



VÚVeL Academy VIII - od výzkumu k praxi
v chovech hospodářských zvířat, cyklus seminářů

**SBORNÍK ZE SEMINÁŘE
16. 06. 2022**

**MOLEKULÁRNÍ DETEKCE PATOGENŮ V POTRAVINÁCH
A VE VODĚ**

Seminář přináší poznatky vzniklé v souvislosti s řešením projektu
NAZV QK1810212 a je financován z prostředků MZe při ČTPZ.

POZVÁNKA



Česká technologická platforma pro zemědělství ve spolupráci s Výzkumným ústavem živočišné výroby, v. v. i., Českou zemědělskou univerzitou Praha, Mendelovou univerzitou Brno a **Výzkumným ústavem veterinárního lékařství, v. v. i.** si Vás dovoluje pozvat na **seminář**

MOLEKULÁRNÍ DETEKCE PATOGENŮ V POTRAVINÁCH A VE VODĚ

PROGRAM

- **Metody extrakce a subtypování kryptosporidií zo vzoriek vody** - MVDr. Elena Hatalová, Ph.D. (Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach)
- **Výzkumná infrastruktura RECETOX - Laboratoře mikrobiomové analýzy** - doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA, RNDr. Petra Růžičková, Ph.D. (MUNI)
- **Detekce vybraných zoonotických agens v mléce a mléčných výrobcích z kozích a ovčích farem České republiky** - MVDr. Jiřina Marková, Ph.D. (VÚVeL)
- **Problematika detekce vybraných patogenů v různých typech odpadních vod v ČR** - Ing. Petra Motřková, Ph.D. (Univerzita Pardubice)
- **Antimikrobiální rezistence ve vodním prostředí** - Mgr. Iva Sukkar, Ph.D. (CEITEC-Středoevrop.technol.institut, VETUNI Brno)
- **Sledování šíření enterobakterií rezistentních k antibiotikům cestou odpadních vod do prostředí: aplikace metagenomiky a celogenomového sekvenování** - Mgr. Lenka Davidová Geržová, Ph.D. (CEITEC-Středoevrop.technol.institut, VETUNI Brno)
- **Aplikace metod celogenomového sekvenování (NGS) v rámci harmonizovaného monitoringu antimikrobiální rezistence zoonotických a komenzálních bakterií detekovaných z hospodářských zvířat a potravin** - MVDr. Tomáš Černý (SVÚ Praha)
- **Detekce některých parazitárních původců v masných výrobcích pomocí molekulárních metod** - Barbora Zalewska, MSc., Ph.D. (VÚVeL)

Registrace [zde](#) Účast na semináři je bezplatná, občerstvení zajištěno.

V průběhu semináře bude pořizována fotodokumentace nebo audiovizuální záznam výhradně za účelem propagace a medializace akce.

Seminář přináší poznatky vzniklé v souvislosti s řešením projektu NAZV QK1810212 a je financován z prostředků MZE při ČTPZ.

Kdy:
14. 6. 2022
10:00 – 15:00 hod.

Kde:
Výzkumný ústav
veterinárního
lékařství, v. v. i.

Kontakt:
Tel.: 773 756 631



Centrální laboratoře RECETOX



(i) **Laboratoře stopové analýzy** - akreditovány podle evropských norem na provádění **odběrů environmentálních vzorků** a širokého spektra **chemických analýz** (perzistentních organických polutantů, jejich metabolitů, vývoj metod pro analýzu nových typů znečišťujících látek, prvků, kovů a specií). Součástí laboratoří jsou také **monitorovací sítě a vzorkovací programy**.

(ii) **Laboratoř analýzy biomarkerů** se zaměřuje na metody **cílené a necílené analýzy biologicky významných molekul** (metabolitů, proteinů, lipidů).



(iii) **Laboratoře mikrobiomové analýzy** - analýzy **bakteriálního profilu** **humánních i environmentálních vzorcích**, izolace DNA, příprava knihoven a sekvenace.



Populační studie - platforma pro biomedicínský výzkum a lidský biomonitoring

- > **Data z databází studií CELSPAC**
- > **Biologický materiál** ze studií CELSPAC
- > **Realizace nových epidemiologických studií**
(konzultace ve fázi přípravy výzkumného protokolu, design studie, spolupráce při tvorbě dotazníkových šetření, sběr a analýza dat, sběr a analýza lidského biologického materiálu, archivace biolog. materiálu)
- > **Legálně-etické otázky** výzkumných studií
- > Podpora **sběru a zpracování dat**
- > **Laboratorní spolupráce**
- > **Analýzy lidského biolog. materiálu**
- > **Biobankovací kapacity**



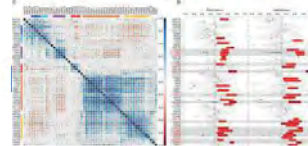
MUNI RECETOX



MUNI | RECETOX

Datové služby

- > **facilita je složena ze čtyř spolupracujících jednotek**
 - (i) Informační systémy
 - (ii) Biostatistika a analýza dat,
 - (iii) Zpracování a analýza sekvenčních dat
 - (iv) Zpracování a analýza spektrometrických dat
- > **prostředí a podporu pro fungování RECETOX RI**
- > zajišťují **komplexní management výzkumných dat**
- > zajišťuje **přístup do databází a informačních systémů**
- > poskytuje uživatelům **biostatistické a bioinformatické analýzy dat z existujících databází, ale i z nových experimentů či vlastních dat uživatelů**, a to buď odděleně nebo v návaznosti na další služby či výzkumné aktivity centra



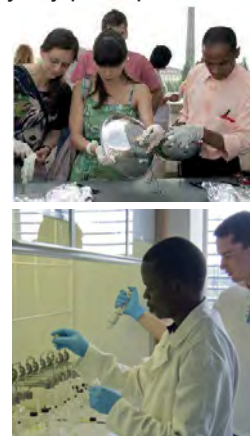
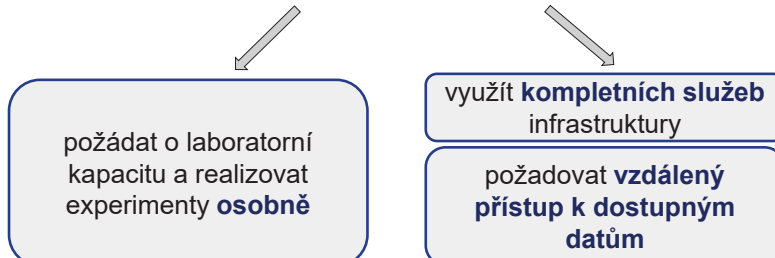
Výzkumná infrastruktura funguje na principu „open access“, v rámci kterého poskytuje své kapacity interním i externím uživatelům z akademické i průmyslové sféry.



„OPEN ACCESS“ strategie

- > politika otevřeného přístupu a aplikační proces
- > umožnit **externím i interním uživatelům** se zajímavými vědeckými projekty přístup k Výzkumné infrastruktuře RECETOX
- > **výzva otevřena stále** (do vyčerpání volných kapacit)
- > přijaté návrhy projektů **vyhodnocovány každé tři měsíce**

Žadatelé mohou

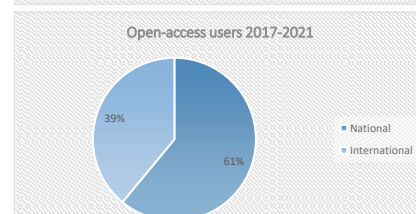
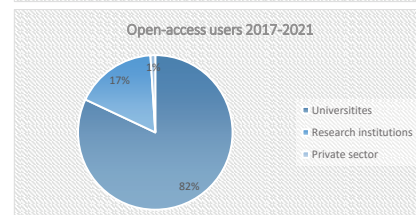
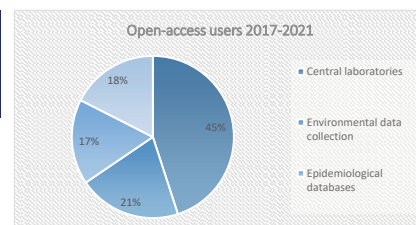


MUNI | RECETOX
Research infrastructure

RECETOX RI 2017-2021 využití kapacity

Open-access uživatelé

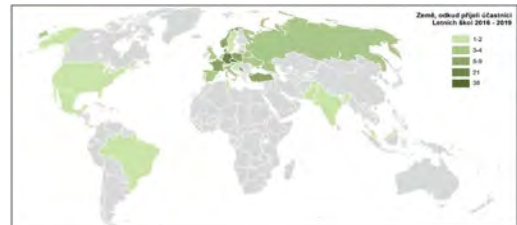
- > **Vědecké projekty:**
790 aplikací – 83 % pozitivně zhodnoceno – **658 realizovaných projektů**
fyzický (TNA) přístup - 218 x
virtuální přístup - 440 vědců
- > **Výuka** - specializované kurzy a cvičení, 547 studentů
- > **Akce a aktivity** – pro odbornou veřejnost, talentované studenty, laickou veřejnost (konference, semináře a letní školy)



it's unusual due to the epidemiological situation, in average, throughout the previous years the share of foreigners was 50-60 %

Letní škola

- nejvýznamnější akcí RECETOX RI
- každoročně od roku 2005
- **teoretické znalosti i praktické dovednosti** z oblasti odběru a laboratorní analýzy environmentálních i humánních vzorků, analýzy a interpretace dat i hodnocení dopadů a rizik
- bohatý **týdenní program** (přednášky, laboratorní, terénní cvičením případové studie)
- zaměření se každý rok mění
- pro vědce, univerzitní studenty, státní správu, kontrolní orgány, pracovníky analytických laboratoří i průmyslu
- **632 účastníků LŠ z 91 zemí**



MUNI | RECETOX
Research infrastructure

MUNI | RECETOX

Research infrastructure

Laboratoře mikrobiomové analýzy

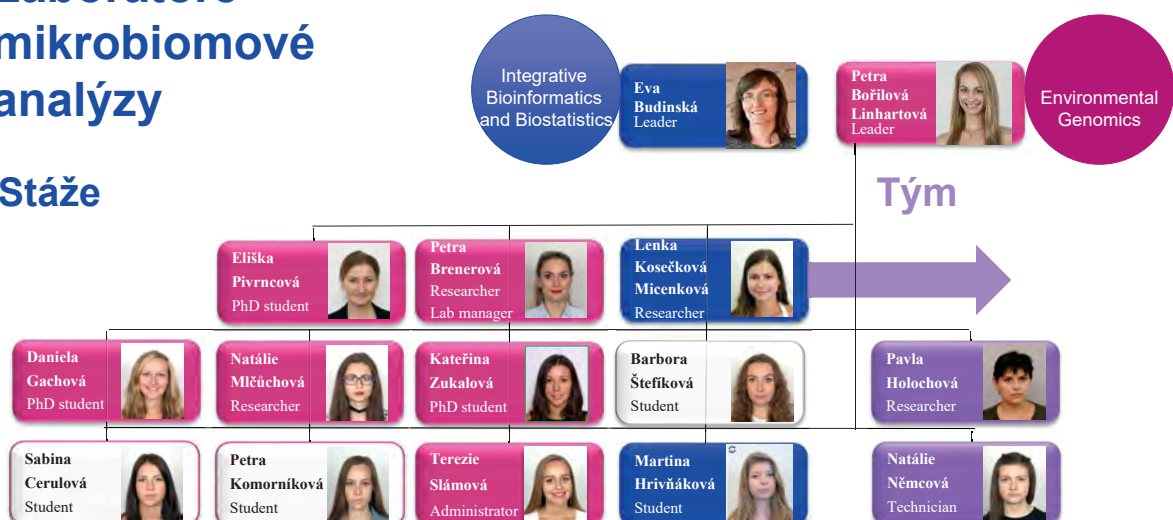
doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

petra.linhartova@recetox.muni.cz



Laboratoře mikrobiomové analýzy

Stáže



petra.linhartova@recetox.muni.cz

MUNI | RECETOX
Research infrastructure

Laboratoře mikrobiomové analýzy

Metody

High-throughput amplicon sequencing

VS

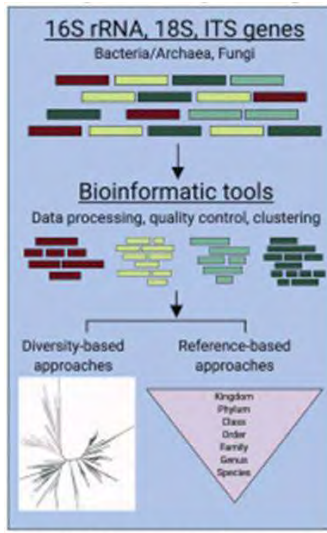
Shotgun metagenomic sequencing

Durazzi et al., 2021

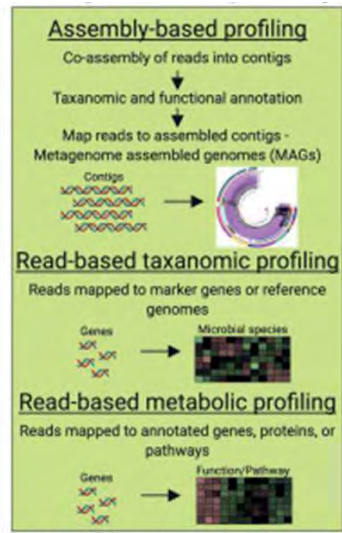
Multiplex PCR

Rapid Multiplex Real-Time PCR Method for the Detection and Quantification of Selected Cariogenic and Periodontal Bacteria

petra.linhartova@recetox.muni.cz



Output: Fingerprint of community membership & diversity



Output: microbial species & genetic functional pathways (active & inactive)

Pierre and Leone, 2020

MUNI | RECETOX

Research infrastructure

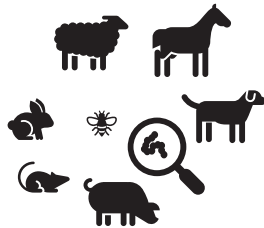
Laboratoře mikrobiomové analýzy

Analyzovaný materiál

sinice, bakterie, bráněnky,

stolice, cekotrofy

stěry: kožní



mekonium, stolice, mo, krev, zub, hnis, mléko

stěry: z nádorů, orální, vaginální, rektální, kožní, orofaryngeální, ušní



voda, prach, hnůj
permafrost (Antarktida)
koží mléko, ovčí sýr

petra.linhartova@recetox.muni.cz

MUNI | RECETOX

Research infrastructure

Laboratoře mikrobiomové analýzy

Výstupy

petra.linhartova@recetox.muni.cz

MUNI | RECETOX

Research infrastructure

Laboratoře mikrobiomové analýzy

Řešené projekty

GAČR – dr. Melymuk
*Propojení složení chemických látek
a mikrobiomu v domácím prachu
s environmentálními parametry*



petra.linhartova@recetox.muni.cz

Submitované projekty

HORIZON – prof. Klánová, doc. Bořilová Linhartová,
doc. Čupr,
dr. Budinská, dr. Price
*DISCERN
CONCRETE*



NPO Excells – doc. Bořilová Linhartová,
dr. Price
*Neurodegeneration with Cognitive
Impairment*



MUNI | RECETOX
Research
infrastructure

Děkuji za pozornost a těšíme se na spolupráci.
Dotazy ?

Výzkumná infrastruktura RECETOX Masarykova universita Brno

<https://www.recetox.muni.cz/sluzby/infrastruktura>

MUNI | RECETOX
Research
infrastructure

Detekce vybraných zoonotických agens v mléce a mléčných výrobcích z kozích a ovčích farem České republiky



MVDr. Jiřina Marková, Ph.D.

Oddělení mikrobiologie a antimikrobiální rezistence

14. 6. 2022

VÚVeL



VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VETERINÁRNÍHO
LÉKÁRSTVÍ, v. v. i.

