



## **Значението на молекулярната диагностика за инфекциозните заболявания. Нови разработки в диагностиката на антимикробната резистентност.**

Антимикробната резистентност (АМР) причинява около 700 000 смъртни случая годишно в световен мащаб и всяка страна е потенциално засегната. Ако не се обърне подходящо внимание, броят им може да нарасне до 10 милиона годишно до 2050 г. АМР възниква, когато бактериите и други микроорганизми се адаптират и станат по-малко податливи на медикаментозно лечение.

Докато много внимание е насочено към неправилната употреба на антимикробни средства, има все повече доказателства, че качеството на лекарствата е друг важен фактор. Лекарства с по-ниска доза от активната съставка могат да доведат до резистентност. Стратегиите, насочени към справяне с антимикробната резистентност, включват осигуряване на широк достъп до лекарства на достъпна цена, правилно управление на съществуващите антимикробни лечения, **инвестиции в разработването на нови лечения**. Качеството на лекарствата е в основата и на трите. Качествената медицина е от съществено значение за справяне с глобалната заплаха от АМР.

**Разработване и актуализиране на стандарти за качество на лекарства**, включително антималярийни и антимикробни средства, използвани за лечение на заболявания като туберкулоза, менингит и пневмония са основна цел за постигане.

**Укрепване на системите за откриване и премахване на некачествени антимикробни средства** от пазара и подпомагане на местните здравни системи да подобрят достъпа до качествени антимикробни лекарства също е едно от основните направления, в които трябва да се работи.

**Повишаване на осведомеността** и разбирането за качеството на лекарствата и правилната им употреба, нивата на АМР и **навременната диагностика** са от решаващо значение за вземане на адекватни, навременни мерки и информирани политически решения.

В условия с ограничени ресурси и широк спектър от възможни етиологични причинители, **молекулярните технологии предлагат ефективно решение за диагностика на инфекциозни заболявания**, тъй като те са гъвкави, бързи и високопроизводителни. Здравните системи, които редовно използват молекулярна диагностика, ще постигнат високи резултати, ще увеличат максимално ограничените експертни познания и бързо ще реагират на нови заплахи.

**Златно правило за изграждане на лабораторен капацитет е изборът на техника**, която е приложима и може да бъде поддържана. Въпреки своята полезност и прецизност молекулярната диагностика се считаше за „неприложима в рутинната диагностика“ в продължение на десетилетия, тъй като беше счестена за твърде податлива

на замърсяване, скъпа и технически сложна, особено в страни с ниски доходи, където ресурсите са ограничени, уменията и знанията са недостатъчни и ресурсите и инфраструктурата не са актуални.

**Традиционната клинична микробиология, основана на клетъчно-културално култивиране е трудоемка, времеемка и ресурсоемка.** Някои патогени са лесно култивиреми за разлика от други. Клетъчно-културалните методи, които биват широко използвани в диагностиката, превенцията и контрола на инфекциите и при доказване на огнища на инфекции са допълнително ограничени от дългите периоди на изпитване и предизвикателствата, свързани с обезпечаване на качеството. Серологичните методи, макар и обикновено много по-бързи и по-прости, често не осигуряват ширината и дълбочината на информацията, необходима за вземане на информирани и ефективни решения, понякога не са достатъчно специфични и не са достъпни за много патогени.

Повечето африкански държави например се сблъскват не само с ограничени ресурси, но и с голяма тежест и разнообразие от инфекциозни заболявания. Треската, най-честият симптом, водещ до посещаемост на здравно заведение в Нигерия, може да възникне от инфекция с > 200 различни патогени, включително маларийни плазмодии, *Salmonella enterica* и редица хеморагични вируси. Много от животозастрашаващите патогени не могат да бъдат надеждно открити и диагностицирани без скъпи допълнителни молекулярни методи. Тази комбинация от широк патогенен диапазон и ресурсни ограничения, които водят до много високоинфекциозни заболявания, подчертава **необходимостта от ефективна молекулярна диагностика.**

Предпочитанието към „прости“ основани на клетъчно култивиране метаанализи идва от съсредоточаването върху отделни заболявания и патогени и често разходите са компенсирани от научни проекти, освен това тези методи са изключително бавни и трудоемки, не дават пълна информация и не са подходящи да задоволят широките нужди на здравната система. Като предлагат **по-голяма диагностична прецизност за широк спектър от патогени, използвайки малка консумативи, молекулярната диагностика е рентабилна, въпреки високите предварителни разходи, и достатъчно гъвкава, за да се валидира и настрои към нововъзникващи заплахи.** В държави с ограничени ресурси молекулярното оборудване обикновено е запазено за специални или само референтни тестове. Но по-широкото използване на молекулярните диагностични методи ще доведе до икономия на време, труд, по-висока производителност, по-точни и информативни резултати и навременно поставяне на диагноза и ефективна терапевтична схема.

**Но колко е възможно да се въведе молекулярна диагностика в среда с ограничен бюджет, слаба инфраструктура и малко квалифициран персонал?**

**COVID-19** предоставя **практическо доказателство за възможността това да се случи и концепцията за въвеждане в рутинната диагностика на нововъзникващите и инфекциозните заболявания да бъде изпълнена успешно.** Между януари 2020 г. и януари 2021 г. броят на лабораториите за обществено здраве в световен мащаб, оборудвани да извършват молекулярна идентификация на SARS-CoV-2 в

**клинични проби, се е увеличил поне десеторно.** Това увеличение беше постигнато чрез образцова координация и надзор, поетапно обучение и обединени обществени поръчки. Успоредно с това **беше увеличена биологичната безопасност, беше развито биоинженерството и се подsigури по-добро качество на диагностиката и получените резултати.** Подобен експоненциален ръст на капацитета за тестване на този патоген в общественото здравеопазване е доказателство за **бързият напредък в молекулярната диагностика** и пренасочване на направените първоначални инвестиции в диагностика на COVID-19 за други инфекциозни заболявания.

Други примери за успешно приложени молекулярни техники в диагностиката са при доказване причинителите на ебола и жълта треска, заболявания, причинени от хеморагични вируси в Нигерия през последното десетилетие. С помощта на молекулярните методи тези тестове са извършени не за седмици, а за часове. Предварителната информация, предоставена чрез PCR тестове на място, предостави ранни сведения, които ръководеха първите мерки, които са предприети в областта на общественото здраве. Секвенирането на целия геном (WGS) даде възможност едновременно да се идентифицират необичайните етиологични агенти, да се определят тяхните профили на антимикробна резистентност и да се определят вътреболничните огнища. Молекулярните методи могат да увеличат идентифицирането на патогени при пациенти с менингит няколкократно, както показват в проучване на огнище на вируса на Чикунгуна в Бангладеш. Тези и много други примери изграждат силен аргумент за рутинна употреба на молекулярна диагностика дори в лицето на предизвикателства, които до голяма степен могат да бъдат преодолени.

Както беше посочено и преди, „PCR е лесно да се направи лошо“, а **вероятността от контаминация или погрешно тълкуване на данни от лошо изпълнени молекулярни тестове са кошмарите на дори най-напредналите диагностичи.** Секвенирането на целия геном може да смекчи някои ограничения на PCR. Налице е **неотложна необходимост от разширяване и укрепване на базата от знания в областта на молекулярната биология** в страните с ниски доходи и от увеличаване на достъпа до външно осигуряване на качеството.

**Молекулярната диагностика ще осигури достъп до тестове за милиони, които нямат такава възможност сега.** Съществува огромен потенциал за революционизиране на наблюдението на труднодостъпните групи от населението и за покриване на големи площи с малко ресурси. Например откриването на патогени, предавани по фекално-орален път може да помогне за идентифициране на разнообразните пътища на предаване и за вземане на своевременни мерки като например кампании за ваксинация. В случай на тиф, рутинната диагностика има слаба чувствителност, а диагностиката на пробите от източници на околната среда е още по-малко чувствителна. Но **откриването на *S. enterica* и други патогени чрез методи, основани на ДНК, е лесно и ефективно и успешно се използва за картографиране на пътищата на трансмисия и предаване на тиф,** както и на полиомиелитните вируси. Аналогични методи могат да се използват за холера, ентеровируси и дори SARS-CoV-2.

**Настоящите постижения в молекулярната диагностика са върхът на айсберга и сега е моментът да се справим със затрудненията, които предотвратяват разширяването на тяхното използване.** Важна стъпка е закупуване на наистина

подходящо оборудване, като например секвенаторите на *Oxford nanopore*, които са поевтини, по-малки като размер, дори мобилни и даващи възможност за употреба в полеви условия. Националните институти за общественото здраве са в най-добра позиция да предоставят така необходимото управление, координация и подкрепа за разширяването на диагностиката на общественото здраве и вече са демонстрирали лидерство в много отношения.

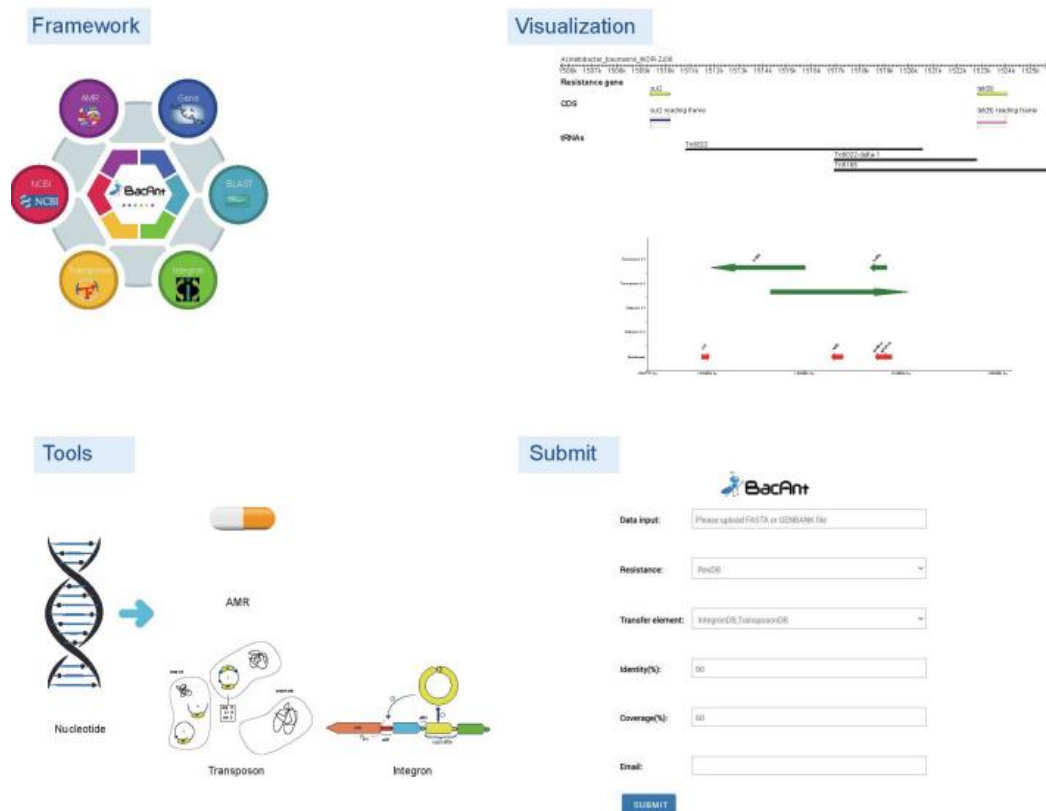
**Може и трябва да се направят иновации, за да се пригоди молекулярната диагностика към рутинната лабораторна подготвеност, а не да се работи в посока адаптиране към съществуващата инфраструктура.**

Ерата на секвенирането от следващо поколение (NGS) започна през 2005 г. с пускането на пазара на масивно паралелно пиросеквениране (*massively parallel pyrosequencing*) (Margulies et al., 2005). **Технологията NGS се разви бързо през последните години и доведе до значителни подобрения по отношение на качеството и добива.** С бързото намаляване на разходите за последователност, намалявайки с до 80% годишно, целогеномното секвениране (WGS) на бактериите се превърна в рутинен метод в диагностичните лаборатории в страните с високи доходи (Didelot et al., 2012). **Приложенията на NGS включват WGS, целеви NGS и метагеномни NGS.** Сред тях най-често се използва WGS за едновременно идентифициране, типизиране и/или прогнозиране на антимикробна чувствителност на патогени (Mitchell and Simner, 2019). **Едно от най-големите предимства на NGS е способността за предвиждане на гени за антимикробна резистентност (ARG) и мобилни генетични елементи (MGE) в бактериите, което позволява изследването както на организацията и структурата на такива генетични характеристики, така и на епидемиологията на разпространение на бактериални щамове или вирулентни гени, включително разпространението на резистентни към антибиотици бактерии като част от програмите за наблюдение (Zhou et al., 2015).** Всеки ден, огромен брой бактериални геноми се секвенират с помощта на NGS технология в лаборатории по целия свят, като секвенирането се осъществява със забележителни темпове. С това огромно количество налични данни е важно лесно да се извлича информация. В публично достъпните бази данни обаче повечето бактериални геноми са налични като *contig* последователности, които са постигнати с помощта на алгоритми за автоматично аотиране. През годините са разработени **високоэффективни методи за бактериална аотация на генома, които не изискват много потребителска подготвеност и намеса.**

**Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST)** е широко използван **уебсървър за геномни аотации на микробни видове (Aziz et al., 2008).** Въпреки че ефективността на използване на RAST-базирана аотация е много висока, остават няколко важни ограничения. Например RAST ще обозначава много отворени рамки за четене (ORF) като „хипотетични протеини“, а ефективността за идентифициране на ARG и тяхното „етикетиране“ като такива е доста ограничена, тъй като алгоритъмът не е съобразен с тази цел. Въз основа на системата RAST, *Patosystems Resource Integration Center (PATRIC)* подобри събирането на данни за ARG и предостави на потребителите по-мощен анализ както за геноми, така и за индивидуални гени (Wattam et al., 2018)). Друг достъпен сървър за аотация е **Resfinder**, който се управлява от Центъра за геномна епидемиология; той осигурява удобен начин за идентифициране на придобитите ARG в

секвенирани бактериални изолати (Zankari et al., 2012). В допълнение към анотациите на ARG са създадени **някои бази данни, специално предназначени за анотиране на MGE, като например инсерционни секвенции (ISfinder), интегрони ((INTEGRALL) и транспозионни елементи (The Transposon Registry) (Siguier et al., 2006; Moura et al., 2009; Tansirichaiya et al., 2019).** IS са изобилие от мобилни елементи в бактериите, които са отговорни за мобилизирането на много гени, включително тези, които посредничат ARG (Razavi et al., 2020)). Такива ARG често се срещат в генетичния код на конкретни IS, докато съпътстващите IS региони са разнообразни (Razavi et al., 2020)). Например може да се наблюдава ясно свързване на ARG с интегрони от клас 1. Анализът на които IS са свързани с гените ARG ще помогне да се открият нови ARG (Razavi et al., 2020). Освен това съществува голям интерес да се проучи как се разпространяват ARG чрез MGE (Chet al., 2021). Ранното идентифициране на ARG в бактериите би улеснило наблюдението и молекулярната диагностика (Razavi et al., 2020). Също така за появата и бързото разпространение на резистентност са отговорни и събития на междувидов генетичен трансфер на MGE. Поради това познаването на свързаната с MGE лекарствена резистентност е от решаващо значение за мониторинга на резистентността при микробните видове. За съжаление, до момента не е налице бърз инструмент за анотация на комбинацията от ARG и MGE, а генерирането на файлове на GENBANK трябва да се извършва ръчно. Затова е създадена **нова програма, наречена BacAnt: A Combination Annotation Server for Bacterial DNA Sequences to Identify Antibiotic Resistance Genes, Integrons, and Transposable Elements**, която бързо и ефективно анотира ARG, интегрони и преносими елементи в една стъпка и генерира файл *genbank* автоматично, който е съвместим с програмата Easyfig за сравнителен геномен анализ. Използват се три бази данни за инструмента *BacAnt*, включително resDB (база данни за последователността на генните локуси на резистентността), IntegronDB (база данни за интегронна последователност) и TransposonDB (база данни за транспозонна последователност). Програмата *BacAnt* е написана на Python, за да се идентифицират ARG и MEG за бактериални нуклеотидни последователности с BLAST анализ. За първи път е използвана програмата BLASTN. За откриване на интегрони е използвана Integron\_Finder, за да се предвидят възможни интегрони и е използвана програмата BLASTN, сравняваща последователността на интегран с базата данни IntegronDB за най-добрата последователност. След това необработените резултати са филтрирани. **Прагът на съвпадение е определен на 90% и на 60 % за покритие.** И накрая, филтрираните резултати се показват във формат текст и *genbank*. За да може анализът да се извърши онлайн, е разработен уебсайт, който е наречен <http://bacant.net>.



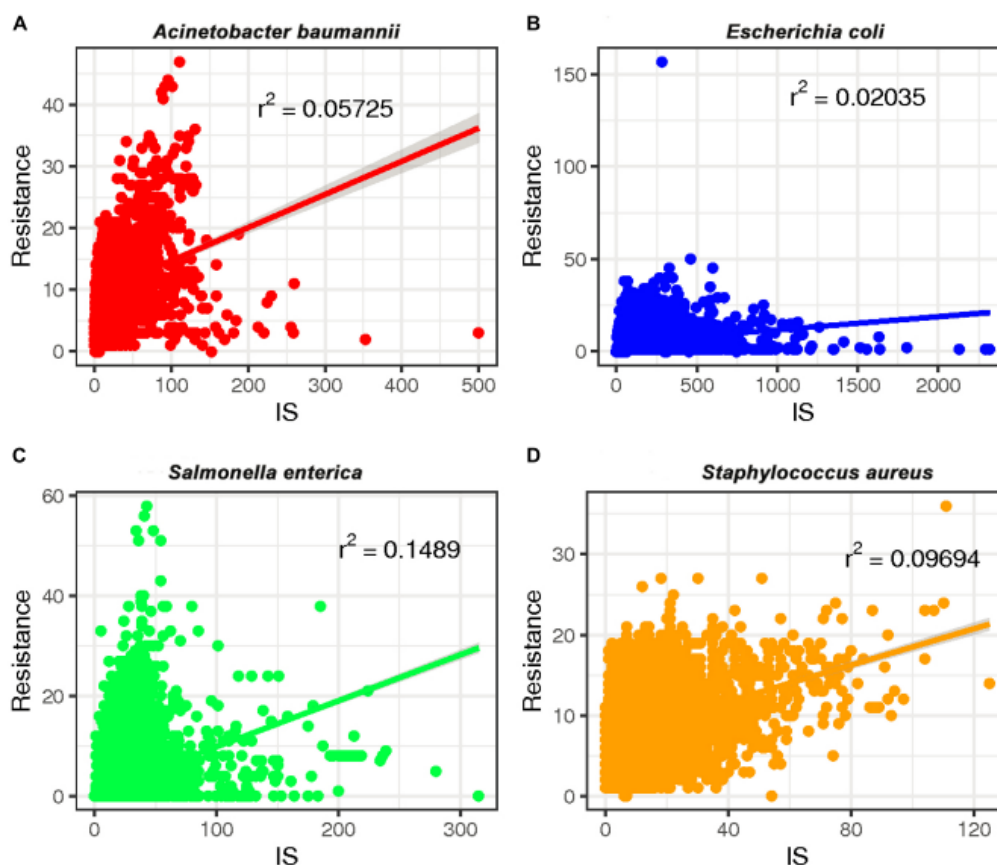


**Фиг. 1:** Работен процес на инструмента BacAnt

BacAnt е валидиран със 1100 геномни секвенции от осем вида (*Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Clostridioides difficile*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* и *Vibrio parahaemolyticus*).

