



RESEARCH PLATFORM
ON ANTIBIOTIC RESISTANCE
SPREAD THROUGH WASTEWATER
TREATMENT PLANTS

Projekt REPARES: parametry qPCR kvantifikace genů antibiotické rezistence v čistírnách odpadních vod

Sabina Purkrtová², Stanislav Gajdoš¹, Marco Antonio Lopez Marin¹, Bukola Lois Ojobe¹, Klára Škodáková¹, Kateřina Hanáková², Milada Šolcová², Dana Kok¹, Lucie Pokorná¹, Jan Bartáček¹

1) VŠCHT ÚTVP, Technická 5, Dejvice, 166 28 Praha 6

2) VŠCHT ÚBM, Technická 5, Dejvice, 166 28 Praha 6

Rezistence k antibiotikům

- Šíření antibiotické rezistence řadí Světová zdravotnická organizace (WHO) mezi hlavní světové hrozby současnosti
- Za tuto antibiotickou rezistenci jsou odpovědné jednotlivé geny antibiotické rezistence (ARG), které se vyskytují v genomu bakterií rezistentních k antibiotikům (ARB)
- ARG se vyskytují v přírodě i přirozeně (rezervoár: zvláště půdní bakterie)
 - nesprávné používání antibiotik u lidí a zvířat zvyšuje četnost výskytu ARG a urychluje jejich šíření
 - důsledek: ATB používaná k léčbě jsou méně účinná
 - delší pobyt v nemocnici, vyšší náklady na léčbu, zvýšená úmrtnost
- K šíření ARB a ARG poté dochází zvláště v takových prostředí jako jsou nemocnice, čistírny odpadních vod, půda, potraviny a další



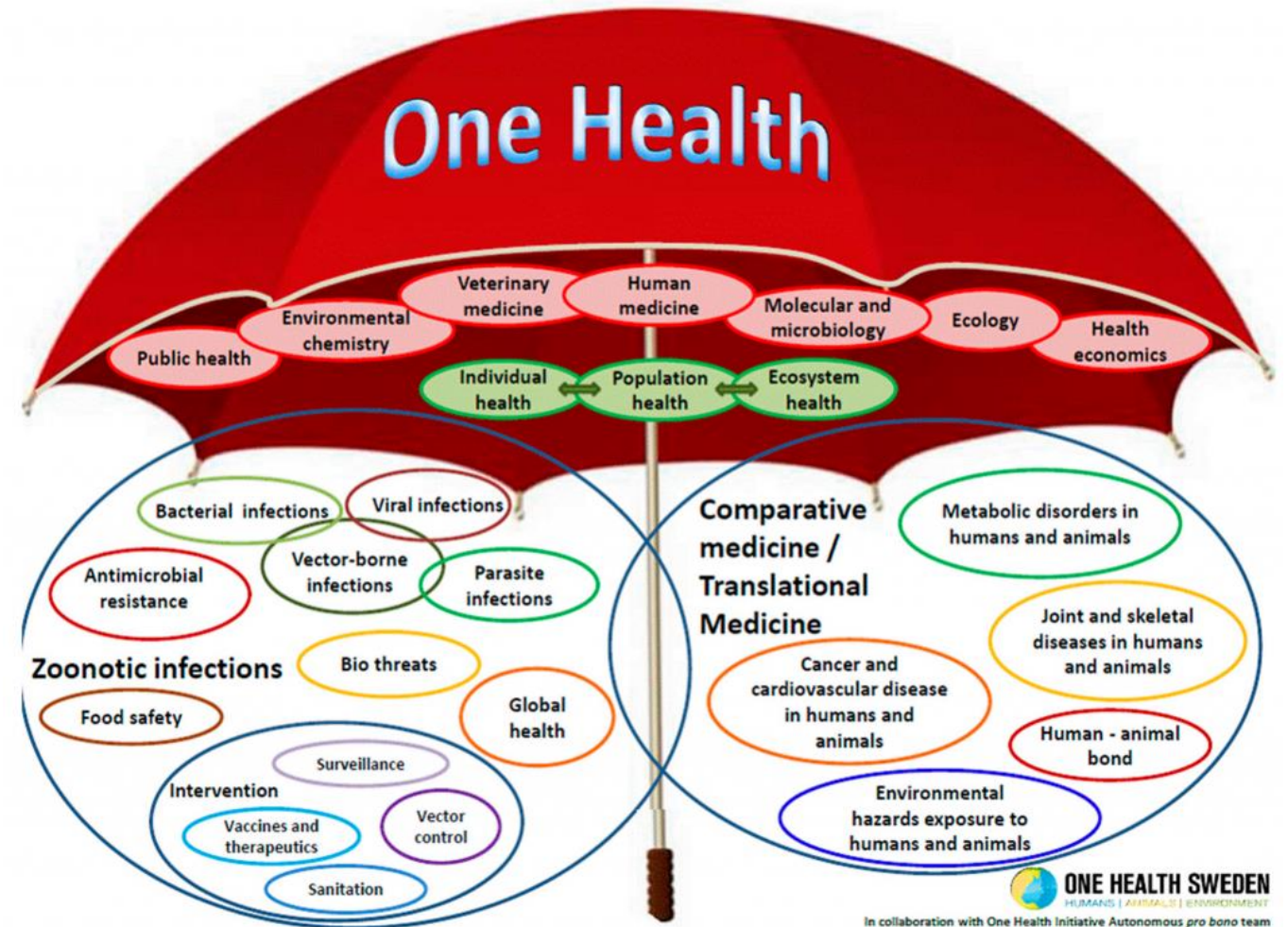
<https://phys.org/news/2019-06-antibiotic-resistance-people-drugs-bacteria.html>

Global Impact of Antimicrobial Resistance on Human Health



https://healthcare-in-europe.com/media/story_section_gallery/168/image-02-amr1_hires.jpg

- antibiotická rezistence je globální problém
- vyžaduje mezinárodní spolupráci a koordinaci
- globálního monitorování výskytu zvláště ARG
 - identifikovat zdroje, rezervoáry a cesty šíření
 - zavést a použít metod dostupné a srovnatelné mezi jednotlivými státy
- monitorování je součástí konceptu **One Health (Jedno zdraví) (WHO)**
- koncept pro mezinárodní interdisciplinární spolupráci pro dosažení optimálního zdraví člověka, zvířat a životního prostředí
- vyhodnocení dvou typů rizik spojených s ARG a ARB
 - riziko jejich šíření napříč různými složkami životního prostředí
 - riziko přenosu na člověka



