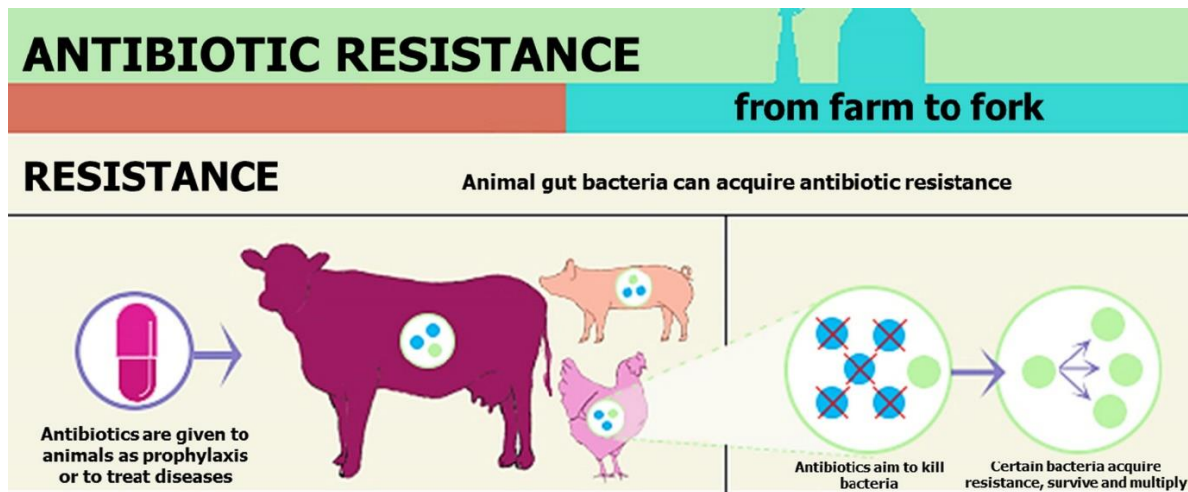


Антибиотична резистентност във веригата за доставки на продукти и храни: Къде може секвенирането и метагеномиката да помогнат в оценката на риска?

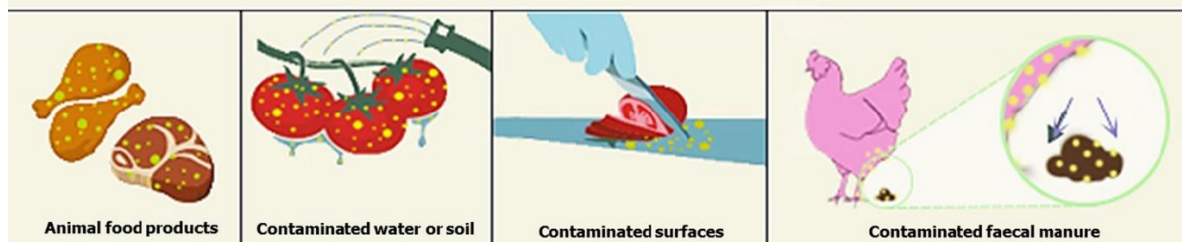
Резистентността към антибиотици е бързо нарастваща заплаха за човешкото здраве. Околната среда, включително животновъдството и растениевъдството, функционира както като път за предаване на резистентни към антибиотици патогени, така и като източник на гени за резистентност. Веригата за доставки на продукти и храни свързва екологичните местообитания на бактериите с хората по начин, който понякога – поради употребата на антибиотици както в селското стопанство, така и в аквакултурите – включва значителен селективен подбор за резистентност. В съответствие с международните стандарти за храните при анализа на риска при производството на храни следва да се вземат предвид подборът и разпространението на пренасяната в храната резистентност. Високопроизводителното секвениране и метагеномиката биха могли да допринесат за разбирането на процесите по предаване на резистентни гени и бактерии и подбора на AMP във веригата за доставки на храни и продукти.



Антибиотичната резистентност е бързо развиваща се здравна криза, която застрашава не само способността да се лекуват и овладеят инфекциите, причинени от резистентни бактериални патогени, но също така усложняват медицински звена като хирургия, неонатални грижи и лечение на рак. Прекомерната и неправилната клинична и ветеринарна употреба на антибиотици несъмнено са основни фактори за развитие на резистентност при патогенните бактерии, като има все повече доказателства, че други мерки трябва да бъдат взети предвид, за да се смекчи нарастването на броя на резистентни бактерии. Гените на резистентността присъстват в околната среда много преди антибиотичната ера и има доказателства, че тя вероятно е послужила като източник за много от гените на резистентността, пред които са изправени днес патогените. Освен това условията на околната среда,

включително животните и растенията, функционират като път за предаване на патогенни и непатогенни резистентни бактерии.

ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA can be passed on...



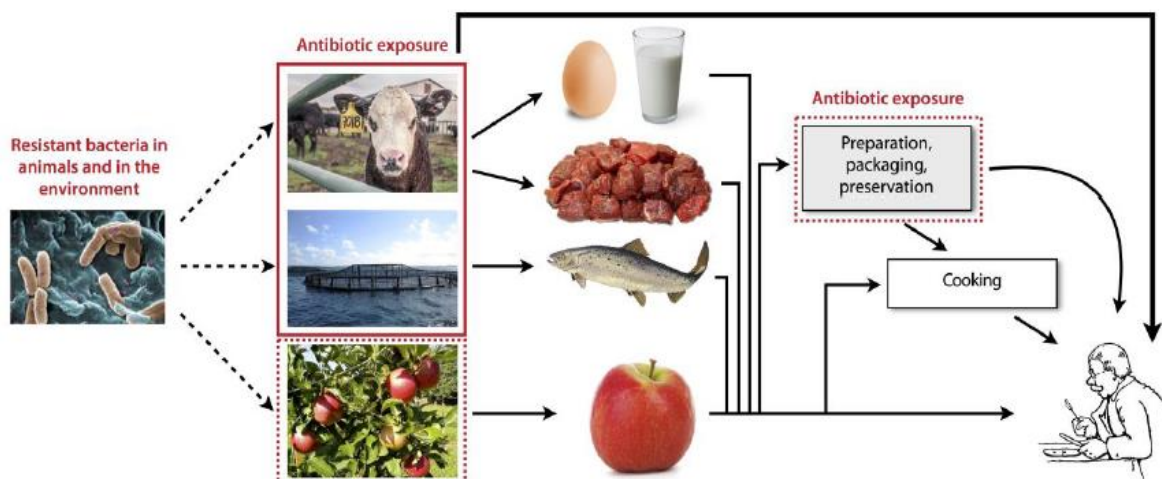
Съоръженията за производство на храни и веригата за доставки на храни и продукти могат да играят решаваща роля като свързващо местообитание на бактериите в околната среда, животните и хората. В международните стандарти за храните се посочва, че при анализа на риска при производството на храни следва да се вземат предвид подборът и разпространението на резистентни бактерии в храните и че **мониторингът на резистентни бактерии е от решаващо значение за определянето на ефективни стратегии за управление на риска**. За предоставяне на насоки и информация за оценка на риска при различни сценарии са използвани високопроизводително секвениране и метагеномен анализ, както по отношение на резистентността към антибиотици, така и по отношение на безопасността на храните. Въпреки това относителните рискове от намирането на индивидуални гени за резистентност в различни среди зависят в голяма степен от контекста и свързването с човешки патогени е от ключово значение за определяне на рисковете за човешкото здраве.

