



## Секвениране на целия геном за наблюдение на антимикробната резистентност (GLASS)

Антимикробната резистентност (AMP) представлява нарастваща заплаха за общественото здраве и устойчивото развитие. Нарастващото разпространение на AMP е заплаха за общественото здраве в световен мащаб, тъй като нововъзникващите механизми за AMP и мултирезистентни (MDR) патогени излагат на риск ефективността на лечението на микробните инфекции. Държавите членки и СЗО признаха тази заплаха, като единодушно одобриха Глобален план за действие в борбата с AMP на шестдесет и осмата световна здравна асамблея (WHA68.7). AMP е призната и като заплаха за постигането на целите за устойчиво развитие. Изчислено е, че до 2030 г. инфекциите с резистентни бактерии, водещи до повишена заболеваемост, увреждания, преждевременна смърт и намалена работоспособност, ще се превърнат в значителна заплаха за световната икономика, ако не бъдат предприети действия. Освен това инфекциите с AMP при добитъка застрашават устойчивото производство на храни и продоволствената сигурност.

В Глобалния план за действие срещу AMP се подчертава важноста на надзора с цел укрепване на базата от знания и данни с цел информирано вземане на решения, прилагане на стратегиите и наблюдение на ефективността на мерките. Понастоящем GLASS (*Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*) „наблюдава“ инфекциите при хора, дължащи се на няколко приоритетни патогена, с микробиологични данни, получени от фенотипни методи за изследване на AMP.

Секвенирането на целия геном (WGS) осигурява огромно количество информация и възможно най-висока разделителна способност за подтипизиране на патогени. Прилагането на WGS за глобален надзор може да предостави информация за ранната поява и разпространение на AMP и допълнително да послужи за основа на навременното разработване на риск политиката за контрол на AMP. Последователността на данните, произтичащи от наблюдението на AMP, може да предостави ключова информация, която да направлява разработването на инструменти за бърза диагностика за по-добро и по-бързо характеризирание на гените за AMP, като по този начин да допълва фенотипните методи.

WGS е използвана вече успешно в наблюдението на AMP при патогени, като например причинителите на мултирезистентна туберкулоза (ТБ) и резистентен към лекарства ХИВ. WGS се използва в молекулярната биология за получаване на пълна или почти пълна ДНК последователност на тестовия организъм. За

мониторинг на патогени и в помощ на общественото здраве, ДНК последователността на патогенния микроорганизъм може да бъде сравнена с база данни за АМР гени и мутации в добре проучени микробни геноми, за да се направят **изводи за важни фенотипни характеристики на микроорганизма, като АМР и факторите на вирулентност**. Освен това, ако данните за последователността са с достатъчно качество, **сравнението на цели микробни геноми позволява охарактеризирането на предполагаеми пътища за предаване и разпространение както на антимикробно-резистентни клонинги, така и на мобилни генетични елементи на АМР, както и на еволюционната взаимовръзка на новохарактеризираните организми с АМР и огнищата на болести**.

**WGS не замества фенотипните методи за откриване на АМР за общественото здраве или за насочване на клиничното лечение на повечето бактериални инфекции. Данните от WGS могат да се използват за проверка на идентичността на механизмите за АМР в изолати със съответната фенотипна резистентност или с несъответстваща фенотипна резистентност. Той обаче не може да се използва за количествено определяне на нивото на фенотипната АМР, така че не е подходящ за рутинен или прогнозен АСТ и следователно не може да замени напълно фенотипните методи. Той обаче може да допълни фенотипните методи, като добави информация за молекулярните детерминанти и механизмите на АМР и генетичните фактори, които улесняват предаването им в микробните популации.** Понастоящем липсват познания относно механизмите за АМР, как те и щамовете, резистентни към антимикробни средства, се разпространяват и точните, конкретни мерки, които могат да бъдат предприети за ограничаване на АМР. Свързването на **всеобхватни бази данни за генома с епидемиологичните и клиничните метаданни би било безценно за общественото здраве, медицинските изследвания и клиничните грижи.** WGS могат да добавят важна, свързана с политиката информация за глобалния надзор на АМР, включително **по-точно определяне на географското разпределение на гените на резистентността**. Надзорът на АМР също така сигнализира за появата и предаването на АМР организми и циркулацията на резистентни щамове сред животните и между животните и хората (подхода „Едно здраве“).

Документ, изготвен от WHO, разглежда **приложенията на WGS за наблюдение на АМР, включително ползите и ограниченията на настоящите технологии на WGS.** Местни, поднационални, национални и международни казуси са включени като примери за използване на WGS при наблюдението на АМР. Също така се **предоставя информация относно изискванията за създаване и модернизиране на лаборатории, за да се осигури капацитет за WGS и за въвеждане на WGS в системите за надзор на АМР.**

Що се отнася до всяка нова технология, **прилагането на WGS има някои ограничения и поражда практически предизвикателства в различни среди в**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



световен мащаб. Но иновациите и по-нататъшното развитие на методите на WGS ще гарантират, че обхватът на тази нова технология ще разшири приложението си в бъдеще.

**Разходите, свързани с приложението на WGS, намаляват бързо, което може да даде възможност за по-широка употреба на достъпни цени на тази нова технология във всички държави. Настоящият доклад има за цел да подпомогне държавите, които обмислят използването на тези *omics* методи за откриване и надзор на АМР, за да увеличат капацитета си.**

Преглед на литературата, показва, че **повечето от секвенираните патогенни изолати до момента са били предоставени от изследователи в държавите с висок доход.** Технологиите за секвениране и разходите за тях обаче се променят бързо, като предоставят възможност за намаляване на пропуските в знанията и в държавите с ниски и средни доходи и за укрепване на способността на тези молекулярни методи за точно идентифициране на патогените и за използване както на фенотипни, така и на молекулярни методи, като например WGS за наблюдение на АМР с цел подобряване на общественото здраве.

Следва да се **определят международни стандарти за използване на WGS за прогнозиране на АМР при патогени, за да се гарантира, че резултатите от различните лаборатории са съпоставими. Лабораториите следва да могат да използват щамове с гарантирано качество „златен стандарт“ и свои собствени протоколи, биоинформатични алгоритми и софтуер, за да идентифицират видовете бактериални щамове и да определят наличието или отсъствието на придобити гени и геномни мутации, свързани с фенотипната експресия на намалена чувствителност или резистентност с определена точност.** За да бъде възможно това, **публичните бази данни с геномни последователности следва да бъдат по-добре поддържани.** Поради това лабораториите следва да качват данните от WGS в база данни на последователностите само с доклад, потвърждаващ, че отговарят на важни стандарти за осигуряване на качеството (QA). Ще трябва да бъдат договорени подходящи стандарти, за да се гарантира включването на новосъздадени лаборатории за WGS в LMIC. Лабораториите не само следва да отговарят на стандартите за качество, но и отделните последователности следва да бъдат качени в база данни само ако отговарят на стандартите за качество.

WGS не е задължителен метод за избор при всички обстоятелства. Следва да има консенсус относно стратегия за постигане на определените цели по надзора на АМР, включително неговото проектиране, необходимите епидемиологични и клинични данни и микробиологични методи. Например **WGS е полезно допълнение към фенотипното наблюдение, ако е необходимо да се определи източникът на инфекцията, събитията, довели до придобиването на АМР, и сринове в практиките за контрол на инфекциите, например при вътреболнични огнища.** WGS също така **предоставя информация за това кои АМР гени са налице и дали те се намират върху бактериалната хромозома или**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



върху плазмидите. Освен това WGS осигурява най-високата резолюция за количествено определяне на връзката между изолати на хора и животни, което е от съществено значение за подхода „Едно здраве“ при надзора на АМР.

Въпреки ползите от това, използването на WGS за наблюдение на АМР при бързо развиващите се бактерии има редица ограничения за приложението му в общественото здраве. Тъй като могат да бъдат открити само известни механизми за резистентност, **понастоящем WGS не може да замени напълно фенотипното наблюдение на АМР в бързо развиващите се бактерии.** Допълнителните предизвикателства, които трябва да бъдат преодолени преди WGS да може да бъде включена в надзора на АМР при бързо развиващите се бактерии, включват **изграждане на подходящ капацитет, лабораторна инфраструктура и техника, стандартизация на биоинформатичните методи, технологии за съхранение в условия с малък или никакъв предишен опит в използването на молекулярни методи и хармонизиране на протоколите за качество и протоколите за обмен и използване на данни.**

За да се разшири използването на WGS за наблюдение на АМР, първоначалният акцент може да бъде поставен върху един или няколко избрани патогена от значение за общественото здраве и върху антимикробни агенти, за които механизмите на резистентност са добре разбрани. **Глобалната система за наблюдение на антимикробната резистентност и употреба (GLASS)** наблюдава **редица приоритетни патогени с фенотипни методи.** За глобалния надзор на АМР би могло първоначално да се въведе WGS за подгрупа от приоритетни патогени на GLASS и/или за организми, докладвани в рамките на системата за докладване на възникваща антимикробна резистентност.

Изчислено е, че **инфекциите, дължащи се на АМР патогени,** ще имат непреки **икономически разходи в размер на 1—3,4 трилиона щатски долара** под формата на заболяемост, увреждане, преждевременна смърт и намалена ефективна работна ръка до 2030 г., **ако не бъдат предприети действия за противодействие на нарастването на АМР.** Освен това АМР е призната като заплаха за постигането на целите за устойчиво развитие. Като показател за напредъка към цел 3 „Осигуряване на здравословен живот и насърчаване на благосъстоянието на хора и животни“ е предложено намаляване на честотата на инфекциите, дължащи се на метицилин-резистентни *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Escherichia coli*, резистентни на цефалоспорини от трето поколение. Освен това инфекциите с резистентни бактериални патогени при добитъка застрашават устойчивото производство на храни и продоволствената сигурност (цел 2: Нулев глад и цел 8: Достоеен труд и икономически растеж).

**Данните за патогените, резистентни на антимикробни средства,** са от съществено значение за **информирането на риск политиката** в областта на общественото здраве и за наблюдението на ефективността на мерките. Понастоящем

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



наблюдението на АМР се основава главно на микробиологично характеризиране на изолати и изпитване за фенотипна антимикробна чувствителност (AST). Добавянето на молекулярни методи в някои случаи може да осигури по-добро разбиране на механизмите на резистентност и свързаността на щамовете за изследване на появата и разпространението на АМР. Секвенирането на целия геном (WGS) предлага огромно количество информация и най-висока разделителна способност за молекулярно подтипиране на патогени. През последното десетилетие WGS доведе до преобразяване на биомедицинските изследвания и може да промени епидемиологичното наблюдение на патогените и да подпомогне вземането на навременни и адекватни решения относно инфекциозните заболявания и лечението на отделни пациенти („прецизна медицина“). Подобренятията в технологиите на секвениране и анализите бързо са увеличили производителността и скоростта на анализа и по този начин са намалени общите разходи за WGS, въпреки че спада на цените на секвенирането се забави, а патентованите инструменти все още са скъпи.

**Потенциалните употреби на WGS в областта на общественото здраве** включват:

- идентифициране на високорискови или резистентни клонинги в регионален и световен мащаб;
- идентифициране на механизмите за АМР и начина, по който те възникват и се предават в популациите хора и животни и чрез източници на околната среда („Едно здраве“);
- идентифициране и проследяване на огнища;
- определяне на нови цели за антимикробните средства и ваксините; и
- разработване на тестове за АМР.

Укрепването на научноизследователската и развойната дейност за нова диагностика и лечение е особено важно, тъй като понастоящем има недостиг на **софтуерни и диагностични продукти в процес на подготовка, които биха могли да се използват за изследване на щамове, които са устойчиви на антибиотично лечение.** Въпреки това WGS все още има някои важни ограничения и поставя редица практически предизвикателства за широкото прилагане.

**WGS може да се използва за единични бактериални изолати или цялата ДНК в съставна бактериална проба** може да бъде секвенирана чрез следващо поколение секвениране — техника, известна още като „метагеномен анализ“. Анализът на метагеномиката е обещаващ, но е **необходима допълнителна стандартизация на протоколите за екстракция, базите данни, биоинформатичните инструменти, методите и инструментите за събиране на проби, условията за съхранение и транспортиране и покритието на инструментите за секвениране.** Най-голямото

препятствие пред използването на метагеномния анализ за откриване на АМР е свързването на гените за АМР, които често се намират в плазмиди, със специфичен патоген.

**WGS** е молекулярен биологичен инструмент, използван за получаване на (почти) пълна ДНК последователност на организма. Чрез сравняване на ДНК последователност със стандартни референтни последователности на добре характеризирани микробни геноми, **могат да се направят изводи за важни фенотипни черти на микроорганизма, като АМР.** Следователно по принцип е възможно да се тества наличието на всички известни гени и мутации на АМР, свързани с резистентността по време на същия анализ, за да се помогне за прогнозирането на фенотипната АМР за широк спектър от лекарства. Трябва да се подчертае, че все още ще се изисква фенотипно изследване за патогени, при които наличието на ген не предвижда точно резистентност, а също и за идентифициране на появата на нови резистентни гени и механизми.

