

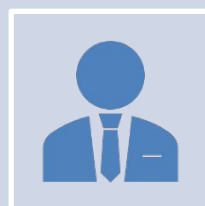
Potenciál fágů při řešení problematiky antibiotické rezistence v environmentálním prostředí



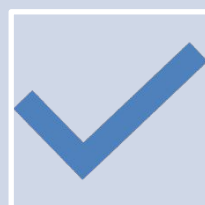
Josef Boštík, Juraj Vronka¹ a Ladislava Matějů²

1. AUMED, a.s., Praha, CEO

2. Státní zdravotní ústav, Laboratoře hygieny půdy a odpadů



Vzhledem k tomu, že se rezistence vůči antibiotikům stává stále více globálním problémem, dostává se pod kontrolu také role odpadového hospodářství v kontaminaci Životního prostředí a v šíření rezistentních bakterií.



Bakteriofágy nebo fágy se objevují jako slibný nástroj v boji proti tomuto problému, který nabízí přirozený a cílený přístup k regulaci bakterií odolných vůči antibiotikům v odpadech a v již kontaminovaných prostředích.



Environmentální prostředí a jeho role v AR

Pojem environmentálního prostředí:

- Kombinace přírodních složek (vzduch, voda, půda) a antropogenních prvků (urbanizace, infrastruktura).
- Interakce mezi těmito složkami (ekologické vztahy, biodiverzita, toky materiálů, lidské aktivity a jejich dopady).

Hlavní motory rostoucí krize AR



Nadužívání antibiotik

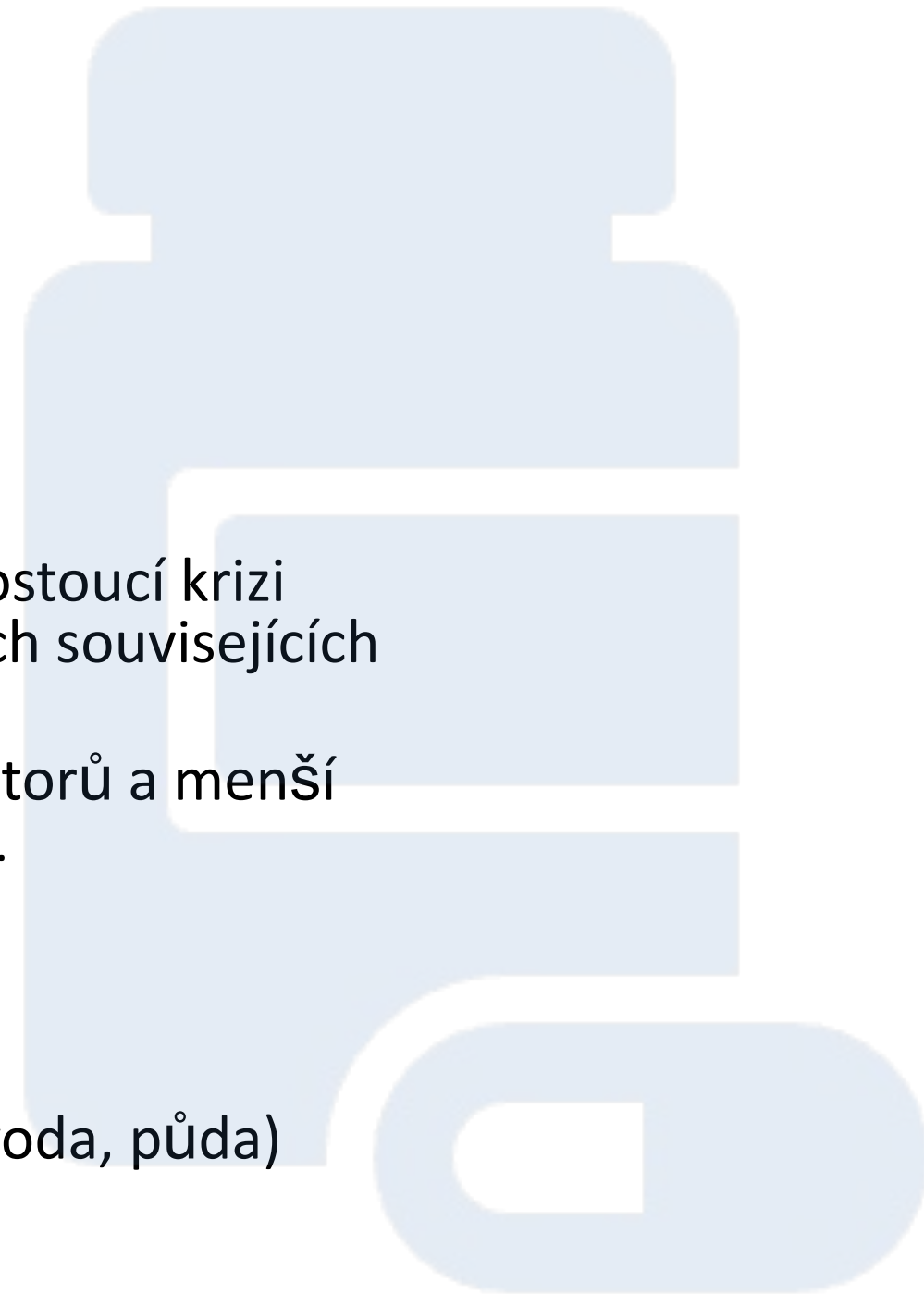
- vedle medicínské sféry významně přispělo k celosvětově rostoucí krizi antibiotické rezistence také nadužívání antibiotik v činnostech souvisejících s chovem zvířat a navazující veterinární péčí.
- Vedle rutinního používání antibiotik jako růstových stimulátorů a menší motivace farmaceutického průmyslu vyvíjet nová antibiotika.
- Významné rozdíly v regulaci antibiotik mezi regiony

