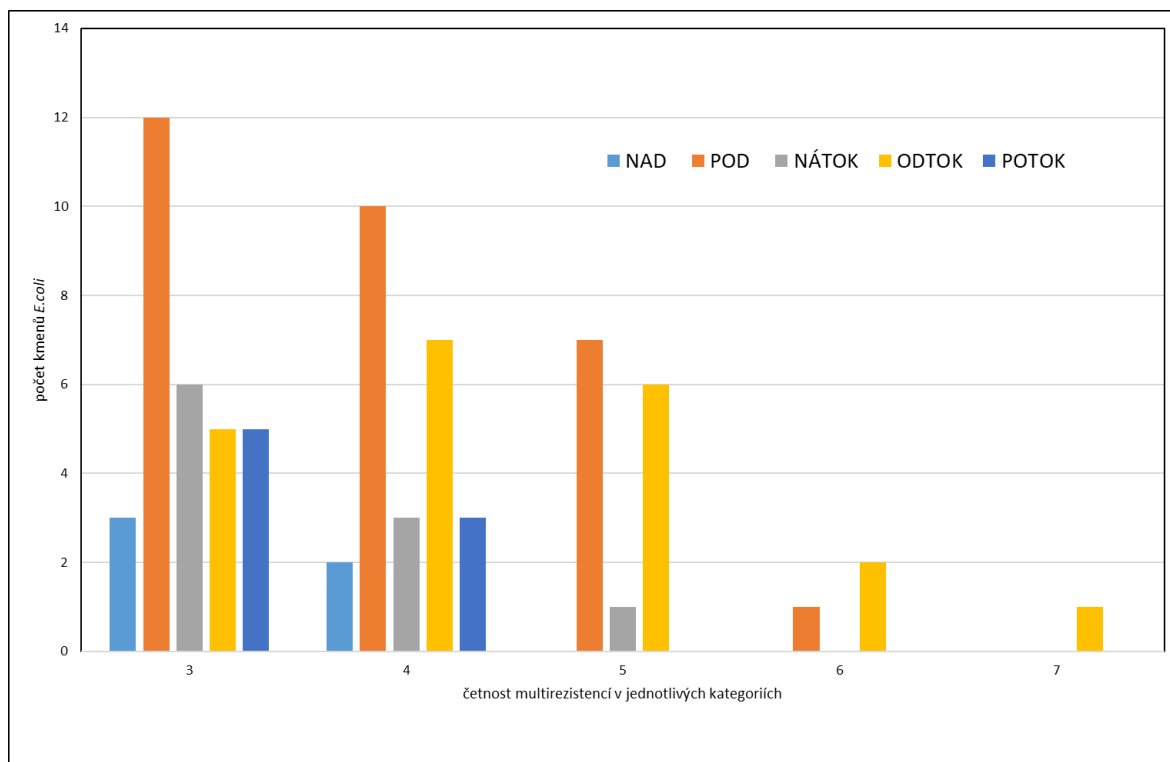
Obr. 4. Relativní podíl kmenů *E. coli* s prokázanou AMR v jednotlivých kategoriích

Fig. 4. Relative proportion of *E. coli* strains with proven AMR in each category



Obr. 5. Relativní podíl výskytu rezistence na jednotlivá ATB (včetně vícečetných rezistencí; v %)

Fig. 5. Relative proportion of occurred resistance to individual antibiotics (incl. Multiple resistance; in %)



Obr. 6. Počty kmenů *E. coli* s prokázanou rezistencí na 3–7 skupin ATB

Fig. 6. Number of *E. coli* strains with proven resistance to 3–7 groups of antibiotics

Tab. 4. Podíl vzorků s prokázanou ESBL u *E. coli*

Tab. 4. Ratio of samples with proven ESBL in *E. coli*

Kategorie vzorků	Počet vzorků	Počet testovaných kmenů	Počet pozitivních kmenů	Podíl ESBL ze všech kmenů <i>E. coli</i> ve vzorku [%]
POD	5	25	13	0–2,4
ODTOK	8	33	23	0,2–3,6