Сравнително малко микробни геноми все още са добре проучени и е установено **силно съответствие между генотипните и фенотипните профили само за малък брой организми и антимикуробни класове.** WGS също така има **ограничения,** свързани с надзора на АМР, тъй като може да се използва за **идентифициране и тълкуване само на известни мутации или гени или нови АМР гени, които са подобни на известните.** Независимо от това, за някои бактериални видове, WGS е започнал напълно да замества други, с по-ниска разделителна способност методи за типизиране, като например пулсова гел електрофореза, анализ на тандемните повтори с променлив брой с няколко локуса и определяне на серотипа (особено за организми с голям брой клинично значими серотипове, като *Salmonella*) и може да го направи за други в близко бъдеще.

Литературният преглед показва, че използването на WGS се е увеличило значително през последното десетилетие (фиг.1). Докато патогените, които понастоящем се наблюдават в рамките на GLASS, са предмет на повече от половината публикувани проучвания на WGS, и повечето от тях са проведени в страни с висок доход, като **56 са от Обединеното кралство и Северна Ирландия и 105 от САЩ** (фиг.2). Въпреки че все повече и повече проучвания върху пълното геномно секвениране за наблюдение на АМР се публикуват, **данните за последователността и метаданните не са винаги обществено достъпни.** Обменът на висококачествени данни е от съществено значение за подобряване на процеса на вземане на решения в областта на общественото здраве; данните за секвенциите на патогените и свързаните с тях метаданни обаче все още се считат за недостатъчни и не напълно надеждни.

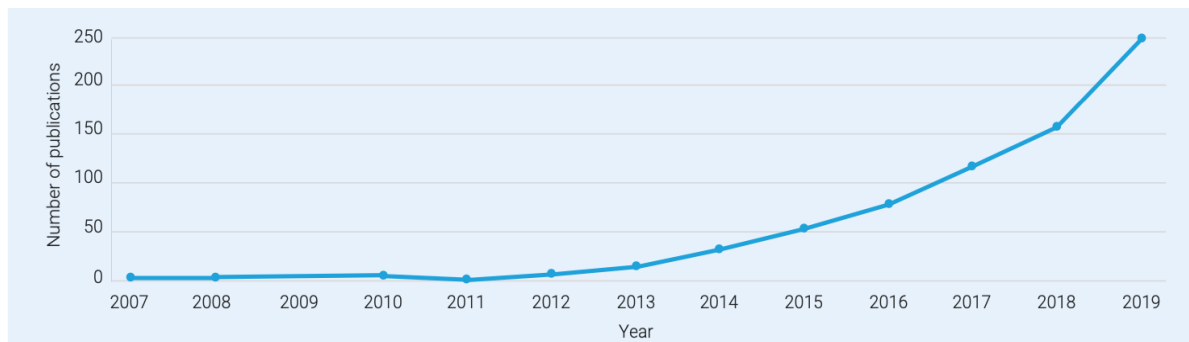
По отношение на лабораториите за наблюдение, има изготвен документ от СЗО, който обхваща насоки към три основни категории лаборатории: местни лаборатории, регионални лаборатории, национални референтни лаборатории (НРЛ) и регионални

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

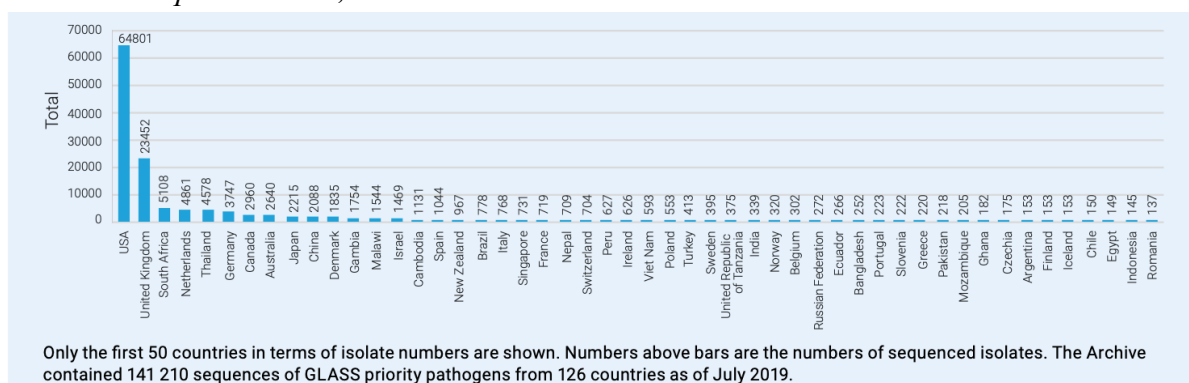
Ф-НК-7.6-5/0



референтни лаборатории (РЛЛ), които обслужват всички държави в световен мащаб. Лабораториите във всяка категория могат да бъдат новосъздадени или да имат различни нива на опит в използването на микробиологични методи, включително WGS и други молекулярни методи за типизиране на патогените.



**Фиг. 1:** Брой публикации за употребата на WGS за охарактеризиране на важни патогенни причинители, включени в GLASS



**Фиг. 2:** Брой публикувани пълни геномни последователности на патогенни причинители, включени в GLASS, разпределени по държави

## Предимства и ограничения на секвенирането на целия геном при наблюдението на антимикробната резистентност

Надзорът на АМР зависи от характеризирането на патогените, резистентни на антимикробни средства, и тяхното разпространение сред населението. Фенотипните тестове и WGS са насочени към различни аспекти на бързоразвиващите се бактерии: фенотипните тестове се използват за характеризиране на реакцията на бактериите при наличие на антимикробно средство, докато WGS може да се използва за характеризиране на генома на изолата. При надзора на АМР двата вида изпитвания могат да се използват по допълващ се начин в съответствие с целите. И двата вида изпитвания имат ограничения.

Повечето AST се извършват рутинно със стандартни фенотипни методи, или чрез референтен метод на микроразрежданията (стандарт на Международната организация по стандартизация), или чрез фенотипно изпитване, като диск дифузия или градиент или полуавтоматизирано изпитване. При тези тестове бактериите са изложени на различни концентрации на антимикробни средства и способността им да растат се тества чрез оценка на минималната инхибираща концентрация (MIC), диаметър на зоната на инхибиране или референтна стойност, които след това могат да бъдат интерпретирани спрямо международно стандартизирани гранични точки, за да се определи дали патогенът е чувствителен или резистентен (Институт за клинични и лабораторни стандарти и стандарти за изпитване на чувствителността към антимикробни средства).

Както всеки друг метод, фенотипният AST има присъщи ограничения и прилагането му изисква непрекъснато подобрене. Оптималното прилагане на фенотипните методи е описано в стандарти като тези на Института за клинични и лабораторни стандарти или Европейския комитет за изпитване на антимикробна чувствителност. Ограниченията включват неяснота и несигурност в интерпретацията, ако измерената MIC е близо до зоната на инхибиране, като се поддържат подходящата температура, рН и атмосферни условия и се гарантират правилните концентрации в средата за растеж за диск дифузионния метод. Допълнителни методологични проблеми за някои лекарства и бактериални видове включват факта, че не се препоръчват тестове за диск дифузия за някои антибиотици, като колистин, трудно се използват за бавнорастящи и бързорастящи бактерии и могат да бъдат повлияни от физични и химични фактори като температура на инкубация и съдържанието на растежната среда. Освен това стандартните подходи може да не са подходящи за анаеробни бактерии или редки бактериални видове и може да няма клинични гранични стойности.

Първата стъпка при вземането на решение кои тестове следва да бъдат на разположение за наблюдение на АМР е да се определят целите, които следва да дадат тласък на стратегиите за справяне с АМР. Целите, като например анализ на тенденциите в нивата на АМР, оценка на честотата на инфекциите с АМР и тяхното въздействие върху човешкото здраве, предоставяне на информация за националния списък на основните антимикробни средства и данни за предоставяне на насоки за лечение, могат да бъдат изцяло постигнати чрез използване на фенотипни методи. За някои други цели WGS могат да допълват фенотипните методи, но не са от съществено значение. Например откриването и контролът на разпространението на АМР в среда с висок селективен натиск на АМР, като например здравните заведения, са успешно постигнати с фенотипни методи, а точността е подобрена чрез молекулярни методи като гел електрофореза в импулсно поле и мнопластов молекулярен анализ с променлив брой

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0





тандемни повторения, които имат по-ниска разделителна способност и са по-малко информативни методи за типизиране, в сравнение с WGS.

**Уникалната характеристика на WGS е, че тя предоставя почти пълна информация за генома на изолата, която може да се използва за разбиране на генетичната основа на механизмите на АМР и за разграничаване на фенотипно идентични изолати със същия АСТ профил. Този вид молекулярна информация може да се използва при разработването на нови диагностични инструменти и подходи и нови мерки за борба с АМР. Той също така позволява локализирането на АМР детерминанти върху бактериалната хромозома или върху плазмидите, което предоставя ценна информация за пътищата на разпространение на АМР. Сравнението на всички ДНК последователности на различни изолати може да допълни проследяването на пътищата на трансмисия, разпространение и контактите между изолираните патогени и фенотипните им антибиограми.**

### **Ползи за общественото здраве от приложението на WGS:**

- WGS може да предостави нови познания за предаването на болести и вирулентността и динамиката на АМР, когато се комбинира с епидемиологична, клинична и фенотипна микробиологична информация. Тези изводи предоставят полезна информация за оценка на риска и за разработване на ефективни мерки.
- WGS може да се използва за бързо и точно идентифициране и характеризирание на патогените. Когато се комбинира с епидемиологична информация, тя може да улесни връзките по време на фазата на ранно откриване на огнищата, точното проследяване на пътищата на предаване, точното очертаване на географското разпространение на огнището и идентифицирането на източниците на инфекция. Навременното откриване и отстраняване на огнища на бактериални инфекции може да доведе до значителни икономии на разходи в областта на общественото здраве.
- WGS позволява анализ на целия геном и субтипизиране с висока разделителна способност на патогените по отношение на АМР, включително характеризирание на АМР детерминантите (напр. подтипизиране на плазмиди).
- Данните от WGS са цифрови и анализите се извършват чрез софтуерни инструменти. Следователно използването на WGS дава възможност за по-добра стандартизация и възпроизводимост, като осигурява по-голяма междулабораторна сравнимост в сравнение с фенотипното изпитване. Фактът, че данните за последователността са цифрови и могат да се използват различни алгоритми за анализ на един и същ набор от данни, означава също така, че старите данни могат да бъдат повторно анализирани, като се гарантира съвместимост и сравнимост между нови и стари анализи.

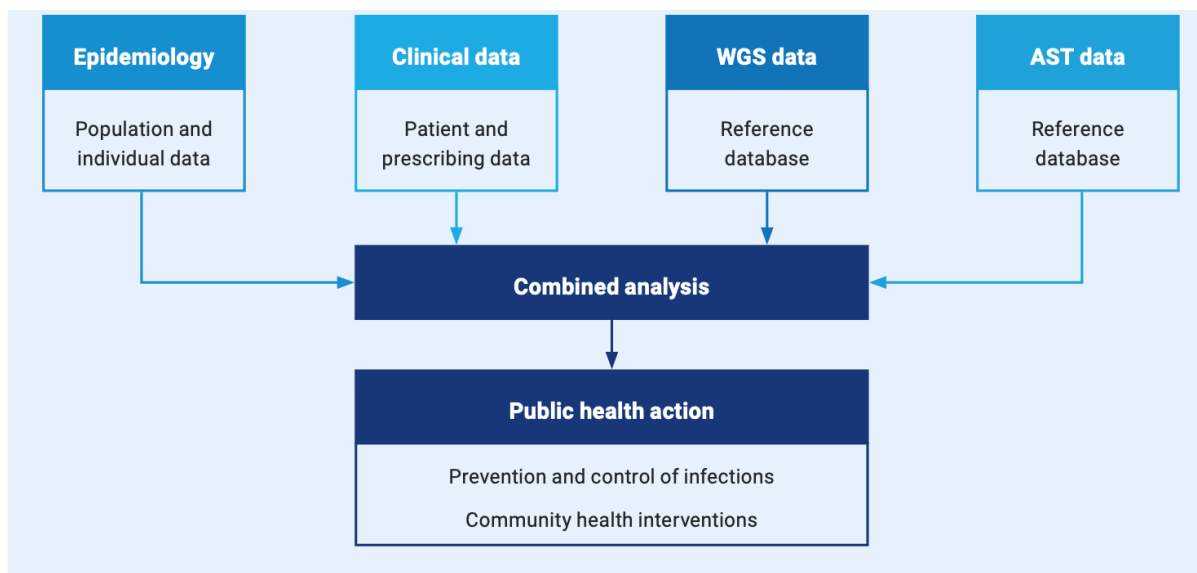
гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



Данните от WGS могат да се използват за проверка на идентичността на механизмите за AMP в изолати със съответната фенотипна AMP или с несъответстваща фенотипна AMP. Той обаче не може да се използва за количествено определяне на нивото на фенотипната AMP, и не е подходящ за рутинен или прогнозен AST и следователно не може да замени напълно фенотипните методи. Фигура 3 показва как WGS, AST и клиничните и епидемиологичните данни заедно могат да доведат до подобрени резултати и вземане на адекватни мерки в областта на общественото здраве. Епидемиологичният и клиничният анализ предоставят индивидуални и популационни данни, които могат да се комбинират с резултатите от WGS и фенотипния AST в добре поддържани референтни бази данни, които да послужат за разработване на ефективни стратегии за контрол и профилактика на инфекциите и подобряване на интервенциите в областта на общественото здраве. Например данните за AST могат да показват, че голям дял от щамове на бактериален патоген в даден регион са резистентни към няколко антибиотици, което предполага нов вид AMP. WGS и епидемиологичните данни биха могли да се използват за проследяване на веригата на предаване или за локализиране на гени на AMP върху мобилни генетични елементи, като тази информация може да се използва, за да се установи какво благоприятства развитието на резистентността към множество лекарства при определен патоген.