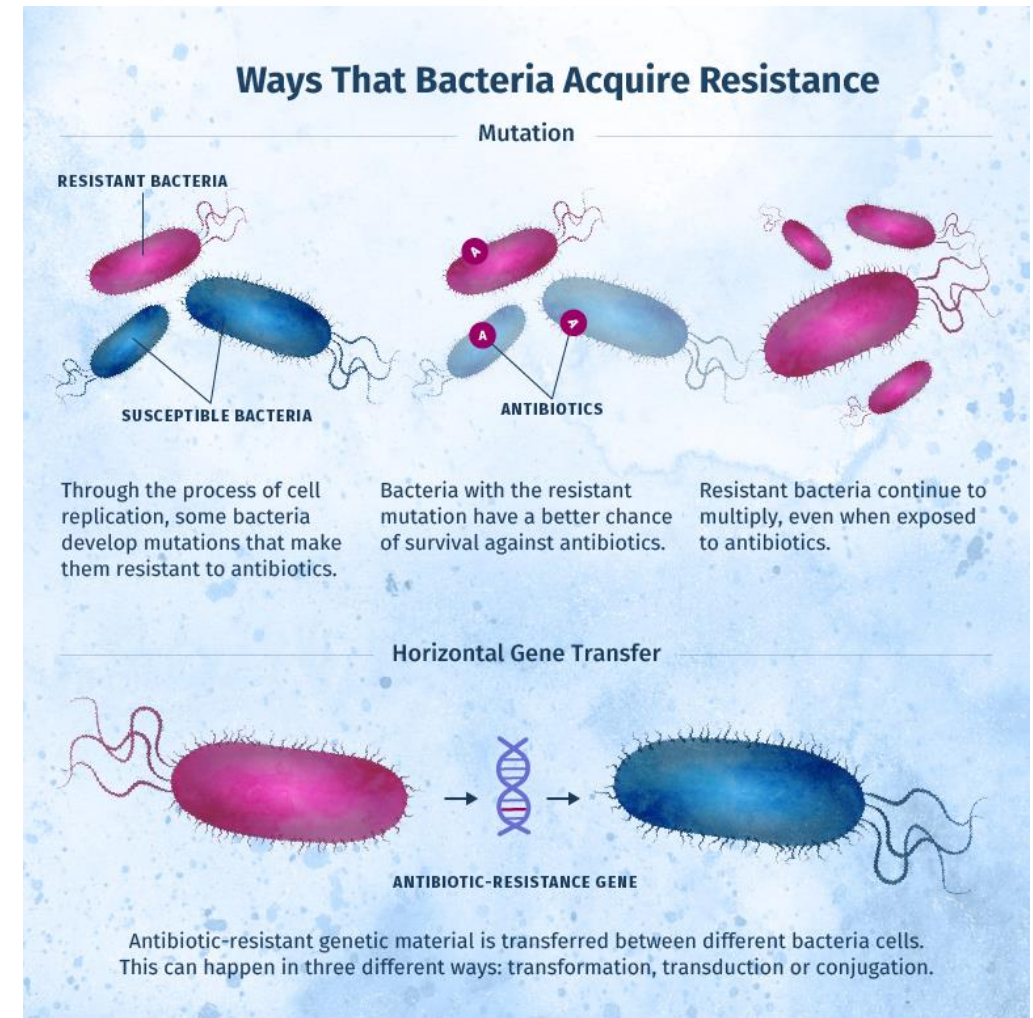
<https://nipahvaccine.com/one-health/>



RESEARCH PLATFORM
ON ANTIBIOTIC RESISTANCE
SPREAD THROUGH WASTEWATER
TREATMENT PLANTS

ATB rezistence a ČOV

- ČOV významné ohnisko (tzv. hotspot) a důležitý rezervoár pro šíření ATB rezistence v prostředí
- uvolňování ATB do odpadních vod
- výskyt ARB i ARG z různých zdrojů (environmentální, lidské, zvířecí)
- vhodné podmínky pro proliferaci ARB a tím i ARG
- hojnost zdrojů živin
- přítomnost částic, na které se mohou bakterie adsorbovat
- poměrně stabilní pH a teplota
- přítomnost reziduí antimikrobiálních látek, kovů a dalších kontaminantů
- vhodné podmínky pro horizontální přenos ARG mezi různými bakteriálními skupinami



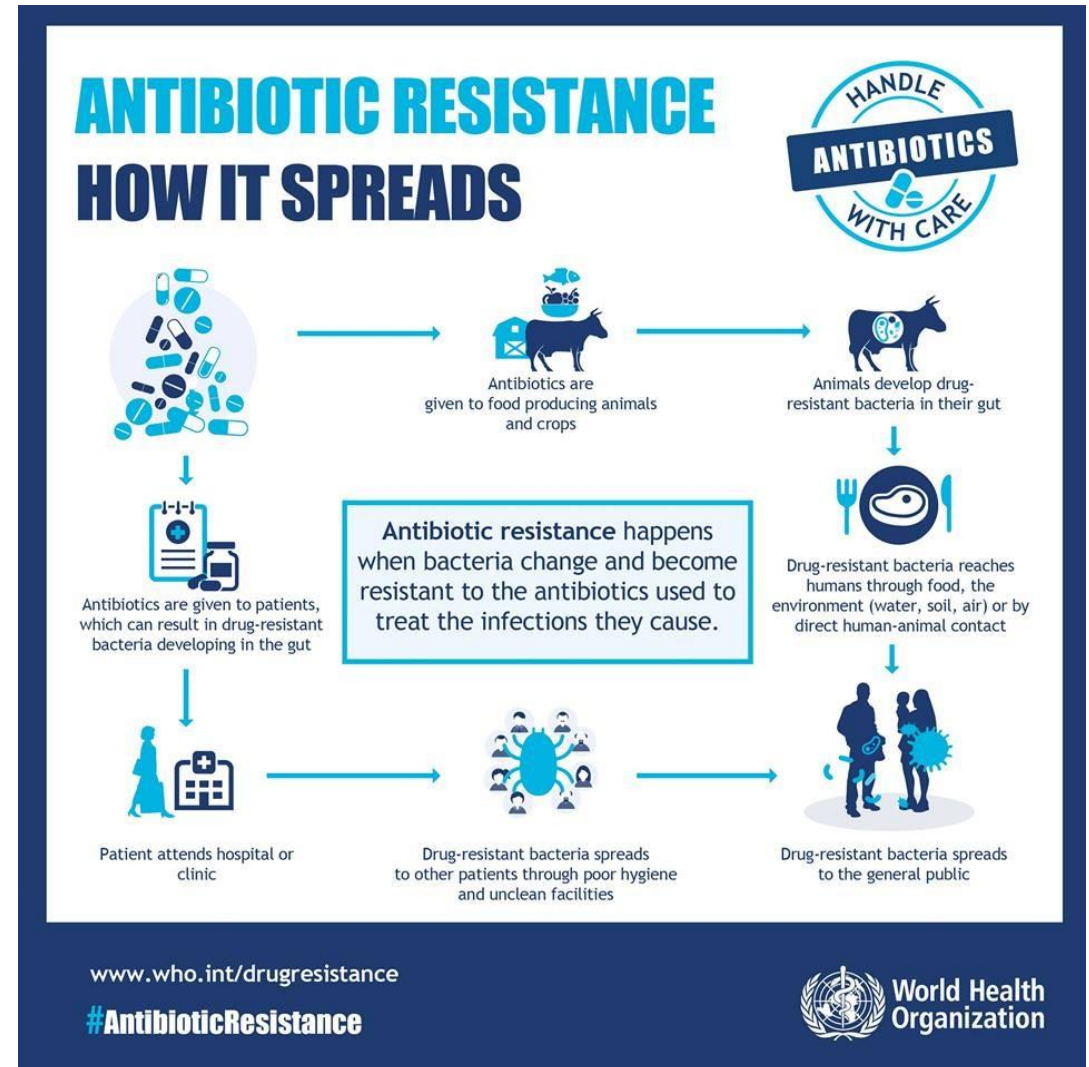
<https://onlinepublichealth.gwu.edu/resources/antibiotic-resistance-at-cellular-level/>



