

ANTIBIOTICKÁ CITLIVOST VYBRANÝCH PATOGENNÍCH BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z NEMOCNIČNÍCH ODPADNÍCH VOD

Roulová N.^{1,2*}, Mořková P.², Brožková I.², Pejchalová M.²

¹Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice

²Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice

*autor pro korespondenci, email: nikola.roulova@student.upce.cz

ABSTRAKT

Cílem studie bylo zhodnotit výskyt antimikrobiální rezistence u klinicky významných patogenních bakterií v nemocničních odpadních vodách a posoudit, zda představují jejich významný zdroj. Z 52 testovaných izolátů *Pseudomonas aeruginosa* jich bylo 30,8 % hodnoceno jako multirezistentních. Z 35 vyšetřovaných izolátů *Yersinia enterocolitica* jich bylo 22,9 % hodnoceno jako multirezistentních. U vyzolovaných kmenů *Staphylococcus aureus* byla naopak zjištěna vysoká míra citlivosti a výskyt multirezistentních kmenů nebyl zaznamenán. Na základě výsledků lze nemocniční odpadní vody označit jako zdroj rezistentních bakterií, prostřednictvím něhož může docházet k jejich dalšímu šíření do prostředí.

KLÍČOVÁ SLOVA

multirezistentní bakterie; nemocniční odpadní voda; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*

1. ÚVOD

V nemocničním prostředí je v důsledku intenzivního používání antibiotické terapie vyvíjen na bakteriální populaci neustálý selekční tlak (Tesfaye a kol., 2019). Z tohoto důvodu jsou nemocnice považovány za významný zdroj bakterií rezistentních na antibiotika. Z nemocničních zařízení se rezistentní bakterie šíří nejenom na kolonizovaných pacientech, ale také prostřednictvím odpadní vody (Hocquet a kol., 2016). Nemocniční odpadní vody spadají do speciální kategorie odpadů, z důvodu jejich vysoké infekčnosti a toxicity a představují významné zdravotní i ekologické riziko (Lorenzo a kol., 2018). Obsahují vysoké koncentrace antimikrobiálních látek a jejich metabolitů, dezinfekčních prostředků, těžkých kovů a dalších chemikálií (Miranda a kol., 2015). Antimikrobiální látky se navíc po podání ve střevech velmi špatně vstřebávají a značná část terapeutické dávky je vyloučena močí nebo výkaly pacientů v nemetabolizované formě jako původní sloučenina (Tao a kol., 2010). I přesto jsou ale antibiotika v odpadních vodách přítomná v subinhibičních koncentracích, které výrazně ovlivňují dosud citlivé bakterie a napomáhají selekci rezistentních kmenů (Łuczkiwicz a kol., 2010).

I přes svoji specifickou povahu jsou ale nemocniční odpadní vody velmi často bez jakéhokoli ošetření přímo vypouštěny do městského kanalizačního systému a čištěny společně s komunálními odpadními vodami v městských čistírnách odpadních vod (Verlicchi a kol., 2010). V čistírnách odpadních vod dochází ke kontinuálnímu mísení bakterií rezistentních na antibiotika, genů rezistence a antibiotik a jejich reziduí. Během procesu biologického čištění odpadních vod, založeném na aktivovaném kalu, který je široce využíván v městských čistírnách odpadních vod, se vytváří ideální podmínky pro rozvoj a další šíření rezistence (Manai a kol., 2016). Přechištěné odpadní vody vypouštěné z čistíren odpadních vod obsahují bakterie rezistentní vůči antibiotikům, a to mnohdy ve vyšších množstvích než v původní surové odpadní vodě (Novo et al., 2013).