Struktura přednášky

- » Výběr farem a charakter odebraných vzorků
- » Spektrum testovaných patogenů
- » Metodiky zpracování a extrakce genomové DNA
- » Metoda real-time qPCR
- » Kultivace na BHT-agaru
- » Multiplexní PCR
- » Závěrečné shrnutí

 **VÚVeL**

2

Výběr farem

» Chovy ovcí a koz ČR (n=12)

7 krajů – Jihočeský, Jihomoravský, Liberecký, Moravskoslezský, Olomoucký, Pardubický, Ústecký

chovy koz (n = 7)

chovy ovcí (n = 2)

smíšené chovy:

ovce a kozy – dojená plemena (n = 2)

kozy a masné plemeno ovcí (n = 1)

sérologický screening na původce paratuberkulózy a pseudotuberkulózy (ELISA od roku 2019)

výrobky pro vlastní spotřebu (n=3), prodej ze dvora (n=5), prodej ze dvora a do tržní sítě (n =4)

 **VÚVeL**

3

Charakter odebraných vzorků

» Celkem 80 vzorků

18 vzorků mléka

28 čerstvých sýrů

20 zrajících sýrů

14 jogurtů

Typ vzorku	Původ	Počet
Mléko		18
nepasterované	ovce	4
	koza	10
pasterované	ovce	2
	koza	2
Sýr		48
čerstvý		28
	ovce	11
	koza	17
zrající		20
	ovce	8
	koza	12
Jogurt		14
	ovce	8
	koza	6



4

Spektrum testovaných patogenů

» Metoda qPCR

Cp – *Corynebacterium pseudotuberculosis* (CLA)

MAP - *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (PTB)

SA – *Staphylococcus aureus*

LM – *Listeria monocytogenes*

» Multiplexní PCR

identifikace SA a MRSA

pyrogenní *S. aureus* exotoxiny A, B, C, D, E, G, H, I, J



5

Metodiky zpracování vzorků

» Tvorba peletu

Mléko (50 ml)

Centrifugace - 4100 x g po dobu 45 min při 4 °C

Sýry a jogurt (15 g)

Nastrouhání nebo rozdrobení sýra

Homogenizace v cheese diluentu (Botsaris et al., 2010)

Incubace při 37 °C po dobu 1 hod a homogenizace

Centrifugace – 4211 x g /15 minut při 15 °C

Zamražení peletu při -70°C



6

Extrakce genomové DNA

» **Quick-DNA Fecal/Soil Microbe MiniPrep Kit** (Zymo Research, USA)

750 µl pufru Bashing Bead Buffer

Keramické kuličky o průměru 0,1 a 0,5 mm

Mechanická homogenizace po dobu 1 min při 6400 x g (Magna Lyser, Roche)

Dle návodu od výrobce

Eluce DNA do 50 µl DNA Elution Buffer



7

Metoda real-time qPCR

detekce dvou specifických sekvencí vyskytujících se nezávisle na sobě v genomu
v každé reakci interní amplifikační kontrola (IAC) v konečné koncentraci 1×10^3

Duplexní qPCR

MAP – IS900, F57 (Slana et al., 2008)

Triplexní qPCR

Cp – PLD, PIP

SA - SA442, *nuc*

Listeria sp. a LM - 23S rRNA a *hlyIII* (Moravkova et al., 2017)

Technický duplikát (20 µL)

LightCycler 480 instrument (Roche)



8

Metoda real-time qPCR

Kvantifikace bakteriálních buněk

softwar LightCycler 480 (verze 1.5.1.62) podle kalibrační křivky s použitím "Fit Point Analysis "

Kalibrační křivka odvozena z kvantifikačního plazmidového standardu s plazmidovým konstruktem

Připraven **standardní gradient** 1×10^5 - 1×10^0 kopií/µL desetinásobným sériovým ředěním

Množství bakteriálních buněk přepočítáno na 1 g nebo 1 ml vzorku



9

Výsledky qPCR

Typ vzorku	Původ	No.	Cp		MAP		SA	
			Pos.	Kopie/1mL nebo 1g	Pos.	Kopie/1mL nebo 1g	Pos.	Kopie/1mL nebo 1g
Mléko		18	1		2		8	
nepasterované	ovce	4	1	10 ⁰	-		-	
	koza	10	-		-		6	10 ⁰ – 10 ⁴
pasterované	ovce	2	-		1		1	
	koza	2	-		1	10 ⁰	1	10 ⁰
Sýr		48	6		8		29	
čerstvý		28	4		6		15	
	ovce	11	3	10 ⁰ - 10 ¹	2	10 ¹ -10 ²	5	10 ⁰
	koza	17	1	10 ¹	4	10 ¹ -10 ³	10	10 ¹ – 10 ⁵
zrající		20	2		2		14	
	ovce	8	-		1	10 ¹	3	10 ⁰ , 10 ² , 10 ³
	koza	12	2	10 ¹	1	10 ²	11	10 ⁰ -10 ⁴
Jogurt		14	-		1		2	
	ovce	8	-		1	10 ¹	-	
	koza	6	-		-		2	10 ⁰ , 10 ¹
Celkem		80	7	10⁰-10¹	11	10⁰-10³	39	10⁰-10⁵

Kultivace na BHT-agaru

- » Vzorky mléka a sýrů qPCR pozitivní na Cp
- » brain-heart infusion (BHI) obohacený o K₂TeO₃ a Tween 80 (Hahne et al., 2018)
- » Kultivace při 37 °C v CO₂ inkubátoru po dobu 72 hod
- » Tvorba lyzátů ze směsných kultur – qPCR

Cp qPCR pozitivní lyzáty
Kozí čerstvý a zrající sýr
Ovčí nepasterované mléko a čerstvý sýr

Metoda real-time qPCR - výsledky

- » **MAP pozitivní mléko a ml. výrobky**
MAP séropozitivní farma ovcí a koz
prodej ze dvora a do tržní sítě
kvantifikace v 1g/1mL řádově 10⁰ – 10³
- » **Cp pozitivní mléko a ml. výrobky**
Cp séropozitivní farma ovcí a koz
prodej ze dvora a do tržní sítě
kvantifikace v 1g/1mL řádově 10⁰ – 10¹
pozitivní Cp qPCR lyzátů po kultivaci výrobků
- » **SA pozitivní mléko a ml. výrobky**
v 9 ze 12 testovaných farem - pozitivní mléko i výrobky/1 farmu
kvantifikace v 1g/1mL řádově 10⁰ – 10⁵
typ farmy a velikost produkce nerozhodující

Multiplexní PCR

Identifikace SA a MRSA

primery:

SA442-1/SA442-2 (Martineau et al., 1998)

mecA P4/mecA P7 (Oliveira and de Lencastre, 2002)

InKo1/InKo2 (Martineau et al., 1996) - 16S rRNA gen, univerzální bakteriální amplifikace

SA enterotoxiny – dvě samostatné reakce

pyrogenní exotoxinové geny: (Monday and Bohach, 1999; Lovseth et al., 2004)

1. *sed, see, seg, sei* - D, E, G, I
2. *sea, seb-sec, sec, seh, sej* - A, B, C, H, J

Elektroforéza na 2% agarovém gelu (1x SB pufr, Ethidium bromide), 120V
50 bp DNA ladder (New England BioLabs)

Multiplexní PCR - výsledky

Typ vzorku	Původ	No.	SA	MRSA	Exotoxiny	
			Pos.	Pos.	Pos.	Toxin
Mléko		18	4	-	-	
nepasterované	ovce	4	nt	nt	nt	
	koza	10	4	-	-	
pasterované	ovce	2	-	-	-	
	koza	2	-	-	-	
Sýr		48	21	11	2	
čerstvý		28	13	6	2	
	ovce	11	5	-	-	
	koza	17	8	6	2	C,G,I
zrající		20	8	5	-	
	ovce	8	3	3	-	
	koza	12	5	2	-	
Jogurt		14	2	-	-	
	ovce	8	nt	nt	nt	
	koza	6	2	-	-	
Celkem		80	27	11	2	C,G,I

nt - netestováno

Multiplexní PCR - výsledky

» Menší záchyt pozitivitu v porovnání s SA qPCR

» **SA enterotoxiny**

dvě různé farmy

kozí čerstvý sýr

1. G,I

2. C

výrobky pouze pro vlastní spotřebu

qPCR kvantifikace SA – řádově 10^5 v 1g sýru

Závěrečné shrnutí

- » testováno **celkem 80 vzorků** (mléko, sýr, jogurt) ze 12 farem ovcí a koz v ČR
- » qPCR, multiplexní PCR, kultivace
- » **nejčastěji** detekovaná DNA bakterie – ***S. aureus*** ($10^0 - 10^5$ /1g nebo 1mL)
- » průkaz **DNA MAP a Cp** na dvou různých séropozitivních farmách ovcí a koz
- » pozitivní výsledky kultivace a qPCR lyzátů Cp pozit. výrobků = **životaschopnost *C. pseudotuberculosis***
- » **MRSA** pozitivní výrobky (n = 11) z pěti různých farem
- » ***S. aureus* enterotoxiny** – C, G, I (kozí čerstvé sýry)



Studie byla realizována v rámci projektu Ministerstva zemědělství (QK1910082) a MZE-RO0518

Děkuji za pozornost



Problematika detekce vybraných patogenů v různých typech odpadních vod v ČR

Petra Mořková, David Kurfiřt, Nikola Roulová, Iveta Brožková, Marcela Pejchalová
Univerzita Pardubice



Česká technologická platforma pro zemědělství ve spolupráci s Výzkumným ústavem živočišné výroby, v. v. i., Českou zemědělskou univerzitou Praha, Mendelovou univerzitou Brno a Výzkumným ústavem veterinárního lékařství, v. v. i. si Vás dovoluje pozvat na seminář

MOLEKULÁRNÍ DETEKCE PATOGENŮ V POTRAVINÁCH
A VE VODĚ



Voda



Odpadní vody

- nedostatek vody → rozšíření opětovného použití odpadních vod
 - sprejové zavlažování
 - průmysl
 - doplňování hladin povrchových a podzemních vod
- **komplexní matrice**
- **čistící proces odpadních vod** (není primárně zaměřen na snížení nebo odstranění patogenních mikroorganismů)
- ? kvalita pro opětovné použití

Mikrobiologie vod

INDIKÁTORY FEKÁLNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ

- *Escherichia coli*
- termotolerantní koliformní bakterie
- intestinální enterokoky
- *Clostridium perfringens*

INDIKÁTORY OBECNÉHO ZNEČIŠTĚNÍ

- *Bacillus* sp.
- *Pseudomonas* sp.
- *Micrococcus* sp.
- některé druhy enterobakterií a vibrií

PATOGENNÍ A PODMÍNĚNĚ PATOGENNÍ MIKROORGANISMY

- rod *Aeromonas*
- rod *Campylobacter*
- patogenní *Escherichia coli*
- rod *Legionella*
- rod *Pseudomonas*
- rod *Salmonella*
- rod *Shigella*
- rod *Staphylococcus*
- rod *Yersinia*
- rod *Vibrio*

upraveno dle:

STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS, *The microbiology of drinking water: part 1 - methods for the examination of waters and associated materials*, in this series, Environment Agency, 2002 [online], [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <https://www.gov.uk/government/>

BAUDIŠOVÁ, D. *Současné metody mikrobiologického rozboru vody: příručka pro hydroanalytické laboratoře*. Vyd. 1. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, 2007, 100 s. ISBN 978-80-85900-72-9.

BAUDIŠOVÁ, D., a BENÁKOVÁ, A. Detekce patogenních bakterií v odpadních vodách, *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. 2011, roč. 53, s. 1 – 20.

Dostupné z: https://www.vtei.cz/wp-content/uploads/2015/08/vtei_2011_5.pdf

4/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022



Cesta přenosu dle WHO

KONTAKT S KŮŽÍ

(koupání mytí)

Přenos přes:

Kůži, sliznici, poranění, oči

- rod *Aeromonas*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Burkholderia pseudomallei*
- zástupci rodu *Mycobacterium*

POŽITÍ

(pití, konzumace)

Přenos přes:

Gastrointestinální trakt

- rod *Campylobacter*
- *Escherichia coli*
- rod *Salmonella*
- rod *Shigella*
- rod *Yersinia*
- *Vibrio cholerae*

VDECHNUTÍ NEBO INHALACE

(aerosol)

Přenos přes:

Dýchací trakt

- rod *Legionella*
- zástupci rodu *Mycobacterium*

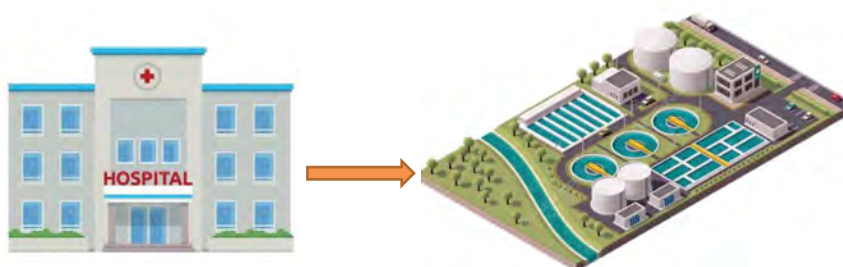
upraveno dle: WHO – World Health Organization, 2011. *Guidelines for drinking-water quality*, 4th ed. Geneva. ISBN 9789241548151.



5/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Odpadní vody

- vzorky městských odpadních vod
- odpadní vody ze zdravotnických zařízení (ZZ)
 - vždy vzorek z nátoky a odtoku ČOV



6/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Zdravotnická zařízení a odpadní vody

- ZZ → chemické látky pro dg., léčebné, dezinfekční či výzkumné účely
- **vody ze ZZ** (tři druhy rizik)
 - **toxické** – zbytky léčiv a jejich metabolity, hormony, anestetika, antibiotika
 - **infekční** – patogenní a potenciálně patogenní MO, MO rezistentní na ATB
 - **radioaktivní** – zbytky kontrastních látek při rtg.
- velká část prochází ČOV přímo do vodního zdroje



7/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Právní rámec, legislativa ČR

- **ČSN 75 6406** – Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu
 - **ZZ I kategorie:** určená k izolaci a léčbě přenosných onemocnění a k manipulaci nebo zpracovávání infekčního materiálu
 - mají nařízeno čistit a dezinfikovat OV
 - **ZZ II kategorie:** nejsou určená k izolaci a léčbě přenosných onemocnění.
 - mohou být vypouštěny bez čištění do veřejné stokové sítě
- neřeší současná rizika, terminologie a předpisy neodpovídající současnému stavu

8/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Právní rámec, legislativa ČR

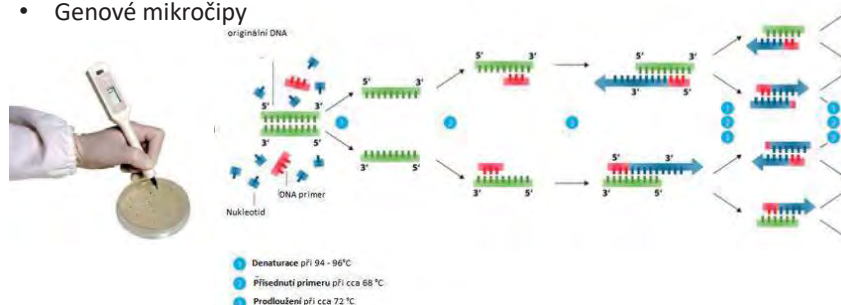
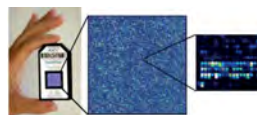
- **ČSN 75 6406** (únor 2020) – Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu
 - posouzení rizik → určení oddělení, v nichž vzniká OV s obsahem rizikové koncentrace znečištění, která musí být dekontaminována



9/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Konvenční metody pro sledování kvality vody

- Mikrobiologická kultivace a počítání kolonií
- Hmotnostní spektrometrie
- MALDI-TOF/MS
- Polymerázová řetězová reakce
- Genové mikročipy



10/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Průkaz / stanovení bakterií

- kultivační metody „zlatý standard“
 - ☺ nízké náklady
 - ☺ jednoduchost
 - ☹ časová náročnost
 - ☹ pomalu rostoucí, stresované bakterie, životaschopné, ale nekultivovatelné buňky, biofilm
 - ☹ typické/atypické kolonie
 - ☹ kultivační média



11/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Zpracování vzorků odpadních vod KULTIVAČNÍ METODY



- říjen 2017 – duben 2018 (10 bodových vzorků)
- **ČSN EN ISO 19458** Jakost vod - Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu
- **ČSN EN ISO 5667-1** Jakost vod - Odběr vzorků - Část 1: Návod pro návrh programu odběru vzorků a pro způsoby odběru vzorků
- **ČSN ISO 5667-10** Kvalita vod - Odběr vzorků - Část 10: Návod pro odběr vzorků odpadních vod
- **ČSN EN ISO 8199** Kvalita vod - Obecné požadavky a návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami



12/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Zpracování vzorků odpadních vod

KULTIVAČNÍ METODY

• patogenní a podmíněně patogenní bakterie

- *Salmonella* (ČSN ISO 19250 Jakost vod - Průkaz přítomnosti bakterií rodu *Salmonella*)
- *Yersinia* (ČSN EN ISO 10273 Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda průkazu patogenních *Yersinia enterocolitica*)
- *Campylobacter* (ČSN ISO 17995 Kvalita vod - Stanovení termotolerantních bakterií rodu *Campylobacter*)
- *Pseudomonas* (ČSN EN ISO 16266 Jakost vod - Stanovení *Pseudomonas aeruginosa* - Metoda membránových filtrů; ČSN EN ISO 16266-2 Kvalita vod - Stanovení *Pseudomonas aeruginosa* - Část 2: Metoda nejpravděpodobnějšího počtu)
- *Aeromonas* (m-*Aeromonas* agar)

13/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Zpracování vzorků odpadních vod

KULTIVAČNÍ METODY

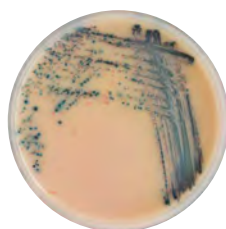
• indikátorové mikroorganismy fekálního znečištění

- *Escherichia coli* a termotolerantní koliformní bakterie (ČSN 75 7835 Jakost vod - Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*; ČSN EN ISO 9308-2 Kvalita vod - Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií - Část 2: Metoda nejpravděpodobnějšího počtu; ČSN EN ISO 9308-3 Jakost vod - Stanovení *Escherichia coli* v povrchových a odpadních vodách - Část 3: Miniaturizovaná metoda stanovení v tekutém médiu (stanovení MPN)
- intestinální enterokoky (ČSN EN ISO 7899-1 Jakost vod - Stanovení intestinálních enterokoků v povrchových a odpadních vodách - Část 1: Miniaturizovaná metoda stanovení v tekutém médiu (stanovení MPN); ČSN EN ISO 7899-2 Jakost vod - Stanovení intestinálních enterokoků - Část 2: Metoda membránových filtrů)

14/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Výsledky: Průkaz bakterií rodu *Salmonella*

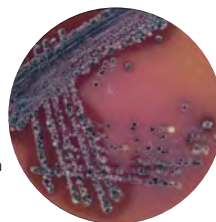
- ☺ MKTTn
- ☺ Rambach® agar



inokulum vyočkované z RVS média

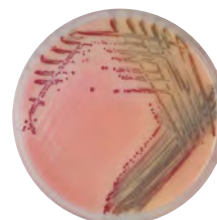
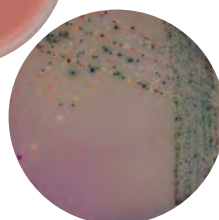


inokulum vyočkované z MKTTn



☹ XLD

Citrobacter amalonaticus
Citrobacter braaki
Citrobacter youngae
Citrobacter freundii



11 získaných izolátů:
Salmonella enterica sérovar *Enteritidis*

15/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

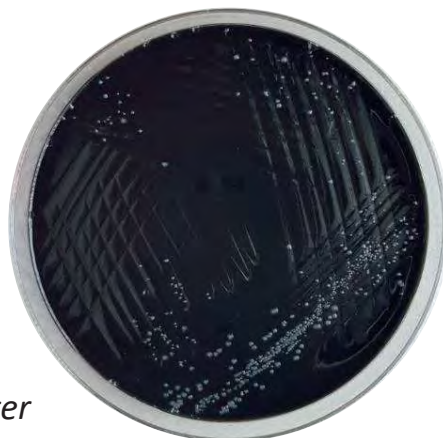
Výsledky: Průkaz bakterií rodu *Yersinia*

