TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOINFORMAATIKA ÕPPETOOL

Antimikroobse resistentsuse detekteerimine reoveeproovidest

Bakalaureusetöö

12 EAP

Marii Telliskivi

Juhendaja PhD Maido Remm

TARTU 2022

Antimikroobse resistentsuse detekteerimine reoveeproovidest

Mikroobid ehk mikroorganismid on mikroskoopilised organismid, kes eksisteerivad nii üherakulises vormis kui rakkude kolooniana. Mikroobid saab jagada alarühmadeks, milleks on bakterid, arhed, seened (lima-, vetik-, pärm- ja hallitusseened) ja protistid. Tänapäeval on kujunenud üheks suurimaks tervishoiuprobleemiks mikroobide võime muutuda varasemalt tõhusa antimikroobse aine suhtes vastupidavaks ehk tekib antimikroobne resistentsus (AMR), mis raskendab haiguste ennetamist ja ravimist. Käesolevas töös analüüsitakse antimikroobsetele ainetele resistentsete bakterite (AMRB) ja antimikroobsetele ainetele resistentsete geenide (AMRG) levikut reovees ning tehakse ülevaade antimikroobse resistentsuse detekteerimise meetoditest ja tarkvarast.

Märksõnad: antimikroobsus, detekteerimine, metagenoomika, sekveneerimine

CERCS: B110 (Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika)

Antimicrobial resistance detection in wastewater samples

Microbes, or microorganisms, are microscopic organisms that exist both in unicellular form and as a colony. Microbes can be subdivided into bacteria, viruses, archaea, fungi (slime molds, algeae, yeasts and molds) and protists. One of the major public health problems today is the ability of microbes to become resistant to antimicrobial substances, i.e. to develop antimicrobial resistance (AMR), which makes disease prevention and treatment more difficult. This work analyses the prevalence of resistant bacteria in wastewater, resistance detection methods and software tools.

Keywords: antimicrobial, detection, metagenomics, sequencing

CERCS: B110 (Bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics)

SISUKORD

SISUKORD 3
KASUTATUD LÜHENDID 4
SISSEJUHATUS 6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE 7
1. AMR monitooring reovees 7
2. Näiteid AMR geenide tuvastamisest reovees 9
2.1 Sissevoolu allikate AMRG-ide detekteerimine 9
2.2 AMRG-ide osakaal reoveevõrgustikus 10
3. AMR geenide tuvastamise meetodid 13
3.1 Kultiveerimisel põhinevad meetodid 13
3.2 Molekulaarsed meetodid 13
Kvantitatiivne PCR (qPCR) 14
Suure läbilaskevõimega kvantitatiivne PCR (HT-qPCR) 14
Suure läbilaskevõimega digitaalne PCR (ddPCR) 15
Pöördtranskriptaasi PCR (RT-PCR) 15
3.3 Metagenoomse DNA sekveneerimine 16
4. AMR andmebaasid ja tarkvara 17
4.1 CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) 17
4.2 NDARO (*National Database of Antibiotic Resistant Organisms*) 18
4.3 PATRIC (*The Pathosystems Resource Integration Center*) 18
5. AMR geenide tuvastamise tarkvara 19
5.1 AMRFinder 19
5.2 ResFinder 20
5.3 PhenotypeSeeker 20
5.4 PARGT 21
ARUTELU 22
KOKKUVÕTE 24
SUMMARY 25
TÄNUSÕNAD 27
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU 28
LIHTLITSENTS 34

KASUTATUD LÜHENDID

AMR – antimikroobne resistentsus (*antimicrobial resistance*)

AMRB – antimikroobsele ainele resistentne bakter (*antimicrobial resistant bacteria*)

AMRG – antimikroobsele ainele resistentne geen (*antimicrobial resistance gene*)

ARO – antibiootikumiresistentsuse ontoloogia (*Antibiotic Resistance Ontology*)

BLAST – *The Basic Local Alignment Search Tool*

CAESAR – Kesk-Aasia ja Ida-Euroopa antimikroobse resistentsuse seire võrgustik (*Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance*)

CARD – *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*

CARD – *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*

CDC – Haiguste Kontrolli ja Tõrje Keskus (*Centers for Disease Control and Prevention*)

CFU – kolooniat moodustav ühik (*colony-forming unit*)

ddPCR – suure läbilaskevõimega digitaalne PCR (*high-throughput droplet digital PCR*)

EARS-Net – antimikroobse resistentsuse seire Euroopa võrgustik (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*)

HGT – horisontaalne geeniülekanne (*horizontal gene transfer*)

HT-qPCR – suure läbilaskevõimega kvantitatiivne PCR (*High-throughput quantitative PCR*)

LOD - detekteerimise piir (*limit of detection*)

LOQ – kvantifitseerimise piir (*limit of quantitation*)

MDR – multiravimiresistentsus (*multidrug resistance*)

MGE – mobiilne geneetiline element (*mobile genetic element*)

MIC – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (*minimum inhibitory concentration*)

NDARO – *NCBI National Database of Antibiotic Resistant Organisms*

PARGT – *Prediction of Antimicrobial Resistance via Game Theory*

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*Quantitative PCR*)

RAS – aktiivmuda (*return activated sludge*)

RT-PCR – pöördtranskriptaasi PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*)

WGS – kogu genoomi järjestamine (*whole-genome sequencing*)

WWTP – reoveepuhastusjaam (*wastewater treatment plant*)

SISSEJUHATUS

Antimikroobne resistentsus väljendub mikroobide suurenenud vastupanu võimes erinevate antimikroobsete ainete osas. Antibiootikumiresistentsete haigustekitajate põhjustatud infektsioonid on tavaliselt raskekujulisemad ja pikaajalisema raviga. Antimikroobse resistentsuse seire Euroopa võrgustik (EARS-Net) ning Kesk-Aasia ja Ida-Euroopa antimikroobse resistentsuse seire võrgustik (CAESAR) on dokumenteerinud, et antibiootikumiresistentsed bakterid on viimase kümnendi jooksul muutunud palju levinumaks.

Mikroobide võime mõnedele antibiootikumidele vastu seista on loomulik, kuid antibiootikumide laialdane kasutamine meditsiinis, põllumajanduses ja loomakasvatuses viimaste kümnendite jooksul on seostatav antimikroobsetele ainetele resistentsete patogeenide järsu kasvuga ning reoveepuhastusjaamadest on saanud AMR vastase võitluse keskpunkt.

Olme-, haigla- ja tööstustest pärinev reovesi suundub reoveepuhastusjaama (WWTP), kus mitmekesise selektsioonisurve all on koos väga kontsentreeritud patogeensete ja kommensaalsete mikroobide kogum. Sealses keskkonnas on soodsad tingimused antimikroobsete ainete resistentsusgeenide ülekandeks ja antimikroobsetele ainetele resistentsete bakterite paljunemiseks. Seega reoveepuhastusjaamad on takistuseks antimikroobse resistentsuse keskkonda sattumisel, kuid on samal ajal ka ideaalseks resistentsuse edasilevimise paigaks.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on analüüsida antimikroobsete ainete resistentsuse olemasolu ja arvukust reoveepuhastusjaamade sissevoolus, reovee töötlemisprotsessi erinevatel etappidel ning väljavoolavas heitvees. Analüüsitakse resistentsete bakterite ja geenide detekteerimise meetodeid ning tarkvara.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