Vzhledem k rostoucímu množství bakterií rezistentních na antibiotika je sledování a charakterizace rezistence u klinicky významných bakterií v nemocničních a městských odpadních vodách nezbytným krokem (Santoro a kol., 2015). V popředí intenzivního zájmu stojí zejména multirezistentní patogenní bakterie, neboť představují významné riziko pro veřejné zdraví (Nnadozie a kol., 2017). Jako multirezistentní jsou klasifikovány bakterie, které jsou necitlivé k nejméně jednomu antibiotiku ze tří a více antimikrobiálních skupin (Krzeminski a kol., 2019). Vysoké riziko představuje právě jejich schopnost získat rezistenci vůči širokému spektru antimikrobiálních látek, čímž se stávají prakticky neléčitelnými (Nnadozie a kol., 2017). Pro stanovení profilů mnohačetné rezistence se nejčastěji používají klasické kultivační metody, neboť umožňují fenotypovou charakterizaci bakteriálních izolátů (Manaia a kol., 2018). Získání bakteriálního kmene je neocenitelné pro schopnost odhalit expresi genů kódující mnohačetnou rezistenci, a ne pouze informovat o přítomnosti daných genů (McLain a kol., 2016).

V této studii byl hodnocen výskyt a rozmanitost antibiotické rezistence u klinicky významných patogenních bakterií izolovaných pomocí klasických kultivačních technik z nemocničních odpadních vod. Cílem bylo posoudit, zda nemocniční odpadní vody představují významný zdroj bakterií rezistentních na antibiotika, a to zejména multirezistentních. Cílovými bakteriemi byly zvoleny patogenní bakterie rodu *Salmonella* a *Campylobacter*, a dále bakterie *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIÁL A METODY

ODBĚR VZORKŮ

Pro mikrobiologický rozbor bylo celkem shromážděno 6 bodových vzorků nepřečištěné (surové) nemocniční odpadní vody. Vyšetřované vzorky odpadní vody byly odebírány v 5 nemocničních zařízeních odlišné velikosti. Ve čtyřech případech byla vzorkována odpadní voda v místě centrálního odtoku nemocnice. Tyto vzorky zahrnovaly odpadní vody pocházející jak ze zdravotnických, tak i technických oddělení nemocnic. Z jednoho nemocničního zařízení byly odebrány dva vzorky. První vzorek zahrnoval pouze odpadní vodu z infekčního oddělení a centrálních laboratoří nemocnice, druhý odpadní vodu z ostatních oddělení nemocnice a technických provozů. Vzorkování probíhalo v období od prosince 2019 do února 2020.

IZOLACE A IDENTIFIKACE VYBRANÝCH PATOGENNÍCH BAKTERIÍ

Pro izolaci bakterií rodu *Salmonella* bylo 10 ml nemocniční odpadní vody inkubováno v 90 ml pufrované peptonové vody (PPV, M614 HiMedia) po dobu 18 hodin při 37 °C. Následně byl 1 ml pomnožené kultury očkovan do 10 ml média dle Mueller-Kauffmana s tetrathionátem a novobiocinem (MKTTn, CM1048B Oxoid) a médium bylo inkubováno při 37 °C po dobu 24 hodin. Současně byla pomnožená kultura z PPV očkována do 10 ml média dle Rappaport Vassiliadis se sójou (RVS, CM0866B Oxoid). Do dvou zkumavek bylo očkováno 0,1 ml pomnožené kultury z PPV, z nichž jedna byla inkubována při 41,5 °C a druhá při 37 °C. Do třetí zkumavky byl očkován 1 ml pomnožené kultury z PPV a inkubován při 37 °C. Ve všech třech případech probíhala inkubace 24 hodin. Selektivně pomnožené kultury byly vyočkovány na xylóza-lyzin-deoxycholátový agar (XLD, M031 HiMedia) a Rambach® agar (Merck KGaA) a inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C. Suspektní kolonie bakterií rodu *Salmonella* byly subkultivovány na masopeptonovém agaru (MSA, M1269 HiMedia) při 37 °C po dobu 24 hodin.

