



Дэвид Аненсен, Роман Козлов, Моника Лара, Каролин Вегвари,
Нил Вудфорд, и сеть сотрудничающих с ВОЗ центров по надзору
за антимикробной резистентностью и оценке качества

Молекулярные методы диагностики
антимикробной резистентности для
совершенствования Глобальной системы
эпиднадзора за устойчивостью
к антимикробным препаратам (GLASS)



Всемирная организация
здравоохранения

Дэвид Аненсен, Роман Козлов, Моника Лара, Каролин Вегвари,
Нил Вудфорд, и сеть сотрудничающих с ВОЗ центров по надзору
за антимикробной резистентностью и оценке качества

Молекулярные методы диагностики антимикробной резистентности для совершенствования Глобальной системы эпиднадзора за устойчивостью к антимикробным препаратам (GLASS)



Всемирная организация
здравоохранения

Дэвид Аненсен¹, Роман Козлов², Моника Лара³, Каролин Вегвари⁴, Нил Вудфорд⁵, и сеть сотрудничающих с ВОЗ центров по надзору за антимикробной резистентностью и оценке качества

¹ Центр геномного надзора за патогенами Института Велком Сэнгер, Великобритания

² Сотрудничающий центр ВОЗ по укреплению потенциала в сфере надзора и исследований антимикробной резистентности, Россия

³ Сотрудничающий центр ВОЗ по заболеваниям, передаваемым половым путем, Австралия, Австралия

⁴ Центр геномного надзора за патогенами Института Велком Сэнгер, Великобритания

⁵ Сотрудничающий референтный центр ВОЗ по изучению резистентности к антимикробным препаратам и инфекциям, связанным с общественным здоровьем, Великобритания

Д94 Молекулярные методы диагностики антимикробной резистентности для совершенствования Глобальной системы эпиднадзора за устойчивостью к антимикробным препаратам (GLASS). — Смоленск: СГМУ, 2023. — 72 с.

Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/WSI/AMR/2019.1). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Этот перевод не был создан Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). ВОЗ не несет ответственности за содержание или точность этого перевода. Оригинальное английское издание является обязательным к цитированию документом.

Информация об отдельных диагностических тестах в этом документе является общедоступной и была получена путем поиска в PubMed соответствующих публикаций по молекулярной диагностике антимикробной резистентности для приоритетных патогенов в рамках программы GLASS, а также с помощью поиска в Google диагностических компаний, предлагающих молекулярные тесты для выявления устойчивости к антимикробным препаратам (условия поиска см. в Приложении 1). Все поиски проводились с 13 октября по 4 декабря 2017 года.

ВОЗ не проводила валидацию и не говорит в пользу использования каких-либо коммерческих тестов, упомянутых в этом документе. Молекулярные диагностические тесты, перечисленные в таблице A1.1, одобрены Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США или имеют маркировку «Compliance Européenne» (соответствуют стандартам Европейского Союза и Европейской экономической зоны). По мере разработки и валидации большего числа молекулярных диагностических тестов, данная таблица будет обновляться с целью включения верифицированных тестов, одобренных другими регулирующими органами.

УДК 57.088.1



Содержание

Резюме.....	4
Благодарности.....	6
Акронимы и сокращения.....	7
1. Введение.....	8
2. Как использовать это техническое уведомление.....	11
3. Молекулярные методы диагностики АМР.....	14
4. Обзор диагностических тестов для выявления АМР.....	15
5. Сложность и стоимость молекулярных методов диагностики АМР.....	17
6. Применимость и гибкость молекулярных методов диагностики АМР.....	20
7. Какую технологию выбрать для какого типа лаборатории?.....	25
8. Ограничения и сложности молекулярных методов диагностики АМР.....	27
9. Обмен данными и анализ.....	29
10. Выводы и перспективы.....	31
11. Литература.....	32
Приложение 1. Литературный и онлайн-поиск валидированных, коммерчески доступных молекулярно-диагностических тестов для выявления АМР.....	34
Приложение 2. Описание молекулярных методов диагностики АМР ...	58
Приложение 3. Ссылки на руководства FDA и ЕЭЗ в отношении методик молекулярной диагностики.....	68

Антимикробная резистентность (АМР) представляет собой серьезную угрозу для общественного здоровья во всем мире. В 2015 г. ВОЗ запустила Глобальную систему эпиднадзора за устойчивостью к антимикробным препаратам (GLASS) с целью стандартизации сбора данных в отношении АМР в государствах-участниках для программ планирования, профилактики и вмешательств. В настоящее время отчеты для GLASS основываются на данных, полученных при выявлении фенотипической устойчивости, что требует культивирования бактерий и тестирования их роста в присутствии антимикробных препаратов (АМП). В будущем GLASS может включать результаты с использованием молекулярно-генетических исследований для детекции АМР соответствующими методами. Методы молекулярной диагностики можно использовать в дополнении к фенотипическому тестированию, чтобы детально охарактеризовать конкретный ген или мутацию, лежащие в основе фенотипа устойчивости. Эта информация может быть использована для интерпретации профилей АМР в наблюдательных (референтных) центрах, а также для лучшего понимания глобального распространения определенных механизмов резистентности.

Организационные модели различных лабораторий определяют использование тех или иных технологий диагностики АМР молекулярными методами. В этом техническом уведомлении рассматриваются три разновидности лабораторных учреждений с различными возможностями для молекулярных исследований в отношении АМР: (1) лаборатории, которые не имеют предшествующего опыта в молекулярном эпиднадзоре за АМР; (2) недавно созданные национальные референтные лаборатории (НРЛ) с определенным опытом применения молекулярных методов; и (3) полностью организованные НРЛ с опытом молекулярного надзора за АМР. Методы молекулярной диагностики классифицируются в зависимости от сложности применения, стоимости оборудования и цены за исследуемый образец. В этом техническом уведомлении содержится руководство для персонала, участвующего в программах надзора за АМР на различном уровне, по выбору наиболее подходящей технологии для молекулярной диагностики АМР, соответствующей принципам организации лаборатории, включая клинические и референтные. В документе также представлен обзор доступных методов и подходов к их применению в рамках национальных надзорных программ.

Из доступных молекулярных методов, полностью автоматизированные, интегрированные устройства для полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием картриджей или устройства на основе петлевой изотермической амплификации, а также иммунохроматографические методы являются наиболее подходящими для лабораторий, не имеющих предшествующего опыта проведения молекулярных исследований

в рамках надзора за АМР. Сложно определить стоимость одного протестированного образца, особенно для стран с низким и средним уровнем доходов (СНСД), поскольку модели ценообразования специфичны для регионов и поставщиков. Отсутствие точности в стоимости молекулярного тестирования является одним из ограничений для его использования в надзоре за АМР в СНСД. Система формирования заказов по каталогу ВОЗ, которая включает предварительное согласование цен и оптимизацию потока материалов, может снизить стоимость одного теста. Более того, гармонизация и стандартизация клинико-лабораторных исследований в рамках национальных лабораторных систем в СНСД может сделать возможными совместные закупки, что было бы полезно при ведении переговоров о ценах с производителями.

Несмотря на то, что молекулярная диагностика АМР в отношении известных маркеров резистентности высоко чувствительна, что является ее бесспорным преимуществом, нет убедительных доказательств их экономической эффективности или доступности во всех условиях применения. Недостаточное понимание механизмов резистентности может препятствовать использованию эффективных молекулярных средств диагностики для некоторых патогенов. В частности, в настоящее время не существует валидированного молекулярно-диагностического теста для выявления АМР при гонорее или пневмококковой инфекции. Тем не менее, поскольку стоимость молекулярной диагностики снижается, а знания о генетических механизмах АМР становятся все более обширными, молекулярные тесты в будущем станут ценными инструментами, доступными для эпидемиологического надзора за резистентностью в лабораториях любого уровня. Возможно проведение доказательных (*proof-of-principle*) экспериментов для демонстрации дополнительной ценности молекулярной диагностики АМР в дополнение к фенотипическому тестированию. В одном из будущих документов будут изложены планы и инструкции по проведению такого рода исследований.

ВОЗ благодарит следующих авторов и участников проекта:

David Aanensen (Центр геномного надзора за патогенами Института Велком Сэнгер), Роман Козлов (Сотрудничающий центр ВОЗ по укреплению потенциала в сфере надзора и исследований антимикробной резистентности, Россия), Monica Laha (Сотрудничающий центр ВОЗ по заболеваниям, передаваемым половым путем, Австралия), Carolin Vegvari (Центр геномного надзора за патогенами Института Велком Сэнгер), Neil Woodford (Сотрудничающий референтный центр ВОЗ по изучению устойчивости к антимикробным препаратам и инфекциям, связанным с общественным здоровьем, Великобритания) и Сеть сотрудничающих с ВОЗ центров по надзору за АМР и оценке качества.

Акронимы и сокращения

CE	Conformité Européenne (Европейское соответствие)
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments (Поправки к закону по совершенствованию клинических лабораторий)
ECDC	(European Centre for Disease Prevention and Control) Европейский центр профилактики и контроля заболеваемости
EUCAST	(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам
EUSCAPE	(European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae) Европейское исследование по оценке продуцирующих карбапенемазы представителей Enterobacteriaceae
FISH	флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>
GLASS	(Global Antimicrobial Resistance Surveillance System) Глобальная система эпиднадзора за устойчивостью к антимикробным препаратам
LAMP	(loop-mediated isothermal amplification) петлевая изотермическая амплификация
LED	(light-emitting diode) световой диод, светодиод
LFIA	(lateral flow immunoassay) иммунохроматографический анализ
LPA	(line probe assay) метод гибридизации с зондами на стрипах
MRSA	метициллин-резистентный <i>Staphylococcus aureus</i>
NLFA	(nucleic acid lateral flow assay) ДНК-иммунохроматографический тест
TTR	(time to result) время до получения результата
USFDA	Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
AMP	антимикробная резистентность
БЛРС	β -лактамазы расширенного спектра
ВКК	Внешний контроль качества
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕС	Европейский союз
КК	контроль качества
кПЦР	количественная полимеразная цепная реакция
МЛУ	множественная лекарственная устойчивость
МПК	минимальная подавляющая концентрация
НРЛ	национальная референтная лаборатория
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
СНП	секвенирование нового поколения
СНСД	страны с низким и средним уровнем доходов
СЦ	сотрудничающий центр
ФХ	фторхинолоны
ЦСЗ-Р	резистентные к цефалоспорином 3 поколения
ЭТ	экспресс-тест

1. Введение

Возрастающая распространенность антимикробной резистентности (АМР) представляет собой глобальную угрозу для общественного здоровья и признается как важная проблема государствами, являющимися членами ВОЗ в резолюции Всемирной ассамблеи здравоохранения (WHA) 68.7 [1]. Данные о патогенах, устойчивых к антимикробным препаратам (АМП), исключительно важны для информирования регуляторных органов и мониторинга эффективности последующих мероприятий. По запросу государств, представленных в ВОЗ, была запущена программа GLASS (Глобальная система эпидемиологического надзора за устойчивостью к антимикробным препаратам) в 2015 г. с целью стандартизации сбора данных по АМР. Начиная с этапа сбора материала до представления результатов с целью облегчения научно-обоснованного планирования программ профилактики и вмешательств, эта программа включает все пункты планирования [2].

В настоящее время данные, передаваемые в GLASS, базируются на обнаружении фенотипической устойчивости, которая определяется на основании способности бактерий к росту в присутствии АМП. Эти методы позволяют определить степень устойчивости отдельного патогена к конкретному АМП путем определения минимальной подавляющей концентрации (МПК), что является золотым стандартом, или диаметра зоны задержки роста с помощью диско-диффузионного метода. Эти методики предоставляют информацию необходимую для клинического ведения пациента, однако не позволяют выявить тот или иной механизм(ы) резистентности возбудителя. Методы определения фенотипической устойчивости часто могут требовать длительного времени (от нескольких часов до дней). В связи с этим стоит рассмотреть возможность дополнения этого подхода молекулярной диагностикой АМР для подтверждения и отслеживания механизмов устойчивости [3].