RESEARCH PLATFORM
ON ANTIBIOTIC RESISTANCE
SPREAD THROUGH WASTEWATER
TREATMENT PLANTS

- Čištění odpadních vod mohou být cestou dalšího šíření nebo naopak bariérou pro další šíření ARG a ARB
- Závisí na použitých technologiích
 - konvenční čistící procesy jsou schopny významně snížit ARB, ale nejsou účinné při odstraňování ARG)
- Závisí na využití produktů ČOV (např. použití kalů jako hnojiv)
- Rostoucí zájem ohledně výskytu a osudu ARB a ARG v systémech ČOV a jejich ekologii a ohledně metod pro jejich detekci a kvantifikaci
- Vhodné a spolehlivé metody jsou zásadní pro zavedení nových kritérií kvality vody nebo kalů z hlediska přítomnosti ARB a ARG a jejich monitorování

ATB rezistence a ČOV



who.int/drugresistance



Projekt REPARES



<https://repares.vscht.cz/>

- REPARES (**R**esearch **p**latform on **a**ntibiotic **r**esistance spread through wastewater treatment plants) (H2020-EU.4.b. ID 857552)
- říjen 2019 - září 2022
- tzv. twinning projekt v rámci programu Horizon 2020 pro podporu excellence a konkurenceschopnosti tzv. widening countries

REPARES konsorcium

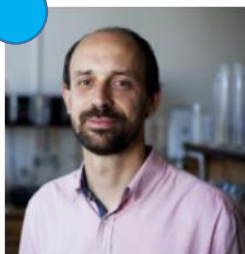
- **VŠCHT v Praze (UCT Prague) – koordinátor projektu** (prof. J. Bartáček)
- Universidade Católica Portuguesa Porto (Portugalsko)
- Delft University of Technology (Nizozemí)
- Aalborg University (Dánsko)
- University of Warsaw (Polsko)
- výzkumné centrum Wetsus (European centre of excellence for sustainable water technology, Nizozemí)





UCT Prague ([University of Chemistry and Technology in Prague](https://www.vscht.cz))

UCT PRAGUE



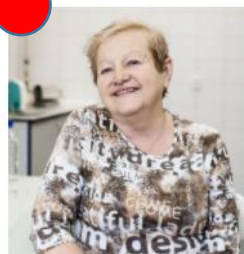
Jan Bartáček
Project investigator



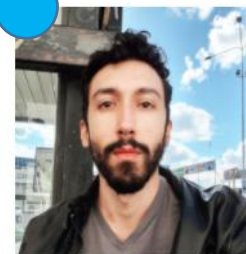
Lucie Pokorná
Project administrator



Sabina Purkrťová
Mobility coordinator



Kateřina Demnerová
Quality Manager



Marco Lopez
WP1 leader



Milada Šolcová



Stanislav Gajdoš



Bukola Lois Ojobe



Dana Vejmelková
(maternity leave)

repare.vsch.cz

Navštivte naše stránky – stále se něco děje 😊



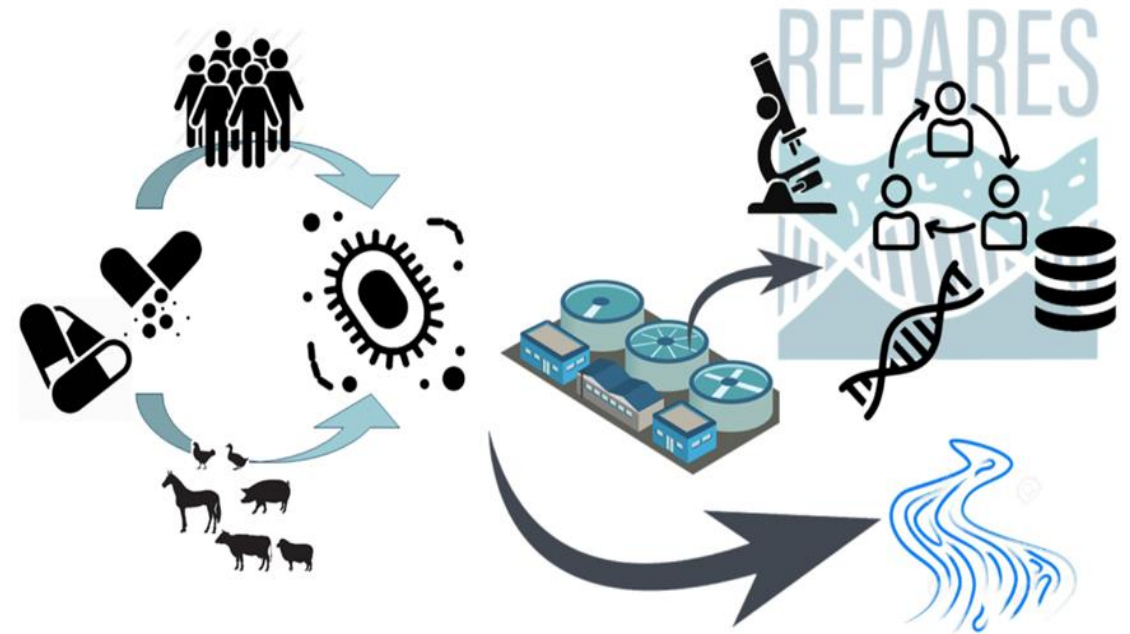
Ústav technologie vody a prostředí



Ústav biochemie a mikrobiologie

Cíle








- vzájemná spolupráce v rámci evropské komunity věnující se tématu antibiotické rezistenci v ČOV a jejího vlivu na člověka a životní prostředí
- sdílení zkušeností a know-how
- tvorba vhodných metodik pro detekci a kvantifikaci ARG v ČOV
- podpora spolupráce s neakademickým sektorem
- zvýšení vědecké excelence VŠCHT Praha
- zvýšení schopnosti VŠCHT Praha se úspěšně ucházet o mezinárodní projekty