## DISKUZE

Úloze životního prostředí při vzniku a šíření AMR je věnována stále větší pozornost. Na základě současných poznatků není možné předpovědět intenzitu výskytu AMR z jakýchkoli jiných údajů (např. reziduí ATB, živin), proto je nutné AMR sledovat přímo, tj. pomocí ARB nebo ARG. Mezi ARB bývá AMR nejčastěji sledována u izolátů *E. coli* [12, 13]. V naší studii byly na přítomnost AMR testovány izoláty *E. coli* z povrchových a odpadních vod. Pro testování byla zvolena především taková ATB, na něž je v současné době dokumentována významná rezistence v klinické sféře a která působí obtíže při léčbě závažných infekcí.

Naše výsledky potvrzují, že výskyt AMR ve vodním prostředí není ojedinělý, naopak, v převážné většině analyzovaných vzorků (95 %) byla zjištěna u izolátů *E. coli* rezistence alespoň k jednomu ATB. Nejčastěji šlo o rezistenci vůči gentamicinu, fosfomycinu a beta-laktamovým ATB. Gentamicin je ATB používané proti vážným infekcím. Často je podáván v kombinaci s dalšími beta-laktamovými ATB a je využíván především v chirurgii [14]. Je znám pro častý výskyt rezistence vůči němu [15]. V případě fosfomycinu jde o ATB používané pro léčení nekomplikovaných močových infekcí. Využívá se také proti již rezistentním kmenům bakterií [16]. K nejméně častým patřil výskyt rezistence na meropenem, zástupce karbapenemů. Tato ATB patří mezi ta méně užívaná, a to pro léčbu závažných infekcí způsobených multirezistentními kmeny enterobakterií a nefermentujících gram negativních tyčků. Rezistence ke karbapenemům je tedy z klinického a epidemiologického hlediska velmi závažný problém [17]. Výsledky této studie jsou v souladu s našimi dřívějšími daty [18]. Různé studie dokumentují, že podíl rezistentních enterobakterií z odpadních vod včetně *E. coli* může dosahovat hodnot od méně než 1 % až do více než 20 %, zejména pokud jde o peniciliny, cefalosporiny, chinolony a tetracykliny [12, 13, 19]. Podobnému tématu se věnovala i práce výzkumného týmu z USA [20]. Autoři popisují výskyt AMR u salmonel, *E. coli* a enterokoků v povrchové a odpadní vodě. Jejich výsledky prokázaly výskyt AMR u 9,6 % izolátů salmonel, 6,5 % izolátů *E. coli* a 6,8 % izolátů enterokoků. U izolátů *E. coli* byla nejčastěji zjištěna AMR na tetracyklin a ampicilin. Podobné výsledky byly pozorovány i v rámci jiných prací, např. [21, 22]. V naší studii bylo detekováno 8 % (pro meropenem) až 55 % (pro gentamicin) kmenů s prokázanou rezistencí. Celkově pak 60 % všech kmenů vykazovalo rezistenci alespoň k jednomu ATB. Vzorky z odtoků ČOV obsahovaly významně vyšší podíl rezistentních kmenů, zejména na cefepim, nitrofurantoin a meropenem, což může být obávaným důsledkem vhodných podmínek k přenosu rezistence v technologiích ČOV. Vodnímu prostředí se nevyhýbá ani přítomnost multirezistentních kmenů. Ty byly izolovány převážně z povrchových vod pod zaústěním odpadních vod a v odtocích z ČOV. Potvrzuje se tedy předpoklad, že ČOV působí jako hot-spoty pro šíření AMR.

ESBL byla zjištěna u nadpoloviční většiny izolátů *E. coli*, s podílem až 3,6 % ze všech kmenů *E. coli* ve vzorku. Tyto nálezy nejsou výjimkou, byly potvrzeny např. i již výše uvedenými autory [20]. Rezistence k beta-laktamovým ATB, zejména prostřednictvím širokospektrých beta-laktamáz a karbapenemáz, narůstá a je významným celosvětovým problémem.