Důsledky

Důsledkem je uvolňování antibiotik do životního prostředí (voda, půda) cestou různých odpadů.

Selekční tlak na bakterie již přítomné v přírodě

- Zvýšená schopnost předávat rezistentní geny zvláště v těch segmentech, které charakterizuje špatná hygiena a nevhodná sanitace





Dopady AR v Životním prostředí

Vodní hospodářství:

- Přítomnost rezistentních bakterií v řekách, jezerech a oceánech.
- riziko pro zdroje pitné vody a zavlažovací systémy

Půdní ekosystémy:

- Rezistentní bakterie přenášené prostřednictvím kejdy, kompostu a biologického odpadu z velkovýrob
- Ovlivnění půdního mikrobiomu, což může mít dopad na růst plodin a ekologické procesy.
- přenos rezistence mezi domestikovanými a divokými zvířaty a následné změny v mikrobiálních komunitách

Výsledek

Vstup AR do potravinového řetězce:

- Rezistentní bakterie pronikají do potravinového řetězce prostřednictvím zemědělských produktů, potravin, kontaminované vody.

Využití fágů pro snížení selekčního tlaku



Fágy lze využít

- k redukci rezistentních bakterií z kontaminovaných vodních zdrojů a půdy (Bioremediace kontaminovaných oblastí).
- k eliminaci rezistentních bakterií v rizikových prostředích (např. nemocnice, farmy)
- k úpravě mikrobiálních komunit způsobem, který snižuje prevalenci rezistentních genů
- k cílení na mechanismy přenosu rezistence např. vývojem fágů, které specificky cílí na bakterie nesoucí plazmidy s geny rezistence
- evolučně informovaný design fágů (vývoj fágů pro zvýšení jejich účinnosti proti specifickým bakteriím, optimalizace hostitelského spektra, snížení rizika rezistence)
- použití fágů k narušení bakteriálních biofilmů - rezervoáry rezistentních bakterií
- využití fágů jako bioindikátorů pro sledování úrovně rezistence v různých prostředích

Výhody fágů

- bakteriofágy mají tendenci přetrvávat v Životním prostředí a jsou středně odolné vůči přírodním a antropogenním stresorům
- Mohou se replikovat pouze uvnitř vnímavých hostitelských bakterií
- Daný bakteriofág může infikovat pouze určité bakterie - různé kmeny téhož druhu se liší svou citlivostí k útoku bakteriofága.
- Některé fágy jsou vynikajícími indikátory, protože obvykle přetrvávají v prostředí déle než bakterie (např. Somatické a F-specifické kolifágy)
- V případě výskytu kolifágů mohou být v prostředí přítomny další viry, ale v nižších koncentracích. Sledování pomocí tohoto virového indikátoru tedy může zabránit některým onemocněním souvisejícím s lidskými viry.