**Фиг. 3.** Взаимовръзка между различните видове данни и подобряване на резултатите в областта на общественото здраве



Резултатите от WGS сами по себе си не могат да доведат до конкретни резултати в областта на общественото здраве. По-скоро **комбинираните познания от всички тези**

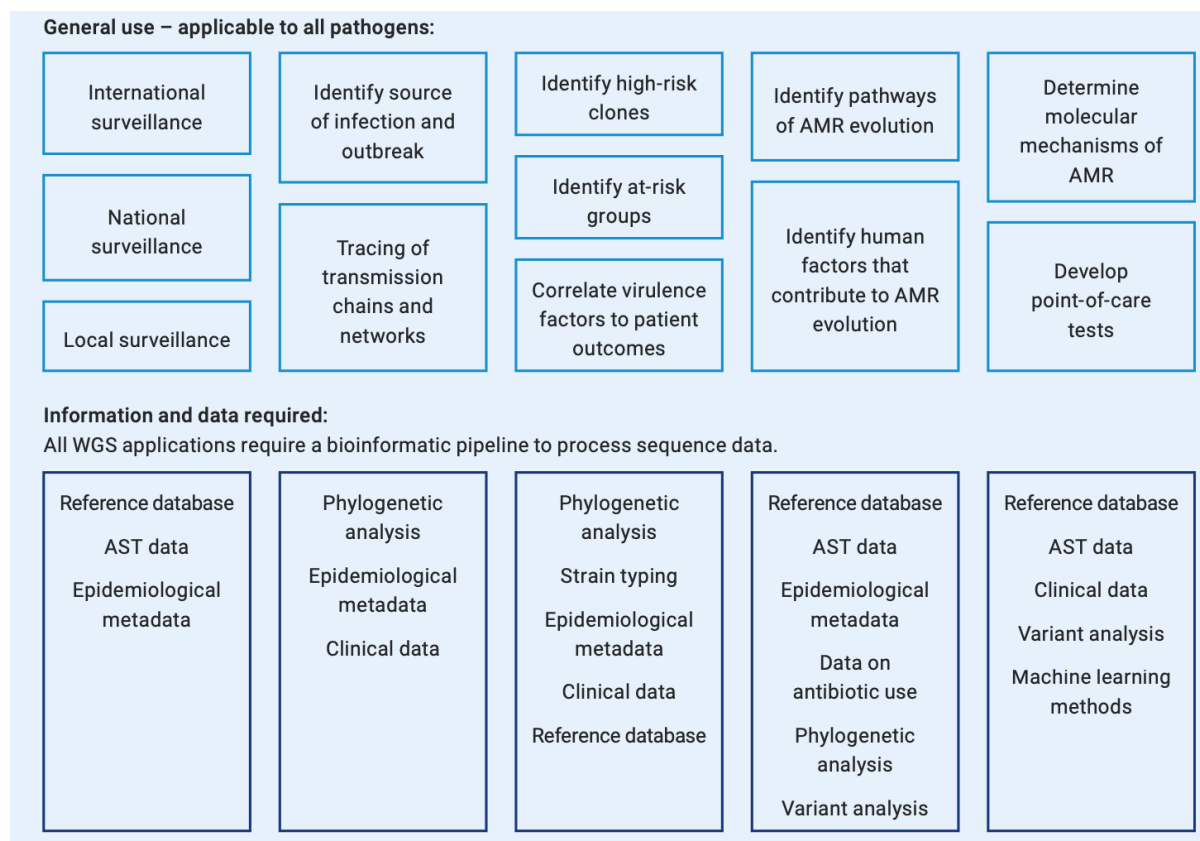
гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



източници на данни са необходими като основа за насоки в областта на общественото здраве, за да се предотврати появата и разпространението на нови резистентни патогени.

**Фиг. 4:** Обобщение на общата и специфичната за патогена употреба на WGS при надзора на АМР и видовете данни и методи, които се изискват. WGS може да се прилага за всеки патоген по няколко начина. Изискваната информация и методи се отнасят до широки категории данни и технологии за анализ на WGS при надзора на АМР:



WGS може да се прилага за всеки патоген по няколко начина. „Изисквана информация/методи“ се отнася до широки категории данни и технологии за анализ на WGS за наблюдение на АМР. WGS могат да се използват за международно, национално и местно наблюдение на АМР. **Наблюдението изисква референтни бази данни за геномните секвенции и данните за АСТ и може да бъде съчетано с епидемиологични метаданни.** Целевото наблюдение може да се използва за установяване на източника на АМР и за проследяване на пътищата на предаване на резистентни гени. Това изисква инструменти за филогенетичен анализ, епидемиологични метаданни и клинични данни.

гр. София, 1618, бул. ”Цар Борис III” № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



Данните от наблюдението на AMP чрез WGS могат да се използват за идентифициране на високорискови клонинги и групи, изложени на риск от инфекция, и за корелация на факторите на вирулентност с резултатите на пациентите, което изисква филогенетичен анализ и типизиране на щама, в комбинация с епидемиологични и клинични метаданни и геномни референтни бази данни. Данните от наблюдението на AMP на WGS могат да се използват и за идентифициране на пътищата на развитие на AMP и човешките фактори, които допринасят за развитието на AMP. Това изисква геномни референтни бази данни, данни за AST, епидемиологични метаданни, данни за употребата на антибиотици и инструменти за филогенетичен анализ и анализ на вариантите. Освен това данните от WGS могат да се използват за идентифициране на молекулярните механизми, на които се основава AMP, и за разработване на тестове за молекулярна диагностика. Това изисква геномни референтни бази данни, данни от AST, клинични данни и инструменти за анализ на вариациите и може да бъде улеснено чрез методи на основата на изкуствен интелект.

#### **Местните употреби на WGS за надзор на AMP включват:**

- откриване на известни механизми за AMP;
- идентифициране на нови механизми за AMP с фенотипни данни за AST и характеризирани напр. на плазмид-медиранни или клонални гени за резистентност; и
- анализ на огнище на бактериална инфекция в една единствена среда, като например болнично заведение.

**Използването на WGS за наблюдение на AMP на местно, регионално или национално равнище** включва:

- сравнение на няколко генома от различни местоположения;
- анализ на местните или регионалните преносни пътища; и
- проследяване на източници на местни или регионални огнища.

**Международната употреба на WGS за наблюдение на AMP** включва:

- мониторинг на популациите от патогени;
- откриване на високорискови и AMP клонинги; и
- оценка на въздействието на предприетите мерки.

Анализът на WGS на местно равнище не е непременно по-лесен или по-съществен от анализа на WGS на регионално или световно равнище.

#### **Ползи за лабораториите и данни:**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



- **WGS е бързо развиваща се технология, която може да се приложи към широк спектър от микробни патогени, след като те бъдат изолирани. Това позволява едновременно наблюдение и диференциране на патогените при коинфекция с няколко патогена, дори ако те имат много сходни фенотипни характеристики. Лабораторният работен процес понякога може да бъде автоматизиран и следователно по-ефективен.**
- **Данните от WGS могат да бъдат предмет на стандартизирани анализи и необработените данни и резултати могат лесно да бъдат споделяни, което улеснява бързия и навременен обмен на знания. То може да направи глобалното наблюдение на АМР дигитално, с навременен достъп до информацията относно нововъзникващата АМР.**
- **Разходите за тестване на всички известни механизми за АМР наведнъж са малко по-високи от тези за тестване само за един механизъм, докато с фенотипния AST тестването на всички необходими антимикуробни средства би изисквало повече реагенти, материали и време.**
- **WGS може да подпомогне разследването на предаването на патогени.**

#### **Ползи за клиничната практика:**

Въпреки че настоящият документ се съсредоточава върху прилагането на WGS в надзора на АМР, изследванията относно прилагането му в клиничната практика по отношение на бързорастящите бактерии бързо се увеличават.

- **Сравнението на геномите на патогените, свързани с рецидивиращи инфекции, може да се използва за разграничаване между ендогенен рецидив (обикновено след неуспех на лечението или колонизация) и екзогенни реинфекции, като така могат да се подобрят диагностичната подготвеност, адекватното лечение и мерките за превенция в общественото здраве.**
- **Глобалните и регионалните знания, придобити от WGS на патогените, ще подпомогнат разработването и интерпретирането на нова, целенасочена молекулярна диагностика за АМР, която може да се използва широко и като бързи тестове.**
- **Прогнози за АМР въз основа на данни за последователността могат да бъдат триангулирани чрез сравнение с архивни последователности с резултати AST. Ако даден изолат има същата или сходна последователност като тази на предварително документиран изолат и данните за AST показват, че предишният изолат е резистентен, това осигурява допълнителна увереност в прогнозираната АМР и изгражда положителен цикъл от доказателства, които в крайна сметка могат да имат пряко клинично значение.**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



Въпреки ползите от този молекулярен метод, WGS може невинаги да бъде най-подходящият метод за микробно типизиране за целите на надзора. За цели като изследване на кръстосаното предаване на патогени или характеризирание на механизмите на АМР може да се наложи използването на няколко други молекулярни метода. **Основно ограничение на WGS** в сравнение с други молекулярни методи са **високите първоначални инвестиции и сложните технологични и инфраструктурни изисквания**. Например целенасоченото секвениране или скрининговия PCR, а не WGS, може да бъде ефективно алтернативно решение за бързо секвениране на определени гени директно от клинични проби и когато наличието на специфични гени трябва бързо да бъде потвърдено или изключено. При „целево“ секвениране вместо целия геном се секвенират само генът или геномният регион, представляващ интерес, което е бързо, рентабилно средство за потвърждаване наличието на специфични АМР гени или мутации. Като алтернатива за откриване на АМР често се използват проста молекулярна диагностика, като например имунохроматографски изследвания (въз основа на откриване на протеини от антигеновете).

## МОЛЕКУЛЯРНИ МЕТОДИ ЗА НАДЗОР НА АМР

- Целенасоченото откриване при наблюдение на АМР (1) включва откриване на гени или мутации, кодиращи АМР. Секвенирането на ДНК на патогена невинаги е необходимо за тази цел. Например PCR може да се използва за откриване на гени или мутации на АМР чрез селективна амплификация; микроразреждания могат да се използват за откриване на АМР гени и мутации чрез свързване на патогенни ДНК фрагменти с известни комплементарни ДНК последователности; изследванията на хоризонталния трансфер откриват наличието на АМР гени чрез свързването на антигена с техните протеинови продукти, ако гените са експресирани.
- Целевото секвениране включва използване на полимеразно верижна реакция (PCR) за амплифициране на познатите АМР гени, за да се потвърди тяхното наличие или да се идентифицират мутации, водещи до резистентност.
- Секвенирането на целия геном се използва за определяне на (почти) пълната ДНК последователност на даден патоген, включително части от генома, които не съдържат известни АМР гени. Познатите гени за резистентност могат да бъдат идентифицирани чрез сравнение с референтната ДНК. Геномната последователност може да се използва в комбинация с фенотипни AST данни за идентифициране на нови АМР гени и мутации.

**WGS е полезна за анализиране на отделни изолати със сложни профили на антимикробна чувствителност или множество изолати със значителна генетична**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



**хетерогенност в един и същ фенотип на АМР, за да се определи механизмът на АМР.** При огнища, при които изолати със същия АМР фенотип имат много сходни базови генотипове и резистентни изолати от един и същ щам, **WGS може да се използва, за да се установи връзката между изолатите и следователно механизмите на предаване.** За оценка на клоналната връзка между патогените при изследване на кръстосаното предаване са използвани и други методи, като например импулсна гел електрофореза.

## **ПОТЕНЦИАЛНИ ПОЛЗИ ОТ СЕКВЕНИРАНЕТО НА ЦЕЛИЯ ГЕНОМ:**

- заключение за **фенотипни признаци**, напр. **АМР, и фактори на вирулентност**;
- откриване на **нови молекулярни маркери за лекарствена резистентност**;
- **бързо идентифициране на щамове на АМР**, които причиняват инфекции, и по-добро вземане на решения в областта на общественото здраве поради високата им чувствителност;
- **възможно най-висока разделителна способност за идентифициране и охарактеризиране на молекулярно ниво на целевия изолат**, като по този начин се дава възможност за проследяване с висока разделителна способност на събития на микробно предаване и бързо, точно идентифициране на местни, регионални и глобални огнища;
- **проследяване с висока разделителна способност на мобилни генетични детерминанти на АМР, като плазмиди и транспозони**, и точно очертаване на местните, регионалните и световните огнища на детерминанти на резистентност;
- **готова стандартизация и споделяне на необработени данни** за приложенията, свързани с обработка и анализ на „големи информационни масиви“;
- **принос към всеобхватни геномни бази данни**, свързани с епидемиологичните и клиничните метаданни, като безценни ресурси за наблюдение в общественото здраве и клиничните грижи;
- **стандартизиране на изпитванията (цифрова епидемиология)** и по-бързо наблюдение в реално време; и
- **потенциално улесняване на разработването на целенасочена диагностика и нови стратегии за антимикробни лечения и ваксини.**

Въпреки ползите от WGS за надзора на АМР, при вземането на информирано решение относно въвеждането му за целите на общественото здраве и клиничните приложения следва да се вземат предвид редица ограничения.