BacAnt е браузър базирана платформа за аотиране на ДНК последователности и визуализиране на резултатите от аотацията. Когато използва веб интерфейса, потребителят първо има избор да качи ДНК последователности като Fasta, Seq или GenBank файлове. След това потребителят има възможност да избере една или няколко бази данни, които включват resDB, IntegronDB или TransposonDB за аотация на последователността. След подаването на ДНК последователност, базираната на питон програма BacAnt ще идентифицира ARG и MGE в бактериалната нуклеотидна последователност.

**За да може да се извлече максималното количество информация от данните за цялата последователност на генома, се нуждаем от подобрените методи за аотация и анализ за MGE.** В това обстойно проучване и разработка е създаден веб сървър, който е лесен за използване и позволява аотация на ARG, интегрони и преносими елементи в същото време. Програмата генерира genbank файлове автоматично, които са съвместими с easyfig за сравнителен геномен анализ, който **ще ускори биоинформатичния анализ на ARG-свързани последователности.**



**Фиг. 2:** Визуализация на резултатите от *VacAnt* за някои тестови патогени, процент резистентност и наличие на инсерционни последователности, съдържащи *MGE* и *ARG*

### Последни развития във фенотипните и молекулярните диагностични методи за откриване на антимикробна резистентност в *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* е Грам-положителна бактерия. Тази бактерия кодира както стафилококовия протеин А, така и коагулазния ензим; тези два фактора имат диагностична значимост, тъй като се използват за разграничаване на *S. aureus* от коагулазо-отрицателните стафилококи (*CONS*), които обикновено са по-малко вирулентни. *S. aureus* обикновено колонизира човешката кожа и назофаринкса и се изчислява, че около 15% - 30% от здравите индивиди са носители на *S. aureus*. *S. aureus* обаче може също да се превърне в опортюнистичен патоген, отговорен за широк спектър от клинични заболявания.

В исторически план *S. aureus* бързо се развива и развива резистентност към няколко класа антибиотици. Резистентността към пеницилин, първият открит бета-лактамен антибиотик срещу инфекция със *S. aureus*, е документирана през 1942г. Днес по-голямата част от изолатите на *S. aureus* са резистентни на множество антибиотици, не само пеницилин. Днес метицилин резистентен *S. aureus* (MRSA) е една от най-често срещаните бактерии, отговорни за вътреболнични инфекции и епидемии. Освен това MRSA е изолирана в общностни условия (където може да причини и огнища на инфекции или пневмония при здрави възрастни) и при животни, и се характеризира с мултилекарствена резистентност, която в различна степен е изразена

спрямо други антибиотици, като например макролиди, аминогликозиди, тетрациклини или флуорохинолони. В действителност през 2017 г. **Световната здравна организация посочи MRSA като бактерия с висок приоритет, за която е необходимо разработването на нови антибиотици.**

Обикновено първоначалната терапия на пациенти, за които се подозира, че са заразени със *S. aureus*, се основава на опита на лекуващия лекар; тази емпирична терапия включва използването на широкоспектърни антибиотици. Когато резултатите от идентифицирането на патогени и тестовете за антимикробна чувствителност (AST) станат достъпни, обикновено 24-72 часа след вземане на проба, емпиричната терапия може да бъде променена на по-целенасочена антибиотична терапия въз основа на доказателства от конкретния случай. Въпреки това неправилната емпирична терапия може да има последствия като увеличаване на продължителността на престоя в болницата и интензивното отделение, появата на лекарствена резистентност, антибиотична токсичност и повишени разходи за пациента и товарене на здравната система. Поради това **бързото и точно откриване на *S. aureus* и неговата лекарствена резистентност (в идеалния случай малко след или в същия ден, в който се взема пробата от пациента) е от клинично значение за бързото намаляване на ескалацията на терапията от широк спектър до целеви антибиотици.**

В този описателен преглед са представени последните фенотипни и молекулярни диагностични методи за откриване на антимикробна резистентност в *S. aureus*.

### **1. Фенотипни методи за откриване на антимикробна резистентност в *S. aureus***

Обикновено при фенотипните методи бактериите (*S. aureus*) трябва да растат при наличието на определени концентрации на антибиотика, който трябва да бъде тестван. **С помощта на тези методи е възможно да се оцени истинската фенотипна резистентност. С някои фенотипни методи е възможно да се определи точната минимална инхибираща концентрация (MIC) - най-ниската концентрация на антибиотик, която инхибира бактериалния растеж - докато при други методи е възможно да се определи само дали бактериите са податливи, интермедиерни или резистентни на антибиотици.** Освен това фенотипните методи могат да бъдат разделени на мануални и (полу) автоматизирани. Фенотипните методи като **метода на микроразреждания в бульон (BMD) или методът на дискдифузия представляват класически методи или така наречения „златен стандарт“ в AST.** Въпреки че фенотипните методи измерват реалната устойчивост и се използват широко, те крият в себе си **проблеми с междулабораторната възпроизводимост (например факторите, влияещи върху възпроизводимостта, включват оператора, който провежда изпитването и ръчно интерпретира/чете резултатите (проблем, който може да бъде решен чрез автоматизирани фенотипни методи), или условията на околната среда/лабораторията, като среда за растеж и стабилност на реагентите).**

В **таблица 1** е представен преглед на фенотипните методи (и тяхната ефективност) от настоящия описателен преглед.



Phenotypic Method Used	Principle of the Method	On Culture/on Clinical Sample	TAT <sup>1</sup>	Brief Advantages/Disadvantages +/-	No. and Type of <i>S. aureus</i> Analyzed <sup>2</sup>	Major Diagnostic Performance <sup>3</sup>
Chromogenic media	Selective media, colorimetric colony detection	Nasal swabs, positive blood culture	24 h	+ Easy to perform and interpret, low-cost – No MSSA identification	72 MRSA 28 MSSA	Sensitivity 100% Specificity 78.6%
					19 MRSA 29 MSSA	Sensitivity 78.9% Specificity 41.3%
Rapid BMD	Colorimetric assay, MTT dye as oxidation-reactions indicator	Culture	7 h	+ Easy to perform, rapid, low-cost – Larger validations needed	21 MRSA 19 MSSA	Sensitivity 100% Specificity 94.7%
Disk diffusion on Mueller-Hinton rapid agar MHR-SIR	Disk diffusion with shorter incubation	Positive blood culture	6–8 h	+ Easy to perform, rapid, low-cost – Larger validations needed	23 <i>S. aureus</i> tested for several antibiotics	CA 97.8% mEs 1.9% VME 0.3%
					29 MRSA 50 MSSA	TAT 17h shorter, better therapy de-escalation
Rapid AST	Disk diffusion with shorter incubation	Positive blood culture	4–6 h	+ Easy to perform, rapid, low-cost – Low growth, diameters margins less demarcated	24 MRSA 313 MSSA	Sensitivity 100% Specificity 100%
					14 MRSA 183 MSSA	Sensitivity 100% Specificity 99.4% ATU 0.5%
					9 MRSA 212 MSSA	Sensitivity 100% Specificity 99.1% ATU 0.4% ME 0.5%
VITEK 2	Turbidimetric monitoring of bacterial growth	Culture	4–11 h	+ Automated, rapid, standardized interpretation – Fixed range of testable antibiotics, less accurate for linezolid/vancomycin	72 MRSA 28 MSSA	Sensitivity 97.2% Specificity 100%
					27 MRSA resistant to linezolid	MEs 85.2%
					28 MRSA with a vancomycin MIC ≥ 2	MEs 46.4%
BD Phoenix	Turbidimetric and colorimetric growth detection	Culture	6–16 h	+ Automated, rapid, standardized interpretation – Less accurate for SXT	642 <i>S. aureus</i> analyzed for SXT resistance	CA 91.9% MEs 7.9% mEs 0.3%
Copan WASP Colibri	Automated disk diffusion	Culture	16 h	+ Automated, flexible, detect heteroresistance and mixed cultures – Should be compared with standard disk diffusion	107 <i>S. aureus</i> tested for several antibiotics	CA 99.9%
Accelerate PhenoTest™ BC	Single-cell analysis, fluorescent in situ hybridization	Positive blood culture	7 h	+ Automated, monomicrobial call, rapid, identification and AST in the same platform	98 MRSA 86 MSSA	Sensitivity 100% Specificity 98.8% CA 99.5%
					22 MRSA 2 MSSA	Sensitivity 100% Specificity 100%
PBP2a latex agglutination assay	Particles with monoclonal antibodies, agglutination reaction	Culture	5 m	+ Rapid, easy to perform and interpret – no PBP2c detection	95 MRSA 10 MSSA	Sensitivity 98.95% Specificity 77.8%
PBP2a SA culture colony test	Monoclonal antibodies immobilized in a membrane	Culture	5 m	+ Rapid, easy to perform and interpret – no PBP2c detection	63 <i>mecA</i> -MRSA 10 <i>mecC</i> -MRSA	Sensitivity 100% Specificity 100% for <i>mecA</i> -MRSA
					On shortly incubated cultures	4–6 h Culture

## Хромогенни среди

Този метод е пример за работен процес, който се основава на клетъчно-културално култивиране, за откриване на антимикуробна резистентност (или за откриване на MRSA. След 16-24 часа инкубация често се открива смесена култура (поради замърсители/колониращи бактерии) и поради това *S. aureus* трябва да бъде изолиран и реинокулиран, т.е. субкултура, за допълнителни 16-24 часа. Когато *S. aureus* е изолиран в субкултурата, може да се извърши AST тест (за още 16-24 часа) и може да се открие MRSA например. Този процес може да отнеме над 72 часа. За да се намали времето за обработката (TAT) (т.е. времето от събирането на пробите до резултатите), са разработени хромогенни среди. Хромогенните среди са селективни среди въз основа на селективни добавки (инхибиращи растежа на други бактерии) и цефокситин или оксацилин (инхибиращи растежа на MSSA). Хромогенната среда може да идентифицира MRSA чрез цветовите реакции на колонии в периода 18-26 часа в първата култура (напр. назални тампони или натривки за рани). *Madhavan* и колеги използват нова хромогенна среда (*CHROMagar, HiCrome, Rapid MRSA AgarPlate-MP1974, HiMedia, New Delhi, India*), за да определят резистентността на метицилин в 100 *S. aureus* субкултури, първоначално изолирани от различни клинични проби. Като се използват методи от златния стандарт, са идентифицирани 72 MRSA и 28 MSSA, а **чувствителността и специфичността на хромогенните среди за откриване на MRSA са съответно 100 % и 78,6 %.**

В друго проучване авторите изследват 48 субкултури на *S. aureus*, за да определят тяхната устойчивост на метицилин, използвайки хромогенна MRSA среда (*RTA Laboratories, Kocaeli, Турция*). Те са установили 19 MRSA и 29 MSSA, а **чувствителността и специфичността на хромогенните среди за откриване на MRSA след 24 часа инкубация са съответно 78,9 % и 41,3%; специфичността се е подобрила до 58,6 %, ако инкубацията бъде увеличена до 48 часа.** Хромогенните среди представляват лесен и евтин начин за скрининг на носителите на MRSA, но **обикновено не откриват MSSA**, което е важна клинична информация за правилния избор на антибиотици.

## Метод за микроразреждане в бульон (BMD)

При метода на BMD бактериите от изолирана култура се инокулират в течна среда с различни концентрации на антибиотици (в двукратно серийно разреждане) в 96-ямкови плаки и се инкубират за 16 - 24 часа. Мътността в ямките показва бактериален растеж при наличие на специфична концентрация на антибиотици; поради това антибиотичният MIC може да бъде определен съгласно критериите на Института за клинични и лабораторни стандарти (CLSI) и на Европейския комитет за изпитване на антимикуробна чувствителност (EUCAST). Методът BMD е **един от златния стандарт фенотипни методи и е евтин, но изисква изолирана култура и инкубация за една нощ.** За да се намали TAT на BMD, *Mahmoud et al.* използва **бърз и колориметричен метод за BMD, който може да осигури AST резултати за 7 часа.** Като бързи

показатели за намаляване на окислението са използвани две багрила, 3-(4,5 диметилтиазол-2-ил)-2, 5 дифенил тетразолиев бромид (МТТ) и 2,3,5-трифенил тетразолиев хлорид (ТТС). Авторите анализират 40 *S. aureus* и 40 *CONS* клинични изолати. След 7 часа е извършено окончателното разчитане на резултатите. Авторите сравняват бързата BMD и стандартната BMD. Бързите BMD, използващи МТТ, са дали най-добри резултати по отношение на: изолатите *S. aureus*: 100% за гентамицин и еритромицин, 97,5% за оксацилин, 95,0% за тетрациклин, 87,5% за ципрофлоксацин и 72,5% за клиндамицин. Бързите BMD правилно идентифицирани 21/21 изолати на MRSA (**чувствителност: 100%**) и 18/19 изолати от MSSA (**специфичност: 94,7%**). Бързата BMD е лесна за тълкуване, осигурява точни резултати AST и е с ниска цена. Поради това той представлява добър метод, който **би могъл да се прилага рутинно, особено в страни с ограничени ресурси.**

### Диск дифузионен метод

При диск дифузионния метод колонии от изолирана бактериална култура се ресуспендират в растежна среда до концентрация около  $1-2 \times 10^8$  колонообразуващи единици (CFU)/ml (еквивалентна на единицата за мътност от 0,5 McFarland). След това бактериалната суспензия се инокулира на плаки с агар, коригирани с катион-хинтон (МН), а хартиените дискове, съдържащи фиксирани концентрации на антибиотици, се прилагат върху повърхността на агара. **След 16-24 часа инкубация** се измерва диаметърът на потискането на растежа около всеки диск. Размерът на диаметрите се използва, за да се интерпретира дали бактериите са податливи или резистентни към антибиотика съгласно критериите CLSI или EUCAST. Този диск-дифузионен метод **осигурява категоричен резултат** (чувствителен или устойчив), **но не и точната MIC стойност**. В своето проучване *Madhavan* и колеги съобщават за **чувствителност от 97,2 % (70/72) и специфичност на 100 %** от диск-дифузионния метод за откриване на MRSA. Авторът подчертават, че в случай на диаметър на граничната зона на инхибиране **може да е необходимо второ потвърдително изпитване**. Методът за диск-дифузия е златен стандартен метод и е **точен, надежден, лесен за изпълнение и на ниска цена**. Този метод **обаче се нуждае от изолирана култура, последвана от нощна инкубация**.

Един от опитите за намаляване на TAT е работата на *Akerlund* и колеги. Те оцениха диск-дифузионния метод EUCAST с бърз AST (RAST) директно от положителни кръвни култури, а плаките са инкубирани за 4, 6 и 8 часа вместо за една нощ инкубация. След тази кратка инкубация резултатите от AST бяха интерпретирани в съответствие с предварителните гранични точки на EU-CAST. За да ограничи фалшивите или лъжливите чувствителни резултати, EUCAST въведе област на неопределеност (ATU) - нещо като буферна зона, в която резултатите не могат да бъдат интерпретирани и могат да изискват или по-дълъг инкубационен период, или потвърдителен тест. От анализирани 337 *S. aureus* 24 са идентифицирани като MRSA **след 4, 6 и 8 часа инкубация със 100% чувствителност**. RAST диск-дифузията може да замени традиционната диск-дифузия за по-бърз AST на положителни кръвни култури. Въпреки това **не са налице всички нови гранични точки за бърз AST и тълкуването на резултатите може да бъде по-трудно**, тъй като след няколко часа на инкубация

бактериалният растеж е нисък и границите на диаметъра на зоната са по-малко очертани. По-автоматизираното тълкуване на резултатите може да преодолее това ограничение.

### Методи на дифузия в градиент (Etest)

При методите на градиентна дифузия градиентните концентрации на антибиотика се инокулират в пластмасова лента, която, подобно на дифузията на диска, може да бъде поставена върху МН агар за определяне на антибиотична МИС. *Etest* (*bioMerieux AB biodisk*) е пример за дифузионен тест с търговски градиент. *Etest* не се използва за определяне на резистентността на метицилин в *S. aureus*, тъй като **този тест е по-скъп от диск-дифузионния метод**. Въпреки това, *Etest* често се използва за определяне на МИС на ванкомицин. CLSI определя гранични стойности за *S. aureus*, възприемчив към ванкомицин, ако МИС < 2 g/ml, интермедиерен (ванкомицин-междинен *S. aureus*, VISA), ако МИС = 4-8 g/ml и устойчив, ако МИС >16 g/ml. Освен това при хетерогенни изолати резултатите са противоречиви.

