



НАУЧНА ИНФОРМАЦИЯ

**Технически спецификации за хармонизиран мониторинг на
антимикробната резистентност при зоонозни и индикаторни бактерии от
продуктивни животни и храни**

**Цялостното секвениране на генома е обещаващо в борбата срещу
антимикробната резистентност (АМР)**

*Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic
and indicator bacteria from food-producing animals and food
Whole genome sequencing shows promise in fight against AMP.*

European Food Safety Authority (EFSA), Marc Aerts, Antonio Battisti, Rene Hendriksen, Isabelle Kempf, Christopher Teale*, Bernd-Alois Tenhagen, Kees Veldman, Dariusz Wasyl, Beatriz Guerra, Ernesto Liebana, Daniel Thomas-Lopez and Pierre-Alexandre Beloeil

Антимикробната резистентност заплашва съвременната медицина и ефективния, глобален „отговор“ за опазване на общественото здраве, за което заплаха са инфекциозните заболявания, причинени от резистентни бактерии. Ефективните антимикробни средства предоставят възможност, както за превантивни, така и за терапевтични мерки, за защита на пациентите от потенциално фатални заболявания и за гарантиране, че уязвими сектори като хирургия, онкотерапия и реанимация могат да бъдат обезпечени с нисък риск.

Въпреки това систематичната злоупотреба и прекомерното използване на тези лекарства в хуманната и ветеринарната медицина, и в производството на храни поставиха на риск всяка нация от развитието на антимикробна резистентност. **Без хармонизирани и незабавни действия в световен мащаб светът се насочва към пост-антибиотична ера, в която обикновени инфекции отново могат да убият хора или животни.**

„Antimicrobial resistance is a crisis that must be managed with the utmost urgency. As the world enters the ambitious new era of sustainable development, we cannot allow hard-won gains for health to be eroded by the failure of our mainstay medicines.“

„Антимикробната резистентност е криза, която трябва да бъде управлявана с най-голяма спешност. Тъй като светът навлиза в амбициозната нова ера на устойчиво развитие, не можем да позволим трудно спечелените ползи за здравето да бъдат ерозирани от провала на нашите основни лекарства“.

Dr Margaret Chan, Director-General, World Health Organization

През 2017 г. Комисията прие нов европейски план за действие в областта на здравеопазването и борбата с АМР. Целта му е да намали появата и разпространението на АМР и да създаде нови ефективни антимикробни средства в и извън ЕС. В рамките на този план за действие ЕК се ангажира да преразгледа до 2021 г. своето решение за изпълнение 2013/652/ЕС относно мониторинга и докладването на АМР в бактериалните изолати от храни и продуктивни животни.

Предприетите действия на ЕС относно антимикробната резистентност могат да бъдат видяни на следният линк: <https://ec.europa.eu/health/AMP/>.

Използвани съкращения:

AMP– Антимикробна резистентност/устойчивост (antimicrobial resistance);

AMC – консумация на антимикробни средства;

AST – тест за антимикробна чувствителност;

EFSA– Европейският орган по безопасност на храните (ЕОБХ);

ECDC– Европейския център за профилактика и контрол върху заболяванията;

EMA– Европейската агенция по лекарствата;

DCF - Data Collection Framework – платформа за докладване на данни;

ДЧ – държави членки на Европейския съюз;

ЕС – Европейския съюз;

ЕИП– Европейско икономическо пространство;

MIC – минимална инхибираща концентрация;

ESBL – произвеждащи разширен спектър β-лактамази бактерии;

AmpC β-лактамазите - са клинично важни цефалоспориноми, кодирани от хромозомите на много от *Enterobacteriaceae* и няколко други организми, където те медираат резистентност към цефалотин, цефазолин, цефокситин, повечето пеницилини и комбинации от бета-лактамазен инхибитор-бета-лактама.

MDR– множествена лекарствена резистентност;

CIA – критично важни антимикробни средства с най-висок приоритет за хуманната медицина (critically important antimicrobials);

ECOFF – епидемиологични cut-off стойности – епидемиологични гранични (референтни) стойности (epidemiological cut-off value);

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Европейски комитет за тестване на чувствителност към антимикробни средства;

EURL-AR - European Union reference laboratory for antimicrobial resistance – европейска референтна лаборатория за антимикробна резистентност

CP – карбапенемаза;

JIASRA - Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis - Съвместен анализ на антимикробното потребление и устойчивост

MLST – Типизиране по мултилокусни секвенции (последователности) е техника в молекулярната биология за определяне на множество локуси. Методиката може да характеризира изолати от микробни видове, използвайки ДНК фрагменти от множество гени– Multilocus sequence typing;

CBP – **clinical breakpoints** (Clinical breakpoints are for everyday use in the clinical laboratory to advise on patient therapy. Breakpoint tables are updated on the 1st of January each year.

Продуктивни животни – в случая животни, отглеждани за производство на храни;

MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – метицилин резистентни *Staphylococcus aureus*

MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight - лазерна десорбция/ йонизация с помощта на матрица

MIC - minimum inhibitory concentration – минимална инхибираща концентрация

NRL - National Reference Laboratories – Национална референтна лаборатория (НРЛ)

PCR - polymerase chain reaction – полимеразно верижна реакция

PFGE - pulse field gel electrophoresis – гел електрофореза

PT - proficiency testing – междулабораторни тестове за пригодност (ринг тестове)

WGS - Whole genome sequencing – пълен геномен секвентен анализ

XML - eXtensible Markup Language

Абстракт:

Предложения за актуализиране на хармонизирания мониторинг и докладване на антимикробната резистентност (АМР), от гледна точка на общественото здраве, на *Salmonella*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* и метицилин резистентен *Staphylococcus aureus* (MRSA) от продуктивни животни и месото от тях в ЕС са представени в съвместният доклад на ЕОБХ и Европейския център за профилактика и контрол върху заболяванията (ECDC) на тема: „Технически спецификации за хармонизиран мониторинг на антимикробната резистентност при зоонозни и индикаторни бактерии от продуктивни животни и храни. Пълното геномно секвениране е обещаващо в борбата срещу антимикробната резистентност“.

В съвместният доклад се отчитат последните тенденции в диагностиката на инфекциите и борбата с АМР, както и нуждите от генериране и събиране на данни за секвенираните геноми на бактериалните патогени и новите научни разработки в това иновативно направление. Набляга се на диагностиката на фенотипното мониториране на АМР в бактериалните изолати, като се използват методи за микротитрация за изследване на чувствителността и интерпретиране на степента на резистентност чрез епидемиологични гранични стойности (*cut-off*), включително по-нататъшно характеризиране на тези изолати на *E. coli* и *Salmonella*, показващи резистентност към цефалоспоринови и карбапенемни с разширен спектър, като специфичен мониторинг на ESBL / AmpC / карбапенем-продуциращи *E. coli*.

Като се имат предвид различията в обема и броя на пробите, които се взимат за тестване на АМР, са извършени числени статистически симулации за оценка на връзката между възникването на АМР и времевите тенденции с предварително зададени параметри, за да се подкрепи стратегическата цел по създаване на хармонизиран подход в пробовземането и диагностиката. Процедурите за вземане на проби, основани на общ стратифициран процес¹, биват също преразгледани и обновени с цел максимална ефективност в борбата с АМР. В доклада са представени предложения за хармонизиране на мониторинга на разпространението, генетичното разнообразие и стратегии за борба с АМР при метицилин резистентните *Staphylococcus aureus* (MRSA). Предложения има за допълване на рутинния мониторинг на MRSA със специфични кръстосани проучвания при прасета и АМР при бактерии, изолирани от морски храни и от околната среда.

Пълното секвениране на генома (WGS) на изолати от ESBL / AmpC / карбапенем - произвеждащата *E. coli*, се препоръчва да се въведе като задължителен метод в мониторинговите програми през периода на валидност на следващото законодателство; генните последователности, кодиращи ESBL/AmpC/карбапенемази ще бъдат и са докладвани вече на ЕОБХ.

Планира се хармонизиране на протоколите за пълен геномен секвентен анализ и програмите за анализ/интерпретация на резултатите от секвенирането на генома, както и валидиране на качеството на резултатите посредством междулабораторни тестове за пригодност, които да се предоставят от референтната лаборатория на ЕС за борба с АМР.

Използването на пълния геномен секвентен анализ като рутинен метод в диагностиката може да подобри начина, по който се осъществява мониторинга на антимикробната резистентност (АМР) в храни и при продуктивни животни. Преди ревизираното законодателство, касаещо мониторинга на АМР, което трябва да влезе в сила през 2021 г., ЕОБХ предлага методите на пълно геномно секвениране на бактериалните

¹ Стратифицираното вземане на проби е тип на вероятностна извадка, при която на първо място популацията се раздвоява в различни взаимно изключващи се, еднородни подгрупи (страти), след което субектът се избира случайно от всяка група (пласт), които след това се комбинират, за да образуват една проба. Пласт не е нищо друго освен хомогенна подгрупа на населението и когато целият пласт се вземе заедно, той е известен като слоеве.

патогени с последващ биоинформатичен анализ на секвенциите, да бъдат въведени постепенно в диагностичните практики на националните референтни лаборатории на всяка ДЧ от ЕС и в мониторинговите програми. Използвайки пълното геномно секвениране, експертите могат да идентифицират резистентни гени в бактериите, за разлика от сегашните фенотипни методи, които тестват бактериите за резистентност към специфични антибиотици. Тази методика не само има потенциал да прогнозира АМР по-ефективно, но също така генерира голямо количество данни, които могат да бъдат от полза за други епидемиологични проучвания и анализи.

Докладът на ЕОБХ също подчертава необходимостта от наблюдение на АМР на бактериите, изолати от морските храни, за които е известно малко. Това е свързано с неотдавнашното разширяване на производството на аквакултури и увеличаването на вноса на морски продукти в ЕС. Експертите подчертават важността на разбирането за това как се появява АМР и се разпространява в среда, в която се произвежда или преработва храна - област, която изисква повече и по-задълбочени проучвания и върху която ЕОБХ скоро ще започне да работи.

ЕОБХ, съвместно с Европейския център за профилактика и контрол върху заболяванията дава препоръки за хармонизиран подход при пробовземане, обработка на пробите, брой и количество на пробите и предлага да бъде въведен задължителен мониторинг на резистентността към антибиотици на бактериални щамове, които са станали жизнено важни за общественото здраве и които понастоящем не се мониторираат. Това ще позволи по-подробен и задълбочен анализ на риска от възникване на нови механизми на резистентност. Мониторингът е ключов компонент на „справянето“ с наболелия и нарастващ непрекъснато проблем – антимикробна резистентност и е един от приоритетите на плана за действие на ЕС.

ЕОБХ преразглежда начина, по който в момента се извършва мониторинг на АМР в ЕС, като се вземат предвид най-новите научни и технологични разработки като пълен геномен секвентен анализ, биоинформатичен анализ на секвенциите и биостатистическа обработка на данните.

Резюме:

Разпоредбите за мониторинг на антимикробната резистентност (АМР) при зоонозни и индикаторни бактерии, изолати от продуктивни животни и месото от тях, са определени в Директива 2003/99/ЕО². Предвижда се също възможност за разширяване на обхвата на мониторинга на АМР до други зоонозни агенти, до колкото те могат да представляват заплаха за общественото здраве. Решение за изпълнение 2013/652/ЕО на ЕК за прилагане на Директива 2003/99/ЕО предоставя подробни и хармонизирани правила за мониторинг и докладване на АМР, които се прилагат от 2014 г. до края на 2020 г. Тази законодателна рамка е частично изведена от документи за техническа спецификация, издадени от ЕОБХ през 2012 г., които дават насоки за хармонизирано наблюдение на АМР на *Salmonella*, *Campylobacter*, индикаторни *Escherichia coli* и ентерококи, както и за мониторинг на разпространението, генетичното разнообразие и степента на антимикробна резистентност на метицилин устойчив *Staphylococcus aureus* (MRSA), изолати от продуктивни животни и полученото от тях месо.

През 2014 г. ЕОБХ също така издаде подробни функционални спецификации за рандомизирано вземане на проби и за хармонизирано наблюдение на АМР. Прилагането на хармонизираното законодателство на ЕС относно АМР във всяка ДЧ ще доведе и до по-добра съпоставимост на данните за АМР.

² ДИРЕКТИВА 2003/99/ЕО НА ЕВРОПЕЙСКИЯ ПАРЛАМЕНТ И НА СЪВЕТА от 17 ноември 2003 година относно мониторинга на зоонозите и заразните агенти, причиняващи зоонози, за изменение на Решение 90/424/ЕИО на Съвета и за отмяна на Директива 92/117/ЕИО на Съвета

Въпреки хармонизиращия подход при мониторинга на АМР, с развитието на биотехнологиите и разработването на нови методи в диагностиката е неизбежна необходимостта от подобряване на мониторинговите програми, законовите разпоредби и въвеждането на нови по-ефективни методики в отговор на постоянно развиващата се заплаха от АМР.

ЕОБХ получи мандат от ЕК да преразгледа и актуализира техническите спецификации, издадени през 2012 и 2014 г., и по-конкретно, в тези актуализации да обърне специално внимание на възможното използване на методи за молекулярно типизиране, в светлината на последните научни становища и разработени методики за борба с АМР, технологичните разработки и последните тенденции в развитието на АМР и значението за общественото здраве, както и одитите, оценяващи изпълнението на решението, извършено от ЕК в редица ДЧ. Обсъдено е и обезпечаване на приемствеността при проследяване на бъдещите тенденции в нарастващата антимикробна резистентност (фактор, който е в основата на преразглеждането на съществуващите насоки).

Обобщените доклади на ЕС относно подадените от ДЧ за АМР данни и докладите от проведените във всяка ДЧ одити показват, че спазването на законодателството от ДЧ води до все по-сравними и надеждни фенотипни данни за АМР във времето. Този факт бива потвърден при мониторинга на тенденциите и появата на резистентност в индикаторни *E. coli*, които се превърнаха в особено наболял проблем. По данни, подадени от ДЧ, разпространението на *Salmonella* spp. в храни и при продуктивни животни, благодарение на успешно прилаганите мерки за контрол на инфекциите в ДЧ на ЕС, е намаляло.

ЕОБХ предлага задължителния мониторинг да включва зоонозите бактериални видове: *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli*, както и индикаторния коменсал *E. coli* от основните селскостопански животински видове, а именно: кокошки носачки, бройлери, пуйки, прасета за угояване и едър рогат добитък на възраст под 1 година, както и месото им, предназначено за човешка консумация. Една от основните цели е събирането на данни за АМР и съпоставянето им с данни за експозицията на антимикробни средства и нерегламентираната употреба на антимикробни средства при продуктивните животни. Въпреки че ежегодното наблюдение би позволило по-ранно откриване и анализ на трендовете при АМР, отколкото при мониторинга на по-големи времеви интервали, се предлага да се запази и засили текущият контрол при свине за угояване, говеда на възраст под 1 година и птици, поотделно, всяка втора година, като да бъде извършван на ротационен принцип.

В допълнение към рутинния мониторинг, провеждан на всеки две години, ЕОБХ обсъжда предприемането на допълнителни базови кръстосани проучвания, за да се оцени конкретно ситуацията на АМР (напр. при щамове MRSA) и да бъдат включени в мониторинга бактериални изолати от околната среда и от морска храна, както и да бъде изследвана тяхната степен на антимикробна резистентност, през периода на валидност на предстоящото решение за изпълнение на ЕК от 2021 г. нататък.

В контекста на прилагането на планове за действие на ЕС и на ДЧ срещу увеличаващата се АМР, се очаква по-нататъшно намаляване на употребата на антимикробни средства при продуктивни животни, във връзка с прилагането на допълнителни мерки за намаляване на употребата им.

Съгласно техническите спецификации в доклада на ЕОБХ до момента, минималният брой проби от всеки вид животни, които трябва да бъдат изследвани, е 170. Броят и количеството на пробите следва да бъде съобразен и оптимизиран в случай на ниско разпространение например на *Salmonella* spp. и за много малки производствени звена. За да се гарантира достатъчна статистическа достоверност, за да може да се открие дори лека флуктоация в нивата на АМР, също така се препоръчва броят проби по мониторингова програма да се преразглежда от всяка ДЧ поотделно на национално ниво според нуждите и проблемите в сектора, както и съобразно нивата на антимикробна резистентност. Допуска се, че този подход може да доведе до увеличаване на броя на пробите, които трябва да бъдат

събрани, и че това може да изисква допълнителен ресурс от страна на ДЧ. Следователно при разработването на схема за вземане на проби се полагат специални усилия за използване, където е възможно, на вече събрани проби по съществуващите програми за мониторинг на АМР, като например проби от цекуми, събрани в кланицата.

Ключов принцип, разглеждан във връзка с дизайна на пробовземането, е засилване на хармонизираните процедури за рандомизирано вземане на животински и месни проби на различни етапи в хранителната верига, като се получават представителни и сравними данни.

И двете стратегии за вземане на проби ще бъдат запазени. Първата стратегия включва събирането на достатъчен брой представителни проби от продуктивни животни и от охладено месо, от които са изследвани възприемчивите изолати; втората стратегия включва случаен подбор на изолати на *Salmonella* от колекции, събрани в рамките на националните програми за контрол на *Salmonella* в птичи стада. За различните стратегии при пробовземане се предлага общ стратифициран подход.

Стратифицираното вземане на проби за *Salmonella* обхваща следните животински групи: бройлери, кокошки носачки и пуйки за угояване, и налични изолати в референтните лаборатории, участващи в националните програми за надзор на *Salmonella*.

Алтернативен подход при пробовземането е то да се извърши в рамките на извадката от стада, положителни за *Salmonella* в ДЧ, като в база данни се записват положителните стада. Един изолат на *Salmonella* серовар трябва да бъде запазен и да служи за тестване за чувствителност и като референтен такъв. Например при наличие на повече от 170 *Salmonella* изолати, отговарящи на епидемиологичните критерии, трябва да бъдат тествани 170 проби за антимикробна чувствителност; ако са налице по-малко от 170 *Salmonella* изолати, всички налични изолати трябва да бъдат изследвани за антимикробна чувствителност (без пропорционално разпределение).

Стратифицираното вземане на проби от съдържанието на цекума (единични или обединени проби) от кланиците обезпечава събирането на представителни изолати на *Salmonella*, *Campylobacter*, индикаторни *E. coli* и оценката на разпространението на *ESBL-/AmpC-/карбапенемаза-продуциращи E. coli* от популациите бройлери, пуйки за угояване, прасета за угояване и говеда на възраст под 1 година.

Вземането на проби от различни категории охладено прясно месо е насочено главно към търговски обекти, обслужващи крайния потребител, като пропорционалното разпределение на броя на пробите е съпоставено към населението на определен географски регион (зона NUTS-3).