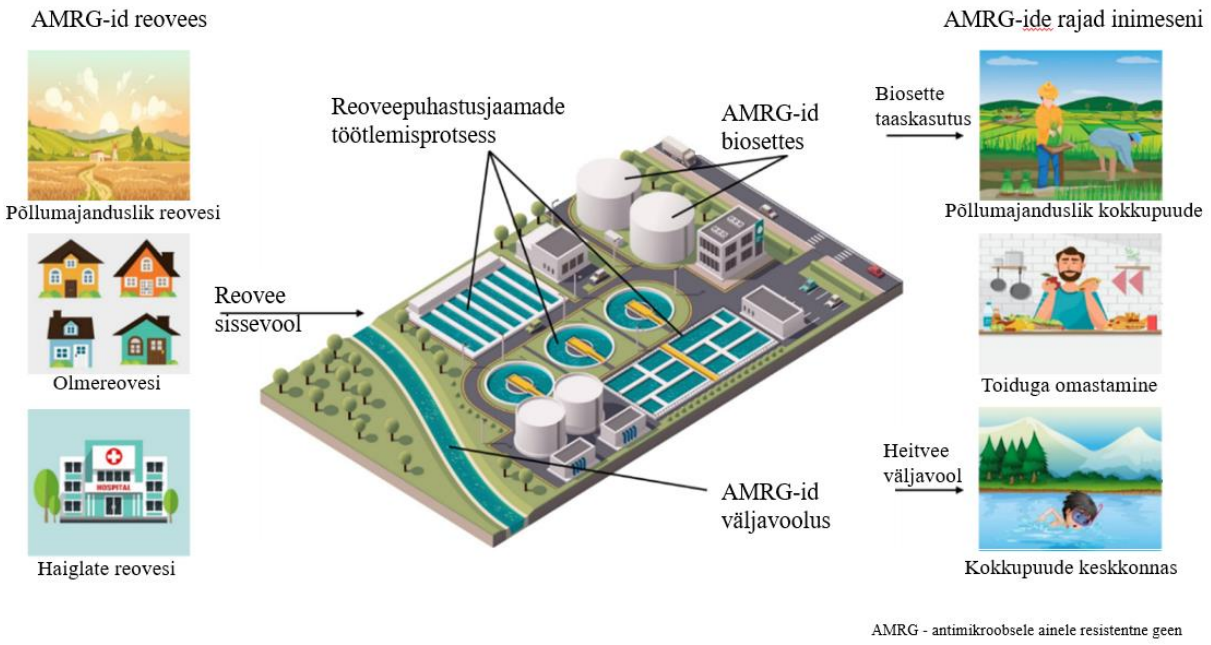
1. AMR monitooring reovees

Olmereovee puhastamiseks on rajatud reoveepuhastusjaamad, mille peamiseks eesmärgiks on puhastada vesi saasteainetest, inaktiveerida haigustekitajad ning vesi tagasi keskkonda suunata. Reoveepuhastusjaamad ühendavad endas nii mehaanilisi, bioloogilisi kui ka keemilisi puhastusetappe. Kuna reoveepuhastusjaamadesse satub kokku hulganisti erinevaid ravimeid, sh ka kõige tavalisemaid antibiootikumide tüüpe (nt aminoglükosiidid, beeta-laktaamid, kinoloonid) ja AMRB-eid, siis toimub seal ka geeniülekandeid ning ravimitele resistentsuse tekke võimalikkus on suurem. Reoveepuhastusjaamade taastöödeldud vees olevad AMRB-id ja AMRG-id võivad kanduda edasi keskkonda, näiteks jõgedesse ja järvedesse. Reovee taaskasutamisel võivad inimesed AMRG-ide ja AMRB-itega lisaks joogiveele kokku puutuda ka selliste tegevuste kaudu nagu veesport, tööalane kokkupuude põllumajandusliku kastmise ajal ja taaskasutatud veega kastetud toiduainete tarbimine (Amarasiri et al., 2020). Seega võivad reoveepuhastusjaamades olevad AMRB-id ja AMRG-id ohustada inimese tervist mitmel erineval viisil (joonis 1).

Reoveepuhastusel on oluline roll AMRG-ide keskkonda sattumise kontrollimisel. Reoveepuhastid võivad toimida AMRG-ide reservuaarina ja hõlbustada AMRG-ide vahetust horisontaalse geeniülekande (HGT) kaudu. Seega võivad reoveepuhasti sissevoolus olevad mitte-AMRG peremeesorganismid reoveepuhastusprotsessi läbides potentsiaalselt AMRG-e omandada (Hultman et al., 2018). AMR kontekstist vaadatuna ei ole haigustekitajate eemaldamine väljavoolust nii lihtne, sest ka kommensaalsed, mittepatogeensed bakterid võivad olla olulisteks AMRG-e kandvate plasmiidide ja muude mobiilsete geneetiliste elementide (MGE) reservuaarideks (Nguyen et al., 2021).

Reoveepuhastuses väljendatakse keemilisi saasteaineid tavaliselt µg/l reovees või µg/kg reoveesette kohta. Samamoodi väljendatakse patogeenide koguseid CFU/g reoveesette kohta või CFU/ml (CFU ehk kolooniat moodustav ühik) (Alcock et al., 2020). AMRG-ide reovees esinemise täpset riski on raske kvantifitseerida, sest nende avastamine reoveepuhastites on esitatud, kas ühe AMRG-i esinemisel miljoni lugemi kohta, koopiat/ml või siis antibiootikumiresistentsusgeenide koopiaarvude ja 16S rRNA geenikoopiate arvukuse

omavahelise suhtena (Ferro et al., 2016). Erinevalt keemiliste saasteainete ja patogeenide mõõtühikutest ei ole need AMRG-i kontsentratsiooni või arvukuse mõõtühikud võrreldavad ning neid saab vaid kaudselt ümber teisteks mõõtühikuteks teisendada. Seega AMRG-id on esitatud ühikutes, mida ei saa otseselt tervisemõjude ja -riskide hindamiseks kasutada (Chandrasekaran & Jiang, 2019).



Joonis 1. Antimikroobse aine resistentsusgeenide (AMRG) võimalikud suunad inimeseni. AMRG = antimikroobsele ainele resistentne geen. (Nguyen et al., 2021), kohandatud).

2. Näiteid AMR geenide tuvastamisest reovees

AMRG-e kandvate patogeenide esinemine reoveepuhastusjaama heitvees on veekvaliteedi probleem ja veeringlusega seotud peamine riskitegur. Reoveepuhastusjaamade töötlemisprotsessi käigus eraldatakse veefaasist suur osa AMRB-idest ja AMRG-idest settefaasi, mille tulemuseks on AMRG-ide kõrge kontsentratsioon biosette hulgas (kuni 109 koopiat/g) (Munir et al., 2011). Paljud AMRG-id jäävad aga ka töödeldud väljavooluvette (Hiller et al., 2019) ning kuna biosetted ja töödeldud reovesi suunatakse lõpuks tagasi looduskeskkonda, võivad reoveest saadud AMRB-id ja AMRG-id potentsiaalselt puutuda kokku keskkonnabakterite, elusloodusе, koduloomade ja inimestega. Reoveepuhastusjaamade väljavool suurendab märgatavalt AMRG-ide, transposoonide ja integronide arvu alamjooksu vees ja selle setetes. (Quintela-Baluja et al., 2019).

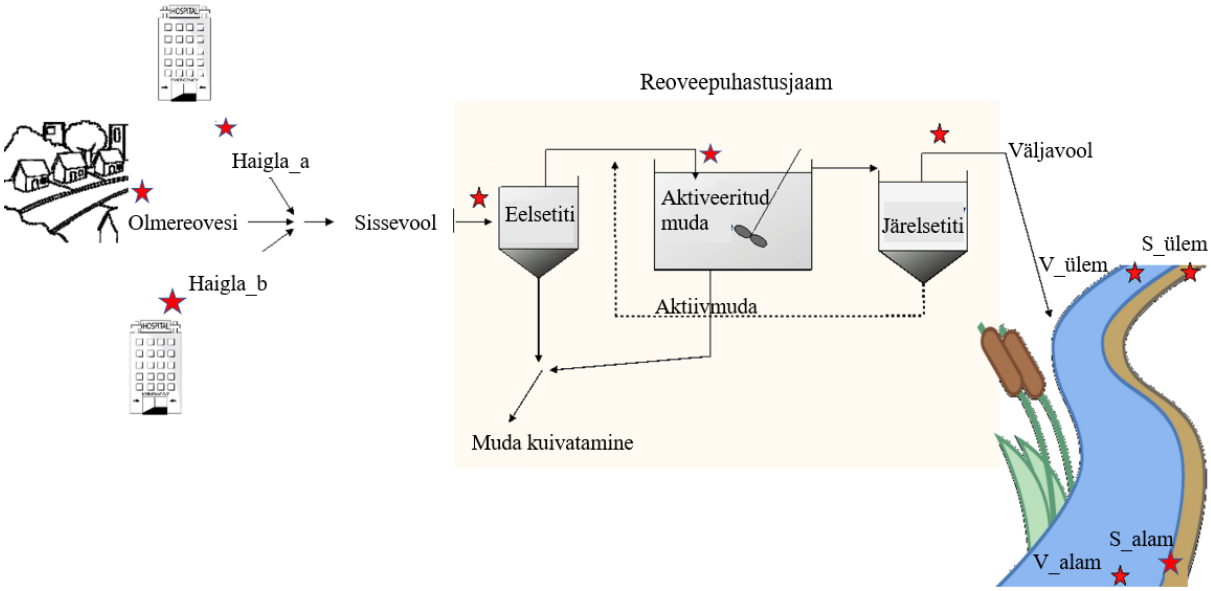
2.1 Sissevoolu allikate AMRG-ide detekteerimine

Hispaania reoveevõrgustikus uuriti mikrobioome ja võrreldi AMRG-ide koguseid erinevate reovee sissevoolu allikate vahel. Proovid võeti 2015. aasta suvel ligi 96 000 elanikuga Hispaania linnast, mille ümber oli minimaalselt tööstuseid ja põllumajandust (Quintela-Baluja et al., 2019). Proove koguti kahe haigla reoveest, olmereoveest, WWTP sissevoolust ja väljavoolust, taaskasutusse võetud aktiivmudast ning reoveepuhasti väljavoolupunktist 100 meetri kaugusel olevast veesamba ja setete ülemjooksust ja alamjooksust (Joonis 2).