Pro izolaci bakterií rodu *Campylobacter* bylo 10 ml nemocniční odpadní vody inkubováno ve 100 ml bujónu dle Boltona (M1592, HiMedia) a současně ve 100 ml bujónu dle Prestona (M899, HiMedia) při teplotě 41,5 °C po dobu 48 hodin v mikroaerofilních podmínkách. Současně bylo 50 ml nemocniční odpadní vody zakoncentrováno centrifugací (4800 x g, 30 minut, 4 °C) a sediment inkubován v 10 ml bujónu dle Boltona a současně v 10 ml bujónu dle Prestona 24 hodin za jinak stejných inkubačních podmínek jako v předchozím postupu. Pomnožené kultury byly vyočkovány na modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem (mCCDA, CM0739B Oxoid). Vedle pomnožených kultur byl na mCCDA agar přímo vyočkován i sediment po centrifugaci 50 ml vzorku (4800 x g, 30 minut, 4 °C). Inkubace mCCDA agaru probíhala při 41,5 °C po dobu 5 až 7 dnů v mikroaerofilních podmínkách. Suspektní kolonie bakterií rodu *Campylobacter* byly subkultivovány na krevním agaru Columbia (MH144 HiMedia) při stejných podmínkách jako mCCDA agar.

Pro izolaci bakterie *Yersinia enterocolitica* bylo 10 ml nemocniční odpadní vody inkubováno v 90 ml bujónu s irgasanem, tikarcilinem a chlorečnanem draselným (ITC, M1220 HiMedia) a současně v 90 ml bujónu s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi (PSB, M941 HiMedia) po dobu 48 hodin při 25 °C. Pomnožená kultura byla vyočkována na agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem (CIN, M843 HiMedia). Současně bylo 0,5 ml pomnožené kultury přeneseno do 4,5 ml alkalizačního roztoku KOH (0,5 g KOH ve 100 ml 0,9 % roztoku NaCl). Po 20 ± 5 sekundách alkalizace byla kultura vyočkována na CIN agar. Agary s vyočkovanou alkalizovanou i nealkalizovanou kulturou byly inkubovány při 30 °C po dobu 24 hodin. Suspektní kolonie *Yersinia enterocolitica* byly subkultivovány na trypton sójovém agaru (TSA, M290, HiMedia) při 30 °C po dobu 24 hodin.

Pro izolaci bakterie *Staphylococcus aureus* bylo 10 ml nemocniční odpadní vody inkubováno v 90 ml mozko-srdcové infuze (BHI, M210 HiMedia) s 6,5 % NaCl při 37 °C po dobu 24 hodin. Pomnožená kultura byla vyočkována na Baird-Parker agar (B-P, M043 HiMedia) a slaný agar s manitolem (MSA, CM0085 Oxoid) a inkubována při 37 °C po dobu 24 hodin. Současně bylo 100 µl nemocniční odpadní vody nebo příslušného ředění rozetřeno L-hokejkou na B-P agar a MSA a inkubováno při 37 °C po dobu 48 hodin. Na miskách bylo použito ředění 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ a 10⁻⁴. Suspektní kolonie bakterie *Staphylococcus aureus* byly subkultivovány na krevním agaru (KA, M834 HiMedia) při 37 °C po dobu 24 hodin.

Pro izolaci bakterie *Pseudomonas aeruginosa* bylo 100 µl nemocniční odpadní vody nebo příslušného ředění rozetřeno L-hokejkou na cetrimidový agar (M024 HiMedia), který byl inkubován při 37 °C po dobu 48 hodin. Na miskách bylo použito ředění 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ a 10⁻⁴. Suspektní kolonie *Pseudomonas aeruginosa* byly subkultivovány na krevním agaru (KA, M834 HiMedia) při 37 °C po dobu 24 hodin.

Předběžná identifikace kmenů izolovaných z nemocničních odpadních vod byla provedena na základě morfologie kolonií, barvení dle Grama a dle tvorby katalázy a oxidázy. K identifikaci bakterií rodu *Salmonella* a *Yersinia enterocolitica* byl využit test na utilizaci citrátů, tvorbu indolu a hydrolýzu močoviny. Identifikace bakterií rodu *Campylobacter* proběhla na základě zkoušky růstu při 25 °C za mikroaerofilních podmínek a při 41,5 °C za aerobních podmínek. Identifikace bakterie *Staphylococcus aureus* byla provedena na základě průkazu hyaluronidázy dekapulačním testem. Identifikace *Pseudomonas aeruginosa* byla provedena dle přítomnosti pigmentu na cetrimidovém agaru a úplné hemolýzy na krevním agaru. Konečná identifikace bakteriálních izolátů byla provedena pomocí MALDI-TOF.