- 7 získaných izolátů (CIN agaru): *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica*
- m-Aeromonas agar (nátok do ČOV Račín): *Yersinia intermedia*
- Chromocult® Coliform agar (odtok z ČOV Pardubice): *Yersinia rohdei*
- Rambach® agar (nátok do ČOV Kolín): *Yersinia frederiksenii*

16/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Výsledky: Průkaz bakterií rodu *Campylobacter*

- mCCDA

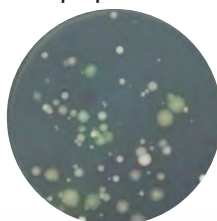


- ? *Arcobacter*

17/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Průkaz bakterií rodu *Pseudomonas*

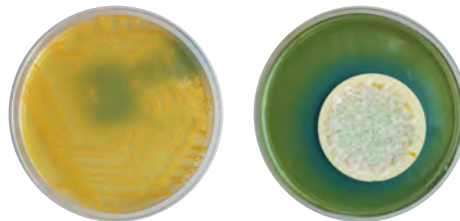
- prokázány pouze v nátoku do ČOV
- cetrimidový agar:
 - 21 izolátů, z nichž 15 bylo identifikováno jako bakterie rodu *Pseudomonas*
 - převládajícím druhem byla *Pseudomonas aeruginosa* (14 izolátů), v jednom případě *Pseudomonas putida*



18/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Průkaz bakterií rodu *Aeromonas*

- pozitivní průkaz ve všech vyšetřovaných vzorcích
- m-*Aeromonas* agar
- *Aeromonas caviae* (cetrimidový agar, CIN agaru)
- *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas ichthiosmia*
- bakterie rodu *Klebsiella* a *Raoutella*

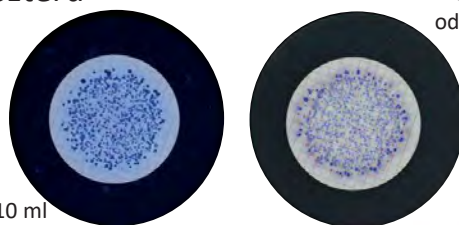


19/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli*

- m-FC agar (ČSN 75 7835)
- chromogenní médium Chromocult® Coliform agar (ČSN EN ISO 9308-1)
- membránová filtrace
- metoda roztěru

Chromocult® Coliform agar
membránová filtrace 10 ml
odtok z ČOV Nový Bydžov



m-FC agar
membránová filtrace 10 ml
odtok z ČOV Nový Bydžov

20/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Výsledky: Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli*

- *E. coli* ve všech vyšetřovaných vzorcích, kromě odtoku z ČOV Račín
- termotolerantní koliformní bakterie v 8 vzorcích, kromě odtoku z ČOV Račín a ČOV Poděbrady
- z m-FC agaru získáno 25 izolátů:
 - 19 izolátů *E. coli*
 - *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia odorifera*, *Raoutella ornithinolytica* a *Kluyvera ascorbata*
- atypické červeně zbarvené kolonie, celkem 8 izolátů
 - 4 izoláty *E. coli*
 - *Raoutella ornithinolytica*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* a *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*

21/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

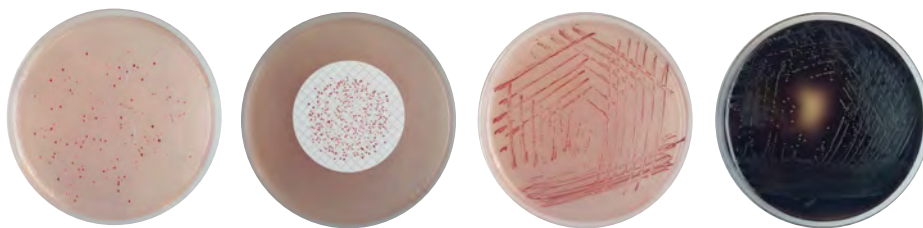
Výsledky: Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli*

- Chromocult® Coliform agar, 16 izolátů
 - 15 izolátů *E. coli*
 - *Yersinia rohdei*
- Z termotolerantních koliformních bakterií, které vyrůstaly v růžových koloniích, byl nejčastěji izolován *Citrobacter freundii*. Dále byly zjištěny *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* a *Enterobacter aerogenes*.

22/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Výsledky: Stanovení intestinálních enterokoků

- pozitivní průkaz v 7 vyšetřovaných vzorcích
- 24 izolátů:
 - 18 rod *Enterococcus*: 15 izolátů *Enterococcus faecalis*, 3 izoláty *Enterococcus casseliflavus*
 - 6 rod *Streptococcus*: *Streptococcus uberis*



23/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

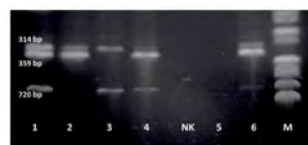
Závěr

- samotné kultivační metody nejsou dostačující pro průkaz bakterií z odpadních vod
 - vhodná metoda (normy x zkušenosti z praxe)
 - doprovodná mikroflóra
 - atypické kolonie
 - životaschopné, ale nekultivovatelné
 - biofilm
- kombinace více metod současně s kultivací

24/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Multiplexní PCR

- **Salmonella** spp. → sady primerů **IpaB** (gen pro invazivní plazmidový antigen B)
 - produkt o velikosti **314 bp**
- **Yersinia enterocolitica** → sady primerů **Ail** (Ail protein – protein vnější membrány)
 - produkt o velikosti **359 bp**
 - druhově specifický primer (pouze u patogenních kmenů)
- **Aeromonas** spp. → sady primerů **Aero** (gen produkce aerolysinu)
 - produkt o velikosti **720 bp**
 - virulenční faktor, charakteristický pro patogenní druhy rodu *Aeromonas*



25/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Zvolené bakteriální kmeny

- studie Kong *et al.* (2002) a Sjöling *et al.* (2015)
 - sada primerů od Generi Biotech s.r.o.

PRIMER	SEKVENCE (5' → 3')	MIKROORGANISMUS	pb	Zdroj
IpaB-F IpaB-R	GGACTTTTTAAAGCGGCGG GCCTCTCCAGAGCCGTCTGG	<i>Salmonella</i> spp.	314	Kong <i>et al.</i> (2002)
Ail-F Ail-R	CTATTGGTTATGCGCAAAGC TGGAAAGTGGGTTGAATTGC	<i>Yersinia enterocolitica</i>	359	Kong <i>et al.</i> (2002)
Aero-F Aero-R	TGTCGGSGATGACATGGAYGTG CCAGTCCAGTCCCACCACTTCA	<i>Aeromonas</i> spp.	720	Kong <i>et al.</i> (2002)

KONG, R., S. LEE, T. LAW, S. LAW and R. WU, 2002. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Research* [online]. 36(11), 2802-2812 [cit. 2021-04-26]. ISSN 00431354.

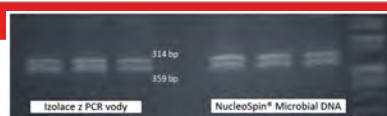
Dostupné z: doi:10.1016/S0043-1354(01)00503-6

SJÖLING, Å., L. SADEGHIPORJAHROMI, D. NOVAK and J. TOBIAS, 2015. Detection of major diarrheagenic bacterial pathogens by multiplex PCR panels. *Microbiological Research* [online]. 172, 34-40 [cit. 2021-04-26]. ISSN 09445013.

Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2014.12.003

26/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Izolace bakteriální DNA

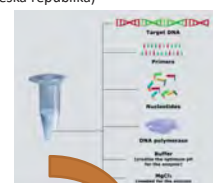


Salmonella Enteritidis CCM 4420 (amplifikace genu *IpaB*, 314 pb)
Yersinia enterocolitica CCM 5671 (amplifikace genu *Ail*, 359 pb)

- izolace DNA z PCR vody a TSB bujónu
- izolace za pomoci komerčně dostupných kitů
 - NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey-Nagel, Biotech a.s., Česká republika)
 - DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen, Elisabeth Pharmacon, spol. s r.o., Česká republika)

PCR

- Složení PCR reakční směsi
 - MasterMix EmeraldAmp® GT PCR
 - sada primerů (*IpaB*, *Ail*, *Aero*)
 - bakteriální DNA
- Optimalizovaná koncentrace sady primerů
 - *Salmonella* spp. → *IpaB* = 0,4 μM
 - *Yersinia enterocolitica* → *Ail* = 2 μM
 - *Aeromonas* spp. → *Aero* = 1 μM
 - po optimalizaci: specifita primerů – 21 sbírkových kultur



27/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

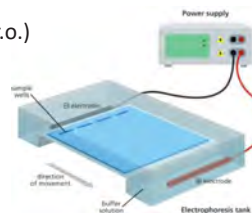
PCR a elektroforetická separace

- Teplotní profil PCR

KROK	TEPLOTA [°C]	ČAS [s]	POČET CYKLŮ
Úvodní denaturace	95	120	
Denaturace	95	15	35
Přisedání primerů	53	8	
Extenze	72	10	
Závěrečná extenze	72	300	

- Elektroforetická separace

- 2% agarózový gel
- 1x TBE pufru s obsahem ethidium bromidu (0,5 µg/ml)
- podmínky: 100 V, 500 mA, 50 min
- DNA marker o velikosti 155 – 970 pb (Top-Bio s.r.o.)
- vizualizace pomocí UV-transluminátoru

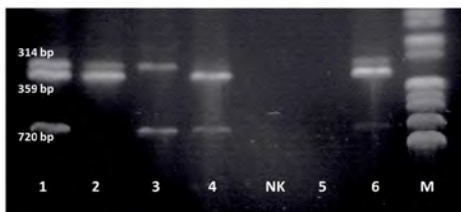
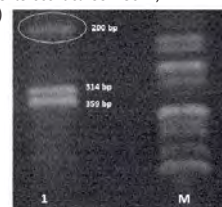


28/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Výsledky

1 - *S. Enteritidis* CCM 4420, *Y. enterocolitica* CCM 5671;
M – DNA marker (155-970 pb)

- sady primerů *lpaB* - 314 pb
- nespecifický produkt v oblasti 200 pb
 - typický pro lidský chromozom 22
- sady primerů *Ail* - 359 pb
- sady primerů *Aero* - 720 pb



1 - *S. Enteritidis* CCM 4420, *Y. enterocolitica* CCM 5671, *A. hydrophila* CCM 4528;
2 - *S. Enteritidis* CCM 4420, *Y. enterocolitica* CCM 5671;
3 - *S. Enteritidis* CCM 4420, *A. hydrophila* CCM 4528;
4 - *Y. enterocolitica* CCM 5671, *A. hydrophila* CCM 4528;
NK – negativní kontrola; 5 - *A. sobria* CCM 7774;
6 - *S. Enteritidis* CCM 4420, *Y. enterocolitica* CCM 5671, *A. hydrophila* CCM 4528;
M – DNA marker (155-970 pb)

29/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

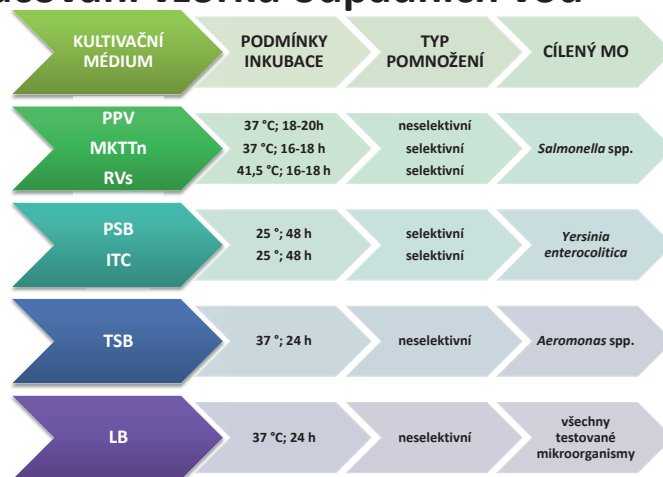
Zpracování vzorků odpadních vod – zrychlený průkaz

- **ČSN EN ISO 19458** Jakost vod - Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu
- **ČSN ISO 5667-10** Kvalita vod - Odběr vzorků - Část 10: Návod pro odběr vzorků odpadních vod
- **Zpracování vzorků**
 - vzorek bez zakoncentrování (10 ml vzorku + 90 ml kultivačního média)
 - zakoncentrování a následné purifikace
 - (50 ml vzorku → centrifugace → promytí fyziologickým roztokem → centrifugace → kultivace v prostředí kultivačního média)
 - membránová filtrace
 - **ČSN EN ISO 8199** Kvalita vod - Obecné požadavky a návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami
- vybrány 4 reprezentativní vzorky vod
 - ČOV 9, 10 – městské ČOV
 - ČOV N14 – nemocniční odpadní voda – infekční oddělení a centrální laboratoře nemocnice
 - ČOV N15 – nemocniční odpadní voda – ostatní oddělení nemocnice a technické provozy



30/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Zpracování vzorků odpadních vod

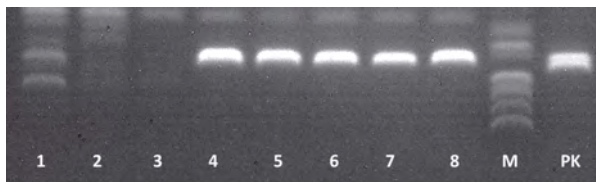


PPV – Pufrovaná peptonová voda; MKTn – Médium dle Muller-Kauffmann s tetrathionátem a novobiocinem; RVs – Rappaport Vassiliadis sója médium; PSB – Bujón s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi; ITC – Bujón s irgasanem, tikarcilímem a chlorečnanem draselným; TSB – Trypton-sójový bujón; LB – Luria-Bertani

31/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Průkaz bakterií rodu *Salmonella*

- Vzorky odpadních vod
 - ve všech vzorcích byla detekována přítomnost bakterií rodu *Salmonella*
 - kultivační metody → suspektní kolonie → mPCR
 - konfirmace biochemickými testy
 - nutno zařadit sérotypizaci a molekulární diverzitu



Amplifikace genu *ipaB* (314 pb) ze vzorku ČOV 9 a ČOV 10.
1, 2, 3 – nepřítomnost genu *ipaB*,
4 → 8 – průkaz genu *ipaB*;
M – DNA marker (155-970 pb); PK – pozitivní kontrola (*Salmonella* Enteritidis CCM 4420)

32/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Průkaz bakterií *Yersinia enterocolitica*

- Vzorky odpadních vod
 - ČOV 9 a 10 → 13 kolonií z kultivačních technik → 10 kolonií mPCR určeno jako patogenní *Y. enterocolitica*
 - biochemické testy určily všech 13 kolonií jako *Y. enterocolitica*
 - ČOV N14 a N15 → přítomnost pouze v nes. pom. médiu (PPV, TSB a LB)
 - selektivní pomnožovací médium (ICT a PSB) → inhibitory PCR
 - kultivační techniky → 20 suspektních kolonií → podrobeny biochemickým testům a mPCR
 - 13 kolonií určeno jako patogenní *Y. enterocolitica*
 - nutné zařadit sérotypizaci

33/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Průkaz bakterií rodu *Aeromonas*

- **Vzorky odpadních vod**
 - **ČOV 9 a 10** → přítomnost bakterií rodu *Aeromonas* pomocí mPCR
 - kultivační techniky → 6 suspektních kolonií → podrobena mPCR a biochemické confirmaci
 - pouze 1 kolonie určena jako bakterie *Aeromonas hydrophila* produkující aerolysin
 - zbývající kolonie → *A. sobria*, *Burkholderia cepacia* komplex
 - **ČOV N14 a N15** → přítomnost bakterií rodu *Aeromonas* pomocí mPCR
 - kultivační techniky → 8 suspektních kolonií → podrobena mPCR a biochemické confirmaci
 - pouze 1 kolonie určena jako bakterie *Aeromonas hydrophila* produkující aerolysin
 - zbývající kolonie → *A. sobria*, *A. caviae*, *Burkholderia cepacia* komplex

34/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Výsledky a závěr

- **multiplexní PCR** *Salmonella* spp., patogenní kmeny *Yersinia enterocolitica*, patogenní druhy rodu *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*)
- testovány rozdílné způsoby úpravy vzorků a jejich kultivace (selektivní a neselektivní kultivační média)
 - vliv purifikačních kroků na průběh PCR → pozorován vliv inhibice PCR způsobený složením média
- **testované patogenní bakterie prokázány ve všech vzorcích odpadních vod**
 - kultivační metoda
 - vzorek po neselektivním pomnožení → zkrácení doby analýzy

35/36 Molekulární detekce patogenů v potravinách a ve vodě, 14. 6. 2022

Poděkování

Mgr. David Kurfiřt
 Ing. Nikola Roulová
 Ing. Iveta Brožková, Ph.D.
 doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy jako účelová podpora na specifický vysokoškolský výzkum (SGFChT 005/2021; SGFChT 005/2022).

DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST



Antimikrobiální rezistence ve vodním prostředí

Mgr. Iva Sukkar, Ph.D.