Kommunaal- kui ka haiglaallikatest pärit mikrobioomid ja AMRG-id kombineeriti 16S rRNA metagenoomilise sekveneerimise ja suure läbilaskevõimega qPCR-i abil. Kõige rohkem AMRG-e, transposaase ja integraasi geene genoomi kohta detekteeriti haiglast pärinevast reoveest (13,9 AMRG-i/genoomis), mis on palju suurem kui kommunaalses reovees (1,6 AMRG-i/genoomis), aktiivmudas (RAS) (1,0 AMRG-i/genoomis), reoveepuhasti väljavoolus (0,8 AMRG-i/genoomis), jõe ülemjooksu setetes (0,1 AMRG-i/genoomis), jõe alamjooksu setetes (1,4 AMRG-i/genoomis) ja alamjooksus (0,6 AMRG-i/genoomis).

Selles võrgustikus moodustas haiglast pärinev reovesi 1,65-1,84% kogu reoveepuhastusjaama voolava vee mahust, kuid massi järgi annab haiglast pärinev reovesi 15,8-17,3% AMRG-idest reoveepuhastisse. Allavoolus olevad AMRG-id sarnanesid pigem algsele reoveeallikale kui

reovee aktiivmudale, millest saab järeldada, et suur osa AMRG-idest ja mikroobidest läbis otse veepuhastusjaama. AMRG-ide ja mikroobide olemasolu aktiivmudas (RAS) võib olla pigem seotud biomaterjali sadestamisega, nagu näiteks flokulatsiooni toimumisega, kui AMRG-ide kandmisega. See seletab, miks RAS-is on AMRG-ide arvukus oluliselt väiksem (47 ± 4 AMRG-i) kui väljavoolus (104 ± 5 AMRG-i), allavoolu veesambas (135 ± 4 AMRG-i) ning jõesetetes (120 ± 5 AMRG-i) (Quintela-Baluja et al., 2019).



Joonis 2. Uurimisala ja proovivõtukohad Hispaania reoveevõrgustikus. Haiglast võetud proovid (Haigla_a ja Haigla_b), veesamba ülem- ja alamjooks (V_ülem ja V_alam), setete ülem- ja alamjooks (S_ülem ja S_alam). (Quintela-Baluja et al., 2019, kohandatud).

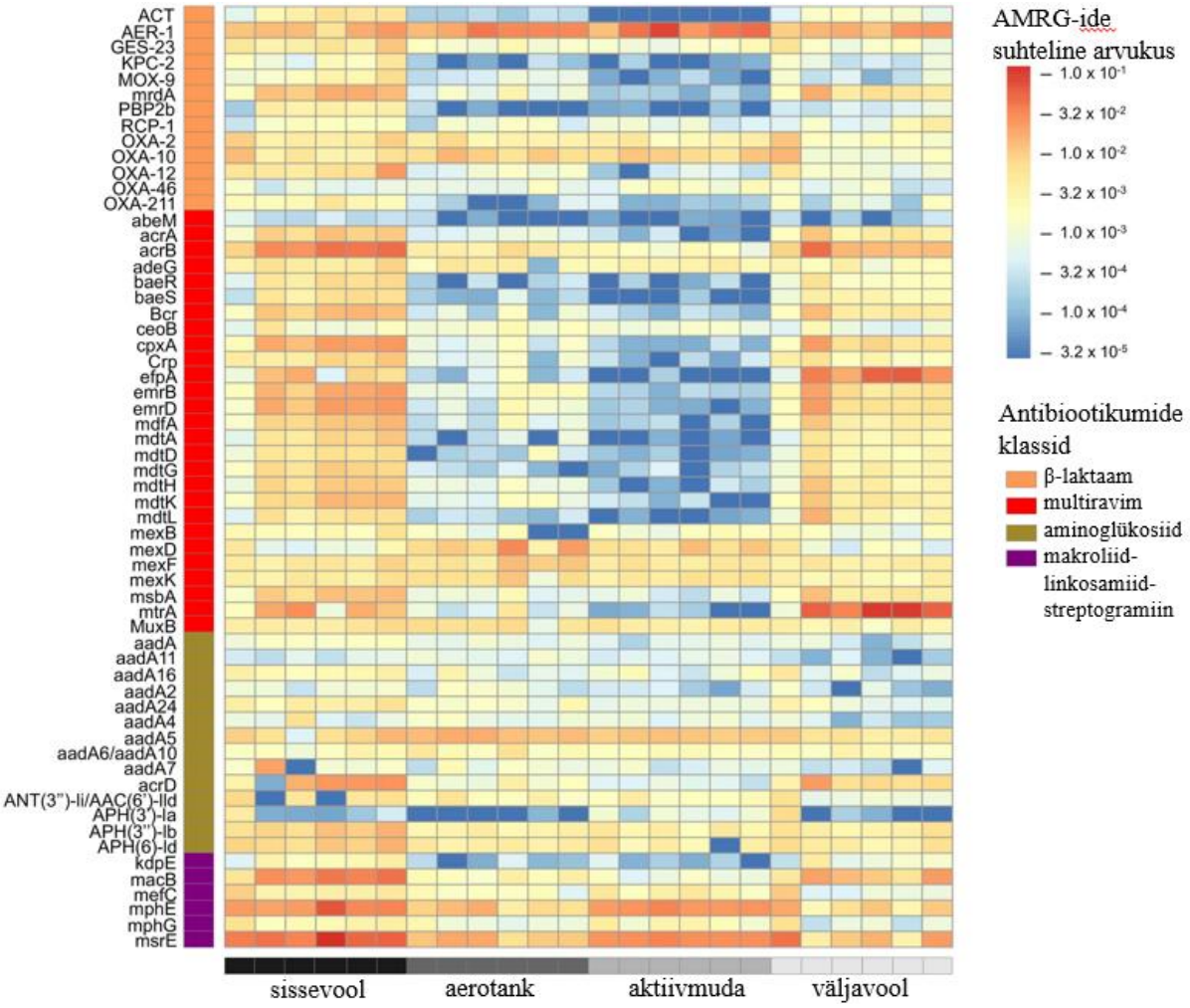
2.2 AMRG-ide osakaal reoveevõrgustikus

Ühes Lõuna-Ameerikas asuvas reoveepuhastusjaamas viidi läbi olmereovee metagenoomi uuring, et analüüsida sealset AMRG-ide populatsiooni. Lõuna-Ameerikas, eriti Kolumbias, on antimikroobne resistentsus ulatuslikult levinud ning kliiniliselt oluliste antibiootikumide, näiteks β-laktaamide suhtes on sealne asukoht resistentsuse mehhanismide poolest endeemiline (Munoz-Price et al., 2013). Ühe aasta jooksul töödeldava reovee keskmine vooluhulk on 1,8 m3/s (umbes 150 000 m3/päevas). Reoveepuhastusjaama sissevool on segu linna- ja tööstusreoveest, kuhu jõuab umbes 610 000 elaniku reovesi mitmetest koolidest, haiglatest ning ka mõnedest tööstusharudest (Rodríguez et al., 2021).

Proovide võtmine leidis aset alates 2017. aasta veebruarist kuni juulini ehk kokku oli kuus proovivõttu. Reoveeproovid võeti neljast konkreetsest punktist kogu reoveepuhastusjaamas: sissevoolust, aerotankist, aktiivmudast ja töödeldud väljavoolust (joonis 3).