Акценти

- Анализът на риска за безопасността на храните следва да отчита селективността на антибиотична резистентност
- ДНК секвенирането може да разграничи щамовете, свързани с хранителни взривове, предавани чрез храна
- Секвенирането на генома може да идентифицира факторите на резистентност към антибиотици, носени от бактериите
- Метагеномния анализ би могъл да следи предаването на резистентност във веригата за доставки на храни
- Понастоящем ползите от метагеномния скрининг може да не оправдаят разходите му.

Метагеномна характеристика на гени на бактериална общност и резистентност към антибиотици в представителна готова за консумация храна

Готовите за консумация храни (*RTE*) се считат за **резервоари на бактерии, устойчиви на антибиотици**, които представляват **пряка заплаха за човешкото здраве**, но потенциалните микробиологични рискове за *RTE* храни остават до голяма степен неизследвани.



В проучване на тема „*Metagenomic characterization of bacterial community and antibiotic resistance genes in representative ready-to-eat food in southern China*“ на YiMing Li, WeiWei Cao, ShuLi Liang, Shinji Yamasaki, Xun Chen, Lei Shi & Lei Y метагеномният подход е използван за характеризиране на изчерпателните профили на бактериалната общност и гените за резистентност към антибиотици (ARG) в 18 проби от RTE храни (8 RTE месо, 7 RTE зеленчуци и 3 RTE плодове) в Южен Китай. Като цяло най-разпространените видове бактерии в RTE храни са: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*. Открити са 204 подтипа ARG, принадлежащи към 18 типа ARG с диапазон на изобилие между $2,81 \times 10^{-5}$ и $7,7 \times 10^{-1}$ копия на ARG на копия на 16S rRNA. Гените, устойчиви на множество лекарства, са най-преобладаващият тип ARG в RTE храните. Доминиращи са гените на резистентност към хлорамфеникол, макролид-линкозамид-стрептограмин, резистентност към множество лекарства, аминогликозиди, бацитрацин, тетрациклин и β -лактамни антибиотици, широко използвани в хуманната медицина или ветеринарната медицина/промотори. Анализът показва, че подвижните генетични елементи (MGE) играят важна роля в промяната на резистомата. Това проучване допълнително задълбочава цялостното разбиране на антибиотичния резистом и корелациите между антибиотичния резистом, микробиома и MGE в RTE храните.

Хранителната верига се счита, че има важен принос за развитието и разпространението на устойчиви на антибиотици микроорганизми. Има много доклади за микробната общност в сурови и RTE храни, но повечето се основават на традиционно култивиране или PCR методи. През последните години, въпреки че технологията за метагеномно секвениране е приложена за изследване на микробната общност в храните, повечето проучвания се фокусират върху проследяване на промените в сложната микробна общност в преработените храни. Освен това RTE храни все още не са добре анализирани, които се консумират директно без допълнително третиране. Настоящото проучване показва, че най-разпространените бактерии в RTE храни са сходни, като това са *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*. Метагеномният подход, базиран на HTS, може изчерпателно да отразява структурата на микробната общност. Освен това, въпреки че 18 -те проби в това проучване са събрани от шест различни супермаркета, повечето от пробите (17/18) са добре групирани според типа на пробата. Доколкото е известно, това е и първият цялостен анализ на бактериалния състав в RTE храните чрез метагеномния подход.

16S rDNA секвенирането е друг широко използван метод за идентифициране на хранителни микробни общности. Цената е сравнително по-ниска, а биоинформатичните инструменти, предназначени за анализ на данните от последователността, са безплатни и лесни за работа. Независимо от това, изборът на хипервариабилния регион за 16S rDNA е по-зависим от публикуваните или разработени вътрешно протоколи. **Метагеномният подход може да предостави изчерпателна информация за гените, структурата и организацията на геномите, структурата на микробната общност и еволюционните взаимовръзки.** В това проучване първите 10 най-разпространени подтипа *ARG* във всеки тип проба са с относителното изобилие от $7,55 \times 10^{-5}$ до $3,42 \times 10^{-3}$ копия на *ARG*/ копия на гена 16S rRNA. Обикновено относителното изобилие на *ARG* в незамърсена среда варира от 10^{-8} до 10^{-6} копия/16S rRNA, докато концентрациите в силно замърсени места често са с няколко порядъка по-високи. Следователно, **трябва да се обърне повече внимание на *ARG* с относително изобилие $> 10^{-4}$ копия на 16S рНК.** Според предишни доклади, базирани на PCR методи, добре проучените *ARG* типове включват предимно резистентни гени, свързани с тетрациклин, сулфонамиди, β -лактами, макролиди, метицилин и аминогликозиди. Гените за резистентност към тетрациклин и макролиди представляват близо 80%. Междувременно не повече от 50 подтипа *ARG* са изброени в предишни проучвания. Поради ограничената наличност на праймери, използвани в традиционните PCR методи, е определена проста схема на възможните профили на *ARG* за *RTE* храни, като *tetM*, *ermB* и *aac (6') Ie-aph (2'')* в *RTE* храни. Въпреки това, метагеномният анализ, базиран на *HTS*, може да улови по-цялостна картина на корелациите между *ARG* профилите без PCR отклонение и може едновременно да анализира 18 *ARG* типа, състоящи се от 204 *ARG* подтипа. Освен това **резултатите от метагеномния анализ биха предоставили нова перспектива за изследвания в бъдеще.** Например, това проучване е разкрило, че **гените за мултирезистентност *acrB* и *ksgA* са сред първите 10 най-разпространени генни типове в *RTE* зеленчуци и плодове**, което е трудно да се докаже чрез PCR подходи и може да бъде проучено задълбочено в бъдеще.

Установено е, че **мултилекарствените *ARG* са най-доминиращите в *RTE* храни** в съотношения $3,7 \times 10^{-2} - 5,8 \times 10^{-1}$. Обратно, данните за околната среда показват, че **доминиращите типове *ARG* в питейната вода, фекалните маси от животни и седиментите са съответно мултилекарствени *ARG*, тетрациклинови *ARG* и аминогликозидни *ARG*.** Много предишни проучвания съобщават за разпространението на многолекарствени *ARG* в *RTE* храни. Резистентност към множество лекарства е открита в *RTE* продукти от пуешко месо, и мултилекарствената резистентност е по-висока отколкото при суровото месо. Различни щамове, устойчиви на много лекарства, са изолирани от *RTE* храни, включително *Salmonella* *Teko* и *Salmonella* *Virchow*. Нещо повече, **рибните продукти** като сурова риба и скариди някога са били считани за **често средство за предаване на патогени, устойчиви на много лекарства.** *Carvalho et al.* съобщават, че **листните зеленчуци и плодовете са източник на мултирезистентни *Acinetobacter* spp.** и 29,8% от щамовете са класифицирани като мултирезистентни. Поради продължителната употреба на антибиотици в хуманната и ветеринарната медицина, **проблемът с микробната резистентност става все по-значителен.** Много проучвания показват, че гените за антибиотична резистентност могат да се разпространяват чрез хоризонтален генен трансфер между различни бактериални общности, което води до широко разпространение на гените за лекарствена

резистентност и появата на мултирезистентност. Мултирезистентните шамове в храните могат да представляват заплаха за общественото здраве, което може да предаде тези патогени на хората и на заобикалящата ги среда. Гените за мултилекарствена резистентност може да са присъщи на бактерии, свързани със самата храна, или да са резултат от замърсяване или предаване при транспорт и допълнителна обработка на суровините и храните. **Необходими са обаче допълнителни системни проучвания и мултидисциплинарен подход за проследяване на пътищата на заразяване с резистентни бактерии и ARG в производството на храни** и за определяне дали тези резистентни гени могат да причинят потенциална вреда на хората.