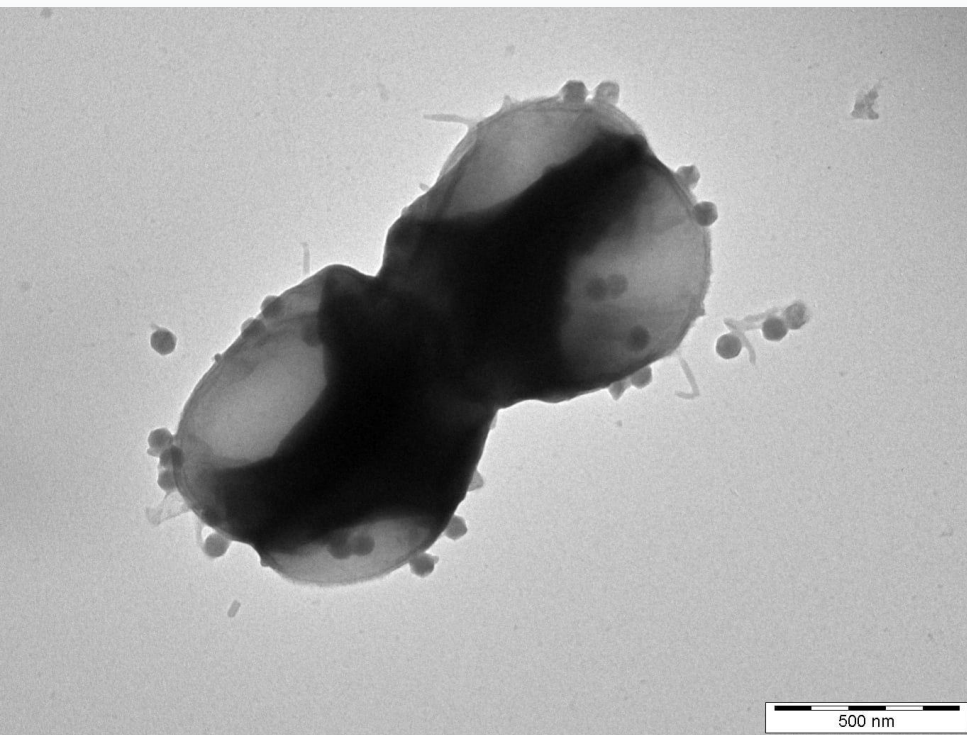


Foto: doc. Ing. Jitka Viktorová, Ph.D.

Kritické oblasti odpadového hospodářství



Čistírny odpadních vod (ČOV):

Rezistentní bakterie přežívají proces čištění a pronikají do vodních systémů.

Skládky odpadu:

Antibiotika a rezistentní bakterie mohou unikat do podzemních vod.

Nemocniční odpady:

Vysoce koncentrované patogeny jako MRSA a VRE.

Zemědělské odpady:

Biologické odpady, kejda a kompost přenášejí AR do půdy.

Farmaceutický průmysl

Některé technologie: (vzduchotechniky, myčky, pračky...)



Využití fágů k cílené dekontaminaci prostředí s výskytem rezistentních bakterií (v odpadovém hospodářství)

- Aktuální je těžba ropy nebo plynů z břidlic, při které se pracuje s ohromným množstvím odpadních vod. Např. jenom v ložisku Permian se za jeden rok pohybuje objem produkováných odpadních vod v objemu $210\,222 \times 10^6$ litrů. Tyto vody, spojené s frakováním, aktuálně obsahují mimo jiné velké množství bakterií s širokou škálou rezistencí, které lze velmi obtížně redukovat běžnými chemickými činidly.
- **Pro eliminaci rezistentních bakterií v těchto průmyslových vodách se ukázaly jako potenciálně účinné a průmyslově využitelné fágy proti *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus megaterium*.**
- Tento přístup může být užitečný pro další vývoj nových procesů čištění odpadních vod, které minimalizují prevalenci zejména nově vznikajících bakteriálních patogenů, které opakovaně získávají nové faktory rezistence od jiných druhů.
- K vymýcení bakteriálních komunit v průmyslových odpadních vodách bylo v průběhu let použito mnoho způsobů čištění. Oxidační činidla a chemické přísady, jako je ozón, manganistan, glutaraldehyd a chlór, účinné při čištění mikrobiálních kontaminantů v odpadních vodách z domácností, nemusí však fungovat u průmyslových kontaminantů.