Молекулярные методы диагностики АМР направлены на обнаружение генов, кодирующих формирование резистентности, или связанные с формированием устойчивости мутаций в ДНК, выделенной из очищенных бактериальных культур или непосредственно из клинических образцов. Эти методы позволяют получить результат за более короткий промежуток времени, чем фенотипические — в некоторых случаях в течение нескольких минут при прямом тестировании культивируемой колонии бактерии, или в течение нескольких часов для клинических образцов [4, 5]. Прямое экспресс-тестирование образцов от пациентов может быть особенно полезным в клинических условиях, когда для обоснованного назначения АМП требуются результаты определения АМР [6]. Однако, если молекулярный тест предполагает получение свежей бактериальной культуры, затраченное время будет суммировано с аналогичным таковому при фенотипическом тестировании. Молекулярная

диагностика АМР может быть полезна для подтверждения результатов фенотипического тестирования, а также в наблюдательных программах, например, для подтверждения механизмов, ответственных за определенный тип резистентности.

В настоящее время на рынке представлено множество коммерчески доступных молекулярных тестов для выявления специфических генов устойчивости как для клинических, так и наблюдательных целей. Например, в случае подозрения у пациента метициллинорезистентного золотистого стафилококка (MRSA), образцы могут быть протестированы в отношении присутствия генов *mecA* и *mecC*, которые определяют резистентность к пенициллинам [7, 8]. Если доказано, что штамм *E. coli* или *K. pneumoniae* устойчив к цефалоспорином третьего поколения (ЦСЗ), могут быть использованы тесты на различные β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) для определения кодирующего устойчивость гена. Для обнаружения генов карбапенемаз у устойчивых к карбапенемам представителей Enterobacteriaceae на рынке представлены тест-системы с хорошей чувствительностью и специфичностью. Характеристика генов резистентности дает важную информацию для лучшего понимания молекулярной эпидемиологии АМР.

Несмотря на то, что молекулярные тесты предоставляют важную и клинически значимую информацию, они имеют ряд ограничений. Методики основанные на использовании молекулярно-генетических технологий, обнаруживают только известные гены устойчивости или описанные мутации, однако фенотипические тесты для выявления резистентности всегда необходимы в рамках программы надзора для обеспечения правильной классификации бактериальных изолятов. Результаты молекулярных и фенотипических тестов не всегда хорошо коррелируют. В частности, молекулярно-диагностические тесты, основанные на амплификации ДНК, могут давать ложноотрицательные результаты, поскольку не был исследован и описан ген, ответственный за данный фенотип устойчивости; с другой стороны, ген может быть исследован, но мутация, находящаяся в зоне посадки праймера, помешала амплификации; наконец, фенотип устойчивости обусловлен новым, еще не описанным механизмом. Очень важным критерием работы является разработанная система контроля качества, которая позволяет получать достоверные результаты [5].

В этом техническом уведомлении описывается практичность и применимость официально одобренных методов молекулярной диагностики для детекции АМР с целью выявления приоритетных патогенов в рамках программы GLASS и типов устойчивости (Таблица 1), а также их пригодность для лабораторий с различными возможностями для рутинной клинической практики и эпидемиологического надзора. «Официально одобренные» диагностические тесты — это тесты, которые были валидированы и стандартизованы. Многие исследовательские лаборатории разрабатывают собственные диагностические методики для внутреннего

использования, но они не всегда стандартизованы или имеют гарантированное качество. Стандартизованное тестирование устраняет разброс результатов из-за использования различных методик и ему отдается предпочтение в лабораториях, участвующих в национальных программах надзора за эпидемиологической ситуацией. Возможности молекулярного тестирования быстро развиваются, новые методы будут валидированы и станут доступными в ближайшем будущем.

Таблица 1. Приоритетные комбинации патогенов и АМП в рамках программы GLASS

Патоген	Класс АМП	Предполагаемые механизмы резистентности для детекции
<i>Escherichia coli</i>	Сульфаниламиды и триметоприм Фторхинолоны Цефалоспорины расширенного спектра Карбапенемы Полимиксины Пенициллины	Фторхинолон-Р БЛРС Карбапенемазы Колистин-Р
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Сульфаниламиды и триметоприм Фторхинолоны Цефалоспорины расширенного спектра Карбапенемы Полимиксины	Фторхинолон-Р БЛРС Карбапенемазы Колистин-Р
<i>Acinetobacter</i> spp.	Тетрациклины Аминогликозиды Карбапенемы Полимиксины	Карбапенемазы Колистин-Р
<i>Staphylococcus aureus</i>	β-лактамы стабильные к действию пенициллиназ	<i>mecA</i> , <i>mecC</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Пенициллины Сульфаниламиды и триметоприм Цефалоспорины расширенного спектра	
<i>Salmonella</i> spp.	Фторхинолоны Цефалоспорины расширенного спектра Карбапенемы Макролиды	Фторхинолон-Р БЛРС Карбапенемазы Колистин-Р
<i>Shigella</i> spp.	Фторхинолоны Цефалоспорины расширенного спектра Макролиды	Фторхинолон-Р БЛРС Карбапенемазы Колистин-Р
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Цефалоспорины расширенного спектра Макролиды Фторхинолоны Аминогликозиды	ЦСЗ-Р

Фторхинолон-Р — резистентность к фторхинолонам; БЛРС — β-лактамазы расширенного спектра; Колистин-Р — резистентность к колистину; ЦСЗ-Р — резистентность к цефалоспорином 3 поколения; *mecA*, *mecC* — гены *mecA*, *mecC*.

2. Как использовать это техническое уведомление

В данном техническом уведомлении представлен обзор преимуществ, затрат, ограничений и проблем рассматриваемых методик молекулярной диагностики вообще и молекулярной диагностики АМП в частности, которые могут использоваться для надзора как в референтных лабораториях, так и в клинических условиях. В документе также указывается какие именно данные мы добавляем к нашим знаниям о профилях АМП в результате использования молекулярно-диагностического тестирования в центрах наблюдения, а также значения этих результатов для регуляторных органов и клинической практики. Документ предназначен для того, чтобы показать руководителям исследовательских центров возможности их лабораторий в сфере изучения АМП и помочь сформировать мнение относительно правильности выбора молекулярных методов диагностики и алгоритмов их использования в клинической практике и эпидемиологическом надзоре (Рисунок 1). Более подробная информация о методах молекулярной диагностики, описанных в этом руководстве, а также технических особенностях, приведена в Приложении 2.

Мы оценили пригодность существующих методов для лабораторий с различными потенциалом и возможностями. Для простоты мы классифицировали лаборатории как:

1. тип 1, без предшествующего опыта в эпиднадзоре за АМП или применения молекулярных методов;
2. тип 2, с предшествующим опытом проведения исследований по определению чувствительности к АМП, но небольшим опытом применения молекулярных методов или без такового (например, недавно созданная национальная референтная лаборатория или клиническая лаборатория при стационаре (НРЛ));
3. тип 3, с большим опытом определения чувствительности к АМП и применения молекулярных методов эпиднадзора за АМП (например, полностью организованная НРЛ).

В рутинных клинических условиях время до получения результатов теста (TTR) имеет важное значение, тогда как в условиях эпидемиологического мониторинга могут быть более полезными тесты с высокой пропускной способностью. Типы тестов, которые подходят для клинических условий и эпиднадзора, представлены на Рисунке 1 (клинические исследования обозначены символом персонала, а эпидемиологические исследования — символом микроба). Выбор теста для каждого вида лабораторий зависит от сложности и стоимости анализа, опыта персонала, бюджета и инфраструктуры организации, а также целей мониторинга АМП. Тесты низкой сложности и низкой стоимости могут подходить для большинства типов лабораторий, тогда как тесты высокой сложности и высокой стоимости могут подходить только для оснащенных НРЛ с достаточным финансированием.

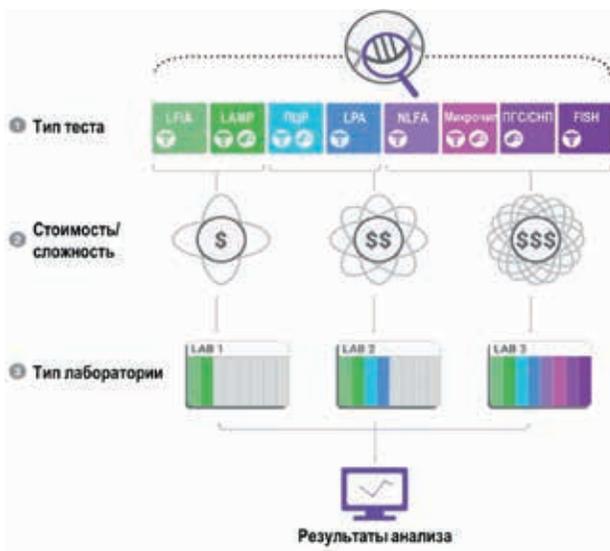


Рисунок 1. Пример различных тестов для молекулярной диагностики, подходящих для лабораторий с различным уровнем оснащения, как для рутинной работы, так и эпидемиологических исследований

LFIA — иммунохроматографический тест (lateral flow immunoassay); LAMP — петлевая изотермическая амплификация (loop-mediated isothermal amplification); ПЦР — полимеразная цепная реакция; LPA — гибридизация с зондами на стрипах (line probe assay); ПГС — полногеномное секвенирование; СНП — секвенирование нового поколения; FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*.

Тесты, подходящие для клинического применения, обозначены символом персонала, а подходящие для эпидемиологических исследований — символом микроба.

Стоимость и сложность молекулярных тестов увеличивается слева направо и по градиенту цвета от зеленого к фиолетовому. Три категории сложности обозначаются растущим числом эллиптических орбит. Знаки доллара указывают на общие категории затрат (затраты на установку и проведение теста). «LAB 1» на рисунке относится к лабораториям, не имеющей опыта проведения молекулярных исследований, «LAB 2» — к лабораториям с определенным предшествующим опытом, а «LAB 3» — к лабораториям с большим опытом в области молекулярной диагностики.

Лаборатории, не имеющие опыта проведения молекулярных тестов, могут рассмотреть использование несложных и недорогих тестов, таких как иммуноферментный анализ (LFIA) и тесты на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP). Недавно созданные НРЛ могут также рассмотреть возможность проведения тестов на основе ПЦР и гибридизации с зондами на стрипах (LPA). Опытные, хорошо оснащенные НРЛ могут рассмотреть возможность использования любой из доступных методик. Некоторые более сложные и дорогостоящие тесты становятся

более рентабельными по мере увеличения числа исследованных образцов или спектра выявляемых генов устойчивости. Методики анализа полученных результатов зависят от сложности теста. Для LFIA и LAMP тестов достаточно визуальной оценки результата, для получения заключения о наличии генов, опосредующих устойчивость. Для более сложных диагностических анализов, таких как микрочипы и ПГС, необходим комплексный аналитический подход для интерпретации полученных данных.

Что такое молекулярная диагностика АМР?

- Фенотипическая диагностика АМР может применяться для оценки способности бактерий к росту в присутствии определенного АМП (т.е., для определения чувствительности).
- Напротив, молекулярные диагностические тесты используются для обнаружения приобретенных генов или мутаций в геномах бактериальных патогенов, которые детерминируют их резистентность к одному или нескольким АМП определенного класса (т.е. детектируют гены, связанные с механизмом устойчивости).
- Молекулярная и фенотипическая диагностика АМР дополняют друг друга для улучшения оценки как распространенности резистентности в конкретном учреждении, так и основных механизмов, ответственных за развитие этой устойчивости.

Преимущества молекулярно-диагностических тестов для выявления АМР

- Потенциально более быстрые результаты могут быть получены с помощью тестов с использованием картриджей, чем с помощью тестов, предполагающих выделение чистой культуры патогена, что может быть преимуществом в клинической ситуации.
- Доступны тесты с использованием картриджей, которые требуют минимального лабораторного оснащения и обучения персонала, с их помощью образцы могут быть протестированы напрямую, без этапа культивирования.
- Молекулярные тесты более чувствительные, чем фенотипические для определения известных маркеров устойчивости; однако присутствие маркера резистентности не всегда надежно предсказывает фенотипическую устойчивость.
- Молекулярные тесты могут использоваться для подтверждения механизмов резистентности у изолятов с соответствующим фенотипом устойчивости.
- Результаты, полученные с помощью методов молекулярной диагностики АМР, могут способствовать получению дополнительных данных для эпиднадзора и обоснованных действий.