Proovid võeti iga kuu samal päeval ajavahemikus 14:00-16:00, et vältida reoveepuhasti sissevoolu kõikumisest tulenevaid mõjusid. Nendes tingimustes võeti kuus proovi iga punkti kohta, kokku analüüsiti 24 metagenoomi proovi, millest arvutati bakterite suhteline arvukus eri WWTP asukohtade proovide ja kuupäevade järgi. Kõigis proovides näitas bakterite osakaal, et kõige sagedamini esines *Proteobacteria* hõimkond (50-90% järjestustest), millele järgnesid *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* ja *Firmicutes* hõimkonnad, mis moodustasid vastavalt kuni 40%, 18% ja 15% saadud 16S rRNA geeni järjestustest. Proovides määrati ära ka esinevad bakterite sugukonnad, kokku tuvastati neid 286. Proteobakterite hulgas tuvastati kõige sagedamini *Comamonadaceae* sugukond (20-27% 16S rRNA järjestustest), millele järgnesid *Chromatiaceae*, *Moraxellaceae* ja *Rhodocyclales* sugukonnad (igaüks neist esindas keskmiselt kuni 5% leitud järjestustest). Igas võetud proovipunktist tuvastati bakterite sugukondade suur mitmekesisus. Tulemused näitasid, et AMRG-id olid laia spektriga peamiselt WWTP sissevoolus ja väljavoolus. AMRG-idena määratletud lugemeid leiti sissevoolust kuni 17%, väljavoolust kuni 7%, aerotankist kuni 2% ja aktiivmudast kuni 2%. Resistentsust esines erinevate antibiootikumiklasside suhtes, millest kõige enim esines multiravimiresistentsust, millele järgnesid makroliid-linkoosamiid-streptogramiini (MLS), β-laktaami ja aminoglükosiidi resistentsus. Resistentsust sulfoonamiidide, kinoloonide ja polümüksiinide suhtes andvad geenid vähenesid reoveepuhastusjaama etappidel, kuigi nende olemasolu oli siiski väljavoolus märgata. Rifamütsiini ja fosfomütsiini AMRG-ide arv oli väljavoolus suurenenud. Samamoodi täheldati, et MLS-i AMRG-ide hulk suurenes aktiivmudas ja olid jätkuvalt olemas lõppvoolus (Rodríguez et al., 2021).

Analüüsiti konkreetsete AMRG-tüüpide jaotumist hinnatud proovides. Avastati üle 502 erineva AMRG-tüübi. Kõige domineerivamad AMRG-tüübid, mis esinesid kõikides kogumispunktides olid näiteks *acrB* ja *acrB*, mis kuuluvad multiravimite resistentsete hulka ning näiteks AER-1, mis on β-laktaami osas resistentne. Täheldati ka spetsiifilist tüüpi AMRG-ide kasvu, näiteks AER-1 ja *aadA5* (resistentne aminoglükosiidide suhtes) (joonis 3) (Rodríguez et al., 2021).



Joonis 3. Kõige sagedasemate AMRG-ide suhteline arvukus analüüsitud proovides. Normaliseeritud 16S rRNA geenidena annoteeritud lugemete koguarvu suhtes. Värviintensiivsus (log10 skaala) näitab AMRG-ide arvukust. (Rodríguez et al., 2021, kohandatud).

3. AMR geenide tuvastamise meetodid

3.1 Kultiveerimisel põhinevad meetodid

Traditsiooniline veekvaliteedi seire ja hindamine sisaldavad kultiveerimisel põhinevat analüüsi, et näha spetsiifilisi indikaator-liike, nt *E.coli*, fekaalseid kolivorme ja patogeene. Kuigi reovees ei ole AMR-i analüüsimiseks standardiseeritud meetodit, siis siiski on kultiveerimisel põhinev analüüs olnud AMR-i seirete alustalaks (McLain et al., 2016).

AMRB-ite eraldamiseks veeproovidest kasutatakse tavaliselt membraanfiltreerimist pooride suurusega 0,2 või 0,45 µm (EPA, 2006), millele järgnevad kultuuripõhised meetodid või molekulaarsed DNA ekstraheerimised. Kultuuripõhise meetodi korral kogutakse membraanfiltrilt bakterid, pannakse selektiivsöötmele edasiseks analüüsiks ja eraldatakse isolaadid. Antibiootikumide minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) väärtuste abil määratakse kindlaks, kui resistentne on konkreetne bakter teatud antimikroobse aine osas (Rodloff et al., 2008). MIC väärtused aga ei anna teavet AMRG-ide kohta, sest bakterid, millel need võivad esineda, ei pruugi kasvada kultuurkeskkonnas. Kasutatakse ka antimikroobse ainega immutatud paberdiske, mis kantakse agarile, kus bakteri kasvu inhibeerimine toimub diski ümber. See on kvalitatiivne meetod, mis liigitab proovi resistentseks, vahepealseks või tundlikuks, sõltuvalt kui lähedal bakter diskile kasvab (Galhano et al., 2021).

Kultiveerimisel põhinevate meetodite kasutamisel on peamiseks probleemiks see, et mittepatogeensed keskkonnabakterid võivad olla olulised resistentsuse reservuaarid, kuid neid ei ole lihtne kultiveerida ja detekteerida. Kultiveerimiseks kasutatav sööde on spetsiifiline vastavalt bakteriliigile, mis tähendab, et enne kultiveerimist on vaja välja selgitada antimikroobse resistentsuse märklauad. Märklauad aga limiteerivad tuvastatavate bakteriliikide leidmist ja seeläbi ka resistentsuse tuvastamist (Franklin et al., 2021).

3.2 Molekulaarsed meetodid

Keskkonnabakterite kultiveerimisega seotud raskuste ületamiseks võib AMR-i reovee uuringutes kasutada molekulaarseid meetodeid, mis analüüsivad bakteripopulatsiooni DNA-d,

eesmärgiga tuvastada AMRG-e ja AMR-iga seotud mobiilseid geneetilisi elemente nagu plasmiide, transposoone, integrone jne. Paljud AMRG-ide detekteerimiseks ja/või kvantitatiivseks määramiseks kasutatavad analüütilised tööriistad põhinevad polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR). AMRG-ide kvantifitseerimiseks on amplifikatsioonist sõltuvad meetodid nagu kvantitatiivne ehk reaalaja PCR (qPCR), suure läbilaskevõimega kvantitatiivne PCR (HT-qPCR), suure läbilaskevõimega digitaalne PCR (ddPCR) ja pöördtranskriptaasi PCR (RT-qPCR) eriti kasulikud, sest nende kasutamine on lihtne ning need on tundlikud (Franklin et al., 2021).

Kvantitatiivne PCR (qPCR)

Kasutades qPCR-i on võimalik amplifitseeritud DNA osa kogu amplifitseerimisprotsessi jooksul tuvastada ja kvantifitseerida. Kvantifitseerimine on võimalik, sest praimeritele lisatakse fluorestseeruvad sondid, mis annavad detekteeritavaid signaale ning need võimaldavad amplifikatsiooni jälgimist reaalajas. Võrreldes tavapärase PCR-tehnikaga on qPCR-l lühem reaktsiooniaeg ning sellega on võimalik määrata mikroorganismide suhtelist ja absoluutset arvu proovis (Galhano et al., 2021).

qPCR on spetsiifiline ja võimaldab tuvastada uuritavate AMRG-ide koguarvu kõigis bakteritüvedes, mobiilsetes DNA-fragmentides, nagu plasmiidid, transposoonid ja integronid (Xu et al., 2016); (Muziasari et al., 2014) ning samuti vabas keskkonna DNA-s. Näiteks uuriti qPCR-i abil resistentsuse geene nii kitse- ja lambalihas kui ka tapamaja keskkonnas ning tulemuste analüüsil nähti *tetA* ja *tetB* geenide esinemist mitmes tapamaja piirkonnas ja ka lihatoodetes (Guarddon et al., 2012).

Suure läbilaskevõimega kvantitatiivne PCR (HT-qPCR)

HT-qPCR pakub kiiret ja mugavat meetodit paljude AMR geenide samaaegseks hindamiseks ja arvukate analüüside tegemiseks proovi kohta, kasutades tavapärase PCR-iga võrreldes väiksemat proovi mahtu. HT-qPCR töötab nanoliitri skaalal ja nõuab ainult piiratud kogust DNA-d proovi kohta, mis on suur eelis veekeskkonnast pärit proovidega töötamisel, kus DNA kogus proovimahu kohta on tavaliselt väiksem kui teistes keskkonnaproovides (nt muld, pinnas). Sageli võib proovimaht ja DNA kogus proovimahu kohta olla tavapärase PCR-i

meetodi jaoks piiravateks teguriteks. Seetõttu loob HT-qPCR võimaluse analüüsida väiksemas koguses DNA-d sisaldavaid pinnaveeproove, analüüsides samal ajal ka AMR geeni sihtmärke (Franklin et al., 2021).

Lisaks eelistele on HT-qPCR-il ka mõned puudused, näiteks ei ole võimalik optimeerida iga huvipakkuva geeni analüüse ühe jooksu ajal, sest kõik testid peavad kasutama samu PCR tsüklitingimusi. Teine puudus on piiratud proovimahud, mis võivad kaasa tuua kõrgemad detekteerimise piirid (LOD) ja kvantifitseerimise piirid (LOQ), mis on murettekitavad madala tasemega keskkonnasaasteainete, näiteks AMR geenide tuvastamisel. Lisaks on nanoliitrises skaalas reaktsioone raske või isegi võimatu taastada amplifitseeritud produktide järjestamiseks, mis on tavapärases PCR-is ja qPCR-is sageli võimalik. Samuti on selle lähenemisviisi ja mis tahes tüüpi PCR-i veel üheks suureks puuduseks vajadus teada huvipakkuvate geenide järjestusi enne, et sobivalt valida ning kavandada praimereid ja sonde, erinevalt metagenoomilisest tööst, mis ei nõua eelnevaid sellekohaseid teadmiseid (Muziasari et al., 2017).