Využití fágů k cílené dekontaminaci prostředí s výskytem rezistentních bakterií (v odpadovém hospodářství)

Čištění odpadních vod typu zemědělských odtoků

- Tento typ zahrnuje - zavlažované pole, živočišné farmy ale i siláže a hnojiště, včetně drenážních systémů. Ty jsou dalším významným zdrojem antibiotické rezistence v životním prostředí.
- **Fágy lze použít k úpravě živočišného odpadu a zemědělských odpadních vod** před tím, než se dostanou do vodních systémů, což pomáhá omezit šíření rezistentních bakterií z farem do širšího prostředí.

Obecný přínos fágů v čistírnách kalů

- Aktivní čistírny kalů trpí poměrně často přítomností vláknitých bakterií, které způsobují objem a **pěnění** na povrchu aeračních reaktorů.

V experimentech v laboratorním měřítku izolované fágy, které infikují bakterie způsobující pěnu, zabránily stabilizaci pěny. Již bylo vytypováno zhruba 7 lytických fágů, které by měly snížit počet problematických bakterií.

- Stále častěji se v ČOV používají různé membránové metody. Komplikací je, že jejich provoz může být narušen vznikem **bakteriálních biofilmů**, což má za následek ztrátu průtoku.

Při řešení tohoto problému byly opět úspěšně testovány lytické fágy a prokázaly slibné výsledky v inhibici bakteriálního znečištění membrán.

Využití fágů k cílené dekontaminaci prostředí s výskytem rezistentních bakterií (v odpadovém hospodářství)

Skládka odpadů



Skládka bývá významným zdrojem znečišťujících látek, jako jsou organické polutanty těžké kovy a amoniakální dusík, viry a bakterie odolné vůči antibiotikům, včetně genů antibiotické rezistence, aktivátory rezistence bývají i nepoužitá a nechtěná léčiva .

Tyto znečišťující látky prosakují do blízkého prostředí, bývají přenášeny do dalších ekologických oblastí a mohou ohrozit životní prostředí a zdraví ekosystémů.

Ošetření skládky vhodným fágovým koktejlem může významně zredukovat únik patogenních rezistentů do okolí.

Využití fágů k cílené dekontaminaci prostředí s výskytem rezistentních bakterií (v odpadovém hospodářství)

Nemocniční odpady

Je objevován potenciál fágů také při kontrole šíření bakterií odolných vůči antibiotikům ve zdravotnických zařízeních.

- **fágy** zde mohou být použity **k dekontaminaci** povrchů, lékařského vybavení a dokonce i kolonizovaných pacientů
- pomáhají snižovat přenos rezistentních patogenů, jako je methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE).
- Bakteriofágy, jako environmentální dezinfekční prostředky v nemocnicích, přispívají k redukci šíření rezistence v zařízení a k redukci rezistentních patogenů v produkovaných odpadech.

Nemocniční povrchy bývají trvale kontaminovány několika patogeny, které bývají hlavní příčinou přenosu tzv. infekcí spojených se zdravotní péčí (**nozokomiální nízky**). (*Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*, včetně methicilin-rezistentního MRSA a *Escherichia coli*).

Běžné dezinfekční prostředky zabíjejí většinu mikroorganismů, včetně potenciálně prospěšných bakterií, což umožňuje nadměrné šíření patogenních a často rezistentních bakterií. **Fágy tuto nevýhodu eliminují!**



Využití fágů k cílené dekontaminaci prostředí s výskytem rezistentních bakterií

Organické odpady ze zemědělství (kejdy, komposty, skládky hnoje...)

- Odpady ze zemědělství obsahují velké množství organických a minerálních látek, využívaných mikroorganismy jako substráty a živiny. Obsahují organismy podílející se na jejich rozkladu a často také rezistentní formy mikroorganismů.
- Rezistentní mikroorganismy jsou přenášeny přímým kontaktem s nebezpečnými odpady nebo zprostředkovaně, přes půdu, vodu a potravinové řetězce, případně přenosem hmyzem nebo hlodavci.
- **Fágy mají potenciál řešení tohoto problému**