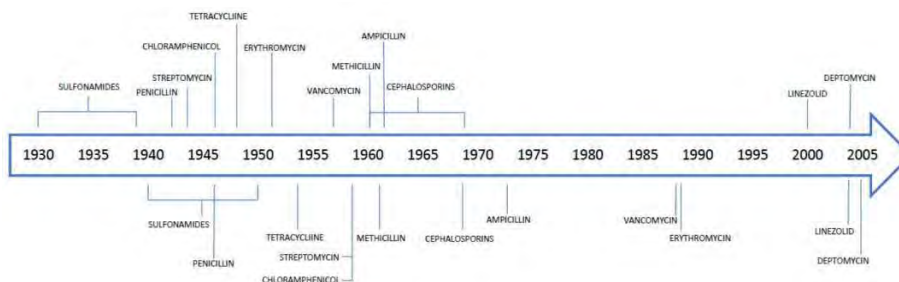
Středoevropský technologický institut (CEITEC)
Veterinární univerzita Brno (VETUNI)



Antimikrobiální rezistence (AMR)

Časová osa zavedení antimikrobiálních látek do klinické praxe a detekce rezistence k nim

Uvedení antimikrobiálních látek



Detekce rezistence

Zdroj: Pazda et al., Science of the Total Environment 697 (2019) 134023

Antimikrobiální rezistence EU/EHP

- ročně 670 000 bakteriálních infekcí s AMR
- z toho 33 000 pacientů umírá v přímém důsledku těchto infekcí
- ekonomická zátěž: až 1,1 miliard eur/rok
- vynaložení 1,5 eur/osoba/rok by zamezilo 27 000 úmrtí



Note: Burden measured in disability-adjusted life years (DALYs) per 100 000 population, EU/EEA

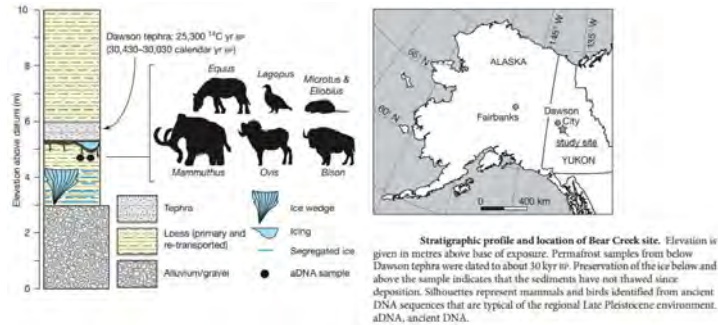
* AMR infections include: third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* and *K. pneumoniae*; aminoglycoside- and fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter* spp.; three or more antimicrobial groups-resistant *P. aeruginosa*; carbapenem- and/or colistin-resistant *E. coli*; *K. pneumoniae*; Acinetobacter spp. and *P. aeruginosa*; methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA); vancomycin-resistant *E. faecalis* and *E. faecium*; penicillin-resistant, and combined penicillin and macrolide-resistant *S. pneumoniae*.

† Acute bacterial enteritis include: campylobacteriosis, salmonellosis and shigellosis

Zdroj: Antimicrobial Resistance Tackling the Burden in the European Union; OECD 2019

Původ AMR

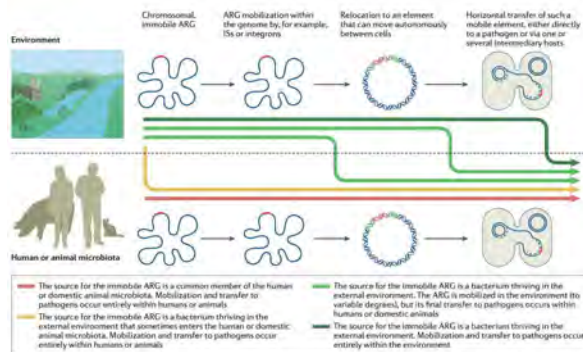
- > 4 miliony let: multirezistentní bakterie detekovány v Lechuguilla jeskyních v Novém Mexiku, rezistence až k 14 různým komerčně dostupným antibiotikům např. beta-laktamy, aminoglykosidy a makrolidy
- > 30 000 let: rezistentní bakterie v permafrostu, geny rezistence k beta-laktamům, tetracyklinům a glykopeptidům



Zdroj: Bhullar et al. PLoS One. 2012;7(4):e34953; D'Costa Vet et al., Nature. 2011 Aug 31;477(7365):457-61

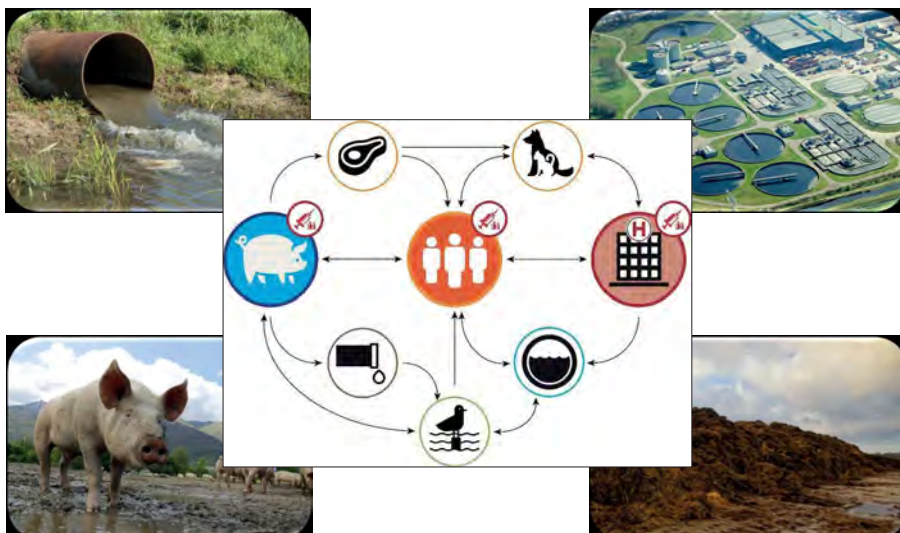
Původ AMR

- bakterie vodního prostředí např. *Shewanella algae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* a *Photobacterium profundum* jsou považovány za možné zdroje *qnr* genů pro patogenní bakterie
- horizontální přenos genů AMR (mobilní genetické elementy)



Zdroj: Larsson and Flach, Nature Reviews Microbiology volume 20, pages 257–269 (2022)

AMR a koncept Jednoho zdraví

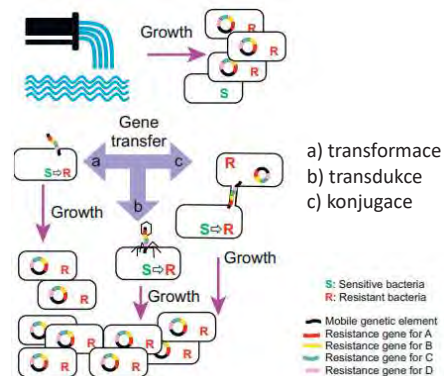


Zdroj: Dolejska, 2020. Antibiotic-Resistant Bacteria in Wildlife. The Handbook of Environmental Chemistry. Online

Odpadní vody a AMR



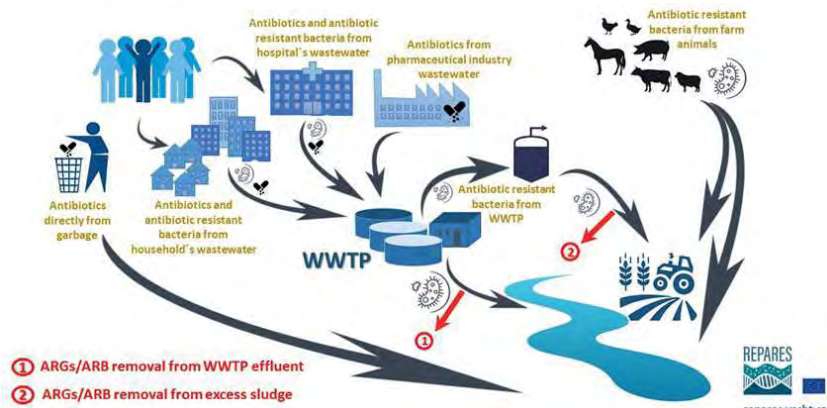
Selekce a přenos antibiotické rezistence v odpadních vodách



Zdroj: <https://www.unep.org/news-and-stories/story/untreated-wastewater-growing-danger>; <https://www.ecomena.org/wp-content/uploads/2014/08/water-pollution.jpg>; Karkman et al., Trends in Microbiology, March 2018, Vol. 26, No. 3

Čistírny odpadních vod

Osud antimikrobiálních látek a bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám v čistírnách odpadních vod a životním prostředí



Zdroj: [https://repares.vscht.cz/antibiotic-resistance/wastewater-treatment-a-major-barrier-against-ar-spread?cookie\[only_desktop\]=1#](https://repares.vscht.cz/antibiotic-resistance/wastewater-treatment-a-major-barrier-against-ar-spread?cookie[only_desktop]=1#)

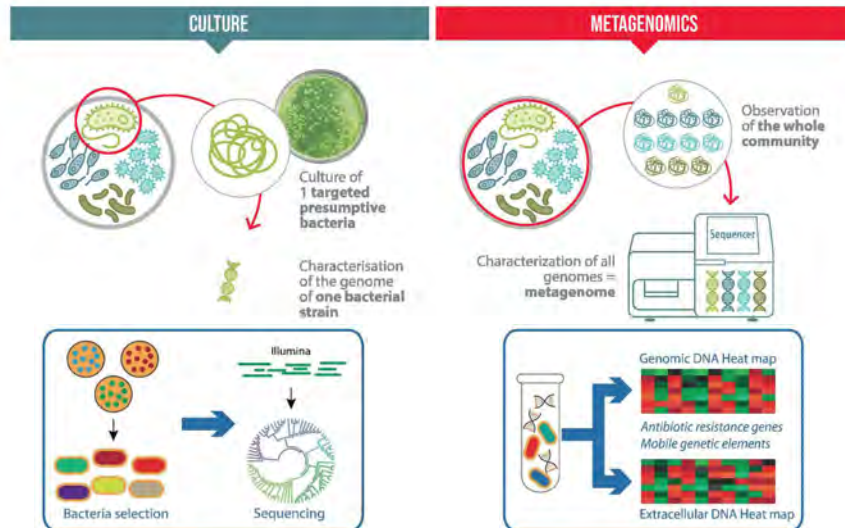
Akvakultury

- zvýšení produkce z 21,8 milionů tun (1960) na 156,4 milionů tun (2018)
- 69 % produkce Asie
- terapeutické a profylaktické využití antimikrobiálních látek (aminoglykosidy, makrolidy, peniciliny, chinolony, sulfonamidy, a tetracykliny) a dezinfekčních látek
- vysoká koncentrace biomasy → infekční nemoci



Zdroj: <https://www.qb-labs.com/blog/2020/5/4/the-current-state-of-antibiotics-in-aquaculture/>; © Sodel Vladyslav, Shutterstock; <https://www.doctorshrimp.com/2021/06/09/aquaculture-in-brazil-the-1-billion-industry/>

Detekce AMR ve vodním prostředí



Zdroj: <https://lallemandanimalnutrition.com/fr/europe/feed-update/communautes-microbiennes/>

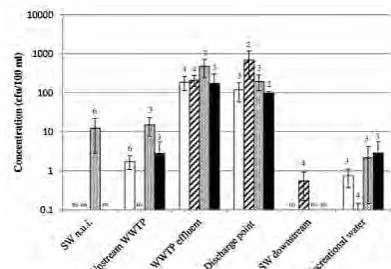
Povrchové vody

Porovnání *Escherichia coli* produkující širokospektré beta-laktamázy (ESBL) pocházející z povrchové vody a přilehlé čistírny odpadních vod (ČOV)



Vzorkovaná místa v lokalitě A

- ESBL-produkující *E. coli* detekovány v rekreační vodě ve všech 4 lokalitách
- ESBL-produkující *E. coli* detekovány i v povrchových vodách neovlivněných ČOV
- identické geny rezistence a sekvenční linie *E. coli* v odpadní a rekreační vodě



Konzentrace *E. coli* produkující ESBL

Zdroj: [Blaak et al. / Veterinary Microbiology 171 \(2014\) 448–459](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.001)

Povrchové vody



Změny bakteriálních kmenů na lidské kůži před a po expozici oceánské vodě

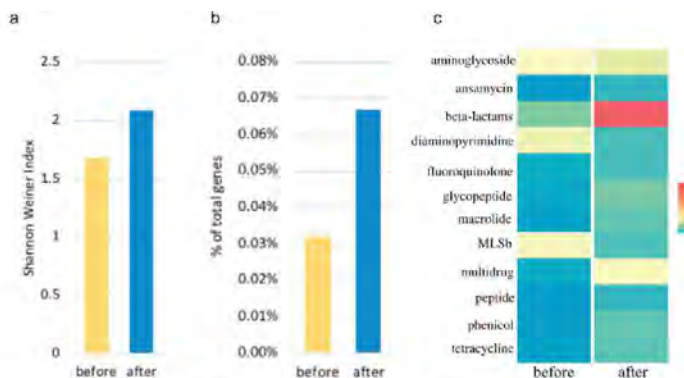
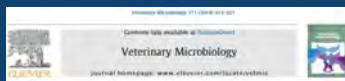


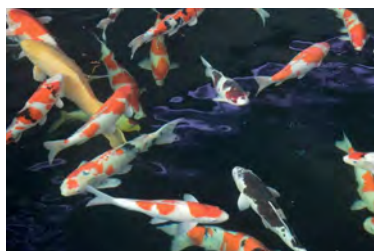
Fig. 4. Comparison of ARGs identified by shotgun metagenomic sequencing in samples collected before and after ocean water exposure. (a) ARG diversity by Shannon Weiner Index, (b) relative abundance of ARGs among total genes, and (c) heatmap of relative abundance of major ARG sub-groups identified among total ARGs. The scale bar for (c) is in % of relative abundance among total ARGs.

Zdroj: [Nielsen et al., Environmental Research 197 \(2021\) 110978](https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110978)

Okrasné ryby



Aeromonády s plasmidově kódovanou rezistencí k chinolonům



Kapři koi (*Cyprinus carpio koi*)

- kůže, žábry
- Česká republika - 7 farem
- 15 izolátů (19 %, n = 80)

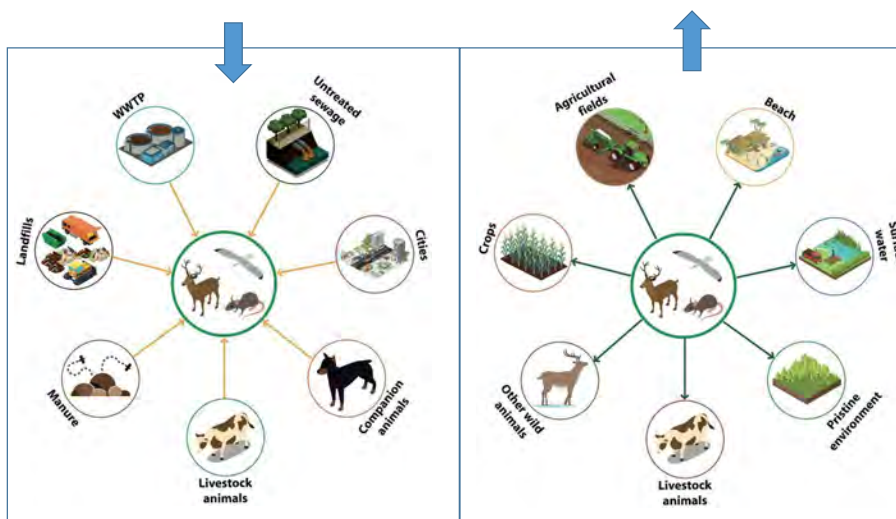


Tropické okrasné ryby různých druhů

- kůže, žábry a tělní kavity
- Vietnam, Thajsko, Čína, Slovensko, Singapur, Brazílie, Peru
- 18 izolátů (24 %, n = 76)

Zdroj: Dobiasova et al., *Veterinary Microbiology* 171 (2014) 413–421414; <https://media.tehrantimes.com/d/t/2021/09/04/4/3881140.jpg>; [https://en.wikipedia.org/wiki/Koi#/media/File:Ojima_Nishikigoi_no_Sato_ac_\(3\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Koi#/media/File:Ojima_Nishikigoi_no_Sato_ac_(3).jpg)

Povrchové vody a volně žijící zvířata



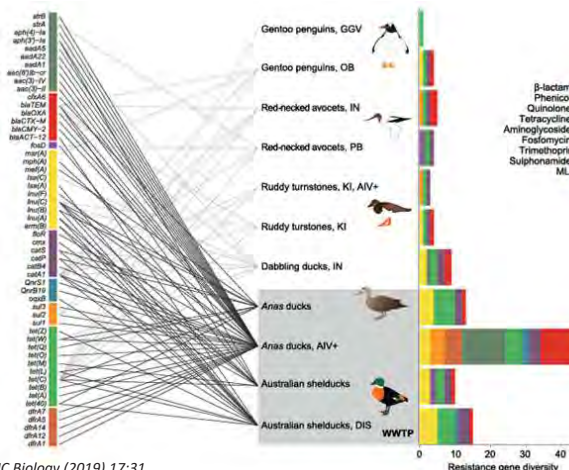
Zdroj: Dolejska. 2020. Antibiotic-Resistant Bacteria in Wildlife. *The Handbook of Environmental Chemistry*. Online

Povrchové vody a volně žijící zvířata

Geny antibiotické rezistence exprimované v mikrobiomu volně žijících ptáků

Meta-transcriptomics reveals a diverse antibiotic resistance gene pool in avian microbiomes

Venencia R. Macalino^{1,2*}, Michelle Miller^{1,2}, Amari C. Hunt¹, Daniel Gonzalez-Acuña¹, Marcel Nassmann¹, Timothy E. Schatz¹, Johannes Kolbert^{1,2}, Fangyao Li¹, Jonathan R. Haskel¹, Wang C. Sorell¹ and Edward C. Holmes^{1,2}



Zdroj: Marcelino et al. *BMC Biology* (2019) 17:31.