Suure läbilaskevõimega digitaalne PCR (ddPCR)

ddPCR on üheks kõige tundlikumaks ja täpsemaks meetodiks erinevate nukleiinhapete (DNA, RNA ja cDNA) järjestuste amplifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks. ddPCR põhineb vee-õli emulsiooni tilkade süsteemil. Üksteisest eraldatud olevate nanoliitri suuruste tilkade arv selles protsessis on 20 000. Üks osake sisaldab ühte sihtmärk-molekuli või siis ei sisalda mitte ühtegi. Pärast amplifikatsiooni analüüsitakse igat tilka fluorestseeruva sondiga. Kui see sisaldab vähemalt ühte sihtmärgi koopiat, on see tilk positiivne (fluorestseeruv). Kui see ei sisalda ühtegi sihtkoopiat, on see tilk negatiivne (fluorestseerub vähe või üldse mitte). Originaalproovi DNA kontsentratsioon määratakse positiivsete ja negatiivsete tilkade suhte kaudu (Hindson et al., 2011).

Pöördtranskriptaasi PCR (RT-PCR)

Pöördtranskriptaasi PCR-i reaktsioonis transkribeeritakse RNA-molekul komplementaarseks DNA-molekuliks (cDNA). Pärast seda protseduuri toimub amplifitseerimine standardse PCR-i abil. RT-PCR meetod on spetsiifiline, tundlik ja usaldusväärne. cDNA molekul on puhtam,

kui otse sihtmärgist võetud DNA-molekul, sest selles ei leidu lisandeid, näiteks valke. Seetõttu on cDNA spetsiifilisem ja algoritmide poolt kergemini äratuntav (Tang et al., 2017). Lisaks sellele tuvastab see tehnoloogia paljunevaid rakke ja eristab elus baktereid elututest. Näiteks on kasutatud RT-PCR-i, et töötada välja meetod resistentsusgeenide tuvastamiseks lihast. Plasmiidides suudeti tuvastada neomütsiini ja puromütsiini suhtes resistentsuse geene (Wang & Salazar, 2016). Kuid selle meetodi suureks puuduseks on RNA molekuli suur ebastabiilsus, seetõttu on proovide töötlemine keerulisem (Fawzy et al., 2017).

3.3 Metagenoomse DNA sekveneerimine

Metagenoomne DNA sekveneerimine, mis tugineb kontiigide või rekonstrueeritud mikroobide genoomide kokkupanemisele sekveneerimislugemitest, on molekulaarne tehnoloogia, mida kasutatakse mikroobide genoomide järjestamiseks. Seda tehnoloogiat saab kasutada AMRG-ide peremeesorganismide leidmiseks. DNA sekveneerimise eeliseks on saadud genoomse teabe suur detailsus ja parem taksonoomiline eraldusvõime võrreldes PCR-iga (Knight et al., 2018). Metagenoomilised lähenemisviisid on väärtuslikeks teabeallikateks AMR-i analüüsimisel ning võimaldavad määrata keskkonna resistoomi pinnavees. AMRG-ide peremeesorganisme saab identifitseerida AMRG-ide lugemitest koos fülogeneetiliste biomarkeritega (16S rRNA geen) või siis huvipakkuva AMRG-iga koos paiknevate geenide annotatsiooni põhjal (Rice et al., 2020).

Reoveepuhastites on AMRG-id tihti MGE-idega seotud (nt plasmiidi ja integroniga) ning et geneetiline kontekst avaldab suurt mõju AMRG-ide püsivusele ja ekspressioonile. Kusjuures plasmiidiga seotud AMRG-id ekspresseeruvad suurema tõenäosusega kui kromosomaalsed AMRG-id. Lisaks on täheldatud, et AMRG-id esinevad sageli koos MGE-dega koos lokaliseerimise tõttu (Che et al., 2019). Põhimõtteliselt võimaldab see meetod avastada uusi AMRG-e, sest sekveneerimisel saab neid analüüsida rohkem (Zhou et al., 2015). Keskkonnaproovide metagenoomiliseks sekveneerimiseks peab proovist ekstraheeritud DNA kogus piisavalt suur olema, et saada kogum, mis tagab mikrobioomi täielikuks iseloomustamiseks piisava katvuse. Arvestades suhteliselt väikest bakterite arvu proovimahu kohta pinnavees, võib metagenoomiliseks sekveneerimiseks minna vaja suuremaid proovikoguseid (Zhou et al., 2015).

4. AMR andmebaasid ja tarkvara

Kogu genoomi ja metagenoomi sekveneerimise meetodite abil saab põhjalikult kataloogida ja profileerida antibiootikumidele resistentseid geene alates ühest kliinilisest isolaadist kuni suuremate metagenoomideni välja. Hiljutised uuringud tegelevad genoomi ja metagenoomiliste andmekogumitega suuremates mõõtkavades, mis eeldab tõhusamaid ja täpsemaid andmeressursse (Lee et al., 2021).

AMRG andmebaasid saab jagada kaheks suuremaks grupiks. Mõned neist sisaldavad liigispetsiifilist infot (nt MUBI andmebaas, mis sisaldab *Mycobacterium tuberculosis*'e resistentsust põhjustavaid mutatsioone (Flandrois et al., 2014)), teised keskenduvad aga kõikidele liikidele ja nende AMRG-ide allikatele (nt CARD andmebaas). AMRG-ide andmebaasid võivad erineda nii nendes olevate liikide kui AMR-mehhanismi tüübi poolest. Mõned andmebaasid on spetsialiseerunud ainult omandatud resistentsusgeenidele, samas kui teised sisaldavad ainult mutatsioone (nt ResFinder andmebaas keskendub omandatud resistentsusgeenidele). On olemas ka andmebaase, mis sisaldavad teavet mõlema AMR-mehhanismi kohta (nt CARD, NDARO).

4.1 CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*)

CARD (Jia et al., 2016) on üks kõige laialdasemalt kasutatavaid AMRG-ide andmebaase (Yao & Yiu, 2019). CARD-i eesmärgiks on lisada andmeid, mis kirjeldavad antibiootikume ja nende sihtmärke, koos antibiootikumiresistentsuse geenide, nendega seotud valkude ja antibiootikumiresistentsuse kohta oleva teabega. CARD-i andmebaas on üles ehitatud antibiootikumiresistentsuse ontoloogia (ARO, *Antibiotic Resistance Ontology*) raamistikul, mis võimaldab klassifitseerida antibiootikumiresistentsuse geenide andmeid (McArthur et al., 2013). CARD-il on põhjalik manuaalselt koostatud antibiootikumiresistentsuse andmebaas, mis pakub genotüüpide analüüsi ja fenotüüpide ennustamist publikatsioonide ja järjestuste põhjal. Kõik andmed CARD-is on korrastatud kontrollitud sõnastike abil. Iga AMRG, mis CARD-i lisatakse peab olema kirjeldatud kontrollitud teaduslikus publikatsioonis, kuhu on lisatud ka kontrollidega võrreldes eksperimentaalsed tõendid minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) tõusu kohta ning selle DNA järjestus peab olema kättesaadav

GenBankis (Benson et al., 2000), mis on kõigi avalikult kättesaadavate DNA järjestuste annoteeritud kogum (Alcock et al., 2020). Andmebaasi ajakohastatakse regulaarselt teaduskirjanduse läbivaatuse põhjal ning praegune versioon ajakohastati oktoobris 2021. aastal (Papp & Solymosi, 2022).

4.2 NDARO (*National Database of Antibiotic Resistant Organisms*)

NDARO (Bogaerts et al., 2019) andmebaas on mõeldud antibiootikumiresistentsuse haldamiseks NCBI-s. See on koostööpõhine andmebaas, mis võimaldab teadlastel pääseda ligi AMR-andmetele ning hõlbustab patogeensete organismide seiret reaalajas. Alates andmebaasi laiendamisest 2021. aastal on NDARO-s hallatavad ka AMR-mutatsioonid, üldised stressireaktsiooni geenid ja virulentsusgeenid kliiniliselt oluliste patogeenide jaoks. NDARO-d ajakohastatakse korrapäraselt ning viimane andmebaasi versioon avaldati detsembris 2021. aastal (Papp & Solymosi, 2022).