Příklad: Pracoviště mikrobiologie z Oddělení hygieny půdy a odpadů Státního zdravotního ústavu monitoruje zmíněné typy odpadů. Společnost AUMED, a.s je subjektem, který disponuje know how v tématice bakteriofágů. Proto se tyto dva subjekty spojily a již navrhly **projektové řešení, které zahrnuje monitoring nebezpečných rezistentních patogenů v tomto typu odpadů, vývoj fágových kmenů kompatibilních s nalezenými patogeny a návrh průmyslově využitelných přípravků na bázi fágů, které by významně redukovaly obsah rezistentních mikroorganismů v tomto segmentu odpadového hospodářství.**

Farmaceutický průmysl



Riziko farmaceutického průmyslu jako zdroje antibiotické rezistence spočívá v několika klíčových aspektech:

- Nedostatečné čištění odpadních vod z výroby
- Nesprávná likvidace výrobního odpad
- Nedostatečné investice do čistících technologií
- Různé standardy v různých zemích
- Nedostatečná edukace o správném používání
- Omezená zodpovědnost za environmentální dopady

I v tomto segmentu lze k redukci bakteriální zátěže rezistentního typu využít fágové přípravky. Jejich snadnější využití je hlavně u těch subjektů, které dlouhodobě pracují s konkrétními bakteriálními kmeny.

Využití fágů v monitoringu Životního prostředí

Fágy se úspěšně využívají v systémech monitorování Životního prostředí, k detekci a kvantifikaci bakterií odolných vůči antibiotikům v různých vzorcích Životního prostředí.

Fágy pomáhají při identifikaci ohnisek rezistence a při vedení cílených intervenčních strategií.

Somatické kolifágy jsou perzistentnější než tradiční indikátory a jsou také odolnější vůči zpracování kalem, zejména pokud jsou adsorbovány na povrchy .

Řada výzkumů preferuje použití bakteriofágů jako indikátorů nejen pro enterické patogenní bakterie, ale také pro střevní viry, jako jsou lidské adenoviry a rotaviry.

Toto směřování je dáno **širokou stabilitou fágů v odpadech, vodě, půdách a reziduích**, přičemž pro monitorování kvality vody se nejvíce používají F-specifické fágy a somatické kolifágy.

Využití fágů k detekci a kvantifikaci bakterií odolných vůči antibiotikům v různých environmentálních vzorcích.

Kolifágy se používají jako fekální indikátory, protože napodobují střevní viry lépe než jakákoli jiná skupina indikátorů,

- splňují podmínky indikátorů, vykazují solidní odolnost a perzistenci ve vodním prostředí a při čištění odpadních vod.
- Atraktivita fágů jako indikátorů spočívá v dostupnosti proveditelných, rychlých a nákladově efektivních metod detekce a v jejich hojném výskytu v odpadních vodách lidského a živočišného původu. Kromě toho lze vzorky uchovávat při teplotě 4 °C po dobu nejméně 48 hodin, aniž by došlo k výrazné změně citlivosti metody.
- Bakteriofágy lze využít pro biologickou kontrolu znečištění membrán v ČOV (především problém biofilmů)
- V zařízení s filtry, membránami nebo jinou technologií poskytuje monitorování bakteriofágů větší bezpečnost než monitorování bakterií, a to vzhledem k jejich velikosti (bakteriofágy jsou menší než bakterie) a jsou přítomny ve větším množství.

Bakteriofágy v potravinové a environmentální mikrobiologii a epidemiologii

Bakteriofágy jsou navrhovány jako signální systémy v potravinové a environmentální mikrobiologii a epidemiologii, protože obecně splňují kritéria indikátorů znečištění.

Bakteriofágy lze použít jako fekální indikátory nebo mikrobiální bioindikátory kvality vody v systému včasného varování před kontaminací odpadními vodami a jako ukazatel účinnosti čištění vody nebo odpadních vod.

Bioremediace

(Použití mikroorganismů ke konzumaci a rozkladu znečišťujících látek v kontaminovaných médiích, včetně vody, půdy a sedimentů..)

V konkrétních případech kontaminace Životního prostředí bakteriemi rezistentními na antibiotika mohou být fágy použity jako bioremediační nástroj.

Mohou být aplikovány na kontaminovaná místa, aby se specificky zaměřovaly na populace rezistentních bakterií a redukovaly je, čímž napomáhají obnově postižených ekosystémů.