Stávající technologie čištění odpadních vod nejsou schopny dostatečně odstranit AMR. Řešením by mohlo být čištění odpadních vod přímo u zdroje (nemocnice, pečovatelské domy, domovy pro seniory, jatka, apod.), tedy dříve, než se znečištění dostane do ČOV

(<https://www.niva.no/en/projects/hotmats>). Pozornost je často cílena na testování pokročilých postupů (např. ozonace, využití UV), nano a ultrafiltraci, ale i přírodě blízká řešení (např. kořenové čistírny) [23–25].

Významným problémem se jeví také import rezistentních bakterií ze zemí třetího světa, který nežádoucím způsobem rozšiřuje spektrum rezistencí, s nimiž už humánní medicína neumí pracovat. V posledních letech směřuje stanovení AMR ve vodním prostředí k využití molekulárně-biologických metod založených na PCR. Existuje mnoho studií, které se zabývají stanovením ARG [26–28]. Pozornost je věnována ARG s běžným výskytem ve vodním prostředí, ale i těm, jež jsou velmi klinicky významné, jako např. geny kódující širokospektré beta-laktamázy či karbapenamázy [26, 28]. Oba zmiňované přístupy mají své výhody i nevýhody, ale za účelem získání co nejkomplexnějších informací je nejvhodnější oba přístupy zkombinovat [19].

V zahraničí je problematice AMR ve vodním prostředí dlouhodobě věnována velká pozornost, příkladem může být Francie se sítí AMR-Env (<https://amr-promise.fr/amr-env/>). V ČR aktivity v oblasti AMR donedávna směřovaly především do oblasti klinické a veterinární medicíny, životní prostředí bylo z velké části opomíjeno. Problematice AMR ve vodním prostředí se věnovalo několik výzkumných týmů, např. kolektiv z VŠCHT [29], Fakulty chemicko-technologické v Pardubicích [30], kolektiv doc. Dolejské na Veterinární univerzitě Brno [31] a SZÚ (projekt EU-WISH). Náš tým ve VÚV TGM se věnuje studiu AMR ve vodním prostředí zejména v rámci projektů č. SS02030008 „*Centrum environmentálního výzkumu: Odpadové a oběhové hospodářství a environmentální bezpečnost*“ a č. SS02030027 „*Vodní systémy a vodní hospodářství v ČR v podmínkách změny klimatu*“. Dále je zapojen do několika iniciativ jako EIONET WG on AMR in surface waters, AMR One Health Network, CZEPAR, Centrální koordinační skupina Národního antibiotického programu.

## ZÁVĚR

Naše studie měla za cíl prověřit výskyt AMR v různých typech vodního prostředí s ohledem na její možné zdroje, jimiž mohou být komunální ČOV. Rezistence byla stanovována pomocí diskové difuzní metody na izolátech *E. coli*, detekované standardně jako indikátor fekálního znečištění vod. Ve vzorcích byl zjišťován relativní podíl kmenů *E. coli* s prokázanou rezistencí na některé z osmi ATB, zařazených do sedmi skupin. Vzorky odebrané v průběhu let 2022–2024 byly hodnoceny v rámci pěti kategorií odlišně znečištěných povrchových a odpadních vod.

*E. coli* s prokázanou rezistencí byla stanovena téměř ve 100 % testovaných vzorků s výjimkou

rezistence na nitrofurantoin a meropenem ve vzorcích kategorie NAD. Nejvyšší podíly rezistentních *E. coli* byly zjištěny pro gentamicin, a to ve všech kategoriích.

