



## Следващата пандемия: антимикробна резистентност

Настоящата и непрекъсната поява на бактерии, резистентни на антимикробни средства, засега остава „невидима пандемия“. Антимикробната резистентност (АМР) е сериозна заплаха за здравето и развитието в световен мащаб и изисква спешни действия. Настоящият темп на разработване на нови антибиотици не е достатъчен за предотвратяване на инфекции, причинени от антимикробно резистентни патогени в световен мащаб, които понастоящем убиват 700 000 души годишно. Антимикробно резистентни бактериални инфекции не могат да бъдат лекувани с настоящите антибиотици.

Глобалните научни изследвания са насочени към АМР, но са необходими политики в подкрепа на по-голямото превръщане на научните изследвания в продукти и решения.

Антибиотиците са вещества, които убиват или потискат растежа на бактериите и са в основата на нашата защита срещу редица бактериални инфекции, които в противен случай биха били нелечими. Те дават възможност за безопасно и ефективно лечение на много инфекциозни заболявания, особено на тези, които се нуждаят от хоспитализация, където рискът от инфекция се увеличава. Те допринесоха за удължаване на средната продължителност на човешкия живот през последните 60 години и за едновременен икономически растеж през същия период.

Антимикробните средства се отнасят по-общо до редица вещества, които убиват или забавят растежа на микроорганизмите. Всички антибиотици са антимикробни средства, но не всички антимикробни средства са антибиотици.

Въпреки това, златната ера на антибиотиците е застрашена. Бактериите могат да се „защитават“ срещу повечето антибиотици, като мутират или придобиват нови гени и стават резистентни към антибиотици. Това е известно като антимикробна резистентност или АМР. Изправени сме пред задаваща се криза в общественото здраве и евентуално още една пандемия — понастоящем „невидима пандемия“ в резултат на бързото ускоряване на АМР и намаляването на инвестициите от страна на фармацевтичните дружества в нови открития на антибиотици. Световната здравна организация обяви АМР за един от 10-те най-важни глобални здравни въпроса, които се нуждаят от внимание.

Пандемията от COVID-19, последвалата я здравна криза и мерките в областта на общественото здраве за борба с нея подчертаха опустошителните последици от неконтролираното разпространение на инфекциозно заболяване без ефективно лечение. Антибиотиците толкова успешно са лекували бактериални инфекции, че до голяма степен сме забравили какво е да живееш в предантибиотичната ера и да се борим да си представим какво би било да живееш в потенциалната реалност на една постантибиотична ера. Нарастващото разпространение на АМР заплашва да доведе света към сценарий, при който няма ефективно лечение за често срещани

**бактериални инфекции.** Понастоящем болестите, които могат да бъдат управляеми, стават нелечими: в момента свършват ефективните антибиотици и защитните системи срещу АМР се нуждаят от укрепване.

Резистентни към лекарства бактерии могат да заразят всеки, независимо от възрастта, местоположението или общите нива на здравен статус на популацията. Без ефективни антибиотици, често срещаните бактериални инфекции, като инфекции на пикочните пътища, хранителни отравяния или инфекции, придобити по цялата агрохранителна верига могат да доведат до повишена заболяемост на пациента (болест) и в тежки случаи — до смъртност.

**АМР оказва отрицателно въздействие върху качеството на живот на индивида.** Тъй като АМР се увеличава и резистентни бактерии се предават чрез общността, здравето и здравните системи в световен мащаб са застрашени. **Рутинни медицински процедури като третиране на рани, оперативни интервенции и химиотерапия при онкоболни пациенти,** които разчитат на антибиотично лечение, ще бъдат **застрашени** — инфекцията, която може да се лекува веднъж, може да се превърне в множество, нелечими, хронични и персистиращи инфекции в цялото тяло. **Пациентите, които имат резистентна инфекция, имат по-лоши резултати, имат по-дълъг престой в болница и се нуждаят от лечение с критично важни антибиотици от „последна линия“,** които имат значителни странични ефекти, включително увреждане на нервната система, органна недостатъчност и загуба на слуха. Антибиотиците от последна линия са лекарства, които се използват само когато други по-често използвани антибиотици не успяват да лекуват инфекцията.

**Както и при COVID-19, въздействието на АМР ще обременява уязвимите групи от населението,** включително възрастните хора, имунокомпрометираните и тези, които живеят в отдалечени региони. Пациентите с антимикуробно-резистентни инфекции е по-вероятно да развият здравословни усложнения и **смъртността им е 2—3 пъти по-висока.**

В допълнение към последиците от АМР има отрицателно въздействие върху нашата общност и икономическата производителност. Например антимикуробните инфекции вече увеличават разходите за здравеопазване - в Австралия средният брой допълнителни болнични дни, свързани с АМР, е 142 дни на 100 000 пациенти. В световен мащаб **антимикуробните инфекции причиняват 700 000 смъртни случая всяка година.** Например австралийските болници харчат допълнителни 11.3 милиона долара годишно, за да лекуват само две от многото заплахи за АМР.

Ако не бъдат взети мерки, **до 2050 г. в световен мащаб АМР би могла да причини 10 милиона смъртни случая в сравнение с 8,2 милиона смъртни случая, причинени от ракови заболявания.**

### **АМР: австралийските перспективи**

Нивата на инфекции с резистентни бактерии в Австралия например са по-високи отколкото във всяка европейска страна. Често срещаните заболявания като тиф и

предавани по полов път инфекции (като гонорея), които обикновено се лекуват лесно с антибиотици, стават все по-устойчиви на стандартните антибиотични лечения. Около 290 индивида умират годишно от инфекции, причинени от осем антиминобни резистентни бактериални патогени. Без намеса, този брой бързо ще ескалира до повече от 10 000 жертви на Австралия всяка година до 2050 г., при разходи за здравеопазването от над 400 милиона долара.

Политиките на Австралия в областта на АМР, включително националната стратегия на австралийското правителство за АМР за 2020 г. и след това, са в съответствие с Глобалния план за действие на СЗО (GAP). Австралия е предприела следните мерки за намаляване на АМР: засилен мониторинг на АМР и употребата на антибиотици, управлението на продажбите на антибиотици (т.е. усилията за спазване на основаващото се на доказателства предписване и предотвратяването на неподходяща употреба) и укрепване на болничната инфраструктура и обучение за контрол на инфекциите. Австралия също така ръководи няколко съвместни инициативи, насочени към АМР в този регион в отговор на непосредствената заплаха от резистентни инфекции.

Въпреки че тези мерки и действия са важни, напредъкът на Австралия по други стратегически цели от СЗО GAP изостава. Необходимо е да се даде приоритет на повишаването на обществената осведоменост относно АМР: това е предпоставка за промяна на стандартната лекарска практика относно лекарското предписание на тази група лекарства, за ограничаване употребата на антибиотици от пациентите и за стимулиране на политическите действия за разработване на нови и устойчиви решения.

## **Справяне с антиминобната резистентност**

АМР е глобално предизвикателство за здравето, което изисква съгласуван глобален отговор. **Подобно на глобалния отговор на COVID-19**, разпространението на резистентни към лекарства бактерии не е задължително ограничено в рамките на географските граници. **Действията на една страна засягат другите, ако нациите действат независимо една от друга.** Вече в световен мащаб се наблюдава резистентност към често използваните антибиотици.

Защитните системи за АМР могат да бъдат укрепени чрез политики за образование и насърчаване на поведенческите промени в предписването и употребата на антибиотици. Освен това следва да се създаде икономическа рамка за разработване на нови антиминобни лекарства, диагностика и ваксини. Не може да се чака или да се разчита на иновациите и суверенните способности на други държави, както показва пандемията от COVID-19.