Kontrola legionel

Komposty, vzduchotechnika, průmyslové vody

Legionella pneumophila

- V ČR nejvýznamnější/ nejznámější, ve vodním prostředí (vlhko, teplo, mikroflóra, biofilmy...)
- Nebezpečné jsou především aerosoly (nákaza probíhá vdechnutím).
- Kritická zařízení: provzdušňovací nádrže, odpařovací kondenzátory, chladicí věže, systémy teplé a studené vody, vysokotlaké vodní čisticí stroje, vodní trysky k zubařským křeslům, zvlhčovače vzduchu a rozprašovače vody, lázeňské bazény, vyhřívané lázně a vířivky a široce používané vzduchotechnické systémy.

Legionella longbeache - Vyskytuje se především v kompostu, borovicové kůře a pěstebních substrátech, Nákaza probíhá pravděpodobně vdechnutím prachových částic. Riziko onemocnění se zvyšuje se zvyšujícím se věkem a kouřením a u lidí s oslabeným imunitním systémem

Redukce kontaminace rezistentními legionelami ve výše uvedených systémech je opět potenciálně řešitelná kmenově specifickými bakteriofágy.

Enzymy odvozené z fágů

Pro řešení některých případů bakteriální rezistence v Životním prostředí lze využít vedle fágových částic i jejich lytické enzymy.

Některé fágové enzymy se jeví jako slibné alternativy k antibiotikům.

Výhoda:

Tyto enzymy mohou zabíjet bakterie, aniž by podporovaly rezistenci stejným způsobem jako tradiční antibiotika. Lze je připravit standardně jako tradiční přípravky.

Působí i na kmeny rezistentní k fágům z důvodu restriční bariéry - ani po podání opakovaných dávek se nevytváří imunita vůči enzymu