3. Молекулярные методы диагностики АМР

В настоящее время большинство валидированных тестов, основанных на молекулярно-диагностических технологиях для выявления АМР относятся к одной из четырех категорий: использующие секвенирование, гибридизацию, методы амплификации или иммунологические подходы. В тестах на основе секвенирования последовательности генома анализируются для выявления генов устойчивости; в тестах, основанных на гибридизации, гибридизационные зонды нуклеиновых кислот специфичны генам-мишеням, что делает возможным их обнаружение; в тестах, основанных на амплификации, количество копий последовательности целевого гена амплифицируется (многократно копируется) для обнаружения; иммунологические тесты основаны на связывании антител с генами-мишенями или их продуктами, что позволяет визуально оценить наличие этих комплексов. Иллюстрированные объяснения того, как работают различные молекулярно-диагностические тесты, приведены в Приложении 2. Новые механизмы, возникающие в результате незначительных изменений в известных генах устойчивости, могут быть обнаружены с помощью разработанных молекулярных методов диагностики АМР, но существует ограничение, которое связано с особенностями молекулярных технологий — абсолютно новые не описанные механизмы резистентности детектировать невозможно, поскольку их дизайн основан на определении ранее известных последовательностей ДНК.

Молекулярные методы для диагностики АМР

Молекулярные методы диагностики АМР имеют различную сложность и требуют разного лабораторного оснащения и подготовки персонала. В зависимости от механизма обнаружения доступны четыре категории тестов:

- тесты на основе амплификации, такие как ПЦР и LAMP;
- тесты на основе гибридизации, такие как FISH и LPA;
- иммунологические тесты для детекции генов, ответственных за АМР, основанные на связывании со специфическими антителами, такие как LFIA и NLFA;
- тесты на основе секвенирования, такие как ПГС и Nanopore.

4. Обзор диагностических тестов для выявления АМР

Чтобы определить какие из молекулярных тестов могут подходить в качестве дополнения к фенотипическим методам контроля над АМР приоритетных патогенов в рамках программы GLASS, мы провели в PubMed и системе Google поиск компаний, занимающихся коммерческой продажей диагностических тестов для выявления АМР. Условия поисковых запросов, период поиска и полный обзор всех доступных валидированных тестов (по состоянию на январь 2017 г.) см. в Приложении 1.

Мы нашли 62 молекулярно-диагностических теста для определения АМР с детекцией маркеров устойчивости (генов или мутаций), которые имеют отношение к одному или нескольким приоритетным патогенам в рамках программы GLASS (некоторые тесты объединены в более объемные панели тестирования). Из них 33 теста предназначены для выявления устойчивых к карбапенемам и цефалоспорином широкого спектра действия представителей Enterobacteriaceae (включая *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp. и *Shigella* spp.). Некоторые из этих тестов также подходят для обнаружения генов, кодирующих устойчивость к карбапенемам и устойчивость к β-лактамам у *A. baumannii* и других грамотрицательных бактерий.

Всего 29 тестов могут быть использованы для определения метициллин-резистентного *S. aureus*. Мы не обнаружили валидированных тестов для молекулярной диагностики устойчивости к цефалоспорином у *S. pneumoniae* или *N. gonorrhoeae* (Таблица 2).

Таблица 2. Количество валидированных молекулярных тестов для диагностики АМР в зависимости от комбинации патоген-антибиотик, сложности и стоимости теста по состоянию на январь 2018 г. (расходы на внедрение и сам тест приведены раздельно)

Патоген ^Δ	Класс антимикробных препаратов [†]	Всего [‡]	Число молекулярных тестов в Категории сложности
Enterobacteriaceae* (<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.), <i>Acinetobacter</i> spp.	Карбапенемы Пенициллины Цефалоспорины расширенного спектра	33	1: 8 2: 8 3: 17
<i>Staphylococcus aureus</i>	Бета-лактамы устойчивые к пенициллиназам	29	1: 6 2: 10 3: 13
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Пенициллин Сульфаниламиды и триметоприм Цефалоспорины расширенного спектра	0	1: 0 2: 0 3: 0

Патоген ^Δ	Класс антимикробных препаратов [†]	Всего [‡]	Число молекулярных тестов в Категории сложности
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Цефалоспорины расширенного спектра Фторхинолоны Макролиды Аминогликозиды	0	1: 0 2: 0 3: 0

^Δ приведены только патогены, в отношении которых собираются данные в рамках программы GLASS.

* все обнаруженные молекулярно-диагностические методы имеют отношение к Enterobacteriaceae, а не к конкретным родам или видам.

[†] классы АМП, перечисленные в этой таблице, относятся только к тем, для которых доступны отдельные тесты; классы АМП в рамках программы GLASS, для которых в настоящее время не существует стандартизованных, валидированных молекулярных тестов, не включены в эту таблицу.

[‡] были включены только официально валидированные тесты, так как новые молекулярные методы диагностики находятся сейчас в разработке, общее количество тестов будет увеличиваться, и обновленная версия этого документа выйдет позже.

Таким образом, существуют молекулярные тесты для обнаружения представленных механизмов АМП у большинства приоритетных патогенов в рамках программы GLASS, таких как гены ESBL у *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. и *Salmonella* spp. Тем не менее, сравнение Таблиц 1 и 2 показывает, что доступные тесты не обнаруживают всех комбинаций патоген-антибиотик, представляющих интерес для программы GLASS.

Валидированные молекулярно-диагностические тесты для выявления АМП

- 62 валидированных молекулярных диагностических теста для исследования АМП, одобренных USFDA или отмеченных как соответствующие стандартам Европейского Союза и Европейской экономической зоны (ЕЭЗ), включены в это техническое уведомление.
- 29 тестов для определения MRSA.
- 33 теста для определения изолятов, продуцирующих карбапенемазы или БЛРС.
- В настоящее время нет валидированных молекулярных методов исследования АМП для *S. pneumoniae* или *N. gonorrhoeae*.

5. Сложность и стоимость молекулярных методов диагностики АМР

Чтобы помочь руководящим лицам в выборе диагностических методов, подходящих именно для их условий, тесты были разделены на категории в соответствии с их сложностью с точки зрения технологии и необходимых технических знаний, например, в отношении дозирования и нанесения материала, работы с реагентами и предотвращения контаминации. Тесты, характеризующиеся быстротой получения результата, больше подходят для использования в клинических условиях, но они не обладают высокой пропускной способностью. В лабораториях, работающих в системе эпиднадзора, могут быть более полезными высокопроизводительные тесты с возможностью проведения секвенирования генов резистентности. Существует три категории сложности теста:

- Низкая. Данная категория включает в себя устройства «всё в одном», которые выполняют все процессы, от выделения ДНК из образца до автоматического отображения результатов и их документирования. Системы поддерживаются в соответствующем состоянии во избежание контаминации образцов или окружающей среды. Обычно они небольшого размера (ручные или портативные) и работают с картриджами, которые содержат все реагенты, необходимые для молекулярного анализа, поэтому пользователям нужно только загрузить образцы в картридж и поместить картридж в устройство. Они не включают анализы, для которых образец смывается с тампона, а затем переносится в картридж. Результаты тестов легко интерпретировать, они требуют минимального обучения, в связи с чем такие устройства подходят для условий, когда нет предварительного опыта работы персонала в молекулярных лабораториях. Некоторые устройства работают от аккумуляторных батарей, поэтому перебои в подаче электроэнергии не приводят к моментальной остановке их работы. Недостатком является то, что тестовые картриджи обычно дороги, что делает их недоступными для некоторых СНСД.
- Средняя. Тесты в этой категории включают более одного устройства или этапа работы с образцом без применения картриджа; однако обработка образцов и ДНК автоматизирована и происходит в закрытой системе. Для работы с образцами и/или интерпретации результатов может потребоваться определенный объем обучения. Устройства могут не быть портативными и требовать бесперебойного энергоснабжения.
- Высокая. Такие тесты требуют серьезной подготовки и полностью оснащенной молекулярной лаборатории. Один или несколько этапов обработки выполняются вручную вне закрытой системы. Могут

потребуется дополнительные реагенты и устройства, не входящие в комплект для анализа, предоставленный производителем. Например, может потребоваться отдельный этап амплификации ПЦР перед загрузкой образца на микрочип.

Тесты можно разделить не только по категории сложности, но и по стоимости. Затраты на установку включают стоимость диагностических устройств, специфичных для теста, при необходимости дополнительных устройств и лабораторного оборудования для проведения теста. В стоимость одного теста дополнительно включена стоимость одноразовых тестов.

Многие СНСД не имеют лабораторной инфраструктуры, необходимой для проведения любого из этих тестов. Поэтому для молекулярного тестирования изоляты или образцы могут быть отправлены в аккредитованные референтные лаборатории, которые проводят тесты на основе молекулярно-диагностических технологий для выявления АМР. Следовательно, стоимость молекулярной диагностики АМР будет такой же, как в этих лабораториях, плюс транспортные расходы, которые могут быть высокими, особенно если требуется соблюдение холодной цепи (например, транспортировка с сухим льдом). Однако ожидается, что лаборатории, которые уже имеют такое оборудование будут требовать меньшие начальные инвестиции в оборудование и обучение.

Стоимость молекулярно-диагностических тестов зависит от их сложности, необходимого оборудования и страны или региона, поскольку лабораторные оборудование и реагенты, как правило, распространяются специализированными поставщиками, устанавливающими цены независимо от рекомендованных производителем. Это приводит к парадоксальной ситуации, когда в странах с низкими доходами могут быть более высокие цены за одну и ту же единицу оборудования и теста, чем в странах с более высокими доходами. Таким образом, текущая стратегия ценообразования, зависящая от поставщика, является серьезным препятствием для широкомасштабного молекулярного эпиднадзора за АМР.

Некоторые производители поставляют устройства бесплатно и возмещают их стоимость продажей наборов для анализов и обязательной платой за обслуживание. В некоторых СНСД поставщики используют эту стратегию для продажи оборудования по доступным ценам; однако эта модель доступна не для всех стран. Более дорогие устройства, позволяющие производить пакетную обработку образцов, могут стать более рентабельными по мере увеличения количества обработанных образцов и расширения спектра анализов. Однако для лаборатории с небольшим объемом проб, подлежащих скринингу, обслуживание устройств с высокой пропускной способностью, например, для ПГС, может быть менее рентабельным, чем отправка проб внешнему источнику для коммерческого секвенирования.

Сложность и стоимость молекулярных методов диагностики АМР

- Молекулярные методы диагностики АМР классифицируются как имеющие низкий, средний или высокий уровень сложности.
- Тесты низкой сложности не требуют предварительного опыта работы в лаборатории молекулярной диагностики.
- Методики ПЦР с использованием картриджей, LAMP и иммунохроматографического анализа в настоящее время доступны в качестве молекулярных диагностических тестов низкой и средней сложности.
- Затраты на установку оборудования для молекулярной диагностики высоки с точки зрения необходимой инфраструктуры и обучения персонала.

* Эти категории не эквивалентны стандартным категориям в составе поправок к закону США по совершенствованию клинических лабораторий (CLIA) «простой» или «отклоненный», «умеренная сложность» или «высокая сложность», которые устанавливают нормативные стандарты для клинических лабораторных исследований, чтобы гарантировать точность и достоверность результатов тестирования. В настоящее время не существует категорий «простой» или «отклоненный» для молекулярных тестов в отношении CLIA для диагностики АМР. (См. в Приложении 3 веб-ссылки на рекомендации USFDA CLIA по диагностическим устройствам.)

6. Применимость и гибкость молекулярных методов диагностики АМР

Другими важными параметрами при мониторинге АМР с использованием молекулярных методов являются рациональность и гибкость метода. «Гибкость» диагностического метода относится к возможности анализа образцов из различных биологических субстратов, в то время как его «применимость» указывает на то, что он может быть легко адаптирован к вновь выпускаемым тестам, для экономической целесообразности. Основным препятствием на пути к применимости являются бюджетные ограничения. Бюджет в условиях ограниченных ресурсов позволяет применять молекулярно-диагностические тесты для выявления АМР, но их постоянное использование требует непрерывной поддержки, что трудно обеспечить.