### Автоматизирани търговски фенотипни методи

Фенотипният AST в *S. aureus* (и при други бактерии) може да се извършва и чрез автоматизирани методи/системи. **Предимствата** на използването на тези системи пред ръчните AST са **стандартизацията на резултатите, по-краткият ТАТ (4,5 - 24 часа) и (полу) автоматизацията на процедурата**. Недостатъците могат да бъдат, че **гамата от тествани антибиотици често е фиксирана** (включена в панели) или че **могат да бъдат тествани само няколко концентрации на лекарства**. Най-често одобрените системи за автоматизирана AST в диагностиката (FDA) са **VITEK 2** (*BioMerieux, Inc., Durham, NC, САЩ*), **MicroScan** (*Beckman Coulter, Renton, WA, САЩ*), **Phoenix** (*BD Diagnostics, Sparks, MD, САЩ*) и **Sensititre** (*Thermo Fisher Scientific, Oakwood Village, OH, САЩ*). Всички тези методи имат автоматизирани системи за откриване на бактериален растеж при наличие на специфични концентрации на антибиотици. *Madhavan* и колеги съобщават за **чувствителност от 97,2% и специфичност от 100% за откриването на MRSA чрез използване на VITEK 2**.

Като се има предвид резистентността към антибиотици, различни от метицилин, *Yoo* и колеги наблюдават **висок процент на фалшиви резултати**, използвайки VITEK 2. Поради това в случай на изолати на резистентност, открити с помощта на VITEK 2, може да е **необходим потвърдителен тест**. Авторите стигнаха до заключението, че в случай на ванкомицин МИС > 2, идентифициран с VITEK 2, следва да се извърши втори потвърдителен тест преди преминаването към антибиотици от втора линия, за да се намали неподходящата терапия и възникващата резистентност. *Al Rawahi* и съавтори установиха **несъответствия в чувствителността на *S. aureus* към триметоприм/сулфаметоксазол (SXT) чрез използване на автоматизирания BD Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, САЩ) и метода за дифузия на диска**. Специфичността на BD системата *Phoenix* за откриване на резистентността към SXT е **91,3% (586/642)**. Проучването също така подчертава необходимостта от наблюдение на ефективността на системата Phoenix BD по отношение на определянето на SXT

резистентността, може би чрез извършване на потвърдителен тест в случай на инфекция с MRSA.

*Cherkaoui* и колеги оцениха изпълненията на *Copan WASP Colibri Coupled* към *Radian In-Line Carousel and Expert System*, напълно автоматизиран метод за дискдифузия, и сравниха резултатите с *VITEK 2*. Сред 107 *S. aureus*, изолирани от различни клинични проби, **не са наблюдавани противоречиви резултати по отношение на резистентността** към цефокситин, гентамицин, клиндамицин, еритромицин, фузинова киселина, рифампицин, линезолид или тигециклин. Общият размер на ВО е бил 99,9%. Въпреки че *VITEK 2* все още изисква някои ръчна работа, ***Copan WASP Colibri Coupled* има следните предимства: той е напълно автоматизиран от подготовката на инокулата до интерпретацията на резултатите, той е гъвкав, тъй като антибиотичните дискове могат лесно да бъдат заменени с други, по-надежден е при откриване на хетерорезистентност и дава възможност за откриване на смесена култура.**

*The Accelerate PhenoTest* е друга автоматизирана система, наскоро одобрена от FDA. Извършва идентификация и AST на Грам-положителни и отрицателни бактерии директно от положителни кръвни проби. Системата автоматично пречиства кръвните проби от примеси. Впоследствие бактериалните клетки се фиксират и идентификацията се постига микроскопски чрез едноклетъчен анализ. Едноклетъчната идентификация се извършва чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) със специфични бактериални сонди. След това пробите растат в МН агар със специфичния антибиотик. **Системата осигурява идентификация в 90 минути и AST в 7 часа и също така показва дали пробите съдържат само един патоген.** *Pancholi* и съавтори оценяват ефективността на системата в 247 *S. aureus* изолати и съобщават **чувствителност и специфичност за откриване на *S. aureus* съответно 98,0 % и 98,9 %.** Чувствителността и специфичността на откриването на MRSA са съответно **100% и 98,8%.** Значително предимство на системата е, че тя **може да извършва идентификация и AST заедно,** без да е необходимо предварително идентифициране с друг метод.

*Sanchez-Carrillo* и *Boland* оценяват системата Alfred AST® за бърз AST директно върху положителни кръвни проби. Тази система открива бактериален растеж чрез турбидиметрия, използвайки технология за разсейване на светлината. Антибиотичните панели могат да се персонализират; системата обаче се нуждае от метод за предварително идентифициране, който да бъде определен за подходяща антибиотична група. И двете изследвания са установили СА от 100 % при анализа на 7 и 30 *S. aureus* изолати; въпреки това, не е ясно колко *S. aureus* са MRSA или резистентни към други антибиотици. Поради това са необходими по-обстойни проучвания за изпитване на системата.

## **Пеницилин-свързващ протеин (PBP) 2A изследване за откриване**

PBP2a е кодиран от гена *mecA* и е отговорен за резистентността към метицилин (или оксацилин или цефокситин) в *S. aureus*. Следователно друг фенотипен метод за откриване на MRSA е откриването на PBP2a протеин директно върху изолираните колонии на *S. aureus*. Съществуват два основни търговски теста: **PBP2a латекс**



**аглютинационен тест (Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc., Lenexa, KS, САЩ) и тест за колония Alere PBP2a SA (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, САЩ), имунохроматографски метод. Khawaja и колеги използват PBP2a латекс аглютинационен тест в 105 клинични изолати на MRSA и съобщават за чувствителност от 98,9 % и специфичност 77,8 %.**

Резистентността към оксацилин се медуира не само от месА, но и от гена месС (първоначално наречен месА LGA251), който споделя 70% нуклеотидна хомология с месА и кодиращ за PBP2с, усложнявайки диагностичните тестове на базата на откриване на месА-PCR и PBP2a. Dupiex и колеги оценяват ефективността на последната версия на имунохроматографския тест, разработен от Alere PBP2a SA за бактериални колонии (SACCT) (Alere, Scarborough, ME). Те анализират 73 MRSA (63 месА положителни и 10 месС положителни), 10 MSSA и 10 CONS. Те също така оценяват ефективността на изпитването на колония PBP2a SA след индукция на PBP2a/PBP2с чрез отглеждане на изолати в присъствието на цефокситинов диск (30pg). Методът показва **100% чувствителност за откриване на PBP2a, но не може да открие PBP2с, дори след индукцията на цефокситин.** Поради това не са наблюдавани подобрения в откриването на PBP2с между настоящата и предишната версия на теста за колония PBP2a SA (SACCT). Следователно отрицателен резултат при PBP2a SACCT не предполага чувствителност към метицилин, тъй като изолатът може да бъде месС-положителен MRSA.

Kolesnik-Goldmann също използват PBP2a SACCT, но те променят протокола. Те изследват SACCT върху скорошните инкубирани (4-6 часа вместо 18-24 часа) стафилококови субкултури (индуцирани или неиндуцирани с цефокситин) от положителни кръвни проби. Анализирани са общо 38 субкултури *S. aureus* с 25 месА-положителни MRSA и 13 MSSA. Бързият SACCT отчита **чувствителност от 96,0% (24/25) и специфичност от 92% (12/13).**

### ***Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)***

През последните години маспектрометрията навлиза в клинични микробиологични лаборатории. Системата **MALDI-TOF открива протеините, налични в бактериите.** Бактериалните колонии се фиксират в кристална матрица и след това се облъчват с лазер. Протеините на пробата се йонизират и след това се ускоряват до йонния детектор, който измерва протеиновите заряди и времето на удара. Протеините с по-ниска маса ще пристигнат по-рано от протеините с по-висока маса. Като се използва референтна и известна маса, масата на изследваните протеини може да бъде определена и се визуализира в маспектър, където всеки пик на спектъра навреме съответства на специфичната маса на даден протеин. **Следователно един микроорганизъм ще има специфичен маспектър, съответстващ на протеиновия му профил, и този маспектър може да се използва за бактериална идентификация.** Прилагането на MALDI-TOF за идентифициране на патогени в клинични лаборатории е широко разпространено. Двете най-често срещани и одобрени от FDA системи MALDI-TOF са VITEK MS (bioMerieux Inc., Durham, NC, САЩ) и MALDI Biotyper CA System (Bruker

*Daltonics, Billerica, MA, САЩ*). Прилагането на MALDI-TOF за рутинни AST все още е развиваща се област. Чрез използването на MALDI-TOF съществуват няколко начина за определяне на резистентността или чувствителността към даден антибиотик, например **откриване на протеини, придаващи резистентност, откриване на масов пик (биомаркер), свързан с резистентност или разграждане на антибиотици**. Едно забележително предимство на MALDI-TOF е, че той **може да извършва както идентификация, така и AST, като опростява диагностичния работен процес, без да е необходимо да има отделни методи**. Освен това MALDI-TOF е **бърз** (няколко минути, след като е налице изолирана култура, но може да се извърши и върху положителна кръвна проба), **с относително евтина цена на изолат и е лесна за изпълнение**. Предизвикателствата са **първоначалната висока цена на инструмента MALDI-TOF и междулабораторната възпроизводимост**, тъй като MALDI-TOF не осигурява последователно едни и същи интензитети или пикови модели и следователно съществува **необходимост от различни и по-големи бази данни със специфични пикове за MRSA**. Няколко проучвания използват MALDI-TOF, по-специално за разграничаване на изолати MRSA и MSSA.

MALDI-TOF System Used	Principle of the Method	On Culture/ on Clinical Sample	TAT <sup>1</sup>	Brief Advantages/ Disadvantages +/-	No. and Type of <i>S. aureus</i> Analyzed <sup>2</sup>	Major Diagnostic Performance <sup>3</sup>
MALDI Biotyper <sup>®</sup> CA System (Bruker Daltonics)	21 peaks to discriminate MRSA/MSSA	Culture	Few m	+ Use a combination of peaks – Low specificity	181 <i>S. aureus</i>	Sensitivity 87.6% Specificity 71.4%
MALDI Biotyper <sup>®</sup> CA System (Bruker Daltonics)	Peptide PSM- <i>mec</i> and $\delta$ -toxin peaks for MRSA identification	Culture	Few m	+ Sensitive for SCC <i>mec</i> type II, III and VIII – Not adapted for other SCC <i>mec</i> types	35 MRSA	Sensitivity 40%
MALDI Biotyper <sup>®</sup> CA System (Bruker Daltonics)	Peptide PSM- <i>mec</i> peak for MRSA identification	Culture	Few m	+ Good specificity – SCC <i>mec</i> types of isolates unknown	241 MRSA 106 MSSA	Sensitivity 60.2% Specificity 100%
MALDI Biotyper <sup>®</sup> CA System (Bruker Daltonics)	m/z 4594 peak for MRSA identification	Culture	Few m	+ Potential MRSA biomarker peak – To be tested in an independent set of data	36 MRSA 31 MSSA	Sensitivity 83.3% Specificity 96.8%
VITEK MS (BioMérieux)	support vector machine algorithm to identify 38 peaks to discriminate MRSA/MSSA	Culture	Few m	+ Use a combination of peaks – MRSA/MSSA classification model needs optimization	194 MRSA 258 MSSA	Sensitivity 84.0% Specificity 88.0%
MALDI Biotyper <sup>®</sup> CA System (Bruker Daltonics)	DOT-MGA	Positive blood cultures	6 h	+ Rapid; tested with cefoxitin – Could be optimized for additional antibiotics	30 MRSA 14 MSSA	Sensitivity 100% Specificity 100%
VITEK MS (BioMérieux)	DOT-MGA	Culture	5 h	+ Tested with oxacillin – Could be optimized for additional antibiotics	20 MRSA 20 MSSA	Sensitivity 100% Specificity 100%

Таблица 2: Видове търговски китове за MALDI-TOF

*Kim* и колеги използват MALDI-TOF върху клинични изолати, за да идентифицират пикове или биомаркери, които могат да разграничат MRSA от MSSA. Анализирайки набор от бази данни от 320 *S. aureus* изолати, авторите са идентифицирали 13 пика, специфични за MRSA, и 8 пика, специфични за изолати от MSSA. Въз основа на тази информация авторите разработиха **алгоритъм, основан на 21 пика, за да се направи разграничение между MRSA и MSSA**. Те прилагат алгоритъма към 181 изолати *S. aureus* и той може да открие MRSA с **чувствителност 87,6% и специфичност от 71,4%**. *Paskova et al.* оценява откриването на пептидния фенолразтворим модул (PSM-мес) и  $\delta$ -токсин пика (специфични за MRSA и особено с тези, съдържащи SCC мес типове II, III и VIII) като метод за разграничаване на MRSA от MSSA. При анализа на 35 MRSA е постигната чувствителност от 70% (14/20) за MRSA, съдържаща SCCмес II или III, но 0/15 MRSA, съдържаща SCC мес I, II и V, са правилно идентифицирани, подчертавайки **слабата разделителна способност на тези пикове**. *Hu* и колеги оцениха разделителната способност на пика на PSM-мес в 241 MRSA и 106 MSSA и установиха чувствителност от 60,2 % и специфичност от 100%, но не беше налична информацията за вида SCCмес на изолати. Друг опит за идентифициране чрез MALDI-TOF-специфични пикове на MRSA бе проведен от *Flores-Trevino* и колеги. Те анализираха 36 MRSA и 31 MSSA и откриха пик с  $m/z$  4594, който би могъл да разграничи изолати на MRSA (където пикът присъства като дублетен) от изолати MSSA (където пикът е единичен). Като се използва този пик за откриване на изолати на MRSA, се достига чувствителност от 83,3% и специфичност от 96,8%. Пикът изглежда е свързан с 50S рибозомната субединица и може да бъде допълнително проучен като биомаркер за MRSA. *Liu* прилага подход за машинно самообучение (*machine learning*) за идентифициране на пикове, които биха могли да разграничат MRSA и MSSA. При анализа на 194 MRSA и 258 MSSA са открити 38 характеристики, които биха могли да разграничат MRSA от MSSA с чувствителност от 84,0% и специфичност от 88,0%.

*Idelevich* разработи MALDI-TOF-базиран директно към целта тест за растеж в микрокапка (*direct-on-target microdroplet growth assay (DOT-MGA)*); микрокапчиците бактериална суспензия първо се инкубират в бульон и след това се инокулират с MALDI-TOF със и без антибиотик. След отстраняване на бульона се измерва растежът в присъствието на специфичния антибиотик. *Nix* и съавтори оценяват DOT-MGA директно върху положителни кръвни проби, за да открият изолати на MRSA. Включени са общо 14 MRSA и 14 клинични изолати на MSSA, плюс 16 контролни MRSA изолати, представляващи типове SCC мес от I до V. След като пробата е маркирана като положителна, авторите са опитали три различни протокола: филтрация/разреждане, лизис/центрифугиране и диференциално центрофугиране. След това инокулумът от трите различни протокола е използван за AST чрез DOT-MGA с 4, 5 и 6 часа инкубация. Накрая, трите инокулума са добавени към MALDI-TOF, със и без цефокситин. Протоколът за лизис/центрифугиране дава най-добри резултати, достигайки **100% чувствителност и специфичност за MRSA след 4, 5 или 6 часа инкубация**. Този бърз метод AST може да бъде интегриран в рутинен диагностичен работен процес за кръвни проби, тъй като може да изпълнява AST на същият ден от вземане на пробата. Други автори също са използвали DOT-MGA, но с VITEK MS (bioMerieux, Durham, NC, САЩ)

върху изолирани култури от 20 MRSA и 20 MSSA и са получили 100% чувствителност и специфичност за откриване на MRSA.

### **Молекулярни методи за откриване на антимикробна резистентност в *S. aureus***

Молекулярните методи диагностицират антимикробната резистентност чрез откриване на свързани с резистентност гени. Едно от основните предимства на използването на молекулярни методи е намаленото ТАТ, приравнено на фенотипни методи, тъй като няма нужда да се чака бактериален растеж в присъствието на антибиотици. Освен това молекулярните методи са засегнати в по-малка степен от тези-проблеми с растежа на културата, типични за фенотипните методи. Молекулярните методи обаче имат и ограничения: те не откриват реалното поведение на фенотипна резистентност, не определят MIC, могат да открият само известни гени, отговорни за резистентността и следователно не могат да открият нова резистентност или гени. Освен това понякога бактериите притежават гена на резистентността, но все още са податливи на антибиотика. В *S. aureus*, резистентността към метицилин (оксацилин, цефокситин) се кодира от гена *mecA*, който кодира PBP2a. PCR е молекулярен метод от “златен стандарт” за откриване MRSA. Генът *mecA* е включен в мобилен генетичен елемент, наречен стафилококова хромозомна касета *mec* (SCC *mec*), заедно с регулаторни гени (*MecI* /*MecR1*/*MecR2*), *csr* гени, отговорни за мобилността и други гени за антибиотична резистентност. Елементът SCC*mec* се вмъква в *orfX* локуса на генома на *S. aureus*. Понастоящем са идентифицирани 14 вида SCC*mec*. Типизирането на SCC *mec* е предимно полезно за молекулярно наблюдение, а не за клинична практика. Както е посочено по-горе, *mecA* не е единственият ген, отговорен за резистентността на метицилин; *mecC*, плазмид-пренесената *mecB* и *mecD*, съществуват, въпреки че последните два са рядко идентифицирани.