## **Промени в поведението**

Агрохранителната верига предоставя пример за неустойчивата употреба на антибиотици. Например в Австралия, употребата на антибиотици е строго регламентирана от Австралийския орган по пестициди и ветеринарни лекарства (APVMA). APVMA изисква задълбочена оценка на риска от развитието на АМР, 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

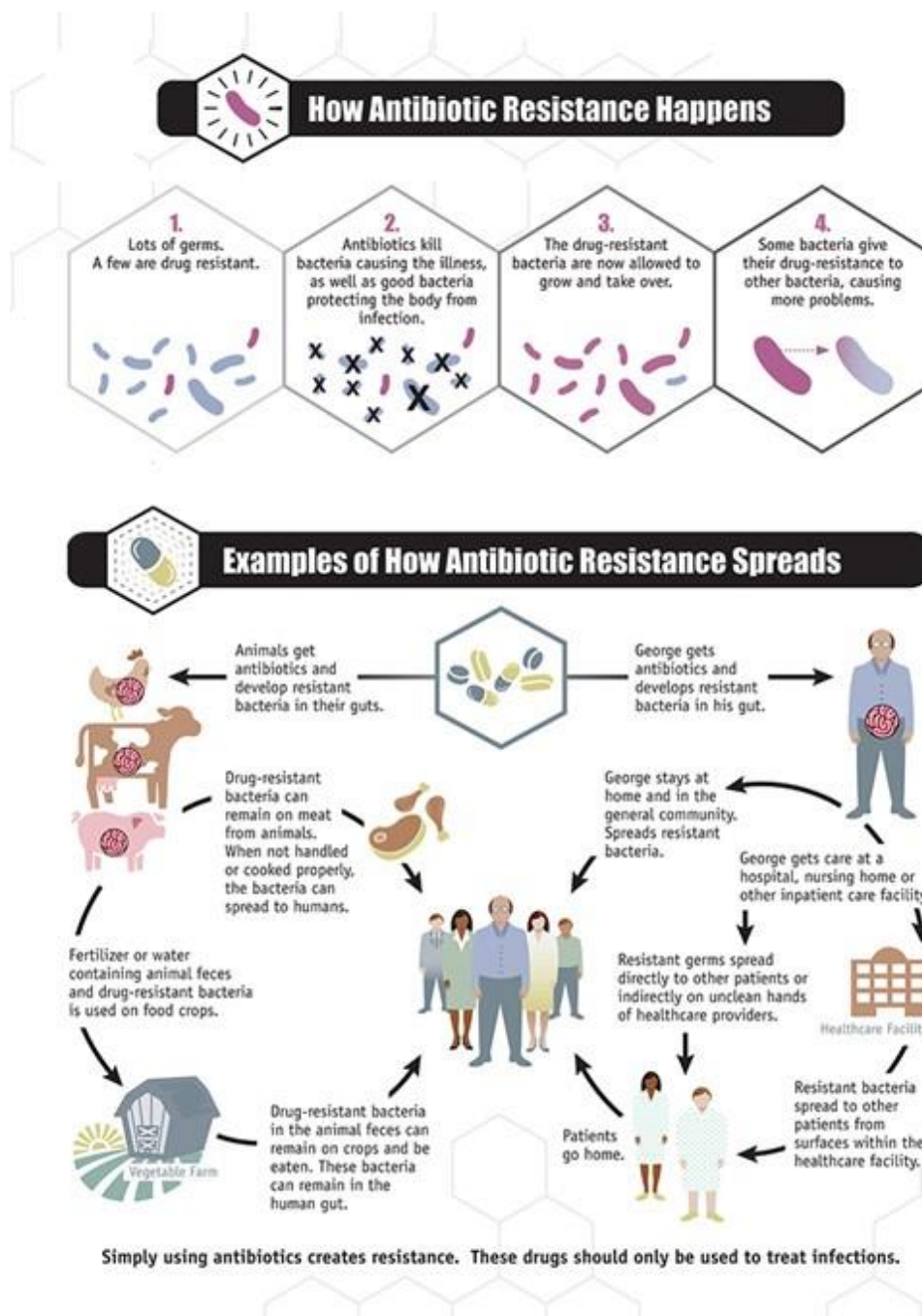


да се одобри нов антибиотик за употреба в животновъдството, растениевъдството и аквакултурите. В исторически план антибиотиците са използвани за насърчаване на растежа на добитъка, което понастоящем е забранено. Профилактично или метафилактично (лечение на засегнати и намиращи се в контакт животни в случай на огнище) употребата на антибиотици все още е необходима за лечение и контрол на някои бактериални инфекции при добитъка. В някои страни има строги правила по отношение на употребата на антибиотици, които са от решаващо значение за човешкото здраве при добитъка. **Настоящите практики за употреба на антибиотици в областта на здравеопазването на човека са неустойчиви в някои области и управлението на продажбите на антибиотици и управлението на употребата на антимикробни средства в хуманната медицина биха могли да бъдат подобрени.** Една от водещите причини за повишена АМР е злоупотребата и прекомерната употреба на антибиотици в здравните грижи, особено в общностни условия.

Въпреки че от 2010 г. се наблюдава обща низходяща тенденция при употребата на антибиотици, тя остава твърде висока — почти една четвърт от рецептите за антибиотици са неподходящи, което впоследствие увеличава АМР. Докладът AURA 2019 г. показва, че антибиотиците продължават да се предписват за заболявания, за които не са ефективни, включително остър бронхит и грип, които са заболявания, причинени от вируси и не могат да бъдат лекувани с антибиотици.

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





*Фиг. 1: Антибиотичната резистентност може да се разпространи, когато резистентни към лекарства бактерии надделят над коменсалните бактерии. (CDC)*

### Разработване на нови антибиотици

Въпреки АМР заплахата за ефективността на съществуващите антибиотици, производството и разработването на нови антибиотици върви с изключително бавни темпове. През 2018 - 2019 г. Администрацията по храните и лекарствата на САЩ (FDA) одобри девет нови лечения за бактериални инфекции; всички обаче са или производни на настоящите антибиотици, или са одобрени за употреба 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





комбинация с настоящите антибиотици. Нито едно от тези нови лечения не е наистина изцяло нов антибиотик с нови механизми на действие.

Новите антимикробни средства трябва да бъдат достъпни за общността и в идеалния случай техният курс на лечение да бъде ограничен. Това означава, че частният сектор няма голям стимул да разработва нови антимикробни средства и следователно малко са в процес на разработване. **Фармацевтичните компании** балансират нарастващите разходи за научноизследователска и развойна дейност с **финансовия риск, който предизвикват кандидатите за нови лекарства и относително слабата възвръщаемост.** При липсата на ускоряване на R&D и ново откриване на антибиотици, трябва да се разчита на добро управление и добри мерки и действия, за да се сведе до минимум разпространението на АМР.

Фундаментални и приложни изследвания в областта на АМР вече са предприети в повечето страни по света. Превръщането на научните изследвания в реални решения обаче изисква правителствени стимули за партньорства с местни и международни фармацевтични и медицински индустрии. Водещ пример за публично-частни партньорства, които могат да ускорят иновациите в областта на антимикробните средства, е **CARB-X** — инициатива, ръководена от **Бостънския университет** и подкрепа от **САЩ и Европа.** В друг пример **Фондът за действие в областта на АМР,** създаден от група фармацевтични дружества през 2020 г., има за цел до 2030 г. да предостави на пациентите между два до четири нови антибиотици.

**Фондът за бъдещето на медицинските изследвания (MRFF)** подкрепя инициативи за АМР, насочени към наблюдение и откриване, като използва предимно нови геномни технологии. Проследяването на АМР в уязвима среда, като например заведенията за полагане на грижи в домашни условия, се подпомага от 2017 г. в рамките на Глобалната здравна инициатива на MRFF. Приоритетите на MRFF за 2020 - 2022 г. включват **разработването на стратегии за прилагане на нови терапевтични решения.** Изследователският център на Австралийския научноизследователски съвет (ARC) за борба с антимикробната резистентност разработва по-бързи, по-точни диагностични и фармацевтични решения. През 2020 г. за първи път австралийските изследователи привличат финансиране от CARB-X за разработване на **модифицирани, безопасни антибиотици от последна линия за лечение на сериозни инфекции.** Въпреки че модификацията и промяната на предназначението на лекарствата могат да осигурят краткосрочни решения за АМР, дългосрочните решения изискват нови терапевтични средства и по-добри стратегии за мониторинг и управление. Изследванията в много страни по света са насочени към изследване на потенциални стратегии, включително разработването на **алтернативни антимикробни терапевтични подходи** като **фаготерапия, анти-вирусни лекарства** (намаляване на вредността на заболяването), **ваксини** срещу бактериални инфекции и **антибиотични аджуванти** (вещества, които могат да подобрят антибиотичната активност или имунния отговор). В допълнение към терапевтичните иновации, научните изследвания в областта на **биомедицината, биоинженерството и усъвършенстванията** **производствен интерфейс** набират скорост. Центровете за научни разработки и изследвания и

центровете за обучение разработват **нови активни химични вещества и антимикробни основи, транспортни системи на активното вещество и алтернативни системи за доставяне на лекарства.** Усилията в областта на научните изследвания обаче биха могли да бъдат по-добре координирани чрез обхващане на правителствени, промишлени и научноизследователски организации. През септември 2020 г. например бе създадена първата австралийска мрежа за антимикробна резистентност, която да обедини основните заинтересовани страни. Това отразява международни инициативи със същата цел, включително **мрежата на заинтересованите страни в областта на АМР,** създадена през 2017 г. **в рамките на Платформата за здравна политика на Европейската комисия,** която обединява експерти и организации на национално, регионално и европейско равнище.