Metagenomika a sledování AMR

ARTICLE

Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage

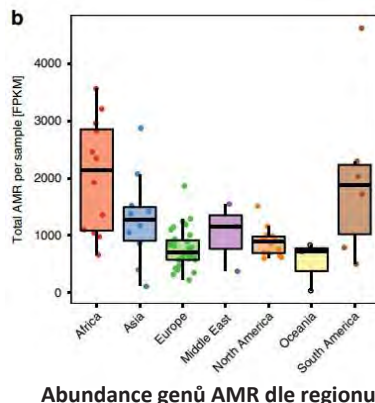
Ilene S. Hendriksen¹, Patrick Munk¹, Patrick Niaga¹, Bram van Boven¹, Luke McHale¹, Oksana Lukjancova¹, Timo Rötter¹, David Neuvirth¹, Susanne Karlsson Pedersen¹, Jette Kjeldgaard¹, Raf S. Kasil¹, Raviy Thomas Lankar Convidum Chasen¹, Josef Kordina¹, Praveen Lakshminarasimhan¹, Milica G.M. van de Sijpe¹, Tina Zudena¹, Ana Maria de Ruda Huaman¹, Simon Rasmussen¹, Bert Petersen¹, The Global Sewage Surveillance project consortium¹, Clara Amis¹, Guy Cochrane¹, Thomas Schmitz-Porten¹, Heike Schmidt¹, Jorge Raul Matheu Alvarez¹, Awa Adara-Kalle¹, Sangeeta K. Pimp¹, Ole Lund¹, Tarek Haddad¹, Mark Woodhouse¹, Marjan P. Koopmans¹, Hilken Vlieghe¹, Thomas Nordström Petersen¹ & Frank M. Aareström¹



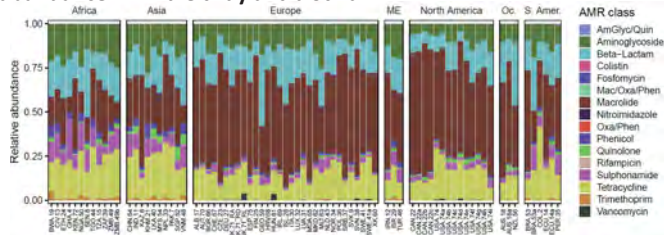
Vzorkovaná místa

Zdroj: Hendriksen et al., Nat Commun . 2019 Mar 8;10(1):1124.

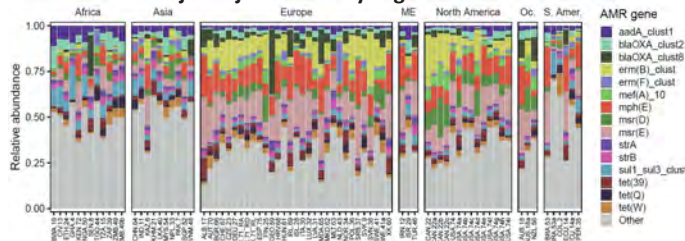
- 79 vzorkovacích míst (74 měst, 60 zemí)
- >1.4 Tb sekvenčních dat (cca 120 milionů readů na vzorek)



Relativní abundance AMR dle třídy antibiotika



Relativní abundance 15 nejčastěji detekovaných genů AMR

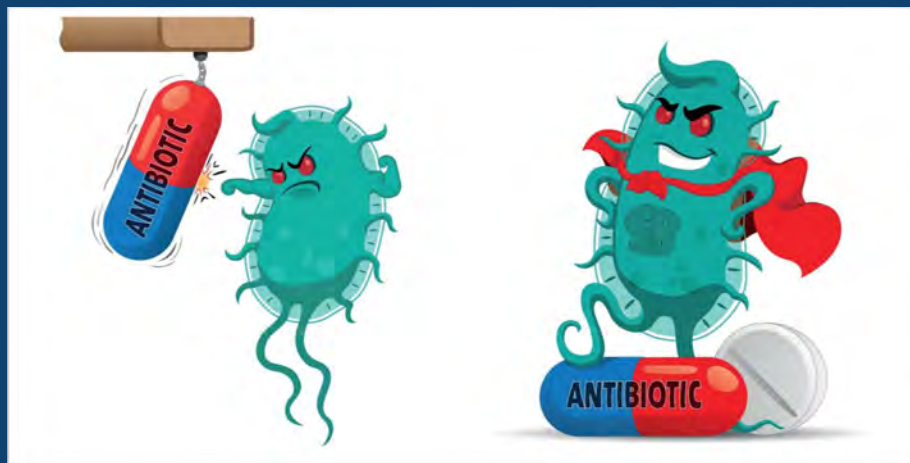


Zdroj: Hendriksen et al., Nat Commun . 2019 Mar 8;10(1):1124.

Závěr

- determinanty AMR jsou přirozené ve vodním prostředí
- dopad využívání antibiotik na vodní ekosystémy
- nemocniční a komunitní vody jako zdroj bakterií rezistentních k antibiotikům a genů antibiotické rezistence
- kontaminace povrchové vody je rizikem pro veřejné zdraví
- akvakultury jako přispěvatelé AMR
- využití metagenomiky pro sledování AMR celosvětově

Děkuji za pozornost..



Zdroj: <https://journalofethics.ama-assn.org/article/unnecessary-antibiotics/2006-06>

Sledování šíření enterobakterií rezistentních k antibiotikům cestou odpadních vod do prostředí: aplikace metagenomiky a celogenomového sekvenování



VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

Mgr. Lenka Davidová Geržová, Ph.D.

Davidova Gerzova L., Lausova J., Sukkar I., Nechutna L., Dolejska M.

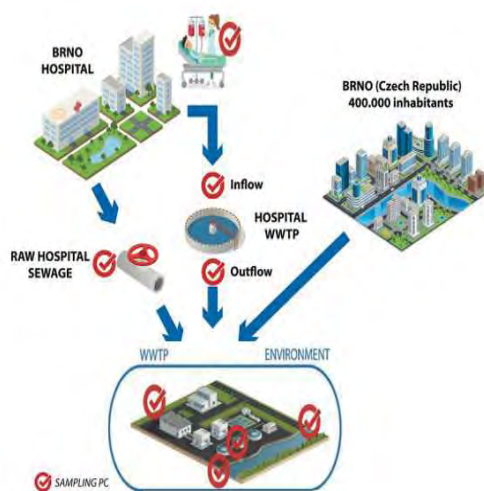
Problematika různých přístupů



Problematika různých přístupů



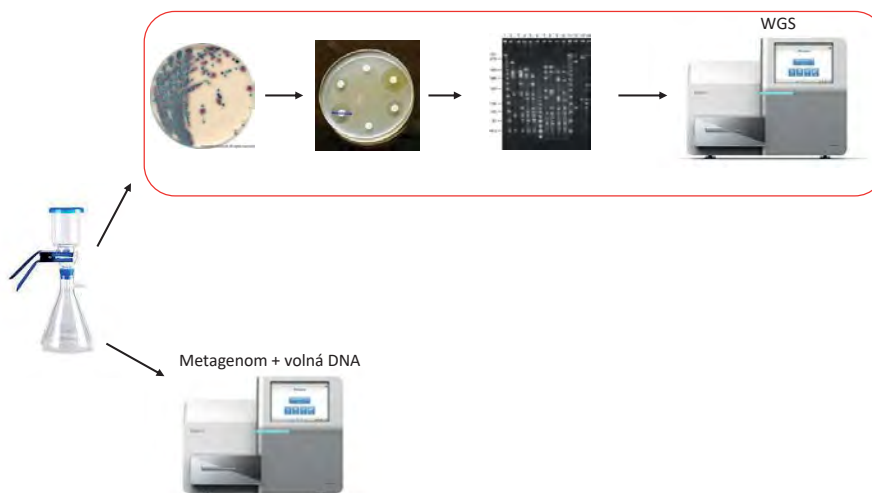
- Říjen 2016
- Celkem 6 vzorků:
 - Nemocnice – přítok a odtok z nemocniční čistírny odpadních vod (ČOV), nepřečištěná odpadní voda
 - Městská čistírna – přítok, odtok
 - Řeka Svatka – nad odtokem



- Srpen 2020, Duben 2021
- Celkem 20 vzorků ze dvou opakování
- Lokalita A, B
 - Nemocnice – izoláty od pacientů s UTI, odtok z nemocniční ČOV
 - Městská ČOV – přítok, odtok, kal
 - Řeka – nad a pod odtokem z ČOV

Problematika různých přístupů

E. coli, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp.



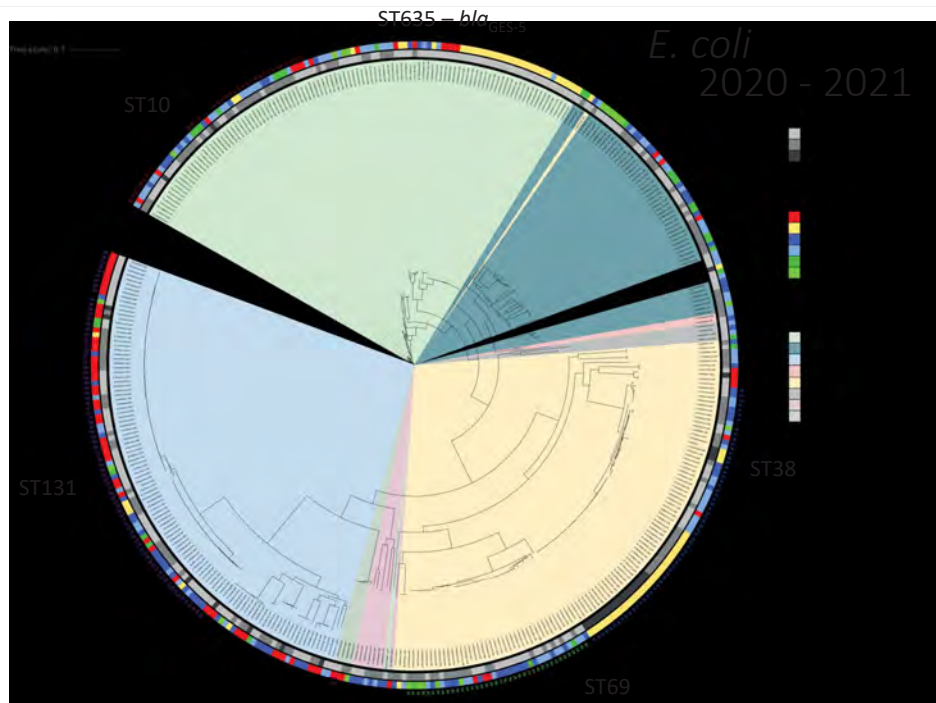
Výsledky 2016

- 78 samples
 - ST38 12.8%
 - ST131 10.3% _ 1 řeka
 - ST635, ST10 6.4%
 - **bla_{CTX-M-15}**: 62.8%

Location	Nr.b	ESBL & AmpC	AmpC	AmpC genes	ESBL	bla _{CTX-M}	bla _{TEM}	bla _{GES}
Hospital-WWTP-In	39	–	1	–	38	38	27	1
Hospital-WWTP-Out	–	–	–	–	–	–	–	–
Hospital-Raw	39	1	–	1	38	39	27	–
Municipal-WWTP-In	38	1	1	2	36	37	16	–
Municipal-WWTP-Out	35	–	2	2	33	33	12	–
River	7	–	3	3	4	2	5	–
Total prevalence	158	2 (1.3%)	7 (4.4%)	8 (5.1%)	149 (94.3%)	149 (94.3%)	87 (55.1%)	1 (0.6%)

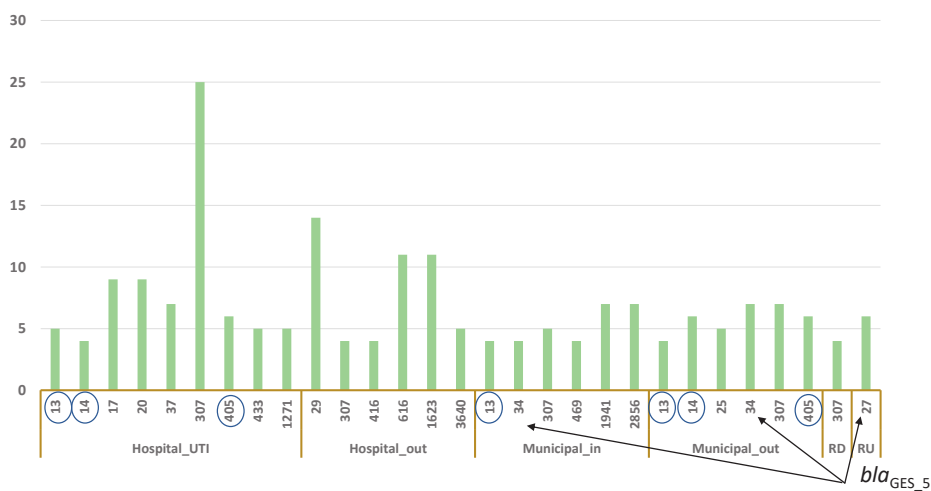
Výsledky 2020 - 2021

Location	Nr.b	ESBL & AmpC	AmpC	AmpC genesc	ESBL	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M15}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{GES}
Hospital-UTI	82	5	3	5	64	75	49	–	–
Hospital-Out	74	–	1	2	51	72	36	–	1
Municipal-WWTP-In	95	1	–	2	90	92	49	2	–
Municipal-WWTP-Out	106	7	1	7	94	100	47	–	–
River_Up	23	1	–	–	21	23 ^{*CTX-M-1}	4	–	–
River_Down	31	1	–	2	30	30	12	–	–
Total prevalence	411	15 (3.6%)	5 (1.2%)	18 (4.4%)	350 (85.2%)	392 (95.4%)	197 (47.9)	2 (0.5%)	1 (0.2%)

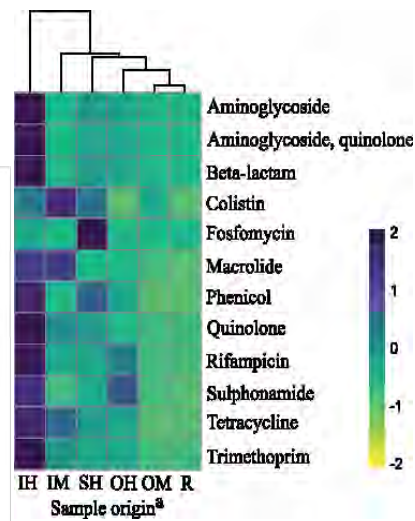
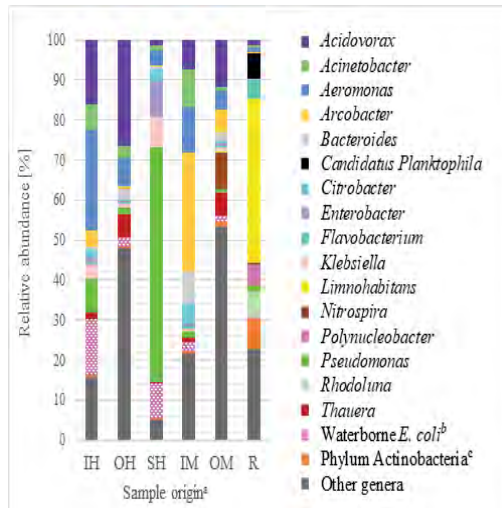


Klebsiella sp.

Distribuce ST *Klebsiella* sp. v různých lokalitách



Metagenom 2016



- geny rezistence 0.08%
✓ *bla*_{GES}, *bla*_{OXA}
- plazmidové replikny 0.07%
- geny virulence 0.003%

Shrnutí

- Močové infekce nejsou primárním zdrojem rezistentních bakterií v odpadní vodě z nemocnic
- Nemocnice nejsou hlavním zdrojem rezistentních bakterií v městské ČOV
- Nejvyšší podíl rezistentních *E. coli* byl na odtoku
- Vysoká prevalence klinicky významných ESBL CTX-resistentních enterobakterií v odpadních i povrchových vodách
- Klinicky významné kmeny mají schopnost přežívat v prostředí

Děkuji Vám za pozornost

Aplikace metod celogenomového sekvenování (NGS) v rámci harmonizovaného monitoringu antimikrobiální rezistence zoonotických a komenzálních bakterií detekovaných z hospodářských zvířat a potravin

Tomáš Černý
SVÚ Praha

Rozhodnutí Komise (EU) 2020/1729 o sledování a ohlašování antimikrobiální rezistence zoonotických a komenzálních bakterií

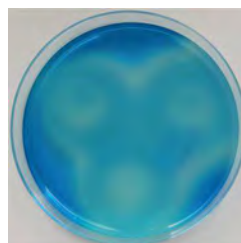
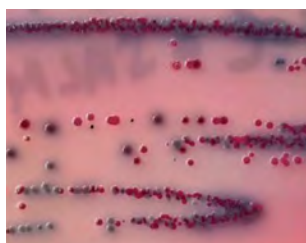
Druhy a počty vzorků/izolátů, které mají být testovány v rámci sledování AMR dle nového prováděcího rozhodnutí 2020/1729 od roku 2021

Populace zvířat nebo potravina	Bakterie	Místo odběru	Matrice	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	Poznámka
Brojeři, nosnice a krůty	Salmonella	chovy (NPSAL)	-	-	do 170 izolátů	-	do 170 izolátů	-	do 170 izolátů	-	-
Brojeři	C. jejuni and C. coli	řatky	slépá střeva	-	alespoň 170 izolátů C. jejuni do 170 izolátů C. coli	-	alespoň 170 izolátů C. jejuni do 170 izolátů C. coli	-	alespoň 170 izolátů C. jejuni do 170 izolátů C. coli	-	-
	E. coli	řatky	slépá střeva	-	alespoň 170 izolátů	-	alespoň 170 izolátů	-	alespoň 170 izolátů	-	-
	<i>E. faecalis, E. faecium</i>	řatky	slépá střeva	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	dobrovolné, lze využít výjimku 3.1 písm. b)
	enzymy produkující E. coli	řatky	slépá střeva	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	-
Prasata výkrm	C. coli	řatky	slépá střeva	alespoň 170 izolátů	-	alespoň 170 izolátů	-	alespoň 170 izolátů	-	alespoň 170 izolátů	-
	Salmonella	řatky	slépá střeva	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	využít výjimku 3.1 písm. b)
	E. coli	řatky	slépá střeva	alespoň 170 izolátů	-	alespoň 170 izolátů	-	alespoň 170 izolátů	-	alespoň 170 izolátů	-
	<i>E. faecalis, E. faecium</i>	řatky	slépá střeva	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	dobrovolné, lze využít výjimku 3.1 písm. b)
	enzymy produkující E. coli	řatky	slépá střeva	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-
Kuřecí maso	enzymy produkující E. coli	maloobchod	maso	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	-
Krůtí maso	enzymy produkující E. coli	maloobchod	maso	-	150 vzorků	-	150 vzorků	-	150 vzorků	-	využít výjimku 3.2 písm. b)
Vepřové maso	enzymy produkující E. coli	maloobchod	maso	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-
Hovězí maso	enzymy produkující E. coli	maloobchod	maso	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-	300 vzorků	-