## **НАСТОЯЩИ ОГРАНИЧЕНИЯ НА WGS ЗА НАДЗОР НА АМР:**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



- Технологиите на WGS изискват **значителни първоначални и постоянни финансови инвестиции**.
- Секвенирането и биоинформатиката не са част от общите познания или обучение на персонала в лабораториите в LMIC и трябва да бъдат **осигурени инвестиции в обучение и непрекъснато образование на персонала**.
- Следва да бъдат **разработени стандартни оперативни процедури, протоколи за осигуряване на качеството и основани на доказателства насоки за използване на WGS при надзора на AMP**.
- За повечето патогени и антимикробни средства **прогнозната чувствителност и специфичността на WGS за определяне на фенотиповете на AMP все още са твърде ниски** за практическо приложение.
- Понастоящем **обменът на данни не е стандартна практика**.
- Технологиите на WGS изискват **значителни първоначални и постоянни инвестиции в лабораторно оборудване, компютърна инфраструктура и обучение**. Следователно **WGS не може да бъде икономически ефективна в малки лаборатории** без необходимата инфраструктура. Когато не са налични средства за първоначалната инвестиция, следва да се обмисли изпращането на проби до централна лаборатория за секвениране.
- **Международно приети стандартни оперативни процедури, процедури за осигуряване на качеството (QA) и регулаторни насоки за WGS в надзора на AMP не съществуват** и следва да бъдат разработени, за да се гарантира, че резултатите от WGS от различни лаборатории са съпоставими и лесни за сравняване и тълкуване. Като отправна точка могат да се използват протоколите, използвани в други програми за наблюдение, в които се използват молекулярни методи и WGS (*Global Microbial Identifier, US Centers for Disease Control and Prevention, US Food and Drug Administration, WHO surveillance of food transmitted disease, HIV drug resistance and MDR-TB*). Международните експертни групи следва да се споразумеят за референтни щамове и гени и мутации на AMP, които могат да се използват за контрол на качеството (КК).
- WGS може да доведе до **фалшиви положителни или фалшиви отрицателни резултати, ако не е допълнена с фенотипен AST**. Резултат, показващ резистентен фенотип и положителен молекулярен резултат, предполага експресия на гени за AMP; въпреки това, гени или псевдогени могат да присъстват, но да не са експресирани, което може погрешно да прогнозира AMP фенотип, ако се използва самостоятелно молекулярно изследване. Неоткриването на наличието на нов неизвестен ген на AMP може да доведе до погрешно прогнозиране на липсата на AMP.
- **Чувствителността и специфичността на геномните бази данни и алгоритмите за прогнозиране на фенотипната AMP варират според бактериалните видове, вида**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0





на АМР и геномните бази данни. Тъй като механизмите на АМР, свързани с всеки организъм или лекарствена комбинация, са по-добре дефинирани генотипно, анализите на WGS следва да доведат до по-малко фалшиви отрицателни прогнози (основна грешка). С няколко изключения (напр. *M. tuberculosis*, MRSA, патогени, пренасяни чрез храна), генотипното прогнозиране на АМР все още не е подходящо за вземане на решения относно лечението на повечето бактериални инфекции. Чувствителността и спецификата на прогнозата за АМР, базирана на WGS, ще варират с течение на времето, тъй като се откриват повече механизми за АМР. Текущите изследвания и разширяването на базите данни за наблюдение с данни от WGS и АСТ в крайна сметка ще повишат чувствителността на генотипните прогнози за АМР до степента, необходима за вземане на решения в областта на клиничното и общественото здраве. Все още обаче ще са необходими фенотипни данни, за да се открият нововъзникващи механизми на АМР.

- **Разработването на протоколи за осигуряване на качеството и насоки за наблюдение и клиничната употреба трябва да бъде координирано.** GLASS, програмата на СЗО за наблюдение на АМР, може да осигури рамката за такава координация, като се основава на регионални системи за наблюдение, като например тези, координирани в Европа от Европейския център за профилактика и контрол върху заболяванията (напр. EURO-GASP, EURGen-Net) и опит в определянето на молекулярни случаи, обучението, стандартизацията и външната оценка на качеството в тези мрежи. Широко приложимите протоколи ще изискват обмен на данни за геномните секвенции на патогените, поради което ще трябва да бъдат обсъдени международни споразумения.

### **Цена и икономически предимства на секвенирането на целия геном за наблюдение на антимикробната резистентност:**

**Икономическите предимства на WGS за надзора на АМР все още не са доказани недвусмислено.** Разходите за създаване на една или повече лаборатории на WGS зависят от съществуващите лабораторни съоръжения и държавата. Не всяка държава изисква WGS технологии, за да участва в наблюдението на АМР. **Регионалните системи за наблюдение „hub-and-spoke“**, в които участващите държави, които нямат капацитет за WGS, изпращат проби на регионални лаборатории с капацитет на WGS, **са алтернатива.** Разходите за създаване на нова лаборатория, използваща WGS зависят от планирания капацитет за секвениране, **от това дали са необходими съоръжения, от изискванията за пространство и от наличната инфраструктура.** При условия, при които са необходими допълнителни инвестиции в лабораторна инфраструктура, въвеждането на наблюдение на WGS може да не бъде приоритет. За лабораториите с капацитет за молекулярна диагностика, разходите за

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



въвеждане на WGS като рутинен диагностичен метод се оценяват на 100 000 - 700 000 щатски долара, като има **допълнителни разходи за наемане и обучение на експертен екип по WGS.**

**WGS на единичен бактериален изолат струва 35 - 300 щатски долара** в НИС, където по-ниската стойност е постижима само с много висока производителност, когато разходите могат да бъдат компенсирани чрез консолидиране на работните потоци за множество изолати. По този начин WGS става по-рентабилна в лабораториите с по-висока производителност. Следователно, когато се взема решение дали да се създаде една голяма лаборатория с по-голям капацитет за WGS (напр. НРЛ) или няколко по-малки лаборатории, първият вариант е по-ефективен от гледна точка на разходите.

Публикуваните оценки на разходите за WGS за изолат са подобни на тези на конвенционалните техники за молекулярно типизиране: US \$ 25 - 150 за импулсна гел електрофореза и US \$ 65 - 120 за мултилокусно секвениране. Очакваните разходи за повтарящи се елементи, основани на PCR, са значително по-ниски - 26 щатски долара на изолат. По този начин **въвеждането на единен работен процес на WGS може да спести разходи, тъй като би премахнало необходимостта от замяна или установяване на много конвенционални молекулярни техники за типизиране на патогени.**

Тъй като WGS стават по-широко използвани и се разработват по-ефективни от гледна точка на разходите технологии за секвениране, внедряването им в националните системи за мониторинг и надзор ще стане по-достъпно за повече държави. **Най-голямата цена, свързана с WGS на микробните патогени, обаче е тази за подготовката на секвенционни библиотеки, която остава стабилна на 60 - 74 щатски долара на изолат** от 2011 г. насам. WGS се използва в много различни приложения в медицината и биомедицинските изследвания и не се ограничава до наблюдение на AMP или патогенна геномика, за разлика от фенотипния AST, който се извършва само в наблюдението на AMP и клиничната микробиология. Следователно пазарните ниши, които намаляват цената на технологията WGS, следва да бъдат много по-силни, отколкото при фенотипните методи, а цените се очаква да намалее по-бързо.

Голяма икономическа полза от мониторинга и наблюдението е готовността, която често се пренебрегва, тъй като е трудно да се оцени цената на липсата на готовност. **Изчислено е, че пълната липса на подготвеност за AMP до 2030 г. би увеличила допълнителните разходи за здравеопазване до 0,22 трилиона щатски долара годишно, дори в условия с ниска степен на AMP. Добрият мониторинг може да помогне на здравните системи да предотвратят големи огнища на резистентни патогени и да бъдат подготвени, ако се появят такива. Включването на WGS в системите за надзор на AMP може да има големи икономически ползи.**

Що се отнася до клиничната полза, WGS може да бъде незначително по-евтина от рутинните диагностични методи за някои патогени, а разходите за WGS в клиничните приложения следва да бъдат сравнени с потенциалните икономии, постигнати чрез

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



съкращаване и контролиране на вътреболничните инфекции с резистентни на антимикробни средства патогени. Проучване например чрез WGS на вътреболнично огнище на инфекции с MRSA в Обединеното кралство е стигнало до заключението, че разходите за здравеопазване, свързани с овладяване на огнището, са над 10 000 GBP (12 167 щатски долара), докато разходите за WGS за един изолат MRSA (включително подготовка на проби, геномна библиотека и секвениране) са 95 GBP (116 щатски долара); т.е. секвенирането на всички 26 изолати от епидемията е струвало 2 470 GBP. В този пример анализът на WGS е довел пряко до предприемане на мерки, които са спряли епидемията. По подобен начин моделирането на разходната ефективност на наблюдението на MRSA чрез WGS показва, че WGS е по-рентабилно от настоящото наблюдение.

### **Изисквания за въвеждане на метода по секвениране на целия геном**

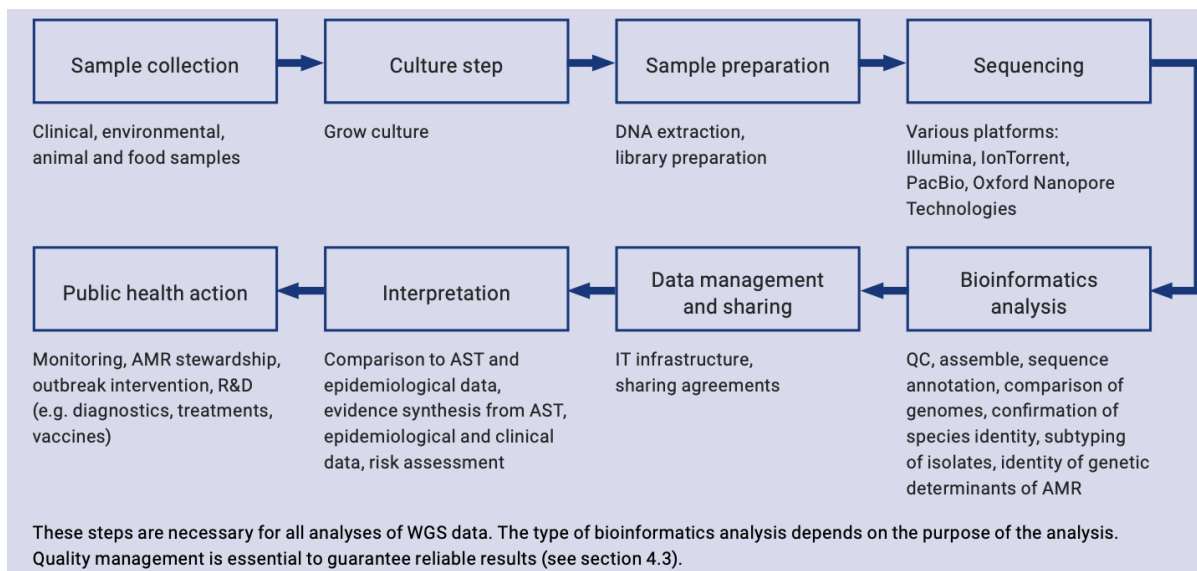
Всички тези изисквания обхващат възможните работни процеси, инфраструктура, платформи и биоинформатика, необходими на лабораториите за използване на WGS за наблюдение на AMP (фиг. 5). Изборът на подходяща стратегия за вземане на проби и подборът на съответните образци са важни преди изпитването за AMP. Цялото необходимо оборудване и умения трябва да бъдат на разположение за всички етапи от работния процес, включително основната лаборатория, секвенирането и биоинформатиката и капацитета за съхранение на данни, за да се генерират и анализират данните от WGS, тъй като всяка следваща стъпка зависи от резултатите от предходните стъпки, а подлежащите на анализ резултати са на разположение едва след приключване на целия работен процес. **Наличието на секвенатор е недостатъчно, ако другите елементи липсват.** Всички стъпки в работния процес изискват добър QC и QA.

*Фиг. 5: Стъпки при генериране на данни от WGS*

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0





Понастоящем основата за наблюдение на АМР все още е фенотипна АСТ на клинични проби и много държави все още изграждат и използват основния си капацитет за бактериология и АСТ. Въпреки че тези методи могат да постигнат няколко от целите на наблюдението на АМР, **WGS могат да добавят значителна стойност към системите за надзор на АМР.** Фенотипните системи за наблюдение и системите за наблюдение на WGS могат да бъдат изградени едновременно, но само ако са налице достатъчно ресурси и са на разположение. Като цяло първо следва да се установи надзор на АМР въз основа на фенотипния АСТ, който след това да бъде допълнен с WGS. Независимо от микробиологичните методи, използвани при надзора на АМР, държавите следва да разполагат с епидемиологичен капацитет да планират надзора и да анализират и предприемат действия по отношение на резултатите.