VYŠETŘENÍ ANTIBIOTICKÉ CITLIVOSTI

U vybraných kmenů izolovaných z nemocničních odpadních vod bylo provedeno vyšetření citlivosti na antimikrobiální látky diskovou difúzní metodou dle standardní metodiky EUCAST (EUCAST, 2020a). Odečítání inhibičních zón bylo provedeno s pomocí šablon. Inhibiční zóny byly interpretovány podle poslední verze tabulky breakpointů (EUCAST, 2020b). Pro kontrolu kvality metody byly použity referenční kmeny *Escherichia coli* CCM 3954 (=ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (=ATCC 27853) a *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (=ATCC 29213).

Pro vyšetření citlivosti na antimikrobiální látky bylo vybráno 52 kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, 35 kmenů *Yersinia enterocolitica* a 14 kmenů *Staphylococcus aureus*. Pro každou patogenní bakterii byla sestavena řada 6 antimikrobiálních látek (Oxoid). Pro *Pseudomonas aeruginosa* piperacilin-tazobaktam (36 µg), ceftazidim (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg) a amikacin (30 µg). Pro *Yersinia enterocolitica* ampicilin (10 µg), cefotaxim (5 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), tetracyklin (30 µg) a sulfamethoxazol-trimetoprim (25 µg). Pro *Staphylococcus aureus* cefoxitin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), klindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg) a tetracyklin (30 µg).

Testované izoláty byly klasifikovány do kategorií vyšetření citlivosti dle EUCAST jako C – „citlivý, standardní expozice“, I – „citlivý, zvýšená expozice“ a R – „rezistentní“ (EUCAST, 2019a).

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Z 6 vyšetřovaných vzorků nemocničních odpadních vod bylo celkem získáno 213 kmenů. Nejčastěji byla izolována *Pseudomonas aeruginosa* (88 kmenů). Dále bylo získáno 68 kmenů *Yersinia enterocolitica* a 57 kmenů *Staphylococcus aureus*. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Yersinia enterocolitica* byly prokázány v 5 vyšetřovaných vzorcích. Zatímco bakterie *Staphylococcus aureus* byla prokázána pouze ve 2 vyšetřovaných vzorcích. Bakterie rodu *Salmonella* a *Campylobacter* nebyly izolovány z žádného vyšetřovaného vzorku.

Z celkem 88 získaných kmenů *Pseudomonas aeruginosa* jich bylo 52 vybráno k vyšetření antibiotické citlivosti. Vůči všem 6 testovaným antibiotikům byla v naší studii zjištěna rezistence. Nejvyšší míra rezistence byla zaznamenána vůči flurochinolonu ciprofloxacinu, a to u 18 izolátů (34,6 %). Toto zjištění je mírně překvapující, neboť flurochinolony jsou obecně účinné při léčbě infekcí způsobených *Pseudomonas aeruginosa* a ciprofloxacin je považován za vůbec nejefektivnější (Łuczkiwicz a kol., 2015). Druhá nejvyšší četnost rezistence byla zaznamenána pro aminoglykosid gentamicin, a to u 17 izolátů (32,7 %). Zjištěná rezistence vůči gentamicinu koreluje s faktem, že EUCAST zrušil breakpointy u *Pseudomonas* spp. pro gentamicin, a k použití aminoglykosidů uvedl, že při léčbě systémových infekcích musí být doplněny dalším účinným antibiotikem (EUCAST, 2020b). Vzhledem k tomu, že naše studie probíhala od prosince 2019, byly inhibiční zóny pro gentamicin u *Pseudomonas aeruginosa* odečítány dle tabulek breakpointů EUCAST v. 9.0 (EUCAST, 2019b). Také ve studii Magalhães a kol. (2016) byla u 9 izolátů z nemocniční odpadní vody zaznamenána vysoká míra rezistence vůči ciprofloxacinu (78 %) a gentamicinu (78 %). Nicméně v dalších studiích nebyla u kmenů *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných z nemocničních odpadních vod vysoká četnost rezistence vůči ciprofloxacinu a gentamicinu zaznamenána. V některých studiích byla zjištěna rezistence vůči ceftazidimu, meropenemu a amikacinu (Moges a kol., 2014; Miranda a kol., 2015; Santoro a kol., 2015; Falodun a kol., 2019). Třetí nejvyšší míra rezistence byla v naší studii zjištěna vůči karbapenemu