Епидемиологичните единици включват стада от домашни птици, партиди свине за угояване и говеда под 1 година за клане и партиди меса.

По отношение на лабораторните методологии е потвърдено, че метода с микротитрацията и зададените референтни стойности на *cut off* от Европейският комитет за изпитване на антимикробната чувствителност (EUCAST, <http://www.eucast.org/>) трябва да се запазят/бъдат използвани като интерпретационен критерий за определяне на микробиологичната резистентност. Диапазоните на концентрациите, които трябва да се използват, трябва да гарантират, че и двете референтни стойности – епидемиологичният *cut-off* и граничните стойности (*clinical breakpoints*) са включени в анализа и при интерпретацията на резултатите, което ще осигури съпоставимост на резултатите.

По отношение на хармонизирания набор от антимикробни средства, които да се използват за тестване на фенотипна чувствителност, се отбелязва, че панелите, които понастоящем са включени в законодателството са използвани от ДЧ при тестването на АМР.

По-специално в съвместният доклад на ЕОБХ и ECDC се предлага настоящият (първи) хармонизиран панел от антимикробни средства за *Salmonella* и *E. coli* да се допълни с антимикробното средство - амикацин, за да се подобри откриването на 16S rRNA метилтрансферазни ензими, които придават устойчивост към всички аминокликозиди, с изключение на стрептомицин. Все повече се наблюдава връзката между тези

метилтрансферази и карбапенемазите, AmpC- или ESBL- ензими и резистентността към флуорхинолони, наблюдавана при *Enterobacteriaceae*, особено извън ЕС. С цел внедряване допълнително на антимикробното средство - амикацин се предлага модификация на хармонизираният панел чрез намаляване на някои от концентрациите, по-специално тези на ампицилин, налидиксова киселина, тетрациклин, гентамицин, триметоприм, сулфаметоксазол и хлорамфеникол.

Не са необходими промени в препоръчителния антимикробен панел, който обединява тестови изолати на *Salmonella* и *E. coli*, които проявяват резистентност към цефалоспоринови от трето поколение и/или карбапенеми.

По отношение на *Campylobacter* се предлага лека промяна на хармонизираният панел с отстраняването на налидиксова киселина, стрептомицин и най-ниската концентрация на гентамицин, така че да се осигури включването на допълнителни по-високи концентрации на еритромицин (за по-добро диагностициране на изолати с висока степен на резистентност към еритромицин, като се предполага, че притежават гена *erm (B)*), както и по-високи концентрации на ципрофлоксацин и феникол, като по този начин позволява предполагаемата дедукция на генотипи с променена секвенция, кодираща *SteABC* и нейния регулиращ регион. Предлага се също да се включи антимикробно средство карбапенем.

С цел подобряване съпоставимостта между разпространението на *Campylobacter* и данните за АМР между ДЧ, е почти задължително наблюдението на ЕС да се основава на **хармонизирани методи на изпитване**, за изолиране и тестване за антимикробна чувствителност. За целта следва да се предостави **хармонизиран протокол**, основан на европейския стандарт **EN ISO 10272-1**, СОП (стандартна оперативна процедура) за откриване *Campylobacter*. Предвижда се Европейската референтна лаборатория за антимикробна резистентност (EURL) да финализира в периода 2019–2020 г. т създаването на такъв хармонизиран протокол. По-добро проучване на тенденциите в разпространението на *Campylobacter* spp., *C. jejuni* и *C. coli* в животновъдството и в храните от животински произход в различните ДЧ и процента на развита резистентност на тези видове патогени ще спомогне за подобряване на разбирането на епидемиологията и особено на потенциалните източници на човешки *C. jejuni* и *C. coli* инфекции, както и различията в съотношенията на *C. jejuni* и *C. coli* човешки изолати между европейските страни.

Въз основа на последните проучвания има предложение да се включи в мониторинговите програми **надзорът** на антимикробната резистентност на *Campylobacter* **при говеда**. Това също може да спомогне за подобряване на мерките за контрол на този зоонозен агент.

Предвид **предимствата**, присъщи на цялата технология за **пълно геномно секвениране (WGS)** на патогенни бактерии, и също така **настоящите ограничения на НРЛи**, както и постоянната динамика в развитието на настоящата ситуация, се предлага да се следва **постепенен, поэтапен подход за интегриране на WGS в рамките на хармонизираното наблюдение на АМР**. Процесът на интеграция на WGS може да бъде въведен първоначално като допълнителен метод в хармонизирания фенотипен мониторинг на доброволна основа в ранния етап на периода 2021–2026 г. В края на периода се предвижда **замяната на стандартния рутинен фенотипен тест за антимикробна чувствителност със системно използване в рутинната диагностика на WGS**. В този ред на мисли **периодът 2021-2026 г. ще бъде преходен/гратисен период за ДЧ да придобият опит и да придобият технологична подготвеност за въвеждане в диагностичните схеми на пълният геномен секвентен анализ на бактериалния геном като рутинен метод**.

Предложеният **гъвкав подход** съответства на възможността ДЧ и техните национални референтни лаборатории (НРЛ) да използват WGS на доброволни начала за откриване на *ESBL/AmpC*/карбапенем-произвеждащи *E. coli*, заместващ тестването на панели 1 и 2 на фенотипна антимикробна чувствителност в мониторинговата програма на

тези микроорганизми. Предлага се **доброволното заместване на метода за тестване на фенотипна антиминокробна чувствителност за откриване на *ESBL-/AmpC*/карбапенем-продуцираща *E. coli* да започне през 2021 г.**

Превключването към WGS за диагностика на коменсален *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. и ентерококи трябва оптимално да се осъществява **по координиран начин** за всички ДЧ в един **предварително определен период от време** и когато са налице необходимите научни и технологични разработки, които да **позволят сравняване на историческите (фенотипни) и генотипни резултати**. Поетапното въвеждане на WGS за специфичния мониторинг и на *ESBL/AmpC*/карбапенемаза-произвеждащи *E. coli*, би означавало, че в рамките на срока на валидност на решението за изпълнение на ЕК, напр. до 2025 г., всички ДЧ вече трябва да са въвели в диагностичните си планове WGS. Трябва да се създаде план за действие (road map), който да установи методи за сравняване на резултатите, независимо дали са прости (напр. поява на резистентност) или комплексни (напр. пълна чувствителност), от фенотипни данни (включително исторически данни) и WGS данни за пълните геномни секвенции, които ще трябва да бъдат разработени и прилагани в момента на преминаване от фенотипно към генотипно наблюдение по мониторингова програма, както и да бъдат създадени хармонизирани процедури за обработка и докладване на суровите данни от WGS.

Постигането на крайната цел включва именно - въвеждане на WGS в рутинната диагностика на патогенните бактерии, изолати от секторите на храните и ветеринарномедицинската дейност на НРЛ по време на периода на валидност на решението за изпълнение на ЕК, както и рутинната употреба на WGS в специфичния мониторинг до края на периода. Прилагането на WGS от страна на ДЧ като „потвърдителен тест“ следва да стане задължително до края на периода. В началото на периода на валидност на решението на ЕК – **2021-2025г. WGS може да се използва на доброволна основа** с подкрепата на AR EURL (Европейска референтна лаборатория по антиминокробна резистентност).

За да се внедри в диагностичната схема използването на **WGS**, от гледна точка на **съпоставимостта, всички данни** ще се обработват по същия **хармонизиран подход**. EURL-AR предвижда да осигури и организира обучения по екстракция на ДНК, подготовка на библиотеките от референтни секвенции, секвениране и биоинформатичен анализ на суровите данни след секвенирането. EURL-AR ще разработи и ще предостави **хармонизирани стандартни оперативни процедури/протоколи/насоки, включително критерии за качество и процедури за външно оценяване на качеството**, които ще бъдат разработени през периода **2019–2020 г.** Необходимо условие при обработка на суровите секвенции е да бъде използвана една и съща версия на софтуерните продукти за обработка на секвенциите и курирана референтна база данни за сравняването им и изготвянето на филогенетични дървета, за да има смисъл хармонизираното и едновременното въвеждане от всички ДЧ на WGS и най-вече да има съпоставимост и сравнимост на резултатите. Предвижда се също така, чрез въвеждането на WGS, **EURL-AR да разработи и внедри генетичен тест за оценка на качеството на геномите, секвенирани от НРЛ и за оценка надеждността на секвенираните генни детерминанти, отговорни за AMP.** ДЧ ще бъдат насърчавани доброволно да предоставят своите изолати и техните секвенирани геноми, ако вече не са публично достъпни, до създаването на **съвместна база данни на ECDC-EFSA за геномни последователности от проведен WGS**, за да може да бъде извършен анализ на геномните секвенции от човешки, животински и хранителни източници.

Предлага се да се **засили мониторингът на MRSA, изолати от продуктивни животни и храни.** По-специално, представена е концепцията за основно проучване на MRSA при прасета, която трябва да се извърши или във фермите, или в клиниците през периода на валидност на решението на ЕК. Хармонизираният панел за изпитване на антиминокробната чувствителност на MRSA е преразгледан, тъй като някои от антиминокробните средства, включени в панела, са от критично значение за хуманната

медицина за борба с *MRSA* и други грам-положителни бактериални щамове при хора, като ванкомицин и линезолид. **Резистентността към ванкомицин или линезолид изисква изследване на механизма на резистентност, включително посредством WGS**, за да се определи дали има в бактериалния геном някои от тези гени, за които е известно, че предизвикват резистентност.

За гентамицин, триметоприм, канамицин, фузидинова киселина, пеницилин, ванкомицин и рифампицин са предложени редица промени в концентрацията на активните вещества; антимикробните средства, включени в панела, остават непроменени. Характеризирането на *MRSA* изолати също се препоръчва да бъде осъществявано чрез WGS за определяне на щамове и линии и взаимосвързаността по между им, както и за изследване наличието на важни фактори на вирулентност и адаптация на гостоприемника и тези специфични генетични маркери (например фаги), свързани с някои животински гостоприемници.

Също така се предполага, че рутинното наблюдение се допълва със специфични изходни (напречни) проучвания (в допълнение към тези за *MRSA* при прасета) за **AMP в бактерии от морски храни и околната среда**, които трябва да бъдат извършени през периода на валидност на следващото законодателство. Целта е по-късно да се предложат подробни протоколи за тези базови проучвания, след като бъде постигнато ясно съгласие за провеждането им.

Що се отнася до **най-добрия формат за докладване на данните**, препоръките са същите като тези от техническите спецификации, свързани със събирането и докладването на данни, базирани на изолати, които преди това са били публикувани.

Гените, кодиращи ESBL/AmpC/карбапенемази, открити от WGS, трябва да бъдат докладвани на ЕОБХ.

Протоколите и интерпретацията на WGS анализа трябва да бъдат **хармонизирани** и подкрепени от външни програми за осигуряване на качеството.

И накрая, предлага се **техническите спецификации да бъдат преразглеждани и редовно актуализирани в светлината на резултатите от първите кампании за мониторинг, най-новата литература и постоянно променящата се ситуация.**

1. Въведение

През юни 2017 г. ЕК прие нов Европейски план за действие в духа на стратегията „Едно здраве“ в областта на здравето и борбата срещу антимикробната резистентност (AMP), който предоставя рамка за **по-обширни действия за намаляване на появата и разпространението на AMP и за увеличаване на разработването и достъпността на пазара на нови ефективни антимикробни средства** в рамките и извън ЕС. Съгласно този нов план за действие в духа на стратегията „Едно здраве“, за да се постигне засилване на здравния надзор и докладването на AMP и да бъде ограничена употребата на антимикробни средства, ЕК е поела ангажимент за **перазглеждане на законодателството на ЕС за прилагане на мониторинг на AMP в зоонозни и коменсални бактерии при селскостопански животни и в храни**, за да се вземат предвид новите научни разработки и нужните данни, които трябва да се събират.

В съответствие с чл. 31 от Регламент (ЕО) № 178/2002 ЕК поиска научна и техническа помощ от ЕОБХ с оглед преразглеждането на Решение 2013/652/ЕС. Референтната лаборатория на Европейския съюз за антимикробна резистентност (**EURL-AR**) в Копенхаген и Европейският център за профилактика и контрол на заболяванията (**ECDC**) са били **консултанти**.

1.1. Контекст и техническо задание, предоставени от ЕК

1.1.1. Концепция

Борбата с АМР е един от основните приоритети на ЕК. Наблюдението на АМР и употребата на антимикробни средства е от съществено значение за събиране на изчерпателна и надеждна информация за развитието и разпространението на резистентни към лекарства бактерии, за оценка на въздействието на антимикробните средства и мерките, които са предприети и ще бъдат предприемани за намаляване на АМР, както и за наблюдението на успеваемостта на мерките от мониторинговите програми. **Тези данни осигуряват по-адекватни и навременни решения и мерки за борба с АМР** и улесняват разработването на **подходящи стратегии и действия за управление на АМР** на европейско, национално и регионално равнище.

Като част от нововъведения Европейски план за действие в духа на стратегията „Едно здраве“ срещу АМР, приет официално през юни 2017 г., **ЕК се ангажира да преразгледа законодателството на ЕС за прилагане на хармонизирания мониторинг на АМР при зооозните и коменсални бактерии, изолати от продуктивни животни и храни** да се вземат предвид новите научни разработки, включително последните промени в епидемиологичните ситуации в ДЧ и нуждите от събиране на данни.

Съгласно Директива 2003/99/ЕО относно мониторинга на зооозни причинители, **ДЧ трябва да предоставят сравними данни от мониторинга за наличието на АМР при различните зооозни причинители** доколкото те представляват заплахата за общественото здраве.

В периода 2008 - 2011 г. ЕОБХ прие няколко научни становища, съвместно с ECDC, ЕМА и Научния комитет по нововъзникващи и неидентифицирани здравни рискове (SCENIHR) и технически доклад, който заключи, че с оглед на нарастващата загриженост за общественото здраве относно АМР, е **необходимо въвеждане и използване на хармонизирани методи за диагностика и епидемиологични гранични стойности (референтни), за да се осигури сравнимост на данните във времето на равнище ДЧ, както и да се улесни сравнението между изолатите с АМР между ДЧ.**

През 2012 г. ЕОБХ публикува два допълнителни научни доклада относно техническите спецификации за хармонизиран мониторинг и докладване на антимикробната резистентност при *Salmonella*, *Campylobacter*, индикаторния коменсал *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp., предавани чрез храна, както и технически спецификации за хармонизирано наблюдение и докладване на антимикробната резистентност при метицилин-резистентен *Staphylococcus aureus* (MRSA) при продуктивни животни и храни.

Като взе предвид констатациите от тези научни доклади, ЕК прие **Решение 2013/652/ЕС относно мониторинга и докладването на антимикробната резистентност в зооозните и коменсалните бактерии като част от плана за действие срещу нарастващите заплахы от АМР за периода 2011—2016 г.**

Настоящото решение, което е за периода от 2014 г. до 2020 г., съдържа **подробни правила за хармонизирания мониторинг и докладване на АМР**, които да се извършват от ДЧ в съответствие с член 7, параграф 3 и член 9, параграф 1 от Директива 2003/99/ЕО и Приложения II (Б) и IV към него.

ЕОБХ публикува също и научен доклад за подробни функционални спецификации за рандомизирано вземане на проби за хармонизиран мониторинг на антимикробната резистентност при зооозни и коменсални бактерии.

Европейската комисия е провела редица одити относно прилагането на Решение 2013/652/ЕС в ДЧ и през юли 2017 г. е публикуван междинен доклад от одитите. Докладът изтъква основните проблеми по изпълнение на хармонизирания мониторинг, пред който са изправени повечето ДЧ и по-конкретно – по постигането на минималния необходим брой проби / изолати:

- При *Salmonella* spp., изолатите са или от националните програми за контрол на *Salmonella* (SNCPs) или от прилагането на Регламент (ЕО)№2073/2005³ относно микробиологичните критерии за храните. В случай на слабо разпространение, всички събрани проби за *Salmonella* трябва да бъдат тествани. Това включва изолатите, получени от хранителната промишленост, но компетентните органи рядко успяват да се възползват от тези изолати.

- При *Campylobacter jejuni*, в някои ДЧ се наблюдават две явления от влизането в сила на Решение 2013/652/ЕС⁴, а именно ниска честота на поява на *C. jejuni* и по-голямо разпространение на *Campylobacter coli* в някои птичи сектори.

- При определени обстоятелства и поради структурните особености на някои производствени сектори, определението за епидемиологична единица, по-специално за прасета за угодяване и едър рогат добитък на възраст под 1 година, също е ограничаващ фактор за събиране на изолати в някои ДЧ.

- Поради комбинация от фактори ДЧ с малък производствен капацитет, по-специално малките ДЧ, съобщават за проблеми с постигането на минималния брой изолати.

1.1.2. Техническо задание, предоставено от ЕК

В съответствие с чл. 31 от Регламент (ЕО) № 178/2002⁵ ЕК отправя **искане за научна и техническа помощ от ЕОБХ с цел актуализиране:**

- техническите спецификации на ЕОБХ за 2012 г. относно хармонизирания мониторинг и докладване на антимикробната резистентност при *Salmonella*, *Campylobacter* и индикаторния коменсал *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp. – бактериални изолати от храни;

- техническите спецификации на ЕОБХ за 2012 г. за хармонизирано наблюдение и докладване на АМР при метицилин-резистентния *Staphylococcus aureus* (MRSA) в храни и при продуктивни животни;

- техническите спецификации на ЕОБХ за 2014 г. за рандомизирано вземане на проби с цел хармонизиран мониторинг на АМР при зоонозни и коменсални бактерии.

В тези актуализации ще бъдат посочени възможностите за използване на методи за молекулярно типизиране (напр. пълно геномно секвениране на бактериалния геном - WGS) за допълване и/или замяна на фенотипните методи, използвани понастоящем за оценка на АМР и описани в Решение 2013/652/ЕС. Необходимо е да бъде взето предвид осигуряване на съпоставимост на резултатите с немолекулярните методи и възможността за използване на данните от молекулярните изпитвания в минали и бъдещи фенотипни тестове за чувствителност. Ако молекулярните техники се въведат като алтернативни на фенотипните методи, ЕОБХ следва да предостави технически спецификации.

Следва да бъдат взети предвид последните научни становища относно АМР, технологичното развитие, последните тенденции на развитие на АМР и значението за общественото здраве. Под внимание трябва да бъдат взети съпоставимите данни от мониторинга на АМР, докладвани от ДЧ на ЕОБХ, в периода след приемането на Решение 2013/652/ЕС, както и резултатите от одитите, оценяващи прилагането му от ДЧ.

³ РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 2073/2005 НА КОМИСИЯТА от 15 ноември 2005 година относно микробиологични критерии за храните.