Изводът е, че инвестициите в науката, включително научните изследвания в областта на АМР, ще донесат значителни дългосрочни ползи за здравеопазването, здравните системи и икономиката. **Без ефективни антибиотици** е напълно ясно, че в рамките на десетилетия **ще се върнем към „тъмните времена“** - време, когато повърхностните драскотини могат да са смъртоносни и стандартните медицински процедури са компрометирани или неефективни. **Цената в световен мащаб** би била **огромна** както **от социална гледна точка** (увеличена ненавременна смърт), така и **от икономическа гледна точка** (цена на заболяемостта, лечението и смъртността).

Инвестирането сега в нови начини за откриване, управление, свеждане до минимум, лечение и докладване на бактериални инфекции ще подпомогне глобалната система за обществено здравеопазване в бъдеще. **Значението на една ефикасна и ефективна система за обществено здравеопазване** (включително медицински изследвания) **за профилактика и лечение на инфекциозни заболявания никога не е било по-ясно демонстрирано, отколкото по време на пандемията от COVID-19.** Засега АМР може да е невидима пандемия, но тя е следващата в списъка и въздействието ѝ ще се усети в световен мащаб във всички възрастови групи за много поколения напред.

*Фиг. 2: Взаимовръзки на АМР с целите за устойчиво развитие:*



**Изследователите на MIT правят напредък по отношение на антибиотичната резистентност по програмата за изследвания на DTRA-JSTO**

Изследователите отбелязват **значителен напредък в антибиотичната резистентност по програмата „Откриване на медицински контрамерки срещу нови**

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



**и възникващи заплахи“ (DOMANE)** на Отдела за намаляване на химическите и биологични технологии на Агенцията за намаляване на заплахите за отбраната (DTRA) в ролята ѝ на Съвместна научно-технологична служба (JSTO) за химическа и биологична отбрана.

Изследователският екип от Масачузетския технологичен институт (MIT) откри нов път, използван от бактериите *E. coli* за избягване на антибиотичния контрол. Когато резистентни към антибиотици бактерии се разпространяват неконтролирано, това представлява значителна заплаха за обществеността. Въпреки десетилетията на научни изследвания в областта на борбата с антибиотичната резистентност, новото научно разбиране на явлението продължава да бъде необходимост. Откриването на механизъм за антибиотична резистентност може да предостави възможности за разработване на **иновативни терапевтични подходи** за премахване на бактериалните инфекции и осигуряване на по-добра защита за нацията.

**Механизмите за бактериална резистентност** към антибиотици са сложни, но традиционно са категоризирани в **три широки групи**:

- **Целева модификация** възниква, когато бактериите се променят, за да се избегне взаимодействие с лекарството, например **при мутации или споделяне на гени на резистентност**
- **Инактивиране на лекарството** настъпва, когато бактериите правят лекарството неефективно
- **Неуспех при транспортирането на лекарството** възниква, когато лекарството не е в състояние да достигне целта си да убие бактериите

Изследователите излагат **активно растящите *E. coli* на определени антибиотици, които налагат селективен натиск и „обогатяват“ оцеляването на бактериите с мутации в гените, отговорни за метаболизма, които не са били оценявани преди това от учените. По този начин някои бактериални процеси са сведени до минимум, което възпрепятства антибиотиците да убиват бактериите и води до антибиотична резистентност.** Изследователският екип открива, че **няколко специфични за метаболизма мутации са изобилни в геномите на повече от 3500 клинични патогенни изолати *E. coli*. DOMANE** изследванията на *DTRA-JSTO* разширяват известните процеси за антибиотична резистентност отвъд обичайните механизми. Откритието може да бъде разширено отвъд *E.coli* до бактериални патогенни агенти, ендемични в определени географски райони, а също и такива, които са създадени в лабораторна експериментална среда.

## **Намиране на нови антибиотици: Геномният начин**

Професор Тилман Вебер обсъжда как микробната геномика помага да се намери следващото поколение антибиотици в надпреварата срещу антимицробната резистентност. **Пандемията от COVID-19** показва **драматично уязвимостта на човечеството към инфекциозни заболявания**, особено при липсата на ваксина или лекарство за лечение на инфекциите. За щастие, за много инфекциозни заболявания, причинени от бактериални патогени, има все още ефективни лекарства — антибиотици

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





за лечение на тях. За тези заболявания обаче съществува и тревожна тенденция: Все по-голям брой патогенни бактерии са придобили антимикробна резистентност, която прави много антибиотици безполезни и прави преди лесно лечими инфекции животозастрашаващи или дори смъртоносни. Понастоящем **повече от 700 000 души умират всяка година от инфекции, причинени от резистентни на лекарства бактериални патогени, включително 230 000 души, които умират от мултирезистентна туберкулоза, според ООН.**

### **Намиране на нови „скрити“ антимикробни средства**

Важен стълб за справяне с това сериозно глобално предизвикателство е разработването на **нови антимикробни средства**. **Промишлените фармацевтични производства** обаче са **в съвсем начален етап** за разработване на нови класове антибиотици. За да се разбере защо, трябва да се погледне назад във времето.

В исторически план повечето антимикробни средства произхождат от бактериални или гъбични микроорганизми. Особено **през 50-те и 60-те години**, полето за откриване на антимикробни лекарства преживява „**златна ера**“, като много от настоящите антибиотици се откриват и разработват. **От 70-те години** на миналия век обаче се наблюдава **огромен спад в разработването на промишлени антибиотици**. С много антибиотици, които не са патентовани, цените на антибиотичните терапии са спаднали значително, намалявайки търговския интерес към целия пазар за разработване на антибиотици. Освен това са налице **научни предизвикателства**: По време на мащабните кампании за скрининг през 1950 - 70-те години на миналия век повечето от старите антибиотици са се внедрили като обещаващо лечение. Новите антибиотици са били по същество твърде трудни за намиране и развитие в сравнение с възвращаемостта.

Ситуацията днес е почти същата. Но поради нарастването на антимикробната резистентност и **новите методи за секвениране на генома**, полето бавно се отваря отново. Вместо да разчитат единствено на изолиране и характеризирането на бактерии, които са култивируеми, изследователите се обръщат към „**Genome Mining**“. С този подход идентифицирането на т.нар. **биосинтетични генни кълстери (BGC)** от потенциално произвеждащи организми **стана осъществимо**. Тази тенденция е силно **подкрепена от паралелното разработване на мощен софтуер за биоинформатичен анализ**, който помага на учените в тази задача. В продължение на десет години учените от DTU Biosustain разработват такива инструменти, например широко използваната **antiSMASH** платформа.

Идентифицирането на често срещани BGC, кодиращи потенциално ново съединение и които не се експресират в лабораторни условия е само първата стъпка; диагностиката и охарактеризирането на такива генни локуси се нуждае от „допълнителни разработки и *upgrade*“. Въпреки че това все още е предизвикателство, новите технологии за гено инженерство, базирани на CRISPR, за да проектират производствените щамове, както и методите за миграция на BGC от слабо проучени организми в оптимизирани клетъчни работни линии помагат „да се върнем в играта“.

## Проект *IIMENA* за откриване на антимикробни средства от следващо поколение

Различните технологии, разработени в *DTU Biosustain*, са интегрирани в международния проект „Интеграция на информатиката и метаболитното инженерство за откриване на нови антибиотици“ (*IIMENA*), който се финансира от Фондация Ново Нордиск. Учените от *DTU Biosustain* работят заедно с Корейския институт за наука и технологии (*KAIST*) и *Fundación MEDINA Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía*. Проектът *IIMENA* интегрира откритието на *BGC* с иновативен високопроизводителен скрининг, адаптивна лабораторна еволюция и метаболитни инженерни технологии. Накратко: използват се всички най-нови технологии, с които разполага науката в момента, за да се възползват учените от информацията за тайния свят на активните химични съединения и метаболити, произведени от бактерии и гъбички, и за да се разкрие следващото поколение антибиотици. С достъп до уникалната колекция от щамове на *MEDINA*, се очаква да бъде намерено множество нови кандидати за антибиотични лекарства.

Учените от *IIMENA* проектът са допринесли за различни ключови технологии, като платформата *antiSMASH* (*Blin, K., et al., 2019, Nucleic Acids Res. 47:W81-W87, Blin, K., et al., 2019, Nucleic Acids Res. 47:D625-D630*), **CRISPR-инструменти** (*Tong, Y., et al., 2020, Nat. Prot. 15:2470—2502, Tong, Y., et al., 2019*), **прекурсор-биосензори** (*Yang, D., et al., 2018*), които вече се използват от много лаборатории по целия свят.