Большинство тестов в данном техническом уведомлении основаны на технологии амплификации. Поскольку даже небольшие объемы генетического материала могут быть амплифицированы с помощью этих методов, они являются наиболее гибкими с точки зрения типов образцов (мазки, биологические жидкости, культура клеток и т.д.), которые могут быть подвергнуты анализу. Гибкость методов LAMP и ПЦР аналогична, но мультиплексные методики сложнее в сравнении с LAMP; то есть сложнее разработать тест, который может выявлять сразу несколько генов. Методы на основе LAMP более устойчивы к воздействию ингибиторов, которые могут присутствовать в сложных образцах (например, гемоглобин или лактоферрин в образцах крови), амплификация происходит при постоянной температуре, в связи с чем нет необходимости в дорогостоящих приборах.

Методы, основанные на диагностике с использованием микрочипов, позволяют тестировать несколько генетических маркеров одновременно, однако полный набор маркеров, представленный на чипе не всегда необходим. LPA и LFIA проверяют только один или несколько генов или генных продуктов, связанных с устойчивостью, что может ограничивать их пригодность, если нужный ген или белок отсутствуют в образце. Однако, в частности для LFIA, новые тестовые наборы для анализа относительно дешевы. Принцип использования FISH для обнаружения маркеров резистентности к метициллину у *S. aureus*, трудно применить для выявления других маркеров резистентности, для которых связь между фенотипической устойчивостью и генотипом менее ясна.

Автоматизированные системы амплификации с использованием картриджей просты в эксплуатации, но обычно требуют тестовых картриджей этого же производителя, что может снижать количество исследуемых молекулярных тестов для выявления АМР. Следовательно, может существовать компромисс между сложностью теста и его гибкостью.

В настоящее время только один тест на основе секвенирования (ПГС) для идентификации БЛРС-продуцирующих энтеробактерий получил одобрение регулирующих органов [9]. Однако, принимая во внимание схожие ценовые возможности ПГС для обнаружения практически всех известных генов устойчивости в изоляте с мультиплексной ПЦР, перспектива расширения точек приложения секвенирования очевидна. Недавно проведенное эпидемиологическое исследование в отношении инвазивных штаммов *S. aureus* [10] показывает, как результаты ПГС могут быть интегрированы с эпидемиологическими, географическими и фенотипическими данными о резистентности для выявления клонов высокого риска, прогнозирования профилей устойчивости и отслеживания случаев трансмиссии. В Таблице 3 перечислены методы молекулярной диагностики, применимые к каждому типу лабораторий.

Во многих СНСД отсутствие знаний в области биоинформатики на локальном уровне может быть дополнительным ограничивающим фактором для применения молекулярных методов эпиднадзора за АМР. Микробиологи, отвечающие за вопросы АМР, могут не иметь соответствующей подготовки в области биоинформатики, а специалисты по биоинформатике могут не обладать знаниями в области АМР и микробиологии в целом. Обучение и сохранение квалифицированного персонала является важным фактором для работы лаборатории, а также основой для применимости и надежности внедренной технологии.

Применимость и гибкость молекулярных методов диагностики АМР

- В идеале молекулярные методы диагностики АМР являются гибкими и адаптируемыми для различных типов образцов и новых тестов, выявляющих маркеры АМР.
- Методы на основе ПЦР являются наиболее гибкими для использования различных типов образцов и наиболее адаптируемой технологией, за которыми следуют методики на основе LAMP.
- Возможен компромисс между сложностью теста и его гибкостью.
- Для молекулярного тестирования с целью выявления АМР в условиях ограниченных ресурсов необходимы устойчивые модели финансирования.

Таблица 3. Методы молекулярной диагностики, применимые к каждому типу лабораторий

Молекулярный метод	Сложность/ Стоимость	Преимущества	Недостатки
На основе ПЦР	Сложность: 1–3	<ul style="list-style-type: none"> • Полностью автоматизированные интегрированные устройства работают с одноразовыми тестовыми картриджами для амплификации; могут использоваться в лабораториях 1 типа. • Реагенты для картриджной лиофилизированы и могут храниться при комнатной температуре. • Некоторые устройства поставляются с перезаряжаемыми батареями (преимущество при отключении электроэнергии). • Мультиплексная ПЦР может использоваться для одновременного обнаружения нескольких маркеров устойчивости (н.п., гены карбапенемаз и БЛРС могут быть обнаружены одновременно, что облегчает идентификацию патогенов с МЛУ). • Быстрота выполнения тестов (от одного до нескольких часов). • Очень надежная, известная и проверенная технология (изобретена в 1983 году, стандартное оборудование в лабораториях молекулярной биологии). 	<ul style="list-style-type: none"> • Отдельные тесты, требующие лабораторного оборудования и реагентов, не представляемых поставщиком тестов, могут подходить только для лабораторий 3 типа (например, перед амплификацией может потребоваться выделение ДНК вручную с помощью отдельного набора). • Высокая стоимость картриджей. • Устройства, отличные от уровня сложности 1 (автоматические устройства с использованием картриджей), требуют обучения методам молекулярной диагностики. • Расходные материалы для устройств, отличных от уровня сложности 1, могут включать сухой лед (н.п., для остановки разрушения ферментов, необходимых для реакции). • Устройства, отличные от уровня сложности 1, могут быть чувствительны к температуре окружающей среды и требовать постоянного источника энергии для сохранения точности и работоспособности.
Полногеномное секвенирование	Сложность: 3	<ul style="list-style-type: none"> • Предоставляет обширную информацию. • Может обнаруживать сразу несколько маркеров устойчивости, включая те, которые обычно не присутствуют в панели. • Если необходимо протестировать несколько генов, связанных с устойчивостью, это может быть столь же рентабельно, как и мультиплексная ПЦР. • Поскольку это новая технология, спонсоры, руководящие органы и сами пользователи стремятся ее приобрести. 	<ul style="list-style-type: none"> • Требуются специальные приборы для секвенирования и обучение в области биоинформатики. • Объем информации может быть огромным, и ее трудно обработать. • Все доступные анализы ПГС включают ряд операций в ручном режиме и использование нескольких устройств. • Секвентаторы должны регулярно обслуживаться обученным персоналом (часто требуется сервисный персонал производителя или поставщика оборудования).

Молекулярный метод	Сложность/Стоимость	Преимущества	Недостатки
На основе LAMP	Сложность: 1	<ul style="list-style-type: none"> • Полностью автоматизированные интегрированные устройства, работающие с одноразовыми тестовыми картриджами, могут использоваться в лабораториях 1 типа. • Часто быстрее и надежнее, чем ПЦР. • Продукты реакции (ампликоны) можно определить визуально по повышенной мутности в реакционной емкости. • Может быть в 10–100 раз более чувствительным, чем ПЦР (11). • Не требует дорогостоящих термоблокеров или систем электрофореза. 	<ul style="list-style-type: none"> • Интерпретация результатов требует обучения. • Поддержка сервиса биоинформатической поддержки может отсутствовать во многих странах. • Высокоскоростной доступ к Интернету требуется для анализа больших объемов данных, на вычислительных кластерах. • Стоимость хранения данных может быть высокой. • Контроль качества является сложной задачей. • Нет произвольного доступа к данным. • Обычно требуется объединение образцов.
Микрочипы	Сложность: 3	<ul style="list-style-type: none"> • Многие маркеры резистентности и виды микроорганизмов могут быть обнаружены одновременно (н.п., набор может содержать маркеры для всех основных патогенов, вызывающих сепсис, а также маркеры устойчивости). 	<ul style="list-style-type: none"> • Менее универсален, чем ПЦР (большое количество включенных праймеров может ограничить выбор сайта-мишени). • Мультиплексирование (выявление нескольких генов в одной пробе) является сложным процессом. • Объемы реакции могут быть больше, чем при ПЦР, и может потребоваться больше расходных материалов.
			<ul style="list-style-type: none"> • Для создания меченого зонда требуется стадия ПЦР (см. потенциальные недостатки выше). • Могут потребоваться другие устройства для считывания и интерпретации сигнала (н.п., лазер и оптический детектор). • Может потребоваться статистическая коррекция при множественном тестировании (если исследуются сразу несколько генов). • Стоимость зависит от количества маркеров.

Молекулярный метод	Сложность/Стоимость	Преимущества	Недостатки
Гибридизация с зондами на стрипах	Сложность: 3	<ul style="list-style-type: none"> • Может обнаруживать сразу несколько маркеров устойчивости (например, пенициллиназы и метало-β-лактамазы). • Сам по себе тест быстр и относительно прост в использовании (несколько часов до получения результата). 	<ul style="list-style-type: none"> • Требуется оборудование и реагенты для предварительной обработки образцов (ПЦР, см. потенциальные недостатки выше) и обучение для предотвращения контаминации (ручные лабораторные процедуры в открытой среде).
Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>	Сложность: 3	<ul style="list-style-type: none"> • Для прямой детекции маркеров резистентности в бактериальных клетках. 	<ul style="list-style-type: none"> • Требуется флуоресцентный лазерный микроскоп или, в качестве недорогой альтернативы, ртутные лампы или светодиоды. • Для ухода за линзами микроскопа требуется очищенная вода. • Для флуоресцентного лазерного микроскопа требуется регулярное обслуживание обученным персоналом.
Иммунохроматографический анализ	Сложность: 1	<ul style="list-style-type: none"> • Быстро и легко использовать. • Не дорогой (< 20 долларов США). • Может обнаруживать сразу несколько маркеров устойчивости (н.п., несколько генов β-лактамаз). • Не требует электрипитания. 	<ul style="list-style-type: none"> • Детекция резистентности только из бактериальной культуры. • Требуется этап культивирования. • Имеющиеся в продаже тесты обнаруживают генные продукты (белки), а не последовательности ДНК.
ДНК-иммунохроматографический тест	Сложность: 3	<ul style="list-style-type: none"> • Может обнаруживать сразу несколько маркеров резистентности. • Сам тест быстр и относительно прост в использовании. 	<ul style="list-style-type: none"> • Требуется оборудование и реагенты для предварительной обработки образцов (ПЦР, см. потенциальные недостатки выше) и обучение для предотвращения контаминации.

Сложность теста варьирует от 1 до 3, где 1 — наиболее простой и 3 — наиболее сложный тест. См. текст для детальной информации в отношении схемы классификации и самих тестов.

7. Какую технологию выбрать для какого типа лаборатории?

Сложность молекулярных методов исследования и требуемый лабораторный опыт можно оценивать параллельно.

Как правило, тесты низкой сложности могут использоваться во всех типах лабораторий, тогда как тесты средней сложности могут быть более подходящими для лабораторий с некоторым опытом в области использования молекулярных методик, а тесты высокой сложности требуют опыта и оборудования полностью организованной НРЛ. НРЛ должны определять комбинации патогенов и профили АМР, которые необходимо предоставить для подтверждения и дальнейшего тестирования.

Согласно шкале оценок, LFIA и полностью автоматизированные, интегрированные методики на основе ПЦР или LAMP являются наиболее подходящими для лабораторий, не имеющих предшествующего опыта надзора за АМР с использованием молекулярных методов; однако тесты с использованием картриджной дорожки, что может стать затруднением при ограниченном бюджете. Некоторые тесты высокой сложности, такие как LPA, могут использоваться во вновь созданных НРЛ. В целом гибкость технологий на основе ПЦР позволяет разрабатывать методы, подходящие для всех типов лабораторий, а также, «прикроватных» экспресс-тестов (далее экспресс-тесты, ЭТ).

Более сложные методики, как правило, дороже с точки зрения затрат как на подготовку, так и исследование одного образца. Они также требуют постоянного электроснабжения и дополнительной инфраструктуры, например, для обеспечения охлаждения или очищенной воды. LFIA и портативные технологии на основе ПЦР для широкого использования являются наименее дорогостоящими вариантами; однако затраты зависят от количества тестов, проводимых за определенное время, и от региональных стратегий ценообразования поставщиков. Эти факторы следует учитывать при выборе метода молекулярной диагностики АМР или диагностического оборудования для конкретных условий.

В национальных наблюдательных эпидемиологических программах молекулярно-диагностические тесты для выявления АМР используются для ответа на вопросы эпидемиологического надзора. Возможны ситуации, когда необходимо решить практические вопросы, связанные с появлением необычного изолята, устойчивого по результатам фенотипического тестирования, но молекулярная идентификация механизма устойчивости недоступна. Это возможно только при использовании сложных или дорогих тест-систем. В таком случае образцы могут быть отправлены в референтную лабораторию с более мощными возможностями для проведения полноценных молекулярных исследований, включая ПГС.