Чрез изучаване на компонентите в ARG, резултатите сочат, че гените за мултирезистентност, резистентност към бацитрацин, аминокликозиди и тетрациклини, са най-разпространени в RTE храни. Установено е, че гените, кодиращи резистентност към тетрациклините, сулфонамидите, бета-лактамите, аминокликозидите и хинолоните са много по-често изолирани от RTE месни продукти отколкото от зеленчуците или плодовете, което може да бъде причинено от прекомерната и неправилната употреба на антибиотици в животновъдството.

Известно е, че **промяната на MGE влияе върху профилите на ARG в коменсални и/или потенциални патогени**, открити в храни от месен и растителен произход. Въпреки това, ролята на промяната на бактериалната общност в промяната на ARG в храни е малко проучена. Много предишни проучвания разкриват, че бактериалната общност играе важна роля за оформянето на профилите на ARG сред различни микроорганизми в околната среда. Необходима е допълнителна работа, за да се разбере по-добре как промяната на бактериалната общност води до промяна на ARG в пробите от храни.

Това е първото проучване на разпределението на микробната общност и ARG между RTE храни, използвайки метагеномния подход. **Тези констатации биха могли да предоставят по-широка перспектива и информация за ARG и резистентните бактерии в RTE храни за оценка на риска и предприемане на мерки за смекчаване на риска.**

Снабдяване с храни и предаване на резистентни към антибиотици бактерии

По принцип процедурата за оценка на риска е същата за предаването на резистентни към антибиотици бактерии в хранителни продукти, както за предаването на нерезистентни патогени, а употребата на високопроизводителен секвентен анализ за тези цели са основно обсъдени и преразгледани преди. Най-важната разлика, специфична за антибиотичната резистентност, е, че гените на резистентността могат да се разпространяват от непатогенни бактерии, които впоследствие могат да прехвърлят тези гени на резистентността към човешки патогени след консумация на храни. Такова предаване обаче до голяма степен може да бъде избегнато чрез същите методи, които се използват за отстраняване на патогени в храната. Освен това инфекциите, причинени от резистентни бактерии в храни, обикновено причиняват по-тежки последици от заболяванията, отколкото инфекциите с възприемчиви бактерии. Важно е да се отбележи, че резистентни бактерии, включително патогени, могат да причинят замърсяване по време на преработката на хранителни продукти, като отворят индиректен път на предаване между хората, и може да е трудно да се определи дали

наличието на резистентни бактерии в храните е резултат от замърсяване от човека или излагане на бактерии от околната среда или животните.

Верига за доставки на храни и развитието на резистентност към антибиотици

Критичен аспект при прехвърлянето на гени за антибиотична резистентност от животни и околната среда към хората е наличието на **антибиотичен селекционен натиск, благоприятстващ гените, допринасящи за фенотиповете на резистентността**. Такъв подбор ще обогати устойчивите бактерии в сравнение с чувствителните, подпомагайки предаването на гените на резистентността, които носят. В това отношение **веригата за доставки на храни** представлява **специален случай**, тъй като може да съдържа **бактерии с преходно висока резистентност** към антибиотици, особено **в месопроизводството и аквакултурите**. Освен това антибиотиците все още се използват като стимулатори на растежа в много части на света, като бактериалните животински изолати имат относително постоянни нива на антибиотична резистентност. **Използването на антибиотици в производството на храни разширява ролята на веригата за доставки на храни за разпространение на резистентни бактерии и резистентни гени**, за потенциално избиране за детерминанти на резистентност и за стимулиране на обмена на гени на резистентност чрез хоризонтален генен трансфер.

Най-голяма употреба на антибиотици е регистрирана **при хората и в животновъдството**. По подобен начин голямата употреба на антибиотици в **аквакултурите** в много части на света превръща отглеждането на риба и двучерупчести мекотели в **арена за появата и селекцията на резистентността**. В рибовъдните стопанства са докладвани с по-голямо изобилие от гени за антибиотична резистентност и разнообразие от мобилни генетични елементи.

Недостигът на ресурси за риболов и липсата на достатъчно храна са предизвикали голям развой на аквакултурите през последните десетилетия по отношение на производството и икономическата стойност. Като такава, **устойчивото производство на аквакултури** е един от **основните приоритети в програмата на Европейския съюз до 2030 г.** Интензивното отглеждане на морски дарове е довело до **по-висок риск от огнища на болести и до увеличаване на употребата на антимикробни средства** за тяхното контролиране. Селективният натиск, упражняван от тези лекарства, осигурява идеалните условия за появата на **«горещи точки» на антимикробна резистентност в съоръженията за аквакултури**.

Технологиите *omics* са общ термин за съвременни технологии като **геномика, метагеномика, транскриптомика, протеомика, културомика и метаболомика**. Тези техники получават все по-голямо признание поради **потенциала им да разкрият нови механизми в биологичната наука**. **Метагеномиката** позволява **изучаването на геномите в микробните общности**, съдържащи се в определена среда/храна. Потенциалните приложения на метагеномиката при аквакултурите включват изследване на **микробното разнообразие, микробните функции и гените за резистентност към антибиотици**.

Зеленчуците представляват друг кратък път за разпространение от околната среда към хората на **резистентни бактерии и гени**, а почвите, използвани за отглеждане на културите, често се третират с **оборска тор**, която от своя страна често е

с животински произход и от животни, третирани с антибиотици. Освен това антибиотиците се използват и за защита на някои плодове от бактериални заболявания. Въздействието на антибиотиците върху оборската тор и торената почва е проучено чрез използване както на традиционни методи, така и на метагеномен анализ. Тълкуването на такива изследвания обаче е сложно, тъй като ефектът от селекцията от остатъци на антибиотици и ефектът от циркулирането и появата на резистентни бактерии от животински фекалии не могат лесно да бъдат отделени. Изглежда обаче, че **почвата на обработваемите земеделски земи може да функционира като дългосрочен резервоар за гени на антибиотична резистентност след третирането и с оборска тор** и е възможно **резистентните бактерии**, натрупани в третираната с оборска тор почва, да могат да се **разпространяват допълнително с плодове и зеленчуци** и по този начин да се разпространят в световен мащаб и да **инвазират хората**.