Основната предпоставка за въвеждането на WGS в система за наблюдение е добрият експертен опит в областта на микробиологията и биоинформатиката в системата на общественото здравеопазване. В държави, които нямат предишен опит с молекулярни методи, WGS първо ще се прилага в НРЛ. Следователно **НРЛ трябва да отговаря на всички изисквания за висококачествен анализ на WGS.** Държавите също така ще имат предимство, ако разполагат с лаборатории, които могат да извършват висококачествена PCR и известен биоинформатичен капацитет или изчислителна инфраструктура. WGS е естествено продължение на PCR, което включва много от същите методи (като извличане и съхранение на ДНК и подготовка на мастер миксове) и познания в областта на генетиката и молекулярната биология. Ако все още предстои да бъде разработена софтуерна инфраструктура, може да е за предпочитане да се наемат сървъри или да се използват облачни технологии за съхранение и обработка на данни, за да се избегне тежестта и поддръжката на такава техника с голям капацитет.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



Държавите имат разнороден надзор на АМР и лабораторен и изчислителен капацитет. В такива случаи WGS може да бъде създадена само в онези региони, в които тя е осъществима и въведена в други региони с развитието на системата за надзор. Например WGS биха могли да бъдат въведени в НРЛ с мрежа за препращане на образци от местни лаборатории без капацитет на WGS. В държави, които все още не разполагат с капацитет за пълен обхват на наблюдение на фенотипната АМР, може да се използва модел „*hub-and-spoke*“, при който местните лаборатории изпращат проби до НРЛ (или Регионални лаборатории в друга държава, ако няма НРЛ с капацитет на WGS) както за фенотипния АСТ, така и за молекулярния анализ, като резултатите се връщат в лабораторията, подаваща информацията. Такъв модел не е необходимо да се ограничава до наблюдение на АМР, а същият център на WGS може да бъде и за други програми за наблюдение, като ХИВ, туберкулоза и грип. Като алтернатива, капацитетът на WGS в местни или регионални лаборатории може да се използва за получаване на молекулярни данни от локални проучвания за разпространението. Децентрализирана мрежа за секвениране е вариант, ако една централна секвенираща лаборатория се претоварва.

**Поетапното прилагане на наблюдението чрез WGS в държавите и регионите следва да бъде координирано, за да се гарантират съпоставими данни, като се определят международни стандарти за валидиране и обмен на данни на ранен етап от процеса.** На членовете на мрежата за наблюдение може да бъде предоставен стандартизиран софтуер за анализ и управление на работния процес. Държавите, които желаят да укрепят както своя капацитет за прилагане на молекулярни методи и на фенотипни такива, могат да спестят общите разходи, като гарантират, че новите лаборатории разполагат с капацитета както за фенотипни АСТ, така и за молекулярни изследвания, включително WGS, или чрез обединяване на ресурси с други програми за наблюдение на WGS. Не е необходимо обаче всяка лаборатория в система за наблюдение да има както фенотипен, така и молекулярен капацитет за изследване.

### **Лаборатории:**

**Лабораториите**, които планират да включат WGS в своите изпитвания, следва да разполагат с **подходяща инфраструктура за изолиране на организми от клинични проби, култивиране и извличане на ДНК от култивирани изолати.** Национално стандартизираното рутинно вземане на проби от бактериални изолати е предпоставка за наблюдението на АМР, а капацитетът за култивиране на микроорганизми и изолиране на бактерии е ключов елемент, тъй като материалът за WGS на бактериалните патогени обикновено е пречистена ДНК, извлечена от течна култура (отгледана от една колония или от отделни колонии, взети от първични култури). WGS при клинични проби, макар и технически възможни, са сложни, с висок процент на неуспех и понастоящем изискват допълнителни времеемки и скъпо струващи стъпки.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



Фенотипните данни за AST са от съществено значение за откриването на нови механизми на АМР (когато даден патоген придобива резистентност към лекарство, към което преди това е бил податлив) чрез сравняване на експресията на фенотипната резистентност с наличието на гени или мутации, кодиращи резистентност. Методите, които често се използват при фенотипните AST, са култивиране в течна или твърда среда, съдържаща антимикробни средства, и изследвания на градиент за определяне на MIC, диск дифузионни тестове и автоматизирани методи. В идеалния случай данните от WGS се сравняват с тези от микроразрежданията за AST, което е „златният стандарт“ за определяне на MIC за бързорастящи бактерии и следователно се очаква да даде най-добра корелация между двата метода. Непрекъснатото разбиране на корелацията между фенотипните и генотипните резултати ще **изисква насоки за граничните стойности и ясно определени клинични или епидемиологични гранични стойности.**

Лабораториите, които планират работните процеси на WGS, следва да имат капацитет за висококачествена PCR, потвърдена от вътрешен и външен контрол по качеството. От съществено значение е да се гарантира, че колонията, която е секвенирана, е същата като тази, която е с фенотипна АМР изява. Ако колонията е мутирала, тя може да е придобила промени като загуба на плазмид или придобиване на нови мутации, което намалява доверието в генотипно-фенотипните взаимовръзки. Ако бъдат установени несъответствия, фенотипният и/или молекулярният анализ ще трябва да бъдат повторени.

Всички тези въпроси трябва да бъдат взети под внимание при **внедряването на WGS в лабораторната практика** и да се **въведат стъпки, които да гарантират както необходимия работен процес, така и вътрешните и външните стандарти за осигуряване на качеството и за поддържане на качеството.** Всички стъпки в работния процес трябва да отговарят на тези стандарти, за да участват в глобални схеми за наблюдение и мониторинг и да качват данни в бази данни. LMIC може да бъде ограничен при създаването на високоефективна микробиологична лаборатория и модернизирването ѝ с капацитет на WGS поради липса на ресурси, инфраструктура, покупателна способност и експертен опит. Ако всички изисквания не могат да бъдат изпълнени, може да е за предпочитане пробите да се изпращат в централна лаборатория за секвениране, вместо да се модернизират местните лаборатории до пълния капацитет за прилагане на WGS. **Централизираното секвениране може да спести значителни разходи**, ако предизвикателствата, свързани с транспортирането на проби, могат да бъдат преодолени и централната лаборатория разполага с достатъчен капацитет да обслужва всички подаващи лаборатории без дълго чакане.

**Настоящите инструменти за секвениране изискват следната инфраструктура:**

- надеждна интернет връзка;

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



- непрекъснато електроснабдяване А/С;
- платформи без вибрации;
- контрол на праха за някои съоръжения;
- вода, използвана за молекулярни цели 100% свободна от ДНК-ази и РНК-ази (която може да бъде закупена в бутилки или произведена на място чрез третиране или филтриране);
- регулиране на температурата и влажността в рамките на подходящ диапазон за химични реакции и оборудване, чувствително към температурата;
- охлаждане и съхранение на реагенти и ДНК, с периодично записване на температурите на съхранение;
- помещения, които са херметически затворени и поддържат стабилна работна среда;
- достатъчно пространство за създаване на еднопосочен работен процес;
- система за възлагане на обществени поръчки, включително издаване на оферти; и
- автоматизирани системи за обработка на течности или работи за високопроизводителен капацитет.

Възможно е лабораториите, които не отговарят на тези критерии, да инсталират генератори, непрекъснати електрозахранващи устройства, климатични инсталации и системи за пречистване на водата, за да провеждат WGS. Необходимо е достатъчно пространство за специални работни повърхности и еднопосочен работен процес, за да се гарантира стерилността на изолати и да се избегне кръстосано замърсяване. Следва да има три физически отделени зони за работа, изготвяне на ДНК шаблони и амплификация на ДНК.

## Платформи

На разположение са **различни платформи за секвениране на микробни геноми**. Изборът зависи от целите на последователността и необходимата дълбочина на покритието, времето за постигане на резултати, производителността и разходите. Платформите за секвениране могат да се класифицират спрямо прочитите на последователностите: **къси четения** и **дълги четения**, като „четене“ е заключена част от геномната последователност, която съответства на един фрагмент от ДНК. Най-често използваните секвениращи инструменти за WGS при бактериални изолати са платоформите за къси прочити, които произвеждат фрагменти от последователността от по-малко от 300 базови двойки. **Най-често използваните машини** за бактериално секвениране на генома са платформите на **Illumina**, които се основават на подход, при който ДНК фрагментите се синтезират от флуоресцентно маркирани нуклеотиди по време на секвенирането. На всеки етап към растящата ДНК нишка се добавя само един нуклеотид. Маркерите произвеждат флуоресцентна светлина

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



с различна дължина на вълната и следователно указват кой нуклеотид се добавя на всеки етап. Поради аспекта на платформите за „синтез“, всеки нуклеотид е секвениран последователно стотици или хиляди пъти (висок „обхват“), което гарантира висока точност. *Illumina* предлага два комплекта инструменти, подходящи за секвениране на патогени: Инструментите *HiSeq*, *NextSeq* и *NovaSeq* предлагат много високопроизводително секвениране за големите центрове за секвениране, докато инструментите *ISEQ*, *MiSeq* и *MiniSeq* са по-подходящи за регионални или местни и нови лаборатории; въпреки това, разходите за изолат, секвенирани на тези по-малки платформи, могат да бъдат значително по-високи, ако партидите не могат да бъдат оптимизирани.

Алтернативен подход за секвениране на къси участъци е платформата *Ion Torrent* на *ThermoFisher*. Тези секвенизатори идентифицират нуклеотидите в ДНК посредством промените в рН по време на синтеза. По-малко биоинформатични инструменти са изградени за генерираните данни от *Ion Torrent*, отколкото за генерираните от *Illumina* данни.

Въпреки че късите прочити и платформите, с които се осъществяват, са много точни, те все още могат да оставят празнини в информацията от секвенираните геноми, така че е трудно да се съберат малки фрагменти в сложни геномни региони, като тандемни повторения и локуси с GC, които съдържат няколко копия на един и същ малък мобилен генетичен елемент.

Секвениращите платформи за дълги прочити, които генерират ДНК секвенции на повече от 10 000 базови двойки, могат да преодолеят тези недостатъци, тъй като се редуват много големи райони на генома и поради това са най-полезни за изграждането на цели цели геноми и плазмиди. Основните платформи на дълги прочити понастоящем са *Pacific Biosciences (PacBio)* и *Oxford Nanopore Technologies (ONT)*. Платформата *PacBio* се основава на вариация на секвенирането, наречено едномолекулно секвениране в реално време, което осигурява много кратки срокове за резултат. Тези секвенизатори обаче не са подходящи за нови или малки лаборатории, които искат да внедрят WGS в диагностичната си практика поради високата цена на инструментите и реактивите, уязвимостта им към фрагментиране на ДНК, големия им размер и по-високия процент на грешки.

*ONT* е разработила нова технология за секвениране, при която отделните ДНК или РНК молекули преминават през инженерни протеинови нанопори, а електрическият ток през всяка пора се измерва и може да бъде преобразуван в информация за ДНК последователността. Секвенаторите *Flongle*, *MinION*, *GridION*, *Promethion* генерират дълги четения и позволяват да бъдат анализирани, докато секвенирането все още е в ход. Секвенаторите *MinION* и *Flongle* са малки и преносими и са били използвани в полеви условия, като например по време на избухването на епидемията от вируса ебола в

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0





Западна Африка през 2013 - 2016г. Секвенизаторите на *ONT* изискват значително повече целева геномна ДНК, отколкото секвенаторите за късо четене, и имат относително висок базов процент на грешка. Въпреки че четенията са дълги и могат да допълнят резултатите от платформите с кратък прочит, покритието е по-ниско от това на платформите с късо четене и следователно общият процент на грешки е по-висок. Въпреки че това все още представлява проблем, тъй като *ONT* устройствата са в постоянен процес на развитие и обновяване, те могат да се превърнат в разумна технология за новосъздадени лаборатории за секвениране, тъй като не изискват огромен първоначален инвестиционен потенциал или договор за услуги и могат да се използват в лаборатории, които нямат постоянна финансова и ресурсна обезпеченост.

Въпреки това анализът и сглобяването на секвенции на дълги четения изискват достъп до подходящи високопроизводителни изчислителни среди. Високите проценти на грешки могат да бъдат преодоленни чрез паралелно извършване на секвениране с къс прочит, в идеалния случай от същия екстракт от ДНК, използван при секвениране с *ONT* на дълго четене. Наскоро разработен метод за хибридно сглобяване както на кратки, така и на дълги четения е изключително полезен за решаване на сложни бактериални геноми и мега-плазмиди с висока точност.