Методы молекулярной диагностики для каждого типа лабораторий

- Автоматизированные интегрированные методы на основе ПЦР и LAMP, а также LFIA могут использоваться во всех типах лабораторий, начиная от тех, у которых нет предшествующего опыта эпиднадзора за АМП (хотя они должны иметь возможность культивировать бактерии из образцов), до полностью организованных референтных лабораторий.
- Возможность использования теста также зависит от ресурсов и доступности теста в стране.
- Самые сложные тесты должны использоваться только референтными лабораториями, имеющими опыт применения молекулярных методов.
- Затраты зависят от масштаба (количества тестов, выполняемых за определенное время) и стратегии ценообразования регионального поставщика.

8. Ограничения и сложности молекулярных методов диагностики АМП

Молекулярные методы обнаружения маркеров АМП используются в ряде программ эпидемиологического мониторинга во всем мире с целью получения дополнительных данных значимых результатов фенотипических исследований АМП.

Тем не менее, коммерчески доступные молекулярные тесты используются не так широко даже в странах с высоким уровнем доходов, отчасти из-за более высокой стоимости в сравнении с фенотипическими методами. Недавний анализ [12] показал несоответствия между аналитическими характеристиками многих средств диагностики АМП и доказательствами их доступности и рентабельности, их наиболее подходящего использования в клинической практике и того, как они вписываются в рабочие процессы лаборатории (время, практические требования, оборудование, инфраструктура и удобство использования).

Имеющиеся в настоящее время коммерческие молекулярно-диагностические тесты не всегда применимы и необходимы в рамках клинического стационара, они различаются по своей способности обнаруживать механизмы устойчивости (с точки зрения числа механизмов и чувствительности). По данным трех проведенных в Великобритании оценок диагностических тестов по обнаружению генов карбапенемаз [13–15] не представлялось возможным дать положительную оценку их работе из-за отсутствия доказательств их клинической (но не аналитической) пригодности.

Помимо затрат, навыков, инфраструктуры и технических требований, корреляция между результатами молекулярных и фенотипических тестов и/или клинической интерпретацией имеет значительные ограничения. Не все изоляты с положительным результатом обнаружения гена резистентности будут клинически устойчивыми к соответствующим АМП (н.п., карбапенемазы и БЛРС). В связи с этим, следует параллельно использовать фенотипический метод для проверки результата молекулярного тестирования. Напротив, интерпретация отрицательного результата молекулярного теста основана (принимает во внимание) на анализе вида микроорганизма и тестируемого антибиотика. Молекулярные тесты обнаруживают только известные гены устойчивости или мутации, а новые генетические механизмы не могут быть обнаружены, если у них нет высокой степени сходства с описанным геном.

Гены резистентности, накопленные данные о которых недостаточно доказательны, могут не быть включены в базы данных. Следовательно, изоляты с отсутствующим геном устойчивости не следует указывать как фенотипически чувствительные. Молекулярная диагностика позволяет обнаружить только те маркеры резистентности, которые входят в тестовую панель (они не могут определить наличие или отсутствие механизмов

резистентности, которые не включены в набор). Низкая чувствительность и специфичность молекулярного теста может быть связана с неполным пониманием механизма резистентности к отдельным препаратам у некоторых видов бактерий.

Контроль качества молекулярных анализов представляет собой еще одну проблему для многих лабораторий. Позиция Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) заключается в том, что имеющиеся данные не поддерживают использование ПГС в принятии клинических решений в отношении большинства приоритетных патогенов ВОЗ [16].

ПГС по-прежнему может быть полезным в целях надзора за АМР с приоритетом демонстрации генетического родства бактериальных изолятов, а также иметь возможность отслеживать цепи передачи клонов и события, которые приводят к возникновению АМР.

Для оценки методов молекулярной диагностики АМР выбранных патогенов с помощью стандартизованных тестов подтвержденного качества для эпидемиологических целей могут потребоваться модельные эксперименты. Это снизит (но не устранил) искажающие эффекты различных характеристик анализа при сравнении результатов внешней оценки качества и контроля качества центров-участников.

Ограничения и сложности молекулярных методов диагностики АМР

- Молекулярные тесты могут обнаруживать только известные гены устойчивости или мутации.
- Недостаточно доказательств экономической эффективности использования молекулярных тестов для обнаружения АМР в клинической практике и рутинной работе лабораторий. Этот тип тестирования (за некоторыми исключениями, например, в отношении туберкулеза) будет использоваться в основном для наблюдательных программ за общественным здоровьем, но не для клинического ведения.
- Тесты различаются по своей способности обнаруживать механизмы устойчивости.
- Молекулярные тесты требуют дополнительных затрат.
- В СНСД для применения молекулярных методов определения АМР требуются устойчивые модели финансирования.
- Корреляция результатов молекулярных исследований с результатами фенотипических тестов и их клиническая интерпретация не является совершенной и зависит от вида бактерий и класса АМП.
- Недостаточное понимание механизмов резистентности может привести к низкой чувствительности теста.
- Должны совершенствоваться знания по молекулярным механизмам АМР.
- Для оценки методов молекулярной диагностики АМР для эпидемиологических целей могут потребоваться модельные эксперименты.

9. Обмен данными и анализ

Основным видом деятельности национальной системы мониторинга за АМР является сбор данных из разных центров-участников в централизованную систему с их последующим анализом для получения суммарного отчета. Важным критерием оценки является сформированный тип резистентности, а также время и место обнаружения. Обработанная информация может быть отправлена обратно в центры с целью инициации или поддержки вмешательства. Несколько национальных и региональных сетей мониторинга за АМР уже используют онлайн-платформы для обмена и управления данными, полученными при определении чувствительности. Для надзора за АМР с помощью молекулярных методов эти платформы могут быть дополнены информацией о генах устойчивости и/или данными по ПГС. ВОЗ предлагает WHONET, программное обеспечение для обработки и анализа данных по определению чувствительности, которое используется в странах всех шести регионов ВОЗ. WHONET поддерживает экспорт отчетов в формат данных GLASS и может быть адаптирован для включения результатов молекулярных тестов. Национальные платформы управления данными GLASS охватывают все регионы.

Примеры национальных и региональных баз данных эпидемиологического мониторинга: TESSy (The European Surveillance System, Европейская система эпиднадзора), которая является базой данных по чувствительности Европейского центра профилактики и контроля заболеваний; Svebar, автоматизированная система сбора данных по культурам микроорганизмов и определения чувствительности Управления общественного здравоохранения Швеции; и JANIS — система надзора за внутрибольничными инфекциями Японии (Japan Nosocomial Infection Surveillance) — автоматизированная программа для сбора, анализа и публикации отчетов по чувствительности микроорганизмов в клиниках; [17]. В настоящее время ни одна из перечисленных платформ не собирает результаты молекулярных методов определения АМР. Другой пример — база данных ResFinder в Центре геномной эпидемиологии Датского технического университета (Centre of Genomic Epidemiology at Denmark Technical University) [18] (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

В идеале базы данных эпиднадзора за АМР, дополненные результатами молекулярного тестирования, должны сочетать в себе характеристики отчетов эпиднадзора и референтных баз данных по генетическим исследованиям и способствовать единой интерпретации как фенотипических, так и молекулярных анализов.

Обмен данными и анализ

- Для эффективного эпиднадзора за АМР требуются онлайн-инструменты для сбора, обмена и анализа данных из различных центров-участников.
- ВОЗ предлагает использование WHONET в качестве программного продукта для управления и анализа данных по определению чувствительности.
- Системы баз данных, основанные на определении чувствительности фенотипическими методами, могут быть дополнены результатами молекулярного тестирования.

10. Выводы и перспективы

Молекулярные диагностические тесты могут предоставить ценную информацию в дополнение к фенотипическим методам отслеживания АМР. Молекулярная диагностика, подходящая для всех трех категорий лабораторий, доступна для большинства приоритетных патогенов в рамках программы GLASS. Например, тесты на основе ПЦР или LAMP могут быть использованы для обнаружения генов *tesA/C*, которые идентифицируют MRSA.

Доступны для использования не сложные (портативные или настольные устройства с использованием картриджей) и не дорогие молекулярные тесты, которые также подходят для СНСД. Для молекулярного эпиднадзора в отношении микроорганизмов, продуцирующих БЛРС и/или карбапенемазы, иммуноферментные методики являются наиболее экономичным подходом. Кроме того, диагностические тесты для БЛРС и выявления карбапенемаз на основе ПЦР и LAMP подходят для широкого использования, в том числе в СНСД.

Стоимость молекулярных методов диагностики существенно снизилась за последние годы и, тенденция к дальнейшему снижению очевидна. Следовательно, можно ожидать, что молекулярные методы исследований вскоре станут более доступными для широкого круга лабораторий. EUCAST указал, что данные по ПГС могут внести значительный вклад в наблюдение за устойчивостью в ближайшем будущем. Европейский центр профилактики и контроля заболеваний также указал, что методы выявления на основе ПГС представляют собой будущее эпиднадзора за АМР (19).

Реализация проектов молекулярного эпидемиологического надзора включает множество аспектов, которые необходимо разработать, включая использование данных по ПГС и общих баз данных, а также применение различных аналитических инструментов.

GLASS имеет все возможности для разработки и получения дополнительных доказательств потенциальной роли ПГС и других молекулярных методов в эпидемиологическом надзоре за АМР.

11. Литература

1. World Health Assembly, <<Resolution WHA68.7 Antimicrobial Resistance,>> 2015.
2. Global antimicrobial resistance surveillance system: manual for early implementation. Geneva: World Health Organization; 2015.
3. Whitley DM, Trembizki E, Buckley C, Freeman K, Baird RW, Beaman M, et al. Molecular antimicrobial resistance surveillance for *Neisseria gonorrhoeae*, Northern Territory, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2017;23:1478–85.
4. Bissonnette L, Bergeron MG. Portable devices and mobile instruments for infectious diseases point-of-care testing. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17:471–94.
5. Burnham CAD, Leeds J, Nordmann P, O’Grady J, Patel J. Diagnosing antimicrobial resistance. *Nature Rev Microbiol*. 2017;15:697.
6. Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, Hanson KE, May L, Quinn TC, et al. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2013;57(Suppl 3):S139–70.
7. Ubukata K, Nonoguchi R, Matsuhashi M, Konno M. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol*. 1989;171:2882–5.
8. Laurent F, Chardon H, Haenni M, Bes M, Reverdy ME, Madec JY, et al. MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1465–7.
9. Veenemans J, Overvest IT, Snelders E, Willemsen I, Hendriks Y, Adesokan A, et al. Next-generation sequencing for typing and detection of resistance genes: performance of a new commercial method during an outbreak of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2454–60.
10. Aanensen DM, Feil EJ, Holden MT, Dordel J, Yeats CA, Fedosejev A, et al. Whole-genome sequencing for routine pathogen surveillance in public health: a population snapshot of invasive *Staphylococcus aureus* in Europe. *MBio*. 2016;7(5):e00444–16.
11. Sahoo PR, Sethy K, Mohapatra S, Panda D. Loop mediated isothermal amplification: an innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet World*. 2016;9:465–9.
12. Plüddemann A, Onakpoya I, Harrison S, Shinkins B, Tompson A, Davis R, et al. Position paper on anti-microbial resistance diagnostics. Oxford: Centre for Evidence-based Medicine; 2015.
13. Xpert Carba-R to identify people carrying carbapenemase-producing organisms. London: National Institute for Health and Care Excellence; 2016 (<https://www.nice.org.uk/advice/mib52>, accessed 3 January 2019).
14. Eazyplex SuperBug kits for detecting carbapenemase-producing organisms. London: National Institute for Health and Care Excellence; 2017 (<https://www.nice.org.uk/advice/mib94>, accessed 3 January 2019).
15. Evidence note 62. Edinburgh: Healthcare Improvement Scotland; 2016 (http://www.healthcareimprovementscotland.org/our_work/technologies_and_medicines/shtg_-_evidence_notes/evidence_note_62.aspx, accessed 3 January 2019).

16. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria. Report from the EUCAST European Subcommittee. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(1):2–22
17. Vong S, Anciaux A, Hulth A, Stelling J, Thamlikitkul V, Gupta S, et al. Using information technology to improve surveillance of antimicrobial resistance in South East Asia. *BMJ* 2017;358:j3781.
18. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2640–4.
19. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrade AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17:153–63.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ И ОНЛАЙН-ПОИСК ВАЛИДИРОВАННЫХ, КОММЕРЧЕСКИ ДОСТУПНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АМР

Стратегия поиска

Проведен поиск в PubMed соответствующих публикаций по молекулярной диагностике АМР для приоритетных патогенов в рамках программы GLASS, используя поисковые запросы: (((((((((antimicrobial resistance) OR (antibiotic resistance)) AND ((molecular diagnostic OR test) OR (point-of-care test))) AND (bacterial infection)))) AND ("2000"[Date — Publication]: "3000"[Date — Publication]))) AND humans) AND Name of GLASS priority pathogen.

Поскольку этот поиск предоставлял в основном публикации о тестах, которые не были ни стандартизованы, ни валидированы (в большинстве исследований использовались собственные лабораторные тесты), также проведен поиск в Google в отношении компаний, предлагающих молекулярные диагностические тесты для выявления АМР. Ключевые слова поиска: «molecular antimicrobial resistance diagnostic test»; «molecular AMR diagnostic test»; «molecular antibiotic resistance diagnostic test»; и «point-of-care diagnostic test for antimicrobial resistance» и различные варианты этих терминов в сочетании с видами микроорганизмов, являющихся приоритетными в рамках программы GLASS.

В таблице А1.1 показаны результаты поиска валидированных, стандартизированных, с подтвержденным качеством коммерчески доступных молекулярных диагностических тестов для детекции АМР у приоритетных патогенов в рамках GLASS. Следует отметить, что ВОЗ не проводила валидацию и не одобряет использование каких-либо тестов, перечисленных в этой таблице 1. В первом столбце перечислены приоритетные патогены GLASS. Сложность указана, как это обозначено в тексте: 1 – низкая; 2 – умеренная и 3 – высокая. Тесты, подходящие для использования в СНСД, указаны в столбце «Детальная информация». Пригодность тестов для СНСД зависит от сложности теста и информации на веб-сайте производителя о параметрах его предполагаемого использования в отношении, например, портативности и электропитания. Эти тесты представляют собой перечень тех, которые были доступны на момент написания – январь 2018 года. Поскольку область молекулярной диагностики быстро развивается, в ближайшее время могут появиться новые тесты.

Таблица А1.1. Валидированные, стандартизованные, коммерчески доступные молекулярные диагностические тесты подтвержденного качества для детекции АМР у приоритетных патогенов в рамках проекта GLASS

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
<p>Патоген: <i>Acinetobacter baumannii</i>, Enterobacteriaceae (<i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Shigella</i>, <i>Salmonella</i>)</p> <p>Лекарственная устойчивость: Карбапенемы / БЛРС-продукты / полимиксины</p> <p>Unuvero ITI Application Curetis N.V./Curetis GmbH, Хольцгерлинген, Германия</p>	<p>Сложность: 2</p> <p>Тест на основе гибридации (микрочип)</p> <p>Включает выделение ДНК, мультиплексную амплификацию ДНК</p> <p>Различные типы образцов</p> <p>Возможно > 100 проб</p> <p>Требует подготовки образца с высоким выходом ДНК</p> <p>ТТР 4–5 ч. (кроме этапа культивирования)</p> <p>Лаборатория или ЭТ</p>	<p>29 патогенов, 17 генов АМР (см. панель по веб-ссылке)</p> <p>Тест на основе гибридации (микрочип)</p> <p>Включает выделение ДНК, мультиплексную амплификацию ДНК</p> <p>Различные типы образцов</p> <p>Возможно > 100 проб</p> <p>Требует подготовки образца с высоким выходом ДНК</p> <p>ТТР 4–5 ч. (кроме этапа культивирования)</p> <p>Лаборатория или ЭТ</p>	<p>http://www.unuvero.com/en/</p>
<p>Unuvero Pneumonia Application Curetis N.V./Curetis GmbH, Хольцгерлинген, Германия</p>	<p>Сложность: 2</p> <p>Тест на основе гибридации (микрочип)</p> <p>Включает выделение ДНК, мультиплексную амплификацию ДНК, микрочипы</p> <p>Различные типы образцов</p> <p>Возможно > 100 проб</p> <p>Требует подготовки образца с высоким выходом ДНК</p> <p>ТТР 4–5 ч. (кроме этапа культивирования)</p> <p>Лаборатория или ЭТ</p>	<p>20 патогенов, 17 генов АМР (39 маркеров) (см. панель по веб-ссылке)</p> <p>Тест на основе гибридации (микрочип)</p> <p>Включает выделение ДНК, мультиплексную амплификацию ДНК, микрочипы</p> <p>Различные типы образцов</p> <p>Возможно > 100 проб</p> <p>Требует подготовки образца с высоким выходом ДНК</p> <p>ТТР 4–5 ч. (кроме этапа культивирования)</p> <p>Лаборатория или ЭТ</p>	<p>http://www.unuvero.com/en/</p> <p>[1]</p> <p>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2029021968</p>
<p>Unuvero VCU Application Curetis N.V./Curetis GmbH, Хольцгерлинген, Германия</p>	<p>Сложность: 2</p> <p>Тест на основе гибридации (микрочип)</p> <p>Включает выделение ДНК, мультиплексную амплификацию ДНК, микрочипы</p> <p>Различные типы образцов</p> <p>Возможно > 100 проб</p> <p>Требует подготовки образца с высоким выходом ДНК</p> <p>ТТР 4–5 ч. (кроме этапа культивирования)</p> <p>Лаборатория или ЭТ</p>	<p>34 патогена, 16 генов резистентности (см. панель по веб-ссылке)</p> <p>Тест на основе гибридации (микрочип)</p> <p>Включает выделение ДНК, мультиплексную амплификацию ДНК, микрочипы</p> <p>Различные типы образцов</p> <p>Возможно > 100 проб</p> <p>Требует подготовки образца с высоким выходом ДНК</p> <p>ТТР 4–5 ч. (кроме этапа культивирования)</p> <p>Лаборатория или ЭТ</p>	<p>http://www.unuvero.com/en/</p>

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
Unuvero IA1 Application Suretis N.V./Suretis GmbH, Хольцгерлинген, Германия	Сложность: 2	26 патогенов, 22 генов резистентности, 2 маркера токсинов Тест на основе гибридизации (микрочип) Включает выделение ДНК, мультиплексную амплификацию ДНК, микрочипы Различные типы образцов Требует подготовки образца с высоким выходом ДНК TTR 4–5 ч. (кроме этапа культивирования) Лаборатория или ЭТ	http://www.unuvero.com/en/
GeneXpert Carba-R Assay Seperheid Corp., поw a Danaher company, Саннивейл, Калифорния, США	Сложность: 2	Грамотрицательные микроорганизмы, включая <i>Acinetobacter</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> KPC, NDM, VIM, OXA-48, IMP Тест на основе амплификации Автоматизированные интегрированные подготовка, амплификация и детекция образцов Чувствительность: KPC: 100% OXA-48-подобные: 83% NDM: 100% VIM: 100% IMP: 71% Специфичность: 100% TTR 48 мин. (кроме этапа культивирования) Лаборатория или ЭТ	http://www.cepheid.com/us/ [2] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25630646 NICE MedTech Innovation Briefing MIB52 (https://www.nice.org.uk/advice/mib52)
TRAPIST V6 Coris BioConcept, Жамблу, Бельгия	Сложность: 3	Грамположительные и Грамотрицательные бактериальные возбудители сепсиса β-лактамазы: KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48-like, OXA-23, OXA-24, OXA-58, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 Тест на основе гибридизации Портативное устройство, проведение ПЦР-амплификации и гибридизации на том же микрочипе	www.corisbio.com [3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
ePlex System Blood Culture Gram-negative Identification Panel GenMark Diagnostics Inc., Карлсбад, Калифорния, США	Сложность: 1	TTR < 1 ч. (кроме этапа культивирования) Предназначен для использования в клинической лаборатории Подходит для применения в СНСД	
Nanosphere/Verigene Bloodstream infection test Luminex Corp., Остин, Техас, США	Сложность: 2	21 Грамотрицательный микроорганизм, включая <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6 генов резистентности (CTX-M, KPC, NDM, VIM, IMP, OXA) Тест на основе гибридизации ПЦР амплификация и гибридизация в одном картридже, электрохимическая технология (eSensor) Чувствительность: 97,5% Специфичность: 99,5% для 199 протестированных клинических образцов TTR 90 мин. (кроме этапа культивирования) Предназначен для использования в клинической лаборатории	www.genmarkdx.com [3, 4] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420 https://www.genomeweb.com/regulatory-news/fda-clearance-genmarks-plex-intensifies-competition-highly-plexed-mdx-test-market [5] https://genmarkdx.com/wp-content/uploads/2018/05/ECCMID-2018-BCID-GN-Poster_DRAFT_FINAL-Landscape.pdf https://www.luminexcorp.com [6, 7] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25994165 [8] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122857

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
		<p>NDM: Чувствительность: 100% (95% ДИ: 91,4–100%) Специфичность: 100% (95% ДИ: 99,7–100%) IMP: Чувствительность: 100% (95% ДИ: 92,6–100%) Специфичность: 100% (95% ДИ: 99,7–100%) VIM: Чувствительность: 100% (95% ДИ: 91,4–100%) Специфичность: 100% (95% ДИ: 99,7–100%)</p> <p>Положительная прогностическая согласованность с культуральным исследованием для <i>Acinetobacter</i> spp. — 98,4% TTR < 2 ч. (кроме этапа культивирования) Лаборатория или ЭТ</p>	
IRIDICA BAC BSI Ibis Biosciences, an Abbott Сомрану, Карлсбад, Калифорния	Сложность: 3	Панель из 780 бактериальных и грибковых патогенов Определяет резистентность, обусловленную КРС Тест на основе амплификации (ПЦР) Образцы крови Чувствительность: 88% Специфичность: 63% TTR 8 ч. Лаборатория	[9] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384540
eazuplex SuperBug complete A kit eazuplex SuperBug complete B complete B kit Amplex, Гиссен, Германия	Сложность: 3	Определение бактерий, продуцирующих карбапенемазы Тест на основе амплификации (LAMP) Портативный Чувствительность: 95,5% Специфичность: 100% TTR 20–30 мин. от мазка или культуры Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД	www.eazuplex.com NICE MedTech Innovation Briefing MIB94 https://www.nice.org.uk/advice/mib94 [2] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25630646

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
<p>eazurplex SureBug CRE Amplex, Гиссен, Германия</p>	<p>Сложность: 3</p>	<p>Определение представителей <i>Enterobacteriaceae</i>, продуцирующих карбапенемазы: KPC, NDM, OXA-48, OXA-181, VIM Гены БЛРС STX-M-1 и STX-M-9 групп Тест на основе амплификации (LAMR) Портативный Чувствительность: 100% Специфичность: 97,9% TTR 15 мин. от мазка или культуры Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД</p>	<p>www.eazurplex.com</p>
<p>Amplidiag CarbaR+VRE Mobidiag Ltd, Эспоо, Финляндия</p>	<p>Сложность: 3</p>	<p>Определение бактерий, продуцирующих карбапенемазы, и ванкомицин-резистентных энтерококков Группы карбапенемаз: KPC, NDM, VIM, OXA-48, OXA-181, IMP, ISAbal-OXA-51, OXA-23, OXA-40, OXA-58 Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ) Чувствительность: 100% Специфичность: 99% TTR 2 ч. (кроме этапа культивирования) Лаборатория, подходит для высокопоточного скрининга</p>	<p>mobidiag.com [3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420 [10] http://jcm.asm.org/content/56/3/e01092-17.abstract</p>
<p>Amplidiag CarbaR+MCR Mobidiag Ltd, Эспоо, Финляндия mobidiag.com/products/novodiag</p>	<p>Сложность: 3</p>	<p>Определение бактерий, продуцирующих карбапенемазы и колистин-резистентных представителей <i>Enterobacteriaceae</i> с отдельными генами <i>msr</i> Карбапенемазы: KPC, NDM, IMP, OXA-48, OXA-181, <i>Acinetobacter</i> OXA ISAbal-OXA-51, OXA-23, OXA-40, OXA-58) В дополнение: MCR (MCR-1, MCR-2), GES Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ) TTR 2 ч. (кроме этапа культивирования) Лаборатория, подходит для высокопоточного скрининга</p>	<p>mobidiag.com [3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420</p>