Další praktické využití fágů

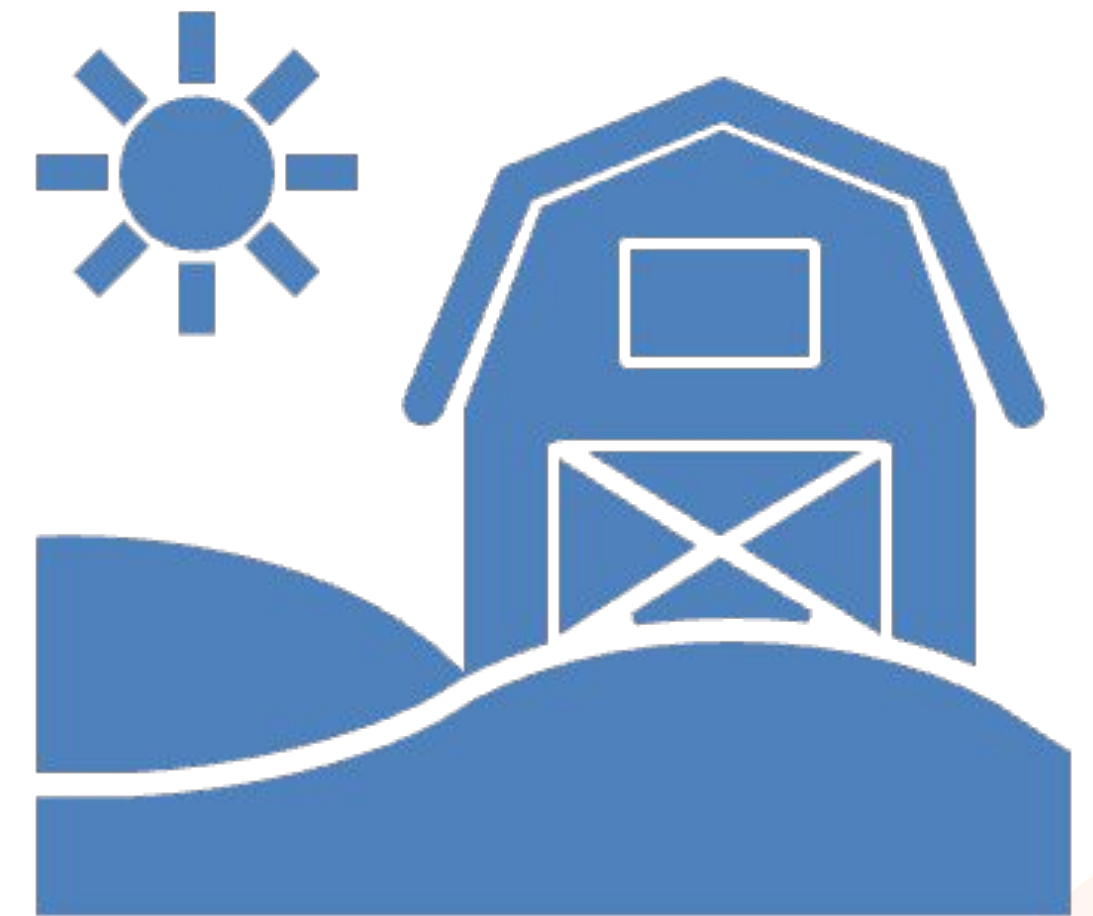
Fágy v zemědělství

Ochrana plodin:

- Biopesticidy na bázi fágů proti rostlinným patogenům (např. *Pseudomonas syringae*).
- Účinnost fágů v ochraně plodin je již komerčně využívána

fágový produkt Agriphage, vyvinutý společností Omnilytics Inc., Sandy, Utah, obsahuje specifické bakteriofágy proti *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* a *Pseudomonas syringae* bakterie zodpovědné za bakteriální skvrny a skvrny v rajčatech a paprikách

- další produkt AgriPhage-Fire Blight od stejného výrobce se používá proti spále u jablek a hrušek (způsobené *Erwinia amylovora*) .



Další praktické využití fágů

Fágy v chovu hospodářských zvířat

- **Snížení potřeby antibiotik u hospodářských zvířat díky fágové terapii.**

V chovu zvířat nabízejí fágy cílený přístup ke kontrole bakteriálních infekcí, aniž by se spoléhaly na antibiotika. Je studováno použití k léčbě běžných onemocnění hospodářských zvířat způsobených bakteriemi rezistentními na antibiotika, jako je mastitida u dojnic nebo kolibacilóza u drůbeže.

Fágová terapie může významně pomoci zpomalit vývoj a šíření bakterií odolných vůči antibiotikům v prostředí farmy.

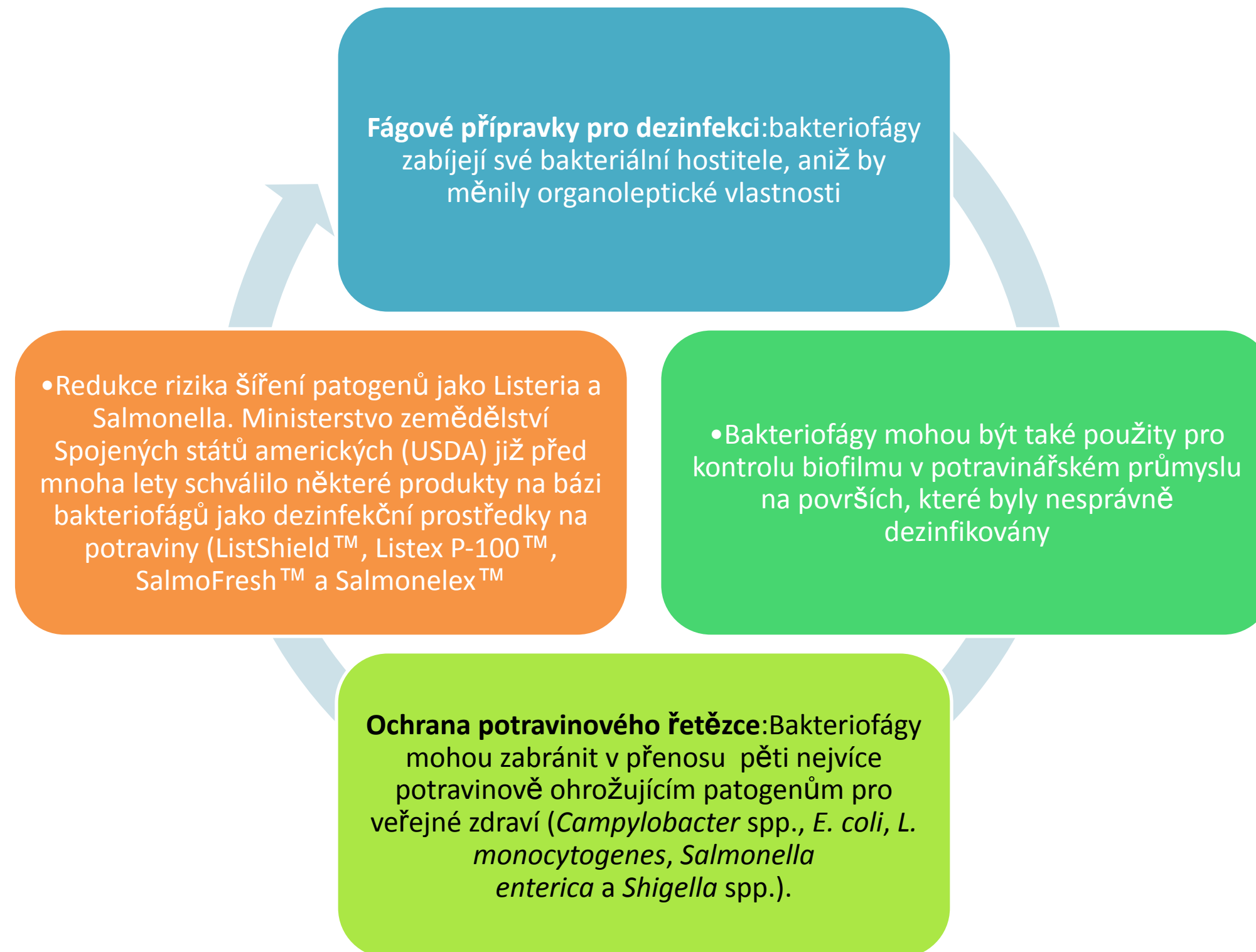
Akvakultura:

- **Kontrola infekcí u ryb, např. *Vibrio* spp., bez nutnosti použití antibiotik.**

Některé bakteriální druhy, patřící do rodů *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* a *Vibrio* představují hlavní bakteriální patogeny kultivovaných ryb a měkkýšů a pokud jsou přenášeny kontaminovaným jídlem, mohou vyvolat onemocnění.

Je popsána schopnost fágů kontrolovat bakteriální infekce v akvakultuře jako vynikající a proveditelná alternativa k léčbě antibiotiky.

Bezpečnost potravin



Fágy a bezpečnost potravin - příklady

Počet komerčních roztoků obsahujících bakteriofágy celosvětově roste (rozvíjející se odvětví a oblast výzkumu).

Konkrétní příklady použití fágů

- koktejl tří bakteriofágů (obsahující EC6, EC9 a EC11) nebo bakteriofág FO1-E2 sníží významně kontaminaci *E. coli*; *E. coli* ATCC 25922 a *E. coli* O127 přítomných v mléce a smíšených mořských plodech již za 24 hodin
- Koktejl EcoShield™ dokáže snížit obsah *E. coli* po podání na zeleninu skladovanou v obalech (brokolice, meloun cantaloupe a jahody).
- Aplikace bakteriofágových koktejlů (EcoShield™, SalmoFresh™ a ShigActive™) je stejně účinná nebo dokonce účinnější než mytí chlorem (ošetření klíčících semen)
- *Salmonely*, které jsou hlavní hrozbou pro potravinářský průmysl a nejběžnějším zoonotickým potravinovým patogenem izolovaným z hospodářských zvířat lze redukovat bakteriofágem např. na kuřecí kůži.

Fágy v environmentálním managementu -souhrn

Fágy mohou pomoci zredukovat bakterie odolné vůči antibiotikům v zemědělském prostředí, například v půdě nebo ve vodních systémech. Tato aplikace může omezit další šíření rezistentních bakterií potravním řetězcem a i do širšího přírodního okolí.

V boji proti antimikrobiální rezistenci považují využití bakteriofágů, jako alternativy k antibiotikům, za přístup s velkým potenciálem, který je využitelný i v bioremediaci životního prostředí.

Využití bakteriofágů v environmentální problematice považují za ekologicky šetrný přístup, který je méně nákladný než tradiční metody, využívané v oblasti čištění vody, půdy, technologií a k redukci obsahu rezistentních patogenů v širokém spektru produkovaných odpadů, kontaminujících životní prostředí.

Děkuji za pozornost.

V boji proti antimikrobiální rezistenci považují využití bakteriofágů za ekologicky šetrný přístup, jako alternativu k antibiotikům, která je využitelná vedle humánní a veterinární medicíny i v bioremediaci životního prostředí - v širokém spektru rezistentních patogenů kontaminujících odpady.