⁴ РЕШЕНИЕ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА КОМИСИЯТА от 12 ноември 2013 година относно мониторинга и докладването на антимикробната резистентност на зоонозните и коменсалните бактерии (нотифицирано под номер С(2013) 7145).

⁵ РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 178/2002 НА ЕВРОПЕЙСКИЯ ПАРЛАМЕНТ И НА СЪВЕТА от 28 януари 2002 година за установяване на общите принципи и изисквания на законодателството в областта на храните, за създаване на Европейски орган за безопасност на храните и за определяне на процедури относно безопасността на храните.

Също така следва да се вземат предвид показателите по отношение на антимикробната резистентност и консумацията на антимикробни средства при хора и продуктивни животни, тъй като това осигурява възможност за **оценка напредъка в намаляването на потреблението на антимикробни средства и степента на АМР при патогенни бактерии, изолати от хора и продуктивни животни**. И накрая, следва също така да се гарантира, че предлаганите разработки, където е възможно, ще подобрят съвместния анализ на антимикробните средства и устойчивостта към тях на бактериалните патогени (JIACRA), извършван от ЕОБХ, ЕМА и ECDC.

2. Кратко описание на настоящата хармонизирана система за мониторинг на АМР

Директива 2003/99/ЕО⁶ относно мониторинга на зоонозните причинители определя **общите изисквания за мониторинг и докладване на АМР в изолати от зоонозни *Salmonella* spp. и *Campylobacter* spp., както и при други избрани бактерии, които са потенциална заплаха за общественото здраве – от продуктивни животни и от храни в ДЧ на ЕС**. В рамките на мониторинга на АМР при продуктивни животни и храни, честотата на АМР обикновено се определя като пропорция между бактериалните изолати, тествани за дадено антимикробно средство (и е установено, че притежават каквато и да е степен, дори и минимална на чувствителност) и напълно чувствителните диви щамове. **Епидемиологичните гранични стойности (*ecoff*) се използват като тълкувателни/референтни критерии/стойности за микробиологична устойчивост.**

2.1. Описание на данните, събрани от системата

Мониторингът на АМР при продуктивни животни и храни е преразгледан с Решение 2013/652/ЕС на Комисията за прилагане на Директива 2003/99/ЕО, които определят приоритетите за мониторинг от гледна точка на общественото здраве и описват комбинациите от бактериални щамове, антимикробни средства, популациите продуктивни животни и храните, които трябва да бъдат наблюдавани от 2014 г. насам, включително честотата, с която трябва да се извършва мониторинг.

2.1.1. Бактериални щамове, продуктивни животни и храни

След прилагането на решението на ЕК, **мониторингът на АМР в зоонозните *Salmonella* spp. и *S. jejuni*, както и в индикаторният *E. coli*, изолати от основните групи продуктивни животни, произведени в страната, са задължителни**. Изолатите от индикаторни *E. coli* и *Campylobacter* spp. са основно от програмите за активен мониторинг (На случаен принцип се вземат цекалните проби от кланични трупове на здрави животни.). В мониторинга на *Salmonella* spp. при бройлери, кокошки носачки и пуйки за угояване са включени изолати, които произхождат от национални мониторингови планове за контрол на *Salmonella*, както и изолати от трупове на бройлери и пуйки за угояване, взети по направление хигиенен контрол. За мониторинга на *Salmonella* spp. при прасета за угояване и едър рогат добитък под 1 година, изолатите са от кланични трупове по изпълнение на програма за хигиенен контрол. **Целевият брой изолати от всеки бактериален щам, които трябва да бъдат изследвани, е 170 от всеки вид селскостопански животини (това се свежда до 85 изолата от домашни птици и свине, ако производството е по-малко от 100 000 тона годишно). От 2014 г. нататък птиците/птичето месо ще бъдат мониторирани през 2 години, а именно: 2014, 2016, 2018 и 2020 г., а прасетата и едрия рогат добитък под 1 година, свинско и говеждо месо съответно - през 2015, 2017 и 2019 г.** В рамките на всяка

⁶ ДИРЕКТИВА 2003/99/ЕО НА ЕВРОПЕЙСКИЯ ПАРЛАМЕНТ И НА СЪВЕТА от 17 ноември 2003 година относно мониторинга на зоонозите и заразните агенти, причиняващи зоонози, за изменение на Решение 90/424/ЕИО на Съвета и за отмяна на Директива 92/117/ЕИО на Съвета

ДЧ, различните видове животни и месо от тях следва да бъдат мониторирани, когато производството надвишава 10 000 тона заклани животни годишно (таблица 1).

Animal populations/ Meat	<i>Salmonella</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Indicator/ ESBL- producing <i>E. coli</i>	CP- producing <i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i> / <i>E. faecium</i>
Broilers	M: NCP, PHC	M: CSS	V	M: CSS	V	V
Laying hens	M: NCP	–	–	–	–	–
Fattening turkeys	M: NCP, PHC	M: CSS	V	M: CSS	V	V
Bovines, < 1 year old	M: PHC	–	–	M: CSS	V	V
Fattening pigs	M: PHC	–	–	M: CSS	V	V
Broiler meat	–	–	–	M: R	V	–
Pig meat	–	–	–	M: R	V	–
Bovine meat	–	–	–	M: R	V	–

CP: carbapenemase; CSS: caecal samples from healthy animals at slaughter; M: mandatory monitoring; NCP: *Salmonella* national control plans; PHC: surveillance of process hygiene criteria; R: at retail; V: voluntary monitoring.

V – доброволен мониторинг, M – задължителен мониторинг, PHS – хигиенен контрол и сървейлънс, NCP – по програма от национален мониторингов план

2.1.2. Панели антимикробни средства

Антимикробните средства, включени в мониторинга от 2014 г. нататък, са показани в таблица 2. **Панелът тестови антимикробни средства включва тези, които са от особено значение за общественото здраве, както и тези от епидемиологична значимост.** Граничните *ecoff* стойности са използвани като тълкувателни критерии за резистентността (*Kahlmeter et al., 2003*). **Хармонизираният панел от използвани антимикробни средства, по-специално за *Salmonella* spp. и *E. coli*, е разширен с включването на продукти като колистин и цефтазидим, които са или важни за човешкото здраве, или осигуряват по-ясна представа за вероятните механизми на резистентност към цефалоспорини с разширен спектър.**

Substances	<i>Salmonella</i>	<i>C. coli/C. jejuni</i>	Indicator <i>E. coli</i>	Enterococci
Ampicillin	●		●	●
Azithromycin	●		●	
Cefepime	x		x	
Cefotaxime	●		●	
Cefotaxime + clavulanic acid	x		x	
Ceftazidime	●		●	
Ceftazidime + clavulanic acid	x		x	
Chloramphenicol	●		●	●
Ciprofloxacin	●	●	●	
Colistin	●		●	
Daptomycin				●
Ertapenem	x		x	
Erythromycin		●		●
Gentamicin	●	●	●	●
Imipenem	x		x	
Linezolid				●
Meropenem	●		●	
Nalidixic acid	●	●	●	
Quinupristin/Dalfopristin				●
Streptomycin		●		●
Sulfonamides	●		●	
Teicoplanin				●
Temocillin	x		x	
Tetracycline	●	●	●	●
Tigecycline	●		●	●
Trimethoprim	●		●	
Vancomycin				●

●: all isolates; x: only for isolates resistant to cefotaxime, ceftazidime and/or meropenem.

(a): Commission Decision 2013/652/EU¹⁷.

- Всички изолати; X – само изолати, резистентни към цефотаксим, цефтазидим и/или меропенем.

2.1.3. Специфично наблюдение на ESBL-/AmpC- и/или карбапенем-продуциращата *E. coli*

С решение за изпълнение 2013/652/EC на ЕК се определя вземането на цекални проби от бройлери, пуйки за угояване, прасета за угояване и едър рогат добитък на възраст под 1 година, както и от птиче, свинско и говеждо месо за мониториране на АМР чрез използване на селективни култивационни среди, включващи трета генерация цефалоспоринов цефотаксим. Тези среди са селективни за *E. coli*, резистентни към цефалоспоринови от трето поколение и се очаква да позволят развитието на б-лактамазни- с разширен спектър (ESBL), AmpC б-лактамазни- (AmpC) или карбапенемазни бактериални щамове, които са резистентни към цефотаксим при микробиологичното изпитване. **От всеки вид животни и месо трябва да се изследват 300 чревни проби.**

На практика, всички предполагаеми ESBL- или AmpC- или карбапенем-продуциращи *E. coli* изолати са идентифицирани чрез селективно посяване, както и всички тези на случаен принцип избрани изолати *Salmonella* spp. и *E. coli*, които са резистентни на цефотаксим или цефтазидим или меропенем, се изследват допълнително с втори панел от антимикробни средства (Таблица 2). Този втори панел от антимикробни средства включва цефотаксим и цефтазидим със или без клавуланова киселина (за изследване дали синергията е наблюдавана в комбинация с клавуланат), както и антимикробните средства цефокситин, цефепим, темоцилин, ертапенем, имипенем и меропенем. **Вторият панел от**

антимикробни средства е предназначен да даде възможност за фенотипно охарактеризиране на ESBL-, AmpC- и карбапенемаза продуциращи бактерии.

С Решение за изпълнение 2013/652/ЕС на Комисията се предвижда доброволно наблюдение на микроорганизмите, произвеждащи карбапенемази, като се използва селективна среда с карбапенем. Редица ДЧ са извършили това специфично наблюдение, фокусирайки се върху откриването на *E. coli*, продуцираща карбапенемаза.

2.2. Силни страни на системата

Наблюдението на AMP съгласно Решение за изпълнение 2013/652/ЕС на ЕК обхваща основните продуктивни животински видове и включва различни производствени сектори (бройлери, кокошки носачки, прасета за угояване, пуйки за угояване и едър рогат добитък на възраст под 1 година).

Ефектите от прекомерната употреба на антимикробни средства върху появата на резистентност могат да бъдат изследвани по-лесно в индикаторните микроорганизми, отколкото в патогенните, пренасяни с храни, като например *Salmonella* spp. и др..

Мониторингът на резистентността в индикаторния коменсал *E. coli* вече е задължителен. Изолатите, подложени на тест за чувствителност, обикновено са получени от програми за активен мониторинг на здрави животни, което осигурява представителност на данните за резистентност, особено в случая на индикаторни бактерии и *Campylobacter* spp.

Решение за изпълнение 2013/652/ЕС на Комисията гарантира, че всички докладващи ДЧ предоставят данни за общият набор от антимикробни средства и циркулиращите бактериални щамове, които са посочени в таблица 2.

До сега събирането и докладването на данни се извършва до ниво изолация на патогенния причинител, което позволява да се извършат задълбочени анализи относно появата на множествена лекарствена резистентност и изследване на възможни взаимовръзки между появата на изолати, които са напълно чувствителни към панела от тествани антимикробни средства и употребата на тези антимикробни средства.

В програмите за мониторинг на AMP е включена външна система за гарантиране на качеството, основана на редовно обучение и годишни тестове за пригодност, което ще открие потенциалните различия между лабораториите, извършващи тестове за чувствителност, свързани с методи или тълкувателни критерии, и се координира от националните референтни лаборатории за AMP (NRL-AR) в рамките на всяка докладваща ДЧ и Референтната лаборатория на ЕС за антимикробна резистентност (EURL-AR).

2.3. Пречки пред системата

Европейската комисия е извършила одити в 14 ДЧ, за да провери реалното изпълнение на програмите за мониторинг на AMP, установени от действащото законодателство на ЕС. Системата гарантира хармонизиране на мониторинга на резистентността при продуктивните животни и съпоставимостта на данните за AMP, записани в съответните ДЧ. От докладите и данните, подавани от ДЧ се забелязват трудности в някои аспекти на прилагането на Решение за изпълнение 2013/652/ЕС на Комисията като: планиране и вземане на проби, обработка на проби, лабораторни тестове и докладване до ЕОБХ.

3. Последно развитие на ситуацията с AMP

Въвеждането на Решение за изпълнение 2013/652/ЕС на Комисията, което планира прилагането на ревизирани панели от антимикробни средства, които да бъдат тествани,

позволи да се разшири обхватът на мониторинга на АМР и да се повиши надеждността на резултатите. Независимо от това, непрекъснато увеличаващият се процент на АМР при патогенните причинители подчертава **необходимостта от преразглеждане на събраните данни, тълкуването на резултатите и оценката на тенденциите на развитие на АМР.** От 2013 г. насам се появиха редица въпроси, свързани с АМР и проблеми със справянето с този наболял проблем в сретовен мащаб и съобразно стратегията „Едно здраве“, като това доведе до **необходимост от по-сериозни анализи и въвеждане на допълнителни молекулярни методи за типизиране на патогенните бактерии като пълен геномен секвентен анализ и биоинформатичен анализ.**

По подобен начин епидемиологичната ситуация по отношение на *Salmonella*, *Campylobacter* и други подобни патогени еволюира през последните години и преразглеждането на хармонизирания мониторинг на АМР също трябва да следва този еволюционен път.

3.1. *Salmonella enterica subsp. enterica*

През последното десетилетие АМР в целевите серовари на *Salmonella* при домашните птици е намаляло значително в повечето от ДЧ.

В някои ДЧ намаляването на броя проби може да задълбочи проблема с липсата на достатъчен брой изолати от домашни птици (т.е. бройлери, кокошки носачки, пуйки за угояване), които да бъдат тествани за АМР. Тъй като АМР при *Salmonella* продължава да се задълбочава и има поява на нови резистентни щамове, е **препоръчително непрекъснато наблюдение на АМР в *Salmonella*, въпреки че ограниченият брой изолати не позволява пълен статистически анализ на нивото на резистентност.**

Тестът за антимикробна чувствителност (AST) при *Salmonella* трябва да бъде насочен предимно към **откриване и проследяване на нововъзникващи проблеми, включително спорадична поява на клонове и развитие на мултирезистентност към множество лекарства (MDR) (например: *S. Kentucky* с висока резистентност към флуорохинолони и изолати *S. Infantis* са с комбинирана резистентност към критично важните антимикробни средства (HPClAs), като цефалоспорини с разширен спектър, флуорохинолони и колистин).** За тази цел салмонела **изолатите от животни за клане, се оказа от голямо значение за оценката на АМР на щамовете, влизащи в хранителната верига.**

3.2. *Campylobacter* spp.

Високото ниво на хармонизация на метода, използван за изпитване на чувствителност на *Campylobacter* spp., независимо дали се вземат под внимание панелите антимикробни средства и диапазони на концентрация, които се тестват, както и интерпретативните критерии за резистентност (*EUCAST ecoff*) и представителния модел на пробовземане, дава възможност за сравнение между нивата на устойчивост и профилите на резистентност, наблюдавани при тези бактерии в ДЧ.

Външните гаранции за качество на фенотипните тестове за чувствителност също се предоставят на НРЛ от EURL-AR. Все пак, в контекста на доста скорошното въвеждане на европейския стандарт EN ISO 10272-1, могат да възникнат леки разлики между методите за изолиране на *Campylobacter*, използвани в различните ДЧ, и получените резултати, включително профилите на чувствителност към антимикробни средства.

3.3. Индикаторен коменсал *E. coli*

Съгласно действащото законодателство за наблюдението на АМР в индикаторния коменсал *E. Coli*, данните за този патоген играят роля на гръбнак в мониторинга на АМР в

целия ЕС. Доказано е, че индикаторния коменсал *E. coli* отразява експозицията на популацията на антимикробен селекционен натиск. Разпространението на индикаторния коменсал *E. Coli* в тестовите продуктивни животни обикновено се равнява на > 90%, а целевият брой от 170 (или 85) изолати е постигнат безпроблемно. Тази бактериална популация може да осигури непрекъснати доказателства за тенденциите на развитие на АМР и тренда на антимикробна консумация в ДЧ.

3.4. Ентерококи

В решението за изпълнение на Комисията 2013/652/ЕС относно мониторинга и докладването на АМР в зоонозни и коменсални бактерии, *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis* са включени от 2014 г. в групата от бактериални видове, подложени на изследване на доброволна основа. Ежегодно само ограничен брой ДЧ представят на ЕОБХ данни за АМР при *E. faecium* и *E. faecalis*. Освен това представените данни за АМР са спорадични, не са добре представени географски и са трудни за обработка и недостатъчни за анализ на тенденцията в развитието на АМР. В допълнение, нивото на АМР при ентерококите е по-слабо предсказуемо сравнено с АМР при други Грам-положителни бактерии, които са от значение за общественото здраве като стафилококи, където клоновото разпространение на определените щамове може да бъде значително. За антимикробни средства, чийто спектър на действие обхваща главно Грам-положителни микроорганизми (напр. макролиди), **задължителният мониторинг на чувствителността на *E. faecalis* и *E. faecium* на 4-годишна ротационна основа** ще позволи изследванията на взаимосвързаността между консумацията на антимикробни средства и развитието на АМР.

Мониторингът на АМР при ентерококите като индикаторни бактерии, представляващи Грам-положителни микроорганизми, ще допълни данните за *E. coli*, въпреки че данните се събират по-рядко, по-малко са и не са от основен приоритет.

3.5. ESBL-/AmpC- и/или карбапенемаза произвеждащи *E. coli*

Селективното изолиране на ESBL/AmpC и/или продуциращата карбапенемаза *E. coli* показва, че тя осигурява интересна допълнителна информация за мониторинга на индикаторния коменсал *E. coli*. Разпространението на ESBL/AmpC-продуциращата *E. coli* по хармонизираните методи са в подкрепа на допълнителни научноизследователски проекти, които ще помогнат да се съберат повече данни относно потенциалното предаване на този патоген от животинските популации и чрез храната на хората, особено хората изложени на постоянен контакт с животни в животновъдството (*Dorado-Garcia et al.*, 2018).

Изследването и изолирането на микроорганизъм, произвеждащ карбапенемаза от продуктивни животни и/или храни, посредством специфична селективна среда с карбапенем, позволи да бъдат открити няколко изолата, принадлежащи към различни *Enterobacteriaceae* (*E. coli* и *Enterobacter* spp.).

Предстоящите резултати от **изследователски проект IMPART⁷ относно селективната изолация и идентифицирането на ентеробактерии, произвеждащи карбапенемази**, ще бъдат взети предвид от EURL-AR при преразглеждането на хармонизирания мониторинг.

3.6. MRSA

Мониторингът на разпространението на MRSA при животни и храни понастоящем се извършва **на доброволна основа** като редица ДЧ докладват резултатите на ЕОБХ за включване в годишния обобщен доклад на ЕС за АМР. Някои ДЧ извършват тестване

⁷ IMPART: Improving phenotypic Antimicrobial Resistance Testing by development of sensitive screening assays for emerging resistances, and setting missing ECOFFs, <https://onehealthjp.eu/projects/jrpl-impart/>

посредством молекулярни методи на чувствителността на изолати *MRSA* на доброволна основа (EFSA, 2012b). EURL-AR публикува актуализиран протокол за изолация на *MRSA* от продуктивни животни (www.eurl.eu).