meropenemu, a to u 16 izolátů (30,8 %), což potvrzuje celosvětový nárůst rezistence vůči karbapenemům u kmenů *Pseudomonas aeruginosa*. Tento zvyšující se trend je nesmírně znepokojující, neboť karbapenemy patří mezi nejefektivnější antibiotika při léčbě závažných infekcí způsobených *Pseudomonas aeruginosa*, a to včetně těch, způsobených multirezistentními kmeny (Rostami a kol., 2018). Vůči piperacilin-tazobaktamu, ceftazidimu a amikacinu bylo shodně rezistentních 7 kmenů (13,5 %), nejednalo se však o stejné kmeny. U 17 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (32,7 %) byla zjištěna rezistence vůči 3 nebo více testovaným antibiotikům. Jako multirezistentních bylo vyhodnoceno 16 kmenů (30,8 %), z nichž 4 (7,7 %) byly rezistentní vůči všem testovaným antibiotikům, 2 kmeny (3,8 %) vůči 5 testovaným antibiotikům a 1 kmen (1,9 %) vůči 4 testovaným antibiotikům. Nejčastěji byla zaznamenána rezistence vůči 3 testovaným antibiotikům, a to u 10 izolátů (19,2 %). Výskyt multirezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* je hlášen i z dalších studií, liší se ale četností jejich výskytu. Ve studii Falodun a kol. (2019) bylo 93,2 % vyšetřovaných izolátů z nemocničních odpadních vod klasifikováno jako multirezistentních. Podobně vysoký výskyt multirezistentních kmenů (82,9 %) byl zaznamenán i v nemocniční odpadní vodě ve studii Miranda a kol. (2015). Ve studii Santoro a kol. (2015) bylo 22 % izolátů z 27 vyšetřovaných klasifikováno jako multirezistentních.

Z celkem 68 získaných izolátů *Yersinia enterocolitica* jich bylo 35 vybráno k vyšetření antibiotické citlivosti. Rezistence byla zjištěna vůči všem 6 testovaným antibiotikům. Testování antimikrobiální citlivosti kmenů *Yersinia enterocolitica* z odpadních vod nestojí v popředí zájmu, a prakticky neexistují studie, které se danou tematikou zabývají. Pro odpadních vody jsou preferovány jiné bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, a to zejména *Escherichia coli*. Naproti tomu, u bakterie *Yersinia enterocolitica* je často sledován výskyt rezistence u izolátů pocházejících ze vzorků potravin, zejména pak vepřového masa.

Nejvyšší míra rezistence byla u izolátů *Yersinia enterocolitica* zaznamenána vůči ampicilinu, kdy bylo rezistentních 32 kmenů (91,4 %). Rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům, jakými jsou ampicilin nebo cefalotin, je u *Yersinia enterocolitica* velmi dobře známá (Gkouletsos a kol., 2019). Dle EUCAST je rezistence vůči ampicilinu u *Yersinia enterocolitica* přirozená (EUCAST, 2020c). Druhá nejvyšší četnost rezistence byla zjištěna pro sulfamethoxazol-trimetoprim, vůči němuž bylo rezistentních 11 kmenů (31,4 %). Dále byla zaznamenána rezistence vůči tetracyklinu (6 izolátů, 17,1 %) a ciprofloxacinu (5 izolátů, 14,3 %). Vysoká citlivost byla zjištěna vůči cefalosporinu 3. generace cefotaximu a aminoglykosidu gentamicinu, kdy byla vůči každému z antibiotik zaznamenána rezistence pouze u 2 izolátů (5,7 %).