Projekt REPARES - aktivity

Aktivita

- výměnné pobyty a stáže (odborné i trénink soft-skills)
- webová platformy pro sdílení nejnovější poznatky o antibiotické rezistenci na ČOV
- semináře, workshopy, letní školy
- popularizační akce a příprava videí
- společné publikace
- sesterské projekty
- příprava společných projektů
- tvorba vhodných metodik pro detekci a kvantifikaci ARG v ČOV
 - vytvoření volně dostupné databáze ARG detekovaných na ČOV
 - **mezilaboratorní srovnávací studie pro tvorbu metodiky kvantifikaci ARG v odpadních kalech a vodách metodou qPCR (Ring test)**

 <p>About the Project</p>	 <p>Who are we here for?</p>	 <p>Antibiotic Resistance</p> <ul style="list-style-type: none"> - What is AR? - How does AR spread? - Information sources - FAQs <p>→</p>
 <p>News & Events</p>	 <p>Exploring wastewater microbiome</p> <ul style="list-style-type: none"> - MiDAS database - Analytical tools <p>→</p>	 <p>Media</p>
 <p>Wastewater Treatment: Barrier against AR spread</p>		

<https://reparres.vscht.cz/>

Ring test - struktura

Vzorek ČOV

- aktivovaný kal
- anaerobní kal
- vyčištěná odpadní voda



Izolace referenční DNA (REF DNA) (VŠCHT Praha)

Cíl: Stanovení počtu kopií genů (CN)



Účastníci



*? Vliv izolace DNA
? Vliv qPCR*

Izolace DNA (LAB DNA)
Analýza LAB DNA

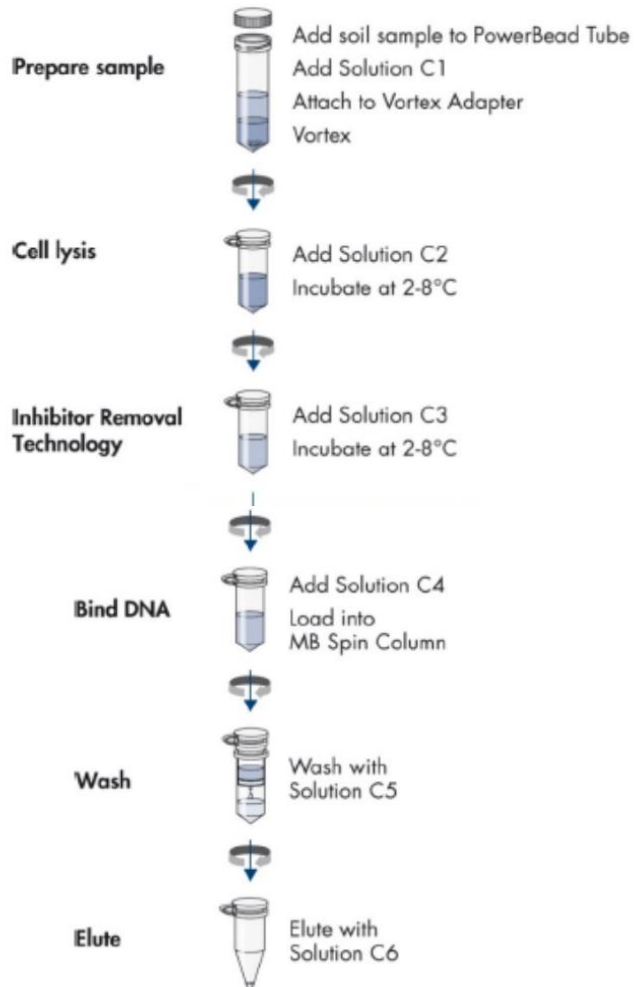
Vliv izolace DNA +
qPCR kvantifikace

Analýza REF DNA

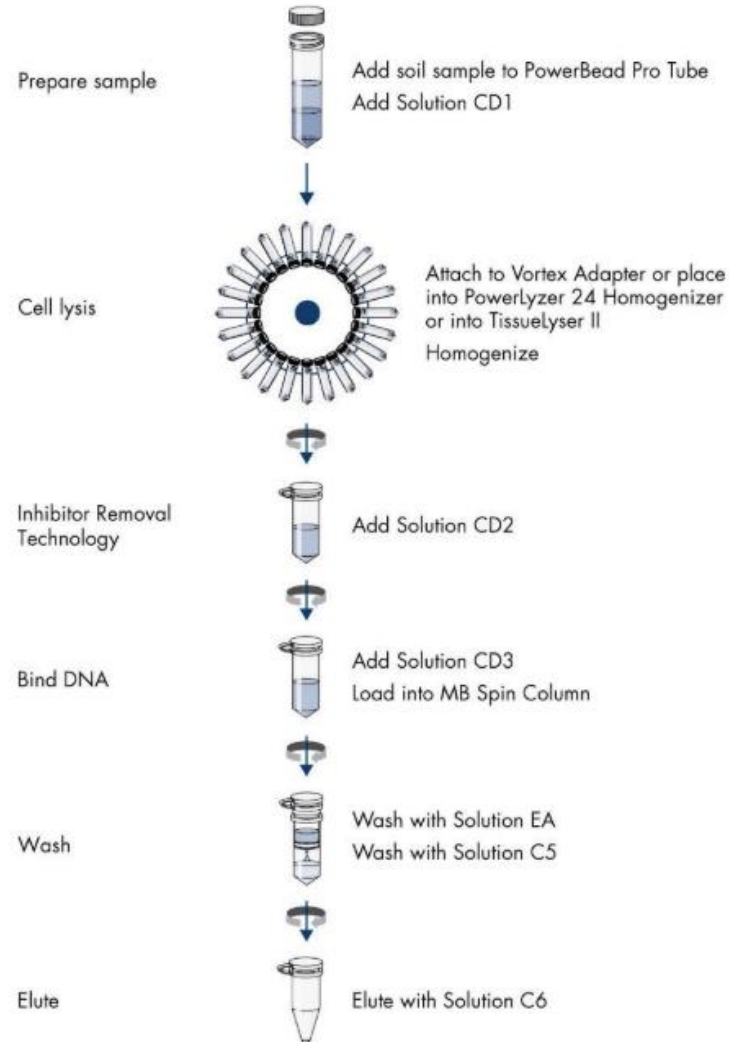
Vliv qPCR kvantifikace



DNeasy PowerSoil Kit [1]