Nejvíce AMR pozitivních kmenů i vzorků bylo detekováno na odtocích z ČOV, současně s významným navýšením počtu při porovnání se vzorky surových odpadních vod na přítocích do ČOV. Příčinou může být obávaný přenos rezistence mezi bakteriálními kmeny v podmínkách ČOV. Pozitivní nálezy AMR byly rovněž ve vzorcích z velkých vodních toků nad zaústěním ČOV, přičemž pod zaústěním ČOV došlo k poměrně značnému navýšení výskytu rezistentních *E. coli*, což potvrzuje předpoklad, že čištěné odpadní vody z ČOV jsou zdrojem AMR ve vodních tocích. Na střední úrovni zatížení AMR byla kategorie vzorků z menších přítoků Vltavy, na nichž jsou situovány ČOV, což ukazuje, že i těmto menším vodním tokům je třeba věnovat pozornost. Alarmující je prokázán výskyt multirezistentních kmenů v odtocích z ČOV a pod jejich zaústěním do vodních toků, současně s výskytem *E. coli* produkujících širokospektré beta-laktamázy.

Naše studie prokázala, že problematice AMR v životním prostředí, jež byla dosud nejen v ČR opomíjena, je třeba věnovat zvýšenou pozornost. Předložená studie ukázala na stěžejních kategoriích vzorků vod v ČR téměř 100% míru výskytu bakterií *E. coli* rezistentních na alespoň jedno z testovaných ATB, včetně rezistence k cefalosporinům 4. generace. Záchyty vysokých počtů rezistentních či multirezistentních kmenů *E. coli* v čištěných odpadních vodách a pod jejich zaústěním ukazují na významnost vodního prostředí při šíření AMR a nutnost jeho detailního studia při snahách o snížení aktuálních zdravotních hrozeb představovaných antibiotickou rezistencí v ČR i ve světě.

## Poděkování

*Práce vznikla za podpory institucionálních prostředků MŽP a projektů č. SS02030008 „Centrum environmentálního výzkumu: Odpadové a oběhové hospodářství a environmentální bezpečnost“ a č. SS02030027 „Vodní systémy a vodní hospodářství v ČR v podmínkách změny klimatu“ Technologické agentury ČR. Autoři děkují provozovatelům ČOV za vstřícnou spolupráci při poskytování vzorků odpadních vod.*

## Literatura

[1] European Centre for Disease Prevention and Control. *Assessing the Health Burden of Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria in the EU/EEA, 2016–2020*. Stockholm: ECDC, 2022. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Health-burden-infections-antibiotic-resistant-bacteria.pdf>



- [2] Státní zdravotní ústav. *Antibiotická rezistence*. 2024. Dostupné z: <https://www.antibiotickarezistence.cz/>
- [3] European Commission. *HERA Factsheet – HEALTH UNION: Identifying Top 3 Priority Health Threats*. 2022. Dostupné z: [https://health.ec.europa.eu/document/download/18c127ce-da4b-4e4e-a27c-f7b93efb2980\\_en?filename=hera\\_factsheet\\_health-threat\\_mcm.pdf&prefLang=cs](https://health.ec.europa.eu/document/download/18c127ce-da4b-4e4e-a27c-f7b93efb2980_en?filename=hera_factsheet_health-threat_mcm.pdf&prefLang=cs)
- [4] Doporučení Rady o posílení opatření EU pro boj proti antimikrobiální rezistenci v rámci přístupu „One Health“ (2023/C 220/01/COM/2023/191). In: *Úřední věstník Evropské unie*. C 220, 22. 6. 2023. ISSN 1977-0626. Dostupné z: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023H0622\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023H0622(01))
- [5] ADLER, N., BALZER, F., BLONDZIK, K., BRAUER, F., CHORUS, I. EBERT, I., FIEDLER, T. GRUMMT, T., HEIDEMEIER, J., HEIN, A., HELMECKE, M., HILLIGES, F., KIRST, I., KLASSEN, J., KONRADI, S., KRAUSE, B., KÜSTER, A., OTTO, C., PIRNTKE, U., ROSKOSCH, A., SCHÖNFELD, J., SELINKA, H.-C., SZEWZYK, R., WESTPHAL-SETTELE, K., STRAFF, W. *Antibiotics and Antibiotic Resistances in the Environment. Background, Challenges and Options for Action*. Dessau-Roßlau: Umweltbundesamt, 2018, 44 s. Dostupné z: <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/antibiotics-antibiotic-resistances-in-the>
- [6] FINLEY, R. L., COLLIGNON, P., LARSSON, D. G. J., MCEWEN, S. A., LI, X.-Z., GAZE, W. H., REID-SMITH, R., TIMINOUNI, M., GRAHAM, D. W., TOPP, E. The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. *Clinical Infectious Diseases*. 2013, 57, s. 704–710. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/cid/cit355>
- [7] UN Environment. *Frontiers 2017, Emerging Issues of Environmental Concern. United Nations Environment Programme*. Nairobi, 2017. Dostupné z: <https://www.unep.org/resources/frontiers-2017-emerging-issues-environmental-concern>
- [8] KUSI, J., OJEWOLE, C. O., OJEWOLE, A. E., NWI-MOZU, I. Antimicrobial Resistance Development Pathways in Surface Waters and Public Health Implications. *Antibiotics*. 2022, 11, 821. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060821>
- [9] ČSN 75 7835. *Jakost vod – Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a Escherichia coli*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009.
- [10] *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 14.0*, 2024. Dostupné z: [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints)