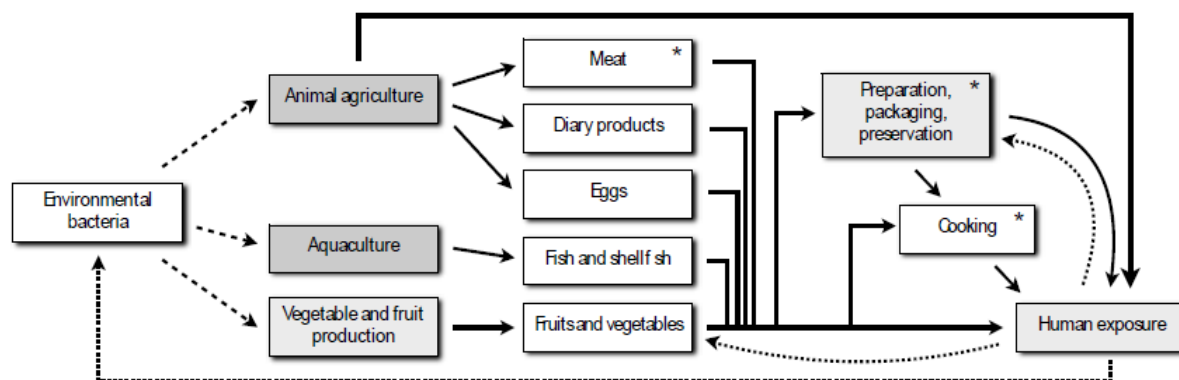
Важен аспект на разпространението на резистентни бактерии чрез производството на храни е, че хората могат да бъдат пряко изложени на бактерии от селскостопански животни. Такова излагане на резистентни бактерии и гени между животните и хората е често и с висока вероятност и въздействието им върху разпространението на резистентност може да бъде голямо.

В обстойно **проучване** на тема: *„Food supply chains and the antimicrobial resistance challenge: On the framing, accomplishments and limitations of corporate responsibility“* на авторски колектив *Alex Hughes, Emma Roe, Suzanne Hocknell* е направен изключително подробен **критичен преглед на веригата на доставки на храни и продукти, съотнесени към антимикробната резистентност**. Това проучване оценява разбирането за АМР като предизвикателство за хранителната верига и критично изследва как се формулират и прилагат мерките и стратегиите за справянето с него във вътрешните вериги за доставка на месни продукти във Великобритания. Това проучване осигурява съвременен анализ на колективната ангажираност с наболелия по цялата хранителна верига проблем АМР в светлината на доклада на *O'Neill* от 2016 г. за борба с инфекциите, предизвикани от устойчиви на антимикробни средства бактерии в световен мащаб, в който веригите супермаркети и други търговски хранителни вериги, преработвателните и регулаторните предприятия и институции са поставени като ключови отговорници. В този научен обзор е **оценена стратегията за справяне с АМР в хранителната верига, фокусирана върху антимикробното управление, по-специално целите за намаляване на употребата на антибиотици в производството на храни и диагностичните методи и подготвеност на държавите да прилагат молекулярните методи като например метагеномен анализ или пълен геномен секвентен анализ**. Този концептуален анализ обхваща начина, по който веригата за доставки на храни и продукти влияят на АМР и разпространението на устойчиви бактерии по цялата агрохранителна верига, така и екологичната сложност на предизвикателството АМР.

Приготвяне на храна

При **оценката на риска** както на резистентни, така и на нерезистентни патогени в храните, от **основно значение** е да се признае значението на **етапа по приготвянето на храната**. **Храна, която е правилно приготвена** или приготвена по друг начин, който убива бактериите, представлява почти **непроницаема бариера** за инвазиране или

колониране на хората. Това оказва влияние и върху картината на риска, тъй като е вероятно зеленчуците и плодовете да бъдат консумирани сурови или необработени, отколкото месото и рибата. Освен това зеленчуците и плодовете често не се обработват преди да достигнат до крайния потребител, които от своя страна също могат да пренебрегнат добрите хигиенни практики и така да не избегнат приема на (потенциално устойчиви) бактерии. Следователно **приготвянето, съхраняването и опаковането** на зеленчуци и плодове може да изисква **допълнително внимание**, тъй като **растителните култури представляват централна връзка между бактериите от околната среда и човешкия микробиом**.

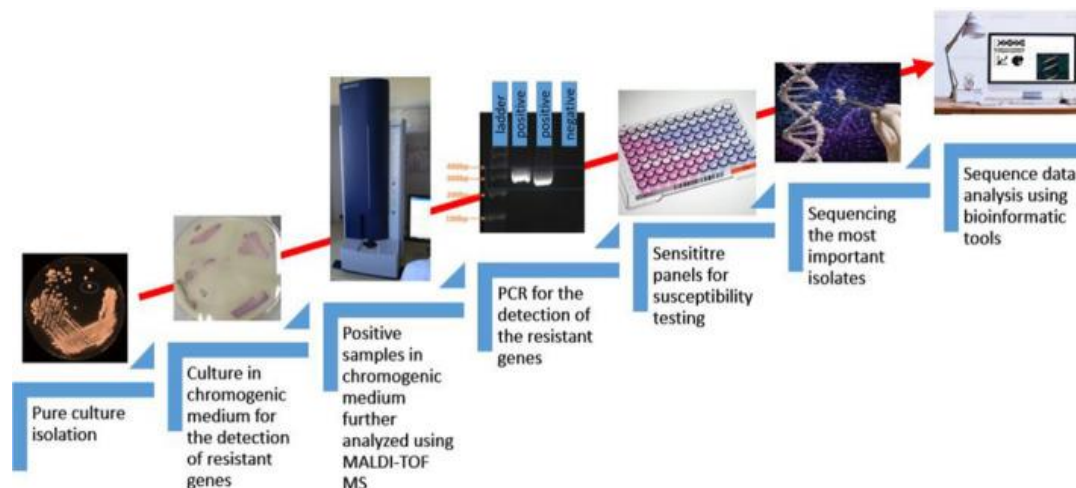


Фигура 1. Опростен схематичен преглед на потока от резистентни бактерии и резистентни гени във веригата за доставки на храни и продукти. Стъпките, при които обикновено се среща силен селекционен натиск за антибиотична резистентност (напр. Употреба на антибиотици), са обозначени с тъмно сив фон, докато стъпките, при които такава селекция се случва, но е по-рядка, са обозначени със светлосив фон. Трябва да се обърне внимание, че директното излагане на резистентни бактерии в животновъдството е важен начин за разпространение, може би по-важен от излагането през цялата верига за доставки на храни. Въпреки че много храни преминават през процес на първична подготовка, опаковане и консервиране, много хранителни продукти също се консумират директно, със или без готвене. Също така (устойчивите) човешки патогени могат да замърсят храната както при тези процеси, така и при третиране от страна на крайния потребител на плодовете и зеленчуците (пунктирни линии). Стъпки, които представляват важни бариери за предаване на резистентността, са обозначени със звездичка.

Принципи и стъпки при употребата на *omics* технологиите за анализиране на микробните общности

Конвенционалните методи за откриване на антибиотична резистентност се основават на анализи чрез диск-дифузионен метод за инхибиране на растежа на бактериите, при които минималната инхибираща концентрация (MIC) на определени антибиотици се оценява за всеки бактериален изолат. С тази процедура само няколко бактериални изолата могат да бъдат изследвани наведнъж, в контраст с милионите бактериални видове, които могат да присъстват в съоръженията за преработка на хранителните суровини и аквакултури, в екосистемите, преработвателните предприятия и съоръженията за преработка на отпадъчни води. Друг проблем, свързан с конвенционалните диагностични методи е времето за култивиране, което може да отнеме от 1 до 2 дни за бързо растящите бактерии до няколко седмици за бавнорастящите видове. Разработени са методи, включващи количествени PCR-и, но те откриват само наличието на специфични добре проучени гени, свързани с антибиотична

резистентност. Те не могат да се използват за **широкоспектърен скрининг** и по този начин реалният потенциал на некултивираните видове като резервоари за резистентност към антибиотици се пренебрегва. **Секвенирането** от следващо поколение заобикаля тези ограничения, тъй като това е технология, позволяваща **по-задълбочен поглед върху геномната информация на повечето бактерии**, което води до откриване на **нови гени на резистентност**. Метагеномният подход предоставя **информация относно наличието, отсъствието или модификацията на гените, отговорни за антибиотичната резистентност**, и освен това откриването на нови гени е по-бързо.