DNeasy PowerSoil Pro Kit [2]



Izolace DNA

Řada PowerSoil kit (QIAGEN)

- pro izolaci „půdě podobných vzorků“
- aktivovaný a anaerobní kal

Izolace DNA

- Odběr vzorku (objem či hmotnost)
- Dezintegrace pomocí kuliček a lýže buněk
- Kolonkové kity – navázání DNA na silikonovou membránu
- Promytí a následně eluce navázané DNA









Kity se mohou lišit

- Složením použitých roztoků
 - účinnost lýže buněk, odstranění inhibitorů qPCR
- Vliv na koncentraci, čistotu a složení získané DNA

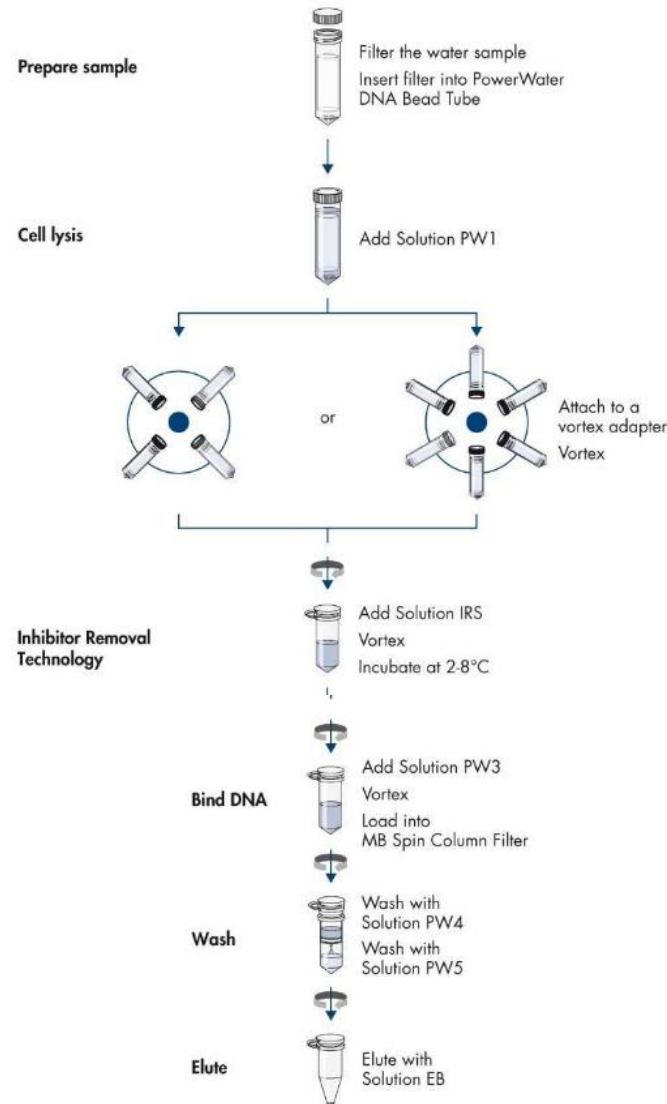


RESEARCH PLATFORM
ON ANTIBIOTIC RESISTANCE
SPREAD THROUGH WASTEWATER
TREATMENT PLANTS

FastDNA™ SPIN Kit [3]

1	PREPARE the sample		ADD up to 500 mg of soil sample, 978 µL Sodium Phosphate Buffer and 122 µL MT Buffer to Lysing Matrix E tube
2	HOMOGENIZE with the FastPrep (or similar instrument)		LOAD tube in FastPrep instrument. PROCESS: 40 s at a speed setting of 6.0 m/s. CENTRIFUGE at 14,000 x g for 5-10 mins to pellet debris
3	PRECIPITATE proteins		TRANSFER supernatant to a clean 2 mL microcentrifuge tube. ADD 250 µL PPS and mix 10 times. CENTRIFUGE at 14,000 x g for 5 mins to pellet precipitate.
4	ADJUST binding conditions		TRANSFER supernatant to 15 mL tube. ADD 1 mL Binding Matrix Solution. Invert 2 mins and place tube on a rack for 3 mins. DISCARD 500 µL of supernatant.
5	BIND the DNA		TRANSFER max 600 µL of DNA Solution to a SPIN Filter Tube. CENTRIFUGE at 14,000 x g for 1 min. Empty catch tube. Repeat step 5 if the volume of the mixture is higher than 600 µL.
6	WASH the SPIN Filter		ADD 500 µL prepared SFWS-M Solution. CENTRIFUGE at 14,000 x g for 1 min. Empty catch tube.
7	DRY the SPIN Filter		CENTRIFUGE again at 14,000 x g for 2 mins. AIR DRY SPIN Filter for 5 mins at room temperature.
8	ELUTE the DNA		ADD 50-100 µL DES Elution Solution. CENTRIFUGE at 14,000 x g for 1 min. DNA in the catch tube is ready-to-use.

DNeasy PowerWater Kit [4]



Izolace DNA

FastDNA™ SPIN Kit (MP Biomedical)

- pro izolaci „půdě podobných vzorků“
- kolonkový kit - navázání DNA na silikonovou membránu
 - před použitím kolonky ale vychytání DNA na speciální matici (Binding Matrix solution)

PowerWater kit (QIAGEN)

- pro izolaci DNA z vody
- filtrace vzorku (0,22 µm) – izolace DNA z membránového filtru
- dezintegrace zachycených buněk pomocí kuliček a lýže buněk
- kolonkový kit – navázání DNA na membránu
- promytí a následně uvolnění eluce navázané DNA



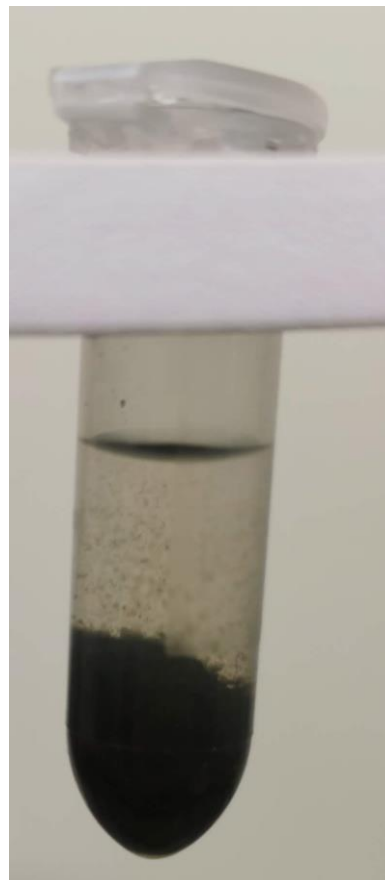
Izolace DNA

Odběr vzorku

- Měřit objem nebo hmotnost ?
- Vyjádřit CN.ml^{-1} nebo CN.g^{-1} – vhodné pro různé účely
- Aktivovaný kal – poměrně řídký – lze odebrat 1 ml
- Anaerobní kal – hustý – odběr 1 ml obtížnější
- Odběr 1 ml a zároveň zvažení