Подадени са данни за открити редица изолати *MRSA* от продуктивни животни и от храни, които са значими за здравето на човека. Тези ДЧ, които изпълняват тестове за чувствителност към определени панели антимикуробни средства (AST) и предоставят резултатите на ЕОБХ, са използвали **култивиране в специфични хранителни среди**, включващи различни панели антимикуробни средства, както беше предложено от ЕОБХ през 2012 г. (EFSA, 2012b).

EURL-AR организира външни анализи за осигуряване на качеството на тестовете на чувствителността на *MRSA*. От резултатите от мониторинга на *MRSA* се наблюдават незначителни различия между ДЧ - по-специално – в програмите за вземане на проби, които са в съответствие с националните приоритети.

3.7. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae често е резистентна към много лекарства (Wyres u Holt, 2018). Този патоген се среща в околната среда (например в повърхностни води) и се изолира от лигавиците и в чревното съдържимо на хора и животни (Podschun and Ullman, 1998). Този патоген е от особен интерес като индикаторен вид за АМР и е с голяма значимост за общественото здраве след *MDR* клонингите, които могат да причинят вътреболнични инфекции. Наличието и разпространението на *K. pneumoniae* е променлива и може да се наложи да се съберат много голям брой проби, за да се получат достатъчно изолати. В най-добрия случай, *K. pneumoniae* може да бъде добавен като допълнителен индикаторен вид в мониторинговата програма за АМР на потенциални патогенни бактерии с неустановен зоонозен потенциал. Смята се, че в идеалния случай разпространението/вариабилността на разпространението на *K. pneumoniae* може да бъде наблюдавано най-добре при продуктивни животни.

3.8. Епидемиологичен контекст

В контекста на изпълнението на плановете за действие на ЕС и на ДЧ срещу заплахата от АМР, се очаква да има намаляване на употребата на антимикуробни средства при продуктивни животни, в съчетание с въвеждането на допълнителни мерки за смекчаване на въздействието през следващите години, което ще доведе до намаляване на селективния натиск върху появата на АМР.

4. Преглед и обратна връзка от мрежите от Национални референтни лаборатории по антимикуробна резистентност и ЕОБХ

Инструментът „EU-survey“, изготвен от работната група на ЕОБХ и EURL-AR, представлява въпросник, предназначен да оцени по-добре визията на ДЧ за мониторинг и борба с АМР и да оцени потенциала за по-нататъшно хармонизиране на процедурите по мониторинг на патогенните бактерии и резистентността им към антимикуробните средства. Въпросникът обхваща пет аспекта, по-специално:

- I: Методологии, прилагани за изолиране на *Campylobacter* spp. за тестване на антимикуробна чувствителност;
- II: Мониторинг на резистентността към жизненоважното антимикуробно средство - колистин с помощта на селективни среди;
- III: Характеризиране на ESBL/AmpC/карбапенемаза продуциращи бактерии и идентификация на гените, отговорни за това;
- IV: Мониторинг на *MRSA*, изолати от продуктивни животни и храни;

- V: Първи и втори антимикуробни панели за тестване на чувствителността на *Salmonella* и *E. coli*.

Общо 27 ДЧ и 4 държави, които не са членки на ЕС, отговориха на въпросника.

Специфичното проучване чрез въпросника показва, че е желателно и разумно да се предложи и приложи хармонизиран протокол въз основа на европейския стандарт EN ISO 10272-1 и точни препоръки (напр. брой проби, максимално изминало време преди анализ, вид селективни среди, схемата и броя на колонии, които трябва да бъдат проверени за идентификация на бактериалните видове) на ДЧ, за да се подобри по-нататъшното хармонизиране на мониторинга на АМР при *Campylobacter*.

По отношение на евентуалния допълнителен мониторинг на *MRSA* за целия ЕС, 19/27 ДЧ (70%) и две отговорили държави извън ЕС считат, че би било полезно да се прилага при продуктивни животни. Само една ДЧ не е съгласна и 7/27 не са отговорили на този въпрос. Основните животински видове, считани за най-приоритетни за по-нататъшен мониторинг в ЕС, са: прасета (18/27 ДЧ), бройлери (15/27 ДЧ), телета (10/27 ДЧ) и пуйки (7/27 ДЧ) и месо от тях.

5. Цели на мониторинга на АМР от гледна точка на общественото здраве

Наблюдението на АМР при бактериални изолати от продуктивни животни и от храни, е от съществено значение за осигуряване на цялостна, съпоставима и надеждна информация за развитието и разпространението на резистентни към лекарства бактерии, към измерване на въздействието на предприетите мерки за намаляване на АМР и за наблюдение на напредъка в борбата с АМР. Постоянно нарастващата заплаха от възникваща резистентност подчертава **необходимостта от по-нататъшно преработване на АМР мониторинговите програми, непрекъснато преразглеждане на събраните данни**, тълкуване на резултатите и оценка на тенденциите да информира, актуализира и консолидира националните планове за действие срещу АМР въз основа на подхода „Едно здраве“.

Наблюдението на АМР при продуктивни животни и храни, е предвидено да бъде извършено **в тясно сътрудничество с наблюдението на потреблението на антимикуробни средства** при продуктивни животни и с програмите за мониторинг на употребата на антимикуробни средства и мониторинговата програма за антимикуробна резистентност при хора. Такива данни за АМР и АМС предоставят възможност за **информирано вземане на стратегически решения и улеснява разработването на подходящи стратегии и действия за управление на АМР на европейско, национално и регионално равнище. Първият в ЕС интегриран анализ на данните за употребата на антимикуробни средства и появата на АМР в бактерии, човешки изолати, изолати от продуктивни животни и изолати от храни са съвместно изпълнявани от ECDC, EFSA и ЕМА (JIACRA I и JIACRA II).**

Настоящите технически спецификации имат за цел да подобрят сравнимостта и надеждността на събраните от ДЧ данни за АМР и така да се разшири обхвата на мониторинга.

Скорошните **биотехнологични открития** и разработки и **нарастващото използване на молекулярнобиологични методи в диагностиката** доведоха до **включване в мониторинговите програми на метода пълно геномно секвениране**, с цел по-подробното характеризирание на изолатите на молекулярно ниво и подобряване сравнението на степента на АМР в изолати от хора и животни на няколко нива: поява и типове гени, отговорни за резистентността, плазмидни последователности, пренасящи гените за резистентност, сравняване на целия бактериален геном на изолатите и построяване на филогенетични дървета, с цел доказване на взаимовръзката по между им и произхода им.

Съпоставимостта с мониторинга, осъществен през предходните години, е важна при преразглеждане на техническите спецификации на всички нива. Данните, събрани през предходните години, осигуряват важен ресурс, на базата на който могат да бъдат оценени бъдещите тенденции. АМР в някои бактериални изолати от храни и продуктивни животни се следи съгласно Решение за изпълнение 2013/652/ЕС на ЕК от няколко години; преработените технически спецификации предлагат разширяване на мониторинга, за да се включат други избрани бактериални видове и видове проби в задължителния мониторинг и да се дадат препоръки относно честотата на мониторинга.

6. Обосновка за преразглеждане на настоящата система за мониторинг на АМР

6.1. Да бъде адаптиран мониторинга към възникващата АМР и настоящите приоритети

6.1.1. Включване в мониторинга на АМР на *C. Coli*

Campylobacter coli е човешки патоген и според обобщеният доклад на ECDC/EFSA на ЕС за зоонозите има регистрирани **246158 потвърдени случая при хора в ЕС** за 2017 г. (*C. jejuni* представляват 84,4%, а *C. coli* - 9,2% от всички потвърдени случаи, EFSA и ECDC, 2018b).

Изолатите *C. coli* показват по-честа резистентност от *C. jejuni* към някои антимикробни средства като еритромицин и гентамицин (EFSA и ECDC, 2018a). Комбинираната резистентност към ципрофлоксацин и еритромицин е ниска при *C. jejuni* (0.6%), но умерена при *C. Coli* (8.0%). Във Франция *C. coli* е по-често резистентна към макролиди, флуорохинолони и тетрациклини (CNR-Campylobacter, online), докато в САЩ и Испания резистентността към макролиди е по-голяма при *C. coli*, отколкото в *C. jejuni* (Bolinger and Kathariou, 2017).

Като се имат предвид животинските източници, при *C. coli* е установена по-често устойчивост към ципрофлоксацин, отколкото при *C. jejuni* в домашните птици (САЩ), дори след забраната на енрофлоксацин (Bolinger u Kathariou, 2017). В Европа през 2016 г. *C. coli* при домашни птици е значително по-често резистентна на ципрофлоксацин, отколкото *C. jejuni*. Сравнението обаче е ограничено до няколко държави, тествачи чувствителността и при двата вида, тъй като *C. coli* не е тестван в много страни (EFSA и ECDC, 2018a). В САЩ в месото от домашни птици са описани по-високи нива на АМР (с изключение на тетрациклин) при *C. coli*, отколкото при *C. jejuni* (Zhao et al., 2010). Във Франция *C. coli* от телета е по-често резистентна на тетрациклини, ципрофлоксацин и еритромицин (Chatre et al., 2010), докато в Полша *C. coli* от прасета и говеда са значително по-често устойчиви на стрептомицин и тетрациклин, отколкото *C. jejuni* (Wieczorek and Osek, 2013). В САЩ се отчитат и високи нива на резистентност към еритромицин при *C. coli* от пилета, пуйки, говеда и свине в сравнение с *C. jejuni* (Bolinger u Kathariou, 2017).

***C. coli* може да съдържа и пренася важни гени, отговорни за антимикробната резистентност към *C. Jejuni*.**

Генът *erm (B)* кодира rRNA метилаза, отговорна за резистентността към макролиди, линкозамиди, и стрептограмин В антибиотици и често се среща в различни Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, животински изолати (Roberts, 2008). Наскоро този ген е описан при *Campylobacter* изолат в Китай, където се наблюдава по-често при *C. coli*, отколкото в *C. jejuni*, и е отговорен за високото ниво на резистентност към макролиди (Liu et al., 2017). В Европа досега генът *erm (B)* е установен само в няколко *C. coli* изолати от бройлери и пуйки в Испания (Florez-Cuadrado et al., 2017) и в Белгия (Elhadidy et al., 2019). В *Campylobacter*, този ген присъства или в плазмиди, или по-често, в мултирезистентни локуси от генома (MDRI), съдържащи други гени на резистентност като *tet(O)*, кодиращ резистентността към тетрациклин и гени за резистентност към

аминогликозиди, като *aad9*, *aadE*, *aph (2'')* - IIIa и *aacA-aphD* (Florez-Cuadrado et al., 2017). MDRI може да се прехвърлят в чувствителни на макролид *C. Jejuni* (Wang et al., 2014).

C. coli може да съдържа *cfr (C)* ген, кодиращ резистентност към фениколи, линкозамиди, плевромутилини и оксазолидинони. За първи път е открит в *C. Coli*, изолати от едър рогат добитък в различни щати на САЩ. Генът е върху конюгиращ плазмид и може да се пренася към *C. Jejuni* реципиентния геном (Tang et al., 2017). Генът *cat*, придаващ резистентност към фениколи (Li et al., 2017) е установен по-често при *C. coli* от бройлери на пазарите на живи животни в Китай (Li et al., 2017).

Присъствието в *Campylobacter* на тези гени, плазмидите и MDRI, кодиращи резистентност е тревожно, като те не само дават възможност на техния бактериален гостоприемник да се противопостави на една или няколко важни терапевтични схеми, но също така те могат да доведат до селекция на мултирезистентни *Campylobacter* изолати, чрез използване на други антимикробни средства.

Желателно е да се гарантира по-голяма степен на хармонизация на протоколите за изолация на бактериалните щамове, за да се осигури подходящо сравнение между данните, подадени от ДЧ по отношение на разпространението на *C. jejuni* и *C. coli*.

6.1.2. Включване в мониторинговите програми на MRSA

Докладването AMP при метицилин резистентен *S. Aureus*, изолати от продуктивни животни и храни (EFSA, 2012b) още през 2008 г. бе извършено във връзка с проучване на ЕС, с цел получаване на сравними предварителни данни за наличието и разнообразието на MRSA в първичното свиневъдство в ДЧ чрез хармонизирана схема за вземане на проби (EFSA, 2009 г.). Резултатите от проучването показват, че MRSA е често срещана в свиневъдните стопанства в някои ДЧ, докато в други - разпространението е ниско (EFSA, 2010). MRSA ST398 е преобладаваща линия, която е идентифицирана.

Сравнително малко ДЧ съобщават за редовен мониторинг на MRSA в производството на храни или изолати от животни или месо към ЕОБХ (EFSA и ECDC, 2019).

Отчитайки само данните, подадени от ДЧ, които докладват резултатите от програмите за мониторинг на MRSA, изолати от продуктивни животни или храна, се забелязва тенденцията, че някои ДЧ са докладвали само наличие/отсъствие на MRSA, а други са направили **молекулярна типизация на щамовете и са определили антимикробната им чувствителност към определени панели антимикробни средства на база геномен анализ.**

Малкият брой ДЧ, които доброволно докладват данни за MRSA, както и липсата на пълна хармонизация на програмите за мониторинг, осигуряват само ограничена оценка на появата и характеристиките на MRSA. Мониторингът на ниво ферма може да улесни проучването на рисковите фактори и влиянието на управленските практики на земеделските стопанства върху появата на MRSA.

Където са налични данни за молекулярно типизиране, откритите MRSA изолати са категоризирани и могат да бъдат намерени в доклада на ЕОБХ и ECDC за AMP - като такива, свързани с продуктивните животни (LA-); свързани със здравеопазването (HA-); свързани с общността (CA-) или *tesC* MRSA. **Данните за разпространението и данните от типизирането са полезни при характеризиране на тези животински щамове,** въпреки липсата на хармонизиран мониторинг. Но липсата на хармонизиран подход означава, че резултатите като цяло не са сравними между ДЧ. Някои ДЧ са приложили последователна методология за наблюдение на MRSA при животните няколко последователни години и следят промените в разпространението, но отново има разминаване в данните от различните ДЧ и процедурите по пробовземане също се различават.

Техническият доклад на ЕОБХ (EFSA и ECDC, 2018a) също описва гените в *MRSA*, отговорни за вирулентността и адаптацията на гостоприемника, като тези гени включват, например, често асоциираният с ***Panton-Valentin* левкоцидин (PVL) SA-MRSA щам, отговорен за инфекциите при човека**, както и други левкоцидини, които са били свързани със *S. aureus* в частност животински изолати (например *lukM* в преживни животни (Schlotter et al., 2012)). В допълнение, някои бактериофаги могат да бъдат свързани със специфични линии на *S. aureus/MRSA* и могат да носят гени, които могат да обезпечат по-голямата адаптивност и да улеснят колонизацията (или вирулентността) на някои животински гостоприемници (Van Der Mee-Marquet et al., 2013). Гени като *sak*, кодиращ стафилокиназа, *chp*, кодиращ протеин на хемотаксисния инхибитор и *scn*, кодиращ стафилококов допълнителен инхибиторен протеин често биват откривани в генома на *S. aureus*, човешки изолат, но се срещат рядко при животински изолати (Cuny et al., 2015).

Възникване на антимикробна резистентност при MRSA при продуктивни животни

Само няколко ДЧ са докладвали подробности за АМР на животински изолати *MRSA* или изолати от месо до ЕОБХ през последните години (EFSA и ECDC, 2019). **Антимикробната чувствителност на MRSA изолати може да предостави полезна информация, което е особено важно за LA-MRSA CC398**, които щамове са изолати от **едър рогат добитък**, които често проявяват резистентност към тетрациклини, което от своя страна е един от маркерите, които спомагат за разграничаване между животинските и човешките изолати на CC398 (Kinross et al., 2017).

Устойчивостта на линезолид, критично важно последно антимикробно средство в хуманната медицина, е била доказана в Европа сред едрия рогат добитък (EFSA и ECDC, 2018a). Резистентността на *MRSA* към линезолид може да се дължи на мутация или на еволюционно придобиване на гени, отговорни за резистентността към антимикробни средства, често използвани във ветеринарната медицина. Резистентност към ванкомицин (друго критично важно в хуманната медицина антимикробно средство) не е открита при *MRSA*, животински изолати, но е включен в доброволния мониторинг.

Мониторингът на антимикробната чувствителност и оценката степента на резистентност към панелите антимикробни средства може да се използва и при биоинформатичния анализ и при типизирането на щамата, за да бъде полезна и пълна информацията за развитието и разпространението на *MRSA* при хора.

6.2. Да се подобри съпоставимостта на данните за АМР, получени в ДЧ на ЕС

6.2.1. Хармонизиране на методите за изолиране на *Campylobacter* spp.

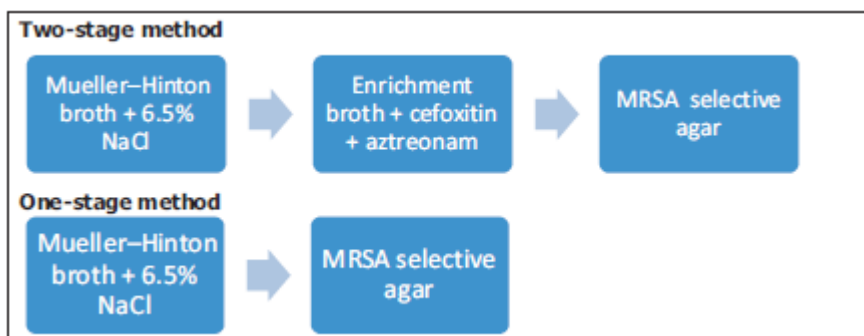
Използване на различни методи за изолиране, по-специално по отношение на възможния различен обем на инокулума (Hsieh et al., 2018), набогатяването на средата (Carrillo et al., 2014; Reperant et al., 2016), температурата на инкубиране, типа среда за посяване (Hsieh et al., 2018) и броя на изолатите, идентифицирани на видово ниво (Carrillo et al., 2014; Reperant et al., 2016), могат да окажат силно влияние върху резултатите от изолирането на *Campylobacter* spp., пропорционалното съотношение между *C. jejuni* или *C. coli* или дори биодиверсията на изолатите, включително техните профили на чувствителност към антимикробни средства. **Различията в методологиите на култивиране и изолиране на *Campylobacter* показват необходимостта от съпоставимост на резултатите и последователни хармонизирани методи за изолация (Huang et al., 2015).** По-доброто познаване на разпространението на *Campylobacter* spp., *C. jejuni* и *C. coli*, по-подробното и информативно характеризиране на щамовете от продуктивни животни и храни както и разпространението и степента на резистентност при *Campylobacter* spp. ще спомогне за разбирането на епидемиологията и особено на източниците на човешки

инфекции със *C. jejuni* и *C. coli*, и разпределението на *C. jejuni* и *C. coli* сред човешката популация между европейските страни. **По-доброто разбиране на източниците на инфекциите в различните ДЧ би могло да спомогне разработването на мерки за по-добър контрол върху този зоонозен агент.**

6.2.2. Хармонизиране на методите за изолиране на *MRSA*

EURL-AR наскоро актуализира протокола за изолиране на *MRSA* от животински изолати и изолати от околната среда, за да отрази последните открития относно относителната чувствителност на различните култивационни методи (*Larsen et al.*, 2017). Предишните технически спецификации (EFSA, 2012b) препоръчат **двуетапен метод за изолиране**, а не едноетапен протокол както сега (*Larsen et al.*, 2017). Доказано е, че едноетапният метод има повишена относителна чувствителност, когато се прилага за изолация при прасета (*Larsen et al.*, 2017), което не важи при говеда или домашни птици (*Nemeghaire et al.*, 2013, 2014).