Фигура 2: Схематично представени етапите от секвенирането на генома и метагеномния анализ

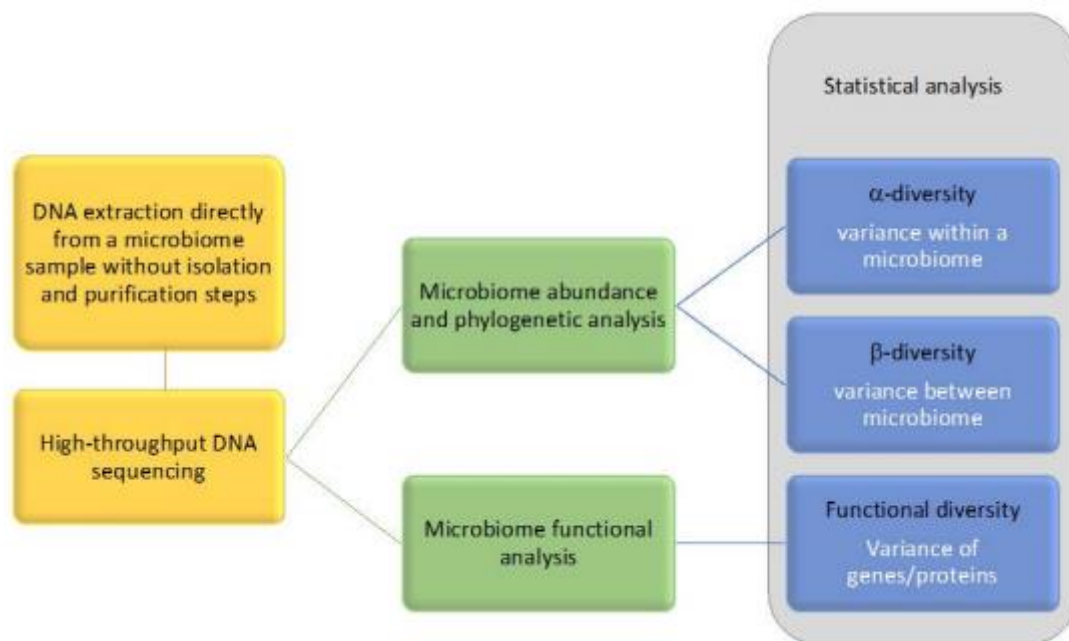
През последното десетилетие **метагеномиката** се очерта като **обещаващ метод**, който **може да анализира множеството геноми, съдържащи се в микробна общност** или биом. По този начин, вместо да се събират микроорганизми от микробна общност, които да бъдат култивирани или наблюдавани в лаборатория, **изолирането на ДНК директно от проба може да предостави информация, свързана с разнообразието на микроорганизмите, циркулиращи в определени области, и включително да разкрие информация, свързана с тяхните функции и биологични роли**. До скоро класическите бактериологични методи са били стандартната процедура за изследване на бактериалните общности, но с появата на геномните подходи, а именно метагеномиката, се отвори нов прозорец за изследване на света на микроорганизмите. Терминът **микробиом** се отнася до всяка микробна общност, заедно с техните геноми. Той може да бъде съставен от множество различни видове микроорганизми. По този начин терминът **метагеномика** се отнася до **анализа на всички геноми от всички микроорганизми, присъстващи в проба**, дори тези, които са трудни за култивиране чрез класически бактериологични методи.

Технологиите за скрининг с висока производителност помагат да се получи цялостен поглед върху различни нива на биомолекулите: гени (геномика), генетика (метагенетика), иРНК (транскриптомика), протеини (протеомика), липиди (липидомика) и метаболити (метабономика), които съставляват и поддържат живота на всички клетки. Основната причина за **нарастващата популярност на омикс технологиите** в биологичните изпитвания е **тяхната способност да предоставят разбираема представа за сложните биологични системи като цяло**. Генетичната информация,

съхранявана в генома, се превръща в набор от всички фенотипове, които се експресират, изпълнявайки подходящи биологични функции.

Изследването на 16S рРНК от различни среди е предоставило сериозни доказателства за съществуването на некултивируеми микроорганизми и почти пълна картина на истинския микробиом. Понастоящем се използват други алгоритми за анализ на последователности, за да се получи информация за еволюционната история и взаимовръзките на организмите (филогеномика) и за класифициране на микроорганизмите.

Метагеномиката се занимава с микробна общност или микробиом като цяло и позволява не само да се разгледа еволюционната динамика на микробиома, но и да се извършат сравнителни анализи на различни микробиоми. Метагеномното секвениране разкрива микробни идентичности и функционална генна информация, включително изолиране на ДНК от микроорганизми с много различни физиологични състояния. Следователно, метагеномиката позволява прогнозиране на функционалния потенциал на общността. Метагеномиката се отнася и до множеството на всички изразени фенотипове, кодирани в метагенома и в околната среда. Метагеномиката е разбирането на метафенотипа, продукт на комбинирания генетичен потенциал на микробиома и наличните ресурси (биотични и абиотични ограничения присъстващи в околната среда). Чрез секвениране на ДНК директно от проби от микробна общност без предишни стъпки на култивиране и изолиране, много различни индивидуални бактериални геноми, всички смесени в една проба се обединява, за да се улови цялото разнообразие от присъстващи организми и функции. Основният актив на метагенома е да представлява общността от микроорганизми, живеещи в определена среда или биом. **Метагеномният анализ** дава информация за **филогенетичното разнообразие в общността**, което трябва да бъде оценено чрез извършване на анализ на алфа разнообразието. За да се получи **пълна класификация и охарактеризиране на видовете**, първо трябва да се отговори на **три различни и допълващи се въпроса**: (i) Колко различни вида или таксони могат да бъдат открити в микробиома? (ii) Как разнообразието на микробите се балансира помежду си? (iii) Има ли еднородност на видовете (подобно ниво на изобилие) или някои видове доминират над други?. По време на **метагеномния анализ** трябва да се извършат **следните стъпки**: (i) извличане на микробна ДНК директно от биологична проба; (ii) високопроизводително секвениране; (iii) последователна биоинформатична обработка на суровите последователности; iv) статистически анализ.



Фигура 3 очертава основните стъпки на метагеномния анализ. Въпреки че лабораторните етапи на обработка могат да бъдат намалени в изследванията на метагеномиката, за генериране на биологични знания са необходими някои мощни биоинформатични инструменти и умения за обработка. Тъй като *in silico* подходите стават все по-популярни, няколко нови биоинформатични инструменти и платформи са проектирани за идентифициране и сравняване на бактериални геноми, което позволява обработката на данни от 16S последователността, получени от метагеномиката. Някои примери са: CopyRighter, Dada2, Deblur, Greengenes, MOTHUR, MicroPro, PAPRICA, PhylOTU, PICRUST2, QIIME2, RDP16, rrnDB, SILVA, Tax4Fun, UPARSE и VITCOMIC2.