Izolace z celého objemu vzorku nebo z pelety

- pouze z pelety - možná určitá ztráta zvláště extracelulární DNA, nižší než ostatní ztráty
- zároveň maximální doporučená navážka vzorku pro každý kit



Vzorek anaerobního kalu (1 ml) po centrifugaci



Vzorek anaerobního kalu (1 ml) připravený pro dezintegraci



Vzorek filtru připravený pro dezintegraci



RESEARCH PLATFORM
ON ANTIBIOTIC RESISTANCE
SPREAD THROUGH WASTEWATER
TREATMENT PLANTS

Izolace DNA - dezintegrace

Mini Bead-Beater Biospec



<https://alt-model-images.s3-us-west-2.amazonaws.com/full-version-images/2018-04-23152251%2B00001.jpg8>

Precellys Evolution Super Homogenizer



<https://www.bertin-corp.com/life-sciences/136-precellys-evolution-homogenizer.html>

Parametry:

- čas, intenzita, typ, chlazení, počet opakování

FastPrep 24 MP



<http://www.biosave.com/products/fastprep-24-high-speed-benchtop-homogenizer>

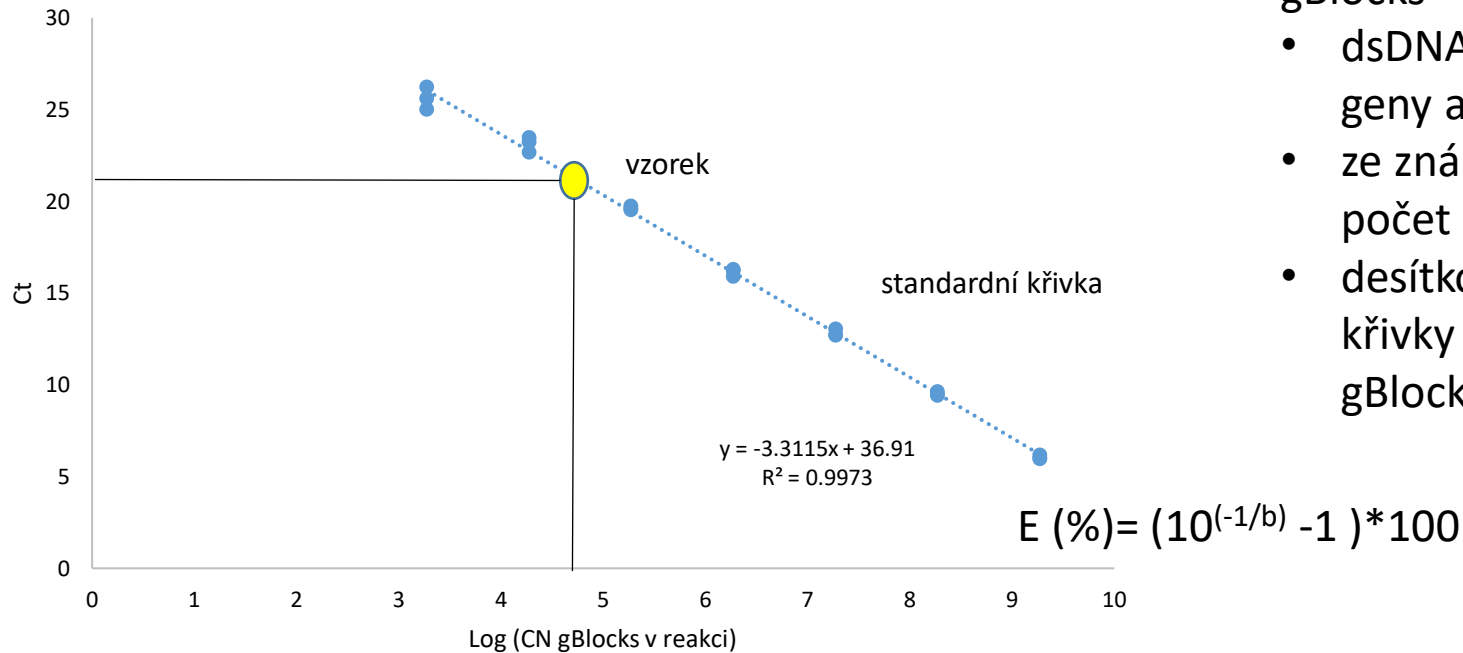
Scientific Industries SI™ Disruptor Genie™ vortex



<https://www.labunlimited.com/s/ALL/4AJ-6253276/Scientific-Industries-Disruptor-Genie-Digital-SI-DD58>

qPCR kvantifikace

Standardní křivka pro kvantifikaci genu 16S rRNA



Pro absolutní kvantifikaci použity genové fragmenty gBlocks™ (Integrated DNA Technologies)

- dsDNA fragmenty navržené na míru pro testované geny a použité primery
- ze známé koncentrace gBlocks lze stanovit přesně počet kopií daného PCR amplikonu
- desítková ředící řada použita pro sestavení standardní křivky (Ct prahový cyklus jako funkce log počtu kopií gBlocks)

qPCR kvantifikace

- různé přístroje
- různé reakční mastermixy
- různé reakční protokoly
- pravidla pro vyhodnocení (alespoň pět bodů standardní kalibrační přímky o efektivitě 90-110 % ($b = -3.58$: -3.10 odpovídající T_m produktů ± 1 °C))