Схематично представяне на двуетапния и едноетапния селективен метод на изолация - Фигура 1:



Фиг. 1: Схематично представяне на едноетапни и двуетапни селективни методи за изолиране за *MRSA*

6.2.3. Хармонизиране на матриците за вземане на проби за *MRSA*

Като се имат предвид наличните данни за относителната чувствителност на различните матрици за вземане на проби, е предложена следната схема за **задължително вземане на проби от продуктивни животни и проби от околната среда** (Таблица 6). Месото и другите продукти от животински произход трябва да бъдат вземани на доброволен принцип.

Table 6: Recommended samples for monitoring *MRSA* in certain food-producing animals

Sample type/Animal population	Pigs	Veal Calves	Turkeys	Broilers
Dust	●	●	●	●
Nasal swabs	●	●		
Oral swabs			●	●
Ear skin swabs	●			
Under wing swabs			●	●

Таблица 6: Препоръчителни проби за мониторинг на *MRSA* при някои продуктивни животни

6.3. Увеличаване обхвата на мониторинга на АМР по хранителната верига

6.3.1. Насочване към други животински видове при наблюдение на АМР в *Campylobacter*

Campylobacter spp. има широка гама от гостоприемници и много видове диви и домашни бозайници и птици са признати за носители (Dearlove et al., 2016). **Продуктивните животни се считат за основен източник на човешката кампилобактериоза чрез консумация на заразени хранителни продукти.** През 2008 г. в целия ЕС посредством мониторингово проучване на разпространението на *Campylobacter* сред партидите бройлери и заразените с *Campylobacter* бройлерни трупове бе оценено нивото на разпространение на кампилобактериоза и то възлиза на съответно 71,2% и 75,8%. През 2016 г., процента *Campylobacter*-положителни проби в прясно месо от бройлери, пуйки, прасета и едър рогат добитък сред докладващите ДЧ на ЕС са оценени на 36,7%, 11,0%, 2,9% и 1,0%, съответно (EFSA и ECDC, 2017b).

Има данни, че консумацията на непастьоризирано или сурово мляко също може да бъде източник на човешка инфекция с кампилобактериоза (Del Collo et al., 2017).

Въпреки че не се откриват често *Campylobacter* в миди (Ripabelli et al., 1999; L evesque et al., 2010) или риба (*Salmo trutta*) (Raeisi et al., 2017), устойчиви на антимикробни средства *Campylobacter* все пак са изолирани от ядивни двучерупчести мекотели, закупени от пазари в Тайланд (Soonthornchaikul u Garelick, 2009).

Този широк обхват на гостоприемници изисква класифицирането на източниците на човешки инфекции и няколко проучвания се опитват да изследват основните източници на човешка кампилобактериоза. По-новите проучвания се основават главно на пълен геномен секвентен анализ на патогенните причинители.

Първите методи използват **нуклеотидни секвенции от конститутивни (housekeeping) гени**⁸. Някои типове мултилокусни последователности (*MLST*) могат да бъдат силно свързани със специфични гостоприемници, като например клонови комплекси *ST-257* - с пилета и *ST-61* - с преживни животни (Dearlove et al., 2016). Поради това, Mossong et al. (2016) съобщават, че **проучванията на базата на *MLST* са установили, че птиците са основен резервоар на човешките инфекции (50–80%), последвани от говедата (20–30%)**. Според проучване, проведено в Люксембург основни източници на човешка кампилобактериоза са следните: домашни птици (61,2%), преживни животни (33,3%), околната среда (4,9%) и свине (0,6%) (Mossong et al., 2016).

Проведено е молекулярно изпитване на щамове *C. coli*, изолирани от различни източници в Нова Зеландия в периода 2005 - 2014 г., което показва, че има **27 различни секвентни типове - *ST* (sequence types)**, от които 18 принадлежат на клонален комплекс *ST-828* (Nohra et al. (2016)) Моделирането след проведения секвентен анализ показва, че **главните източници на *C. Coli*, причиняващи човешки инфекции са преживните животни и домашните птици**. За разлика от това, при проведено молекулярно изследване на случаи на човешки инфекции с *Campylobacter* в Германия, Rosner et al. (2017) резултатите показват, че над 90% от случаите на човешка кампилобактериоза се дължат на птичи източници, и нито един от изолатите не е свързан с говеда като източник на инфекцията.

Някои щамове, изолати, принадлежащи към клоновите комплекси *ST-21* и *ST-45* в *C. jejuni* и *ST-828* в *C. coli*, имат широки граници на гостоприемника, което възпрепятства използването на *MLST* за извършване на типизация и определяне на източника (Dearlove et al., 2016). За тази цел е **желателно цялата геномна последователност на патогенните бактерии да бъде прочетена посредством методът пълен геномен секвентен анализ като при това изследване резултатите сочат , че 89% от човешките инфекции се дължат на птици като източник, 10% на говеда; и 1% на прасета.**

⁸ В молекулярната биология „housekeeping“ гените са типично конститутивни гени, които са необходими за поддържане на основната клетъчна функция и се експресират във всички клетки на организма при нормални и патофизиологични условия. Произходът на термина "housekeeping ген" остава неясен. Литературата от 1976 г. използва термина, за да опише специално тРНК и рРНК. За експериментални цели, експресията на един или множество такива гени се използва като референтна точка за анализ на нивата на експресия на други гени.

В допълнение, едно скорошно молекулярно проучване на източниците на човешка кампилобактериоза, основано на петнадесет локуса от бактериалния геном, за които е установено, че служат като маркери за сегрегиране на гостоприемника, са използвани за изследване източника на *C. jejuni* от 42 френски и 281 клинични изолати от Обединеното кралство (Thepault et al., 2017). Резултатите сочат, че 56,8% от човешката кампилобактериоза в Обединеното кралство се дължи на птичи източници, а френските клинични изолати са еднакво свързани с птиците и преживните животни като резервоар на инфекциите, което е в съответствие с много високото разпространение на *C. jejuni* във телета от Франция (98,5%), и с групирането на изолатите в клъстери, общи за човешки и говежди изолати (Thepault et al., 2018).

Неотдавнашно проучване (Whitehouse et al., 2018) показва, че **ролята на свинете при човешката кампилобактериоза остава неясна**, тъй като, въпреки че *C. coli* често се изолира от прасета, резултатите показват нисък принос на свинете като източник на инфекция в сравнение с домашните птици, говедата и кучетата. Същите автори посочват, че морските храни са отговорни за човешки огнища на кампилобактериоза.

6.3.2. Провеждане на допълнителни базови проучвания

Предлага се да се извършат **специално предназначени за целия ЕС базови проучвания с променящи се специфични животински/хранителни/екологични категории**. Този инструмент може да се използва за изследване на разпространението на АМР в специфични животински/хранителни/бактериални комбинации, които за момента не изискват годишно тестване, но трябва да бъдат анализирани на европейско равнище, за да се получи общ преглед на АМР в животински/хранителни/екологични категории. В идеалния случай времето за тези по-интензивни програми трябва да бъде хармонизирано между ДЧ, за да се оптимизира съпоставимостта на резултатите.

Производството на морски продукти за консумация, включително риба и аквакултури, нараства глобално на годишна база (<https://ourworldindata.org/>). Би било **желателно разширяване на мониторинга на АМР в аквакултурите и морските храни, но до момента няма постигнат консенсус**, макар свидетелството на няколко проучвания, че тази стока може да бъде замърсена с различни резистентни бактерии, включително зоонозни патогени и рискът не е малък. Голяма част от рибните продукти, консумирани в ЕС, се внасят от страни извън ЕС (<http://www.eumofa.eu/>) и също така многократно е показано, че **морски храни, внасяни от страни извън ЕС, могат да съдържат бактерии, имащи гени, кодиращи резистентност към определени панели антимикуробни средства, включително антимикуробни средства от крайна необходимост в хуманната медицина**, като карбапенеми (Rubin et al., 2014; Morrison and Rubin, 2015; Janecko et al., 2016; Mangat et al., 2016; Roschanski et al., 2017; Brouwer et al., 2018; Lee et al., 2018). Така има излагане на потребителите в ЕС на патогенните бактерии, носители на гените за АМР, което в противен случай би било локализирано до клинична среда или може да е изключително рядко или незабелязано в рамките на ЕС.

Програмата за мониторинг на АМР в морските храни може да бъде подходяща за различни цели, включително:

- 1) Да се оцени рискът от излагане на потребителите на резистентни бактерии, носители на гените на резистентност
 - чрез внесени морски храни от различни световни източници, и
 - чрез морска храна, произхождаща от ЕС.
- 2) Да наблюдава ефекта от прилагане на антимикуробни средства в аквакултурите.
- 3) Непряко да се оцени степента на „замърсяване“ на околната среда с устойчиви бактерии на ниво ЕС.
- 4) Непряко наблюдение на ефекта от екологичните интервенции, насочени към намаляване на изхвърлянето на резистентни бактерии в повърхностните води и околната среда.

Мониторинг на АМР при бактерии от околната среда:

Важно значение за оценката на степента на АМР в цялост има наблюдението на бактерии, резистентни към антимикробни средства в околната среда, като допълнение на мониторинга, извършван при хора, животни и в храни. **Появата на резистентни на антимикробни средства бактерии, изолати от хора, продуктивни животни и храни може да повлияе появата на резистентни бактерии в околната среда** (например чрез изхвърляне на отпадъчни води, изхвърляне на отпадъчни продукти от фермите, изхвърляне на хранителни отпадъци и др.), както и обратно - циркулиращите бактериални щамове при хора и животни се влияят от присъствието на резистентни бактерии в околната среда, които могат да замърсят храната или фуража или да влязат по друг начин в хранителната верига или да засегнат популациите животни или хора (и да **предадат гените за резистентност**). В някои случаи, екологичните пътища за разпространение на резистентността могат да бъдат повлияни от векторни преносители, като например чайки; освен това околната среда може да действа и като резервоар на резистентни бактерии.

Мониторинг на появата на АМР в бактериите от околната среда може да се извърши по ред и куп различни причини и основополагащата логика или цели ще повлияят избора на типа мониторинг, който ще бъде прилаган.

Неотдавнашна среща на експертите на ФАО/СЗО за мониторинг на АМР при патогени по хранителната верига разглежда ролята на околната среда, културите и биоцидите (FAO/WHO, 2018) и по-специално пътищата на предаване на резистентни бактерии или гени за резистентност от околната среда към хранителната верига и фуражите.

- **Замърсяване на култури като плодове, зеленчуци или зърно с резистентни бактерии може да се случи, но с намаляването на замърсяването намалява и експозицията и контакта на човека или животните с културите и респективно намалява АМР. Почвата, оборската тор и водата за напояване са важни източници на микробна контаминация.**
- **Антимикробни средства** могат да се използват за **терапевтични цели в аквакултурите**; във водата на системите за аквакултури може да се заселят резистентни бактерии, включително бактерии, предадени от хора или отпадъци от животински произход.
- Някои антимикробни средства и вещества се използват в градинарството.

Зеленчуците, плодовете и салатите представляват важен източник на експозиция на потребителите, тъй като тези продукти често се консумират без предварителна топлинна обработка и за напояването им често се използват води, които са за повторна употреба. Потенциалната роля на водата за напояване наскоро беше разгледано в технически доклад на ЕОБХ за **водите, предназначени за повторна употреба като потенциален резервоар на микроорганизми**, които проявяват АМР (EFSA, 2017).

Няколко скорошни изследвания, обхващащи зеленчуци, плодове и листни зеленчуци (салати) обаче са показали, че появата на резистентни бактерии в тези продукти е ниска и следователно рискът е малък и поради малкият брой изследвани проби. Би следвало по-честото изследване на зеленчуците и плодовете и да се следва подходът на пасивен мониторинг, съчетан с рутинния мониторинг и тестване за АМР.

Използването на антимикробни средства в градинарството е сравнително рядко явление и въздействието им върху АМР се разглежда от специфични проучвания, а не проучвания, обхващащи целия ЕС.

6.4. Да се извърши генетично характеризирание/типизиране на детерминантите на АМР

През последните няколко години **технологиите за високопроизводително секвениране (HTS - high throughput sequencing)**, включително пълният геномен секвентен анализ на ДНК (WGS), се развиват с бързи темпове и технологичният прогрес доведе до **по-евтини, по-бързи, по-малки и по-ефективни платформи за секвениране, както и намаляване на разходите при HTS**. WGS дава възможност да се „прочете“ пълната ДНК последователност на бактериалния геном, която след това се анализира посредством биоинформатични инструменти, софтуерни продукти и платформи, като този иновативен подход в диагностиката и мониторинга на АМР потенциално може да осигури много допълнителни информация за тестовия микроорганизъм. **Характеристиките, които могат да бъдат изследвани включват: степен на АМР, геномната архитектура на микроорганизмите, механизмите на резистентност, гените, отговорни за антимикробната резистентност, факторите на предаване на инфекциите, MLST, биоразнообразието на патогенните причинители и техните геноми, геномната пластичност и динамиката на геномните реасортации при появата на нововъзникващи микробни патогени и признаците, свързани с вирулентност на щамове, както и прогнозни серотипове, core-genome MLST (cgMLST), плазмидни репликони и др.**

WGS позволява включването на **разширен набор от АМР детерминанти** и позволява диференциация между АМР, медирана от хромозомни точкови мутации и придобита резистентност, свързана с хоризонтален генен трансфер. Точната локация на гените, отговорни за антимикробната резистентност в генома на микроорганизма могат да бъдат определени посредством WGS, като се прави разграничение между локализациите в хромозомата и мобилните генни секвенции (плазмиди).

WGS наскоро доказва, че е **мощен инструмент за епидемиологично наблюдение на АМР по хранителната верига**. В контекста на стратегията „Едно здраве“ допълнителната информация, предоставена от „прочитането“ на целия геном на бактериалните патогени посредством WGS, води до по-лесното установяване на източниците на инфекции при хората, взаимовръзката между щамове, пътищата на пренасяне на инфекциите от продуктивни животни и околна среда към хора и обратно и „унаследяването“ на АМР. В допълнение, WGS може да се използва и за изследване на хранителните взривове и установяване източника на инфекция и степен на вирулентност в рамките на епидемията, което го прави **многофункционален инструмент** и увеличава рентабилността му.

WGS също така предоставя практическо предимство в сравнение с конвенционалните молекулярни методи, като например гел електрофореза (PFGE), полимеразно верижна реакция (PCR) или количествен PCR (qPCR), тъй като веднъж генерирани, WGS данните могат да се съхраняват в бази данни и следователно остават достъпни и сравними за бъдещи проучвания, освен това така се обогатяват и поддържат колекциите от референтни щамове. **Така се осигурява уникална възможност за повторно анализиране на вече събрани данни, търсене и охарактеризиране на нови гени или такива, които са наскоро открити нови гени, отговарящи за АМР** (пример: ген *mcr-1* на резистентност към колистин (Hasman et al., 2015)).

Все пак **все още** може да има и **несъответстващи резултати между данните за АМР от WGS и фенотипния анализ на антимикробна чувствителност** в зависимост от бактериалните щамове и разгледаните АМР детерминанти. Минималното ниво на несъответствие е най-вече свързано с АМР, медирана от хромозомни точкови мутации и много по-малко - свързана с придобитите гени за резистентност. Несъответствието може да бъде в много ограничени случаи, наблюдавани при експресията на гени за АМР, често свързани с някои аминокликозиди или дължащи се на секвенции от генома, наречени „contigs“. Технологията на WGS все още се развива и доусъвършенства посредством използване и на **изкуствен интелект (machine-learning/deep learning) подходи**, които

потенциално биха могли да бъдат използвани за откриване на нови АМР гени и такива, свързани с АМР.

В САЩ Националната система за мониторинг на АМР (NARMS) вече използва WGS комбиниран с биоинформатичен анализ, като част от мониторинговата програма на АМР за всички *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. и някои резистентни щамове на *E. coli* и *Enterococcus* spp. NARMS изпълнява и успоредна рутинна конвенционална фенотипна диагностика AST за мониторинг. WGS се извършва в лабораториите на NARMS и последователностите се анализират за резистомата на място. NARMS започна да отчита и публикува ежеседмично всички секвенирани геноми на резистентни *Salmonella*, изолати от месо, продуктивни животни и хора в публичен интернет портал с отворен достъп. NARMS приема и предизвикателството пред метода WGS за извличане на информация за определения бактериален вид, серотипизиране на изолатите, за по-добър поглед върху новопоявяващите се АМР гени и информация за пътя на преминаването на резистентни бактерии през хранителната верига (NARMS).

7. Препоръки за бактериални видове, продуктивни животни, и видове храни, които да влезнат в мониторинга на АМР:

7.1. Бактериални видове, които трябва да се вземат под внимание:

Хармонизираният мониторинг на АМР при продуктивни животни и храни следва да обхваща *Salmonella* spp., *C. Jejuni*, *C. coli* и индикаторни коменсални *E. coli*. Такъв мониторингов подход би следвало да допълва тестването на АМР в човешки изолати.

Индикаторните *E. coli* обикновено се изолират от чревно съдържимо и фекалии от животни и могат да служат като показатели за грам-отрицателните коменсали в чревната флора. Коменсалните бактерии, които се изолират от храни, също могат да се считат за потенциална опасност относно АМР, като те могат да притежават гени, кодиращи резистентност. По време на преминаването през червата, тези бактерии могат да предадат гените си за резистентност при репликация на генома към адаптирани към гостоприемниците си бактерии. Миграцията на гени за резистентност между бактерии от различни източници може да се наблюдава и в околната среда (ЕОБХ, 2008). Ефектите от моделите на употреба на антимикробни средства в дадена страна и при даден вид животни както и тенденциите в появата на резистентност могат да бъдат изследвани по-точно в индикаторни бактерии, отколкото в патогенни, предавани с храни.