LABORÁTORNÍ
STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Monitoring – analytické metody

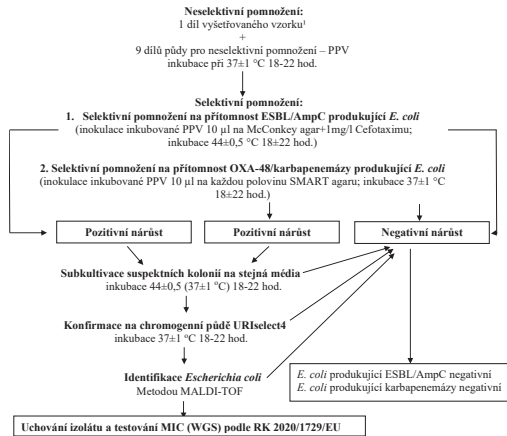
- *Salmonella* spp. >> ČSN EN ISO 6579-1:2017 >> sérotypizace (KwLm) >> MLVA >> MIC (1+2 deska)
- *Escherichia coli* komenzální >> neselektivní pomnožení TBX >> MALDI-TOF >> MIC (1+2 deska)
- *Campylobacter coli/jejuni* >> harmonizovaný protokol EURL-C >> MIC
- *Enterococcus faecalis/faecium* >> dobrovolný (v ČR se neprovádí)
- *Escherichia coli* produkující ESBL, AmpC a karbapenemázy >> harmonizovaný protokol EURL-AR >> MIC/NGS



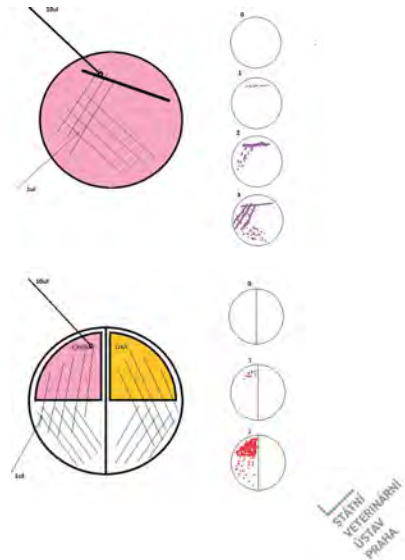
LABORÁTORNÍ
STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Schéma postupu detekce kmenů *Escherichia coli* produkujících ESBL, AmpC a karbapenemázy

Shrnutí postupu vyšetření je graficky znázorněno následujícím schématem:



25±0,5 g čerstvého masa do 225 ml PPV
1±0,1 g obsahu stěpých střev do 9 ml PPV



NGS – používané technologie a využití

Illumina NextSeq 1(2)x75bp single (paired) – end reads

- *Escherichia coli*
- *Salmonella spp.*
- *Campylobacter coli/jejuni*



<https://nanoporetech.com/products/minion>

Oxford Nanopore MinION

- Aviární influenza
- SARS-CoV-2
- Metagenomická analýza

STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV PRAHA

NGS – harmonizace/EQAS

OTU Food National Food Institute

PROTOCOL FOR WHOLE GENOME SEQUENCING AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF BACTERIAL ISOLATES RELATED TO THE EU MONITORING OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE

AUTHORED BY THE EURL-AR
VERSION 2.2 - DECEMBER 2021

RENE S. HENDRIKSEN & JETTE S. KJELDGAARD

HISTORY OF CHANGES				
Version	Sections changed	Description of change	Date	Approval
2.2	Links	Update of links	03 Dec 2021	EURL-AR
2.1	AMR gene and point mutation prediction	Minor changes	February 2021	EURL-AR
2	Assessment of genome quality AMR gene prediction	Modifications and addition of specifications	15 Dec 2020	
1	All through the document	Minor modifications based on comments from the EURL Working Group of NGS	10 Jan 2020	The EURL Working Group of NGS
Draft	New draft document	-	06 Dec 2019	Authors

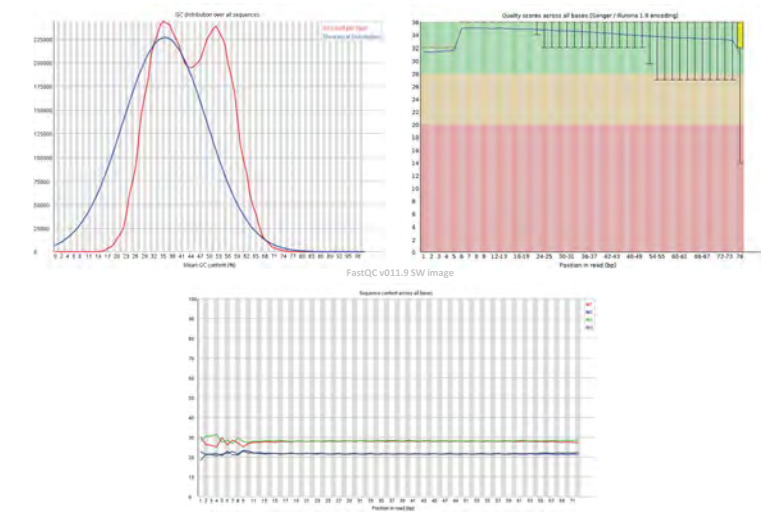
WGS-based cluster identification as expected:
Technical duplicates 215CA08 and 215CA09 reported within one cluster: Yes
Yes



Figure 1. Minimum Spanning Tree of the participants' results and the EURL-Salmonella (E13) results. (Kolamdeppanure*, cpMLST (3062), pairwise spacing missing values).

STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV PRAHA

NGS – bioinformatika – pipeline/QC



- echo "Spusteni prvni paramet je adresar s davkou osekovaných dat (tyto v tomto adresari lezi jsou jako .fastq.gz)"
- echo "Druhy paramet udava kroky workflow."
- echo "Například ./workflow_wgs.sh Lab28_ZQTNqFSBRKMLCtOYbEX"
- echo "y .. force Campylobacter"
- echo "e .. force ecoli"
- echo "a .. force salmonella"
- echo "Z .. delkomprese fasta.gz"
- echo "Q .. kontrola kvality fastQc originalních dat"
- echo "T .. Trimming dat pomoci trimmomatic"
- echo "N .. Nanofilt (orez malo kvalitních dat)"
- echo "q .. kontrola kvality fast(q) ctrimovaných cropyntých dat"
- echo "S .. Spades (genome assembly)"
- echo "F .. Flye"
- echo "S .. N50 (posouzení kvality contigu)"
- echo "B .. Blast určení největšího contigu (slouží v dalších krocích pro volbu vhodné databáze salmonella,ecoli,campylobacter,isteria)"
- echo "R .. Resfinder"
- echo "K .. Kmerfinder"
- echo "M .. [mapping on two top matches k-merfinder genome]"
- echo "V .. Virulencefinder"
- echo "L .. mLst"
- echo "C .. CgMLSTfinder"
- echo "O .. seqserQ"
- echo "S .. Serotypefinder"
- echo "I .. plasmidfinder"
- echo "E .. EPort"
- echo "X .. xls"
- echo "D .. bank contigs and reads"
- echo "M .. odeslati skriptu e-mailem"
- echo "P .. minityPer pouziva se samostatne ./workflow.sh puvodce P"
- echo "G .. cGmlstfinder pouziva se samostatne ./workflow.sh puvodce"



NGS – bioinformatika – pipeline report

Accession	Score	Expected	Template	Query	Cov	Template	Depth	tot_query	tot_templ	tot_depth	p_value	Accession	Descriptor	TAXID	Taxonomy	SVid	Species
GCF_016204885.1	11347	13900	6	17417	85.86	87.38	0.86	85.86	87.38	0.86	1.35E-26	NZ_CP024	Escherichia coli	562	cellular ori	562	Escherichia coli
GCF_00207795.1	21233	9279	47	16270	5.90	5.78	0.06	75.20	73.62	0.72	99.36.95	NZ_CP020	Escherichia coli	562	cellular ori	562	Escherichia coli
GCF_002169285.1	24666	3074	46	15426	2.34	2.40	0.02	82.89	86.11	0.85	93.36.97	NZ_CP021	Escherichia coli	562	cellular ori	562	Escherichia coli
GCF_01128275.1	10721	1771	53	176028	1.13	1.04	0.01	62.76	57.15	0.56	1615.87	NZ_CP042	Escherichia coli	562	cellular ori	562	Escherichia coli

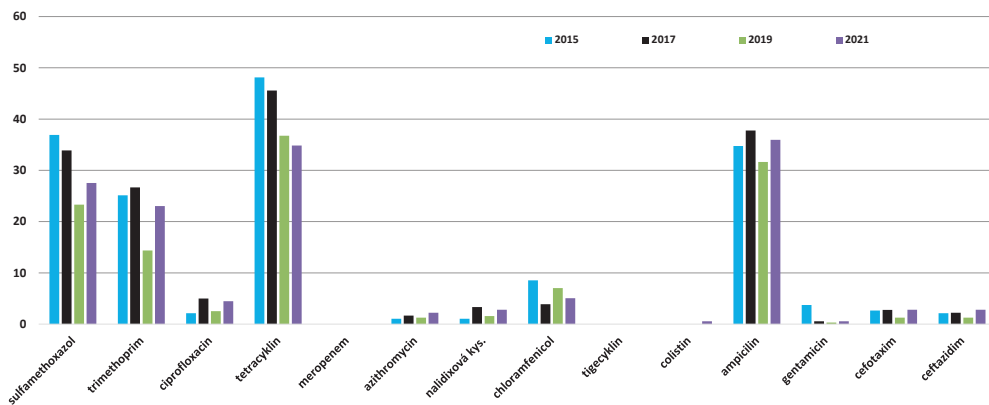
Sample name	Total number of loci	Number of % Called allele qST	Allele_m %	Allele_matches
R22-EC1-S-5-1001_R1	2518	2387/94.99	18885	2176/86.59

Database	Gene	Serotype	Identity	Template	Contig	Position	Accession
H_type	fliC	H18	97.84	1665	1666	NODE_32_39770_25	AV250001
O_type	wzx	O59	99.92	1298	1298	NODE_30_24278_25	AV645490
O_type	wzy	O59	99.14	1170	1171	NODE_30_32408_25	AV645490

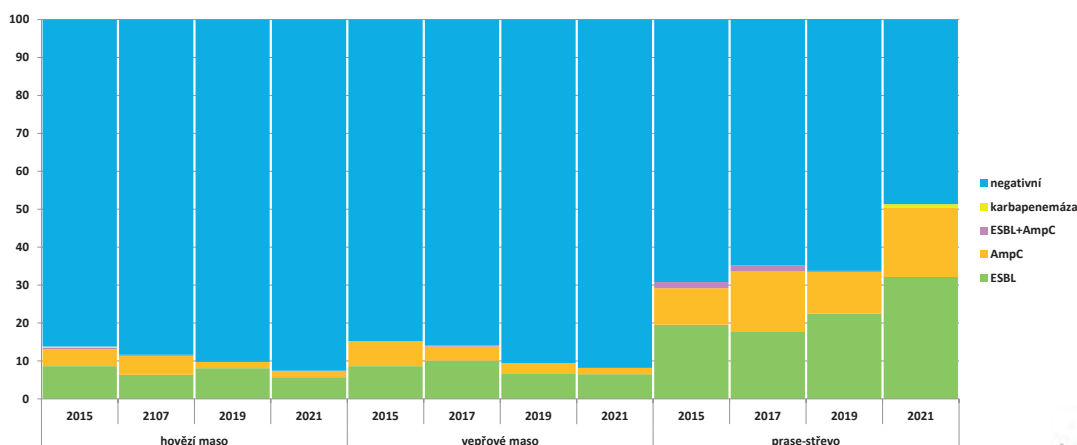
Database	Phasmid	Identity	Query	Template	Contig	Position	Note	Accession
enterobacteriaceae	INCY	98.82	765	765	NODE_30_3087_3851	K02380		

Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
LT83800.1 Escherichia coli isolate W12 isolate genome assembly...	3.908e+05	0.0
LT83896.1 Escherichia coli isolate W11 isolate genome assembly...	3.908e+05	0.0
CP019005.1 Escherichia coli strain Ecol AZ155, complete genome	3.908e+05	0.0
CP04238.1 Escherichia coli strain CD26, chromosome, complete...	3.907e+05	0.0
LS992171.1 Escherichia coli isolate Escherichia coli str. TO73 ge...	3.907e+05	0.0
CP010971.1 Escherichia coli strain b499, complete genome	3.826e+05	0.0
LS18407.1 Escherichia coli strain NCTC102 genome assembly, chro...	3.854e+05	0.0
CP038857.1 Escherichia coli strain PgiCaeca_2 chromosome, comple...	3.826e+05	0.0
CP010971.1 Escherichia coli strain H6, complete genome	3.825e+05	0.0
CP042893.1 Escherichia coli strain CFSAN061772 chromosome, comple...	3.820e+05	0.0

Porovnání relativní četnosti výskytu epidemiologické rezistence sledovaných antimikrobiálních látek u komenzální *Escherichia coli* izolované z obsahu slepých střev prasat v letech 2015, 2017, 2019 a 2021 (n 898)

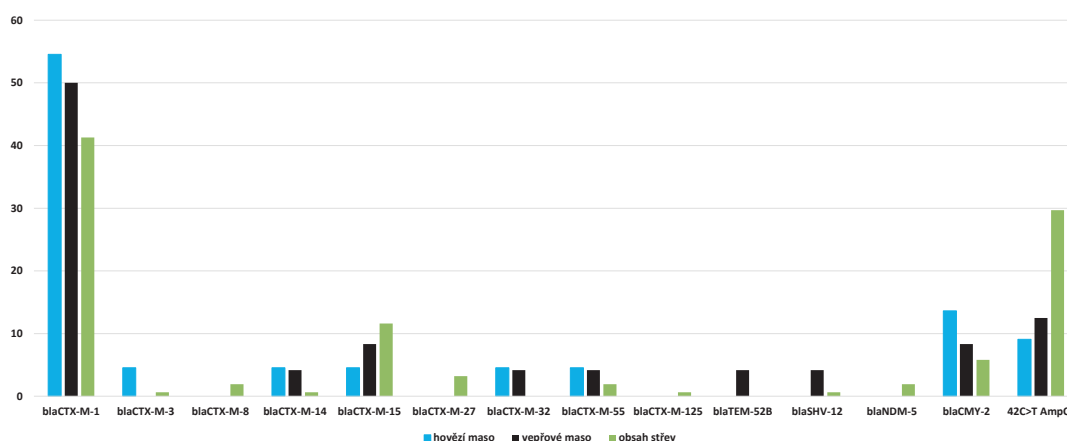


Porovnání relativní četnosti sledovaných fenotypů rezistence izolátů *Escherichia coli* detekovaných při selektivním pomnožení vzorků hovězího a vepřového masa a obsahu slepých střev prasat v letech 2015, 2017, 2019 a 2021 (n 3603)



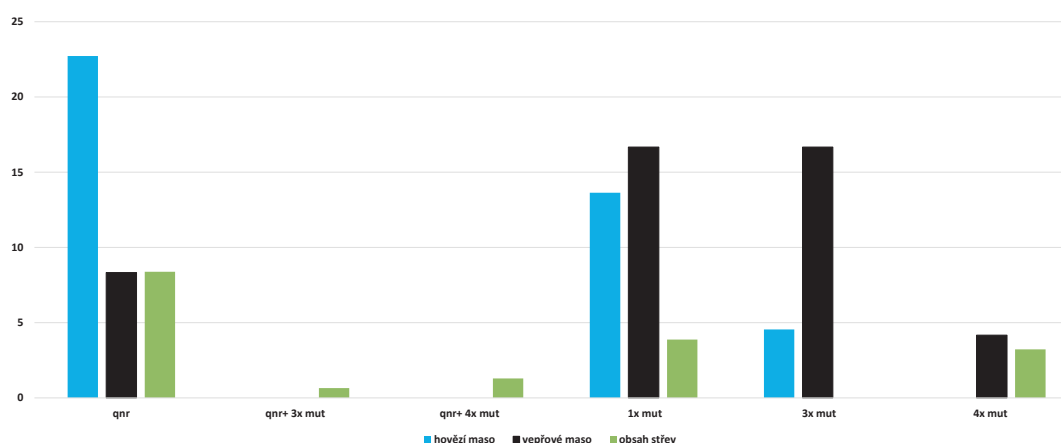
STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV PRAHA

Porovnání relativní četnosti genů rezistencí a chromozomálních mutací zodpovědných za produkci rozšířené betalaktamázy a karbapenemázy u izolátů *Escherichia coli* detekovaných z vepřového a hovězího masa a obsahu slepých střev prasat v roce 2021 (n 894)



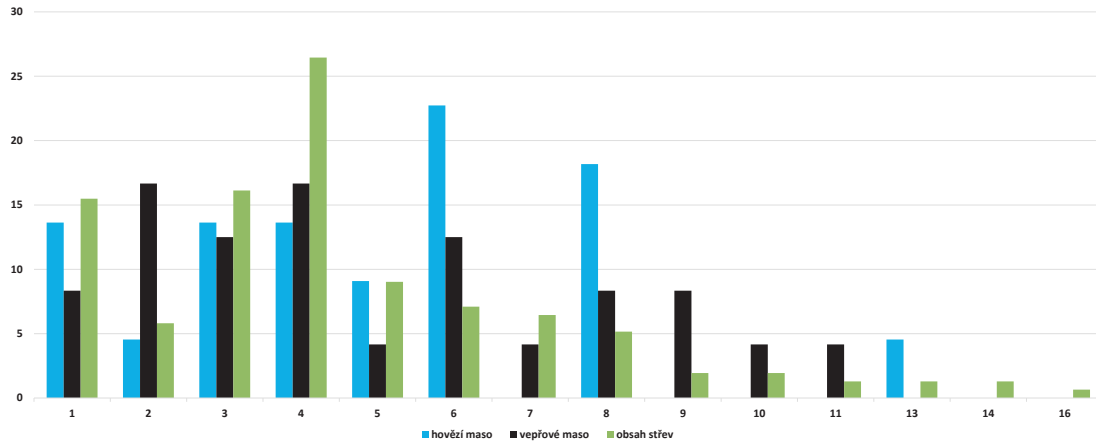
STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV PRAHA