- [11] World Health Organization. *WHO Integrated Global Surveillance on ESBL-Producing E. coli Using a “One Health” Approach: Implementation and Opportunities*. Geneva: WHO, 2021. Dostupné z: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/340079/9789240021402-eng.pdf?sequence=1>
- [12] HONDA, R., TACHI, C., NOGUCHI, M., YAMAMOTO-IKEMOTO, R., WATANABE, T. Fate and Seasonal Change of *Escherichia coli* Resistant to Different antibiotic classes at each stage of conventional activated sludge process. *Journal of Water and Health*. 2020, 18, s. 879–889. Dostupné z: <https://doi.org/10.2166/wh.2020.013>
- [13] MARANO, R. B. M. et al. A Global Multinational Survey of Cefotaxime-Resistant Coliforms in Urban Wastewater Treatment Plants. *Environment International*. 2020, 144, 106035. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106035>
- [14] EDSON, R. S., TERRELL, C. L. The Aminoglycosides. *Mayo Clinic Proceedings*. 1999, 74, s. 519–528. Dostupné z: <https://doi.org/10.4065/74.5.519>
- [15] WRIGHT, G. D. Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. *Trends in Microbiology*. 1997, 5, s. 234–240. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(97\)01033-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(97)01033-0)
- [16] FALAGAS, M. E., VOULOUMANOU, E. K., SAMONIS, G., VARDAKAS, K. Z. Fosfomycin. *Clinical Microbiology Review*. 2016, 29, s. 321–347. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/cmr.00068-15>
- [17] MELETIS, G. Carbapenem Resistance: Overview of the Problem and Future Perspectives. *Therapeutic Advances in Infection*. 2016, 3, s. 15–21. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/2049936115621709>
- [18] ŠMÍDA, A., ZVĚŘINOVÁ MLEJNKOVÁ, H., SOVOVÁ, K. Pilotní monitoring antibiotické rezistence u *Escherichia coli* ve Vltavě pod Prahou. In: ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., PETRÁKOVÁ KÁNSKÁ, K. (eds.). *Vodárenská biologie 2024*. Praha, Česká republika, 2024, s. 158.
- [19] MANAIA, C. M. Framework for Establishing Regulatory Guidelines to Control Antibiotic Resistance in Treated Effluents. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2023, 53, s. 754–779. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2085956>
- [20] CHO, S., HIOTT, L. M., READ, Q. D., DAMASHEK, J., WESTRICH, J., EDWARDS, M., SEIM, R. F., GLINSKI, D. A., BATEMAN MCDONALD, J. M., OTTESEN, E. A., LIPP, E. K., HENDERSON, W. M., JACKSON, C. R., FRYE, J. G. Distribution of Antibiotic Resistance in a Mixed-Use Watershed and the Impact of Wastewater Treatment Plants on