*Таблица 3: Преглед на молекулярните методи за детекция на S. aureus*

Molecular Method Used	Principle of the Method	On Culture/ on Clinical Sample	TAT <sup>1</sup>	Brief Advantages/Disadvantages +/-	No. and Type of <i>S. aureus</i> Analyzed <sup>2</sup>	Major Diagnostic Performance <sup>3</sup>
Xpert <sup>®</sup> SA Nasal Complete (Cepheid)	Real-time PCR for <i>mecA/C</i> , <i>spsA</i> and <i>SCCmec-orfX</i>	Nasal samples	3 h	+ Clinical outcomes analyzed – 56 invalid results not further analyzed	10 MRSA in 605 nasal samples	Sensitivity 100% Specificity 98.8% PPV 58.8% NPV 100% TAT 41 h shorter
			85 m	– Unusual reference method	27 MRSA in 500 nasal samples	Sensitivity 51.8% Specificity 100%
Xpert <sup>®</sup> MRSA/SA BC Assay (Cepheid)	Real-time PCR for <i>mecA/C</i> , <i>spsA</i> and <i>SCCmec-orfX</i>	Positive blood cultures	1.7 h	+ Clinical outcomes analyzed – More resistant isolates needed	1 MRSA 38 MSSA in 264 blood cultures	Sensitivity 100% specificity 100% TAT 24 h shorter, earlier changes in patient management
			n.a.	+ Clinical outcomes analyzed – Sensitivity/specificity not calculated	37 MRSA 64 MSSA	Time to optimal therapy 20 h shorter, duration of vancomycin therapy 18 h shorter
Xpert <sup>®</sup> MRSA/SA SSTI (Cepheid)	Real-time PCR for <i>mecA/C</i> , <i>spsA</i> and <i>SCCmec-orfX</i>	BAL samples	68 m	+ Clinical outcomes analyzed – Method not validated in BAL samples	23 MRSA 25 MSSA in 247 BAL samples	Sensitivity 95.7% specificity 98.2% Time of line-zolid/vancomycin treatment 40 h shorter
Hologic Panther Fusion <sup>®</sup> MRSA	PCR and Invader chemistries for <i>mecA/C</i> , <i>gap</i> and <i>SCCmec-orfX</i>	Nasal samples	<3 h	+ Can analyze 350 samples in 8 h – Need comparison with a similar method	30 MRSA 112 MSSA in 434 nasal swabs	Sensitivity 86.7%, specificity 98.8%, CA 97.9%
MRSA/SA ELITE MGB assay (ELITech-Group)	Real time PCR for <i>mecA/C</i> and a <i>S. aureus</i> specific sequence	Sputum, tracheal aspirate, BAL	<3 h	+ Accurate – Do not target <i>SCCmec-orfX</i> junction	23 MRSA 60 MSSA in 113 respiratory samples	Sensitivity 95.7% specificity 96.7% PPV 91.7% NPV 98.3%
Unyvero HPN Application	Multiple PCRs	BAL fluids	5 h	+ Detect 21 species and 19 resistance genes; mixed cultures detection – More resistant isolates needed	2 MRSA 1 MSSA in 84 BAL fluids	Sensitivity 100% specificity 98.7%
GenMark Dx ePlex blood culture identification	Hybridization and electrochemical detection, <i>mecA/C</i> , <i>vanA/B</i>	Positive blood cultures	<2 h	+ Detect 20 Gram-positive species; mixed cultures detection	194 MRSA 97 MSSA in 1297 blood cultures	Sensitivity 97.9% specificity 100%
GENECUBE (TOYOBO)	<i>nuc</i> and <i>mecA</i> amplification and, hybridization	Positive blood cultures	52 m	+ Faster than similar methods – No <i>mecC</i> detection	44 MRSA 56 MSSA in 263 blood cultures	Sensitivity 100% specificity 100% LOD 12.5 gene copies/test
Real-time triplex PCR	Targeting <i>nuc</i> , <i>mecA</i> and <i>pvl</i>	Rectal and pharyngeal samples	3 h	+ Applicable in contaminated samples – No <i>mecC</i> detection	12 MRSA 3 MSSA in 80 samples	Sensitivity 100% specificity 100% LOD 514 CFU/ml
Long-range and real-time PCRs	Targeting <i>mecA/C</i> and <i>orfX</i>	Nasal, wound, axilla, throat samples	8–9 h	+ Perform well in various samples – Slower than similar methods, laborious	23 MRSA in 88 samples	Sensitivity 100% specificity 97.0%
Eazyplex <sup>®</sup> MRSA	LAMP targeting <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>mecA/C</i>	Positive blood cultures	1 h	+ Portable; faster than similar methods – Need optimization for CONS	32 MRSA 199 MSSA in 797 blood cultures	Sensitivity 100% specificity 99.7%, TAT 17 h shorter



## Откриване на податлива на оксацилин MRSA (OS-MRSA)

OS-MRSA са фенотипно чувствителни към оксацилин-цефокситин, но са месА-положителни. От диагностична гледна точка тези изолати на OS-MRSA могат да се считат за грешка на фенотипните методи, които могат да бъдат коригирани с молекулярни методи. Като се използва методът на BMD, оксацилин MIC > 4 pg/ml (или цефокситин MIC > 8 pg/mL) показва наличието на MRSA. Типичен изolat на OS-MRSA е месА-положителна, но има MIC за оксацилин от 2 pg/ml, така че би бил погрешно идентифициран като MSSA, ако се извърши само фенотипен тест. Liu и колеги идентифицират 17 OS-MRSA сред 377 излата (4,%) клинична месА положителна MRSA. Авторите отбелязват, че **системата VITEK 2 е проблематична при откриването на изолати OS-MRSA**, въпреки че е включен допълнителен скрининг за цефокситин. По-добра производителност е постигната с помощта на теста за дискдифузия на цефокситин, където 15/17 OS-MRSA са правилно идентифицирани. Поради това може да е необходим тест за дискдифузия на цефокситин за допълнително тестване на изолатите *S. aureus* с граничен оксацилин MIC (1 - 2pg/ml), идентифициран с автоматизирани системи AST. Авторите също така наблюдават хетероустойчивост на оксацилин, тъй като може да се предизвика висока резистентност към оксацилин във всички идентифицирани OS-MRSA след *in vitro* експозиция на нарастващи концентрации на оксацилин. Авторите препоръчват клиницистите да лекуват тези OS-MRSA с линезолид или ванкомицин, а не бета-лактамни антибиотици.

Liu и колеги идентифицират 14 OS-MRSA изолати в 1200 клинични *S. aureus*. Всички 14 месА-положителни изолати са MSSA съгласно метода BMD, VITEK 2 и BD Phoenix 100. Тестът за дискдифузия на цефокситин правилно открива 3/14 изолати като MRSA, докато PBP2a аглутинационният тест правилно идентифицира 6/14 MRSA. За да се справят с инфекциите на OS-MRSA, авторите препоръчват извършването на PCR за месА и месС гени в случай на пациенти, страдащи от тежки инфекции на *S. aureus*, които получават беталактамни антибиотици поради предполагаеми MSSA инфекции, определени с фенотипни методи, особено ако хода на заболяването е неблагоприятен. В друго проучване 11 изолати на OS-MRSA са изолирани от очни инфекции.

## Автоматизирани/Семивтоматизирани търговски молекулярни методи

### *Cepheid GeneXpert*®

Системата *GeneXpert* може да открива MRSA директно в няколко клинични проби чрез PCR в реално време, насочена към гените месА/С,orfX - SCC мес и spa гена. Всички стъпки на PCR се извършват автоматично. Dewar оценява *Xpert SA Nasal Complete*, който е валидиран за скрининг. От 605 носни проби 17 проби са идентифицирани като MRSA от *GeneXpert*, със седем фалшиво положителни резултата. **Чувствителността на *GeneXpert* за откриване на MRSA е 100%, а специфичността е 98,8 %.** Ayebare и колеги използват *Xpert SA Nasal Complete* (и други методи като хромогенни среди и *Hain GenoQuick MRSA*) за оценка на разпространението на MRSA в

тяхната болница. От 500 назални тампона, 27 са MRSA. Чувствителността и специфичността на *Xpert SA Nasal Complete* са съответно **51,8% (14/27)** и **100%**.

Изследването *Xpert MRSA/SA* (Cepheid) може да се извърши върху положителни кръвни проби. *McHugh et al.* анализира 264 положителни кръвни проби с Грам-положителни коки и открива 1 MRSA и 38 MSSA и докладва за пълно съвпадение на резултатите между системата *GeneXpert* и референтния метод. Използвайки *Xpert MRSA/SA BC*, TAT е **1,7 часа в сравнение с 25,2 часа при конвенционални методи**. В допълнение, при 40/238 от анализирани пациенти (16,8%), употребата на този готов търговски продукт и метод *Xpert MRSA/SA BC*, **позволява ранни промени в лечението на пациентите**. В друго проучване авторите изследват ретроспективно въздействието на *Xpert MRSA/SA BC* за време и за оптимална терапия и продължителност на терапията в 101 положителни кръвни проби от пациенти в педиатрия. Пациентите са разделени на две групи: пациентите се лекуват според резултатите от традиционния AST (n = 61) спрямо пациентите, лекувани според резултатите на *Xpert MRSA/SA BC* (n = 40). С **Xpert MRSA/SA BC времето за оптимална терапия е с около 20 часа по-кратко**, намалявайки от 61,5 до 42,5 часа от вземането на кръвната проба. Освен това инфектираните с MSSA пациентите са се подобрили по-бързо.

*Paonessa* и колеги използват *Xpert MRSA/SA SSTI* (валидиран за диагностициране на инфекции на кожата и меките тъкани) върху 247 бронхоалвеоларни проби (BAL), и *Xpert MRSA/SA SSTI* достига **чувствителност от 95,7% и специфичност от 98,2%** за откриване на MRSA.

### ***Hologic Panther Fusion*® MRSA**

*Maurin* и съавтори оценяват изпълненията на *Hologic Panther Fusion*® MRSA за скрининг за MSSA или MRSA от назални проби и сравняват резултата от това изследване с резултатите от хромогенната среда. **Panther Fusion**® MRSA може да прави разлика между MSSA и MRSA чрез откриване на *mecA/C*, *sra* ген и *SCCmec-orfX* област. Методът е **напълно автоматизиран**. Авторите анализират 434 назални проби от хоспитализирани възрастни. В сравнение с хромогенните среди Panther Fusion® достигна първоначално 88,0% СА. Авторите анализираха допълнително несъвпадащите резултати, използвайки *Xpert SA Nasal Complete* или бульон. Тридесет изолати са идентифицирани като MSSA, използвайки *Panther Fusion*®, но са отрицателни при инокулиране с хромогенна среда. След анализите на дискретни резултати и корекцията със златния стандарт са открити 30 MRSA и 112 MSSA и ***Panther Fusion*® MRSA достигна 97,9 % СА за откриване на MRSA**.

### ***MRSA/SA ELITE MGB Assay***

*Boattini* и колеги оценяват ефективността на *MRSA/SA ELITE MGB* тест. Това е автоматизирана платформа, която извършва мултиплексни PCR изследвания в реално време, като **открива специфична последователност от *S. aureus* и гените *mecA/mecC***. Авторите са използвали изследването върху 113 респираторни проби, като храчки, трахеални аспирати, бронхоаспирати и BAL. Установени са общо 23 MRSA и 60 MSSA

и MRSA/SA елитен MGB тест достига чувствителност от 95,7% и специфичност от 96,7% за откриване на MRSA, с два фалшиви положителни резултата и един фалшив отрицателен (потвърден като смесена култура със CONS).

### **Unyvero HPN приложение**

Системата *Unyvero (Unyvero P55 или Unyvero HPN Application)* е бърз молекулярен метод, базиран на множество PCR за откриване на 21 типични бактерии на долните дихателни пътища и 21 гена за резистентност, включително *mecA/C*. *Sun* и колеги оценяват ефективността на *Unyvero* върху проби от BAL течност от пациенти с инфекции на долните дихателни пътища. От 84 анализирани проби са установени само 2 MRSA и 1 MSSA. Системата *Unyvero* достига чувствителност от 100 % и специфичност от 98,7 % за откриване на *S. aureus*.

### **GenMark Dx ePlex Blood Culture Identification Gram-Positive (BCID-GP)**

*BCID-GP* панел за идентификация на кръвни проби *Genmark Dx ePlex* позволява откриването на 20 Грам-положителни бактериални видове и гените на резистентността *mecA/C* и *vanA/B* в положителни кръвни проби. Системата се основава на мултиплексно усилване на ДНК чрез конкурентна ДНК хибридизация и след електрохимично откриване. *Carrol et al.* използва тази система в 1297 положителни кръвни култури. Чувствителността на *BCID-GP Panel* за откриване на MRSA е 97,9%. Системата може да открие множество стафилококови видове в една и съща кръвна проба. Известно е обаче едно ограничение на този метод (общо за други подобни системи) е, че в случай на множество стафилококови видове, които също имат *mecA*-положителен резултат, не е възможно да се определи към кой вид принадлежи генът *mecA* (*S. aureus* или CONS).

### **GENECUBE (TOYOBO Co., Ltd., Осака, Япония)**

*Hida* оценява ефективността на изследването *GENECUBE* - напълно автоматизирана система за откриване на изолати на MRSA или MSSA директно от положителни кръвни проби. Амплифицираните целеви гени *mecA* и *nuc* се хибридизират с флуоресцентни олигонуклеотиди и след това се откриват чрез промени в интензитета на флуоресценцията. Авторите анализират 263 кръвни проби и идентифицират 44 MRSA, 56 MSSA, 2 смесени култури и 161 CONS. Чувствителността и специфичността на *GENECUBE* са 100 %. Системата изглежда точна, бърза (52 мин) и надеждна, но не открива гена *mecC*.

### **Вътрешни молекулярни методи**

Разработени са няколко вътрешни метода за откриване на MRSA. Предимствата на тези методи могат да бъдат намаляването на разходите за лабораториите, които не могат да купуват скъпи търговски анализи, и повишената гъвкавост при

**промяна на протоколите или антибиотиците.** Тези методи могат да бъдат подходящи за малки/местни лаборатории или лаборатории с по-малко финансови ресурси, които не се нуждаят от обработка на голям брой клинични проби. Втрешните методи обаче **не са автоматизирани и обикновено изискват по-дълъг ТАТ и е трудно да се сравняват и възпроизвеждат резултатите** в различни лаборатории.

*Galia* и съавторите разработват триплексен PCR в реално време (за целите на скрининга) за едновременно разграничаване на изолати на MRSA, MSSA и *mecA* положителни CONS и наличието на *Panton-Valentine leucocidin* директно от ректални и фарингеални проби. Авторите изследват този PCR в 42 ректални и 38 фарингеални проби. Общо 13 MRSA, 2 MSSA и 58 *mecA*- положителни CONS са идентифицирани както чрез референтните методи, така и чрез PCR в реално време. **Изследването е бързо (ТАТ: 3 часа), точно, и може лесно да се прилага за обработка на проби, които са силно замърсени без предварително третиране на пробата.** *McClure et al.* разработва вътрешен метод за бързо (8 - 9 часа) откриване на MRSA директно от клинични проби. Тестът включва две PCR: първоначална PCR на дълги разстояния и втора PCR в реално време. PCR е насочена към гените *mecA/C* интеграционните гени и *orfX* на SCC*mec* елемента. Когато са изследвани в 88 изолати от различни видове проби, са идентифицирани 23 MRSA и изследването е достигнало **чувствителност от 100% и специфичност от 97,0%** за откриване на MRSA. Изследването е проведено добре в различни видове клинични проби, но **има по-дълъг ТАТ в сравнение със сходни методи и е трудоемко.** *Shanmugakani* разработва **PCR-dipstick** за откриване на MRSA от положителни кръвни проби. Авторите валидират тази PCR в 48 вече известни изолати на *S. aureus* (включително 33 MRSA) от различни клинични проби и в две кръвни култури с един MRSA и един MSSA, които получават **100 % чувствителност и специфичност с ТАТ от 3 часа.**

### Методи, базирани на *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP)

LAMP може да се използва и за **усилване на целевите последователности/гени.** В LAMP са **необходими шест праймери, осигуряващи висока специфичност.** По време на изследването два вида реакции на удължаване усилват прицелните гени при фиксирана (изотермална) температура. LAMP **може да произведе голямо количество целева ДНК, може да се визуализира с невъоръжено око и не се нуждае от термосайкълъри** (както в случая с PCR), тъй като всички реакции се случват при една и съща температура. *Kashani* и колеги разработиха метод, базиран на **дуплекс LAMP** за откриване на *mecA* и *sra* гена. Те анализират 53 клинични изолати (37 MRSA и 16 MSSA) и LAMP достигна **чувствителност от 100% и специфичност от 75,0%** за откриване на *mecA* с ТАТ 188 мин.

***Eazyplex*® MRSA** е LAMP-базирана **преносима система, която може да открива *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *mecA/C* гените директно в назални проби или положителни кръвни проби.** *Leikem et al.* провежда ретроспективно изследване за оценка на ефективността на ***Eazyplex*® MRSA.** **Чувствителността и специфичността на *Eazyplex*®MRSA за откриване на MRSA са съответно 100% и 99,7%.** Освен това при

190 пациенти авторите оценяват клиничното въздействие от използването на *Eazyplex*® *MRSA* в сравнение с рутинните методи. При пациенти, лекувани според резултатите от *Eazyplex*®*MRSA*, ТАТ е с около 17 часа по-кратък, а времето за започване на подходящо лечение също е било по-кратко. Изследването осигурява отлична производителност за откриване на *MRSA*, но може да бъде оптимизирано за *CONS* стафилококи, вероятно поради полиморфизми на *mecA* в *CONS*, непризнати полимикробни инфекции или *CONS* замърсяване по време на процедурите за вземане на проби.

## Секвениране на целия геном (WGS)

Рутинното прилагане на WGS се извършва в няколко условия и най-вече за изследване на огнища или молекулярно наблюдение. WGS е метод с най-висока разделителна способност, тъй като може да открива единични нуклеотидни полиморфизми (SNP) и може да открие всички известни гени, свързани с резистентност, и техните варианти. Други предимства от използването на WGS са следните: Данните от WGS могат да се съхраняват и анализират повторно, ако нови механизми за устойчивост са открити или за да се предскаже ефикасността на новите антибиотици. Данните от WGS могат да бъдат споделяни — за разлика от изолати — чрез лаборатории, като по този начин се намаляват разходите и свързаните с транспорта рискове; и сравнявайки данните от WGS, генетичната връзка между изолати може да бъде определена при изследванията на огнищата. Въпреки това рутинното прилагане на WGS в клиничната практика има следните пречки: голямото количество данни, които трябва да се анализират и съхраняват, високите разходи, дългият ТАТ, необходимият опит в биоинформатиката, сложният работен процес, скринингът за замърсители и гените за резистентност, разположени в плазмиди, което може да доведе до ниско секвениране и да бъде изключено от анализа. Както при другите молекулярни методи, гените на резистентността трябва да са известни; нехарактеризираните или новите гени за резистентност са трудни за откриване. И накрая, промени в генната експресия не могат да бъдат открити.