### Софтуер и биология — два инструмента за една секвенция

Световите на големите информационни масиви, софтуера, лабораторната диагностика и биологията се сливат в наши дни. Наскоро *DTU Biosustain* е получила безвъзмездна помощ в размер на 100 милиона евро от фондация *Novo Nordisk*, за да продължи дейността си през следващите пет години. Голяма част от тези безвъзмездни средства ще бъдат предназначени за разработване на софтуерни инструменти за откриване на устойчиви химични съединения, за разработка на нови антибиотични средства и терапии на лечение. Проектът *IIMENA* ще продължи още 2,5 години и има за цел — в допълнение към разработването на основни технологии — да предложи пет нови кандидати за антибиотици. **Но необходимостта от повече научни изследвания и повече кандидати за лекарства остава неотложна.** Проблемът с антимикробната резистентност не изчезва, а само се влошава, така че трябва да се действа сега.

### Платформата *antiSMASH*

Платформата за отворен прочит на геном *antiSMASH* е най-широко използваният биоинформатичен софтуер за анализ на микробни геномни секвенции и за *BGC*. Повече от 750 000 анализа са публикувани на публичния уебсайт, хостван от *DTU*. *AntiSMASH* е съвместна разработка, поддържана

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



понастоящем от *T. Weber/K.Blin* в *DTU Biosustain* и *M. Medema* в Университета *Wageningen*, с принос от десетки водещи учени, работещи в тази област. Софтуерът предлага лесен достъп до информация за геномни секвенции и генетичния потенциал на микроорганизмите за синтезиране на метаболитни продукти, без да се изискват специални биоинформатични умения. Платформата също така включва база данни с биосинтетични генни клъстери и базата данни *MIBiG* за експериментално определени и валидирани генни клъстери.

## Инструменти за справяне с антибиотичната резистентност

Диагностиката, която разчита на бактериални фенотипни характеристики, геномика и *machine learning*, може да помогне за справяне с глобалната криза (*Jyoti Madhusoodanan*).

В проучване на *Maha Farhat* през 2007 г. с ХИВ пациенти, заразени с *Mycobacterium tuberculosis*, патоген, който причинява туберкулоза, са наблюдавани щамове, които са резистентни към обикновени антибиотици. Въпреки че имунокомпрометираните индивиди са особено податливи на туберкулоза, инфекцията не е уникална за хората с ХИВ: *M. tuberculosis* по статистика, направена за проучването е отнела 1,4 милиона живота в световен мащаб през 2019 г., 208 000 от които са имали ХИВ.

„Туберкулозата беше заменена за кратко от COVID-19, но тя все още е най-големият убиец при инфекциозните заболявания в световен мащаб“, казва *Maha Farhat*, лекар и биоинформатик в Харвардския университет. Резистентни към лекарства форми на *M. tuberculosis* са основен фактор за проблема.

Всички видове резистентни към лекарства патогени предизвикаха криза с антибиотичната резистентност, която застрашава общественото здраве, селското стопанство и животновъдството. Но откриването на тези щамове и идентифицирането на ефективни лечения е трудно. Лабораториите, оборудвани да се справят особено с инфекциозни патогени, като *M. Tuberculosis*, могат да бъдат трудно достъпни в страни с ниски доходи, а инструментите за тестване за чувствителност към лекарства могат да отнемат дни, за да се получат релевантни резултати. В много случаи лекарите тестват за резистентност само след като един или повече стандартни антибиотици се провалят. Докато чакат, пациентите могат да започнат ненужен или неефективен курс на антибиотично лечение или да напуснат клиниката без лечение.

*Maha Farhat* и други изследователи по света все по-често се обръщат към инструменти като атомно-силова микроскопия, геномика и изкуствен интелект, за да създадат диагностични тестове, за които се надяват, че ще дадат резултати за минути, като сведат до минимум използването на неправилни или ненужни предписания. „Увеличаването на бързината е най-важният необходим напредък“, казва клиничният микробиолог Евгений Иделевич в Медицинския център на Университета Грайфсвалд в Германия.

Златният стандартен метод за оценка на лекарствената чувствителност на микроорганизмите, известен като диск дифузионен тест, датира от 1889 г. Процесът е автоматизиран и работи на същия принцип в инструментите като например *BD Phoenix* от *BD Biosciences*, и *VITEK 2* от *bioMerieux*. Тези системи търсят оптични промени, които показват бактериален растеж или смърт. Тестовите обикновено изискват между 4 и 8 часа. Но изследователите също използват тестове, които са по-често свързани с физичните науки, отколкото с микробиологията. През 2018 г. например *Idelevich* е разработил миниатюризирана версия на стандартните тестове за чувствителност, която се основава на MALDI-TOF, маспектрометрия, при която се използва лазерно индуцирана йонизация, за да се идентифицират молекули въз основа на тяхната маса и заряд. *Idelevich* и колегите му поставят микрокапчици от култури от два патогена - *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae* - директно върху твърда матрица, използвана за MALDI-TOF и инкубират всяка капчица с различно антибиотично средство. След това те обработват пробата със система, специално проектирана за бактериална идентификация: „MALDI Biotyper“, като интензитетите на характерните спектрални пикове показват дали културите са податливи или резистентни на антибиотика.

През 2013 г. *Giovanni Longo* и екип, в Националния съвет за научни изследвания на Италия, установяват, че когато свързват патогенните *Escherichia coli* с миниатюрни структури, наречени „cantilevers“ и ги излагат на антибиотици, тези структури се движат нагоре и надолу поради малки движения на прикрепени живи бактерии. Движенията спират, ако бактериите са чувствителни към антибиотичите. Движението е видимо чрез атомно силова микроскопия в рамките на минути, което означава, че тестът може да идентифицира живи бактерии много по-бързо, отколкото е възможно със стандартно изследване за бактериален растеж. Поради трудности по реализация на практика на това изследване, екипът от учени са разработили софтуер за анализиране на бактериалното движение, така че четенето да е пропорционално на броя на бактериите в разтвора. Въпреки че все още тази система не е комерсиализирана, тя би могла да бъде адаптирана и разширена за клинична употреба. Специфичните повърхности могат да бъдат заменени с микротитърни плаки, а атомно-силовият микроскоп - с оптичен четец на DVD, за да улови сигнала. „Това би могло да бъде една много лесна и евтина постановка“, твърдят учени от екипа на *Rachel McKendry*, нанотехнолог.

Физикът *Kamil Ekinci*, в Бостънския университет в Масачузетс, преследва друг метод за изследване на бактериална антибиотична резистентност: електрически ток. Екипът му работи с проба (урина) с *K. pneumoniae*, често срещан причинител на инфекции на пикочния тракт, като директно поставят пробата в един канал на микрофлуидно устройство с антибиотик, и така се проследява електрическият поток - „Колкото повече данни се събират, толкова повече има шанс да се подобри и усъвършенства тази технология. Ако бактериите растат и запушват канала, те създават повече електрическо съпротивление. На практика бактериалния растеж се превръща в електрически сигнал.“, казва *Ekinci*. Предимството е, че електрическите сигнали е по-лесно да се усилват и визуализират, отколкото са

**микроскопските изображения** и по твърдение на учените от екипа тази техника може да открие едно единствено бактериално делене. Все пак има и известни пречки за такъв тип изпитвания и те са свързани главно с фенотипните характеристики на бактериалните видове, като например бавнорастящите патогенни бактерии *M. Tuberculosis*.

**Тестовете, базирани на бактериален растеж, са лесни, евтини и неспецифични:** един тест работи върху широк спектър от патогени. Но тъй като резултатите от тестовете зависят от фенотипните характеристики на патогените и използването на правилната концентрация на антибиотици, „всичко друго е недостатък“, е казала *Susanne Häussler*, която е клиничен микробиолог в Копенхаген. Като алтернатива, *Häussler* и екип се обръщат към геномиката, за да се противопоставят на антибиотичната резистентност. **Разчитането на гени, които са ясно свързани с механизмите за антибиотична резистентност, е идеален път за побърза диагностика,** тъй като не изискват продължителни периоди на бактериална инкубация. Но е важно да се знае кои последователности в бактериалния геном са важни за лекарствената резистентност. Ако това не бъде направено, лесно може да се пропусне нов механизъм на резистентност или да се открие някаква мутация на определен ген, който всъщност не дава чувствителност.