В съвместният доклад на ЕОБХ и ECDC се предлага да се подкрепи препоръката за наблюдение на АМР в коменсалния индикатор *E. coli* при продуктивни животни (EFSA, 2012a), тъй като получените данни за АМР са по-представителни и сравними и този мониторингов подход би трябвало да се приоритизира.

Трябва мониторингът на АМР при MRSA да бъде включен в хармонизирания мониторинг.

7.2. Комбинации от бактериални видове/ групи храни / продуктивни животни

Хармонизираното наблюдение и докладване на АМР в *Salmonella* spp., *C. jejuni* и *C. coli* и индикаторни *E. coli* включват систематичен мониторинг на производствените типове / животински популации, на които най-вероятно потребителят ще бъде изложен чрез консумация на храна, по-специално месни продукти. **Основните продуктивни животински видове, участващи в мониторинга на АМР са бройлери, кокошки носачки, пуйки за угояване, прасета за угояване, телета и свързаните с тях месни и млечни хранителни продукти.**

Animal population ^(a) / Meat ^(b)	<i>Salmonella</i> spp. (at the serovar level)	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> ^(c)	Indicator commensal <i>E. coli</i>	ESBL/ AmpC/CP-producing <i>E. coli</i>	CP-producing <i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i> / <i>E. faecium</i>
Broilers	M: NCP, CSS	M: CSS	M: CSS	M: CSS	M/V ^(d) : CSS	M/V ^(d) : CSS
Laying hens	M: NCP	–	–	–	–	–
Fattening turkeys	M: NCP, CSS	M: CSS	M: CSS	M: CSS	M/V ^(d) : CSS	M/V ^(d) : CSS
Bovines, < 1 year old	M: CSS	M: CSS	M: CSS	M: CSS	M/V ^(d) : CSS	M/V ^(d) : CSS
Fattening pigs	M: CSS	M: CSS	M: CSS	M: CSS	M/V ^(d) : CSS	M/V ^(d) : CSS
Broiler meat	–	–	V: R	M: R	M/V ^(d) : R	–
Turkey meat	–	–	V: R	M: R	M/V ^(d) : R	–
Pig meat	–	–	V: R	M: R	M/V ^(d) : R	–
Bovine meat	–	–	V: R	M: R	M/V ^(d) : R	–

CSS: caecal samples from healthy animals at slaughter; M: mandatory monitoring; NCP: *Salmonella* national control plans; R: at retail; V: voluntary monitoring. CP: carbapenemase-producers.

(a): Domestically produced.

(b): Including imported and domestically produced products.

(c): For each animal species, and for each MS, the target is the more prevalent *Campylobacter* species; all isolates of the other *Campylobacter* species that are identified, considering the specification of one isolate per species and epidemiological unit, are to be included. However, for fattening pigs, only *C. coli* is considered.

(d): Mandatory on a 4-year rotational basis, voluntary intervening years.

Таблица 7: Комбинации от популации / месо от продуктивни животни, които се тестват за антимикробна чувствителност в рамките на хармонизирания мониторинг на АМР

8. Препоръки за изготвяне на извадка за мониторинг на АМР

8.1. Общи съображения за представителна и случайна извадка

Изолатите, които са тествани за антимикробна чувствителност, следва да произтичат от програмите за мониторинг на АМР, така че определянето на бактериалното разпространение в изследваните популации от животни, дали *Salmonella*, *Campylobacter* или индикаторни бактерии, както и степента на резистентност, да могат да бъдат обезпечени с достатъчен брой проби. Бактериалните изолати, изследвани за антимикробна чувствителност, трябва да произхождат от - здрави животни, от които са взети проби на случаен принцип от избрани епидемиологични единици, било то птичи стада или случайно избрани партиди за клане в кланиците.

Трябва да се наблегне на рандомизираните стратегии за вземане на проби, които да позволяват правилен анализ на статистическите данни и да намалят ефекта от манипулиране на резултатите. Вземане на проби на случаен принцип от всяка таргетна популация животни осигурява представителна извадка на цялата популация и отразява ако има промени в управленските и хигиенни практики в стопанствата и в различните региони на дадена страна. Приблизително равномерното разпределение на събираните проби през годината дава възможност за проследяване на сезоността на поява на бактериалните инфекции.

Ако се вземат проби от заразени животни, тези резултати трябва да се докладват отделно.

8.2. Изчисляване на размера на извадката

Размерът на извадката представлява броя на изолатите, които трябва да бъдат тествани за чувствителност във всеки период на пробовземане, трябва да позволява, с предварително определена точност, да се изчисли пропорцията на резистентност към определено антимикробно средство за дадена комбинация от бактериални видове / популации животни / категории храни или да се открият някакви промени във времето. Подходът и резултатите от анализите и изчисленията на размера на извадката в техническите спецификации на ЕОБХ (EFSA, 2007, 2008, 2012a) са прегледани и

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056

рeвизирани с помощта на допълнителни набори от статистически сценарии (Приложение Н от техническия доклад на ЕОБХ и ЕСДС).

Предлага се минималният целеви брой микроорганизми от всеки бактериален вид, които трябва бъдат изследвани да е 170 от всеки вид продуктивни животни.

В контекста на изпълнението на плановете за действие на ЕС и ДЧ срещу заплахата от АМР, се очаква **по-нататъшно намаляване на употребата на антимикробни средства при продуктивни животни, във връзка с прилагането на допълнителни мерки за смекчаване на въздействието през следващите години, което ще доведе до намаляване на селективния натиск върху появата и / или липсата на АМР.** За да се подsigури достатъчна статистическа достоверност, така че дори и лекото намаление на АМР може да бъде открито, се препоръчва размерът на пробите, които се предвиждат да се взимат по мониторингова програма да се преразглежда от всяка ДЧ отделно.

Sampling concept	Prospective sampling of samples		Retrospective sampling of isolates
	Sampling of caecal samples at slaughter	Sampling of meat samples at retail	Sampling of <i>Salmonella</i> from primary production of poultry ^(d)
Target populations	Domestically produced – Broilers ^(a) – Fattening Turkeys ^(a) – Fattening Pigs ^(a) – Bovines < 1 year ^(a)	– Broiler meat – Turkey meat – Pig meat – Bovine meat	– Broiler flocks – Laying hen flocks – Fattening turkey flocks
Strata (1st stage)	Slaughterhouses ^(b)	NUTS-3 area ^(c)	Laboratories involved in NCPs
Proportional allocation	Sample size proportionate to the slaughterhouse throughput	Sample size proportionate to the NUTS-3 area population	Isolate sample size proportionate to the size of the relevant ^(e) isolate collection in the laboratory ^(f)
2nd stage	Batches/lots of carcasses originating from the sample flock/herd	Retailers	NA
Epidemiological Unit	Flock of poultry or slaughter batches of pigs/bovines	One lot of meat	Flock of poultry
Sample/Isolate	1 sample of caecal content per epidemiological unit ^(g)	1 meat sample per lot	1 isolate per flock of poultry

Схематично представяне на стратифицираният подход при вземане на проби за изследване на АМР от различни видове продуктивни животни

10. Препоръки относно методологията за тестване на панели антимикробни средства и чувствителност на бактериалните изолати

10.2. Панел от антимикробни средства за тестване на чувствителност на *Salmonella* и *E. coli*

Панел за рутинен мониторинг:

Предлага се да се допълни хармонизираният панел от антимикробни средства с амикацин. Амикацин е един от най-често използваните аминокликозиди в болници за лечение на инфекции, причинени от Грам-отрицателни бактерии в редица ДЧ.

Antimicrobial	Bacterial species	ECOFF ^(a) R: > (mg/L)	CBP ^(a) R: > (mg/L)	Current concentration range (mg/L) (No. of wells)	Suggested new concentration range (mg/L) (No. of wells)
Ampicillin	<i>Salmonella</i>	8	8	1–64 (7)	1–32 (6)
	<i>E. coli</i>	8	8		
Cefotaxime	<i>Salmonella</i>	0.5	2	0.25–4 (5)	0.25–4 (5)
	<i>E. coli</i>	0.25	2		
Ceftazidime	<i>Salmonella</i>	2	4	0.25–8 (6)	0.25–8 (6)
	<i>E. coli</i>	0.5	4		
Meropenem	<i>Salmonella</i>	0.125	8	0.03–16 (10)	0.03–16 (10)
	<i>E. coli</i>	0.125	8		
Nalidixic acid	<i>Salmonella</i>	16	NA	4–128 (6)	4–64 (5)
	<i>E. coli</i>	16	NA		
Ciprofloxacin	<i>Salmonella</i>	0.06	0.06	0.015–8 (10)	0.015–8 (10)
	<i>E. coli</i>	0.06	0.5		
Tetracycline	<i>Salmonella</i>	8	NA	2–64 (6)	2–32 (5)
	<i>E. coli</i>	8	NA		
Colistin	<i>Salmonella</i>	2 (EFSA)	2	1–16 (5)	1–16 (5)
	<i>E. coli</i>	2	2		
Gentamicin	<i>Salmonella</i>	2	4	0.5–32 (7)	0.5–16 (6)
	<i>E. coli</i>	2	4		
Trimethoprim	<i>Salmonella</i>	2	4	0.25–32 (8)	0.25–16 (7)
	<i>E. coli</i>	2	4		
Sulfamethoxazole	<i>Salmonella</i>	256 (EFSA)	NA	8–1024 (8)	8–512 (7)
	<i>E. coli</i>	64	NA		
Chloramphenicol	<i>Salmonella</i>	16	8	8–128 (5)	8–64 (4)
	<i>E. coli</i>	16	8		
Azithromycin	<i>Salmonella</i>	16 (EFSA)	NA	2–64 (6)	2–64 (6)
	<i>E. coli</i>	16 (EFSA)	NA		
Tigecycline	<i>Salmonella</i>	1 (EFSA)	NA	0.25–8 (6)	0.25–8 (6)
	<i>E. coli</i>	1 (EFSA)	2		
Amikacin	<i>Salmonella</i>	NA	16	–	4–256 (7)
	<i>E. coli</i>	8	16	–	

NA: not available. ECOFF: epidemiological cut-off value; CBP: clinical breakpoint;

(a): EUCAST ECOFFs and CBPs as available on the EUCAST website, last accessed on 6.3.2019.

Таблица 9: Панел от антимикробни средства, ECOFF, CBPs и диапазони на концентрация (в mg / L) за *Salmonella* и *E. coli* (първи панел)

Панел за откриване и специфичен мониторинг на предполагаемите производители на ESBL, AmpC и карбапенемаза

Предлага се вторият панел (Таблица 10) да бъде запазен.

Antimicrobial	<i>Salmonella</i> EUCAST ECOFF ^(a)	<i>E. coli</i> EUCAST ECOFF ^(a)	Concentration range, mg/L (no. of wells)
Cefoxitin	> 8	> 8	0.5–64 (8)
Cefepime	NA ^(b)	> 0.125	0.06–32 (10)
Cefotaxime + clavulanic acid	NA	NA	0.06–64 (11)
Ceftazidime + clavulanic acid	NA	NA	0.125–128 (11)
Meropenem	> 0.125	> 0.125	0.03–16 (10)
Temocillin	NA ^(c)	NA ^(c)	0.5–64 (8)
Imipenem	> 1	> 0.5	0.12–16 (8)
Ertapenem	NA ^(d)	NA ^(d)	0.015–2 (8)
Cefotaxime	> 0.5	> 0.25	0.25–64 (9)
Ceftazidime	> 2	> 0.5	0.25–128 (10)

ECOFFs: epidemiological cut-off values; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (last accessed on 6.3.2019); NA: not available.

(a): EUCAST epidemiological cut-off values available as the Decision 2013/652/EU was drafted (2013). For some antimicrobials, these values have been updated. To allow comparison with the data collected in previous years, the ECOFFs laid down in the legislation have been considered.

(b): For cefepime the cut-off value used in the analysis for *Salmonella* spp. was > 0.125 mg/L.

(c): For temocillin the cut-off value used in the analysis was > 32 mg/L.

(d): For ertapenem, the cut-off value used in the analysis was > 0.06 mg/L.

Таблица 10: Панел от антимикробни средства, EUCAST ECOFF и диапазони на концентрация, използвани за тестване на *Salmonella* spp. и изолати от *E. coli*, резистентни на цефотаксим, цефтазидим или меропенем (втори панел).

10.3. Панел от антимикробни вещества за *C. jejuni* и *C. Coli*:

В Решение за изпълнение 2013/652/ЕС на ЕК са следвани препоръчителните от ЕОБХ концентрации за еритромицин (1–128 mg/L), ципрофлоксацин (0,12–16 mg/L), тетрациклин (0,5–64 mg/L) и гентамицин (0,12–16 mg/L), но не и за стрептомицин (0,25–16 mg/L вместо 1–128 mg/L), като последният се тества доброволно. За разлика от техническите спецификации на ЕОБХ (EFSA, 2012a), Решение за изпълнение 2013/652/ЕС на Комисията включва и изпитване на налидиксинова киселина (1–64 mg/L).

Antimicrobial		ECOFF 2013	CBP 2013	Advised 2012	Decision 2013	ECOFF 2019	CBP 2019	Suggested range, mg/L (no. of wells)
Erythromycin	<i>C. jejuni</i>	4	4	1–128	1–128 (8)	4	4	1–512 (10)
	<i>C. coli</i>	8	8	(8)		8	8	
Ciprofloxacin	<i>C. jejuni</i>	0.5	0.5	0.12–16	0.12–16	0.5	0.5	0.12–32 (9)
	<i>C. coli</i>	0.5	0.5	(8)	(8)	0.5	0.5	
Tetracycline	<i>C. jejuni</i>	1	2	0.5–64	0.5–64	1	1	0.5–64 (8)
	<i>C. coli</i>	2	2	(8)	(8)	2	2	
Streptomycin	<i>C. jejuni</i>	4	NA	1–128	0.25–16	4	4	
	<i>C. coli</i>	4	NA	(8)	(7)	4	4	
Gentamicin	<i>C. jejuni</i>	2	NA	0.12–16	0.12–16	2	2	0.25–16 (7)
	<i>C. coli</i>	2	NA	(8)	(8)	2	2	
Nalidixic acid	<i>C. jejuni</i>	16	NA	–	1–64 (7)	16	16	–
	<i>C. coli</i>	16	NA			16	16	
Chloramphenicol	<i>C. jejuni</i>	–	–	–	–	16	16	2–64 (6)
	<i>C. coli</i>	–	–			16	16	
Penems ^(a)	<i>C. jejuni</i>	–	–	–	–	–	Ertapenem: 1 (CA-SFM 2018) Imipenem: 16 (CLSI) ^(b) Meropenem: 16 (CLSI) ^(b)	Ertapenem: 0.125–4 (6)
	<i>C. coli</i>	–	–	–	–	–	Ertapenem: 1 (CA-SFM 2018) Imipenem: 16 (CLSI) ^(b) Meropenem: 16 (CLSI) ^(b)	–

ECOFF: epidemiological cut-off value; CBP: clinical breakpoint; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

2012: According to EFSA (2012a).

2013: According to Commission Implementing Decision 2013/652/EU.

2019: According to <http://mic.eucast.org/Eucast2> (last accessed on 6.3.2019)

CA-SFM 2018: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM%20V1_0%20FEVRIER%202018.pdf

(a): to be chosen among imipenem, meropenem or ertapenem, according to data available in 2019 (QC ranges for the reference strain *C. jejuni* ATCC 33560, ECOFF values or clinical breakpoints).

(b): CLSI breakpoint of 16 mg/L recommended for imipenem and meropenem for other non *Enterobacteriaceae* by CLSI M100-S26.

Таблица 11: Панел от антимикробни вещества, ECOFF, CBP и диапазони на концентрация (в mg / L) за *Campylobacter jejuni* и *C. Coli*

10.4. Панел от антимикробни средства за MRSA:

Техническите спецификации на ЕОБХ за 2012 г. (EFSA, 2012b) описват препоръчителен и незадължителен набор от антимикробни средства за включване в панела за тестване на чувствителност и предложени диапазони на концентрация, които трябва да бъдат прилагани. Настоящите EUCAST CBPs и ECOFFs за *S. aureus* са преразгледани и има някои промени. Предлаганият панел от антимикробни средства е в съответствие с предишните технически спецификации на ЕОБХ (EFSA, 2012b). Предложеният панел включва две антимикробни средства, използвани в хуманната медицина, които могат да се използват в краен случай при лечение на MRSA (линезолид и ванкомицин).

Antimicrobial	ECOFF ^(f) 2012	CBP ^(f) 2012	Advised 2012	Decision 2013	ECOFF 2019	CBP 2019	Suggested range, mg/L	Currently available plate format
Cefoxitin	> 4	> 4	> 4	– ^(a)	> 4	> 4 ^(b)	0.5–16	0.5–16
Chloramphenicol	> 16	> 8	> 16	–	> 16	> 8	4–64	4–64
Ciprofloxacin	> 1	> 1	> 1	–	> 1	> 1	0.25–8	0.25–8
Clindamycin	> 0.25	> 0.5	> 0.25	–	> 0.25	> 0.5	0.12–4	0.12–4
Erythromycin	> 1	> 2	> 1	–	> 1	> 2	0.25–8	0.25–8
Gentamicin	> 2	–	> 2	–	> 4	> 1	0.5–16	1–16
Linezolid	> 4	> 4	> 4	–	> 4	> 4	1–8	1–8
Mupirocin	> 1	> 256	> 1	–	> 1	NA	0.5–2256	0.5–2256
Quinupristin/ Dalfopristin	> 1	> 2	> 1	–	> 1	> 2	0.5–4	0.5–4
Sulfamethoxazole	> 128	> 1024 ^(c)	> 128	–	> 128	NA	64–512	64–512
Tetracycline	> 1	> 2	> 1	–	> 1	> 2	0.5–16	0.5–16
Tiamulin	> 2	–	> 2	–	> 2	NA	0.5–4	0.5–4
Trimethoprim	> 2	> 4	> 2	–	> 2	> 4	1–16	2–32
Trimethoprim/ sulfamethoxazole ^(d)	> 0.5	> 4	> 0.5	–	> 0.5	> 4	– ^(e)	– ^(e)
Vancomycin	> 2	> 2	> 2	–	> 2	> 2	1–8	1–16

NA: not available; ECOFF: epidemiological cut-off value; CBP: clinical breakpoint; MIC: minimum inhibitory concentration.

(a): Not included as combination.

(b): Not given as a clinical breakpoint by EUCAST, but rather stated that *S. aureus* with cefoxitin MIC values > 4 are methicillin resistant.

(c): Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

(d): Breakpoint expressed as trimethoprim concentration; trimethoprim:sulfamethoxazole in the ratio 1:19.

(e): Not included.