Най-забележителната характеристика на метагеномния анализ е, че той се занимава с последователности, изолирани както от известни, така и от неизвестни микроорганизми, принадлежащи към една и съща микробна общност. Метагеномният анализ също така позволява разпределението на тези различни оперативни таксономични единици (OTU) да бъде оценено като приблизителна мярка за тяхното относително изобилие (въпросът „колко?“). Индексът на Шанън измерва разнообразието на микробиома, позволявайки установяването на бактериални таксони, които са доминиращи над другите или, напротив, такива, които са балансирани помежду си.

Оценката на броя на копията на гена 16S също позволява да се допълнят данните, така че да могат да се сравняват различни микробиоми. Тази информация има голяма стойност, тъй като е в основата на анализа на микробното разнообразие. Тази допълнителна информация позволява сравнителен анализ в различни среди, което дава възможност да се установи колко различен е микробният състав в една среда в сравнение с друга. **Метагеномният анализ постепенно замества молекулярните техники, базирани на PCR** (полимеразно верижна реакция), като например клонирани библиотеки за секвениране на рибозомни ампликони, тъй като тези базирани на PCR подходи са ограничени до бактерии и не предоставяха информация за метаболитните възможности на изследваните микробиоми. **Метагеномните технологии** с висока производителност произвеждат **голямо количество данни**, включително за голям брой

гени, генна експресия/изобилие на протеини, в един единствен метод или комбинация от различни методи. Друг **обещаващ аспект на метагеномиката** е способността да се позволи **репертоарът от бактериални геномни черти на микробната общност да се характеризира колективно**, тоест да се изпълняват функционални анотации за всички геномни последователности в общността. За да се изпълни тази задача, трябва да се съберат показания за последователността, получени по методите за секвениране след *Sanger*, последвани от прогнозиране на гени и анотация, така че функционалното разнообразие да може да бъде адресирано.

Функционалният метагеномен анализ предоставя **информация за кодиращи последователности за всяка черта, а именно вирулентни фактори или детерминанти на антимикробна резистентност**. Новите гени и генните продукти също могат да бъдат открити чрез метагеномика, включваща няколко хидролитични ензима, нови молекули и антимикробни съединения. Някои налични инструменти, предназначени специално за анотиране на генома, са: Системата за интегриран експертен преглед на микробния геном (*IMG/ER*); сървърът *RAST*, включващ ресурс от данни за микробни патогени; *JCVI* услуга за анотации и други. Комбинацията от подход за филогенетично профилиране и функционален анализ може да даде отговори на следните въпроси: „Кой е там?“ и "Какво правят или могат да направят тези резистентни гени/бактерии?"

Изводи от оценката на риска от секвенирането и метагеномиката

Много проучвания показват наличието на гени за резистентност при селскостопанските животни, като се използват например подходи за плазмидно и цялостно секвениране на генома (*WGS*). Например *CTX-M* и *TEM* бета-лактамазните гени са открити върху плаزمиди, изолирани и секвенирани от холандски пилета, и същите генни варианти са открити и в човешки изолати. *WGS* е използвана и за идентифициране на конюгативни мегаплазмидни, кодиращи гени за резистентност *ESBL* и при пилета, прасета, месо и човешки изолати от Италия и за определяне на клоналните връзки, факторите на вирулентност и гените за резистентността сред изолати от американски говеда. **Плазмидното секвениране е използвано и за идентифициране на причинителя на наблюдаваната преносима резистентност към колистин**, а именно новият ген за резистентност *mcr-1* на същият плазмид - в изолати от китайски свине, впоследствие идентифициран и в изолати от хора. В нито един от тези случаи пътят на предаване между животните и хората не може да бъде определен напълно. Възможно е експозицията на човека на бактериите, носещи тези детерминанти на резистентност, да се е случила по-скоро на ниво стопанство, отколкото чрез консумирана храна. **Фактът, че тези изследвания откриват почти идентични плазмиди, кодиращи резистентност при хората и животните, ясно показва ролята на животните и производството на храни като основен начин за разпространение на гените на резистентността**. В подкрепа на това, метагеномният анализ потвърждава, че микробиома на животните споделя значителен брой гени на резистентност или мобилни генетични елементи с човешкия микробиом.

Що се отнася до аквакултурите, както и до производството на зеленчуци и плодове, научните изследвания, използващи молекулярни подходи като метагеномния анализ или пълното геномно секвениране, все още са относително оскъдни.

Неотдавнашно проучване, използващо **секвентен анализ на изолати** от италианско **рибовъдно стопанство** показва **сложно взаимодействие между фагите и бактериите по отношение на пренасянето на гени за резистентност**. В друго проучване WGS на бактерии с интегрони, изолирани от плодове и зеленчуци, е използван, за да покаже, че тези хранителни продукти действително представляват правдоподобен начин за разпространение на гените на резистентността от околната среда към човешкия микробиом. Следва обаче да се отбележи, че тези резистентни бактерии също биха могли да произхождат от замърсяване на плодовете с бактерии, свързани с човешката дейност по време на обработката им. По подобен начин секвенирането на фаги, изолирани от готови за консумация храни в Южна Корея е установило наличието на метало-бета-лактамаза, пренасяна с фаги, и гени за резистентност в португалски храни (*street food*) с помощта на PCR, но не може да се определи дали това е резултат от човешко замърсяване или предаване по веригата за доставки на храни.

До момента **метагеномното секвениране** не се прилага много за оценка на безопасността на храните на резистентни бактерии, въпреки че **може да играе централна роля при идентифицирането на опасностите, където може да се използва за откриване на патогени, както и за характеризиране на опасността, особено за идентифициране на факторите на вирулентност и моделите на резистентност**. Количествената оценка на микробния риск изисква определяне на концентрациите на бактерии в местата на експозиция и оценка на дозата след консумация от човека на хранителни продукти, съдържащи резистентни бактерии.

Ако се прилага по подходящ начин, **метагеномиката има потенциала да запълни количествените пропуски в моделите за оценка на риска**, например по отношение на микробното присъствие в суровините, ефективността на отстраняването на замърсителите по време на преработката на храните и сериозността на опасността (напр. антибиотична резистентност и вирулентност). Интересен факт е, че метагеномното секвениране не може да идентифицира единичен ген за резистентност в изолати от кланични трупове, за разлика от откриваните множество гени във фекалии, води, почви, транспортни средства и от животински изолати – разлика, която не може да се обясни единствено с много по-големия дял ДНК на гостоприемника в пробите от кланични трупове. Трябват **допълнителни проучвания**, за да може тази модерна омикс технология да **навлезне в рутинния мониторинг и диагностика на патогени в храни и хранителни суровини**.

Това подчертава, че **процесът на приготвяне на храната все още е важен за предотвратяване наличието на резистентни бактерии в храните** и че **подходящите мерки за хигиена и подготовка значително намаляват риска от експозиция на човека на резистентни към антибиотици бактерии**, произхождащи от животни и външна среда чрез хранителни продукти. Заслужава да се отбележи, че ако предаването на резистентни бактерии се избягва в процеса на приготвяне на храната, това увеличава риска от разпространение на резистентни бактерии при прекия контакт между животни и хора. Всъщност **предаването на бактерии директно от селскостопанските животни на земеделските стопани може да бъде епидемиологично най-вероятният начин на експозиция на хората на детерминантите на резистентност от животински източници**.