Съществуват няколко платформи за WGS; *Illumina* е най-често срещаната, е по-евтина, осигурява кратки последователността четения (около 200 bp) и има по-висока точност. Секвенциите обаче са твърде кратки, за да се разграничат плазмидите от хромозомната ДНК и ТАТ е 24 часа. *PacBio* и *Nanopore* произвеждат по-дълги четения (5-10 kb) и обикновено са по-скъпи, но имат по-кратък ТАТ в сравнение с *Illumina* (*PacBio*, 0,5-10 часа; *Nanopore*, резултати в реално време). Днес съществуват няколко инструмента за извличане на свързани с резистентност гени от данните на WGS за различни патогени, включително *S. aureus*. Няколко проучвания подчертават общото добро представяне на базираната на WGS прогноза за антибиотичната резистентност. *Bortolaia et al.* разработи *ResFinder*, онлайн база данни за гени за антимикробна резистентност и мутации в клинично значими микроорганизми. В *ResFinder* е възможно да се идентифицират специфични гени за антимикробна резистентност чрез качване на данни от WGS. Общата генотипно-фенотипна корелация (ген/мутация спрямо фенотипен AST) е 96,0%, варирайки от 76,2% за



тетрациклин до 100% за цефокситин и ванкомицин. В друго проучване бе сравнена резистентността на молекулярния WGS с фенотипния AST, което доведе до **чувствителност и специфичност съответно от 98,5% и 99,9%.**

*Brown* и др. перспективно извършва WGS (и стандартни методи) върху всички изолати на MRSA за две седмици. Те използват инструмента *Next Gen Diagnostics bioinformatic*, за да **анализират автоматично данните от секвенирането** и за потвърждаване на вида *S. aureus*, откриване на *mecA/C* гени, **определяне на връзката между изолатите и прогнозиране на антибиотична резистентност.** Платформата извършва **всички тези анализи автоматично в 30s (на проба).** По отношение на антибиотичната резистентност се наблюдава **пълно съответствие между биоинформатичния инструмент и стандартния метод.** И двата метода откриват два MRSA клъстера от трима пациенти. Проучването показва, че една от пречките пред рутинното прилагане на WGS (експертния опит в областта на биоинформатиката, необходим за анализ на данни) може да бъде преодоляна с такъв автоматичен инструмент.

Обикновено WGS се извършва върху изолирани бактериални култури. Тези чисти бактериални култури обикновено са субкултура от първичната клинична култура. За да се намали TAT, *Blane et al.* прилага WGS директно върху колонии на *S. aureus*, отглеждани върху първичната клинична култура. Едно от **предизвикателствата при прилагането на този метод** е, че тези **първични клинични култури съдържат колонизиращи бактерии или замърсители и може да нямат ясна изолирана колония**, която да бъде изследвана чрез WGS. Авторите опитаха това „секвениране на колионии“ в 30 MRSA и бяха получени задоволителни резултати (по отношение на покритието, качеството на четене, наличието на замърсители) за потвърждение от MRSA. Чрез промяна на протокола на *Illumina*, в друго проучване авторите са **намалили TAT за MRSA изолирано секвениране до 24 часа** от ДНК екстракция до WGS резултати.

WGS може също така да се провежда директно върху клинични проби в т.нар. **метагеномно секвениране**; това може да намали TAT, тъй като той е независим от културата, но има повече ДНК от замърсители, други бактерии и човешка ДНК и следователно **изисква процес на пречистване, за да се разграничат бактериалната ДНК от човешката ДНК.** Но какво да се направи, ако показанията от множество съответни патогени бъдат идентифицирани чрез метагеномния секвентен анализ, продължава да бъде клинично предизвикателство. Съществуват **платформи**, които могат да **автоматизират процеса на метагеномно секвениране като IDbyDNA, CosmosID, One Codex и Karius.**

### **Нововъзникващи методи за откриване на антимикробна резистентност в *S. aureus***

Някои от тези методи за *point-of-care (POC)* системи са **базирани на микрофлуиди.** Микрофлуидите предполагат малка система, при която малко количество проба може да се обработва в миниатюрни флуидни канали, което позволява AST. Предимствата на наличието на POC микрофлуидни устройства (наричани също лабораторни методи върху чип) са: **лесни за използване дори от не-обучен персонал,**

предлагат голяма бързина, високопроизводителен анализ, ниска цена, автоматизация, мултиплексиране и преносимост. Предизвикателствата, свързани с внедряването на микрофлуидни РОС системи в рутинната диагностика, са следните: необходимостта от специфичен материал с определени характеристики, реалистична преносимост и появата на нови гени/механизми за резистентност, които ще възпрепятстват трайността и устойчивостта на тези изделия. *Khan* и екип са направили преглед, насочен към различните видове микрофлуидни системи за AST.

В таблица 4 е представен преглед на нововъзникващите методи (и тяхната ефективност), използвани при проучванията.

Method Used	Principle of the Method	On Culture/on Clinical Sample	TAT <sup>2</sup>	Brief Advantages/Disadvantages +/-	No. and Type of <i>S. aureus</i> Analyzed <sup>1</sup>	Major Diagnostic Performance <sup>3</sup>
Duplex PCR + SERS	PCR for <i>mecA</i> and <i>femA</i> , magnetic separation and SERS detection	Culture	1.5 h	+ Customizable – No comparisons with standard methods	14 MRSA	MRSA correctly identified; LOD 10 <sup>4</sup> DNA copies
SERS based on magnetic microspheres	Magnetic separation with microspheres, SERS fingerprint	Blood samples	24 h	+ No sample pretreatment – No comparisons with standard methods	13 MRSA 11 MSSA in 77 blood cultures	MRSA MSSA differentiated
Raman spectroscopy + deep learning	Raman spectroscopy and convolutional neural network	Blood cultures, sputum, wound	Few h	+ Label-free – Low accuracy with clinical isolates;	5 MRSA 5 MSSA	Accuracy 65.4%
SERS	Ag-nanoparticle fixed in nanochannels, spectra measurement	Positive blood cultures	4 h	+ Rapid – Require blood culture pretreatment	15 MRSA 17 MSSA in 75 blood cultures	Sensitivity 93.3%, specificity 94.1%, 1 VME, 1 ME
SERS + deep learning	SERS and deep neural network	Culture	0.5–1 h	+ Rapid	19 MRSA 3 MSSA	Accuracy 97.7%
ATR-FTIR spectroscopy	Infrared spectroscopy and multivariate analysis	Culture	15 m	+ Faster than similar methods; few reagents needed – Variability in cell wall thickness to be investigated	10 VSSA 10 hVISA	Sensitivity 100%, specificity 100%
Surface plasmon resonance sensor platform	Measure changes in cell wall refractive index	Culture	3 h	+ Easy to use; multiplexing possible; – Bacterial adherence instability	10 MRSA 10 MSSA	Sensitivity 100%, specificity 100%
FRET probe-based AST	Micrococcal nuclease detection	Culture	4–6 h	+ Several antibiotics tested	10 MRSA 10 MSSA	Sensitivity 100%, specificity 100%
Electrochemical biosensor	Magnetic nanoparticles-based detection of PBP2a	Nasal samples	4.5 h	+ Multiplexing possible; minimal samples pretreatment – No MSSA detection (for screening only)	11 MRSA 19 non-MRSA	Sensitivity 100%, specificity 100%, LOD 845 CFU/mL
MNA-zyme-GNP platform	Amplification of <i>mecA</i> and <i>fib</i> , gold nanoparticles binding, colorimetric detection	Nasal, groin, axilla, wound swabs	2 h	+ Naked-eye detection; isothermal amplification – Multi-pathogen detection needs validation	30 <i>mecA</i> -positive 20 <i>mecA</i> -negative	Sensitivity 90%, specificity 95%, LOD 10 <sup>2</sup> –10 <sup>3</sup> CFU/mL
Duplex LAMP + lateral flow biosensor	Targeting <i>mecA</i> and <i>femA</i>	Blood samples	80 m	+ Naked-eye detection; isothermal amplification; rapid; easy to perform	12 MRSA 16 MSSA in 63 blood samples	Sensitivity 100%, specificity 100% LOD 100 fg of genomic DNA
Microfluidic device LAMP-based	Targeting <i>mecA</i> and the variable region of <i>femA</i>	CSF positive cultures	70 m	+ Multiple staphylococcal species detection	4 MRSA 11 MSSA in 102 CSF positive cultures	Sensitivity 100%, specificity 100% LOD 20–200 CFU/reaction

Tandem mass spectrometry of PBP2a–PBP2c	Liquid chromatography and tandem mass spectrometry	Culture	5–120 m	+ Detection of PBP2c also	37 MRSA + 4 MSSA	Sensitivity 100%, specificity 100%
Bacteriophage-based MRSA screening	NanoLuc luciferase reporter phages ISP and MP115	Nasal samples	6 h	+ Low-cost – Slower compared to similar methods	40 spiked MRSA 40 MSSA	Sensitivity 100%, specificity 90% LOD 75–750 CFU per sample

## Методи, базирани на спектроскопия

Спектроскопията е изследване на взаимодействието между радиацията и материята. *Raman* спектроскопия е една спектроскопска техника, основана на разсейване на светлината, която **осигурява спектрални пръстови отпечатьци за идентифициране/диференциране на молекули, но също така различни бактериални изолати и фенотипове** (напр. устойчиви или чувствителни). Тъй като различните бактериални фенотипове се характеризират с различни молекулярни композиции (по отношение на нуклеинови киселини, протеини и т.н.), тези разлики ще бъдат отразени в различни спектри на Раман. Въпреки напредъка в идентифицирането на бактериални спектрални «отпечатьци» («*fingerprints*»), са необходими **по-представителни и всеобхватни бази данни, заедно с математически модели за интерпретиране на спектралните данни.**

*Potluri et al.* комбинира дуплекс PCR ( *mecA* и *femA* гени) и SERS наночастици. Първо се извършва PCR и се намножават прицелните гени. След това продуктите от PCR се инокулират със златни наночастици, които функционират като сонди за откриване и хибридизиране на PCR продукта. След това стрептавидин-магнитни перли се добавят към разтвора и реагират с PCR продукт-наночастици комплекса, произвеждайки сигнал, открит от микроскоп Раман.

*Ho et al.* разработва база данни с Раман спектри за 30 клинично значими бактерии (включително MSSA и MRSA) и прилага техники за *machine learning* за анализ на спектрите на *Raman* за идентифициране на бактерии и откриване на антибиотична резистентност. Авторите тестват този набор от данни на Раман спектри директно в пет MRSA и пет MSSA изолирани от различни клинични проби (кръвни проби, храчки, раневи ексудати). Методът откри MRSA с **точност 65,4 %**.

*Kochan* и съавтори използват инфрачервена и *Raman* спектроскопия, съчетани с химиометричен анализ, за да разграничат MRSA/MSSA чрез анализ на промените в химичния състав в една MSSA и една MRSA, които са били изложени и не са били изложени на оксацилин. В изолатите MSSA авторите идентифицират намалено съдържание на нуклеинова киселина, промени в състава на протеините и промени в състава на въглехидратите, което предполага активност на оксацилин (т.е. чувствителност). *Ciloglu et al.* използва SERS в комбинация с няколко подхода за *machine learning* за идентифициране на изолати MSSA и MRSA. След нощна инкубация на изолати на *S. Aureus*, изолатите се инкубират с Ag-наночастици и след това се подлагат на SERS измерване. Анализирани са общо десет MRSA, три MSSA и четири отрицателни контроли и са получени 230 спектри от тези изолати. Тези спектри биха могли да диференцират MRSA от MSSA с **точност от 97,8%**, като използват подхода за

*machine learning*. От същата група беше приложен алтернативен подход с използване на SERS, съчетан с друга техника с невронни мрежи при *machine learning*. Анализирани са общо 19 MRSA от 3 MSSA и 33 975 SERS спектри са придобити от тези изолати. Тези спектри биха могли да диференцират MRSA от MSSA с 97,7% точност.

По отношение на резистентността към ванкомицин, с рутинни и автоматизирани микробиологични тестове, не е възможно да се разграничат чувствителните към ванкомицин *S. aureus* (VSSA) изолати от хетерогенните изолати hVISA. *Wongthong et al.* използва спектроскопия с обща рефлексия на Фурие (ATR-FTIR) за разграничаване на VSSA от hVISA. Суспензия на изолирани *S. aureus* е забелязана на спектрометъра ATR-FTIR. От 59 клинични MRSA (31 VSSA и 28 hVISA) са анализирани 531 спектри. Частичен дискриминантен анализ е извършен върху подмножество от десет VISA и десет hVISA и са открити разлики в спектрите, които могат да разграничат всички изолати.

### Методи, базирани на биосензори, микрофлуидни методи

В биосензора, биорецептора (напр. ДНК сонда от 15-50 нуклеотиди, антицяло или ензим) се фиксира на повърхността на сензора. Ако анализът (напр. *mecA* ген) се свързва с биорецептора, трансдюсерът преобразува това взаимодействие в сигнал, който може да бъде показан и количествено определен. Биосензорите обикновено са наноматериали. Биосензорите могат да бъдат фенотипни (ако откриват фенотипни характеристики като растеж в присъствието на антибиотици или компоненти на клетъчни стени) или генотипни (ако откриват гени). През последните години **базираните на биосензор системи показаха обещаващи резултати за бързото, преносимо, лесно и евтино откриване на патогени, което ги прави добри кандидати за диагностика на РОС. Предизвикателствата, свързани с разработването на биосензори, са следните: често е необходима стъпка за амплификация на ДНК, за да се увеличи интензивността на сигнала и да се открият ниски концентрации на анализи (бактерии или гени) в клиничните проби; понастоящем мултиплексните подходи в биосензорите са рядко срещани в сравнение с PCR тестовете.** През 2021 г.

*Ozka* и колеги разработват **повърхностно плазмен резонансен фенотипен биосензор, който открива промени в състава на клетъчната стена между MSSA и MRSA, изложени на цефокситин, антибиотик, който влияе върху синтеза на клетъчната стена.** Експозицията на цефокситин променя състава на клетъчната стена и следователно MRSA може да бъде разграничена от MSSA въз основа на различни показатели за пречупване, открити от сензора. Биосензорът правилно идентифицира десет клинични изолати MRSA и десет MSSA в сравнение с референтния метод. Системата може да бъде адаптирана за откриване на множество патогени. Друг пример за фенотипен биосензор е методът AST, базиран на флуоресцентен резонанс (FRET). Методът се основава на принципа, че живият *S. aureus* отделя микронуклеази (*S. aureus* биомаркер) в извънклетъчната среда. Бактериална суспензия от изолирана култура се инокулира в микроплаки, съдържащи изследвания антибиотик и специфичната сонда *S. aureus FRET*. *S. aureus* оцелява в присъствието на антибиотици отделя микронуклеази, които разцепват сондата *FRET*, освобождавайки флуоресцентен сигнал. Този флуоресцентен

сигнал се измерва и **МИС на съответният антибиотик се определя за 4-6 часа**. Тази сонда *FRET* достигна **100% чувствителност и специфичност**, когато се изпитва върху десет клинични изолати на MRSA и MSSA.

*Nemr* и колеги разработват **устройство с микрофлуидни наночастици** за MRSA скрининг директно от назални проби, с **минимална обработка на пробата**. Пробите MRSA се инкубират в микрофлуидното устройство и се улавят от магнитни наночастици, свързани с PBP2a антитела, конюгирани с алкална фосфатаза. Авторите тестват системата в 30 назални проби и тя правилно идентифицира 11 MRSA и 19 не-MRSA изолати. *Patel* и колеги разработват **електрохимичен биосензор** за откриване на един щам MRSA, **използвайки бактериофага SATA-8505**. *Maldonado* и съавтори разработват **нанофотонен биосензор**, който използва **бимодален вълноводен интерферометър** за разграничаване на MRSA от MSSA въз основа на **откриване на PBP2a протеин**. Последният пример за фенотипен биосензор, основан на имуноанализ на страничния поток, който открива PBP2a, е разработен от *Amini* и съавтори.

*Mohamed et al.* разработва колориметрична **нанодиагностична система за идентифициране на седем бактериални вида и резистентни гени (*mecA*, *blaZ*, *vanA*, *vanB*, *tetK*, *tetM*, *ermA*, *ermC*)**. Системата се основава на многокомпонентен ензим - нуклеинова киселина - златни наночастици (**MNAzyme-GNP**) комплекс и може да се използва директно върху клинични проби. ДНК се извлича и след това се амплифицира чрез изотермална амплификация. Амплифицираната ДНК цел се открива от комплекса MNAzyme-GNP въз основа на колориметрична промяна. Авторите тестват системата в 50 клинични проби (назални, слабини, аксила и рана) за откриване на *mecA*. Тридесет проби са били *mecA*-положителна, а 20 - *mecA*-отрицателна, а системата е достигнала **90% чувствителност и 95% специфичност в сравнение с *mecA*—PCR**.

*Chen et al.* комбинират **LAMP техниката с откриването на LAMP целеви гени *mecA* и *femA* чрез биосензор** на базата на наночастици. Авторът тества този метод в 63 клинични цели кръвни проби от пациенти, за които се подозира, че са заразени със *S. aureus*. Биосензорът правилно открива 12 MRSA, 16 MSSA и 35 *S. aureus* -отрицателни изолати, достигащи **чувствителност и специфичност от 100%** в сравнение с клетъчно-културалните методи.

## Други системи за РОС

*Meng* и колеги разработват **микрофлуидно LAMP-базирано устройство**, способно да-разграничи *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* и *Staphylococcus hominis* (чрез насочване към променливата област в гена на *femA*) и гена *mecA*. Другите стафилококови видове са клинично значими за BSI. Авторите тестват това изследване в 102 култури. Изследването идентифицира правилно всички видове, 4 MRSA и 11 MSSA, за **70 минути**. Освен това системата откри и шест смесени култури (*S. epidermidis*, *S. hominis*). *Neil et al.* предложи метод за откриване на PBP2a и PBP2c протеини чрез протеинова течна хроматография и тандемна масспектрометрия. Те оценяват метода в 25 представителни изолати на MRSA, съдържащи различни видове SCC *mec*, 3 MSSA и 13 клинични изолати (12 MRSA и 1 MSSA). Всички тези изолати са правилно идентифицирани в сравнение с референтните методи.



*Brown* и съавтори разработват **диагностичен тест, базиран на бактериофаги**, за скрининг на MRSA от назална проба. Използвани са двама репортери на **NanoLuc** **луциферазни фаги, ISP и MP115**. За една нощ, културите на *S. aureus* са прехвърлени на 96-ямкови плаки и след това смесени с фаговия коктейл. Окончателните резултати са налични след **6 часа**. От всички тествани проби **специфичността е 90%, а чувствителността 100%**.