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
Novodiag Mobidiag Ltd, Эспоо, Финляндия	Сложность: 1	Микроорганизмы, продуцирующие карбапенемазы Тест на основе гибридизации Амплификация (ПЦР) и гибридизация в одном картридже, настольный, портативный TTR 1 ч. Лаборатория или ЭТ	mobidiag.com [3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420
NucliSENS easyQ [®] KPC Assay bioMérieux, Марсиль-Этуаль, Франция	Сложность: 3	Определение KPC Тест на основе гибридизации Подготовка образцов ручным способом, ПЦР амплификация и детекция зондом KPC: Чувствительность: 93,3% (95% ДИ: 77,9–99,2%) Специфичность: 99,9% (95% ДИ: 98,0–99,6%) TTR 3–4 ч. Подготовка образцов ручным способом, ПЦР амплификация и детекция зондом	http://www.biomerieux-diagnostics.com [7] https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf [11] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22622445
FILMARRAY Blood culture panel bioMérieux, Марсиль-Этуаль, Франция	Сложность: 1	Определение KPC и vanA/V, mecA Тест на основе гибридизации Амплификация (ПЦР) и гибридизация (микрочип) в одном картридже Enterobacteriaceae KPC: Чувствительность: 100% (95% ДИ: 91,1–100%) Специфичность: 100% (95% ДИ: 99,3–100%) TTR 1 ч. Лаборатория или ЭТ	http://www.biomerieux-diagnostics.com [7] https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf [12] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26311866
Check-multi-drug resistant CT101 Check-Points, Вагенинген, Нидерланды	Сложность: 3	Штаммы Enterobacteriaceae, продуцирующие карбапенемазы KPC, NDM БЛРС vs не-БЛРС Мобильные AmpC Тест на основе гибридизации	http://www.check-points.eu/ [13] http://www.check-points.eu/downloads/Roberts_et_al_poster_ASM_2011.pdf

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
		<p>Ручной метод, микрочип КРС Чувствительность: 100% Специфичность: 96,8% TTR < 7 ч.</p>	<p>[14] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26888905</p>
<p>Check-multi-drug resistant CT102 Вагенинген, Нидерланды</p>	Сложность: 3	<p>Использование в лаборатории Штаммы Enterobacteraeae, продуцирующие карбапенемазы и БЛРС: КРС, NDM, VIM, IMP OXA-48-подобные Группы CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 и -25, CTX-M-9 TEM wt, TEM E104K, TEM R164S, TEM R164H, TEM G238S SHV wt, SHV G238S, SHV G238A, SHV E240K Тест на основе гибридизации Ручной метод, микрочип Чувствительность и специфичность достигают 100% для большинства целевых генов TTR < 7 ч.</p>	<p>http://www.check-points.eu/ [15] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21325547</p>
<p>Check-multi-drug resistant CT103 XL Вагенинген, Нидерланды</p>	Сложность: 3	<p>Использование в лаборатории Как CT102, но дополнительные карбапенемазы, БЛРС, AmpC Тест на основе гибридизации Ручной метод, микрочип TTR < 7 ч.</p>	<p>http://www.check-points.eu/</p>
<p>Check-Direct CPE Вагенинген, Нидерланды Автоматизированная версия совместно с BD MAX</p>	Сложность: 2 (версия BD MAX)	<p>Использование в лаборатории Определение КРС, OXA-48, VIM, NDM у представителей Enterobacteraeae Тест на основе амплификации Мультиплексная ПЦР-РВ, мазки или культуры Чувствительность: 100% Специфичность: 88% TTR 2 ч. Лаборатория или ЭТ</p>	<p>[2, 16] http://www.check-points.eu/ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135412 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25630646 [17] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26338860</p>

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
Master Diagnostica AMR Direct Flow Chip Oxford Biosystems, Оксфорд, Великобритания	Сложность: 3	Панель с определением 20 генов AMP у Грамположительных и Грамотрицательных бактерий Тест на основе гибридизации Мультиплексная ПЦР и микрочип; нет необходимости в выделении или очистке ДНК TTR несколько часов Лаборатория	http://www.oxfordbiosystems.com/
Master Diagnostica Sepsis Flow Chip Oxford Biosystems, Оксфорд, Великобритания	Сложность: 3	Определение 40 патогенов, являющихся возбудителями сепсиса, и 20 генов AMP Тест на основе гибридизации Мультиплексная ПЦР и микрочип; нет необходимости в выделении или очистке ДНК TTR несколько часов Лаборатория	http://www.oxfordbiosystems.com/
AID Diagnostica Line Probe Assay ESBL Oxford Biosystems, Оксфорд, Великобритания	Сложность: 3	Определение наиболее важных мутаций в TEM и SHV, определение CTX-M, KPC Тест на основе гибридизации (LPA) Валидирован для применения с культурами бактерий и клиническими образцами Точность: 100% (размер выборки, 424) TTR 5 ч. Лаборатория	http://www.oxfordbiosystems.com/ [21] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24004861
AID Diagnostika Line Probe Assay Carbenemases Oxford Biosystems, Оксфорд, Великобритания	Сложность: 3	Пенициллиназы (Класс A): KPC, IMI, NMC-A, BIC Металло-β-лактамазы (класс B): IMP, VIM, NDM, AIM, DIM, GIM, SIM, SPM Оксациллиназы (класс D): OXA-48 Тест на основе гибридизации (LPA) TTR 5 ч. Лаборатория	

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
RESIST KPC K-SeT Coris BioConcept, Жамблу, Бельгия	Сложность: 1	<p>Определение KPC в бактериальной культуре Иммуноанализ: детекция эпитопов фермента KPC Чувствительность: 100% (95% ДИ: 87,0–100%) Специфичность: 100% (95% ДИ: 98,5–100%) TTR 20 мин. (5 мин. подготовка, 15 мин. реакция) Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД</p>	<p>http://www.corisbio.com [22] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28844719 [23] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126269 http://www.corisbio.com [24] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28483549</p>
RESIST OXA-48 K-SeT Coris BioConcept, Жамблу, Бельгия	Сложность: 1	<p>Определение OXA-48 K-SeT в бактериальной культуре Иммуноанализ: детекция эпитопов фермента OXA-48 Чувствительность: 100% (95% ДИ: 96,4–100%) Специфичность: 100% (95% ДИ: 97,8–100%) TTR 20 мин. (5 мин. подготовка, 15 мин. реакция) Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД</p>	<p>http://www.corisbio.com [25] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27535687 [26] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28151407 http://ngbiotech.com/</p>
RESIST-3 O.O.K. RESIST-3 O.K.N. Coris BioConcept, Жамблу, Бельгия	Сложность: 1	<p>Определение OXA-48, OXA-163, KPC (O.O.K.) или OXA-48, KPC, NDM (O.K.N.) в бактериальной культуре Иммуноанализ: детекция эпитопов фермента Чувствительность и специфичность: 100% TTR 20 мин. Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД</p>	<p>http://www.corisbio.com/ [25] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27535687 [26] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28151407 http://ngbiotech.com/</p>
NG-Test CTX-M Next Generation Biotech, Гипри, Франция	Сложность: 1	<p>Иммуноанализ: детекция фермента CTX-M Чувствительность: 100% (95% ДИ 94,8–100%) Специфичность: 100% (95% ДИ 96,5%–100%) TTR 15 мин. Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД</p>	<p>http://ngbiotech.com/</p>
NG-Test CARBA 5 Next Generation Biotech, Гипри, Франция	Сложность: 1	<p>Иммуноанализ: детекция ферментов NDM, IMP, VIM, OXA, KPC Чувствительность: 100% (95% ДИ 94,8%–100%) Специфичность: 100% (95% ДИ 96,5%–100%)</p>	<p>http://ngbiotech.com/</p>

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
Sartbarlex assay Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия	Сложность: 3	TTR 15 мин. (кроме этапа культивирования) Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД Определение KFS, NDM, VIM, IMP и OXA-48-подобных карбапенемаз Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ) Типы образцов: ректальные мазки или культура микроорганизмов Чувствительность: 96,3% Специфичность: 99,5% TTR 3 ч. (кроме этапа культивирования) Лаборатория	https://www.bruker.com
Патоген: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Лекарственная устойчивость: Метициллин			
Unuvero ITI Application Curetis N.V./Curetis GmbH, Хольцгерлинген, Германия	Сложность: 2	См. выше	http://www.unuvero.com/en/
Unuvero VCU Application Curetis N.V./Curetis GmbH, Хольцгерлинген, Германия	Сложность: 2	См. выше	http://www.unuvero.com/en/
Unuvero IAI Application Curetis N.V./Curetis GmbH, Хольцгерлинген, Германия	Сложность: 2	См. выше	http://www.unuvero.com/en/

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
iC-Cassette Gram-positive cassette iCubate Inc., Хантсвилл, Алабама, США	Сложность: 2	5 Грамположительных патогенов, 3 гена резистентности: <i>mecA</i> Тест на основе гибридизации Портативная система; одностадийная мультиплексная ПЦР-амплификация и детекция зондом Чувствительность: 93,8% Специфичность: 98,7% TTR 4,5 ч. Лаборатория или ЭТ	http://icubate.com [3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420 [27] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26468498
TRAPIST V6 Coris BioConcept, Жамблу, Бельгия	Сложность: 3	Грамположительные и Грамотрицательные бактериальные патогены, являющиеся возбудителями сепсиса <i>mecA</i> , <i>mecS</i> Тест на основе гибридизации Портативное устройство; ПЦР-амплификация и гибридизация на одном микрочипе TTR < 1 ч. Подходит для применения в СНСД	www.corisbio.com [3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420
ePlex System GenMark Diagnostics Inc., Карлсбад, Калифорния, США	Сложность: 1	> 20 Грамположительных бактерий > 25 Грамотрицательных бактерий 4 гена резистентности к антибиотикам (<i>mecA</i> , <i>mecS</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i>) Тест на основе гибридизации ПЦР амплификация и гибридизация в одном картридже, электрохимическая технология (eSensor) TTR 90 мин. (кроме времени работы с образцом) Предназначен для применения в клинической лаборатории	www.genmarkdx.com [3, 4] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420 https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=26256