Výsledky získané v naší studii se až na vyšší míru rezistence vůči sulfamethoxazol-trimetoprimu shodují s výskytem rezistence u kmenů *Yersinia enterocolitica* pocházejících z jiného prostředí než z odpadních vod. Kmeny *Yersinia enterocolitica* obecně vykazují vysokou míru rezistence vůči ampicilinu, a naopak vysokou citlivost ke gentamicinu, cefotaximu, ciprofloxacinu, tetracyklinu a ve většině případů i vůči sulfamethoxazol-trimetoprimu (Bonardi a kol., 2013; Fois a kol., 2018; Peng a kol., 2018; Gkouletsos a kol., 2019). Nicméně v některých studiích byl zaznamenán významný výskyt rezistence vůči sulfamethoxazol-trimetoprimu. Ve studii Ye a kol. (2015) bylo 74,3 % ze 70 kmenů izolovaných z mrazených potravin rezistentních vůči sulfamethoxazol-trimetoprimu. Izolované kmeny současně vykazovaly vysokou rezistenci vůči ampicilinu (98,6 %) a naopak vysokou citlivost k tetracyklinu, cefotaximu, gentamicinu a ciprofloxacinu. Ve studii Bonardi a kol. (2016) byla rezistence vůči sulfamethoxazol-trimetoprimu zjištěna u 25,4 % z celkem 55 vyšetřovaných kmenů vyizolovaných z vepřových mandlí. Téměř shodná míra rezistence

byla zjištěna i vůči tetracyklinu (20,2 %) a ciprofloxacinu (18,2 %). Naopak vysokou citlivost vykazovaly kmeny vůči cefotaximu a gentamicinu. Rezistence vůči ampicilinu byla zjištěna u všech kmenů *Yersinia enterocolitica*.

U 8 kmenů *Yersinia enterocolitica* (22,9 %) byla v naší studii zjištěna rezistence vůči 3 a více testovaným antibiotikům, všechny tyto kmeny byly hodnoceny jako multirezistentní. U 1 kmene (2,9 %) byla zjištěna rezistence vůči všem testovaným antibiotikům a u 1 kmene (2,9 %) vůči 5 testovaným antibiotikům. Zbývajících 6 kmenů (17,1 %) bylo rezistentních vůči 3 testovaným antibiotikům. Podobně ve studii Younis a kol. (2019) bylo 23,3 % z 30 izolátů *Yersinia enterocolitica* ze syrového masa a masných výrobků klasifikováno jako multirezistentních. Současně izoláty vykazovaly vysokou citlivost na ciprofloxacin, gentamicin a cefotaxim. Výskyt rezistence vůči 3 a více antimikrobiálním látkám byl ve vysoké míře zaznamenán i v dalších studiích, nicméně v nich bylo testováno širší spektrum antibiotik (Bonardi a kol., 2013; Bonardi a kol., 2016; Peng a kol., 2018).

Z celkem 57 získaných kmenů *Staphylococcus aureus* jich bylo 14 vybráno k vyšetření antibiotické citlivosti. Rezistence byla zaznamenána pouze vůči aminoglykosidu gentamicinu, a to u 2 izolátů (14,3 %). Zbývajících 12 kmenů (85,7 %) bylo citlivých ke všem testovaným antibiotikům. Vysoká míra citlivosti u izolátů *Staphylococcus aureus* zjištěná v naší studii je poměrně překvapující. V nemocniční odpadní vodě se předpokládá přítomnost rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus*, a to zejména tzv. meticilin-rezistentních (MRSA), jejichž výskyt je úzce spojen s nemocničním prostředím. Kromě rezistence vůči všem β -laktamovým antibiotikům, je u MRSA kmenů hlášena i rezistence vůči aminoglykosidům, linkosamidům, tetracyklinům a makrolidům (Börjesson a kol., 2010; Ramessar a Olaniran, 2019). Ve studii Thompson a kol. (2013) byl na základě rezistence k cefoxitinu zjištěn vysoký výskyt MRSA kmenů v odpadních vodách ze dvou různých nemocničních zařízeních (59 % a 78 %). Současně byla u izolátů zjištěna vysoká míra rezistence vůči gentamicinu, a to 62 % resp. 76 %. Vysoký výskyt MRSA kmenů byl však hlášen i v městských odpadních vodách (Börjesson a kol., 2010; Ramessar a Olaniran, 2019).