(f): EUCAST ECOFFs and CBPs last accessed on 6.3.2019.

Таблица 13: Основен панел от антимикробни средства, ECOFF, CBP и диапазони на концентрация (в mg / L) за *S. aureus*

Някои от незадължителните допълнителни антимикробни средства, ECOFF, CBP и диапазони на концентрация (в mg / L) за *S. Aureus* са представени в **Таблица 14:**

Antimicrobial	ECOFF ^(b) 2012	CBP ^(b) 2012	Advised 2012	Decision 2013	ECOFF 2019	CBP 2019	Suggested ranges - mg/L	Currently available plate format
Ceftobiprole	NA	NA	None	– ^(a)	>1	>2		
Kanamycin	> 8	–	> 8	–	> 8	NA	4–32	4–64
Tigecycline	> 0.5	> 0.5	> 0.5	–	NA	> 0.5		
Fusidic acid	> 0.5	> 1	> 0.5	–	> 0.5	> 1	0.25–4	0.5–4
Daptomycin	> 1	> 1	> 1	–	> 1	> 1		
Rifampicin	NS	NS	NS	–	> 0.032	> 0.5 ^(a)	0.016–0.5	0.016–0.5
Penicillin	NS	NS	NS	–	> 0.125	> 0.125	0.06–1	0.12–2
Streptomycin	NS	NS	NS	–	> 16	NA	4–32	4–32

NA: Not available; NS: not specified; ECOFF: epidemiological cut-off value; CBP: clinical breakpoint.

(a): Not included.

(b): EUCAST ECOFFs and CBPs last accessed on 6.3.2019.

10.5. Панел за антимикробна резистентност за *E. faecalis* и *E. Faecium*:

За да се осигури непрекъснатост на данните за мониторинг, се предлага антимикробните средства, изброени в действащото законодателство, да останат непроменени в бъдещите изисквания за тестване. ECOFFs и CBPs са актуализирани в съответствие с препоръките на EUCAST.

Antimicrobial	Species	ECOFF 2012 ^(a)	CBP 2012 ^(a)	Advised 2012 ^(b)	Decision 2013 ^(b)	ECOFF 2019 ^(c)	CBP 2019 ^(c)	Advised 2019 ^(b)
Streptomycin	<i>E. faecalis</i>	> 512	NA	16–2048 (8)	–	> 512	NA	–
	<i>E. faecium</i>	> 128	NA			> 128	NA	
Gentamicin	<i>E. faecalis</i>	> 32	NA	8–1024 (8)	8–1024 (8)	> 32	NA	8–1024 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 32	NA			> 32	NA	
Chloramphenicol	<i>E. faecalis</i>	> 32	NA	4–128 (6)	4–128 (6)	> 32	NA	4–128 (6)
	<i>E. faecium</i>	> 32	NA			> 32	NA	
Ampicillin	<i>E. faecalis</i>	> 4	> 8	0.5–64 (8)	0.5–64 (8)	> 4	> 8	0.5–64 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 4	> 8			> 4	> 8	
Vancomycin	<i>E. faecalis</i>	> 4	> 4	1–128 (8)	1–128 (8)	> 4	> 4	1–128 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 4	> 4			> 4	> 4	
Teicoplanin	<i>E. faecalis</i>	> 2	> 2	0.5–64 (8)	0.5–64 (8)	> 2	> 2	0.5–64 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 2	> 2			> 2	> 2	
Erythromycin	<i>E. faecalis</i>	> 4	NA	1–128 (8)	1–128 (8)	> 4	NA	1–128 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 4	NA			> 4	NA	
Q/D	<i>E. faecalis</i>	> 16	NA	0.5–64 (8)	0.5–64 (8)	NA	NA	0.5–64 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 1	> 4			NA	> 4	
Tetracycline	<i>E. faecalis</i>	> 4	NA	1–128 (8)	1–128 (8)	> 4	NA	1–128 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 4	NA			> 4	NA	
Tigecycline	<i>E. faecalis</i>	> 0.25	> 0.5	0.03–4 (8)	0.03–4 (8)	> 0.5	> 0.25	0.03–4 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 0.25	> 0.5			> 0.25	> 0.25	
Linezolid	<i>E. faecalis</i>	> 4	> 4	0.5–64 (8)	0.5–64 (8)	> 4	> 4	0.5–64 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 4	> 4			> 4	> 4	
Daptomycin	<i>E. faecalis</i>	> 4	NA	0.25–32 (8)	0.25–32 (8)	> 4	NA	0.25–32 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 4	NA			> 8	NA	
Ciprofloxacin	<i>E. faecalis</i>	> 4	NA	–	0.12–16 (8)	> 4	NA	0.12–16 (8)
	<i>E. faecium</i>	> 4	NA			> 4	NA	

NA: not available; Q/D: Quinupristin/dalfopristin; ECOFF: epidemiological cut-off value; CBP: clinical breakpoint.

(a): EUCAST values (mg/L).

(b): Range of concentrations (mg/L) and no of wells in brackets.

(c): EUCAST values (mg/L). March 2019.

Таблица 15: Предложен панел от антимикробни вещества, EUCAST ECOFFs и CBPs и диапазони на концентрация, които трябва да бъдат тествани в *E. faecalis* и *E. Faecium*

Повече за стратифицираният подход при вземане на проби за изследване на АМР в целеви патогенни видове бактерии от популациите продуктивни животни, храни и околна среда, както и описание с панелите антимикробни средства, включени в мониторинга може да бъде достъпена в техническия доклад на ЕОБХ и ECDC точка 8.3. – 10.5 - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5709>.

11. Генетична характеристика и допълнителни молекулярни анализи на бактериалните щамове

11.1. Допълване на фенотипния мониторинг на АМР

11.1.1. Текущо положение

Поради ползите, които се отчитат от метода WGS и многобройните данни, които може да бъдат генерирани при употребата му в рутинната диагностика по изпълнение на мониторинговата програма за АМР, все повече се увеличава броят на лабораториите в различни сектори (обществено здраве, безопасност на храните, ветеринарна медицина), които вече използват WGS методите за анализ на микроорганизми за различни цели (наблюдение, проучване за огнища на инфекции, хранителни взривове и др.) през последните години в ЕС. Това развитие има различен темп между различните ДЧ на ЕС/или страните извън ЕС, както е видно от наскоро проведеното проучване на ЕК/ЕОБХ относно използването на WGS методи при изследване на основните патогенни микроорганизми, пренасяни по хранителната верига, циркулиращи сред продуктивните животни, във фуражите и в околната среда в страните от ЕС/страните извън ЕС (EFSA, 2018). По статистически данни, до края от 2016 г., всички референтни лаборатории на Европейския съюз (EURLs) (7, 100%), почти половината от НРЛ (31/71, 44%) и само няколко официални лаборатории (ОЛ) (5/76, 7%) докладват проведен WGS на животински изолати, изолати от храни или фураж. **Включените лаборатории в доклада от проучването, изпълняващи WGS, обхваща 17 от 30-те страни (27 ДЧ, Исландия, Норвегия и Швейцария) (EFSA, 2018).**

Въпреки тези обнадеждаващи резултати, поради редица практически причини, по-специално: ограничената хармонизация на съществуващите методологии, поради липса или осигурен достъп до платформи за WGS на НРЛ, трудността на софтуерните продукти за биоинформатични анализи, поради необходимост от куриране на геномните библиотеки на гени, отговорни за АМР или геномни библиотеки на цели бактериални геноми и липса на подготвени кадри или слаба подготовка по биоинформатичен анализ за обработка на суровите секвенции, както и фактора - по финансови причини, **се налага постепенния подход на преминаване от фенотипни методики, включващи култивиране върху селективни среди на патогенните микроорганизми, към WGS и това би било реалистично постижимо да се случи във втората част на периода на валидност на решението за изпълнение на ЕК, *a priori* около 2025–2026.** Пълната подмяна на хармонизираното фенотипно наблюдение на АМР при продуктивни животни и в храни с напълно приложен WGS преждевременно преди 2021 г. е нереалистично.

Съществуват и потенциални критични точки по отношение на публичната достъпност на генерираните данни от проведения WGS и изследването на АМР в патогенните бактерии, изолати от храни, продуктивни животни и околна среда. Докладването на данните от WGS в затворена платформа или отчитането на частични данни, като гените, отговорни за АМР, ще облекчат във времето бъдещото доразвиване на платформи за съхранение на данните с нива на достъп и достъп от публичното пространство.

Понастоящем **генотипното определяне на придобитите гени, отговорни за АМР се извършва чрез WGS, без да бъде потвърждавана клиничната значимост на гените.**

Получените данни не са пряко сравними с фенотипните данни, получени чрез конвенционалните методи.

Ключовото изискване за наблюдение на АМР в хуманната медицина е необходимостта да се гарантира това, бактериите, причиняващи инфекции, да са напълно лечими с определени антибиотици. Следователно е много вероятно следенето на чувствителността към антимикробни средства на патогени в храни да разчита все още основно на фенотипните конвенционални методи.

ECDC наскоро започна да организира **тестове за пригодност** в тази област, което **включва и експертиза и проучване на по-нататъшните възможности на *in silico* прогнозиране на резистентност.**

Отчетените данни по мониторингът на АМР, извършен съгласно решение за изпълнение 2013/652/ЕС на ЕК в обобщения доклад на ЕС за АМР, се използват и по редица други направления, например, за да се извлекат обобщени показатели за АМР (**ECDC, панел на EFSA BIOHAZ и CVMP, 2017**) и за изследване на възможните взаимовръзки между антимикробната резистентност и приемът на антимикробни средства (ECDC, EFSA и ЕМА, 2017). Необходимостта следователно за сравнимост на резултатите в ЕС е важно изискване за хармонизирания АМР мониторинг, така че съпоставими данни да могат да бъдат използвани и в допълнителни доклади и проучвания.

Отчитайки бъдещата преходна ситуация, при която данни от проведен WGS се предоставят от някои ДЧ, а фенотипни данни - от всички други ДЧ, въпросите за сравнимост на генотипния и фенотипния резултат ще са всеки път на дневен ред не само относно антимикробното действие, но също и по отношение на сравнимостта на данните. Оптималното решение за преодоляване на проблема със съпоставимостта на генотипните и фенотипните резултатит би могло да бъде всички ДЧ да преминат от фенотипно към генотипно мониториране в бъдеще.

В случай на специфично наблюдение за ESBL/AmpC/карбапенемаза произвеждащи *E. coli*, **приоритет е откриване и секвениране на гените, кодиращи ESBL/AmpC беталактамази и карбапенемази.** Специфичният мониторинг позволява на ДЧ да преминат от конвенционални методи за идентифициране на даден патоген към геномно типизиране и боинформатичен анализ в мониторинга на АМР в периода между 2021 и 2026 г. **До 2025 г. се предлага всички ДЧ да са ориентирани към внедряване като основен метод на WGS в мониторинга на бактериалните патогени и по-специално - ESBL/AmpC/карбапенемаза-продуциращата *E. coli* и пълният геномен секвентен анализ да бъде задължителен в рутинната диагностика.**

Данните от MLST осигуряват друго предимство при типизиране на *E. coli* като осигурява идентификация на гени, кодиращи бета-лактамази / карбапенемази.

11.1.2. Предложение за подход за интегриране на WGS

Като се имат предвид предимствата, присъщи на технологията WGS, но също и неговите настоящи ограничения като неподготвеността на ДЧ към настоящият момент, се предлага да се следва **постепенен подход към интегриране на WGS в рамките на хармонизирания мониторинг на АМР.** Процесът на интеграция може да започне като WGS методът да служи като допълнителен на конвенционалните хармонизирани методики в ранната фаза на периода 2021–2026 г. и впоследствие да се планира евентуалното заместване напълно със системно използване на WGS. Следователно периодът 2021–2026 г. следва да се разглежда като преходен период за въвеждането на WGS технологията, за да могат ДЧ да придобият опит и да успеят да въведат WGS технологията (**Таблица 16**).

Year	WGS applied to	MSs WGS Confirmatory testing	Indicator <i>E. coli</i> ^(a)	<i>Salmonella</i>	<i>Campylobacter</i>
	Specific monitoring of ESBL/AmpC/carbapenemase-producing <i>E. coli</i>				
2021	Voluntary	Voluntary	NA (Phenotypic)	Phenotypic	Phenotypic
2022	Voluntary	Voluntary	NA (Phenotypic)	NA (Phenotypic)	NA (Phenotypic)
2023	Voluntary	Voluntary	NA (Phenotypic)	NA (Phenotypic)	NA (Phenotypic)
2024	Voluntary	Voluntary	NA (Phenotypic)	NA (Phenotypic)	NA (Phenotypic)
2025	Mandatory	Voluntary	NA (Phenotypic)	NA (Phenotypic)	NA (Phenotypic)
2026	Mandatory	Voluntary	TBD	TBD	TBD

TBD: to be determined based on progress achieved; NA: not applicable; WGS: whole genome sequencing.

(a): In the case of commensal *E. coli* and *Salmonella* that are resistant to cefotaxime or ceftazidime further characterisation may be performed by WGS (as under the specific monitoring) on a voluntary basis to 2024, and then on a mandatory basis.

Таблица 16: Подход за интегриране на WGS от ДЧ в рамките на хармонизирания мониторинг на АМР през периода 2021–2026 г.

Преминаването към WGS при диагностиката на АМР в индикаторен коменсал *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. и ентерококи трябва оптимално да се проведе по координиран начин за всички ДЧ и когато е необходимо във времето. Налице са вече разработки, които обезпечават сравнимостта на историческите (фенотипни) и генотипни резултати.

На практика преходният период може да бъде разглеждан като стъпка от формализирането на доброволното докладване на данни към EURL/EFSA към потвърдително изпитване. Понастоящем, потвърдителните тестове се извършват от EURL-AR с подкрепата ДЧ, които доброволно предоставят съответните секвенирани бактериални геноми. Използването на WGS и инструментите за биоинформатичен анализ в рамките на потвърдителните тестове на EURL/EFSA вече са доказали своите плюсове при допълването на вече генерираните фенотипни данни.

WGS на *MRSA*, животински изолати или изолати от месо, може да се извърши като алтернатива на фенотипното тестване през целия период на валидност на предстоящото решение за прилагане.

11.2. Хармонизиран протокол и критерии за качество

Използвайки WGS, **разнообразни биоинформатични инструменти за анализ, платформи за секвениране, софтуерни продукти за биостатистика и различни протоколи за секвентен анализ са на разположение** за откриване и са в помощ за охарактеризиране на АМР и бактериалния геном.

Различни стратегии могат да бъдат използвани за извършване на генотипно определяне на АМР гени и за прогнозиране на АМР профили, като k-mer подходи, сравнения на последователностите на суровите данни на ДНК секвенциите или на сглобената ДНК верига за справка в бази данни; и те могат да варират между различните съществуващи инструменти. **Недостатъчната хармонизация на процесите на WGS могат да доведат до противоречиви/несъвместими резултати/данни.** Параметрите за контрол на качеството е необходимо да се приложат за подобряване на надеждността и съпоставимостта на резултатите подобно на използването на референтни щамове за качествен контрол при фенотипните тестове за чувствителност AST. Късите прочити посредством WGS затруднява обработването на директните повтори и плазмидния анализ и може да бъде подвеждаща при изследване на плазмидно свързани гени, отговорни за АМР. **Желателно е да се постигат по-дълги прочити от генома с цел по-добра съпоставимост и сравнимост на секвенираните геномни последователности.** Съществена част от внедряването на техниките на пълния геномен секвентен анализ е

постигане на подходящо ниво на обезпеченост от към техника и подготвеност от гледна точка на компетентност на специалистите, използващи технологията.

Освен това съществуват различни референтни бази данни за сравняване на тестовите секвенции с референтни такива за гени, кодиращи АМР. **Тези бази данни е желателно постоянно да бъдат обновявани поради постоянно възникващи нови гени, кодиращи АМР** или други детерминанти, отговарящи за резистентността към АМС на патогенните бактерии. Използването на непълна или неправилно курираната база данни може да доведе до фалшиви отрицателни резултати, ако не се открие наличен АМР ген (и) фалшиви положителни резултати, ако записите в базата данни са погрешни.

Използването на различни бази данни / биоинформатични софтуерни инструменти и номенклатура може да попречи на сравнимостта на получените секвенции посредством WGS. Както са разработени няколко изчерпателни бази данни за хромозомни мутации и гени, кодиращи АМР, трябва да бъде разработена и хармонизирана база данни за генни секвенции, резултати от WGS, кодиращи АМР. Също, трябва да бъдат установени ясни критерии за определяне на даден ген като „нов“ (т.е. % идентичност с определени вече съществуващи гени). Предложеният хармонизиран мониторинг на АМР на базата на WGS следователно изисква уеднаквяване на основните етапи от методиката на пълен геномен секвентен анализ – първоначално обработване на пробите (ДНК екстракция, подготовка на геномна библиотека, амплификация, секвениране на генома и др.), последвани от биоинформатичен анализ, визуализация и интерпретация на резултатите.

11.3. Докладване на детерминанти/гени за АМР на ЕОБХ

Предполага се, че идентифицираните АМР гени (както са интерпретирани от ДЧ) впоследствие се докладват на ЕОБХ. Заедно със събирането на данни за фенотипна антимикуробна чувствителност, ЕОБХ ще събира данни и за секвенции на гени, отговорни за АМР от ДЧ в съответствие с **добре дефиниран АМР генен каталог, който трябва да бъде установен и поддържан от EURL-AR в сътрудничество с ЕОБХ.** Данните изискват знания и критичен преглед на представените резултати; да се предвиди стъпка за валидиране на представените резултати от ЕОБХ и / или EURL-AR. Настоящият модел на система за докладване на данни на ЕОБХ позволява предоставянето на данни относно гените, кодиращи ESBL-/AmpC-/карбапенемази от ДЧ (виж **Фигура 2**). Списъкът на настоящите генни данни са курирани и актуализирани от EURL-AR през 2018 г. Включването на новооткрити гени за АМР и новосъздадени антимикуробни средства ще **наложи непрекъснато актуализиране на каталозите с данни с помощта на EURL-AR.**

И накрая, предлага се данните от проведения WGS анализ на АМР да бъдат представени в обобщения доклад на ЕС.

Съпоставимостта с резултатите от данните за предходни години е проблем, който ще трябва да бъде разгледан и да се изследват всички различия; за някои антимикуробни средства (аминогликозидите, например), голям брой различни резистентни гени могат да проявят подобни фенотипове на резистентност и съпоставимостта между всички резултати може да не е толкова лесно постижима.

Предложение: EURL-AR ще продължи да полага усилия за организиране на обучение по екстракция на ДНК, подготовка на геномни библиотеки и секвентен анализ. Освен това EURL-AR ще препоръча хармонизирани стандартни оперативни процедури, протоколи и критерии за качество, които трябва да бъдат разработени през 2019–2020 г., в сътрудничество с ЕОБХ.