*Таблица 1* обобщава пригодността на различните платформи за *WGS* секвениране за различните видове лаборатории:

LABORATORY TYPE	PURPOSE	SUITABLE PLATFORMS
New laboratory or local laboratory	Sequencing of a limited number of samples Fast detection of specific AMR mutations for outbreak management	Illumina MiniSeq Illumina iSeq
Subnational regional laboratory	Sequencing of a potentially large number of samples for outbreak detection and AMR typing	Illumina MiSeq Ion Torrent devices Illumina NextSeq (if covering large region) Illumina NovaSeq (if covering large region) GridION (ONT)
National reference laboratory	Sequencing of a large number of samples High-throughput sequencing	Illumina MiSeq Illumina NextSeq Illumina NovaSeq Ion Torrent devices PacBio devices GridION (ONT) PromethION (ONT)

## Софтуер за биоинформатичен анализ

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



**WGS и биоинформатичен анализ на данните след това съчетава биология, компютърни науки, математика и статистика** и се използва за анализ и тълкуване на данни от WGS. Биоинформатичните анализи са поредица от алгоритми за всяка стъпка от работния процес, включително QC проверки и анализ надолу по веригата, като например подравняване на последователността и сравняване на последователността. Биоинформатиката е бързо развиваща се област и понастоящем **няма общоприети „златни стандартни“ инструменти за биоинформатичен анализ на АМР**. Лабораториите с експертен опит в WGS предпочитат различни алгоритми и могат диференцирано да ги приспособят към своите нужди, докато лабораториите без експертен опит ще се нуждаят от подкрепа при вземането на решение от какви анализи се нуждаят и необходимата хардуерна, софтуерна и информационна инфраструктура. **Оптималният инструмент за дадена задача зависи от настройката, използвания секвенатор, генетичните характеристики на секвенирания организъм и целта на анализа; използването на алгоритми, пригодени за специфични ситуации, обаче може да ограничи функционалността на работния процес на биоинформатичния анализ, а резултатите на различните лаборатории няма да бъдат съпоставими. Изграждането на стандарт за биоинформатичния анализ в много държави едновременно ще бъде уникална възможност за хармонизиране на методите и механизмите за осигуряване на качеството, за да се гарантира съпоставимостта на бъдещите резултати. Това също така ще предостави възможност за споделяне на изчислителна инфраструктура или начини на достъп до различни софтуерни инструменти и различни набори от платформи и услуги за извършване на биоинформатичен анализ. Хармонизирането не изисква всички лаборатории да използват абсолютно едни и същи инструменти; те могат да използват всеки инструмент, който е валидиран за предвидената употреба.**

Всяка стъпка в анализа на бактериалния геном изисква специализирани биоинформатични инструменти, от които има много, с различни силни и слаби страни. Инструментите трябва да бъдат интегрирани в съгласуван работен процес, а праговете и настройките за филтриране следва да бъдат прозрачни и еднакви, за да се сведат до минимум грешките и несигурността и да се постигне максимална съпоставимост. В идеалния случай следва да бъде възможно да се свържат резултатите от биоинформатичните анализи с резултатите от фенотипните изследвания и епидемиологичните и клиничните метаданни, за да се създаде цялостна база от знания за наблюдение, без да се излага на риск защитената здравна информация за пациентите.

**Необходим е високо обучен и опитен персонал**, за да се реши какви инструменти да се използват и кога. По същия начин тълкуването на резултатите не е просто и може да се окаже трудно да се превърне в действие от страна на неспециалисти. Следователно държавите, които желаят да включат WGS в своята система за надзор на АМР, трябва да осигурят експерти в областта на биоинформатиката, а

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



стандартизираните решения за биоинформатика от край до край следва да бъдат публично достъпни за използване от неексперти. В контекста на внедряването на WGS за национален надзор на патогени на АМР чрез сходни биоинформатични подходи в Европа, в проучване сред потребителите основните пречки са свързани с липса на експертен опит в интегративния анализ и интерпретиране на епидемиологичните данни и данните за секвенциите, липсата на оперативна съвместимост на системите за наблюдение и липсата на достъп до лесна за ползване международна номенклатура.

Геномните последователности на патогените могат да бъдат сравнени с референтни геноми, за да се идентифицират видовете и типовете щамове. Достъпните в интернет или *in silico* бактериални методи за типизиране (напр. типизиране на мононуклеотидния полиморфизъм, CG многолокусно типизиране на последователността) са на разположение за WGS за по-фино подтипизиране и почувствително откриване на гени на АМР в сравнение с микробиологичните или други молекулярни методи, като например импулсна електрофореза и многолокусно секвениране. Данните от WGS за патогени, за които геномът е добре характеризирани и представени в публично достъпни бази данни, могат да се използват за прогнозиране на важни фенотипни характеристики като АМР и вирулентността. Въпреки че това все още не е възможно за всички бактерии, методът е използван успешно за профилиране на резистентността при ХИВ, за насочване на антиретровирусната терапия и за откриване на клинично значима АМР при *Mycobacterium tuberculosis*.

Наличните бази данни и онлайн инструменти функционират по различен начин при откриването на детерминанти на АМР. Чрез разширяване и подобряване на съществуващите бази данни може да бъде създадена единна публична база данни за всички известни гени и мутации на АМР. Тази база данни може да бъде организирана по бактериални видове и да включва данни за фенотиповете на АМР на секвенираните изолати. По-малки, целеви бази данни също биха били приемливи за специфична употреба, включително откриване на АМР. Важно е **внимателното поддържане и актуализиране на референтните бази данни, тъй като бактериите се развиват бързо**. По-специално, различни бактериални щамове или видове могат да придобият нови АМР и вирулентни гени чрез хоризонтален трансфер на гени. Ако базите данни не са добре поддържани и не съдържат достатъчно разнообразни и качествени последователности, използването на тези бази данни за генотипно прогнозиране на АМР може да доведе до погрешни резултати.

Налични са софтуерни инструменти с отворен достъп, с отворен код и патентовани биоинформатични инструменти, както и бази данни с отворен достъп, публичен достъп и бази данни за геномни секвенции със затворен достъп.

**Определенията, използвани при тези биоинформатични анализи и бази данни са следните:**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



- Софтуер или инструмент с отворен достъп: инструмент, който може да бъде достъпен за всеки.
- Софтуер или инструмент с отворен код: софтуерен код, който е публично достъпен.
- Собствен софтуер или инструмент: инструмент, който е собственост на дружество или институция, с ограничен достъп. Често достъпът може да бъде закупен срещу заплащане.
- База данни със свободен достъп: данни, за които доставчиците не запазват права.
- База данни за публичен достъп: инструмент или база данни, които могат да се използват безплатно, но само от лицата, които се нуждаят от достъп (напр. служители в областта на общественото здраве и епидемиолози). Доставчиците на данни търсят информация и контролират изтеглянето и използването на данни за последователността, най-вече признание за сътрудничество, ако тези секвенции се използват в публикации и/или обществени съобщения. Достъпът може да бъде одобрен при регистрацията.
- База данни със затворен достъп: база данни, до която може да има достъп само лица, на които е предоставен достъп. Доставчиците на последователността на данните изискват използването само на непублично достъпни бази данни и членовете на мрежата могат да си сътрудничат и да споделят информация, но последователността не е достъпна за широката общественост. Няма отворена регистрация.

### **Предимства и недостатъци на отворения достъп срещу патентования софтуер:**

*Таблица 2 показва, че патентованият софтуер обикновено има по-удобни за ползване интерфейси и изисква по-малко обучение. Някои патентован софтуер предлага и пакети за поддръжка, които могат да бъдат полезни за неопитни потребители. Тези предимства обаче обикновено идват на висока цена, с липса на възможност за персонализиране на анализите. За разлика от това софтуерът с отворен код обикновено е свободен за използване и често може да бъде персонализиран за нуждите на потребителя, ако потребителят разполага с достатъчно обучение за използване на софтуера. Тъй като кодът е достъпен, методът е по-прозрачен и е по-лесно да се проучат техническите слабости на метода и защо някои анализи се провалят.*

	ADVANTAGES	DISADVANTAGES
Proprietary	<ul style="list-style-type: none"> <li>• May have more user-friendly interface</li> <li>• May offer tailored user support</li> <li>• Usually does not require much training</li> <li>• High product stability and standardization</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cost may be high</li> <li>• Methods not transparent</li> <li>• Limited control of the design, coding standards and flexibility for making modifications for new types of analysis</li> <li>• Time lag in obtaining support from providers based in other time zones</li> <li>• Prevents data-sharing</li> </ul>
Open-access	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No cost to user</li> <li>• Community or developer may offer support</li> <li>• Transparent</li> <li>• May be customized by user</li> <li>• "Bugs" and security issues may be recognized and resolved faster because the code is open and more people look at it.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• User interface may not be intuitive</li> <li>• Less tailored user support</li> <li>• Typically requires more training in bioinformatics and programming</li> <li>• Product may be unstable, with changing versions on open-source platforms</li> <li>• Complex certification for data security and laboratory accreditation</li> </ul>

## Модели за достъп за софтуер за биоинформатичен анализ

Данните от WGS и по-специално свързаните с тях метаданни могат да включват чувствителна информация; следователно **базите данни със свободен достъп може да не са най-подходящите**. Базите данни със затворен достъп, използвани например в Програмата на СЗО за наблюдение на резистентността към ХИВ и програмата на СЗО за наблюдение на туберкулозата, гарантират, че чувствителната информация се споделя само с доверени и оторизирани партньори. Тъй като достъпът до данни е от съществено значение за подобряване на общественото здраве, са **необходими усилия за разработване на алтернативни възможности за публичен достъп**, за да се даде възможност на собствени бази данни за достъп на обществеността до бази данни с публичен достъп, като същевременно се запазят техните цели в областта на общественото здраве и изискванията за поверителност.

**Добър пример за база данни с публичен достъп е Глобалната инициатива за споделяне на всички данни за грипа.** Достъпът до базата данни EpiFlu е безплатен за всички лица, които се регистрират и се съгласяват да спазват споразумението за обмен на данни по инициативата. Условието за ползване включват съгласие, че данните не трябва да се копират от базата данни или да се разпространяват на трети страни, изискване за посочване на източника на данни в публикациите (лабораторията с произход и подаващата лаборатория) и съгласие за сътрудничество с представители на лабораторията на произход, по целесъобразност. При избора на бази данни и софтуер следва да се вземат предвид правата за работа с лични данни, интелектуална собственост и публикуване.

**За да се увеличи максимално тяхната полезност за общественото здраве, за предпочитане е базите данни с патогенни геномни секвенции, включително договорено ниво на метаданни, да бъдат публично достъпни, с ясни правила за това на кого се**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



предоставя достъп и как могат да бъдат използвани и оповестени данните и резултатите. Въпреки това базите данни за обществен достъп трябва да бъдат поддържани и обновявани, което води до разходи. Въпреки че базите данни с публичен достъп и инструментите с отворен код не водят до допълнителни разходи за потребителите в LMIC, изчислителната инфраструктура и експертният персонал, необходим за извършване на анализите, ще доведат до сериозни разходи. Липсата на изчислителна инфраструктура често се посочва като пречка пред използването на WGS за наблюдение на AMP в LMIC. Разходите за изграждане на компютърна инфраструктура за анализ на WGS обикновено са десетки хиляди щатски долара. Освен това има разходи за поддръжка на тази апаратура. Лаборатория, която придобива биоинформатична инфраструктура *de novo*, изисква стабилно хранилище за данни. Необходимо е също така да се обезпечи администрирането и инженеринга на системите за изчисляване в биоинформатичния анализ. Съществуват облачни технологии като алтернативи за съхранение на големите масиви от данни, което може да бъде полезен вариант, особено за малки местни и новосъздадени лаборатории. Моделите за наблюдение, при които капацитетът за биоинформатика е централизиран в НРЛ или РРЛ и в които местните центрове изпращат проби или генерирани данни за секвенциите до централния център, са потенциално решение. Въпреки това за уеб базирани анализи и за качване на данни на сървър в референтен център е необходима надеждна интернет връзка.

Няма международно признати стандарти за QC на данните от WGS за типизиране на патогени и откриване на гени на AMP. Някои национални и специфични за патогените мрежи за наблюдение (напр. PulseNet, Gen-FS), публичните институции (напр. централните на САЩ за контрол и профилактика на заболяванията, администрацията на САЩ по храните и лекарствата) и Глобалният микробен идентификатор) са установили стандарти, които могат да бъдат разширени или адаптирани. Най-често използваните показатели за оценка на качеството на данните от WGS са обобщени от *Ellington et al.* **За да може WGS да бъдат включени в международна система за наблюдение на AMP, трябва да се договорят общи показатели за обезпечаване на качеството, за да се гарантира, че резултатите могат да бъдат релевантни и съпоставими.** Изискваните минимални показатели могат да зависят отчасти от използваната технология за секвениране и от последователността на патогенния миктоорганизъм. След секвенцията на бактериалния геном и преди какъвто и да е биоинформатичен анализ, секвенираните фрагменти трябва да бъдат подравнени, асемблирани и да преминат тест за качество. Някои анализи могат да изискват геномно сглобяване (асемблиране), чието качество зависи от алгоритъма на асемблера, характеристиките на генома и качеството на необработените данни, въпреки че може да бъде трудно да се разграничат грешките в сглобяването от биологично значими генетични промени. Трябва да се вземе основано на доказателства решение относно минималното генно

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



покрытие (броят на уникалните четения, които включват даден нуклеотид в реконструираната последователност), необходим за откриване на гени и генни варианти, особено ако трябва да се предвидят фенотипове на АМР въз основа на данни за последователността. Ако това не е възможно, следва да се разработи система на основата на статистически методи за наблюдение на WGS. Такава стандартизация е направена по отношение на причинителя на туберкулозата и инфекциите, пренасяни чрез храна.