*Gary Schoolnik* и екип, финансирани от Националните здравни институти на САЩ и Службата за биомедицински изследвания и развитие на Министерството на здравеопазването на САЩ, са тествали *Neisseria gonorrhoeae* за наличие на мутации, водещи до резистентност към ципрофлоксацин, основно използван за гонококови инфекции. Мутации в ген, кодиращ ензима гираза А **предопределя разликата между *Neisseria* щамове, които са резистентни или чувствителни на ципрофлоксацин.** Тестът е прост, еднократен и целенасочен. Базираните на PCR тестове за откриване на такива генни варианти са с ограничена употреба в клиниките поради необходимостта от инструменти, реагенти и оператори, които са обучени да извършват тези реакции. Диагностиката на *Schoolnik* заобикаля тези ограничения, като опростява изследването до проста промяна на цвета. **Усилваните фрагменти се слагат в апарата, който съдържа сонди за улавяне за всеки вариант на гена. Свързването води до промяна на цвета, която отразява дали щамът е чувствителен или устойчив на ципрофлоксацин.**

Други екипи от учени продължават да изследват секвенирането на целия геном, за да уловят спектъра от генни варианти, които водят до резистентност. Но разработването на евтини и бързи тестове въз основа на такава технология продължава да бъде предизвикателство. „Не става въпрос само за наличието на ген на резистентност, но и за неговата експресия“, казва *Nicole Wheeler*, специалист по биоинформатика и анализ на данни в Бирмингамския университет, Великобритания, която **изучава и подходи, базирани на изкуствения интелект в геномиката.** „**Колкото повече транскриптомни и протеомни данни се събират, толкова повече има шанс да се подобри диагностичната способност за предвиждане на резистентността**“, казва *Wheeler*.

Техники, основани единствено на генома като секвенирането, работи добре за някои патогени, като например *Salmonella enterica*, но мутациите в множество



регулаторни гени могат да променят моделите на генна експресия на други, отговорни за резистентността, включително *P. aeruginosa*. „По принцип всички транскриптомни данни са в генома, но понякога е по-лесно да се погледне в транскриптома, вместо да се търсят всички възможни мутации, които променят генната експресия.“ – Häussler.

През 2014 г., например, *Chikara Furusawa*, биоинженер в *RIKEN* в Осака, Япония, изследва лабораторни щамове *E. coli*, които се адаптират към растежа в присъствието на различни антибиотици, и установява, че може да се използват промените в генната експресия, за да се предскаже резистентността по-точно, отколкото би могла с геномно ДНК секвениране. „Връзката между генната експресия и резистентността е значително по-висока от тази между резистентността и геномните маркери“, казва *Furusawa*.

### Прогнозиране на бъдеща резистентност

В работата си, *Häussler* и нейните колеги усъвършенстват комбинация от геномни и транскриптомни маркери като най-добрият „подпис“, който да предопределя антибиотичната резистентност в *P. aeruginosa*. Но за да подобрят модела си, те са използвали изкуствен интелект. Вместо просто да идентифицират мутациите, водещи до резистентност, те са използвали алгоритми, за да идентифицират ДНК и РНК вариации, които предсказват резистентността на щама към антибиотици. Алгоритъмът помага да се идентифицират само ключови черти и няма да бъде част от евентуален диагностичен тест. Вместо просто да информират клиницистите за текущия профил на резистентност на патогена, тези алгоритми могат също така да разкрият кои механизми за антибиотична резистентност биха могли да се развият в отговор на определени антибиотични лечения. И все пак, колкото и перспективи да дава изкуствения интелект, този подход според повечето учени е „черна кутия“, дори ако са известни всички кодове и всички данни, не е ясно какво кара модела/алгоритъма да каже, че образец А е устойчив на азитромицин, например. Друг проблем с изкуствения интелект за преодоляване е свързан с претоварване, тоест един алгоритъм може да „запамятава цял куп еднозначни характеристики в данните, вместо да се „научи“ да намира истински корелации. Тъй като бактериалните генни последователности могат да бъдат много сходни, инструментите, базирани на изкуствен интелект могат да опростят/неглижират даден проблем и да направят погрешни заключения. Например алгоритъм, който е обучен на много снимки на селскостопански животни в полеви условия, може да идентифицира отделна снимка на животно на открито като овца. Бактериите често предават антибиотично устойчиви гени един на друг в малки ДНК плазмиди, които не са част от геномите им. Но тъй като останалата част от генома е същата, алгоритъмът може да „прецени“, че секвенирания геном все още свидетелства за чувствителност. Това, което наистина се изисква от тези модели, е „да научат“ биологията на резистентността.

Като се имат предвид ограниченията на изучаването и тестването на туберкулозата, *Farhat* е възприела подхода за изкуствен интелект, който използва цели

геномни последователности, за да направи прогнози. През 2021г. *Farhat* и екип са описали веб-базиран инструмент, наречен *GenTB*, който може да предскаже резистентност към няколко лекарства за туберкулоза. Ефективността на инструмента варира в зависимост от качеството на входящите данни за последователността и въпросното лекарство. Докато една често срещана мутация е отговорна за до 80% от резистентността към лекарства от първа линия, използвани за туберкулоза, няколко редки варианта са отговорни за повишаване резистентността към лекарства от втора линия. Понякога резистентността се забелязва само когато има няколко такива мутации.

Какъвто и подход да използват, изследователите са изправени пред същото основно предизвикателство: да се проектира диагностичен тест, който да е подобрен и да използва същите аналитични устройства и техника и да дава резултат сравнително бързо. Някои от текущите тестове вече могат да дадат резултатите на клиницистите за по-малко от 24 часа, за долар или два, на тест. **Въпросът не е дали тестът е добър, а въпросът опира до това: по-добре ли е от диагностичната схема, което е налична към момента?** Важно е да се постави траектория и път, който да помогне да се постигнат набелязаните цели, свързани с АМР.

**Някои тестове са ограничени откъм развитие** спрямо видовете проби, които могат да бъдат обработвани, или бактериите или антибиотиците, които могат да бъдат тествани. В момента диагностиката е ограничена до гонококови инфекции, например, а микрофлуидното устройство на *Ekinci* изисква проби от урина и не може да се справя с проби и инфекции, причинени от повече от един вид бактерии. Предложените методи, които изискват усъвършенствани атомно силови микроскопи или спектрометрия, ще трябва да бъдат адаптирани, преди да могат да бъдат използвани от неспециалисти, работещи в клиници и в страни с ниски доходи по света. Тъй като много от тези подходи тестват един или два микроорганизма срещу шепа антибиотици, те са победили само „върхът на айсберга“, според *Alex van Belkum*, директор на микробиологичната лаборатория в *BioMerieux*. Все още има голямо изоставане между тези технологии и автоматизираните системи за изпитване на антибиотична чувствителност, които понастоящем се намират в лабораториите.

**Подобно на пандемията от COVID-19, по време на която бързите тестове се оказаха от решаващо значение за откриването и спирането на разпространението на вируса, ниската цена на диагностиката е от съществено значение за вземане на своевременни мерки, предприемане на адекватно лечение и намаляване на злоупотребата с антибиотици.** Антимикробната резистентност е много сложен проблем и новите тестове са само една част от решението.“ казва *McKendry*.

**Антибиотичната резистентност е в кризисен момент и правителствената подкрепа за академичните среди и Big Pharma за намиране на нови лекарства може да помогне за поражението на мултирезистентните бактериални патогени.**

Антибиотичната резистентност представлява едно от най-важните здравни предизвикателства на 21-ви век. И времето вече изтича, за да се спрат тежките

последници. Увеличаването на разпространението на мултирезистентни бактерии вече е довело до значителен ръст на заболяванията и смъртните случаи при хората. Американските центрове за контрол и профилактика на заболяванията оценяват, че приблизително 2,8 милиона души по света са заразени с резистентни на антибиотици бактерии, което води до 35 000 смъртни случая всяка година в САЩ и 700 000 смъртни случая по целия свят.

В съвместен доклад от 2019 г. на Организацията на обединените нации, Световната здравна организация и Световната организация за здравеопазване на животните се посочва, че инфекциите, причинени от резистентни на лекарства патогенни бактерии, биха могли да причинят 10 милиона смъртни случая всяка година до 2050 г. и да доведат до крайна бедност на 24 милиона души до 2030 г., ако не бъдат предприети действия. Мултирезистентните бактериални патогени вече са в състояние да избегнат всички съществуващи лечения - например има данни за 70-годишна жена от Невада, починала през 2016 г. от бактериална инфекция, резистентна на всеки наличен одобрен антибиотик в САЩ.

Учените по света считат, че разрешаването на тази криза изисква нещо повече от правилно използване на антибиотици от лекари и пациенти. Тя също така изисква взаимни инвестиции и сътрудничество между промишлените отрасли и правителството.