Porovnání relativní četnosti genů rezistencí a chromozomálních mutací zodpovědných za rezistenci k chinolonům u izolátů *Escherichia coli* produkujících rozšířené betalaktamázy detekovaných z vepřového a hovězího masa a obsahu slepých střev prasat v roce 2021 (n 894)



STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV PRAHA

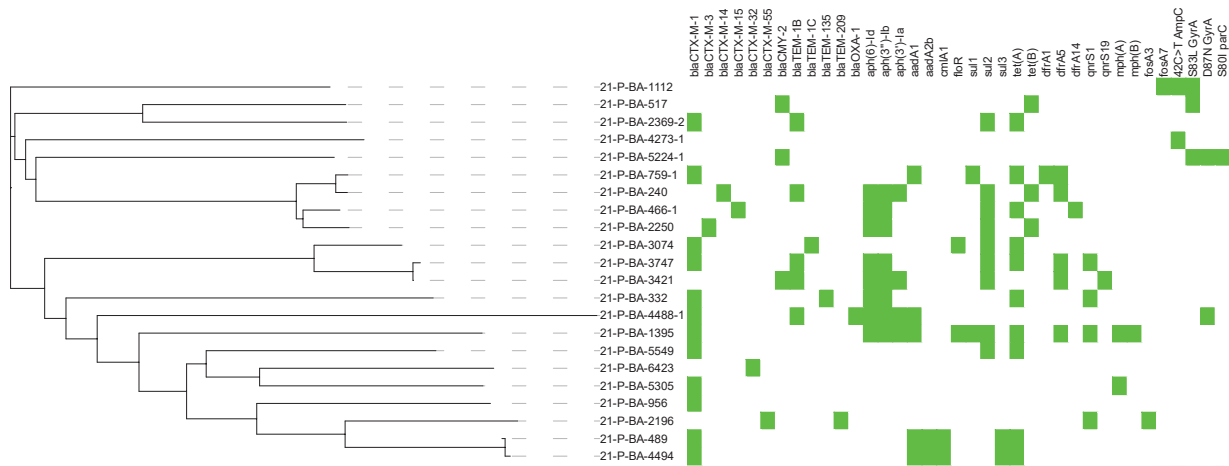
Porovnání relativní četnosti součtu genů rezistencí a chromozomálních mutací celkově detekovaných u jednotlivých izolátů *Escherichia coli* produkujících rozšířené betalaktamázy a karbapenemázy izolovaných z vepřového a hovězího masa a obsahu slepých střev prasat v roce 2021 (n 894)



STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV PRAHA

Tree scale: 100

Příloha č. 1 Porovnání profilů rezistence a vzájemné příbuznosti izolátů *Escherichia coli* produkujících rozšířené betalaktamázy detekovaných z hovězího masa v roce 2021 (n 22)

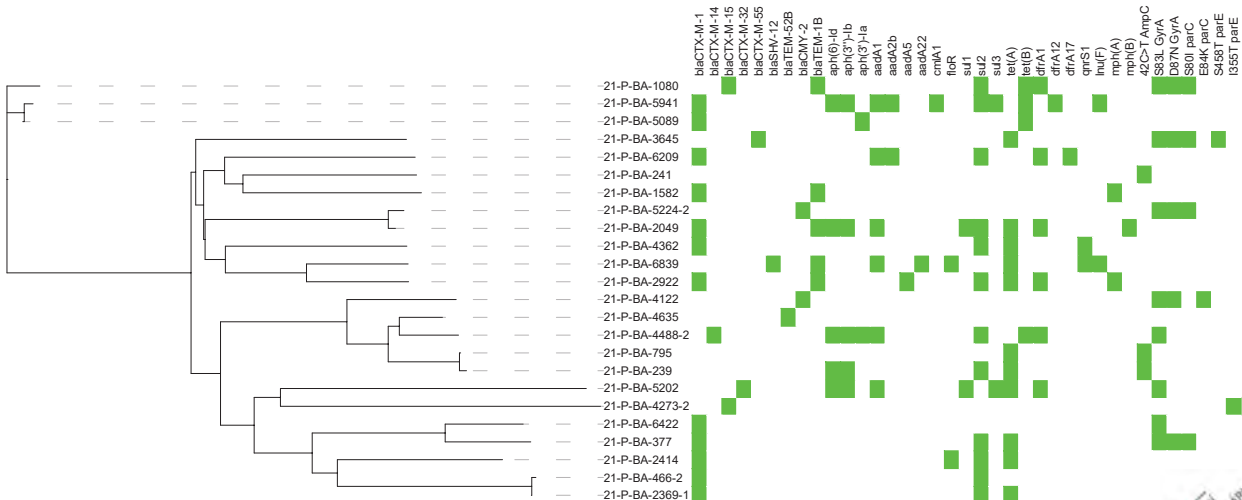


Created with: <https://itol.embl.de/>

STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV PRAHA

Tree scale: 100

Příloha č. 2 Porovnání profilů rezistence a vzájemné příbuznosti izolátů *Escherichia coli* produkujících rozšířené betalaktamázy detekovaných z vepřového masa v roce 2021 (n 24)

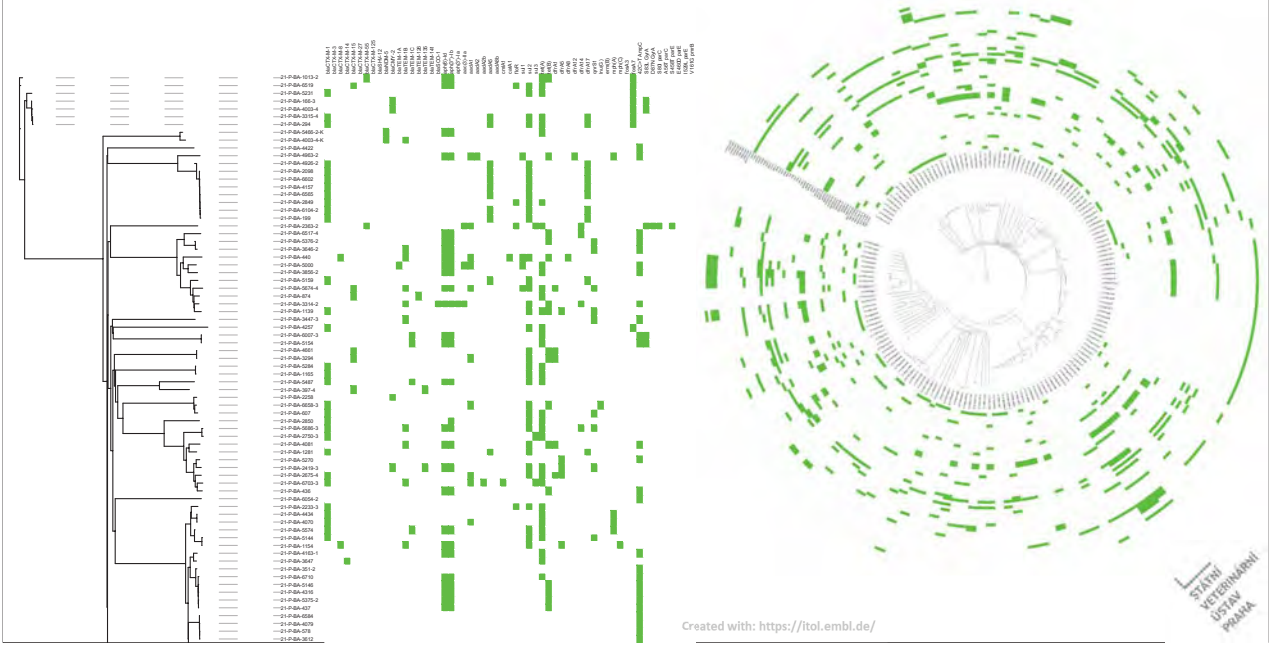


Created with: <https://itol.embl.de/>

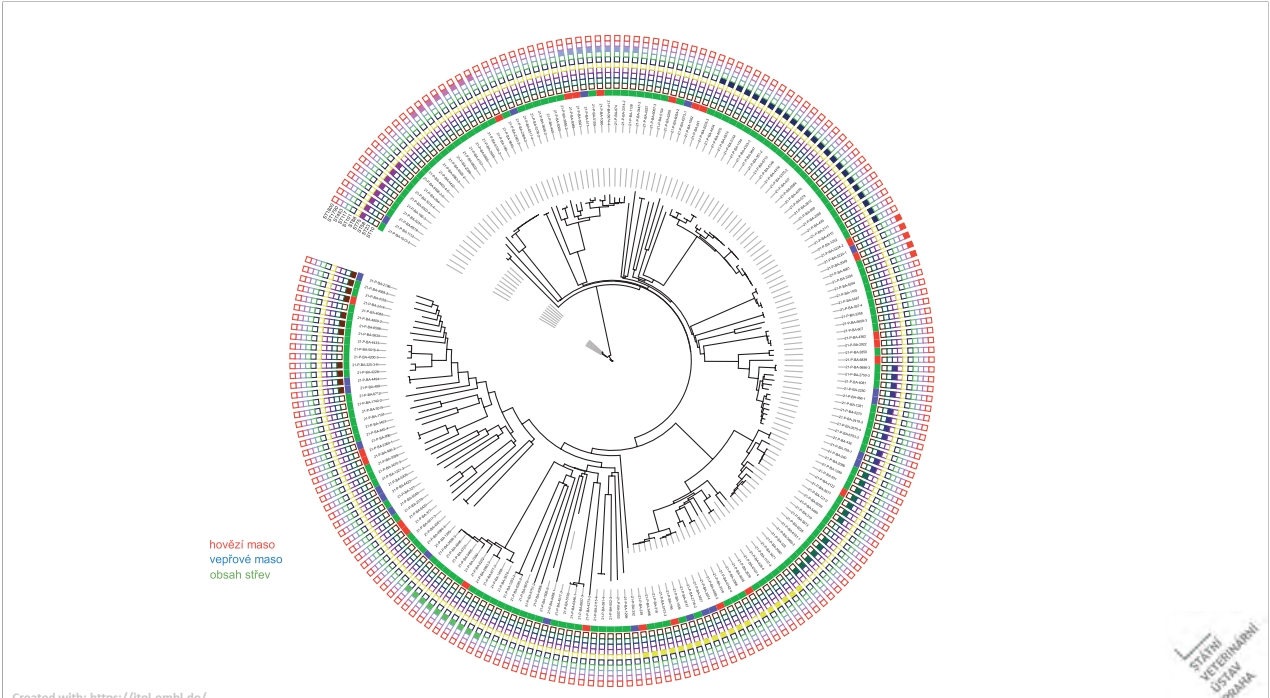
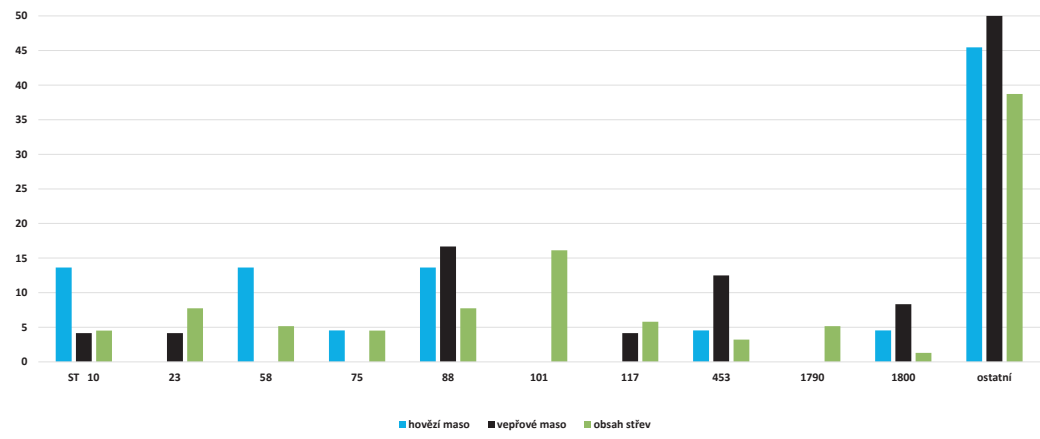
STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV PRAHA

Tree scale: 1000

Příloha č. 3 Porovnání profilů rezistence a vzájemné příbuznosti izolátů *Escherichia coli* produkujících rozšířenou betalaktamázu detekovaných z obsahů střev prasat v roce 2021 (n 155)



Porovnání relativní četnosti nejčastěji detekovaných sekvenčních typů (ST) izolátů *Escherichia coli* produkujících rozšířenou betalaktamázu a karbapenemázu izolovaných z vepřového a hovězího masa a obsahu slepých střev prasat v roce 2021 (n 894)



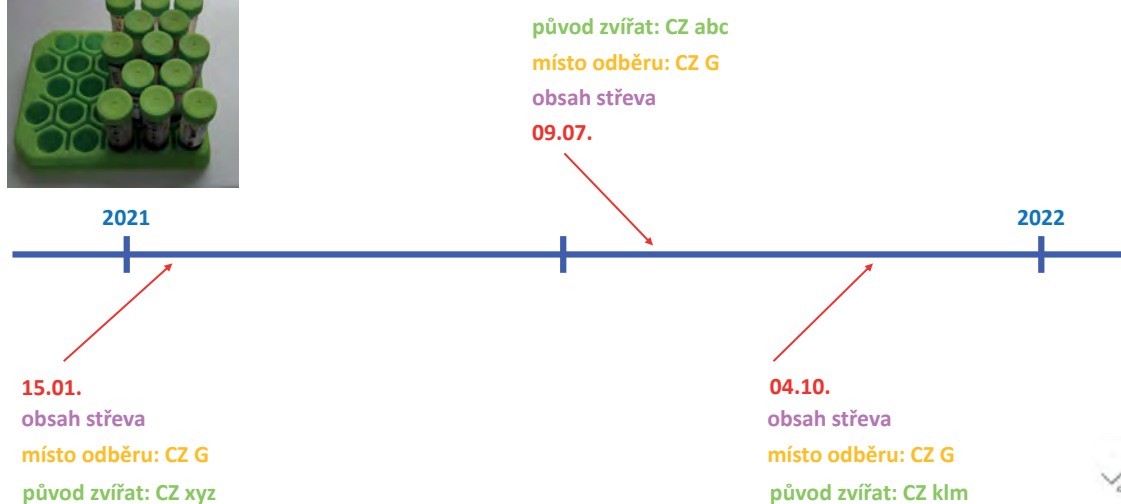
Created with: <https://itol.embl.de/>

Klonálně vysoce příbuzné izoláty *Escherichia coli* produkujících rozšířené betalaktamázy a karbapenemázy s identifikovatelnou epizootologickou návazností

Datum odběru	Místo odběru	Původ	Typ vzorku	Číslo vzorku	ST	cgST	O-antigen	H-antigen
01.11.2021	CZ A	CZ zz	slepé střevo prasete	21-P-BA 6009	23	21258	O9	H32
03.05.2021	CZ A	CZ xx	slepé střevo prasete	21-P-BA 2677	23	21258	O9	H32
27.07.2021	CZ B	CZ cc	slepé střevo prasete	21-P-BA 4315	101	87812	O15	H10
13.04.2021	CZ B	CZ cc	slepé střevo prasete	21-P-BA 2111	101	87812	O15	H10
26.01.2021	CZ B	CZ cc	slepé střevo prasete	21-P-BA 439	101	87812	O15	H10
11.06.2021	CZ C	CZ bb	slepé střevo prasete	21-P-BA 3574	117	63201	O33	H18
16.05.2021	CZ C	CZ bb	slepé střevo prasete	21-P-BA 1456	117	63201	O33	H18
20.09.2021	CZ D	CZ pp	slepé střevo prasete	21-P-BA 5284	345	17304	O9	H11
01.03.2021	CZ D	CZ rr	slepé střevo prasete	21-P-BA 1165	345	17304	O9	H11
29.09.2021	CZ E	CZ vv	slepé střevo prasete	21-P-BA 5376-2	641	55580	O153	H10
16.06.2021	CZ E	CZ ww	slepé střevo prasete	21-P-BA 3646-2	641	55580	O153	H10
14.04.2021	CZ F	CZ nn	slepé střevo prasete	21-P-BA 2115-4	1300	1220		H28
03.02.2021	CZ F	CZ mm	slepé střevo prasete	21-P-BA 581-4	1300	1220		H28
15.09.2021	CZ G	CZ aa	vepřové maso	21-P-BA 5224-2	1800	132193	O82	H21
15.09.2021	CZ G	CZ G	hovzí maso	21-P-BA 5224-1	1800	132193	O82	H21

STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

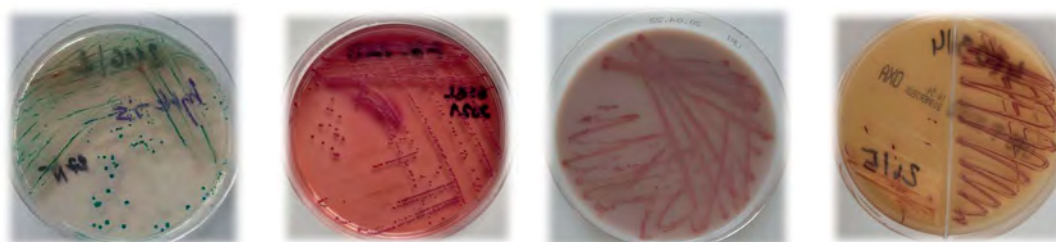
Časová osa detekce izolátů *Escherichia coli* produkujících karbapenemázu blaNDM-5



STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Vyšetření provedená paralelně z identického vzorku obsahu střeva

- Escherichia coli* komezální >> neselektivní pomnožení >> MALDI-TOF >> MIC (1 deska nebo 1+2 deska)
- Escherichia coli* produkující ESBL, AmpC >> selektivní detekce >> MIC (1+2 deska) >> WGS
- Escherichia coli* produkující karbapenemázy >> selektivní detekce >> MIC (1+2 deska) >> WGS