Лабораториите следва да участват не само във вътрешната оценка на качеството на процедурата по WGS, но и във външното оценяване на качеството на дейностите по WGS. Външните оценки на качеството за лабораториите на WGS следва да се основават на добре характеризирани, външно потвърдени изолати с известни фенотипни характеристики и мутации от особен интерес. Тази референтна група от изолати следва да бъде изпратена на лабораториите, за да бъде секвенирана и анализирана. Резултатите от АСТ и WGS трябва да са съпоставими и хармонизирани. Външните изпитвания за качество следва да бъдат достатъчно гъвкави за различни лабораторни протоколи, но да са достатъчно строги, за да се гарантира, че всички лаборатории правилно провеждат анализа си чрез WGS.

С използването на валидиращи щамове и техните собствени протоколи лабораториите следва да могат да идентифицират бактериален шам и да определят наличието или отсъствието на АМР гени и мутации с определена точност.

**Американските центрове за контрол и профилактика на заболяванията и администрацията по храните и лекарствата на САЩ имат свободно достъпна биобанка от резистентни изолати, всички от които са секвенирани. Глобалният микробен идентификатор е установил рамка за изпитване на пригодността на лабораториите, които провеждат наблюдение на АМР въз основа на WGS и го тестват с хранителни патогени. Тези бази данни и протоколи биха могли да формират основата на международно одобрен външен стандарт за качество. Стандартите трябва да бъдат достатъчно строги, за да гарантират, че данните от наблюдението са с добро качество, но не следва да бъдат толкова ограничителни, че новосъздадените лаборатории, много от които ще бъдат в LMIC, да не могат да участват.**

За да се гарантира, че в базите данни се качват само висококачествени данни, всяка последователност или резултат, получен от данни за последователността, трябва да отговаря на минимални стандарти за качество, които са сравнително лесни за проверка преди качването. Само данните от WGS, които отговарят на минимален стандарт за метаданни, следва да се използват за анализ. Тези стандарти следва да бъдат определени и договорени от всички държави, участващи в глобална мрежа за наблюдение.

Важен аспект на достъпността и разходната ефективност на WGS за наблюдение на АМР са капиталовите поръчки за оборудване. Цената на техниката за секвениране в НИС варира от около 20 000 щатски долара за *Illumina ISEQ*, US \$ 50 000 за *Illumina*

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



*MiniSeq* или *Ion PMG* до 695 000 щатски долара за *PacBio RSII* или US \$ 1 000 000 за машина *Illumina HiSeq X* (по цени от 2018 г.). Устройствата *ONT MinION* са значително по-евтини, но в момента могат да се използват само за кратки прочити на секвенциите. Цената на гигабайт (Gb) ДНК секвенция спада с повишаването на производителността на секвениращите инструменти. По този начин цената на Gb е около 7 - 10 щатски долара за *Illumina HiSeq X* и US \$ 200 - 400 за *Illumina MiniSeq*. Разходите за секвениране на 1 Gb ДНК с устройство *ONT MinION* са около 100 - 400 щатски долара. По отношение на производителността, цената на Gb секвенирана последователност е малко по-ниска за *Illumina*, отколкото за *Ion Torrent* или *PacBio* устройства. Следва да се вземат предвид и значителните разходи за реактиви, поддръжка и услуги.

**Лабораториите следва да изберат инструмент за секвениране, който да отговаря на техните настоящи и очаквани изисквания по отношение на разделителната способност и обема на работа.** Друго важно съображение е дали ще е необходима секвенция с къс или дълъг прочит, тъй като нито една от настоящите технологии не може да осигури и двете. Изборът на платформа също е ограничен от наличните по биоинформатика.

Разходите за устройства и реактиви и за поддръжка могат да бъдат по-високи в LMIC, отколкото в HIC, поради моделите на ценообразуване.

Допълнителните разходи за оборудване и инфраструктура могат да удвоят разходите за създаване на лаборатория на WGS в сравнение с разходите за секвенатор. Някои лаборатории може вече да разполагат с необходимата инфраструктура, но може да се наложи да реорганизируют или разширят работното пространство. Преустройството на лабораторната среда, така че да побере средно- до високопроизводителен секвенатор, ще изисква значителни допълнителни разходи, както и инструменти за автоматизирано извличане на ДНК, работи за високопроизводителна библиотечна подготовка, друг допълнителен инструментариум и оборудване.

Биоинформатичният анализ включва също така разходите за квалифициран персонал и изчислителни ресурси. Сървърите трябва да бъдат закупени, инсталирани и обслужвани. Ако в страната не може да бъде закупен подходящ сървър, може да се наложи той да бъде изпратен от чужбина, което ще доведе до допълнителни разходи за транспорт и митници. Като алтернатива може да се използват облачните технологии.

**Експертен опит в областта на технологиите на WGS може да се получи по много начини, включително онлайн курсове, университетски курсове (например специализирана магистърска степен), курсове, предлагани от центрове за секвениране, и съвместни научноизследователски инициативи между HIC и LMIC за трансфер и обмен на знания и умения.** Тези формати могат да предоставят обучение и в по-специализирани области, например лабораторни техники или биоинформатични анализи. Най-полезните програми за обучение обаче осигуряват интегриран подход,

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0





който обхваща всички дисциплини, свързани с WGS за наблюдение на АМР и обучение на екипи, а не на отделни лица. Програмите за обучение следва да включват практическа лабораторна работа, умения в областта на биоинформатиката, осигуряване на качеството, биологична безопасност, снабдяване и използване на системи за управление на лабораторната информация. Оптимално обучение се предоставя на мястото, където ще се въведе WGS, тъй като прехвърлянето на новопридобити умения от една лаборатория в друга не е лесно. Повечето инициативи за обучение са локализирани в НИС. Поради това следва да се предоставят местни или регионални програми за обучение и експертен опит, както е направено в региона на Северна и Южна Америка от СЗО; а Индия и Южна Африка имат значителен експертен опит в областта на WGS.

Данните от WGS могат да се събират непрекъснато за наблюдение на АМР (чрез постоянно подаване на нови изолати в базата данни) или в структурирани изследвания (при които произволно подбрани изолати, които са били секвенирани през определен период, се подават в база данни). Последният вариант обикновено е по-лесен за прилагане. Данните, събрани по време на проучванията са достатъчни за интерпретиране и анализ на изолатите с нови механизми за АМР и изолати, секвенирани по време на епизотично проучване. Видовете събрани данни следва да бъдат определени в съответствие с целите на надзора или разследване на огнище, причинено от резистентни щамове бактерии.

**За да могат WGS да бъдат полезни при надзора на АМР на национално и международно равнище, данните, генерирани от отделните лаборатории, трябва да бъдат споделени.** Съществуват стандартизирани бази данни за съхранение на геномни последователности и данни за АМР, но трябва да се обърне дължимото внимание на вида база данни, която ще се използва в съответствие с целите и изискванията на системата за наблюдение. Прогнозирането на фенотипната АМР от данните за секвениране се основава на сравнения с последователността на известните фенотипове на АМР. Идентифицирането на високорискови клонинги се основава на филогенетични анализи, а идентифицирането на нови високорискови родословия се основава на генетиката на популацията от местни или регионални патогени. Поради това от базите данни се изисква да сравняват последователностите.

Въпреки че ползите от обмена на данни при наблюдението на инфекциозните заболявания са общопризнати, загрижеността относно икономическите, политическите или правните последици от резултатите, получени от споделени данни за държави, организации или физически лица, собствеността върху данните и обработката на лични данни може да доведе до нежелание за споделяне на данни. Следва да бъдат на разположение алтернативни платформи за обмен на данни за патогенни микроорганизми и техните геномни секвенции, за да се отговори на нуждите и предпочитанията в различни ситуации. Докладчиците на данни могат да потърсят определен контрол или сигурност по отношение на изтеглянето и използването на данни

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



от проведеното пълно геномно секвениране и по-специално признаване на сътрудничеството, когато резултатите от споделени данни се използват в публикации или обществени съобщения. Използването на клинични данни за разработване на диагностични схеми може да изисква допълнително одобрение от институционалните съвети за преглед и пациентите, които предоставят своите данни. Следва също така да се гарантира, че диагностични средства, терапевтични средства и превантивни агенти, които са разработени с данни от секвентния анализ, са достъпни в държавите, в които е била епидемията, причинена от конкретния секвениран патоген и от които произхождат последователностите.

Споделянето на данни за последователността и свързаните с тях метаданни също поражда регулаторни, логистични и технологични проблеми. Трябва да се разгледат споразумения за това какви данни да се споделят и с кого трябва да се водят преговори, както и местни или регионални изисквания за защита на данните. Пример за регулиране защитата на личните данни е Общият регламент на Европейския съюз относно защитата на данните.

Поради това **в системите за надзор на АМР следва да се регламентират специфични механизми за обмен на данни и също така да се определят какви данни и с кого следва да се споделят**, за да се отговори на нуждите на общественото здраве. Първият въпрос е кои данни следва да се споделят, за да се постигнат договорените цели на надзора на АМР и да се отговори на епидемиологичните въпроси: пълни данни за последователността или генни варианти (т.е. само онези локуси в генома, които се различават между изолатите), данни за отделни изолати или обобщени данни на национално равнище? Видът метаданни, които трябва да се споделят, ще зависи отчасти от патогена, но някои общи изисквания за метаданните биха могли да включват времето на изолиране на бактериалния щам, мястото на произход на изолата, мястото на секвениране и вида на пробата. Тъй като епидемиологичните метаданни са особено чувствителни, достъпът вероятно ще бъде ограничен. Данните от целогеномно секвенирани изолати, без метаданни, могат да бъдат публично достъпни, а подробните лабораторни резултати може да не се споделят открито.

Вторият въпрос е кой трябва да има достъп до данните: органи за обществено здравеопазване, отговарящи за наблюдението на АМР, членове на мрежи за наблюдение на АМР, сътрудници или изследователи при поискване? Или всички данни следва да бъдат публично достъпни? Друг основен въпрос е къде ще се съхраняват данните и къде ще се намират сървърите с данните: локално или централно? Отговорите на въпросите относно най-подходящите начини за обмен на данни за последователността следва да бъдат разгледани от системите и мрежите за наблюдение на АМР на всички равнища.

## Метаданни

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



Метаданните се състоят от синтезирани геномни последователности и клинични, лабораторни и епидемиологични данни. Данните за секвенциите на изолатите трябва да се комбинират с фенотипни, епидемиологични и клинични метаданни за да има пълни, информативни и подпомагащи оценката на риска резултати. Следователно, за да се увеличи максимално използването на данните от WGS, държавите следва да разполагат с достатъчно обучен персонал, епидемиолози, биоинформатици и други специалисти, за да събират, анализират и обобщават такива данни. Видът на изискваните метаданни ще зависи от инфекциозния агент и от предназначението на данните и следва да отговаря на минималните изисквания за събиране на фенотипни данни за AST в GLASS. Консорциумът *Global Microbial Identifier* е определил минимален набор от контекстуални данни. Като минимум метаданните за наблюдение следва да включват анонимна информация за пациентите (възраст, пол, място на изолация, но без информация, която може да бъде идентифицирана от пациента), къде (географско местоположение) и кога (година). Допълнителната полезна информация включва източника на изолата (напр. анатомично място, тъкан, изпражнения), индикация за изследване (т.е. клинична инфекция/ огнище или мониторинг) и данни за AST. За инфекции, пренасяни чрез храна или зоонози, следва да бъдат включени хранителните матрици или видовете животни, които са били източник на инфекция, ако са известни. За инфекции, предавани по полов път, сексуалната ориентация на пациентите е ценна информация, тъй като различните щамове могат да се разпространяват по различен начин. За пробите от околната среда може да се включи информация като описание на материала, съставляващ пробата, и мястото на събиране (географска дължина, ширина).

Често данните от WGS се генерират по-бързо и се споделят по-бързо от свързаните с тях метаданни поради високата степен на автоматизация и стандартизация на WGS и липсата или недостатъчното използване на системите за управление на лабораторната информация в много LMIC; данните от WGS обаче са далеч по-малко полезни за осъществими заключения и предприемане на съответните мерки при липсата на метаданни. Когато последователностите се качват в онлайн база данни, те получават номер за достъп, който, когато са необходими бързи действия, например по време на избухване на епидемия от силно разпространяващ се патоген, позволява бързо свързване на метаданните с данните от WGS чрез определени, стандартизирани формати и полета за въвеждане. Епидемиолозите, клиничните специалисти и здравните работници следва да бъдат информирани за метаданните, които трябва да се събират за наблюдението на АМР, и за начините за тяхното споделяне. Обща грижа при предоставянето и анализирането на метаданни е неприкосновеността на личните данни и те следва да се предоставят по такъв начин, че физическите лица или понякога институциите да не могат да бъдат идентифицирани, например с уникални идентификатори на субекта. Местната лаборатория следва да съхранява данни за пациентите, които могат да бъдат споделяни с РРЛ или НРЛ. НРЛ съхраняват данни за лабораториите в своите мрежи, но

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



могат да обобщават данни на национално равнище, преди да ги споделят на международно равнище.