Както стана ясно и от предходното обстойно пручване на *S. Aureus*, секвенирането на целия геном (WGS) революционизира изследването на огнищата, пренасяни от храни, и наблюдението на голямо разнообразие от микробни патогени. Характеризирането на изолати с използване на конвенционални микробиологични методи изисква няколко различни трудоемки молекулярни и други изследвания и може да отнеме няколко дни, за да завърши. За разлика от това, **WGS може да предостави пълен преглед на изолат с цялата необходима информация за типизиране и характеризирание на патогени, включително отделяне на гените, кодиращи антимикробната резистентност и вирулентните фактори, прогнозиране на серотипа, откриване на плаزمиди и типизиране на последователността, за относително кратък период (3—5 дни) с разделителна способност на един нуклеотид и при относително ниска цена за проба**. Освен това WGS е дала възможност и за нови методи за **филогенетичен анализ**, като например cgMLST и анализ на целия геном SNP (wgSNP), които осигуряват много по-диференциращ потенциал за охарактеризиране на щамове в сравнение с конвенционалните методи като PFGE или MLVA, осигурявайки добавена стойност за бърза и точна епидемиологична/епизоотична оценка на огнищата, причинени от патогенните организми.

Поради тези предимства, **използването на WGS за типизиране на патогени както при епидемични ситуации, така и при рутинно наблюдение става все по-широко**, като много национални референтни центрове и лаборатории (НРЛ, храни и фуражи) я интегрират в рутинните си дейности. Това обаче невинаги е валидно, поради липсата на достатъчно експертни познания в областта на **биоинформатиката и изискването за валидиране на методи, основани на WGS в съответствие със строги системи за качество**. Първото препятствие може да бъде преодоляно чрез увеличаващата се наличност на уеб базирани инструменти, които позволяват на неекспертно ниво биоинформатици да анализират своите данни, без да е необходим опит или специален хардуер. Центърът за геномна епидемиология (CGE) предоставя широко използван набор от такива инструменти, включително, наред с другото, характеризирание на AMP, откриване на вирулентен ген, откриване на плазмидния репликон и определяне на серотипа. Уебсайтът на *Patosystems Resource Integration Center (PATRIC)* предоставя широк спектър от анализи и е приложим за всички бактериални видове, с акцент върху патогените. Съществуват множество уеб базирани алтернативи за характеризирание на AMP, за откриване на плазмиди и за въвеждане на последователността. Съществуват и специализирани портали за базиран на WGS анализ на конкретни видове, като *Enterobase* и *ARIES* за *Escherichia coli*, които предоставят по-всеобхватни решения за анализ на данните от WGS. Второто препятствие, т.е. необходимостта от валидиране на биоинформатичните изследвания и липсата на стандартизирани насоки и критерии за

качество на работните процеси в областта на биоинформатиката, усложнява сътрудничеството между лабораториите.

В проучване на тема „*Validation strategy of a bioinformatics whole genome sequencing workflow for Shiga toxin-producing Escherichia coli using a reference collection extensively characterized with conventional methods*“, като се използва референтна колекция от изолати *E. coli*, която е характеризирана с конвенционални методи, е представен **биоинформатичен работен процес за пълно характеризиране на изолатите шига токсин продуциращи *Escherichia coli*, разработени с цел рутинна употреба от неекспертен персонал.** Изпълнението на работния процес е широко валидиран върху голям набор от проби. Очаква се да се получи акредитация от Международното бюро по стандартизация (ISO). Методологията в биоинформатиката може да се различава и съществуват **множество алгоритмични подходи за сравняване на данни от WGS с бази данни, съдържащи информация за AMP, вирулентност, cgMLST и др.** Три широко използвани методологии за търсене в такива бази данни са: I) *de novo* сглобяване, последвано от подравняване с BLAST+ II) Kmer-базирано картографиране с инструменти като KMA и III) директно картографиране с инструменти като SRST2.

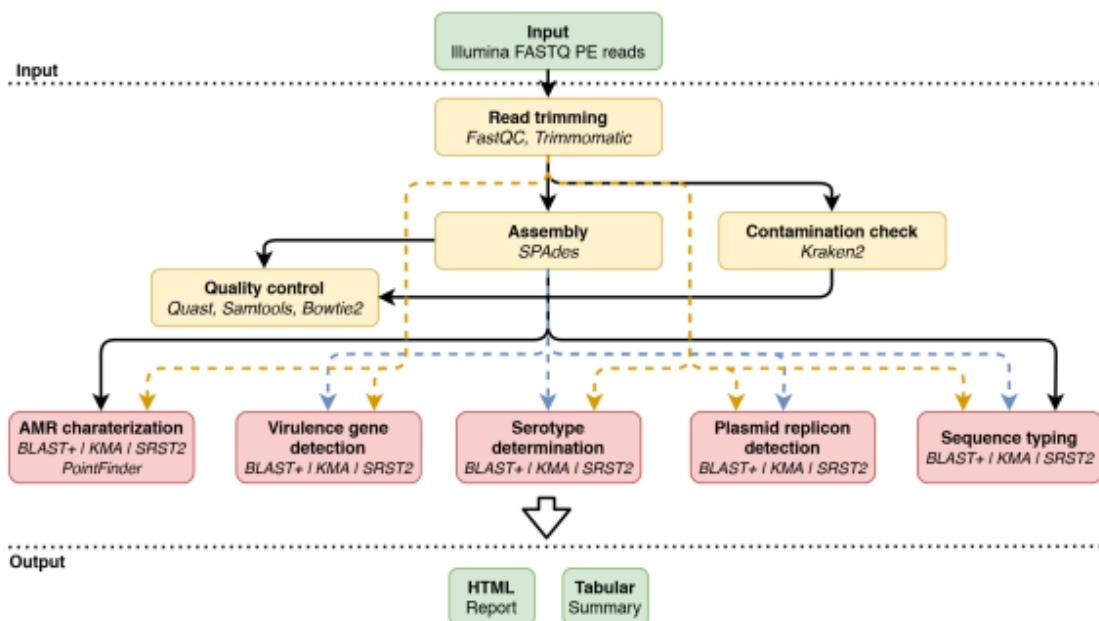
Тъй като изследванията на огнищата на инфекциите с *E. coli* или други подобни патогени обикновено включват няколко различни лаборатории, често в различни държави, **хармонизирането на използваните методи е от съществено значение за свързването на клиничните случаи със съмнителни хранителни източници.** Поради това **необходимостта от валидиране на работните процеси, основани на WGS,** наскоро започна да получава по-голямо внимание, по-специално как да се подходи към тази сравнително нова технология. В резултат на това в последните проучвания бяха представени стратегии за валидиране за цялостните работни процеси на WGS, адаптиране на един и същ работен процес в различни лаборатории, общият процес на WGS, разделен на отделни компоненти (приготвяне на библиотеките, секвениране, анализ и т.н.), както и по-специално биоинформатичния анализ. Това е също така част от обхвата на работната група по ISO TC34-SC9-WG25, **която подготвя общи изисквания и насоки за WGS за тип и геномно характеризиране на хранителни бактериални патогени (ISO 23418:2018(E)).** Понастоящем обаче все още липсва широко приет консенсус и този стандарт още не е довършен. По-специално референтният стандарт, който трябва да се използва за валидиране на работните процеси, базирани на WGS, т.е. набор от данни, за който е известна „цялата последователност“ и може да се използва за оценка на ефективността на WGS, продължава да бъде проблематичен. Висококачествените референтни набори от данни от WGS, за които има налична информация от конвенционални методи и/или епидемиологични взаимовръзки, остават оскъдни. Тази информация обикновено липсва в публично достъпните данни от WGS, за които метаданните (като например AMP или профила на вирулентност, а не информация за гостоприемника) често са непоследователни или липсващи, което възпрепятства използването им за систематична оценка. Това се дължи отчасти на факта, че изграждането на такива бази данни изисква използването на трудоемки и разходоемки молекулярно-биологични методи като

амплификация на PCR и/или секвениране на *Sanger*, което се счита за златен стандарт за потвърждаване на отсъствието/присъствието на геномни маркери, представляващи интерес (напр. AMP ген, *cgMLST* алел). **Наличните понастоящем референтни набори от данни често са ограничени до един аспект, като профила на AMP, наличието на фактори на вирулентност, серотип и известни епидемиологични връзки на огнищата.** Следователно усилията на организации като *Global Microbial Identifier (GMI)* и ISO бюрото имат за цел не само да предоставят насоки за стандартизиране на WGS, но и бази данни с висококачествени метаданни, свързани с геномна информация.

Неотдавна **Европейският орган за безопасност на храните (ЕОБХ)** ясно разясни необходимостта от хармонизирана и контролирана относно качеството система, основана на WGS, за разследване на трансгранични огнища и оценка на риска от пренасяни чрез храната патогени, като се използва шига токсин продуциращата *Escherichia coli* (STEC) като показателен микроорганизъм. STEC е бързо развиващ се човешки ентеропатоген, отговорен за инфекции, пренасяни чрез храна, които могат да доведат до гастроентерит, диария и хемолитичен уремичен синдром (HUS), и дори могат да бъдат фатални. Добавената стойност на WGS беше подчертана по-специално от огнището на вирулентния щам O104:H4 STEC в Германия през 2011 г., което доведе до 3816 случая, включително 845 случая на HUS и 54 смъртни случая. **Конвенционалните изследвания, основани на молекулярна биология, не успяха да охарактеризират огнището, докато WGS успя да осигури пълен преглед на събитията и взаимовръзките, довели до появата и циркулацията на този особено патогенен щам.** Оттогава ползата от WGS за характеризирането на STEC огнищата, предавани чрез храна, и употребата му като метод в рутинното наблюдение са подробно илюстрирани в различни проучвания.

Набор от 137 изолати, за които информация за профила на AMP е налице чрез конвенционални методи, информация за наличието на вирулентни гени и серотипове е постигнато чрез секвениране с помощта на *Illumina MiSeq*, за да се създаде висококачествен набор от референтни данни от 131 проби, спрямо които за всички изследвания е валидирано изпълнението на биоинформатичния работен процес. Освен това са оценени три различни биоинформатични подхода въз основа на i) сглобяване *de novo* със *SPAdes*, последвано от привеждане в съответствие с *BLAST+*; II) *kmer*-базирано картографиране с *KMA*; и iii) директно картографиране с *SRST2*.

*Фиг. 3: Работен процес на биоинформатичен анализ*



**Таблица 4:** критерии за оценка на качеството на биоинформатичния анализ и конкретно разработения работен процес

Metric	Definition	Warning threshold	Failure threshold
Contamination	Percentage of reads classified as highest occurring in species other than <i>E. coli</i>	1%	5%
Median coverage against assembly	Median coverage based on mapping of the trimmed reads against the assembled contigs	20	10
% cgMLST genes identified	Percentage of cgMLST genes identified. Only perfect hits (i.e. full length and 100% identity) are considered [85]	95	90
Average read quality (Q-score)	Q-score of the trimmed reads averaged over all reads and positions	30	25
GC-content deviation	Deviation of the average GC content of the trimmed reads from the expected value for <i>E. coli</i> (50.5% [86])	2%	4%
N-content	Average N-fraction per read position of the trimmed reads, expressed as a percentage	0.5%	1%
Per base sequence content	Difference between AT and GC frequencies averaged at every read position. Since primer artefacts can cause fluctuations at the start of reads due to the non-random nature of enzymatic tagmentation when the Nextera XT protocol is used for library preparation, the first 20 bases are not included in this test. As fluctuations can also exist at the end of reads caused by the low abundance of very long reads because of read trimming, the 0.5% longest reads are similarly excluded	3%	6%
Minimum read length	Minimum read length after trimming (denoted as a percentage of untrimmed read length) that a minimum of half of all trimmed reads must obtain (e.g. half of all trimmed reads should either be minimally 120 or 200 bases long when raw input reads lengths are 300 bases long)	66.67%	40.00%

В 42 човешки проби, които са били фенотипно определени като резистентни, са налице общо 283 наблюдения, включително 83 резистентни и 200 възприемчиви

фенотипа. **От 83 резистентни наблюдения 79 са правилно идентифицирани и при трите биоинформатични подхода.** От 200 чувствителни фенотипни наблюдения, 196 са правилно „предсказани“ от трите биоинформатични подхода. Всички генотипни характеристики, открити чрез работния процес, водещ до прогнози за АМР, са оценени с PCR и чрез секвениране на *Sanger* за точкови мутации и гени за резистентност. По-голямата част от прогнозите за резистентност се основават на наличието на гени и са открити само пет точкови мутации с *PubMed identifier*. **Това е довело до точност, прецизност, чувствителност и специфичност съответно от 97,53%, 95,24%, 96,39% и 98,00% както за SPAdes, последвано от BLAST+ и КМА и SRST2 – съответно 97,17%, 95,18%, 95,18% и 98,00%.** Резултатите за всички повторения с различните методи винаги са били 100% съвпадащи.

**Показателите за ефективност** са оценени поотделно за stx гените (stx1 и stx2) и други гени за кодиране на фактора на вирулентност. Информация за stx1 и stx2 от конвенционалните методи е налична за всички 131 проби, в резултат на което са направени общо 262 наблюдения. Това е довело до **точност, прецизност, чувствителност и специфичност съответно от 98,85%, 100%, 97,87% и 100% за BLAST+ и 99,62%, 99,30%, 100% и 99,17% за КМА и SRST2.** Ефективността за откриване на другите гени на вирулентността е сходна.

**Показателите за ефективност за определяне на серотипа** за 111 проби от STEC показват налична информация в три и 12 случая само Н-типът и О-типът. Това показва **точност, прецизност, чувствителност и специфичност съответно от 97,41%, 100%, 97,17% и 100% за BLAST+ и 98,28%, 100%, 98,11% и 100% за КМА и SRST2.**

Резултатите за онлайн инструмента *PlasmidFinder* за всички проби относно **показателите за ефективност на теста за откриване на плазмид репликон** са 333 репликона в 131 проби и 100% ефективност, както и за BLAST+. За КМА са открити 41 FN, ограничени до плазмиден репликони *IncFIA*, *IncQ1*, *IncFIB*, *IncFII* и *IncII/IncB/O/K/Z*. При премахване на несъответствията между платформите поради различната рамка на четене, **точността, прецизността, чувствителността и специфичността са съответно 99,61%, 97,01%, 87,69% и 99,93% за КМА.**

Резултатите за онлайн инструмента PubMLST за всички проби са депозирани в Zenodo (10.5281/zenodo.4006065), както и показателите за ефективност.

**De novo** сглобяването и въвеждането на последователността заемат по-голямата част от общото време за изпълнение на работния процес, като всички останали стъпки допринасят леко за общото време за изпълнение. Подравняването на секвенциите, сглобяването *de novo* и проверката за замърсяване са отнели съответно 31,76s, 847,19s и 77,21s за проба. Времето за изпълнение на тестовете за откриване на гени показва много ограничено отклонение в различните бази данни и е най-кратко за КМА (средно 5,08s), следвано от BLAST+ (средно 5,32s) и SRST2 (средно 29,58s). Същите тенденции са наблюдавани при определянето на серотипа, който се основава на един и същ работен процес за откриване на гени, със средни срокове на изпълнение съответно 10,72s, 10,09s и 55,63s на проба за BLAST+, КМА и SRST2. Откриването на точкови мутации е отнело средно 15,44s на проба. Времето за изпълнение на работния процес на четене на последователността е екстраполирано въз основа на четенето на



първите 50 локуси, което води до оценки от 18,81 min, 1,06 h и 11,65 дни на проба, средно за *BLAST+*, *KMA* и *SRST2*.

Workflow step	Database	Detection method	Average duration (s)
Read trimming	-	-	31.76
Assembly	-	-	847.19
Contamination check	-	-	77.21
Gene detection	ResFinder	BLAST	5.35
		KMA	5.03
		SRST2	27.19
	Virulence genes	BLAST	5.30
		KMA	5.14
		SRST	36.88
	PlasmidFinder	BLAST	5.30
		KMA	5.06
		SRST2	24.68
PointFinder	PointFinder	-	15.44
Serotype determination	SeroTypeFinder	BLAST	10.72
		KMA	10.09
		SRST2	55.63
Sequence typing	cgMLST*	BLAST	1128.84
		KMA	3798.15
		SRST2	1006639.45

**Фиг. 4:** Сравнение на времето, необходимо за всяка стъпка от процеса на биоинформатичния анализ (TAT), спрямо целта и спрямо подхода

В това проучване е представена актуализирана рамка на работния процес по биоинформатика с цел валидирането му за характеризиране на STEC изолати с помощта на данни от WGS. STEC е избран като казус, тъй като е често срещана причина за епидемии и лесно обменя гени за вирулентност и AMP гени. Стратегията за валидиране на този процес е приложена за няколко биоинформатични изследвания, представляващи интерес за референтните лаборатории, изискващи внедряване в рутинната диагностика и определяне и характеризиране на патогени на WGS и биоинформатичния анализ (предвиждане на AMP, откриване на вирулентен ген, определяне на серотипа, откриване на плазмидния репликон и типизиране на последователността).

На практика работните процеси в областта на биоинформатиката са изградени така, че да бъдат относително стабилни срещу колебанията в качеството на входящите

данни, но обикновено бързо губят резултати, след като качеството на набора от данни спадне под определен праг. **Способностите и възпроизводимостта винаги са били 100% за всички методи за откриване и за всички изследвания**, като се подчертава, че биоинформатичният компонент е особено устойчив срещу повтарящи се анализи, извършвани в една и съща или отделна изчислителна среда.

Валидирането е насочено специално към прилагането на стратегията към работен процес за характеризирание на изолати STEC. Части от работния процес обаче са приложими и за други патогенни видове. Биоинформатичните изследвания, използващи бази данни като *ResFinder* за прогнозиране на AMP (всички бактерии) и/или *PlasmidFinder* за откриване на плазмидни репликони (*Enterobacteriaceae*), могат да се прилагат и за други бактериални видове. **Оптимизираният и валидиран подход в това проучване на биоинформатичните анализи**, включващи използване на специфични за STEC бази данни, като например базата данни на *E. coli VirulenceFinder* за откриване на гени за вирулентност и базата данни *E. coli Enterobase* за типизиране на последователността, **ще бъде приложим и за охарактеризиране и на други патогени чрез замяна на базите данни за съответните разглеждани видове. За определяне на серотипа трябва да се адаптира както основната база данни, така и дървото на решенията.** Във всички случаи обаче се очаква резултатите от работния процес да имат сходни резултати, както е документирано в това проучване за STEC.