4. ZÁVĚRY

Výsledky získané v této studii jenom potvrdily, jak obtížným úkolem je izolace citlivých patogenních bakterií ze silně selektivního a pro bakterie nepříznivého prostředí odpadních vod. Nicméně klasické kultivační metody nelze podceňovat, neboť jsou klíčem ke studiu fenotypu a stanovení profilů mnohačetné rezistence bakteriálních izolátů.

Výsledky této studie odhalily v nemocničních odpadních vodách přítomnost multirezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* a *Yersinia enterocolitica*. Tyto závěry jenom zdůrazňují důležitost stanovovat profily rezistence u klinicky významných patogenních bakterií, jejichž sledování je ve vodním prostředí často opomíjeno. Sledování antibiotické rezistence u kmenů izolovaných z odpadních vod je zásadní pro odhalení a porozumění rizik, které tyto organismy reálně představují pro veřejné zdraví.

Odpadní vody vypouštěné z nemocničních zařízení lze považovat za důležitý činitel, který napomáhá k šíření rezistentních bakterií do životního prostředí. Významně tomu napomáhá také skutečnost, že vypouštěné odpadní vody ve většině případů nepodléhají žádné kontrole a jejich přečištění před vypuštěním do veřejné kanalizační sítě není věnována zasloužená pozornost.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy jako účelová podpora na specifický vysokoškolský výzkum (SGS_2020_005).

SEZNAM LITERATURY

- Börjesson S., Matussek A., Melin S., Löfgren S., Lindgren P. E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat? *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), p. 1244-1251.
- Bonardi S., Bassi L., Brindani F., D'Incau M., Barco L., Carra E., Pongolini S. (2013). Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), p. 248-257.
- Bonardi S., Bruini I., D'Incau M., Van Damme I., Carniel E., Brémont S., Cavallini P., Tagliabue S., Brindani F. (2016). Detection, seroprevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pig tonsils in Northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 235, p. 125-132.
- EUCAST (2019a) Redefining susceptibility testing categories S, I and R.
- EUCAST (2019b) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0.
- EUCAST (2020a) Disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing Version 8.0.
- EUCAST (2020b) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0.
- EUCAST (2020c) Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes Version 3.2.
- Falodun O. I., Akinbamiro T. F., Rabiou A., G. (2019). Hospital wastewater: reservoir of antibiotic resistant *Pseudomonas* strains in Ibadan, Nigeria. *Emergent Life Science Research*, 5(1), p. 1-7.
- Fois F., Pirasa F., Torpdahl M., Mazza R., Ladu D., Consolati S. G., Spanu C., Scarano C., De Santisa E. P. L. (2018). Prevalence, bioserotyping and antibiotic resistance of pathogenic *Yersinia enterocolitica* detected in pigs at slaughter in Sardinia. *International Journal of Food Microbiology*, 283, p. 1-6.
- Gkouletsos T., Patas K., Lambrinidis G., Neubauer H., Sprague L. D., Ioannidis A., Chatzipanagiotou S. (2019) Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and presence of plasmid pYV virulence genes in human and animal isolates. *New Microbes and New Infection*, 32.
- Hocquet D., Muller A., Bertrand X. (2016). What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection*, 93(4), p. 395-402.
- Krzeminski P., Tomei M. C., Karaolia P., Langenhoff A., Almeida C. M. R., Felis E., Gritten F., Andersen R. H., Fernandes T., Manaia C. M., Rizzo L., Fatta-Kassinos D. (2019). Performance of secondary wastewater treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern implicated in crop uptake and antibiotic resistance spread: A review. *Science of the Total Environment*, 648, p. 1052-1081.
- Lorenzo P., Adriana A., Jessica S., Carles B., Marinella F., Marta L., Luis B. J., Servais P. (2018). Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. *Chemosphere*, 206, p. 70-82.
- Łuczkiwicz A., Jankowska K., Fudala-Książek S., Olańczuk-Neyman K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 44(17), p. 5089-5097.
- Łuczkiwicz A., Kotlarska E., Artichowicz W., Tarasewicz K., Fudala-Książek S. (2015). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), p. 19823-19834.
- Magalhães M. J. T. L., Pontes G., Serra P. T., Balieiro A., Castro D., Pieri F. A., Crainey J. L., Nogueira P. A., Orlandi P. P. (2016). Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* survey in a stream receiving effluents from ineffective wastewater hospital plants. *BMC Microbiology*, 16(1).
- Manaia C. M., Macedo G., Fatta-Kassinos, D., Nunes, O. C. (2016). Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), p. 1543-1557.
- Manaia C. M., Rocha J., Scaccia N., Marano R., Radu E., Biancullo F., Cerqueira F., Fortunato G., Iakovidisi I. C., Zammit I., Kampourisk I., Vaz-Moreira I., Nunes O. C. (2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International*, 115, p. 312-324.
- McLain J. E., Cytryn E., Durso L. M., Young S. (2016). Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), p. 432-440.
- Miranda C. C., de Filippis I., Pinto L. H., Coelho-Souza T., Bianco K., Cacci L. C., Picão R. C., Clementino M. M. (2015). Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 118(6), p. 1276-1286.