Antibiotic Resistance in Surface Water. *Antibiotics*. 2023, 12, 1586. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111586>

[21] BURIÁNKOVÁ, I., KUČHTA, P., MOLÍKOVÁ, A., SOVOVÁ, K., VÝRAVSKÝ, D., RULÍK, M., NOVÁK, D., LOCHMAN, J., VÍTĚZOVÁ, M. Antibiotic Resistance in Wastewater and Its Impact on a Receiving River: A Case Study of WWTP Brno-Modřice, Czech Republic. *Water*. 2021, 13, 2309. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/w13162309>

[22] LAMONTAGNE, C. D., CHRISTENSON, E. C., ROGERS, A. T., JACOB, M. E., STEWART, J. R. Relating Antimicrobial Resistance and Virulence in Surface-Water *E. coli*. *Microorganisms*. 2023, 11, 2647. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112647>

[23] GUERRA-RODRÍGUEZ, S., ABELEDO-LAMEIRO, M. J., POLO-LÓPEZ, M. I., PLAZA-BOLAÑOS, P., AGÜERA, A., RODRÍGUEZ, E., RODRÍGUEZ-CHUECA, J. Pilot-Scale Sulfate Radical-Based Advanced Oxidation for Wastewater Reuse: Simultaneous Disinfection, Removal of Contaminants of Emerging Concern, and Antibiotic Resistance Genes. *Chemical Engineering Journal*. 2023, 477, 146916. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146916>

[24] LI, J., QIU, X., REN, S., LIU, H., ZHAO, S., TONG, Z., WANG, Y. High Performance Electroactive Ultrafiltration Membrane for Antibiotic Resistance Removal from Wastewater Effluent. *Journal of Membrane Science*. 2023, 672, 121429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2023.121429>

[25] PASTOR-LOPEZ, E. J., CASAS, M. E., HELLMAN, D., MÜLLER, J. A., MATAMOROS, V. Nature-Based Solutions for Antibiotics and Antimicrobial Resistance Removal in Tertiary Wastewater Treatment: Microbiological Composition and Risk Assessment. *Water Research*. 2024, 261, 122038. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122038>

[26] KEENUM, I., LIGUORI, K., CALARCO, J., DAVIS, B. C., MILLIGAN, E., HARWOOD, V. J., PRUDEN, A. A Framework for Standardized qPCR-Targets and Protocols for Quantifying Antibiotic Resistance in Surface Water, Recycled Water and Wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2022, 52, s. 4 395–4 419. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.2024739>

[27] LUND, M., PETERSEN, M. B., JØRGENSEN, A. L., PAULMANN, D., WANG, M. Rapid Real-Time PCR for the Detection of IMP, NDM, VIM, KPC and OXA-48 Carbapenemase Genes in Isolates and Spiked Stool Samples. *Diagnostic Microbiology and*

*Infectious Disease*. 2018, 92, s. 8–12. Dostupné z:  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.002>

[28] SUBIRATS, J., ROYO, E., BALCÁZAR, J. L., BORREGO, C. M. Real-Time PCR Assays for the Detection and Quantification of Carbapenemase Genes (bla KPC, bla NDM, and bla OXA-48) in Environmental Samples. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017, 24, s. 6 710–6 714. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8426-6>

[29] MIŁOBEDZKA, A., FERREIRA, C., VAZ-MOREIRA, I., CALDERÓN-FRANCO, D., GORECKI, A., PURKRTOVA, S., BARTACEK, J., DZIEWIT, L., SINGLETON, C. M., NIELSEN, P. H., WEISSBRODT, D. G., MANAIA, C. M. Monitoring Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Environments: The Challenges of Filling a Gap in the One-Health Cycle. *Journal of Hazardous Materials*. 2022, 424, 127407. Dostupné z:  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127407>