Бъдещи перспективи за използването на секвенирането и метагеномния анализ при безопасността на храните

Наблюдава се повратна точка, в която **широкомащабното секвениране** се превръща вече в основна техника за изучаване на микроби и микробни общности, която измества традиционните методи, като например *MLST*, за очертаване на причините за пренасянето чрез храна на определени патогени, установяване огнища на заболявания, хранителни взтривове и откриване и охарактеризиране на гените, отговорни за резистентността и вирулентността. Въпреки това съществуват редица важни пречки, които възпрепятстват прилагането на метагеномиката и секвентния анализ като скрининг инструмент. На първо място, ако се изследват хранителни продукти, е много трудно да се извлече само бактериална ДНК от пробите. Най-често по-голямата част от четенията ще бъдат на самия хранителен източник, а не на отделните бактериални изолати или отделните гени за резистентност. Такъв е случаят и в гореспоменатото проучване на кланичните трупове и месото, в което повече от 97% от висококачествените данни от секвентния анализ са на животинските геноми. Освен това, дори много високи дълбочини на четене при секвенирането може да не са достатъчни за клинично откриване на важни патогени и гени за резистентност дори във фекални проби. Последните статистически данни и данните от метагеномния анализ, въпреки развитието в тези технологии, не могат да бъдат използвани в модели за количествена оценка на риска въз основа например на *Bayes* теоретичната статистика. Второ, по принцип не е възможно да се идентифицира специфичният патоген, от който произхожда прочита на последователностите, което по принцип се изисква за регулаторни и потвърждаващи цели. Въпреки че събирането на данни от метагеномния анализ на последователността би могло частично да облекчи този проблем, остават няколко пречки преди сглобяването, например на геномните локуси, отговорни за резистентността към антибиотици. Трето, *shotgun* метагеномният анализ осигурява само частична информация, която може да е недостатъчна, за да се установи дали е открит патоген или резистентен ген и дали присъства в количества, съответстващи на инфекциозната доза. Този проблем може до известна степен да бъде преодолян чрез набогатяване на пробите с материал с известна концентрация. Освен това, подобно на други молекулярни методи, метагеномното секвениране не прави разлика между ДНК от инактивирани и живи бактерии, което допълнително усложнява оценката на риска. И накрая, метагеномното секвениране и анализът на данните отнемат време и резултатите могат да отнемат седмици за получаване, което може да бъде твърде бавно за вземане на решения и предприемане на конкретни мерки и действия, свързани с безопасността на храните. Въпреки това метагеномните подходи могат да бъдат полезни за подчертаване на конкретни пътища за разпространение на резистентността или очертаване на конкретни генни локуси, кодиращи резистентност. Метагеномният скрининг на гени за резистентност може също така да спомага приоритизирането на мерките за намаляване на разпространението на гени за резистентност във веригата за доставка на храни. Не е ясно обаче дали има достатъчно ползи от метагеномния анализ, за да се оправдаят разходите за прилагането му в рутинната диагностика и оценката на риска за момента. Въпреки това, с бързото развитие на тези *omics* технологии, разходите за секвениране намаляват, както и времето за извършване на анализа и производителността на метода може драстично да се подобри. Освен това метагеномното секвениране позволява ретроспективно изследване на гените за антибиотична резистентност, тъй като се откриват нови фактори на резистентност. Това дава възможност за оценка на степента на проникване на новооткритите гени

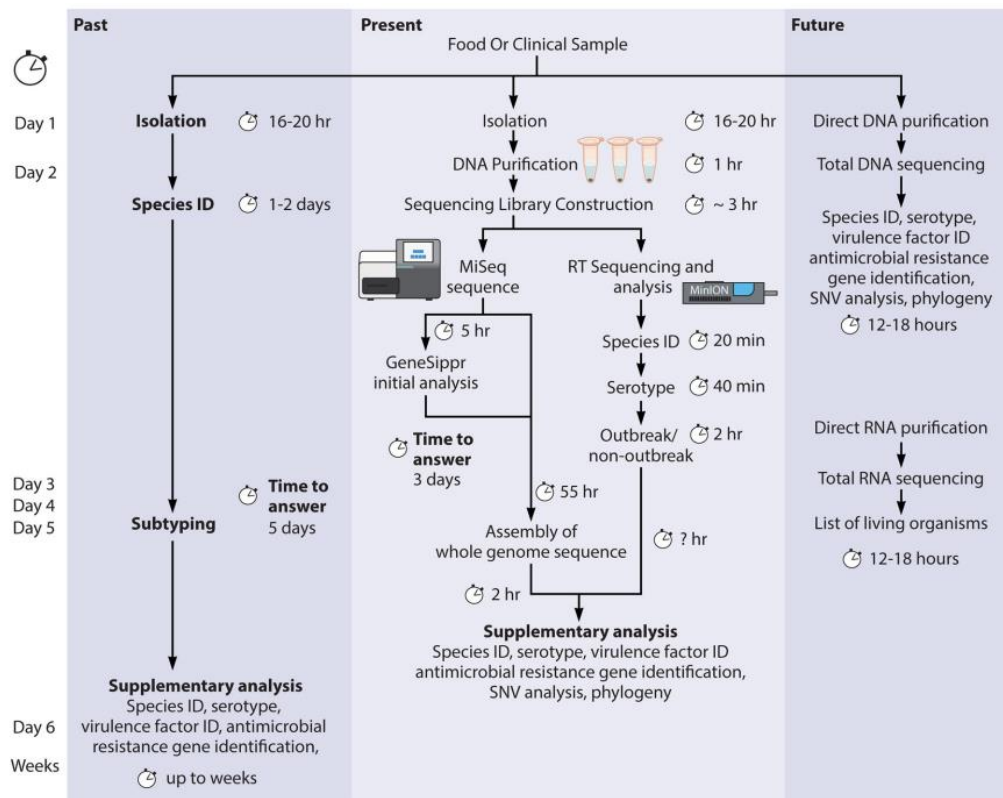
за резистентност, както и за проследяване на тяхната история на разпространение, например по веригата за доставки на храни.

Заклучения

Понастоящем основната употреба на високопроизводителното секвениране при безопасността на храните е свързано с анализ на цели геномни секвенции, за да се определи точно кои шамове са засегнати и кои се предават чрез храни и кои предизвикват хранителни взривове и кои фактори на резистентността носят. За тази цел бързо развиващите се *omics* технологии изглеждат много обещаващи, особено ако се подобри сравнително високият им процент на грешка. Освен това използването на *shotgun* метагеномния анализ за скрининг на проби за множество гени, участващи в резистентността и вирулентността, се появява като идеален инструмент за наблюдение на предаването на фактори на резистентност и патогени по веригата за доставки на храни. Понастоящем обаче използването на метагеномния анализ като част от рутинните програми за мониторинг би било както скъпо, така и съмнително. Въпреки това метагеномния анализ и секвенирането на целия геном може да допринесат с научни познания за количествена оценка на риска от развитие и разпространение на резистентност във веригата за доставки на храни. С развитието на тези технологии след време може да се очаква частичен преход към основани на ДНК технологии при оценката на безопасността на храните и с това да нарастне разбирането за това как производството на храни допринася за развитието на антибиотична резистентност сред човешките патогени.