Когато се използват диск дифузионни методи, трябва да се комбинират диаметрите на зоните на инхибиране на растежа с данни за вътрешната QC. Клиничните гранични стойности и епидемиологичните гранични стойности могат да се променят с течение на времето и следователно може да бъде трудно да се интерпретират данни от миналото, ако резултатите се докладват само като отделни категории възприемчиви/повишена експозиция (Европейски комитет за изпитване на антимикробната чувствителност) или междинни /резистентни (Институт за клинични и лабораторни стандарти). Освен това епидемиолозите, работещи в областта на AMP, следва да декларират кой стандартизиран метод, насоки, реагенти, китове и компоненти са използвани и да представят своите вътрешни данни за обезпечаване на качеството. Стандартите на Европейския комитет за изпитване на антимикробната чувствителност или на Института за клинични и лабораторни стандарти могат да се използват, ако се съхраняват необработени данни.

**Системата за управление на лабораторната информация е от ключово значение за стандартизирането на събирането на метаданни и интегрирането на метаданните с данните от WGS.** Стандартизацията на метаданните ще бъде най-ефективна, ако формулярите за въвеждане съдържат полета, които трябва да бъдат попълнени преди качването. В клиничните и микробиологичните изследвания системите за управление на информацията се използват рутинно за записване на данни за пациенти и изолати, въпреки това, видът на използваната система варира в рамките на и между отделните държави и лаборатории. За WGS в наблюдението на AMP, системата следва да бъде цифровизирана (поне в НРЛ) въз основа на документиран стандарт за данни и да осигурява променлив интерфейс за свързване на съответните метаданни с данните от WGS. За да се постигне стандартизация, трябва да се гарантира оперативната съвместимост на системите за управление на информацията, използвани от различните лаборатории, или за различните работни процеси.

Свързването на метаданни с геномни филогенетични анализи предлага важни познания за наблюдението на AMP, включително изясняване на механизмите за предаване на различни видове, потенциалните начини на предаване на патогени и кой в популацията допринася най-много за предаването. Данните от WGS могат да бъдат достатъчно диференциращи, за да се насочват към случаи, свързани с контакти между общностите или болниците, и по този начин да се предотврати по-нататъшното разпространение и да се разследват генетично свързани случаи без ясна епидемиологична връзка. Непрекъснатият мониторинг, основаващ се на пълно геномно секвениране позволява идентифициране на детерминантите на предаването, наблюдение на развитието и адаптирането на патогените, точна и навременна диагностика на

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



инфекции с епидемичен потенциал и усъвършенстване на стратегиите за техния контрол.

## **Национално и международно съпоставяне на данни за Глобалната система за наблюдение на антимикробната резистентност и употреба**

СЗО *GLASS* събира, управлява и анализира данни за AST от микробиологични лаборатории. Държавите, включени в *GLASS*, могат да използват всеки софтуер за въвеждане на данни; въпреки това софтуерът *WHONET* е безплатен и е адаптиран за целите на *GLASS* за държави, които нямат определен софтуер за наблюдение на AMP. *WHONET* може да преобразува лабораторни кодове и формати в своя собствена структура и може да бъде адаптирана така, че да включва резултатите от WGS. *WHONET* обаче понастоящем се основава на прост текстов формат, докато базата данни WGS за предпочитане се основава на по-гъвкав формат, който позволява сложни заявки, като например SQL формат.

*GLASS* може да използва съществуващите бази данни за микробни секвенции и да ги включи в мониторинга и анализа на AMP. За да се улесни това използване, следва да се разработи единна номенклатура за видовете данни и полетата с данни, с единен интерфейс за достъп до всички бази данни. Функционалността на интерфейса следва да бъде гъвкава, тъй като различните държави са на различни етапи от прилагането на наблюдението на AMP. Данните, предоставени в базите данни, следва да отговарят на вътрешните параметри за обезпечаване на качеството, а лабораторията следва да демонстрира адекватни резултати във външните тестове за пригодност.

## **Използване на данни от целогеномното секвениране за разработване на *in vitro* диагностични тестове, методи и нови лечения и ваксини за инфекции, причинени от патогени, резистентни на антимикробни агенти**

Молекулярните *in vitro* диагностични тестове за AMP се използват за откриване на придобитите гени или мутации в геномите на бактериалните патогени, които ги правят резистентни към един или повече антимикробни средства. Някои диагностични тестове за AMP се основават на откриване на протеини, кодирани от придобити гени за резистентност, например имунохроматографски тестове за хоризонталния генен поток за откриване на клинично значими карбапенемизи (подобни на Окса-48, *K. pneumoniae* карбапенемаза, Ню Делхи метало- $\beta$ -лактамази, имипенемаза, Верона интегрон-кодиран метало- $\beta$ -лактамаза, MCR-1, ESBL и PBP2a). Данните на равнище популация за геноми на патогенни бактерии, гени и мутации, които посредничат на AMP, могат да се използват както при разработването на нова молекулярна диагностика, така и при интерпретирането на съществуващите тестове за откриване на патогени, резистентни на

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



антимикробни средства. Тъй като AMP при бактериалните патогени се развива бързо, ще е необходимо непрекъснато наблюдение на молекулярната и фенотипната AMP, за да се запази чувствителността и специфичността на молекулярните диагностични тестове. Целенасочената молекулярна диагностика е по-евтина от WGS и може също така да бъде подходяща за използване в случаите, при които пълното прилагане на WGS все още не е възможно и когато секвенирането на бактериален геном от клинични проби е от решаващо значение за времето на реакция и предприемане на мерки. Освен това данните от мониторинга чрез WGS, които са представителни за даден географски регион, могат да се използват за подобряване на специфичното за региона тълкуване на молекулярните диагностични тестове. Новата молекулярна диагностика следва да бъде валидирана спрямо добре характеризирани щамове със съответните AMP гени и мутации. Разработени са и одобрени за клинична употреба вече няколко молекулярни диагностични теста за AMP.

Данните от наблюдението на WGS могат да се използват и при разработването на ваксини и нови антимикробни средства. Например **познаването на молекулярните механизми зад фенотипа на AMP може да се използва при подбора на кандидат-лекарства**, които избягват тези механизми на AMP и намаляват риска от кръстосана резистентност. Биобанка от резистентни щамове и техните данни за генома може да се използва по време на предклиничното изследване на нови антимикробни средства, за да се гарантира, че те са активни не само срещу клинично значими щамове, но и срещу щамове с различен генетичен произход.

## Заклучения

**WGS може значително да подобри наблюдението на AMP на местно, регионално и световно равнище. Пречките пред преминаване на наблюдението и диагностиката на AMP от фенотипни методи към WGS в областта на общественото здраве и въвеждането на WGS в LMIC включват високи първоначални и системни инвестиции, разходи за лабораторна и компютърна инфраструктура и експертен опит, високи разходи за поддръжка и изисквания за обучение;** съществуват обаче **решения на повечето от тези проблеми**, така че държавите да могат да участват в мрежите за наблюдение на AMP чрез WGS. Например **включването на няколко държави в консорциуми при оборудване на лабораториите** могат да договорят **по-ниски цени** за секвениращи инструменти и диагностични китове и реагенти, а всички биоинформатични анализи могат да се публикуват на сървъри, или в облак, така че местните лаборатории да не се нуждаят от скъпа изчислителна инфраструктура на място.

Очаква се **разходите за WGS да спаднат още повече**, тъй като те стават все по-широко използвани не само за секвениране на патогени, но и за секвениране на човешки геноми за медицински цели. Системите за надзор на AMP, които не могат да отговорят

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



на изискванията за създаване на лаборатория за WGS, могат да участват в модели „*hub-and-spoke*“, в които изолати на патогени от местни центрове се изпращат в референтна лаборатория за секвениране.

Прилагането на **WGS за глобален надзор на АМР** ще изисква стандартизация на методите на **WGS и валидиране**, за да се гарантират висококачествени и сравними данни от различни лаборатории. Фактът, че много държави планират или въвеждат WGS в своята система за наблюдение на АМР, предлага възможност за висока степен на стандартизация. **Първоначална стъпка** може да бъде **WGS на няколко избрани приоритетни патогена от GLASS** въз основа на националния или регионалния опит. Това би показало добавената стойност на WGS за надзора на АМР, а патогените и механизмите на АМР, които ще бъдат изследвани, следва да бъдат избрани с оглед на тази цел. Подобни инициативи биха могли да окажат въздействие в световен мащаб, тъй като много резистентни патогени в LMIC разполагат с нови механизми за АМР.

**По-важните изводи за България**, които могат да бъдат направени са следните: **молекулярната идентификация и секвентният анализ са методи, които могат да послужат при идентифициране и класифициране на патогенни микроорганизми**, които са преносители и причинители на много заболявания по животни и хора и са разпространени все по-често в България.

**Пълният геномен секвентен анализ, биоинформатиката и метагеномният анализ** могат да бъдат **изключително полезни** и в духа на стратегията на Европейския съюз „Едно здраве“ (“One Health”) и поради постоянно възникващите заболявания, увеличаващата се антимикробна резистентност на причинителите. **Желателно е внедряване на молекулярните и биоинформатичните методи в рутинната диагностика и анализ до 2026г.** (Пълният геномен секвентен анализ (WGS) по препоръка на Европейския орган по безопасност на храните (ЕОБХ), Световната здравна организация (СЗО) и Организацията по прехрана и земеделие (FAO) трябва поетапно да замени конвенционалните методи на изпитване при охарактеризиране на патогенните причинители в храни, в околна среда, изолати от хора и животни до 2026 г.).

Трябва да бъде създадена на национално ниво единна хармонизирана платформа за данни от проведено пълно геномно секвениране или метагеномен анализ, която да е с различни нива на достъп за всички заинтересовани страни.

Трябва да има **колаборация между заинтересованите институции и работа в екип за постигане на тези цели**. Трябва да бъде изградена обща платформа за сътрудничество, която да осигури ползването на съществуващите лабораторни и диагностични звена от всички институции.

## Изготвил:

Красимира Захаријева,  
Главен експерт в Дирекция ОРХВ, ЦОРХВ

## Използвана литература:

- *Jonas O, Irwin A, Berthe F, Le Gall F, Marquez P. Drug-resistant infections : a threat to our economic future. Washington DC: World Bank; 2017.*
- *Jasovský D, Littmann J, Zorzet A, Cars O. Antimicrobial resistance-a threat to the world's sustainable development. Uppsala J Med Sci. 2016;121(3):159–64.*
- *Gerner-Smidt P, Besser J, Concepción-Acevedo J, Folster JP, Huffman J, Joseph LA, et al. Whole genome sequencing: bridging one-health surveillance of foodborne diseases. Front Public Health. 2019;7:172.*
- *One Health Global. One Health Global Network webportal 2015 (<http://www.onehealthglobal.net/what-is-one-health/>, accessed April 2020).*
- *Global antimicrobial resistance surveillance system: manual for early implementation. Geneva: World Health Organization; 2015.*
- *Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. Geneva: World Health Organization; 2019.*
- *Hendriksen RS, Munk P, Njage P, van Bunnik B, McNally L, Lukjancenko O, et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. Nature Commun. 2019;*
- *Whole genome sequencing for foodborne disease surveillance: landscape paper. Geneva: World Health Organization; 2018.*
- *Genomics for infectious disease management. Cambridge: PHG Foundation; 2016*
- *Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype–phenotype correlations in a collection of isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2019;*
- *Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. Clin Microbiol Infect. 2017;*
- *Doyle RM, O'Sullivan DM, Aller SD, Bruchmann S, Clark T, Pelegrin AC, et al. Discordant bioinformatic predictions of antimicrobial resistance from whole-genome sequencing data of bacterial isolates: an inter-laboratory study.*
- *Balloux F, Brønstad Brynildsrud O, van Dorp L, Shaw LP, Chen H, Harris KA, et al. From theory to practice: translating whole-genome sequencing (WGS) into the clinic. Trends Microbiol. 2018;*
- *Hendriksen RS, Bortolaia V, Tate H, Tyson GH, Aarestrup FM, McDermott PF. Using genomics to track global antimicrobial resistance. Front Public Health.*
- *PulseNet. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 2019*
- *GLASS whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance*

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0





- *Nadon C, Van Walle, Campos J, Chinen I, Concepcion-Acevedo J, et al. PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. Eur Surveill. 2017;*
- *Bridging genomics, microbiology and big data to tackle global antimicrobial resistance (AMR). Bethesda (MD): Global Health Research Unit. National Institute for Health Research; 2019*
- *WHO GLASS guidance for national reference laboratories. Geneva: World Health Organization; 2020.*
- *Gwinn M, MacCannell D, Armstrong GL. Next-generation sequencing of infectious pathogens. JAMA. 2019;*
- *Moran-Gilad J, Sintchenko V, Pedersen SK, Wolfgang WJ, Pettengill J, Strain E, et al. Proficiency testing for bacterial whole genome sequencing: an end-user survey of current capabilities, requirements and priorities.*
- *Taboada EN, Graham MR, Carriço JA, Van Domselaar G. Food safety in the age of next generation sequencing, bioinformatics, and open data access. Front Microbiol. 2017;*
- *Hicks AL, Kissler SM, Lipsitch M, Grad YH. Surveillance to maintain the sensitivity of genotype- based antibiotic resistance diagnostics. PLoS Biol. 2019;17(11):e3000547.*
- *Köser CU, Ellington MJ, Peacock SJ. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. Trends Genet. 2014;*

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0