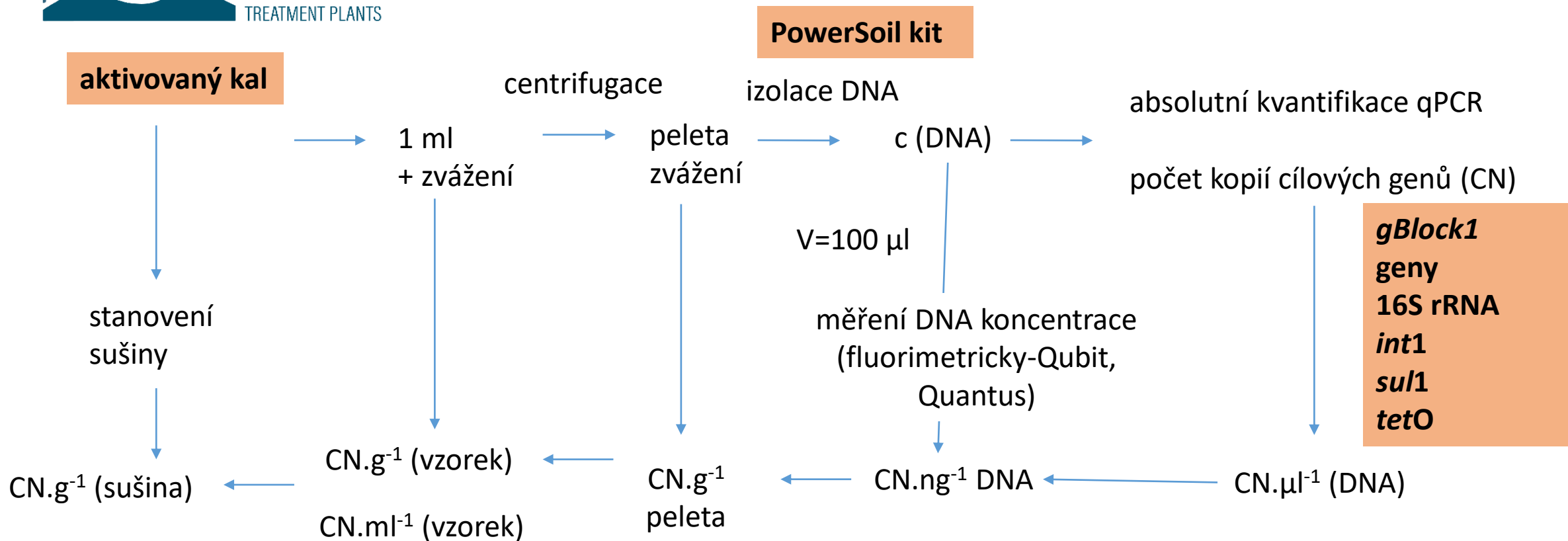
TTTT	PCR amplikon gen A	TTTT	PCR amplikon gen B	TTTT	PCR amplikon gen C	TTTT	PCR amplikon gen D	TTTT
------	--------------------	------	--------------------	------	--------------------	------	--------------------	------

Struktura genového fragmentu gBlocks



RESEARCH PLATFORM
ON ANTIBIOTIC RESISTANCE
SPREAD THROUGH WASTEWATER
TREATMENT PLANTS

Ring test 1



Účastníci: VŠCHT Praha, UCP Porto, TU Delft, Wetsus

Závěry Ring test 1

- DNA izolovaná kitem PowerSoil z 1 ml aktivovaného kalu při různých metodách dezintegrace
 - koncentrace izolované DNA: $124 \pm 20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ($12.4 \pm 6.9 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ vzorek)
 - relativní standardní odchylka (RST) 16 %
- testovány vysoce abundantní geny 16S rRNA, *int1*, *tetO* a *sul1*
- metodická poznámka
 - limit detekce qPCR: řádově 10^1 - 10^3 CN v 1 μl DNA
 - lišilo se mezi laboratořemi v závislosti na použitých reagentech a přístroji
 - limit detekce vzorek: řádově 10^3 - 10^5 CN v 1 ml vzorku aktivovaného i anaerobního kalu
řádově 10^1 - 10^3 CN v 1 ml vzorku odpadní vody
 - DNA je izolována v objemu 100 μl z 1 ml aktivovaného nebo anaerobního kalu nebo ze 100-300 ml odpadní vody

Závěry Ring test 1

- testovány vysoce abundantní geny 16S rRNA, *int1*, *tetO* a *sul1*
 - počet kopií genů v izolované DNA: $\log(\text{CN} \cdot \mu\text{l}^{-1}) \text{ DNA} \sim 4-8$
 - počet kopií genů ve vzorku: $\log(\text{CN} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{ml}) \text{ vzorek} \sim 6-10$
 - relativní standardní odchylka kvantifikace počtu kopií genů mezi laboratořemi nejvýše 8 %

Ring test 1 gen	DNA REF - $\log(\text{CN} \cdot \text{ml}^{-1})$ vzorek			DNA LAB - $\log(\text{CN} \cdot \text{ml}^{-1})$ vzorek		
	průměr	stand.odch.	rel.stand.odch.	průměr	stand.odch.	rel.stand.odch.
16S rRNA	9.68	0.36	4%	9.66	0.35	4%
<i>int1</i>	7.73	0.35	5%	7.70	0.45	6%
<i>sul1</i>	7.92	0.29	4%	7.87	0.28	4%
<i>tetO</i>	6.11	0.50	8%	6.15	0.35	6%

- **Samotná qPCR analýza má na kvantifikaci počtu kopií genů vyšší vliv než izolace DNA**