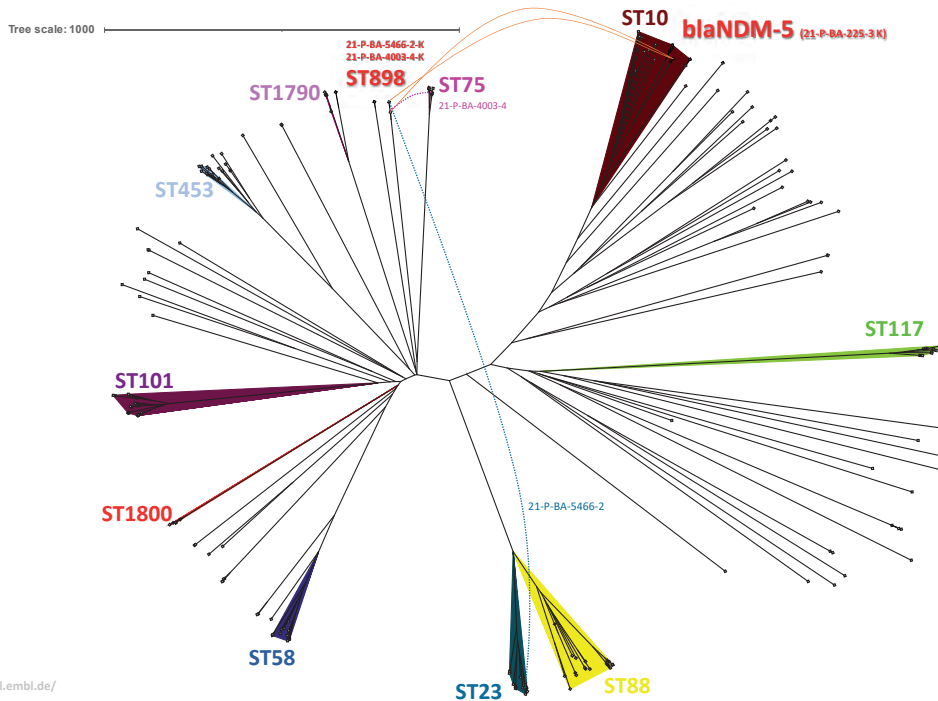
STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Sdružené výsledky fenotypového testování MIC paralelně detekovaných izolátů *Escherichia coli*

Číslo vz.	Program	Fenotyp	AMP	AZI	AMI	GEN	TGC	TAZ	FOT	COL	NAL	TET	TMP	SMX	CHL	MERO	CIP	FOX	ETP	FOT	TRM	IMI	MERO	TAZ	FEP	F/C	T/C
21-P-BA-225-3-K	CARB/OXA	Karba+T	>32	8	≤4	1	≤0,25	>8	>4	≤1	≤4	>32	≤0,25	8	≤8	8	≤0,015	>64	>2	>64	32	16	8	>128	16	>64/4	>128/4
21-P-BA-225-1	KOMENZÁL	AmpC	>32	4	≤4	≤0,5	≤0,25	8	4	≤1	≤4	≤2	≤0,25	≤8	≤8	≤0,03	≤0,015	64	0,06	8	4	0,25	≤0,03	8	0,25	8/4	8/4
21-P-BA-4003-4-K	CARB/OXA	Karba	>32	4	≤4	1	≤0,25	>8	>4	≤1	≤4	≤2	≤0,25	≤8	≤8	8	≤0,015	>64	>2	>64	32	4	8	>128	16	>64/4	>128/4
21-P-BA-4003-2	KOMENZÁL	CSuT+W+Na+Cip	4	≤2	≤4	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤1	16	16	>16	>512	64	≤0,03	1	4	≤0,015	≤0,25	4	≤0,12	≤0,03	≤0,25	≤0,06	≤0,06/4	≤0,12/4
21-P-BA-4003-4	ESBL/AmpC	AmpC+Na+Cip	>32	4	≤4	≤0,5	≤0,25	8	4	≤1	>64	≤2	≤0,25	≤8	≤8	≤0,03	0,25	32	0,03	4	8	≤0,12	≤0,03	8	0,25	4/4	8/4
21-P-BA-5466-2-K	CARB/OXA	Karba+T	>32	2	≤4	1	≤0,25	>8	>4	≤1	≤4	>32	≤0,25	16	≤8	8	≤0,015	>64	>2	>64	32	8	8	>128	16	>64/4	>128/4
21-P-BA-5466-1	KOMENZÁL	ASuT+W	>32	4	≤4	≤0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤1	≤4	>32	>16	>512	≤8	≤0,03	≤0,015	4	≤0,015	≤0,25	4	≤0,12	≤0,03	≤0,25	≤0,06	≤0,06/4	≤0,12/4
21-P-BA-5466-2	ESBL/AmpC	ESBL+SuT	>32	4	≤4	≤0,5	≤0,25	1	>4	≤1	≤4	≤2	>16	>512	≤8	≤0,03	≤0,015	4	≤0,015	32	8	≤0,12	≤0,03	1	4	0,12/4	0,25/4

Rozsah testování a kritéria vyhodnocení v souladu s RK 2020/1729 (hodnoty MIC v mg/l)

LABORÁTORNÍ
STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA



Created with: <https://itol.embl.de/>

LABORÁTORNÍ
STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Epidemiologie izolátů s detekovanou karbapenemázou blaNDM-5

Datum odběru	Místo odběru	Původ	Typ vzorku	Číslo vzorku	Fenotyp	Gen	ST	cgST	O-antigen	H-antigen
15.01.2021	CZ G	CZ xyz	slepé střevo prasete	21-P-BA-225-3-K	Karba + T	blaNDM-5	10	34258	O101	H9
15.01.2021	CZ G	CZ xyz	slepé střevo prasete	21-P-BA-225-1	AmpC	??	??	??	??	??
09.07.2021	CZ G	CZ abc	slepé střevo prasete	21-P-BA-4003-4-K	Karba	blaNDM-5	898	33479	??	H48
09.07.2021	CZ G	CZ abc	slepé střevo prasete	21-P-BA-4003-2	CSuT+W+Cip	-	??	??	??	??
09.07.2021	CZ G	CZ abc	slepé střevo prasete	21-P-BA-4003-4	Na+Cip+AmpC	blaCMY-2	75	114622	O112ab	H8
04.10.2021	CZ G	CZ kml	slepé střevo prasete	21-P-BA-5466-2-K	Karba + T	blaNDM-5	898	4945	O88	H48
04.10.2021	CZ G	CZ kml	slepé střevo prasete	21-P-BA-5466-1	ASuT+W	-	??	??	??	??
04.10.2021	CZ G	CZ kml	slepé střevo prasete	21-P-BA-5466-2	ESBL+SuT	blaCTX-M-1	23	130956	O8	H9

vzorek/ SNPr distance	21-P-BA-225-3-K	21-P-BA-4003-4-K	21-P-BA-5466-2-K
21-P-BA-225-3-K	0	26178	26180
21-P-BA-4003-4-K	26178	0	727
21-P-BA-5466-2-K	26180	727	0

Tree scale: 10000



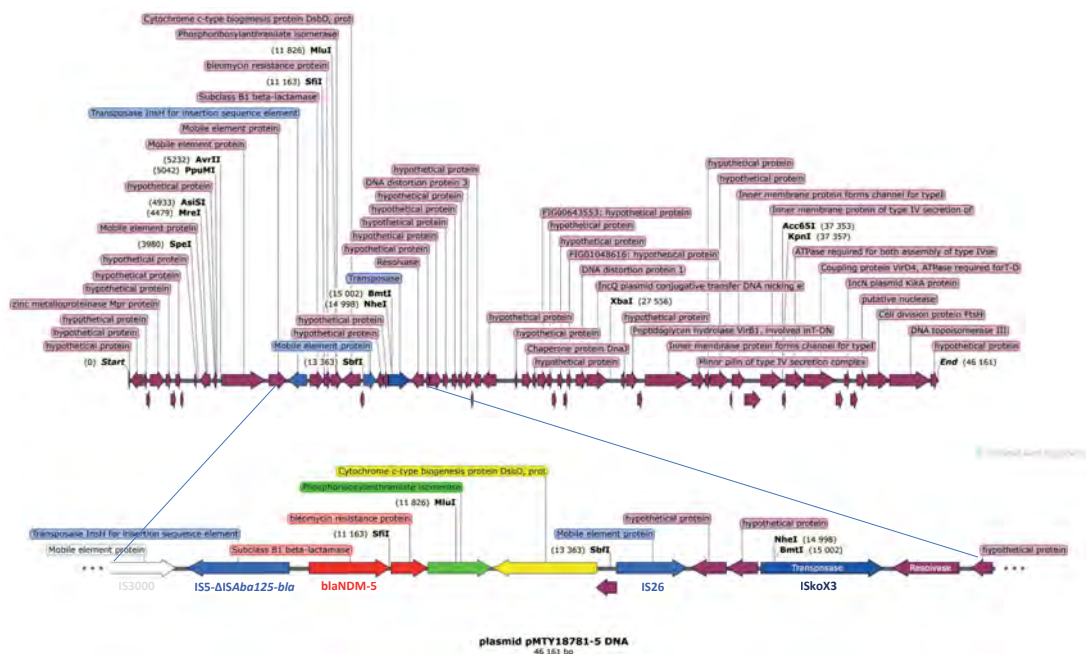
LABORÁTORNÍ
STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Karbapenemáza – blaNDM-5

- První záchyt blaNDM-5 *Escherichia coli* v GB (Hornsey, M., et. al., 2011)
- Záchyty blaNDM-5 v České republice od roku 2011 (Hrabák, J., et. al., 2012; Pasková, V., et. al., 2018; Chudějová, K., et. al., 2021)
- Přítomnost genu detekována na různých plazmidech IncF, IncX3, IncL/M, IncH, IncA/C2 (Zhu, Y., Q. et. al., 2016; Giufrè, M. et. al., 2018)
- IncX3 identifikován jako nosič genů blaNDM-x v Evropě, Asii, Americe (Wu, W., et. al., 2019)
- IncX3 je nejdůležitější nosič genu blaNDM-5 u enterobakterií (Shen, Z., 2018; Xi, L., 2018; Krishnaraju, M., 2015)
- *Escherichia coli* IncX3/blaNDM-5 detekována
 - u drůbeže (Yang, L., et al., 2016, Zhang, F., et al., 2019)
 - z kravského mléka (Yaici, L., et al., 2016)
 - u prasat (Pak-Leung, H., et. al., 2018; Xiaofeng, H., 2021)
- Na IncX3 (~46 kb) detekována sekvence IS26-blaNDM-5-IS5-ISAb125 (Pak-Leung H., et. al. 2018)
- Prokázána vysoká konjugační aktivita plazmidu IncX3/blaNDM-5 (Wang, Y., et al., 2018, Xiaofeng, H., 2021)
- Prokázána přítomnost plazmidu IncX3/blaNDM-5 i v environmetálních vzorcích (Ito, Y., et. al., 2022)

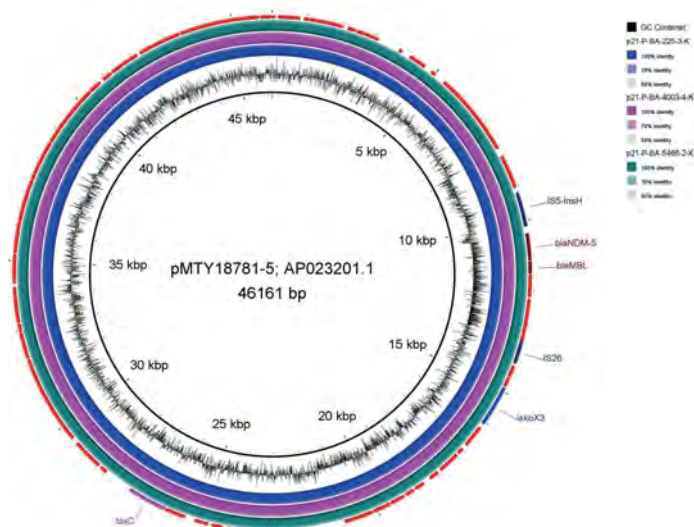
STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Plazmid IncX3 jako nosič genu blaNDM-5



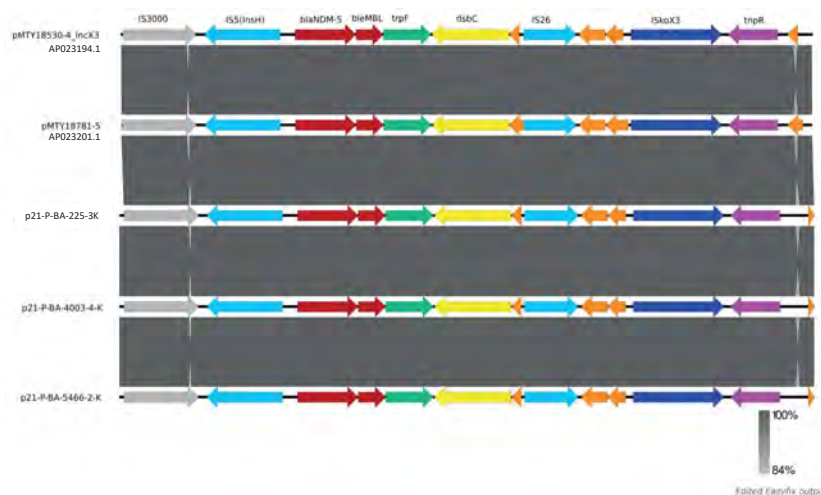
STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Porovnání detekovaných IncX3/blaNDM-5 plazmidů



STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Porovnání topografie IS26-blaNDM-5-IS5-ISAbc125 segmentu



STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Hodnocení – závěr – rizika

- Prvotní výsledky – omezené srovnání
- Složitý multifaktoriální systém
- Potvrzení dřívějších domněnek
- Horizontální přenos
- Vertikální přenos
- Přítomnost odlišných subpopulací
- Perzistence v prostředí
- Křížová kontaminace
- Role selekčního tlaku
- Kritická místa potravinového řetězce
- Identifikace intenzity a četnosti výskytu rizikových faktorů



STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Poděkování

- Kolektiv oddělení bakteriologie
- MVDr. Kateřina Kučerová
- MVDr. Eva Patrasová
- RNDr. Alexander Nagy Ph.D.
- Ing. Lenka Černíková Ph.D.
- Ing. Martina Stará
- Ing. Petr Buřič



STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

Detekce některých parazitárních původců v masných výrobcích pomocí molekulárních metod

Barbora Zalewska, MSc, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. Brno



Parazité

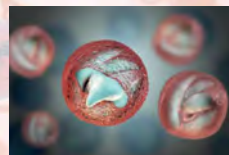
- Nepatří mezi běžně monitorované v mase a masných výrobcích
- Prevalence je častější → citlivější detekční metody
- Molekulární detekce ✗ vizuální inspekce



VUVeL ACADEMY 2022

Cryptosporidium parvum

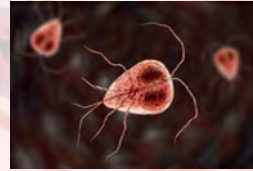
- Intracelulární protozární parazit
- Průjmová onemocnění tenkého střeva
- Velmi odolné oocysty
- Možný přenos na člověka ze špatně tepelně upraveného masa



VUVeL ACADEMY 2022

Giardia intestinalis

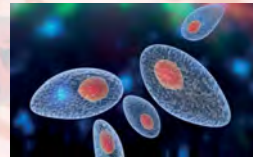
- Protozární, na povrchu střevní sliznice
- Průjmová onemocnění
- Odolné oocysty
- Výskyt hlavně ve vodě, detekce i v živočišných tkáních



VÚVeL ACADEMY 2022

Toxoplasma gondii

- Protozární parazit
- Toxoplasmóza, asymptomatické, potraty a malformace
- Odolné oocysty
- Nákaza i konzumací špatně tepelně opracovaného masa



VÚVeL ACADEMY 2022

Cíl práce

- Detekovat zmíněné parazity užitím molekulárních metod
- Z tržní sítě zakoupeno:
41 vzorků tepelně neopracovaných mletých mas
82 tepelně opracovaných masných výrobků
- Určit možné riziko výskytu



VÚVeL ACADEMY 2022

Zpracování tkání

- Certifikovaná metodika č.44 (Slaný a Lorencová, 2014)
- 25 g na kousky namletého masa či masného výrobku
- Lyzační pufr
- Homogenizace
- Inkubace v lázni přes noc
- Homogenizace
- Supernatant použit pro izolaci DNA, Blood and Tissue Kit Qiagen



VÚVeL ACADEMY 2022

Detekce pomocí real time PCR

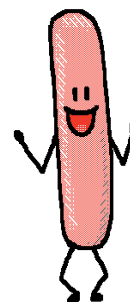
- Kvantitativní PCR systém
- *C. parvum*: hsp70
- *G. intestinalis*: β -giardin
- *T. gondii*: B1 a element 529
- Detekce v duplikátu
- Interní amplifikační kontrola



VÚVeL ACADEMY 2022

Výsledky

- 41 mletých mas tepelně neopracovaných → negativní
- 81 masných výrobků tepelně oppracovaných → negativní
- 1 vzorek klobásy pozitivní na *T. gondii* (50 kopií genomu/g)



VÚVeL ACADEMY 2022

Závěr studie

- Bylo vyšetřeno 123 mas a masných výrobků z tržní sítě
- Prevalence zmiňovaných parazitů v těchto výrobcích je velmi nízká
- Riziko pro konzumenty je minimální



VÚVeL ACADEMY 2022

Poděkování

- Projektu Ministerstva Zemědělství QK1810212
- Dr. Čechové za pomoc s izolací DNA
- Děkuji za pozornost





Copyright:

Výzkumný ústav veterinárního
lékařství, v. v. i. Brno
Hudcova 296/70, 621 00

Tel.: +420 773 756 631
E-mail: vri@vri.cz

www.vri.cz