Тези три подхода (откриване въз основа на изравняване с *BLAST+*, *Kmer*-базирано откриване с *KMA* и откриване въз основа на картографиране със *SRST2*) се използват широко за различни работни процеси в областта на биоинформатиката, основани на WGS, като **подходите, основани на картографиране, се считат за почувствителни, особено при по-ниски дълбочини на четене на последователността, а подходите за картографиране на *Kmer* се считат за особено бързи за анализиране на големи набори от данни и бази данни с незначителни разходи за ефективност.** Въз основа на по-ранен преглед на научните изследвания и литературата бе определен критерий за допустимост от > 95% за всички показатели за ефективност на биоинформатичния анализ. Този праг е достигнат за всички изследвания.

**Времето за изпълнение обаче се различава значително между различните методи.** Въпреки че разчетите за времето, зависят в голяма степен от използваната изчислителна архитектура и от размера на входящите данни, те предоставят приблизителна оценка, позволяваща сравнение между различните методи. ***SRST2* отнема около пет или шест пъти повече време**, за да завърши повечето тестове в сравнение с *BLAST+*, но времето за изпълнение се увеличава значително с увеличаването на размера на базата данни. Следователно, въпреки че допълнителното време за *SRST2* в сравнение с *BLAST+* остава ограничено до най-много половин минута за повечето анализи и следователно е незначително, времето за изпълнение на *cgMLST* се увеличава рязко и отнема твърде дълго време, за да се завърши в разумен срок, особено при „зависими от времето ситуации“, като например разследване на огнища, епизотични и епидемиологични проучвания. Следователно включването в работния процес на откриване на базата на четене на картографиране чрез *SRST2* за *cgMLST* би изисквало алгоритмични подобрения, за да се ускори времето за обработка, въпреки че това би изисквало и повторно валидиране на работния процес. **Времената за**

изпълнение на *KMA* за повечето анализи са много сходни с тези на *BLAST+*, и въпреки че също се увеличават с размера на базата данни, остават осъществими за *cgMLST*.

По отношение на висококачествените набори от данни, общата производителност и за трите метода за откриване е много сходна и разликите във времето за изпълнение са ограничени, освен когато размерите на базите данни стават твърде големи, в който случай *BLAST+* получава значително предимство по отношение на скоростта пред *KMA* и особено *SRST2*. Независимо от използвания биоинформатичен подход времето за изпълнение е малко в сравнение с общия работен процес на WGS, при който подготовката на пробите, изграждането на библиотеката и секвенирането отнемат няколко дни.

Прогнозата за АМР като цяло е с най-ниска производителност в сравнение с другите изследвания, но точността, прецизността, чувствителността и специфичността винаги са били > 95%. Валидирането на всеки компонент от работния процес на WGS изисква сравнение с референтен стандарт, който служи като основна отправна точка. Предпочитаният референтен стандарт за валидиране на биоинформатичните изследвания е висококачествена генотипна информация, получена чрез конвенционални методи. На практика обаче тази информация може да не е налична и да е неосъществима или дори просто невъзможна за получаване. Друга пречка относно оптимизиране на времето за изпълнение на целия процес по секвениране и биоинформатичен анализ е свързана с множеството АМР гени и необходимостта от голям брой PCR за оценка на всички основни потенциални гени или други механизми, които биха могли да доведат до резистентност. Връзките между генотипа и фенотипа могат да варират между патогените и проучванията на конкретни случаи и дори между различните антибиотици в рамките на един и същ патоген. Значението на скрининга за точкови мутации също е от изключително важно значение. Валидирането се осъществява на ниво група антибиотици, но за някои групи е тествана само подгрупа от свързани антибиотици.

Ефективността на откриване на гени на вирулентност като цяло е много висока, въпреки че ефективността на детекцията на базата на *BLAST+* е малко по-ниска, отколкото за откриване въз основа на картографиране с *KMA* или *SRST2*. Резултатите от генотипните методи, базирани на PCR, са използвани като референтен стандарт, а именно за *stx* и други гени на вирулентността. За разлика от стандартните методи, основани на PCR, WGS открива специфични генни варианти, които могат да имат различни биологични свойства. Откриването на *stx* ген с *KMA* и *SRST2* съвпада перфектно с методите, основани на PCR. Точното откриване на *stx* е от решаващо значение за рутинното наблюдение, тъй като това е определящата характеристика за разграничаване на коменсалните *E. coli* или *STEC*. Не са открити съществени разлики между отделните гени, което предполага висока производителност за откриване на гени като цяло.

Ефективността на определянето на серотипа е малко по-ниска, отколкото при откриване на ген на вирулентност. При други проучвания са докладвани подобни резултати, с по-ниска ефективност за серотипизиране въз основа на WGS. Независимо от това ефективността на всички методи при серотипизирането винаги е била > 95

%, което показва, че WGS е подходяща алтернатива на конвенционалните методи, особено тъй като всички гени могат да бъдат изследвани едновременно, за разлика от методите, основани на PCR, които обикновено са ограничени до най-често срещаните серотипове.

Ефективността на теста за откриване на плазмидния репликон показва най-голямо вариране при различните методи от биоинформатичния анализ. Липсва референтна информация от конвенционалните методи, поради което *PlasmidFinder* е използван като референтен инструмент. *SRST2* и *KMA* пропускат някои плазмиди, открити чрез *BLAST+*, присъстващи в референтния инструмент, голяма част от които могат да бъдат проследени обратно до плазмидния репликон *IncFIA*. Вследствие на това цялостната ефективност е повлияна по-специално от спадане на чувствителността до 87,69% и 95,80% съответно за *KMA* и *SRST2*.

Съществуват много други инструменти и софтуерни продукти за характеризиране на бактериални патогени въз основа на данни от WGS, както за общ бактериален анализ на WGS, така и за специфични за *E. coli*, но обикновено не са валидирани, което затруднява сравняването на показателите. Също така няма достатъчно проучвания и работа, свързана с валидиране на тези нови методи с цел сравнение на резултатите не само за *E. coli*, а и за други бактериални патогени.

Като цяло високата ефективност на работния процес на WGS и биоинформатичния анализ показва, че той е подходящ за наблюдение на патогени както в областта на общественото здраве, така и в клиничната среда, но може да бъде от полза и за научноизследователски проекти. Тези разгледани научни разработки, проучвания и нови методи демонстрират ползата и осъществимостта на преминаването от класически методи към рутинно типизиране на патогени и наблюдение, основани на WGS, и в крайна сметка ще бъдат от решаващо значение за успешното им прилагане в диагностиката.

В още едно обстойно проучване на тема: „*Application of Whole Genome Sequencing to Aid in Deciphering the Persistence Potential of Listeria monocytogenes in Food Production Environments*“ на *Natalia Unrath, Evonne McCabe, Guerrino Macori, Séamus Fanning* е охарактеризиран един от най-опасните и бъдещ безпокойство патоген *Listeria monocytogenes* и потенциалът му за устойчивост в производствената среда за храни посредством високо производителния и ефективен WGS.

Групите от населението, които са изложени на най-голям риск от инфекция с *Listeria monocytogenes*, включват възрастните хора, бременните жени и имунокомпрометираните индивиди. Листерията при хората е свързана най-вече с консумацията на заразна храна. Много проучвания съобщават, че замърсяването на съоръженията за преработка на храни и свързаните с тях среди често е пътят, по който храните се замърсяват. Глобализацията на веригата за доставки на храни вероятно ще допринесе за увеличаване на случаите на епидемии от листериоза. Огнища могат да възникнат и поради уязвими групи от населението, които консумират заразна храна, какъвто е случаят с документираното огнище на листериоза, свързано с консумация на сладолед. Прилагането на WGS ще улесни откриването на тези огнища. През 2019 г. са описани 21 европейски огнища на разпространение в храни, които са с 50% повече

в сравнение с предходната година. MLST показва, че 91% от случаите са причинени от ST6, тип последователност, често замесена в огнищата на листериоза. Появата на целогеномното секвениране (WGS) революционизира бактериалното характеризирание и, от своя страна, проучването на огнищата подпомага глобалното наблюдение на пренасяните чрез храна патогени. Тъй като има огромно производство на храни, ефективният (глобален) надзор е от решаващо значение за ограничаване на разпространението на свързаните с храни микробни замърсители и за опазване на общественото здраве. WGS е улеснил откриването на много международни огнища на листериоза. В допълнение към бактериалната характеристика, разработването на технологии на WGS дава възможност за описание на антимикробната резистентност (AMP) и вирулентните гени. Патогенността и вирулентността на *L. monocytogenes* са добре документирани. Преди всички *L. monocytogenes* са считани за еднакво вирулентни. Съществуват обаче нови доказателства, че някои щамове са по-малко вирулентни от други, тъй като се дължат на мутация в стоп кодона на *internalin A* гена, което води до производството на счупен и неактивен протеин. **WGS се използва за откриване на тези мутации, което позволява да се оцени потенциалът за вирулентност на *L. monocytogenes*.** Освен това хипервирулентните щамове, които представляват по-голяма заплаха за общественото здраве, също могат да бъдат описани с помощта на WGS. Тези щамове съдържат предполагаеми гени, кодиращи вирулентни фактори, често картографирани в генните кълъстери. **Идентифицирани са четири генни кълъстера на вирулентност, известни като *LIPIs*.** Признатите *LIPIs* включват *LIPi-1*, *LIPi-2*, *LIPi-3* и *LIPi-4*, като всички те са свързани с *L. monocytogenes*. Доскоро *LIPi-2* е бил свързан само с *L. ivanovii*. При нетипичен *CC33 L. monocytogenes* обаче е открит частичен локус *LIPi-2*. В неотдавнашен преглед от *Disson, Moura u Lecuit* се предлага хипотезата, че хетерогенността на вирулентността да бъде свързана с разликите в адаптацията в гостоприемника. Тъй като изолатите от род I обикновено са по-толерантни към ниско рН, е по-вероятно те да оцелеят в киселата стомашна среда на гостоприемника. Това наблюдение е в съответствие с находките, че **СС, свързани с хипервирулентност, са по-ефективни колонизатори на червата.** Както е посочено в настоящия преглед, са **необходими повече изследвания, за да се изясни напълно процесът, чрез който *L. monocytogenes* се адаптира към различни среди.** WGS ще играе важна роля в това отношение, тъй като транскриптомните изследвания на различни СС вероятно ще изяснят фенотиповете на *L. monocytogenes* в различни среди.



Island	Gene	Product	Function			
LIPI-1	<i>actA</i>	Actin assembly-inducing protein	(i) Actin recruitment and polymerization events responsible for intracellular movement and cell-to-cell spread [46]			
			(ii) autophagy evasion [47]			
			(iii) Mediation of aggregation and biofilm formation [48]			
			(iv) May also be involved in the entry into eukaryotic cells, probably by recognition of an HSPG receptor			
	<i>mpI</i>	Metalloprotease	Process the PC-PLC into its mature and active form [49]			
LIPI-1	<i>plcA</i>	Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C	(i) Hydrolyze glycosyl PI (GPI)-anchored eukaryotic membrane proteins [50] and			
			(ii) synergize with LLO and PC-PLC in the destabilization of primary and secondary phagosomes [51]			
LIPI-1	<i>plcB</i>	phosphatidylcholine-specific Phospholipase C or lecithinase	(i) Synergize with LLO and PI-PLC in the destabilization of primary phagosomes [52]			
			(ii) Mediate disruption of the double-membrane secondary phagosomes formed after cell-to-cell spread [53]			
LIPI-1	<i>prfA</i>	PrfA (Pleiotropic regulatory factor)	Belongs to CAP (for catabolite gene activator protein)/FNR family, Dimeric protein and binds to its DNA target sequences in dimeric form [54]			
			(i) Mediates lysis of the primary phagosomes and required for the escape from the double-membrane vacuole [55]			
	<i>hly</i>	Listeriolysin O	(ii) Regulates influx of calcium ions inside the host cell and plays a role in bacterium invasion [56]			
			(iii) Downregulate the host immune system through dephosphorylation of H3 and deacetylation of H4 histones of the host cell and [57]			
LIPI-2	<i>i-inlB2</i> <i>i-inlL</i> <i>i-inlK</i> <i>i-inlB1</i> <i>i-inlJ</i> <i>i-inlI</i> <i>i-inlH</i> <i>i-inlG</i> <i>smcL</i> <i>i-inlF</i> <i>i-inlE</i> <i>surF3</i>	Internalins and SMase	(i) SMase disrupts phagosomes [59]			
			(ii) Internalins mediate invasion into human epithelial cells [59]			
			LIPI-3	<i>llsAGHXBYDP</i>	Listeriolysin S	Haemolysin that is post-translationally modified and belongs to a family of modified virulence peptides, including streptolysin S and several as-yet uncharacterized members of the same family in other pathogens. LLS demonstrated to play a role in the survival of <i>L. monocytogenes</i> in PMNs and also contributes to its virulence in the mouse model [60]
			LIPI-4	<i>lm4b_02324</i>	Maltose-6'-P-glucosidase	Putative 6-phospho-beta-glucosidase [61]
				<i>lm4b_02325</i>	Transcriptional antiterminator	Putative transcription antiterminator BglG family [61]
				<i>lm4b_02326</i>	Uncharacterized protein associated to PTS systems	Unknown [61]
				<i>lm4b_02327</i>	Membrane permease EIIA	Putative PTS system, cellobiose-specific enzyme component [61]
				<i>lm4b_02328</i>	Membrane permease EIIB	Putative PTS system, cellobiose-specific enzyme component [61]
			LIPI-4	<i>lm4b_02329</i>	Membrane permease EIIC	Putative PTS system, cellobiose-specific enzyme component [61]

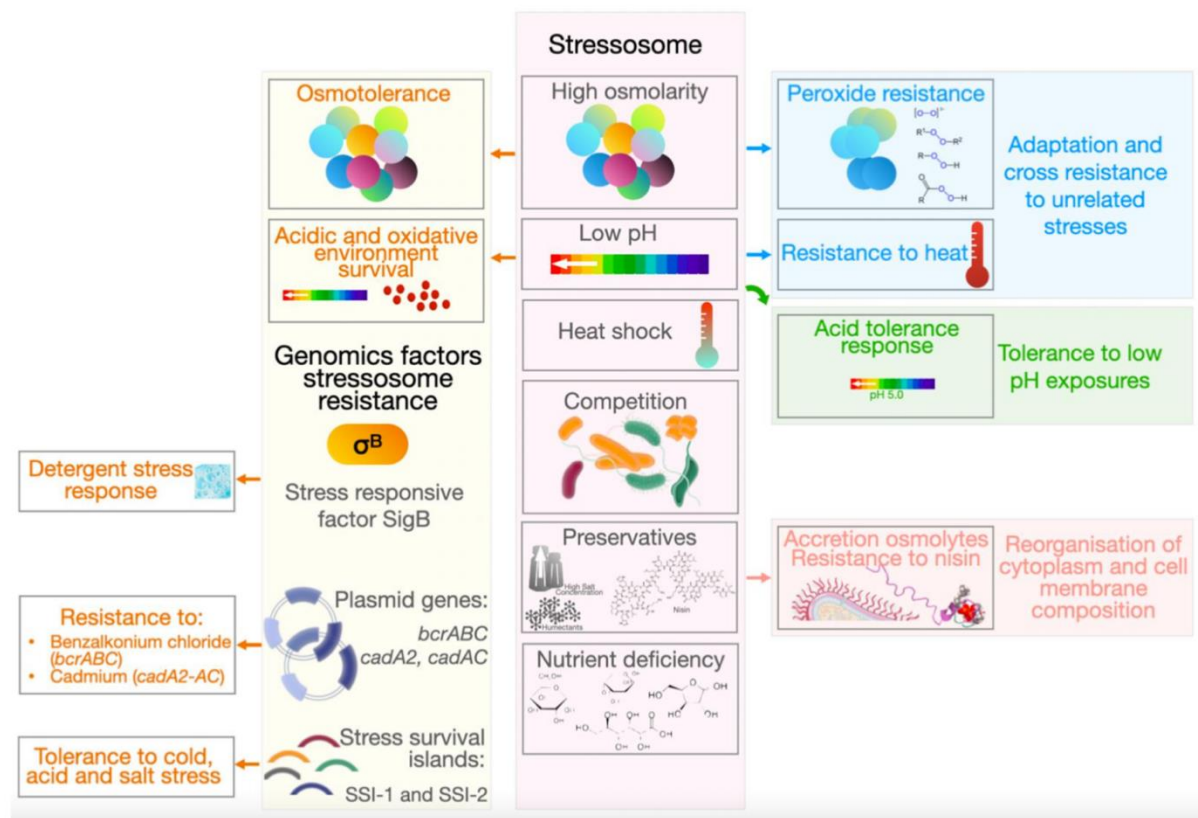
**Таблица 5:** генни клъстера на вирулентност (LIPs), продукти от тези гени и тяхната функция

Технологиите на WGS оказаха значително въздействие върху характеризирането на *L. monocytogenes* и дадоха възможност за прогнозиране на потенциала за

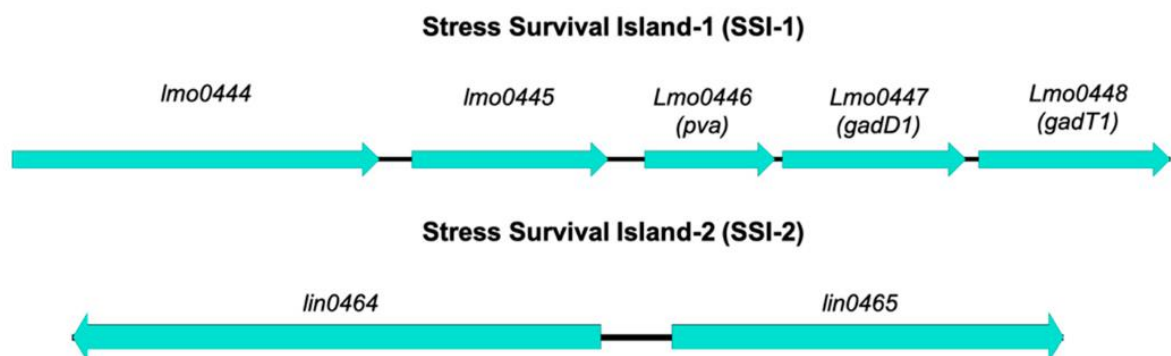
вирулентност на този патоген. В днешно време съществуват няколко метода за епидемиологично типизиране на молекулярна основа, включително MLST и импулсно-полева гел електрофореза (PFGE), които могат да бъдат приложени. Тези методи имат предимства и недостатъци, които могат да бъдат преодолені с прилагането на технологии за **секвениране от следващо поколение (NGS), които осигуряват възможно най-добра разделителна способност за съвременното типизиране на щама.** Както бе споменато по-горе, диференциращата сила на WGS е несравнима. Много изследователи са използвали тази технология, за да намалят двусмислието на персистиращия фенотип, описан по-горе. Този метод е полезен за откриването на устойчиви изолати, както и за проучванията на огнищата. **Инструментите за типизиране, използвани за характеризиране на данните за последователността, като cgMLST и SNP анализ, могат да улеснят откриването на много тясно свързани изолати, които могат да се запазят и постоянно да циркулират в среда за производство на храни.**

Различните механизми, използвани от *L. monocytogenes* за оцеляване при неблагоприятни условия, позволяват на тази бактерия да ги използва в отговор на едно и също или различни стресови фактори, какъвто е случаят с топлинно-шоковите гени, които се активират в отговор на топлинен стрес, високо хидростатично налягане (ННР) и импулсно-електрически полета (PEF). Способността на *L. monocytogenes* да оцелее при температури между -0,4 °C и 45°C му позволява да преодолее стратегиите за обезпечаване безопасността на храните, които често се прилагат в съхраняването и производството на храни. Тази бактерия е по-устойчива на високи температури в сравнение с други патогени, пренасяни в храната, като например видовете *Salmonella* и *E. coli*. *L. monocytogenes* проявява адаптивен киселинен толеранс (ATR), при който излагането на лек киселинен стрес (pH 5,0) води до поносимост към последващи експозиции при още по-ниско pH (3.0).