Предлага се също, с въвеждането на WGS, да се разработят от EURL-AR и генетични тестове за оценка на качеството на секвенираните геноми, подадени от НРЛи.

11.4. Възможни са по-нататъшни развития в близко бъдеще

WGS се счита за мощен инструмент за епидемиологично наблюдение на AMP по хранителната верига. В допълнение към AST, WGS може да се използва и за установяване на източника на инфекцията, изследване на хранителните взривове и зоонозните огнища, изследване на вирулентност, което го прави **многофункционален инструмент и увеличава рентабилността му**.

Последните данни демонстрират висока съвпадаемост между резултатите от WGS генотипизирането на щамовете и фенотипните тестове за антимикробна чувствителност. Съвпадаемостта на резултатите зависи от бактериалните щамове, панелите антимикробни средства и начинът на събиране на данни. **Основните разминавания в някои от проучванията засягат комбинациите *Salmonella* spp./стрептомицин (Neuert et al., 2018), *Salmonella* spp./*E.coli*/спектиномицин (Zankari et al., 2013) и *E. coli* /b-lactam (DTU, IZSLT, BfR, NIPH, NVRI, PHE, APHA и IZSV, 2018). Откриват се хромозомни точкови мутации, които влияят върху AMP.**

Очаква се да се наблюдава бърз технически напредък, който ще настъпи преди 2026 г. С бурните темпове на технологичния напредък се смята, че в бъдеще резултатите от WGS ще позволяват прогнозиране на фенотипите на AMP и дори стойностите на MIC. Въпреки че програмите за надзор, базирани на WGS, все по-често се прилагат по целия свят, **само системата за мониторинг на AMP, базирана на NARMS, изглежда хармонизирана**. WGS, съчетан със софтуерни инструменти за биоинформатичен анализ на AMP, трябва да се основава на общи критерии за оценка на качеството на резултатите и хармонизирани процедури, така че да обезпечава събирането на данни за ЕС, което да доведе до хармонизирана система за мониторинг.

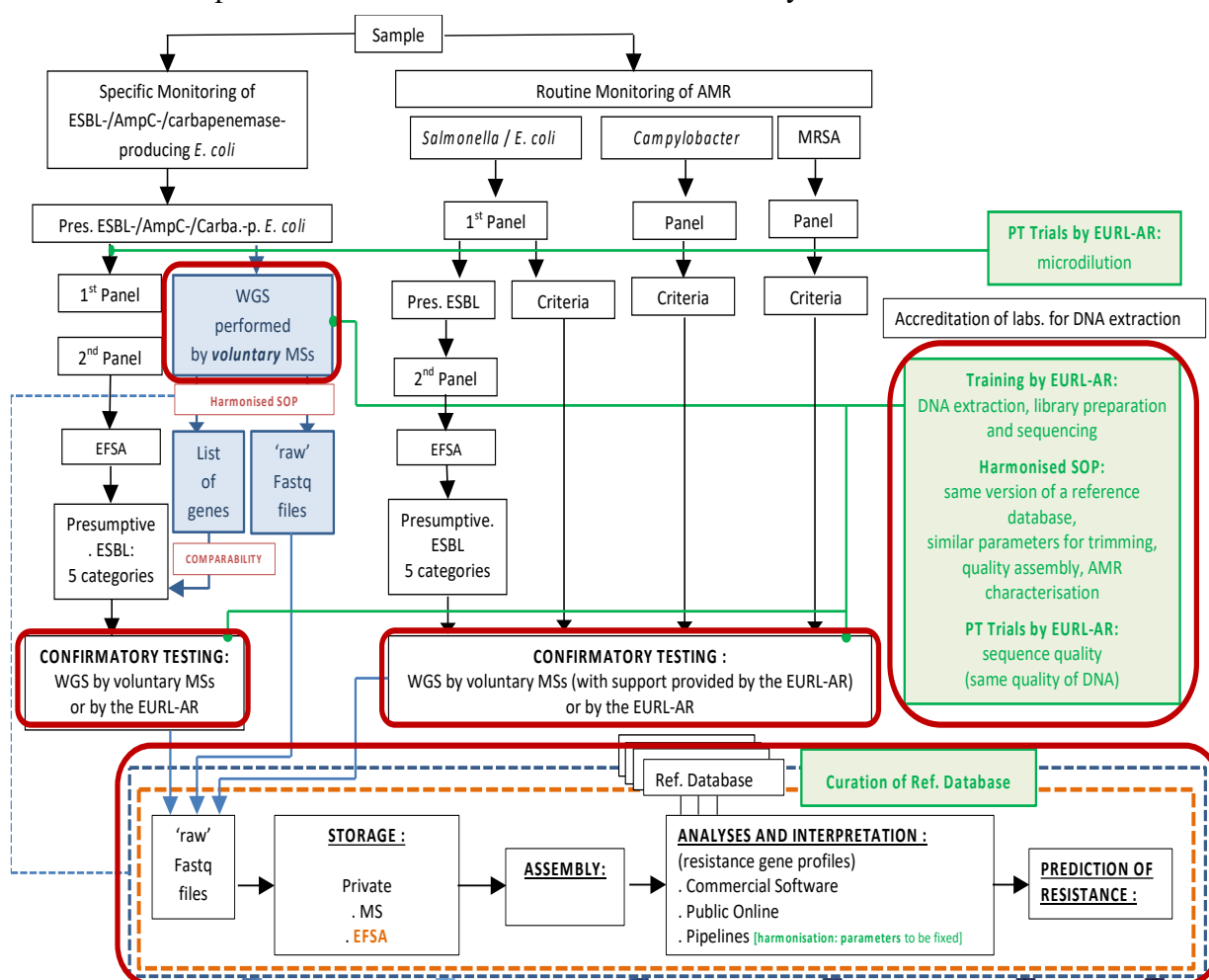
Наблюдението, базирано на WGS, може да осигури резултати за голяма част от антимикробните средства, които са задоволителни и са съответстващи на фенотипните тестове за чувствителност към антимикробни средства. Необходимо е да се разработи софтуерен продукт, който е свързан със събирането на данни за резултатите от WGS.

Относно генерираните данни от WGS трябва да бъде приета еквивалентна мярка или подходящо изменена мярка за сравнимост между геномните данни и данните от фенотипните тестове. Съществуват редица подобни примери, при които **трябва да се разработи подход за използване на данните от WGS в еквивалентен или подобрен сравним начин с фенотипните данни**. Подходите за докладване на тези данни също се нуждаят от развитие, както и процедури за обследване на епидемии, определяне на източника на епидемията и изследване на епидемичните фактори по отношение на AMP.

Развитието може да се окаже по-бързо от очакваното и навременното определяне на приоритети за развитие вероятно ще доведе до бързо и постепенно подобряване на данните, получени от програмите за мониторинг. Вероятно е също така да има синергия с други подобни инициативи, като базата данни, която се разработва от ECDC и ЕОБХ за анализиране на хранителните взривове и патогенните причинители в областта на AMP.

ECDC и ЕОБХ са обсъдили съвместно мандата на ЕК относно „Искане за техническа помощ за събиране и анализиране на данни от пълния геномен секвентетн анализ (WGS) в съвместната ECDC-ЕОБХ база данни за молекулярно типизиране“ (EFSA, 2019). След като бъде предоставена съвместната база данни на ЕОБХ-ECDC за докладване на данни от WGS, геномните последователности от WGS могат да бъдат публикувани от ДЧ на доброволна основа (ако вече не са публично достъпни), така че съвместният анализ между секторите (човешки, животински и храни) да може да се извърши (вж. фигура 2). **Тази система се предвижда да предложи дигитална среда за съхранение на геномни последователности и да даде възможност за публикуване/изтегляне на геномни последователности от публично достъпни web базирани платформи или сървъри или облачно базирани хранилища и не на последно**

място да се осигури хармонизиран подход на WGS анализа. Може все още да се запази до определена степен фенотипната методика за наблюдение на чувствителността към АМС.



Фигура 2: Схематично представен процес на използване на WGS от ДЧ на доброволна основа за специфичното наблюдение на ESBL-/AmpC-/карбапенемаза произвеждащи *E. coli* в рамките на хармонизирания подход при мониторинга на AMP, с възможност за докладване на гени, отговорни за AMP (понастоящем) или цели геномни последователности (в бъдеще) към ЕОБХ и необходимите стъпки за верифициране на качеството.

12. Събиране и докладване на данни за молекулярно типизиране/фенотипни данни

ЕОБХ разработи хармонизирана и рационализирана система за докладване на данните за AMP от ДЧ на ЕС и други държави извън ЕС съгласно Директива 2003/99/ЕО и Решение за изпълнение 2013/652/ЕС на ЕК. Системата цели по-специално да гарантира, че събраните данни са релевантни и лесни за анализ на ниво ЕС, като се прилагат редица проверки за валидност на докладваните данни. **Отчитането на AMP данните и предаването на файлове е във формат XML**, чрез платформата за събиране на данни (DCF) на ЕОБХ, придружено от подробни насоки.

ЕОБХ изготвя годишно ръководство за докладване на данни, за да предостави **подробни указания относно начина на попълване и публикуване на данните за AMP**. Ръководството обикновено включва бактериалните щамове, антимикробните средства, видовете животински популации и категориите храни, за които трябва да бъдат докладвани данни. Инструкциите са дадени в схеми за вземане на проби и мониторинг, както и анализ на резултатите в националните доклади.

Ръководството обхваща *Salmonella*, *C. coli*, *C. jejuni*, индикаторният коменсал *E. coli*, индикаторни ентерококи и *MRSA*, включени в текущото събиране на данни. Включени са и специфични насоки за докладване на разпространението, генетичното разнообразие и АМР на *MRSA*, изолати от продуктивни животни и храни. Ръководството включва и специфични насоки за задължителното докладване на данни за *Salmonella* spp. и индикаторен коменсал *E. coli* - произвеждащи *ESBL/AmpC*/карбапенемази, получени при хармонизирувания рутинен мониторинг, и данни за *ESBL-/AmpC-/карбапенем-произвеждащи E. coli* от специфичния мониторинг, както и доброволното докладване на данни за специфичния мониторинг на карбапенемаза произвеждащ *E. coli*.

Допълнителна техническа информация за отчитане на данните за АМР може да бъде намерена и в библиотеките с данни, указанията и ръководните документи за отчитане на данни за зоонози, АМР и хранителни взривове, издавани ежегодно.

13. Преглед на рутинния мониторинг на АМР

Препоръчва се тези технически спецификации да бъдат преразглеждани и редовно актуализирани в светлината на резултатите от първите кампании за мониторинг, технологичното развитие и тенденциите в постоянно развиващия се проблем - АМР.

ЕОБХ ще продължи да използва същата система за събиране на данни от фенотипното тестване на антимикробна чувствителност, като тя ще се използва и при докладване на данните от проведения пълен геномен секвентен анализ на патогенните причинители.

Системата вече позволява събирането и докладването на данни за секвентните последователности на гени, кодиращи *ESBL/AmpC*/карбапенемаза, които могат да бъдат докладвани от ДЧ доброволно след прилагане на специфичния мониторинг и проведен WGS на *ESBL- / AmpC- / карбапенема-продуциращ E. coli*. Геномните секвенции ще трябва да бъдат докладвани в съответствие с добре дефиниран АМР генен каталог и одобрени от EURL-AR и ЕОБХ.

Заклучение:



Тестването на антибиотичната резистентност на патогенните бактерии посредством пълен геномен секвентен анализ отменя все повече традиционните методи на култивиране на микроорганизми, където отчитането се осъществява след минимум 72 часа, съпоставено с WGS, при който резултатът е налице след няколко часа в зависимост от избрания СОП (стандартна оперативна процедура). Тази информация за патогенния микроорганизъм е клинично важна при предприемане на антибиотична терапия или замяната ѝ с алтернативни методи на лечение. Секвенираните геноми на патогенните бактерии могат да бъдат изследвани за наличието/отсъствието на гени, отговорни за антибиотична резистентност, а също така и хромозомни мутации, които допринасят за резистентността към антимикробните средства.

Все пак WGS-базираният подход при установяване на антибиотична резистентност на бактериите не може все още напълно да замени конвенционалните методи поради все още високата цена на изпитването, специфичните изисквания към китове и консумативи за реакциите, постоянно нововъзникващи гени, кодиращи резистентност при бактериите и времеемкостта поради тежестта на софтуерните пакети, визирайки тези на Illumina, но това не пречи поетапно и системно WGS да бъде внедрен като стандартен метод, както ще се случи до 2026 година.

Като пример за постигнат **важен напредък в прилагането на WGS** е откриване на хромозомни точкови мутации, на които се дължи все по-нарастващият процент **резистентност на *Mycobacterium tuberculosis***, установени посредством пълен геномен секвентен анализ (През 2015 г. са докладвани около 480 000 нови случая на мултирезистентни туберкулозни бактерии и още 100 000 случая на резистентни на рифампицилин *M. tuberculosis*). WGS-диагностиката и тестването на чувствителността на *M. tuberculosis in silico* е със 7% по-евтино и с 21 дни по-бързо от традиционното изследване.

Новата генерация секвениране, наименование, звучащо като цитат от филма Стар Трек, е **широкомащабен подход, който увеличава скоростта на реакцията, дава информация в реално време, точността е изключително висока и разходите за изследване все повече и повече намаляват.**

Чрез технологиите за секвениране от следващо поколение (NGS) се произвежда голям обем данни за кратък период от време и следователно е предназначен да осигури на медицинските специалисти и техните пациенти **качествена и своевременно информация и адекватно лечение.**

В днешно време цялостното геномно секвениране се налага с бързи темпове като **сертифициран диагностичен подход в мониторинга и превенцията на заболяванията и при оценката на риска от възникването им.**

В бъдеще:

Необходимо е хармонизиране на стандартните оперативни процедури между НРЛ на национално ниво и между ДЧ и уеднаквяване на методиките спрямо Европейската референтна лаборатория по антимикробна резистентност.

ЕК предлага:

Проектът ENGAGE (<http://www.engage-europe.eu/>) е сътрудничество между осем институции в Европа. Целта е да се стимулира научното сътрудничество, за да се **използва анализът на целия геном (WGS) в областта на безопасността на храните и защитата на общественото здраве.** ENGAGE се фокусира върху някои определени патогени: *Escherichia coli (commensal E. coli)* и различни *Salmonella* spp. серотипове. Секвенирани са общо 3360 генома, 778 *E. coli* и 2 582 *Salmonella* spp. Тези геномни секвенции са съхранени и споделени между партньорите в проекта и ще бъдат предадени в следствие на Европейската банка за геномни последователности. Секвенираните геноми са използвани за да се оцени възможността за замяна на конвенционалното типизиране с WGS за проучване на огнищата на инфекции и хранителните взривове. Посредством тестове за пригодност партньорите в проекта са оценили качеството на методиката и възможността тя да бъде **внедрена в рутинната диагностика на инфекциите.** Изготвени са ръководни документи и инструкции, включващи **налични софтуерни инструменти за**

Building capacity for genomic-based surveillance



EXTERNAL SCIENTIFIC REPORT
 ENGAGE
 APRIL 2014 to SEP 2014
 FINAL REPORT OF ENGAGE - ESTABLISHING NEXT GENERATION SEQUENCING ABILITY FOR GENOMIC ANALYSIS IN EUROPE
 NAME S. HERNANDEZ, SUSANNA KALINICHEVA, HENRIK WILHELM, ANITA K. VON DER WEICHER, ALBERTO RIZZI, EMERENKA KALINICHEVA, CAROLINE LANGE, CAROLINE LANGE, SARAH PEREIRA, LIAM BERRY, TORSTEN BRUNNEN, ANITA K. VON DER WEICHER, HENRIK WILHELM, ANITA K. VON DER WEICHER, DANIEL KRISTOF, MAGALINA ZAROV, KINGA WIECZOREK, KAZEMRA POKORSKI, LIJUNA NEIDREICH, HANNAE BLOMHOFF, SUN FANG, ANITA K. VON DER WEICHER, HENRIK WILHELM, ANITA K. VON DER WEICHER, HENRIK WILHELM, ALI AL-SHOUBI, AND LOUISA COLLIER



In the project period, ENGAGE has shown that it is possible to implement WGS and the use of bioinformatics tools in laboratories without any prior knowledge of WGS, and that other countries can be supported to do this through partnerships. In addition, ENGAGE has showed that some current phenotypic methodologies, e.g. *Salmonella* serotyping, could in the future be replaced by WGS and the use of bioinformatics tools. The ENGAGE project was successful on many levels both in terms of boosting WGS and analysis capacity and capability across Europe but also in demonstrating advantages of having genome data sets from different sources and different countries for validation and benchmarking exercises as well as investigative analyses. To date there has been little

биоинформатичен анализ и стандартни оперативни процедури, които са публикувани онлайн и са обществено достъпни. По време на проекта са провеждани семинари, обучителни курсове и туининг програми с цел улесняване разбирането и прилагането на методиката WGS.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056



Други научни становища и актуална информация от областта на здравето, хуманното отношение и благосъстоянието на животните, антимикробната резистентност, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига: <http://corhv.government.bg/>

Използвана литература:

- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5709> - Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food - European Food Safety Authority (EFSA), Marc Aerts, Antonio Battisti, Rene Hendriksen, Isabelle Kempf, Christopher Teale*, Bernd-Alois Tenhagen, Kees Veldman, Dariusz Wasyl, Beatriz Guerra, Ernesto Liebana, Daniel Thomas-Lopez and Pierre-Alexandre Belœil
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. EFSA Journal 2019;17 (2):5598, 278 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5598> ISSN: 1831-4732 © 2019 European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. EFSA Journal published by John Wiley and Sons Ltd on behalf of European Food Safety Authority.
- ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations 2019–2021 - www.ecdc.europa.eu
- P7_TA(2011)0473 - Public health threat of antimicrobial resistance - European Parliament resolution of 27 October 2011 on the public health threat of antimicrobial resistance
- GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE - World Health Organization, ISBN 978 92 4 150976 3 - <https://www.who.int/>
- Global Antimicrobial Resistance Surveillance System - Manual for Early Implementation
- Antimicrobial Resistance - A MANUAL FOR DEVELOPING NATIONAL ACTION PLANS - Published by the World Health Organization and the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal Health
- Monitoring the use of whole-genome sequencing in infectious disease surveillance in Europe 2015–2017 - <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/monitoring-use-whole-genome-sequencing-infectious-disease-surveillance-europe>

Изготвил:

Красимира Захариева

Главен експерт

Отдел ЗРЖ, дирекция ОРХВ

Център за оценка на риска по хранителната верига

Министерство на земеделието, храните и горите

31.07.2019 г.