Метагеномният анализ на цялата микробна ДНК в дадена среда, често се използва както за обозначаване на амплификацията на гена на 16S рРНК и последващото секвениране, така и за „истинската“ метагеномика, където цялата ДНК, извлечена от проба се секвенира. За тестване на безопасността на храните настоящите протоколи за секвениране на 16S рРНК не са полезни, тъй като кратките последователности, предоставени от настоящите секвенатори от следващо поколение, са твърде кратки, за да се разрешат правилно близко свързани патогенни и непатогенни видове (напр. *L. monocytogenes* и *L. innocua*). Това се е променило, тъй като секвенаторите от трето поколение са оптимизирани за 16S рРНК секвениране или други филогенетично информативни маркери са допълнително разработени за секвениране на ампликони. Истинското метагеномно секвениране вече предлага независима алтернатива за директно откриване на патогени в храната в случай на некултивируеми микроорганизми. Тази техника в крайна сметка може да бъде разширена до култивируеми бактерии, за да се намали времето и разходите за откриване; обаче има много опасения относно получаването на положителни сигнали поради наличието на ДНК, а не на жизнеспособен организъм. Диагностичните тестове ще въведат големи предизвикателства пред платформите, които позволяват комуникация в реално време на информация за огнището, като *PulseNet*. Притеснението е, че тъй като клиничните проучвания преминават към използването на бързи тестове, ще има по-малко (или никакви) изолати от пациенти с болести, пренасяни чрез храна. CDC в момента работи с APHL, регулаторни агенции, производители на диагностични комплекти и клиницистите, за да се гарантира, че положителните резултати от тестовете ще бъдат последвани от събирането на проби за молекулярни изпитвания на бактериалните патогени.

Молекулярният пейзаж в изследванията за безопасност на храните се променя бързо и гинамично от използването на традиционни методи за молекулярно подтипизиране към методите за типизиране, базирани на *WGS* и метагеномиката. Трябва също така да се отбележи, че *omics* технологиите не са и няма да заменят добро епидемиологично проучване, но вместо това двете трябва да се разглеждат като допълващи се набори от данни за бързо очертаване на епидемични/епизотични събития. Увеличената резолюция, предоставена от *WGS* и *omics* технологиите предоставят на епидемиолозите информация, която ще помогне за свързване на случаи, които в миналото биха били пренебрегвани като спорадични. Данните от геномните техники могат да се използват и за вторичен анализ, като например оценка на ефективността на стратегиите за интервенция на замърсяване по веригата от фермата до вилницата, откриване на гени на АМР и установяване на географски източници. Сега са налични няколко софтуерни пакета, които да помогнат в този анализ, а непрекъснато се разработват нови. Поради намаляващите разходи, повишената разделителна способност и вторичния анализ на данните, подходите на *NGS*, използвани за безопасността на храните, ще продължат бавно да заменят традиционните методи за молекулярно подтипизиране и да стимулират подобренията в безопасността на храните.



Поради увеличаването на антропогенните дейности, сега антибиотиците са важен замърсител на местообитанията, а именно водната среда и аквакултурите и по този начин могат потенциално да навлязат в хранителната верига на човека. Някои от тези остатъци от антибиотици могат да бъдат от критично значение за човешкото здраве и следователно бактериите, които споделят резистентност към тези антибиотици, трябва да бъдат държани под епидемиологичен контрол. Напоследък **метагеномиката се превърна не само в обещаващ инструмент за изучаване на микробното разнообразие във водна среда, но също така се превърна в полезен начин за оценка**

на разнообразието от характеристики на антимикробна резистентност, присъстващи в микробиома. От друга страна, културомиката, техника, която използва високопроизводителни методи при бактериалното култивиране с автоматизирано оборудване, възражда някои традиционни методи и протоколи за изпитване в микробиологията.

В заключение трябва да се подчертае, че все пак **мощният мултисекторен анализ е много информативен подход при справяне с наболелия проблем АМР в духа на стратегията «Едно здраве»**, въпреки все още възникващите въпроси, грешки в четенията на секвенциите и анализите на резултатите. Бъдещето е в *omics* технологиите и тези методи със своята висока информативност, висока производителност и все по-намаляващи разходи, ще заместват конвенционалните класически методи, но са необходими все още доста проучвания, разработки, тестове, познания и валидиране. **Необходима е постоянна колаборация и обмяна на опит и знания**, за да може тези нови технологии да бъдат внедрени като рутинна диагностика.

Изготвил:

Красимира Захариева, главен експерт в Дирекция „ОРХВ“

Използвана литература:

- *Antibiotic resistance in the food supply chain: Where can sequencing and metagenomics aid risk assessment?* - Johan Bengtsson-Palme
- *Metagenomics and Other Omics Approaches to Bacterial Communities and Antimicrobial Resistance Assessment in Aquacultures* - Teresa Nogueira and Ana Botelho
- *Application of Metagenomic Technologies for Antimicrobial Resistance and Food Safety Research and Beyond* - Chin-Yi Chen, Xianghe Yan, Siyun Wang and Charlene R. Jackson
- *Identification of risk factors and hotspots of antibiotic resistance along the food chain using next-generation sequencing* - Department of Food Hygiene and Technology, Institute of Food Science and Technology, I. Bergspica, G. Kaprou, E. A. Alexa, M. Prieto-Maradona and A. Alvarez-Ordóñez – EU-FORA EJ EFSA
- *Addressing Learning Needs on the Use of Metagenomics in Antimicrobial Resistance Surveillance* - Ana Sofia Ribeiro Duarte, Katharina D. C. Stärk, Patrick Munk, Pimlapas Leekitcharoenphon, Alex Bossers, Roosmarijn Luiken, Steven Sarrazin, Oksana Lukjancenko, Sünje Johanna Pamp, Valeria Bortolaia, Jakob Nybo Nissen, Philipp Kirstahler, Liese Van Gompel, Casper Sahl Poulsen, Rolf Sommer Kaas, Maria Hellmér, Rasmus Borup Hansen, Violeta Munoz Gomez and Tine Hald
- *Genomics tools in microbial food safety* - Matthew J. Stasiewicz Henk C. den Bakker Martin Wiedmann
- *Significance of whole genome sequencing for surveillance, source attribution and microbial risk assessment of foodborne pathogens* - Eelco Franz, Lapo Mughini Gras and Tim Dallman
- *Risk assessment of antimicrobial resistance along the food chain through culture-independent methodologies* - Department of Food Hygiene and Technology, Institute of Food Science and Technology – EFSA

- *Resistome metagenomics from plate to farm: The resistome and microbial composition during food waste feeding and composting on a Vermont poultry farm - Korin Eckstrom, John W. Barlow*
- *Metagenomic characterization of bacterial community and antibiotic resistance genes in representative ready-to-eat food in southern China - YiMing Li, WeiWei Cao, ShuLi Liang, Shinji Yamasaki, Xun Chen, Lei Shi & Lei Ye*
- *Antimicrobial Resistance and Food Safety Methods and Techniques - Chin-Yi Chen, Xianghe Yan, Charlene R. Jackson*
- *Navigating Microbiological Food Safety in the Era of Whole-Genome Sequencing - J. Ronholm, Neda Nasheri, Nicholas Petronella, Franco Pagottoa*