4.3 PATRIC (*The Pathosystems Resource Integration Center*)

PATRIC (Snyder et al., 2007) toetab kõikide bakterite bioinformaatilisi analüüse ja pakub võrdlevat analüüsikeskkonda, mis võimaldab kasutajatele juurdepääsu üle 250 000 ühtselt annoteeritud ja avalikult kättesaadavale genoomile koos korrastatud metaandmetega. PATRIC pakub põhiteavet sagedamini kasutatavate antibiootikumide kohta, sealhulgas nende keemiliste ja füüsikaliste omaduste, farmakoloogia ja toimemehhanismi kohta. Lisaks on iga antibiootikum seotud muude PATRIC-is saadaolevate asjakohaste andmetega, nagu genoomide AMR-fenotüübid, AMRG-id ja AMR piirkonnad. PATRIC ennustab ka AMR-fenotüüpe, kasutades masinõppe klassifikaatoreid. PATRIC-i veebilehel saab kasutada visualiseerivaid ja võrdlevaid analüüsi vahendeid, privaatset tööruumi, kus kasutajad saavad analüüsida oma andmeid avalike kogude kontekstis, teenuseid, mis lihtsustavad keerulisi bioinformaatilisi töövooge, ja käsurea vahendeid andmete massanalüüsiks (Davis et al., 2020).

5. AMR geenide tuvastamise tarkvara

Kogu genoomi järjestused muutuvad järjest enam kättesaadavamaks, mistõttu on uute AMRG-ide tuvastamiseks võimalik kasutada masinõppe lähenemisviise traditsiooniliste joonduspõhiste meetodite asemel. Sellised lähenemisviisid on eriti kasulikud, kui patogeene ei saa laboris kultiveerida. Tavapärane strateegia AMR-mehhanismide tuvastamiseks hõlmab järjestuste kokkupanemist ja lugemipõhiseid meetodeid, mis kaardistavad järjestuse andmed otse võrdlusandmebaasidele. Kuigi need meetodid toimivad hästi tuntud ja väga konserveerunud AMR geenide puhul, võivad need anda vastuvõetamatult palju valepositiivseid tulemusi (geenid, mis kodeerivad eeldatavasti resistentsust, kui nad seda ei tee) väga erinevate järjestuste puhul (Chowdhury et al., 2020).

Masinõppe tehnikaid saab rakendada alternatiivse lahendusena oletatavate AMRG-ide ennustamiseks. Selle asemel, et kasutada järjestuse sarnasust, tuvastab masinõppemudel AMRG-idele ainulaadsed omadused, nt valgujärjestuse omadused. Uute AMRG-ide tuvastamiseks metagenoomiliste andmete põhjal on välja pakutud mitmeid masinõppe meetodeid, kuid need meetodid kasutavad ennustamiseks väikest hulka geneetilisi tunnuseid (Chowdhury et al., 2020).

5.1 AMRFinder

AMRG-ide sisalduse hindamiseks töötas NCBI mitme asutuse koostöö raames välja AMRG-ide detekteerimise tööriista AMRFinder (Feldgarden et al., 2019) ja põhjaliku AMRG-ide andmebaasi *the Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database*. Geenide andmebaasi laiendati, mida nüüd kutsutakse *Reference Gene Catalog*'iks ja see sisaldab lisaks virulentsusgeenidele ja liigispetsiifilistele punktmutatsioonidele ka oletatavaid happe-, biotsiidi-, metalli-, stressiresistentsuse geene.

Geene ja punktmutatsioone klassifitseeritakse nende funktsioonide järgi. Tuvastatud geenide repertuaari kui ka funktsionaalsust laiendati ning NCBI andis välja AMRFinderi uue versiooni – AMRFinderPlus (Feldgarden et al., 2021), mis suudab tuvastada omandatud geene ja punktmutatsioone nii valgu- kui ka nukleotiidjärjestuses. Andmebaasi täiustused ja funktsionaalsed laiendused võimaldavad suuremat täpsust AMRG-ide tuvastamisel, AMR-

genotüüpide ja -fenotüüpide seostamisel ning võimalike seoste määramisel antimikroobse resistentsuse, virulentsuse ja stressivastuse vahel (Feldgarden et al., 2021).

5.2 ResFinder

ResFinder (Zankari et al., 2012) on veebipõhine ressurss, mis tuvastab omandatud geenid ja/või leiab muutused kromosoomis bakterite kogu või osalises DNA-järjestuses, mis resistentsuse tekkele võivad viia. ResFinder koosneb manuaalselt loodud AMRG-ide andmebaasist ja bioinformaatilisest töövoost. Andmebaas sisaldab faile, mis kirjeldavad bakterite looduslikku resistentsust ja geenide üksikasjalikke kirjeldusi, nt geeni nimi, NCBI registreerimisnumber ja antud resistentsust antimikroobse aine suhtes. AMRG-ide lisamisel ResFinderisse ei kehti range nõue eelnevalt publitseeritud AMRG-ide kohta nagu oli CARD-il. Kuid geenidel peab siiski olema GenBanki number ja eksperdi hinnang. Resfinder sisaldab mitmeid kromosomaalseid punktmutatsioone, näiteks millega kolistiini, fluorokinoloonide suhtes resistentsust detekteerida saab (Hendriksen et al., 2019).

AMR-determinantide ulatuslikuma ressursi väljatöötamiseks koostasid ResFinder-i arendajad andmebaasi, mis on pühendatud ainult resistentsust põhjustavatele mutatsioonidele ning seda nimetatakse PointFinder-iks (Zankari et al., 2017). Need kaks andmebaasi ühendati ResFinder 4.0 projekti raames ja lisaks ulatuslikule ekspertide poolt andmete kureerimisele, koostati ka fenotüübi kirjeldus, et aidata teadlastel ühendada genotüübi info võimalike fenotüübiliste tunnustega. ResFinder-i viimane andmebaasi versioon avaldati septembris 2021. aastal (Papp & Solymosi, 2022).

5.3 PhenotypeSeeker

PhenotypeSeeker (Aun et al., 2018) tuvastab fenotüübispetsiifilised k-meerid, genereerib k-meeridel põhineva statistilise mudeli antud fenotüübi ennustamiseks ja ennustab antud bakteri isolaadi sekveneerimisandmete põhjal fenotüübi. Fenotüübi ennustamine kokkupandud genoomide põhjal võtab vähem kui ühe sekundi isolaadi kohta, seetõttu sobiks PhenotypeSeeker hästi fenotüüpide suurtest sekveneerimisandmestikest ennustamiseks. PhenotypeSeeker on rakendatud Pythoni programmeerimiskeeles ning on avatud lähtekoodiga tarkvara (Aun et al., 2018).

5.4 PARGT

PARGT on avatud lähtekoodiga tarkvarapakett, mis on loodud ja rakendatud bakterite AMRG-ide ennustamiseks. Kõik vajalikud bioinformaatika tööriistad ja skriptid, mis on vajalikud masinõppemudelis nõutavate valgufunktsioonide loomiseks on PARGT-is olemas. PARGT kasutab prognooside tegemiseks funktsioonide alamhulka, mille on tuvastanud GTDWFE algoritm (Gram-Negative Bacteria via Game Theory-Based Feature Evaluation). See võimaldab kasutajatel lisada andmekogumitele uusi AMR-järjestusi ja ka mitte-resistentseid järjestusi ning tarkvara värskendab end automaatselt masinõppe mudelit täiendavate järjestustega, mille tulemuseks on mudeli täpsuse suurenemine. PARGT pakub võimalusi ennustada grampositiivsete ja gramnegatiivsetes bakterites olevaid resistentsuse geene. Kasutajad saavad nende geenide jaoks testida ühte järjestust või tervet genoomi. Lisaks võimaldab PARGT kasutajatel lisada treeningkomplekti äsja kinnitatud AMR- või mitte-AMR-järjestusi ning lähtestada treeninguandmed tagasi tööriista algsele allalaaditud treeningkomplektile (Chowdhury et al., 2020).

ARUTELU

Antimikroobse resistentsuse parema kontrolli all hoidmiseks oleks vaja uuenduslikke lähenemisviise. Viimase 30 aasta jooksul on turule toodud ainult kaks uut antibiootikumi rühma, milleks on oksasolidinoonid ja tsüklilised lipopeptiidid (Coates et al., 2011), kuid mõlemad on suunatud grampositiivsetele bakteritele. Gramnegatiivsete bakterite multiresistentsete infektsioonide raviks leidub vähe tõhusaid ravimeid, seega oleks hädavajalik lahendusi leida. Uute vaktsiinide kasutuselevõtt võib vähendada haiguste levikut ja seeläbi vähendada vajadust antibiootikumiravi järele. Näiteks pneumokokkide konjugatsioonivaktsiinide kasutuselevõtmine on viinud resistentse *Streptococcus pneumoniae* vähenemiseni mitte ainult vaktsineeritud elanikkonnas, vaid ka elanikkonnas tervikuna (Kaplan et al., 2004). Samuti aitaksid kiired diagnostilised vahendid ära hoida raskekujulisema haigusinfektsiooni, leides haiguse põhjuse ja pakkudes koheselt ka tõhusa antibiootikumiravi (Prestinaci et al., 2015).