[30] ROULOVÁ, N., MOT'KOVÁ, P., BROŽKOVÁ, I., PEJCHALOVÁ, M. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Hospital Wastewater in the Czech Republic. *Journal of Water and Health*. 2022, 20, s. 692–701. Dostupné z:  
<https://doi.org/10.2166/wh.2022.101>

[31] DOLEJSKA, M., LITERAK, I. Wildlife Is Overlooked in the Epidemiology of Medically Important Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019, 63. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aac.01167-19>

#### Autoři

**RNDr. Hana Zvěřinová Mlejnková, Ph.D.<sup>1</sup>**

[hana.mlejnkova@vuv.cz](mailto:hana.mlejnkova@vuv.cz)

ORCID: 0000-0002-3892-6226

**Mgr. Kateřina Sovová, Ph.D.<sup>2</sup>**

[katerina.sovova@vuv.cz](mailto:katerina.sovova@vuv.cz)

ORCID: 0000-0002-2067-7081

**Mgr. Štěpánka Šabacká<sup>1</sup>**

[stepanka.sabacka@vuv.cz](mailto:stepanka.sabacka@vuv.cz)

ORCID: 0009-0005-9032-7369

**Mgr. Adam Šmída<sup>1</sup>**

adam.smida@gmail.com

ORCID: 0009-0008-8187-6966

<sup>1</sup>Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, Praha

<sup>2</sup>Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, Brno

Príspevek prošel recenzním řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2024.09.004

## **THE ISSUE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN THE AQUATIC ENVIRONMENT OF THE CZECH REPUBLIC**

**ZVĚŘINOVÁ MLEJNKOVÁ, H.<sup>1</sup>; SOVOVÁ, K.<sup>2</sup>; ŠABACKÁ, Š.<sup>1</sup>; ŠMÍDA, A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>T. G. Masaryk Water Research Institute, Prague

<sup>2</sup>T. G. Masaryk Water Research Institute, Brno

**Keywords:** antimicrobial resistance – surface and wastewater – disc diffusion method – multiresistance – antibiotics – ESBL

Antimicrobial resistance (AMR) has emerged as a high priority global problem in recent decades. Its severity lies in the critically increasing number of pathogenic bacteria that carry resistance genes to previously common antibiotics, making them a health threat. The emergence of resistance is a consequence of the long-term misuse of antibiotics in human medicine and veterinary praxis (with the most significant contribution from developing countries). In 2017, the UN warned that the issue is not limited to these areas and that the environment can also be a significant reservoir and vector for the spread of AMR. The issue has been included in the "One Health" initiative, which is based on a collaborative approach to combat AMR across the health, agriculture and environment sectors. AMR enters the aquatic environment in the form

of resistant bacterial strains (ARB) or resistance genes (ARG) shed by patients through municipal wastewater treatment plants (WWTPs), runoff or agricultural wastes.

In our study, screening for the occurrence of antibiotic resistance to selected antibiotics (cefuroxime, cefotaxime, cefepime, gentamicine, sulphamethoxazole/trimethoprim, fosfomycin, nitrofurantoin and meropenem) in indicator bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated from surface water and wastewater in influent and effluent of a wastewater treatment plant was performed. A culture disc diffusion method was used to detect resistance. *E. coli* with proven resistance was detected in almost 100 % of the samples tested, with the exception of resistance to nitrofurantoin and meropenem in samples of the category above the WWTP outflow. The highest proportions of resistant *E. coli* were found for gentamicin in all categories. Multi-resistant strains and strains producing broad-spectrum beta-lactamases (ESBLs) were also observed.

The detection of high numbers of resistant or multidrug-resistant *E. coli* strains in and downstream of treated effluents indicates the importance of the aquatic environment in the spread of AMR, which may be a consequence of the suggested transfer of resistance between bacterial strains in WWTP. The screening findings point to the need for detailed study of AMR in the environment, which is essential for success in efforts to reduce the current health threats posed by antibiotic resistance in the CR and worldwide.