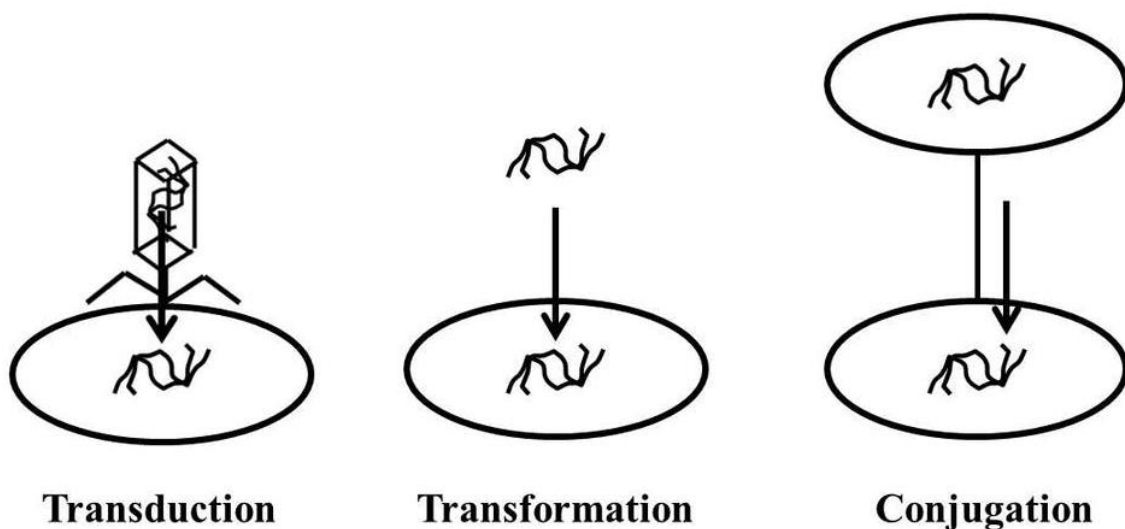
Антибиотиците революционизираха съвременната медицина, факт, но неправилното използване на антибиотици и липсата на финансиране за научни изследвания обаче доведоха до нарастваща криза с резистентни към антибиотици бактерии.

За да оцелеят, бактериите естествено еволюират, за да станат устойчиви на лекарствата, които ги убиват. Те постигат това чрез два метода: **генетична мутация и хоризонтален генен трансфер**.

**Генетична мутация** възниква, когато ДНК или генетичен материал на бактериите се променя на случаен принцип. Ако тези промени позволят на бактериите да избегнат антибиотик, който иначе би ги убил, те ще могат да оцелеят и да се превърнат в резистентни щамове. С течение на времето делът на резистентни бактерии ще се увеличи, тъй като нерезистентните бактерии се елиминират от антибиотичната терапия. В крайна сметка лекарството вече няма да работи върху тези бактерии, защото всички те имат мутация, свързана с резистентност.

Другият метод, използван от бактериите за оцеляването им е **хоризонтален генен трансфер**. Тук една бактерия придобива резистентни гени от друг източник, или чрез заобикалящата среда, или директно от друга бактерия или бактериофаг.

*Фиг. 3: Диаграма на видовете бактериален хоризонтален генен трансфер:*



Бактериите могат да получат резистентност чрез инфекция от вирус (**трансдукция**), улавяне от околната среда (**трансформация**) или директен трансфер от други бактерии (**конюгация**). Но **кризата с антибиотичната резистентност е до голяма степен антропогенна или предизвикана от човека**. Сред факторите са прекомерната употреба и злоупотребата с антибиотици, както и липсата на разпоредби и правоприлагане, свързани с правилната употреба. Например лекарите, предписващи антибиотици за небактериални инфекции и пациентите, които не завършват предписания курс на лечение, дават възможност на бактериите да развият резистентност.

**Не съществуват** и разпоредби относно употребата на антибиотици в животновъдството, включително **контрол на изтичането в околната среда**. Едва наскоро имаше натиск за по-голям надзор на антибиотиците в селското стопанство в САЩ. Както в доклад от октомври 2021 г. на националните академии по науки, инженерство и медицина се отбелязва, че **антибиотичната резистентност е проблем, който свързва здравето на хората, околната среда и животните**. Ефективното справяне с един аспект изисква да се обърне внимание на останалите.

Една от основните причини за кризата с резистентността е **забавянето на разработването и създаването на нови антибиотици през последните 34 години**. Учените наричат това **период на празно антибиотично откритие**.

Изследователите откриха **последния клас високоефективни антибиотици през 1987 г.** Оттогава няма нови антибиотици, които да са излезли от лабораториите. Това се дължи отчасти на **липсата на финансов стимул за фармацевтичната промишленост да инвестира в по-нататъшна научноизследователска и развойна дейност**. Антибиотиците по това време са били ефективни срещу бактериални инфекции, срещу които са създадени. **За разлика от хроничните заболявания като хипертония и диабет, бактериалните инфекции обикновено не изискват текущо лечение и така имат по-ниска възвръщаемост на инвестициите**. Обръщането на тази тенденция изисква инвестиции не само в разработването на лекарства, но и във фундаменталните

изследвания, които позволяват на учените да разберат как функционират антибиотиците и бактериите на първо място.

**Фундаменталните научни изследвания са насочени по-скоро към подобряване на знанията, отколкото към разработване на мерки за решаване на конкретен проблем.** По-доброто разбиране на движещите механизми на резистентността към антибиотици може да доведе до иновации в разработването на лекарства и техники за борба с мултирезистентни бактерии.

Фундаменталната наука също така предоставя възможности за следващото поколение изследователи за решаването на проблеми като антибиотичната резистентност. **Като преподават на студентите основните принципи на науката, учени и преподаватели могат да обучават и вдъхновяват бъдещите учени със страст, способност и компетентност да решават проблеми, като АМР.**

Много учени са съгласни, че справянето с антибиотичната резистентност изисква повече от само отговорна употреба на антибиотиците от индивидите. **Правителствата, академичните среди и фармацевтичните компании трябва да си партнират, за да се справят ефективно с тази криза – това се нарича сътрудничество чрез триангулация.** Сътрудничеството между водещи учени в академичните среди и фармацевтичните компании е един от стълбовете на тези усилия. Докато фундаменталните научни изследвания осигуряват основата на знанието за откриване на нови лекарства, фармацевтичните компании разполагат с инфраструктурата, за да ги произведат в мащаб, който обикновено не е наличен в академичните среди. Останалите два стълба включват финансова и законодателна подкрепа от правителствата. Това включва увеличаване на финансирането за научни изследвания в академичните среди и промяна на настоящите политики и практики, които по-скоро възпрепятстват, отколкото предлагат стимули за инвестиции на фармацевтични дружества в разработването на антибиотици.

**Партньорството между академичните среди, фармацевтичните компании и правителството би могло да спомогне за ускоряване на разработването на антибиотици.** За тази цел през юни 2021 г. е предложен Законът за насърчаване борбата с резистентността (PASTEUR)<sup>1</sup> има за цел да запълни празнотата на откритията на нови антибиотици. Ако бъде приет законопроектът **ще се осигурят средства за учените и разработчиците за проучване и разработване на антимикуробни лекарства за период от време, който варира от пет години до края на патента.** Приемането на този акт би било важна стъпка в правилната посока за справяне с антибиотичната резистентност и заплахата, която тя представлява за човешкото здраве в САЩ и по света. **Паричен стимул да се предприемат фундаментални изследвания относно нови „начини за убиване“ на патогенни бактерии е като че ли най-добрата налична възможност в света за излизане от кризата с антибиотичната резистентност.**

## **Биоинформатични подходи за изследване на антимикуробната резистентност**

<sup>1</sup> [https://www.bennet.senate.gov/public/\\_cache/files/9/0/9015563c-7fc9-4c8e-b7c2-daf3329f225e/82E62B4EBDA0AF2031442B9EDB27C039.pasteur-bill-text.pdf](https://www.bennet.senate.gov/public/_cache/files/9/0/9015563c-7fc9-4c8e-b7c2-daf3329f225e/82E62B4EBDA0AF2031442B9EDB27C039.pasteur-bill-text.pdf)



Откриването и наблюдението на антимикробната резистентност са два стълба, на които ще се основава клиничната микробиология през следващите десетилетия. Прилагането на определени технологии, като например **цялостното секвениране на генома (WGS)** или **мас-спектрометрията**, както и **създаването на национални и международни бази данни**, които включват и събират данни за антимикробната резистентност от цял свят, **позволяват прилагането на биоинформатичните подходи в изследването на антимикробната резистентност на микроорганизмите.**

Развитието на антимикробна резистентност (AMP), нараства през последните няколко десетилетия, като се разпространява бързо поради прекомерната им употреба и злоупотреба както при хората, така и при животните. AMP се превърна в главен „препъни камък“, пред който е изправено световното здраве. За някои патогени, които често предизвикват инфекции при хора, като *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* или *Mycobacterium tuberculosis*, наред с други, **се наблюдават високи нива на резистентност срещу антибиотиците в световен мащаб.** Инфекциите, причинени от тези микроорганизми, са свързани с **висока заболяемост и смъртност**; всъщност в неотдавнашен доклад на СЗО е направена оценка и прогноза, че **резистентни към лекарства микроорганизми ще причиняват до 10 милиона смъртни случая всяка година до 2050 г.** с последващото им социално, политическо и икономическо въздействие. В този контекст СЗО и други институции разработват планове за действие с цел подобряване на разбирането на AMP, намаляване на заболяемостта от инфекциозни заболявания чрез превенция на инфекциите.