Metagenoomilised klassifitseerimise töövahendid sobitavad järjestusi, tavaliselt lugemeid või assambleeritud kontiige, mikroobide genoomi andmebaasiga, et tuvastada iga järjestuse takson. Metagenoomika algusaegadel kasutati enim BLAST-i (Altschul et al., 1997) ning sellega võrreldi igat lugemit GenBankis oleva järjestusega. Kuna referents-andmebaasid ja sekveneeritavate andmete maht on tõusnud, siis BLAST-i abil joondamine on muutunud arvutuslikult võimatuks. See on kaasa toonud metagenoomika programmid, mis tagavad kiiremad tulemused, kuid mis tavaliselt pole nii tundlikud kui BLAST. Mõned programmid annavad iga lugemi väärtuse ning teised programmid jällegi ainult valimi üldise koostise. Sobitamise etapi jaoks on erinevaid strateegiaid – lugemite joondamine, k-meeride mappimine, tervete genoomide kasutamine, ainult markergeenide joondamine või DNA translatsioon ja joondamine valgujärjestustega. Hiljutised uuringud on püüdnud võrrelda metagenoomika klassifikaatorite toimivust nii täpsuse kui ka kiiruse põhjal, kuigi neid uuringuid piirab nende sõltuvus jäljendatud andmetest (Breitwieser et al., 2019).

Kõik haigusetekitajad sisaldavad DNA või RNA genoome, mistõttu on sekveneerimine hea lähenemisviis patogeenide tuvastamiseks. Suure läbilaskevõimega või järgmise põlvkonna sekveneerimise kulusid on alates selle tulekust 2005. aastal mitme suurusjärgu võrra vähendatud ning see on muutunud palju kättesaadavamaks tehnoloogiaks. Sekveneerimistehnoloogia *Oxford Nanopore Technologies* pakub kaasaskantavaid

sekveneerimise masinaid nimedega *MinION*, *GridION* ja *PromethION*. Masinad töötavad juhtides üheahelalist DNA-d läbi valgu nanopooride võrgustiku, mis koguvad DNA järjestuse elektriliste katkestuste abil. Nakkushaiguste diagnostika jaoks on nanopooride DNA järjestamine meetod kiirem võrreldes järjestuspõhiste analüüsi meetoditega. Nanopooridega lähenemisel on ka negatiivseid külgi, näiteks esineb neil rohkem järjestusvigu, neil on väiksem läbilaskevõime ja kõrgemad lugemise kulud kui teistel järgmise põlvkonna sekveneerimise platvormidel, mis võib piirata kasulikkust mõnede rakenduste jaoks (Gu et al., 2019).

Viimase sajandi jooksul on molekulaarsed meetodid märkimisväärselt paranenud ning annavad kiiresti mahukaid andmehulki. Molekulaarsetel meetoditel on palju eeliseid kultiveerimisel põhinevate meetoditega, kuid ükski molekulaarne meetod eraldi ei anna piisavalt informatsiooni antimikroobse resistentsuse täielikuks iseloomustamiseks. Seega erinevate molekulaarsete ja kultiveerimisel põhinevate meetodite kombineerimine annaks kõige põhjalikuma analüüsi antimikroobse resistentsuse kohta.

KOKKUVÕTE

Tänapäeval on üheks suurimaks globaalseks probleemiks saanud antimikroobne resistentsus, mis tähendab, et mikroobidel on tekkinud vastupanuvõime varasemalt efektiivselt mõjunud antimikroobsete ainete osas.

Mikroobide vastupanuvõime mõnede antimikroobsete ainete suunas on küll loomulik, kuid viimaste kümnendite jooksul on see märgatavalt suurenenud. Antimikroobsete ainete laiaulatuslik ja kergekäeline kasutamine meditsiinis, põllumajanduses ja loomakasvatuses on seostatav resistentsete patogeenide tõusuga. Antimikroobse resistentsuse teket on vaja pidevalt kontrollida, et olla kursis nende arvukuse ja levimispaikadega. Hea viis antimikroobse resistentsuse monitooringuks on reoveepuhastusjaamad, millesse suunduv reovesi tuleb väga erinevatest asukohtadest.

Reoveepuhastusjaamadel on tähtis roll eemaldada veest antimikroobsele ainele resistentsed bakterid ja geenid, kuid samal ajal on reoveepuhastis olevad mikroobid väga kontsentreeritult koos, mis loob head tingimused antimikroobsete ainete resistentsusgeenide ülekandeks ja antibiootikumiresistentsete bakterite paljunemiseks. Kõiki AMRB-eid ja AMRG-e pole võimalik veepuhastusprotsessis töödeldavast veest eemaldada ja paratamatult kanduvad need edasi keskkonda, mille tagajärjel võib tekkida heitvee ja inimese vahel kontakt, näiteks töödeldud veega kastetud toiduainete tarbimisel või veesporti tehes.

AMRG-e saab tuvastada nii kultiveerimisel põhinevatel meetoditel, näiteks MIC-i ja antimikroobse ainega immutatud paberdiskide abil ning ka molekulaarsete meetodite abil PCR-i ja metagenoomse sekveneerimise kaudu. Antimikroobse resistentsuse kohta on põhjalikke andmebaase, näiteks CARD, mis sisaldab resistentsusgeenide kohta informatsiooni ja ühendab AMR-alased teadmised. Uute AMRG-ide tuvastamiseks on olemas tarkvarad, mis kaardistavad järjestuse andmed otse võrdlusandmebaasidega ning leiavad muutused kromosoomis bakterite kogu või osalises DNA-järjestuses, mis resistentsust tekitada võivad.

SUMMARY

Antimicrobial resistance detection in wastewater samples

Marii Telliskivi

Summary

Nowadays antimicrobial resistance has become one of the biggest global challenges, meaning that microbes have developed resistance to antimicrobial substances that were previously effective.

Microbial resistance to some antimicrobials is natural, but has increased markedly in recent decades. Large-scale and unreasonable use of antimicrobials in medicine, agriculture and animal industry is associated with a rise in resistant pathogens. The emergence of antimicrobial resistance needs to be constantly monitored in order to have an overview of their abundance in different locations. A good way to monitor antimicrobial resistance is through wastewater treatment plants, which receive wastewater from a wide variety of locations.

WWTPs have an important role to play in removing antimicrobial resistance bacteria and genes from the water, but at the same time, the microbes present in the WWTP are highly concentrated together, creating good conditions for the transfer of antimicrobial resistance genes and the proliferation of antibiotic resistant bacteria. It is not possible to remove all AMRBs and AMRGs from the wastewater in the water treatment process, and they will inevitably be transferred to the environment. There is different ways how AMRBs and AMRGs may come in contact with human, it can happen through drinking water, through watersport, etc.

AMRGs can be detected by cultivation-based methods, such as MIC and paper disks with antimicrobial agents applied to the agar, and by molecular methods such as PCR and metagenomic sequencing. A combination of different molecular and cultivation-based methods would provide the most comprehensive analysis of antimicrobial resistance.

There are available comprehensive databases about antimicrobial resistance, i.e CARD, which contains information about AMR on resistance genes. To identify novel AMRGs, there are

softwares available that maps sequence data directly to reference databases and identify changes in the chromosome in the whole or partial DNA sequence of bacteria that may have resistance towards an antimicrobial substance.

TÄNUSÕNAD

Tänan oma juhendajat Maido Remmi, kes alati juhendades toeks oli ja käesoleva töö valmimisse oma aega panustas. Tänan ka Age Brauerit ja Reidar Andresoni, kes teema praktilisemat poolt tutvustasid. Samuti soovin tänada kogu Bioinformaatika õppetooli tehtud seminaride eest.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., & others. (2020). CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, *48*(D1), D517–D525.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, *25*(17), 3389–3402.

Amarasiri, M., Sano, D., & Suzuki, S. (2020). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *50*(19), 2016–2059.

Aun, E., Brauer, A., Kisand, V., Tenson, T., & Remm, M. (2018). A k-mer-based method for the identification of phenotype-associated genomic biomarkers and predicting phenotypes of sequenced bacteria. *PLoS computational biology*, *14*(10), e1006434.

Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Rapp, B. A., & Wheeler, D. L. (2000). GenBank. *Nucleic acids research*, *28*(1), 15–18.

Bogaerts, B., Winand, R., Fu, Q., Van Braekel, J., Ceyssens, P.-J., Mattheus, W., Bertrand, S., De Keersmaecker, S. C., Roosens, N. H., & Vanneste, K. (2019). Validation of a bioinformatics workflow for routine analysis of whole-genome sequencing data and related challenges for pathogen typing in a European National Reference Center: Neisseria meningitidis as a proof-of-concept. *Frontiers in microbiology*, *10*, 362.

Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2019). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in bioinformatics*, *20*(4), 1125–1136.

Chandrasekaran, S., & Jiang, S. C. (2019). A dose response model for quantifying the infection risk of antibiotic-resistant bacteria. *Scientific reports*, *9*(1), 1–11.

Che, Y., Xia, Y., Liu, L., Li, A.-D., Yang, Y., & Zhang, T. (2019). Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome*, *7*(1), 1–13.

Chowdhury, A. S., Call, D. R., & Broschat, S. L. (2020). PARGT: A software tool for predicting antimicrobial resistance in bacteria. *Scientific reports*, *10*(1), 1–7.

Coates, A. R., Halls, G., & Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same? *British journal of pharmacology*, *163*(1), 184–194.

Davis, J. J., Wattam, A. R., Aziz, R. K., Brettin, T., Butler, R., Butler, R. M., Chlenski, P., Conrad, N., Dickerman, A., Dietrich, E. M., & others. (2020). The PATRIC Bioinformatics Resource Center: Expanding data and analysis capabilities. *Nucleic acids research*, *48*(D1), D606–D612.

EPA, U. (2006). Method 1600: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using membrane-Enterococcus Indoxyl-Beta-D-Glucoside Agar (mEI) EPA-821-R-02-022. *US Environmental Protection Agency, Washington, DC*.

Fawzy, R., Samy, A., Salam, H. S., Khairy, E. A., & Koraney, A. A. (2017). Polymerase chain reaction detection of genes responsible for multiple antibiotic resistance Staphylococcus aureus isolated from food of animal origin in Egypt. *Veterinary world*, *10*(10), 1205.

Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J. G., Haendiges, J., Haft, D. H., Hoffmann, M., Pettengill, J. B., Prasad, A. B., Tillman, G. E., & others. (2021). AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–9.

Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D. H., Prasad, A. B., Slotta, D. J., Tolstoy, I., Tyson, G. H., Zhao, S., Hsu, C.-H., McDermott, P. F., & others. (2019). Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *63*(11), e00483-19.

Ferro, G., Guarino, F., Castiglione, S., & Rizzo, L. (2016). Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H2O2 process. *Science of the total environment*, *560*, 29–35.

Flandrois, J.-P., Lina, G., & Dumitrescu, O. (2014). MUBII-TB-DB: a database of mutations associated with antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. *BMC bioinformatics*, *15*(1), 1–9.

Franklin, A., Brinkman, N., Jahne, M., & Keely, S. (2021). Twenty-first century molecular methods for analyzing antimicrobial resistance in surface waters to support One Health assessments. *Journal of Microbiological Methods*, *184*, 106174.

Galhano, B. S., Ferrari, R. G., Panzenhagen, P., de Jesus, A. C. S., & Conte-Junior, C. A. (2021). Antimicrobial resistance gene detection methods for bacteria in animal-based foods: A brief review of highlights and advantages. *Microorganisms*, *9*(5), 923.

Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *14*, 319–338.

Guarddon, M., Miranda, J. M., Vázquez, B. I., Cepeda, A., & Franco, C. M. (2012). Direct Quantification and Distribution of Tetracycline-Resistant Genes in Meat Samples by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of food science*, *77*(7), M372–M376.

Hendriksen, R. S., Bortolaia, V., Tate, H., Tyson, G. H., Aarestrup, F. M., & McDermott, P. F. (2019). Using genomics to track global antimicrobial resistance. *Frontiers in public health*, *7*, 242.

Hiller, C., Hübner, U., Fajnorova, S., Schwartz, T., & Drewes, J. (2019). Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. *Science of the Total Environment*, *685*, 596–608.

Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., & others. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*, *83*(22), 8604–8610.

Hultman, J., Tamminen, M., Pärnänen, K., Cairns, J., Karkman, A., & Virta, M. (2018). Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent. *FEMS microbiology ecology*, *94*(4), fiy038.

Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., Lago, B. A., Dave, B. M., Pereira, S., Sharma, A. N., & others. (2016). CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, gkw1004.

Kaplan, S. L., Mason, E. O., Wald, E. R., Schutze, G. E., Bradley, J. S., Tan, T. Q., Hoffman, J. A., Givner, L. B., Yogev, R., & Barson, W. J. (2004). Decrease of invasive pneumococcal

infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*, *113*(3), 443–449.

Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolek, T., McCall, L.-I., McDonald, D., & others. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(7), 410–422.

Lee, K., Kim, D.-W., & Cha, C.-J. (2021). Overview of bioinformatic methods for analysis of antibiotic resistome from genome and metagenome data. *Journal of Microbiology*, *59*(3), 270–280.

McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., & others. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(7), 3348–3357.

McLain, J. E., Cytryn, E., Durso, L. M., & Young, S. (2016). Culture-based methods for detection of antibiotic resistance in agroecosystems: Advantages, challenges, and gaps in knowledge. *Journal of environmental quality*, *45*(2), 432–440.

Munir, M., Wong, K., & Xagoraraki, I. (2011). Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water research*, *45*(2), 681–693.

Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M. K., & others. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. *The Lancet infectious diseases*, *13*(9), 785–796.

Muziasari, W. I., Managaki, S., Pärnänen, K., Karkman, A., Lyra, C., Tamminen, M., Suzuki, S., & Virta, M. (2014). Sulphonamide and trimethoprim resistance genes persist in sediments at Baltic Sea aquaculture farms but are not detected in the surrounding environment. *PLoS One*, *9*(3), e92702.

Muziasari, W. I., Pitkänen, L. K., Sørum, H., Stedtfeld, R. D., Tiedje, J. M., & Virta, M. (2017). The resistome of farmed fish feces contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in sediments below Baltic Sea fish farms. *Frontiers in microbiology*, *7*, 2137.

Nguyen, A. Q., Vu, H. P., Nguyen, L. N., Wang, Q., Djordjevic, S. P., Donner, E., Yin, H., & Nghiem, L. D. (2021). Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: Current strategies and future challenges. *Science of The Total Environment*, *783*, 146964.

Papp, M., & Solymosi, N. (2022). Review and Comparison of Antimicrobial Resistance Gene Databases. *Antibiotics*, *11*(3), 339.

Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, *109*(7), 309–318. PubMed. https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030

Quintela-Baluja, M., Abouelnaga, M., Romalde, J., Su, J.-Q., Yu, Y., Gomez-Lopez, M., Smets, B., Zhu, Y.-G., & Graham, D. W. (2019). Spatial ecology of a wastewater network defines the antibiotic resistance genes in downstream receiving waters. *Water research*, *162*, 347–357.

Rice, E. W., Wang, P., Smith, A. L., & Stadler, L. B. (2020). Determining hosts of antibiotic resistance genes: A review of methodological advances. *Environmental Science & Technology Letters*, *7*(5), 282–291.

Rodloff, A., Bauer, T., Ewig, S., Kujath, P., & Müller, E. (2008). Susceptible, intermediate, and resistant–the intensity of antibiotic action. *Deutsches Ärzteblatt International*, *105*(39), 657.

Rodríguez, E. A., Ramirez, D., Balcázar, J. L., & Jiménez, J. N. (2021). Metagenomic analysis of urban wastewater resistome and mobilome: A support for antimicrobial resistance surveillance in an endemic country. *Environmental Pollution*, *276*, 116736.

Snyder, E., Kampanya, N., Lu, J., Nordberg, E. K., Karur, H., Shukla, M., Soneja, J., Tian, Y., Xue, T., Yoo, H., & others. (2007). PATRIC: the VBI pathosystems resource integration center. *Nucleic acids research*, *35*(suppl_1), D401–D406.

Zankari, E., Allesøe, R., Joensen, K. G., Cavaco, L. M., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2017). PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(10), 2764–2768.

Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *67*(11), 2640–2644.

Zhou, J., He, Z., Yang, Y., Deng, Y., Tringe, S. G., & Alvarez-Cohen, L. (2015). High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: Open and closed formats. *MBio*, *6*(1), e02288-14.

Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., Polachek, A. J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J. D., & others. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*, *1*(8), e316–e327.

Wang, Y., & Salazar, J. K. (2016). Culture-independent rapid detection methods for bacterial pathogens and toxins in food matrices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(1), 183–205.

Xu, L., Ouyang, W., Qian, Y., Su, C., Su, J., & Chen, H. (2016). High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. *Environmental Pollution*, *213*, 119–126.

Yao, H., & Yiu, S.-M. (2019). Deep analysis and optimization of CARD antibiotic resistance gene discovery models. *BMC genomics*, *20*(10), 1–10.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marii Telliskivi,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Antimikroobse resistentsuse detekteerimine reoveeproovidest, mille juhendaja on Maido Remm,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Marii Telliskivi

26.05.2022