

## 第 376 回雑誌会

(July. 20, 2022)

### (1) Prevalence of enteric opportunistic pathogens and extend-spectrum cephalosporin-carbapenem-resistant coliforms and genes in wastewater from municipal wastewater treatment plants in Croatia

Puljko, A., Milaković, M., Križanović, S., Kosić-Vukušić, J., Babić, I., Petrić, I., Maravić, A., Jelić, M. and Udiković-Kolić, N.

Journal of Hazardous Materials, **427**, 128155, (2022).

Reviewed by K. Tsuda

臨床環境と非臨床環境の両方において、薬剤耐性菌 (ARB) とその薬剤耐性遺伝子 (ARG) の出現と拡散が加速しており、第 3 世代セファロスポリン (ESC) やカルバペネム系などの  $\beta$ -ラクタム系抗生物質に対する細菌の耐性が高まっていることが世界的に問題になっている。下水処理場 (WWTP) は、腸内日和見病原体 (EOP) や ARG の水平伝移のホットスポット、ならびに環境中にそれらを拡散させる供給源と考えられている。しかし、クロアチアの下水における ESC およびカルバペネム耐性 (CR) の蔓延に関連する ARG および EOP の情報は、ほとんど得られていない。そこで本研究では、クロアチアの 7 都市の WWTP の流入・放流水中の ARB/ARG および EOP を 2 シーズン (冬と夏) にわたって比較した。採取したサンプルは、0.85% NaCl で連続的に希釈し、滅菌済みフィルター (0.22  $\mu\text{m}$ ) でろ過した。次に、フィルターを Rapid' *E. coli* 2 寒天培地で培養し、非耐性大腸菌群 (*E. coli*, 非 *E. coli*) を計数した。また、セファタキシム (CTX) を 4mg/L 添加した Rapid' *E. coli* 2 寒天培地を用いてセファタキシム耐性 (CTX-R) 大腸菌群も計数した。CR 大腸菌群は、CHROMagar mSuperCARBA 寒天培地を用いて計数した。加えて、qPCR により、2 種類の ESBL 遺伝子 (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-32</sub>), 5 種類の CP 遺伝子 (*bla*<sub>KPC-3</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OX4-48-like</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>), 総菌数のマーカーとして 16S rRNA 遺伝子のコピー数を測定した。さらに、EOP (*yccT*: *E. coli*, *gltA*: *K. pneumoniae*, *secE*: *A. baumannii*, 23SrRNA: *Enterococcus* spp.) の遺伝子のコピー数も測定した。

非耐性大腸菌群, CTX-R および CR の大腸菌群は、ほとんどの WWTP において従来の処理で有意に減少したが、 $10^2$  CFU/100 mL 以上で存在した。*K. pneumoniae* や *A. baumannii* などの EOP は、ほとんどの WWTP で効率的に除去された。一方で *E. coli* と *Enterococcus* spp. は減少したものの、放流水中に比較的高濃度で存在した。ESBL 遺伝子 (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-32</sub>) は、処理後にわずかに減少または増加した。CP 遺伝子のうち *bla*<sub>KPC-3</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OX4-48-like</sub> は散発的に検出された。*bla*<sub>IMP</sub> と *bla*<sub>VIM</sub> は処理後増加し、処理場の規模、集水域の病院の数または規模、放流水の化学的酸素要求量と相関していた。この結果は、廃水処理技術の改善が必要であることを示唆している。

## (2) Detecting genes associated with antimicrobial resistance and pathogen virulence in three New Zealand rivers

Davis, M., Midwinter, A.C., Cosgrove, R., and Death, R.Z.

Science of the Total Environment, **775**, 145846 (2021).

Reviewed by R. Matsuyama

薬剤耐性菌による感染症は世界的な衛生問題となっているが、環境中に放出された細菌に対する情報は少ないのが現状である。特に畜産場を流域に持つ河川においては、病原性大腸菌や薬剤耐性大腸菌などの流出が懸念されるため、微生物の分析が必要である。しかしながら微生物の分析は、培養する方法に依存しているため、調査に時間や費用を要する。そこで本研究では、代替手段としてニュージーランドに位置する3河川から環境DNA (eDNA) を抽出し、PCRによって病原性遺伝子と薬剤耐性遺伝子を評価した。対象河川は、畜産場が流域に存在する3河川とし、秋(5月)と春(9月)にわたって2季に分けて、畜産場の上流と下流の2地点において水試料1Lと底質堆積物25gを採取した。水試料中のeDNAは、試料500mLを通水後、Nucleospin soil kitを用いて抽出した。同様に、堆積物中のeDNAは、試料0.5gを1サンプルとしてNucleospin soil kitを用いて抽出した。その後、抽出したeDNAは、qPCR法によって定量した。qPCRの対象とした遺伝子は、大腸菌普遍遺伝子である *uidA*, 病原性に関連する遺伝子である *stx1*, *stx2*, *eae*, 血清型に関連する遺伝子である O157 *rfbE*, O26 *wzy*,  $\beta$ ラクタマーゼに関連する遺伝子である *bla*<sub>CTX-M</sub> の7つとした。

大腸菌の普遍的遺伝子である *uidA* はすべてのサンプルから検出されたが、その他の遺伝子は、季節や基質によって異なった。春と秋の調査では、病原性遺伝子 (*stx1* か *stx2* および *eae*) が3河川において、上流と下流合わせてそれぞれ66%と25%の検体から検出された。*bla*<sub>CTX-M</sub> は、春の調査時のみに、33%の検体から検出された。この結果は、周辺農家における抗生物質の使用量を反映している可能性がある。いずれの河川においても、下流のサンプルから対象遺伝子が全体的に多く検出された。また、水試料よりも堆積物から検出された対象遺伝子の方が多かった。しかしながら、河川によっては、検出される遺伝子の変動している場合も見受けられた。以上の結果から、水試料のみによるモニタリングでは、河川の利用者に対する微生物の曝露リスクは、評価できない可能性があることが示唆された。環境DNAによる遺伝子評価は、細菌の培養による分析の代替手段となり得る。