### **Мерки, оптимизиране на употребата на антимикробни лекарства и разработване на нови лекарства и стратегии за лечение**

Въпреки огромните усилия, положени в рамките на тези планове за борба с AMP, това все още е неизбежен проблем, който намалява ефективността на антибиотиците за лечение на инфекции. Практическо и осъществимо решение на този въпрос може да бъде използването на **определени биоинформатични инструменти, които позволяват на здравните системи в световен мащаб да упражняват по-голям контрол върху AMP.** За тази цел някои техники като **масспектрометрията, MALDI-TOF и секвениране на целия геном, които бавно стават част от „ежедневието“ на повечето микробиологични лаборатории,** могат да помогнат не само да бъдат открити различни механизми на антимикробна резистентност при бактерии и други патогени, но и да **насочат към по-добро разбиране на тези механизми от епидемиологична и молекулярна гледна точка.** Освен това, **с помощта на биоинформатиката, може да се анализира огромното количество генерирана информация, за да бъдат изпълними определени стратегии, съобразени с конкретна цел, за подобряване мерките за превенция, контрол и лечение на инфекции, причинени от резистентни микроорганизми.**

## Биоинформатични инструменти за анализ на данните от секвенирането на целия геном на бактериите

Изследването за фенотипна антимикробна чувствителност (AST) е класическият метод за откриване на АМР, но през последните няколко години **целогеномното секвениране в комбинация с AST (WGS-AST) се очертава като бърз и точен метод за откриване на АМР**. В някои случаи съществува **пряка връзка между генотипа и фенотипа**, което позволява определянето на някои гени на АМР чрез прилагане на молекулярни тестове, налични в клиничната практика, като например при откриването на гена *mecA*, отговорен за резистентността към бета-лактамни антибиотици в *S. aureus*. Въпреки това повечето от механизмите на антимикробната резистентност включват множество гени и клетъчни сигнали за пътища или просто все още не са добре известни, поради което WGS се явява алтернатива за разбиране на тези механизми чрез проучване на целия геном на патогени, изолирани в клиничната практика, и осигуряване на възможност за цялостно откриване на АМР. **Един от големите проблеми** по отношение на **WGS** е, че той **предоставя големи масиви от данни**, което **затруднява прогнозирането на наличието на непознати гени за антибиотична резистентност или генни варианти**, свързани с антибиотичната резистентност. За щастие, тези набори от данни, получени от прилагането на WGS за клинични изолати, **могат да бъдат анализирани чрез безплатни биоинформатични инструменти като *Resfinder*, *AMRfinder* или Цялостната база данни за антибиотична резистентност (*CARD*)**. Тези инструменти могат да бъдат използвани за идентифициране на генетични елементи, участващи в АМР (мутации с полиморфизъм, хоризонтален трансфер на гени, генни варианти и т.н.), без операторите да притежават задълбочени биоинформатични умения. За да се идентифицира и прогнозира наличието на АМР гени или други механизми за АМР в определен клиничен изолат, тези инструменти разчитат на големи, висококачествени бази данни за АМР. Разликите между тези инструменти се основават на алгоритъма, който тези бази данни използват, и на състава на данните. Въпреки факта, че някои проучвания са показали ползата от тези биоинформатични ресурси за откриване на АМР, неотдавнашно **междулабораторно проучване на *Doyle et al.* установи, че има висока вариабилност в резултатите между лабораториите в зависимост от това какъв софтуер и аналитичен метод се използват за откриване и прогнозиране на наличието или отсъствието на АМР гени при изучаването на същите клинични изолати, което води до лоша съпоставимост с фенотипните резултати за AST**. Тези несъответстващи резултати могат да се дължат не само на използвания биоинформатичен инструмент, но и на качеството на последователностите, получени от WGS и на интерпретирането на данните, получени след биоинформатичния анализ. Трябва също така да се отбележи, че някои автори, включително Европейския комитет за изпитване на антимикробна чувствителност (EUCAST), състоящ се от експерти по WGS, е стигнал до заключението, че въпреки че има големи количества данни от проучвания, съсредоточени върху фенотипно-генотипното съответствие на AST, WGS все още не е най-подходящият инструмент за точно прогнозиране на антимикробната чувствителност. Освен това

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



EUCAST препоръчва използването на епидемиологични гранични стойности (ECOFF) като сравнителни показатели за прогнозиране на AST, базирано на WGS, вместо на клинични крайни точки. Към днешна дата **техниките WGS-AST не се прилагат рутинно в повечето лаборатории по клинична микробиология поради високата им цена, необходимостта от квалифициран персонал, лошото качество на получените данни и трудностите при тълкуването на тези данни.** По същия начин и както беше обсъдено по-рано, разбираема е спешната необходимост от стандартизирани, разбираеми, общодостъпни бази данни на секвенциите, достъпни онлайн **безплатно, както и от стандартизирани препоръки за качеството на данните.** Въпреки това през следващите няколко години разработването на нови биоинформатични инструменти и тяхното прилагане за антимикробна резистентност ще улеснят превръщането на големи количества неразбираеми и необясними данни в достъпни резултати, което позволява откриването на гени на AMP в данните на WGS, което беше немислимо преди няколко години. **По мнение на голяма част от учените WGS ще бъде избраният метод за откриване на AMP в клиничната практика, тъй като разходите за WGS продължават да намаляват и се натрупа опит в анализа и интерпретацията на данни.**

## **Биоинформатични инструменти за мониторинг на AMP**

**Мониторингът на антимикробната резистентност е също толкова важен етап, колкото и откриването ѝ.** В тази епоха на глобализация детерминантите на AMP могат лесно да се разпространят по целия свят, надхвърляйки географските бариери и увеличавайки разпространението на AMP в световен мащаб. През последните няколко години например се наблюдава бързо увеличение на откриването на резистентни на карбапенеми *Enterobacterales* (CPE), както в болнична, така и в общностна среда. По същия начин употребата на антибиотици при животните се е увеличила значително през последните десетилетия, което е довело до разпространението на остатъци от антибиотици в околната среда и до увеличаване на тежестта на AMP при патогенните агенти, причиняващи зоонози, което означава, че **надзорът на AMP, при който се използват само клинични проби, не е полезен като система за ранно предупреждение за откриване на механизми за резистентност.** По този начин разработването на инструменти за проследяване на антимикробната резистентност в световен мащаб придоби значение, тъй като тези инструменти могат да предоставят подходяща информация, която да насочва специалистите в областта на здравеопазването при разработването на програми за управление и действия в областта на общественото здраве. **Най-голямата система за наблюдение на AMP в Европа - Европейската мрежа за наблюдение на антимикробната резистентност (EARS-Net), събира съпоставими, представителни и точни данни за AMP, като анализира времевите и пространствените тенденции на AMP, предоставя доказателства за неблагоприятни събития и насърчава незабавни мерки за противодействие.** Основният проблем по отношение на EARS-Net е фактът, че тя се основава на клинични данни за антимикробна чувствителност, получени само за инвазивни