Скорешно проучване на *Hingston et al.* разкри, че оцеляването на *L. monocytogenes* в стресови условия може да бъде свързано със серотипа, клоналния комплекс, пълния профил на *inlA* гена и плазмидния носител. В проучването *inlA* генът допринася за повишена поносимост към ниски температури, докато наличието на плазмиди води до повишена издръжливост на киселинност.



Фиг. 5: Адаптация на стерсови фактори на *L. Monocytogenes* спрямо геномните фактори, детерминирани посредством WGS



Фиг. 6: Генни острови, детерминиращи способността на този патоген да оцелява

Има две филогенетични групи *L. monocytogenes* плазмиди, които се отличават по своите *repA* последователности. Въпреки че наличието на плазмиди може да доведе до намалена скорост на бактериален растеж, някои гени, картографирани върху плазмидите, могат, за разлика от това, да осигурят на *L. monocytogenes* предимство на растежа. Гените, картографирани върху *L. monocytogenes* плазмиди, включват **гени, устойчиви на бензалкониев хлорид (кодирани от *bcrABC*)** и **гени, устойчиви на кадмий (кодирани от *cadA2, CadAC*)**. Установено е, че в плазмидите се намират и **гени**

на оксидативен стрес, като пероксидази и редуктази. Необходими са повече изследвания, за да се изясни функцията на други гени, разположени също върху *L. monocytogenes* плазмиди, и как те допринасят за устойчивост на стрес и резистентност. Тъй като генният локус *InlA* с пълна дължина е по-често срещан сред изолати, които са толерантни към студ, сол и киселина, може да се предположи, че наличието на повърхностни протеини като *InlA* може да допринесе за защита срещу определени стресови фактори. За разлика от това, проучване на *Franciosa et al.* установи, че съкращенията в *InlA* са допринесли за увеличаване на образуването на биофилми, докато проучване на *Piercey et al.* докладва за изолати със съкращения в *InlA*, *InlB* и *inlH*, които спомагат за образуването на биофилми и оцеляването на този патоген на стресови фактори.

Тъй като повечето научни изследвания, свързани с образуването на биофилм и серотипа или устойчивостта са проведени с помощта на фенотипни методи, **геномните методи могат да имат потенциала да преодолеят тези противоречиви резултати.** Всъщност взаимовръзките, основани на родословие, са довели до противоречиви резултати, тъй като две серогрупи (IIIb и IVb), принадлежащи към родословие I, са показали значителни различия в образуването на биофилми при някои определени условия. Голяма част от авторите предполагат, че вместо да използват тези критерии за определяне на вътрешноспецифичните различия в образуването на биофилм, други генетични маркери, като например щамове или клонални комплекси, могат да се окажат по-надеждни. *Maury и Bracq-Dieye* отбелязват, че геномите на някои клонални комплекси могат да доведат до образуване по-лесно на биофилми при излагане на стресови фактори в околната среда, тъй като хиповирулентните клонални комплекси (CC9 и CC121) при излагане на субинхибиторна концентрация на бензалкониев хлорид по-лесно образуват биофилм.

Gene	Product	Function
<i>degU</i>	Putative response regulator	<i>degU</i> is essential for flagellar synthesis and motility in <i>L. monocytogenes</i> . It is required for growth at high temperature, adherence to plastic surfaces and formation of efficient biofilms. It also functions in virulence of <i>L. monocytogenes</i> .
<i>flaA</i>	Flagellin A	Involved in initial attachment of <i>L. monocytogenes</i> in biofilm formation.
<i>agrBDCA</i>	Peptide-sensing system	Peptide-sensing system involved in quorum-sensing. Involved in early stages of biofilm formation. Also involved in virulence.
<i>bapL</i>	Putative cell wall-anchored protein	Surface adherence of <i>L. monocytogenes</i> in <i>L. monocytogenes</i> . Required to obtain wild-type levels of static and continuous-flow biofilms. Also involved in resistance of planktonic/biofilm cells to benzalkonium chloride and peracetic acid.
<i>sigB</i>	Major transcriptional regulator of stress response genes	Further work needed to find specific function.
<i>dltABCD</i>	D-alanylation pathway	Further work needed to find specific function.
<i>phoPR</i>	Phosphate-sensing two component system	Further work needed to find specific function.

**Фиг. 7:** Гени, отговорни за образуването на биофилм при наличие на стресови фактори

Към днешна дата **много генетични детерминанти са свързани с образуването на биофилм в *L. monocytogenes*** - характеристика, която показва сложността на изследвания фенотип. **Транспозонната мутагенеза е метод, който често се използва за изследване на функционалността на генетичните детерминанти, отговорни за образуването на биофилми**, и има публикувани няколко проучвания, насочени към изследване на ефекта от *knockout* на отделните гени, участващи в образуването на биофилм. Гените, участващи в образуването на биофилм, включват отговора на *degU* и *flaA*, като и двата контролират подвижността. *AgrBDCA* оперона участва в кворум сенсинга. *L. monocytogenes* свързания с образуване на биофилм протеин (*BAPL*) допринася за повърхностното прилепване на щамовете, които го притежават, но не е от съществено значение за всички щамове. По подобен начин е доказано, че транскрипционният регулатор на гените за реакция на стрес, *SigB*, оказва ефект върху образуването на биофилм от *Van der Veen u Abee*. Въпреки че тези изследвания са полезни, **идентифицирането на функционално значимите гени за образуването на биофилм на ниво геном би било ценно**. *Chang, Gu* провеждат едно от първите проучвания, базирани на *GWAS* (*genome-wide association studies*), като използват подхода за транспозонна мутагенеза. Това проучване идентифицира 24 гена, участващи в образуването на биофилми. *Alonso u Perry* идентифицират 38 генетични локуси, за които се смята, че участват в образуването на биофилми в *L. monocytogenes*, когато се инкубират при 35°C. Сред тези локуси са гените на D-аланилационния път *dltABCD* и фосфатно -чувствителният двукомпонентен *phoPR*, чиято значимост е изследвана чрез създаването на мутанти чрез делеция. Резултатът от това е **значително намаляване на образуването на биофилми от мутантите**. Тези резултати са показателни за значимостта на D-аланилацията на липотейхова киселина, медирана от генните продукти на *DltABCD* оперона и двукомпонентната система с фосфатно-сензорни *phoPR*, за способността на *L. monocytogenes* да образува биофилми.

Проучване на *Piercey u Hingston* идентифицира гени, които участват в образуването на биофилм при 15°C - температура, по-често поддържана в производствената среда за храни. Възможно е тези гени да се различават, тъй като температурата на околната среда засяга хидрофобността на клетъчната повърхност, подвижността и експресията на други генетични фактори. Това проучване използва и транспозон-медирана мутагенеза за създаване на мутантни библиотеки. Идентифицирани са девет локуси, свързани с образуването на биофилм. Проучване *Pan Genome Wide Association*, проведено от *Lee and Cole*, сравнява набори от гени, за които е установено, че са свързани с образуването на биофилми при 37 и 10°C и които включват четири различни състояния. Тестваните условия включват ВНИ, дестилиран ВНИ, ВНИ + NaCl и дестилиран ВНИ + NaCl. При 37°C 1360 гена са идентифицирани само с 50 гена (3,68 %), открити при три или повече темепературни състояния. При 10°C са идентифицирани около 1050 гена с 59 гена (5,62 %), често активиращи се при повече от три темепатурни състояния. Установено е, че продуктите от идентифицираните гени кодират клетъчните повърхностни протеини и функциите, свързани с трансформацията и устойчивостта.

**За да се изясни напълно процесът на образуване на биофилм, са необходими допълнителни генетични изследвания, като например изследване на непознати**



**генни функции и транскриптомни/протеомни подходи.** Освен това би било интересно да се проучи въздействието на връзката между образуването на биофилми и резистентността на биоцидите върху устойчивостта на *L. monocytogenes* в производствена среда за храни (FPE).

Често обаче е предизвикателство да се тълкуват данни, описващи резистентността на бактериите към биоциди. Това се дължи на **липсата на стандартизирани критерии за определяне на резистентността към дезинфектанти** и често изолати *L. monocytogenes* се характеризират като устойчиви въз основа на преживяемостта при концентрации, които инхибират повечето щамове. Налице е също така **необходимост от стандартизирани протоколи за проучване на чувствителността на биоцидите**, тъй като MIC може да варира, когато се прилагат различни методи. Необходими са и допълнителни изследвания на моделите на резистентност към биоцидите. Способността да се образуват биофилми може да варира при щамове, които са еднакво устойчиви на *BAC*, но имат различни генетични детерминанти на резистентността. Това е видно от проучване на *Ortiz u Lopez-Alonso*, при което *L. monocytogenes*, принадлежащи към *ST121*, съдържащ генния *QACs*, образува биофилми при  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . Междувременно *SST31* изолат, който също е резистентен, не образува биофилм при същата концентрация. *Nakamura u Takakura* също показват, че резистентни на *QAC L. monocytogenes* по-бързо образуват биофилми от чувствителните щамове. Тъй като гените на *BC* толерантност и устойчивост на стрес често се намират в *MGE*, чувствителните изолати могат лесно да станат резистентни при наличие на резистентни изолати. За борба с разпространението на гени, резистентни към *BC* и последващата устойчивост, се предлага използването на нехимични или комбинирани антимикробни подходи. Тези всички резултати посочват само още едно доказателство в полза на внедряването и рутинното използване на новите молекулярни методи, които са по-надеждни, по-точни, по-специфични и по-информативни.

Много проучвания не успяват да изяснят връзката между *L. monocytogenes* устойчивостта и образуването на биофилм и резистентността на биоцидите. Въпреки това, с появата на нови методи за характеризиране на генома, вече могат да се правят по-добри сравнения между изолати на *L. monocytogenes*. Тези стратегии позволиха на изследователите да определят специфичното разпределение на *L. monocytogenes CC*, идентифицирани в околната среда, както и да открият уникални характеристики, свързани с тях. Епидемиологичните връзки между устойчивостта, резистентността към дезинфектанти и образуването на биофилми са направени в многобройни проучвания, но изучаването на еволюцията на образуването на биофилми в отговор на субинхибиторните нива на дезинфектантите може да се окаже по-информативна и ценна информация. С появата на стандартизирани протоколи е вероятно резултатите от различните изследвания да бъдат по-съгласувани. С непрекъснатото развитие на молекулярни и фенотипни методи ще бъде изяснен характера на такива патогенни бактерии като *L. Monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *STEC*, *Salmonella* и др. в среда за производство на храни.

## Заклучения

В този научен обзор е направен описателен преглед на някои от последните фенотипни и молекулярни методи за откриване на антимикробна резистентност и устойчивост на патогенни бактерии, които **ще допринесе за по-добрата диагностична подготвеност, установяване въздействието и произхода на тези патогени, етиологията и генетичните характеристики, отговорни за вирулентността, резистентността, устойчивостта и приспособимостта им. Бързата и точна диагноза гарантира не само навременна реакция и вземане на адекватни мерки в борбата с тези патогени, а и това, че пациентите получават подходящи антибиотици и адекватно лечение.** Освен това **наблюдението на резистентността към антибиотици продължава да бъде от решаващо значение поради нарастващия капацитет на бактериите за бързо адаптиране към новите антибиотици.**

Съществуват **широк спектър от методи и нововъзникващи технологии за откриване на резистентност.** В много проучвания, включени в този описателен преглед са извършени с най-малко два метода. Един-единствен метод, който е в състояние както да идентифицира, така и да изпълнява AST, значително би опростил диагностичните работни процеси, особено ако може да открие няколко патогена. В този смисъл, ***PhenoTest*, *MALDI-TOF* и *WGS* ако са оптимизирани за AST, може да окажат голямо въздействие върху рутинната диагностика.** Друг по-достъпен за страните с ниски доходи вариант е да се използва метод от „златния стандарт“ и той да бъде автоматизиран, да се намали времето за прилагане, да се подобри междулабораторната възпроизводимост и да се стандартизира тълкуването на резултатите.

**Молекулните методи значително намаляват ТАТ за идентификация.** Все повече проучвания подчертават клиничните ползи от използването на системата GeneXpert в сравнение с рутинните методи. Един единствен молекулярен метод, способен да открие няколко патогена, би представлявал огромен успех в диагностичната подготвеност, например *GenmarkDxePlex*. Рутинното прилагане на WGS в диагностиката за откриване на резистентност за момента все още е сложно, по отношение на ТАТ, високите разходи и скъпата първоначална инвестиция. **Платформата *Nanopore Minlon* изглежда обещаваща от диагностична гледна точка поради малкия си размер, преносимост, малък ТАТ и предоставяне на резултати в реално време.** Инструментите, които позволяват автоматичното идентифициране на гени за резистентност чрез анализиране на данни от WGS, намаляват времето за биоинформатичен анализ, необходим за прогнозиране на резистентността към антибиотици. Тези инструменти могат да бъдат доразвити и актуализирани. **Метагеномното секвениране в клиничните проби може да представлява близкото бъдеще на прилагането на технологии за секвениране в рутинната диагностика.**

Необходимо е да се вземат предвид различните условия, в които може да се приложи даден метод: ниски срещу високи необходими ресурси, високо работно натоварване срещу ниско работно натоварване и възможности на централизирани

лаборатории, които тестват пълната гама от патогени/антибиотици срещу РОС системи и стандартни фенотипни методи, които са фокусирани само върху един патоген и един вид резистентност. В идеалния случай, **най-добрият метод за откриване на резистентност трябва да има следните характеристики: способността за откриване на резистентност директно от клинична/хранителна проба, автоматизиран процес, преносимост на апаратурата, да изисква минимални ресурси, да е лесна за използване дори и от не-обучени професионалисти, бърза ТАТ и гъвкавост при промяна на условията и матриците за тестване.** Дори ако в момента не съществува тест, който да отговаря на всички тези критерии, това следва да служи като отправна точка, която да следва. **Разработването и подобряването на диагностичните методи за откриване на антимикробна резистентност е един от многобройните начини за намаляване на тежестта на резистентността към антибиотици.**

#### Изготвил:

Красимира Захаријева,  
Главен експерт в дирекция ОРХВ на ЦОРХВ

#### Използвана литература:

- *Antimicrobial Resistance and Whole Genome Sequencing – What is Changing?* - <https://www.usda.gov/media/blog/2018/11/16/antimicrobial-resistance-and-whole-genome-sequencing-what-changing>
- *BacAnt: A Combination Annotation Server for Bacterial DNA Sequences to Identify Antibiotic Resistance Genes, Integrons, and Transposable Elements* - Xiaoting Hua, Qian Liang, Min Deng, Jintao He, Meixia Wang, Wenjie Hong, Jun Wu, Bian Lu, Sebastian Leptihn, Yunsong Yu and Huan Chen
- *Disrupting drug Resistance using Innovative Design (JPIAMR-DRUID)* - <https://anr.fr/en/call-for-proposals-details/call/disrupting-drug-resistance-using-innovative-design-jpiamr-druid/>
- *Recent Advances in Iron Chelation and Gallium-Based Therapies for Antibiotic Resistant Bacterial Infections* - Victor Vinuesa and Michael J. McConnell
- *Iron Sequestrant DIBI, a Potential Alternative for Nares Decolonization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Is Anti-infective and Inhibitory for Mupirocin-Resistant Isolates* - David S. Allana, Maria del Carmen Parqueta, Kimberley A. Savagea, and Bruce E. Holbein
- *Validation strategy of a bioinformatics whole genome sequencing workflow for Shiga toxin-producing Escherichia coli using a reference collection extensively characterized with conventional methods* - Bert Bogaerts, Stéphanie Nouws, Bavo Verhaegen, Sarah Denayer, Julien Van Braekel, Raf Winand, Qiang Fu, Florence Crombé, Denis Piérard, Kathleen Marchal, Nancy H. C. Roosens, Sigrid C. J. De Keersmaecker and Kevin Vanneste
- *ISO/FDIS 23418 - Microbiology of the food chain — Whole genome sequencing for typing and genomic characterization of foodborne bacteria — General requirements and guidance*