- Moges F., Endris M., Belyhun Y., Worku W. (2014). Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste water in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. *BMC Research Notes*, 7(1).
- Nnadozie C. F., Kumari S., Bux F. (2017). Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 16(3), p. 491-515.
- Novo A., Andre S., Viana P., Nunes O. C., Manaia C. M. (2013). Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Research*, 47(5), p. 1875-1887.
- Peng Z., Zou M., Li M., Liu D., Guan W., Hao Q., Xu J., Zhang S., Jing H., Li Y., Liu X., Yu D., Yan S., Wang W., Li F. (2018). Prevalence, antimicrobial resistance and phylogenetic characterization of *Yersinia enterocolitica* in retail poultry meat and swine feces in parts of China. *Food Control*, 93, p. 121-128.
- Ramessar K., Olaniran A. O. (2019). Antibigram and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(9).
- Rostami S., Farajzadeh Sheikh A., Shoja S., Farahani A., Tabatabaiefar M. A., Jolodar A., Sheikhi R. (2018). Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), p. 127-132.
- Santoro D. O., Cardoso A. M., Coutinho F. H., Pinto R. P., Vieira R. P., Albano R. M., Clementino M. M. (2015). Diversity and antibiotic resistance profiles of Pseudomonads from a hospital wastewater treatment plant. *Journal of Applied Microbiology*, 119(6), p. 1527-1540.
- Tao R., Ying G. G., Su H. C., Zhou H. W., Sidhu J. P. S. (2010). Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from the Pearl rivers in South China. *Environmental Pollution*, 158(6), p. 2101-2109.
- Tesfaye H., Alemayehu H., Desta A., Eguale T. (2019). Antimicrobial susceptibility profile of selected *Enterobacteriaceae* in wastewater samples from health facilities, abattoir, downstream rivers and a WWTP in Addis Ababa, Ethiopia. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1).
- Thompson J. M., Gündoğdu A., Stratton H. M., Katouli M. (2013). Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in hospital wastewaters and sewage treatment plants with special reference to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), p. 44-54.
- Verlicchi P., Galletti A., Petrovic M., Barceló D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389(3-4), p. 416-428.
- Ye Q., Wu Q., Hu H., Zhang J., Huang H. (2015). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail frozen foods in China. *FEMS Microbiology Letters*, 362(24).
- Younis G., Mady M., Awad A. (2019). *Yersinia enterocolitica*: Prevalence, virulence, and antimicrobial resistance from retail and processed meat in Egypt. *Veterinary World*, 12(7), p. 1078-1084.