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



**клинични изолати** (проби от кръв и цереброспинална течност). С оглед на това е очевидно, че **трябва да се подобрят системите за наблюдение на АМР, способни да събират информация не само от клинични, но и от екологични изолати.** Както се доказва, откриването на АМР е възможно чрез прилагане на WGS, което генерира огромни количества данни, които впоследствие ще бъдат анализирани с помощта на биоинформатични инструменти, спомагащи за определяне на микробните популации и установяване на тенденции в антимикробната резистентност. WGS се интегрират в клиничните и здравните заведения в повечето страни с високи доходи, въпреки че използването на WGS е съсредоточено основно върху идентифицирането и наблюдението на отделни локуси. В неотдавнашно проучване на настоящата епидемия от резистентни на карбапенем *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) в Европа *David et. al.* показва (чрез анализ на геномните последователности и географското разпределение на 1 717 клинични изолати *K. pneumoniae*), че придобиването на карбапенемаза е основната причина за резистентността към карбапенем в *K. pneumoniae* и че почти 70 % от изолатите CRKP са концентрирани само в четири клонални линии; анализът на геномните последователности дори показва, че най-високата трансмисия в болничните условия е свързана със степента на устойчивост на карбапеними. Друг пример за прилагане на WGS при мониторинга на АМР е проведеното от *Harris et al.* проучване на клиничните изолати на *Neisseria gonorrhoeae* по програмата за наблюдение на гонококовата антимикробна резистентност в рамките на Европа. Екипът от учени установи, че WGS е оптимален инструмент за молекулярна епидемиология, тъй като идентифицира смесени инфекции, прогнозира антимикробна резистентност и позволява бърз анализ на геномно-филогенетичните корелации, давайки реалистична картина на циркулиращите щамове *N. gonorrhoeae*. Но най-голямото постижение на това проучване е създаването на база данни, включваща епидемиологични, фенотипни и генотипни данни, които могат да се използват за прогнозиране на АМР, молекулярно типизиране и филогенетично клъстериране. Създаването на този вид бази данни следва да бъде приоритет за контрола на разпространението на АМР, тъй като те позволяват съхраняването на множество профили на резистентност и геномна информация от микроорганизми от голям епидемиологичен интерес, като резистентни на метицилин *Staphylococcus aureus*, MDR и XDR *Pseudomonas aeruginosa* или *Acinetobacter baumannii*.

## Протеомични инструменти в АМР

Масспектрометрия от типа MALDI-TOF MS е бърз, точен метод за рутинно идентифициране на микроорганизми както от клинични изолати, така и от клинични проби, и наскоро се появи като надежден метод за откриване на антимикробна резистентност. Откриването на антимикробна резистентност чрез MALDI-TOF MS може да се направи по един от следните три начина: **откриване на АМР чрез анализ на пиковите модели на патогените, измерване на модификациите на антибиотиците, дължащи се на ензимната активност на бактериите** (напр. откриване на  $\beta$ -лактамази чрез измерване на масспектралните промени в антибиотика)

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



и количествено определяне на бактериалния растеж при наличие на антибиотик. Въпреки че MALDI-TOF MS е показал в няколко проучвания способността си да открива АМР от клинични изолати, съществуват две основни ограничения за рутинната му употреба: ограничен брой механизми за АМР, които могат да бъдат идентифицирани чрез този метод, и ниската му чувствителност за откриване на директна АМР от клинични проби. Въпреки това наскоро бяха използвани методи за изкуствен интелект за откриване на резистентни към лекарства патогени, като се използва профилният спектър, получен чрез MALDI-TOF MS. Въпреки че е постигнат известен напредък, анализът на стотици пикове и спектри все още е предизвикателство при прилагането на изкуствен интелект. Въпреки че е добър метод за откриване на АМР, са необходими повече изследвания на MALDI-TOF MS, преди той да бъде интегриран като рутинен работен процес в микробиологичните лаборатории.

## Заклучение

Антимикробната резистентност е новата пандемия, засягаща човешкото и животинското здраве и околната среда в световен мащаб, нанасяща жестоки фатални щети в икономическо, финансово и здравословно отношение. Борбата с АМР изисква глобални стратегии, насочени към предотвратяване на появата на АМР чрез превенция, подобряване на употребата на антибиотици и разработването на нови лекарства, прилагане на системи за наблюдение с цел проследяване на резистентността и подобряване на капацитета на лабораториите за идентифициране на резистентни патогени. Микробиологичните лаборатории играят ключова роля в откриването и мониторинга на АМР. В този аспект науката и диагностиката премина към нови начини за откриване на АМР в клинични условия. Напредъкът в маспектрометрията и технологиите за секвениране на целия геном позволи прилагането им не само при идентифицирането на патогени, но и при откриването на АМР, като се превърнаха в мощни системи, които могат да променят парадигмите на изпитването за антимикробна чувствителност. Тъй като тези методи предоставят огромно количество данни, за интерпретиране на резултатите са необходими биоинформатични инструменти и спешна необходимост от всеобхватни бази данни със свободен достъп, които да включват всички известни гени/мутации за резистентност, за да се улесни сравняването между методите и инструментите за биоинформатика. Въпреки че е постигнат известен напредък, липсата на стандартизация ограничава техния потенциал. Според повечето учени разработването и внедряването на тези технологии в областта на микробиологията ще позволи бързо и точно идентифициране на АМР, улесняване на персонализираната медицина и опростяване на наблюдението на АМР.

## Изготвил:

Красимира Захариева,

Главен експерт в дирекция ОРХВ

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





## Използвана литература:

- <https://theconversation.com/antibiotic-resistance-is-at-a-crisis-point-government-support-for-academia-and-big-pharma-to-find-new-drugs-could-help-defeat-superbugs-169443>
- <https://www.openaccessgovernment.org/finding-new-antibiotics-the-genome-way/93551/>
- <https://www.science.org.au/curious/policy-features/next-pandemic-antimicrobial-resistance>
- <https://www.nature.com/articles/d41586-021-02292-1>
- <https://www.bennet.senate.gov/public/index.cfm/2021/6/bennet-young-doyle-ferguson-introduce-pasteur-act-to-fight-antimicrobial-resistance>
- *The Importance of Rapid Diagnostic Testing and Stewardship for Infectious Disease Management* - Karen Fong, PharmD, BCIDP
- <https://carb-x.org/>
- <https://www.health.gov.au/initiatives-and-programs/medical-research-future-fund>
- *MIT Researchers Make Progress on Antibiotic Resistance Under DTRA-JSTO Research Program* - <https://globalbiodefense.com/2021/10/12/mit-researchers-make-progress-on-antibiotic-resistance-under-dtra-jsto-research-program/>
- *IIMENA - Integrating Informatics And Metabolic Engineering For The Biosynthesis Of Novel Antibiotics*  
<http://iimena.org/#:~:text=The%20iimena%2Dproject%20aims%20to,candidates%20for%20antibiotic%20drug%20development.>
- <https://mibig.secondarymetabolites.org/>
- *GenTB: A user-friendly genome-based predictor for tuberculosis resistance powered by machine learning* - Matthias I Gröschel, Martin Owens, Luca Freschi, Roger Vargas Jr, Maximilian G Marin, Jody Phelan, Zamin Iqbal, Avika Dixit, Maha R Farhat
- <https://dbmi.hms.harvard.edu/people/maha-farhat>
- *Development of a novel MALDI-TOF MS-based bile solubility test for rapid discrimination of Streptococcus pneumoniae* - Evgeny A Idelevich, Andreas Schlattmann, Markus Kostrzewa, Karsten Becker
- *Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors* - G Longo, L Alonso-Sarduy, L Marques Rio, A Bizzini, A Trampuz, J Notz, G Dietler, S Kasas
- <https://www.bu.edu/eng/2020/05/13/a-gold-standard-gets-a-modern-makeover/> - *Photonics Center Professor Kamil Ekinici Develops Process to Test Antibiotic Resistance with Results in Hours*
- *Hornischer K, Khaledi A, Pohl S, Schniederjans M, Pezoldt L, Casilag F, Muthukumarasamy U, Bruchmann S, Thöming J, Kordes A, Häussler S (2019) BACTOME – a reference database to explore the sequence- and gene expression-variation landscape of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Nucleic Acids Res. doi: 10.1093/nar/gky895*

- Dötsch A, Schniederjans M, Khaledi A, Hornischer K, Schulz S, Bielecka A, Eckweiler D, Pohl S, Häussler S (2015) The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptional landscape is shaped by environmental heterogeneity and genetic variation. *MBio* 6(4):e00749. doi:10.1128/mBio.00749-15
- <https://www.prnewswire.com/news-releases/visby-medical-receives-fda-clearance-and-clia-waiver-at-the-point-of-care-for-pcr-sexual-health-test-301364845.html> - Visby Medical Anticipates Rapid Uptake of Handheld PCR Test for STIs
- *Microbes are perhaps more manageable than we thought* - Chikara Furusawa - [https://www.riken.jp/en/news\\_pubs/research\\_news/rr/20210405\\_1/index.html](https://www.riken.jp/en/news_pubs/research_news/rr/20210405_1/index.html)
- <https://card.mcmaster.ca/>
- *Impact of a mobile decision support tool on antimicrobial stewardship indicators in St. John's, Canada* - Daniel Doyle, Gerald McDonald, Claire Pratt, Zahra Rehan, Tammy Benteau, Jennifer Phillips, Peter Daley
- <https://www.bbc.com/news/health-59310099>