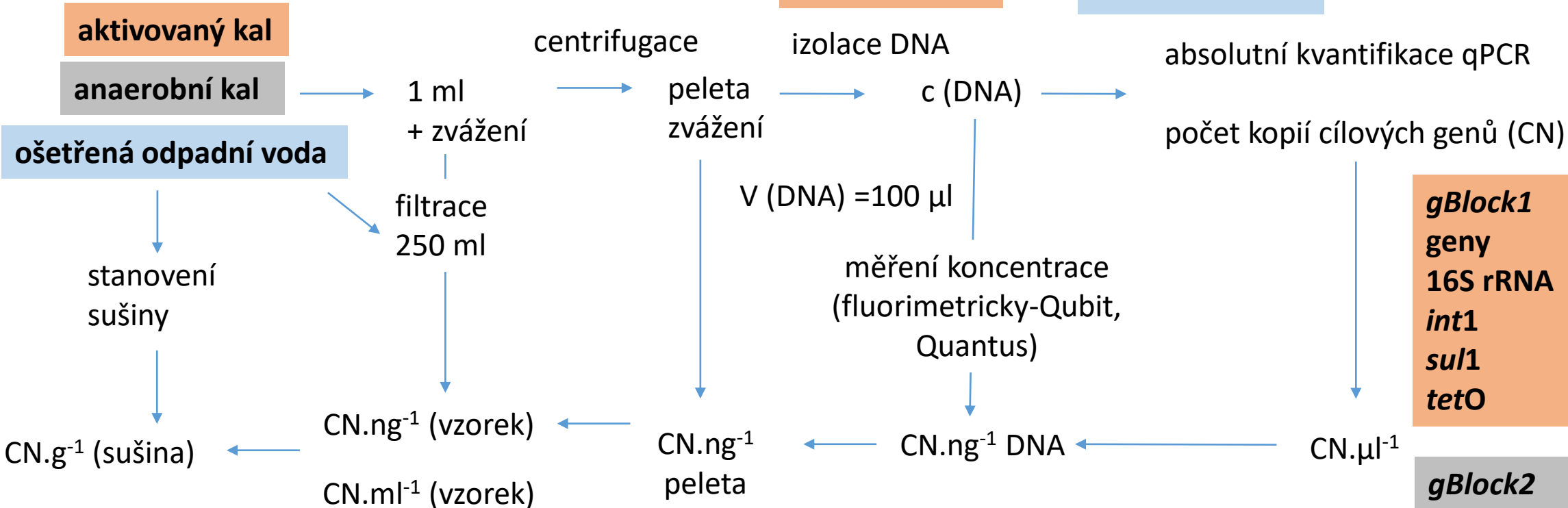
Východiska pro Ring test 2

- ověřit i pro další typy vzorků (anaerobní kal, ošetřená odpadní voda)
- ověřit i pro vzorky s nízkou koncentrací DNA (ošetřená odpadní voda)
- ověřit i pro méně abundantní geny (vybrány na základě dalších analýz o výskytu ARG v testované ČOV)



RESEARCH PLATFORM
ON ANTIBIOTIC RESISTANCE
SPREAD THROUGH WASTEWATER
TREATMENT PLANTS

Ring test 2



gBlock1
geny
16S rRNA
int1
sul1
tetO

gBlock2
geny
blaIMP
blaKPC
blaVIM
mcr-1
tetO – nový pár primerů

Účastníci: VŠCHT Praha, UCP Porto, TU Delft, Wetsus, University of Valladolid (pouze izolace DNA)



Závěry Ring test 2

- DNA izolovaná kity PowerSoil, PowerSoil Pro a FastSpin z 1 ml aktivovaného nebo anaerobního kalu při různých metodách dezintegrace (celkem 7 různých kombinací)
- c(DNA) aktivovaný kal: $199 \pm 69 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ($19.9 \pm 6.9 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ vzorek) RST 35 %
- c(DNA) anaerobní kal: $95 \pm 53 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ($9.5 \pm 5.3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ vzorek) RST 56 %
- DNA izolovaná kitem PowerWater z 250 ml ošetřené odpadní vody při různých metodách dezintegrace (celkem 5 různých kombinací)
- c(DNA) odpadní voda: $19 \pm 10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ($7.96 \pm 4 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ vzorek) RST 53 %
- vyšší vliv použití různých zvláště dezintegračních podmínek
- relativní standardní odchylka koncentrace DNA je nepřímo úměrná koncentraci
- čím méně přítomné DNA, tím vyšší RST pro izolovanou DNA mezi laboratořemi
 - větší efekt použité metody dezintegrace a dalších podmínek

Závěry Ring test 2

- vysoce abundantní geny 16S rRNA, *int1*, *tetO* (1. varianta primerů) a *su1*

Ring test 2		DNA REF - log (CN.ml ⁻¹) vzorek			DNA LAB log (CN.ml ⁻¹) - vzorek			Δ(LAB-REF)
gen	Vzorek	průměr	stdev	rel.stdev	průměr	stdev	rel.stdev	
16S rRNA	AS	9.5	0.5	5%	9.6	0.4	4%	0.1
	NS	9.3	0.6	6%	9.6	0.5	5%	0.3
	TWF	5.9	0.5	9%	6.0	0.7	11%	0.1
<i>int1</i>	AS	8.0	0.4	5%	8.0	0.2	3%	0.0
	NS	7.2	0.4	5%	7.6	0.3	4%	0.3
	TWF	4.4	0.3	7%	4.5	0.5	11%	0.1
<i>su1</i>	AS	8.0	0.3	4%	8.0	0.2	3%	0.0
	NS	6.9	0.2	3%	7.3	0.3	4%	0.4
	TWF	4.6	0.2	4%	4.6	0.4	10%	0.0
<i>tetO</i>	AS	5.6	0.3	6%	5.9	0.4	6%	0.3
	NS	5.1	0.3	6%	5.4	0.2	3%	0.3
	TWF	2.9	0.2	7%	2.8	0.5	17%	-0.1

- RST počtu kopií genů v ml vzorku mezi laboratořemi nejvýše 11 %
- výjimkou *tetO* v odpadní vodě – 17 % (otázka dostatečně vhodných primerů)

Závěry Ring test 2

- méně abundantní geny *bla*IMP, *bla*VIM, *bla*KPC, *mcr*-1
 - detekovány pouze v některých vzorcích
 - pro některé laboratoře v některých vzorcích pod limitem kvantifikace
 - pokud stanoveny RST až 40 %
 - vliv použité metody qPCR – bude provedeno srovnání vlivu přístroje a použitých reakčních materiálů

Další hypotézy a cíle

- čím nižší koncentrace DNA ve vzorku, tím vyšší RST mezi laboratořemi v koncentraci izolované DNA (méně a více účinné postupy izolace)
 - ale velmi malý vliv na kvantifikaci ARG – „navíc“ izolovaná DNA obsahuje malé množství cílových ARG ?
- stanovení interlaboratorní a intralaboratorní odchylky pro jednotlivé odlišné kroky v protokolu
 - analýza zdrojů této variace (vše prováděno v replikátech)

1. qIAGEN. DNeasy® PowerSoil® Kit Handbook. 2017, Version: May 2017, p. 24,
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5a0517a7-711d-4085-8a28-2bb25fab828a&lang=en>
2. qIAGEN. DNeasy® PowerSoil® Pro Kit Handbook. 2021, Version: March 2021,
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=9bb59b74-e493-4aeb-b6c1-f660852e8d97&lang=en>
3. qIAGEN. DNeasy® PowerWater® Kit Handbook. 2020, Version: January 2020, p. 28,
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=75765ef9-2a6f-4f5d-a36b-dbd9beb43079&lang=en>
4. Biomedical, M. FastDNA™ SPIN Kit for Soil. 2021, Version: 2021-05,
https://www.mpbio.com/media/document/file/manual/dest/f/a/s/t/d/FastDNA_SPIN_Kit_for_Soil_UM_2021_WEB.pdf

Příspěvek vznikl za finanční podpory projektu REPARES (Research platform on antibiotic resistance spread through wastewater treatment plants) programu Horizon 2020 (H2020-EU.4.b. ID 857552) a projektu TAČR SS01020112 (Technologie pro odstranění antibiotické resistance z čistírenských kalů aplikovaných v zemědělství).

Za poskytnutí vzorků děkujeme PVK, a.s.



RESEARCH PLATFORM
ON ANTIBIOTIC RESISTANCE
SPREAD THROUGH WASTEWATER
TREATMENT PLANTS

DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST

Sabina.Purkrtova@vscht.cz