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
FILMARRAY Blood culture panel bioMérieux, Марси- л'Этуаль, Франция	Сложность: 1	Определение <i>тесА</i> , КРС Тест на основе гибридизации Амплификация (ПЦР) и гибридизация (микрочип) в одном кар- тридже <i>тесА</i> : Чувствительность: 98,4% Специфичность: 98,3% TTR 1 ч. Лаборатория или ЭТ	http://www.biomerieux-diagnostics.com/ [7] https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf [28] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739158
Nanosphere/Verigene Bloodstream infection test Lumindex Corporation, Остин, Техас, США	Сложность: 2	Грамположительные и Грамотрицательные патогены <i>тесА</i> Тест на основе гибридизации Амплификация и гибридизация в одном картридже Образец культуры крови <i>тесА</i> : Чувствительность: 94,2% [95% ДИ: 91,5–96,3%] Специфичность: 98,2% [95% ДИ: 97,1–98,9%] TTR < 2 ч. Лаборатория или ЭТ	https://www.luminexcorp.com [7] https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf [8] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122857
NucliSENS easyQ® MRSA Assay bioMérieux, Марси- л'Этуаль, Франция	Сложность: 3	<i>тесА</i> Тест на основе гибридизации Подготовка образцов ручным способом, ПЦР амплификация и детекция зондом Чувствительность: 95,8% [95% ДИ: 91,1–98,4%] Специфичность: 96,8% [95% ДИ: 95,5–97,7%] TTR 3–4 ч. Подготовка образцов ручным способом, ПЦР амплификация и детекция зондом	http://www.biomerieux-diagnostics.com [7] https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
Light Cycler MRSA Advanced Test Roche Molecular Diagnostics	Сложность: 3	<p>MRSA <i>mecA</i></p> <p>Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ)</p> <p>Автоматизированный или ручной, мазки из носа или перинальной области</p> <p>Чувствительность: 95,2% [95% ДИ: 91,1–97,8%]</p> <p>Специфичность: 96,4% [95% ДИ: 95,2–97,4%]</p> <p>TTR 2–3 ч.</p> <p>Предназначен для применения в центральной лаборатории высокой сложности</p>	<p>https://molecular.roche.com</p> <p>[7]</p> <p>https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf</p> <p>https://www.gsaadvantage.gov/ref_text/</p> <p>V797P7037A/00ME86.372</p> <p>DCQ_V797P-7037A_V797P7037A.PDF</p>
Light Cycler SeptiFast MecA Test MGRADE Roche Molecular Diagnostics	Сложность: 3	<p>MRSA <i>mecA</i></p> <p>Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ)</p> <p>Автоматизированный или ручной, возможна детекция гена <i>mecA</i>, если из образцов высевается <i>S. aureus</i></p> <p>Чувствительность: 60–95%</p> <p>Специфичность: 74–99%</p> <p>TTR < 6 ч.</p> <p>Предназначен для применения в клинической лаборатории</p>	<p>https://molecular.roche.com</p> <p>https://www.nice.org.uk/guidance/dg20/chapter/3-The-diagnostic-tests</p> <p>https://www.gsaadvantage.gov/ref_text/V797P7037A/00ME86.372</p> <p>DCQ_V797P-7037A_V797P7037A.PDF</p> <p>[29]</p> <p>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3580598/</p>
Cobas MRSA/SA Roche Molecular Diagnostics	Сложность: 2	<p>Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ)</p> <p>Автоматизированный, частично интегрированный, подготовленный для переноса ПЦР-планшета в термоциклер, мазок из носа</p> <p>Чувствительность: 93,1% [95% ДИ: 88,1–96,1%]</p> <p>Специфичность: 97,5% [95% ДИ: 96,8–98,0%]</p> <p>TTR 2–3 ч.</p> <p>Лаборатория или ЭТ</p>	<p>https://molecular.roche.com</p> <p>[7]</p> <p>https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf</p> <p>https://pim-eservices.roche.com/eID_SF/gb/en/Documents/GetDocument?docu mentId=cffe450d-f2bd-e411-a8af-00215a9b0ba8</p>

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
GenoType Assays Gram-positive (with resistance detection) panels Hain Lifescience GmbH, Нерен, Германия	Сложность: 3 Стоимость установок: 3 Стоимость за тест: 2	Грамположительная панель: mecA Тест на основе гибридизации (LPA) Автоматизированный или ручной, культура крови TTR 4,5 ч. Лаборатория	https://www.gsaadvantage.gov/ref-text/V797P7037A/00ME86.372DCQ_V797P-7037A_V797P7037A.PDF http://www.hain-lifescience.de/en [30] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170900
FluoroType MRSA Hain Lifescience GmbH, Нерен, Германия	Сложность: 3	MRSA Тест на основе гибридизации Автоматизированный, интегрированный, ПЦР амплификация и детекция зондом Мазки Чувствительность: 100% Специфичность: 96,1–99,2% TTR 2,5 ч. Лаборатория	http://www.hain-lifescience.de/en [7] https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf
GenoType/GenoQuick Assays MRSA Hain Lifescience GmbH, Нерен, Германия	Сложность: 3	MRSA, mecS Тест на основе гибридизации (LPA) Автоматизированный или ручной GenoQuick: Чувствительность: 57% Специфичность: 100% TTR 2,5 ч. GenoType: Чувствительность: 94,59% Специфичность: 98,73% TTR 4 ч. Лаборатория	http://www.hain-lifescience.de/en https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mrsa/genoquick-mrsa.html [7] https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
IRIDICA VAC BSI Ibis Biosciences, an Abbott Comrapu, Карлсбад, Калифорния, США	Сложность: 3	Панель из 780 бактериальных и грибковых патогенов <i>меСА</i> Тест на основе амплификации (ПЦР) Образцы крови Чувствительность: 88% Специфичность: 63% TTR 8 ч. Предназначен для применения в клинической лаборатории	[9] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384540
eazyplex MRSA eazyplex MRSA plus Amplex, Гиссен, Германия	Сложность: 3	MRSA <i>S. aureus, S. epidermidis</i> <i>меСА, меСВ</i> Тест на основе гибридизации (LAMP) Портативный, интегрированный Детекция MRSA в плевральной и синовиальной жидкостях: Чувствительность: 83,3% Специфичность: 97,8% TTR 30 мин. Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД	www.eazyplex.com [31] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28450195
GeneXpert MRSA Assay Cepheid Corp., now a DanaHER comrapu, Саннивейл, Калифорния, США	Сложность: 2	MRSA Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ) Автоматизированная интегрированная пробоподготовка, амплификация и обнаружение Чувствительность: 86,9% Специфичность: 97,9% TTR < 66 мин. Применение в лабораториях умеренной сложности согласно США Возможно для ЭТ	http://www.cepheid.com/us/ [32] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377748 [33] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995869 [34] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28321579

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
GeneXpert MRSA NxG Assay Cepheid Corp., now a Danaher company, Саннивейл, Калифорния, США	Сложность: 2	MRSA orfX SCCmec комплекс и <i>mecA</i> , <i>mecC</i> Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ) Автоматизированная интегрированная пробоподготовка, амплификация и обнаружение Чувствительность: 91,8% [95% ДИ: 87,4–94,8%] Специфичность: 97,2% [95% ДИ: 96,3–97,9%] TTR 70 мин. Применение в лабораториях умеренной сложности согласно CLIA	http://www.cephheid.com/us/ [35] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29118165?dopt=Abstract
GeneSTAT System DxNA LLC, Сент-Джордж, Юта, США	Сложность: 1	MRSA Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ) Портативный Также определяет коагулазо-негативные <i>S. aureus</i> с МЛУ TTR 60 мин. Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД	http://dxna.com https://www.genomeweb.com/pcrsample-prep/dxna-licenses-staph-assay-pathogene-use-gene-stat-system [3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420
Portrait Great Basin Scientific Inc., Солт-Лейк-Сити, Юта, США	Сложность: 1	<i>S. aureus</i> , <i>mecA</i> Тест на основе гибридизации Портативный, ПЦР-амплификация и детекция зондом в одном картридже Процент согласованности детекции <i>mecA</i> в сравнении с референтными методами: Чувствительность: 94,4% [95% ДИ: 86,6–97,8%] Специфичность: 98,8% [95% ДИ: 97,7–99,4%] TTR < 3 ч. Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД	[36] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28122871

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
BD MAX MRSA XT panel BD MAX StaphSR panel BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США	Сложность: 1	MRSA, <i>S. aureus</i> Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ) Наиболее широкий доступный диапазон штаммов MRSA Автоматизированная, полностью интегрированная (пробоподготовка, амплификация и детекция), мазки из носа Чувствительность: 96,5% (95% ДИ: 92,0–98,5%) Специфичность: 96,9% (95% ДИ: 96,1–97,6%) Центральная лаборатория умеренной сложности	https://www.bd.com/en-us
GeneOhm Staph SF GeneOhm MRSA ACP BD, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США	Сложность: 2	MRSA, <i>S. aureus</i> , <i>mecA</i> <i>mecA</i> и <i>OrfX</i> Тест на основе гибридизации Ручная подготовка образцов, без этапа культивирования, автоматизированная, встроенная ПЦР-амплификация и детекция зондом Культуры крови, мазки из носа Чувствительность: 92% Специфичность: 94,6% TTR 2 ч.	[32, 37] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377748 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2021508148
GenomEra CDX system Abacus Diagnostica Oy, Турку, Финляндия	Сложность: 1	MRSA Тест на основе амплификации (ПЦР-РВ) Чувствительность: 100% Специфичность: 99,8–100% TTR 50 мин. Лаборатория или ЭТ Подходит для применения в СНСД	www.abacusdiagnostica.com/ [3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343420
MRSA ELITE MGB ELITech	Сложность: 2	MRSA Полуавтоматический, мазки из носа Чувствительность: 92,3% (95% ДИ: 88,1–95,2%)	https://www.elitechgroup.com [7]

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
		<p>Специфичность: 95,2% (95% ДИ: 94,3–95,9%) TTR 3–5 ч. Лаборатория</p>	<p>https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf</p>
<p>mesA Xpress FISH OpGen</p>	<p>Сложность: 3</p>	<p>Тест на основе гибридизации Руководство для культур крови, FISH-зонды с флуоресцентной меткой Чувствительность: 98,7% (95% ДИ: 95,4–99,6%) Специфичность: 99,5% (95% ДИ: 97,0–99,9%) TTR 70 мин. Лаборатория или ЭТ</p>	<p>http://www.opgen.com [7] https://www.gardp.org/wp-content/uploads/2017/05/AMR_Tech_Landscape_Analysis.pdf</p>
<p>Master Diagnostica AMR Direct Flow Chip Oxford Biosystems, Оксфорд, Великобритания</p>	<p>Сложность: 3</p>	<p>Панель из 20 генов резистентности Грамположительных и Грамотрицательных бактерий Тест на основе гибридизации (микрочип) На основе мультиплексной ПЦР и микрочипа; не требуется экстракции или очистки ДНК TTR несколько часов Лаборатория</p>	<p>http://www.oxfordbiosystems.com</p>
<p>Master Diagnostica Sepsis Flow Chip Oxford Biosystems, Оксфорд, Великобритания</p>	<p>Сложность: 3</p>	<p>40 патогенов, приводящих к развитию сепсиса, и 20 генов МЛУ Тест на основе гибридизации (микрочип) На основе мультиплексной ПЦР и микрочипа; не требуется экстракции или очистки ДНК TTR, несколько часов Лаборатория</p>	<p>http://www.oxfordbiosystems.com</p>
<p>AID Diagnostika Line Probe Assay MRSA Oxford Biosystems, Оксфорд, Великобритания</p>	<p>Сложность: 3</p>	<p>mesA, месС, Дифференциация <i>S. aureus</i> и коагулазо-негативных стафилококков Тест на основе гибридизации (LPA) TTR, 5 ч. Лаборатория</p>	<p>http://www.oxfordbiosystems.com</p>

Тест и производитель	Сложность	Детальная информация	Ссылка
Патоген: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>			
Лекарственная устойчивость:	Цефалоспорины расширенного спектра Макролиды Фторхинолоны Аминогликозиды		
В настоящее время нет доступных тестов для молекулярной диагностики			
Патоген: <i>Streptococcus pneumoniae</i>			
Лекарственная устойчивость:	Пенициллины Сульфаниламиды и триметоприм Цефалоспорины расширенного спектра		
В настоящее время нет доступных тестов для молекулярной диагностики			

¹ Дисклеймер: молекулярные диагностические тесты, перечисленные в таблице, отмечены как соответствующие стандартам Евросоюза и Европейской экономической зоны (EE) или одобрены USFDA. Другие молекулярные диагностические тесты разрабатываются и проходят валидацию, и в будущих версиях таблицы будет обновлен список тестов, включая одобренные другими регуляторными органами.

Литература к Приложению 1

1. Ozongwu C, Personne Y, Platt G, Jeanes C, Aydin S, Kozato N, et al. The Unyvero P55 “sample-in, answer-out” pneumonia assay: a performance evaluation. *Biomol Detect Quantif.* 2017;13:1–6.
2. Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, Woodford N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70, 1338–42.
3. Bissonnette L, Bergeron MG. Portable devices and mobile instruments for infectious diseases point-of-care testing. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17: 471–94.
4. Tyler E, Harrel B, Leatham B, Vansickle R, Mehlman K, Stelling C, et al. Analytical comparison of GenMark’s ePlex™ gastrointestinal pathogen panel to bench methods. *GenMarkDx poster.*
5. Al-Khouri A, Kinana F, Wong K, Gertzen R, Jain M, Kulkarni S, et al. Assessment of the ePlex BCID Gram-negative (GN) panel for the identification of Gram-negative organisms associated with bloodstream infections. *ECCMID 2018.*
6. Ledebouer NA, Lopansri BK, Dhiman N, Cavagnolo R, Carroll KC, Granato P, et al. Identification of Gram-negative bacteria and genetic resistance determinants from positive blood culture broths by use of the Verigene Gram-negative blood culture multiplex microarray-based molecular assay. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2460–72.
7. Reiske H. Anti-microbial resistance, landscape analysis of the state of AMR testing technologies. *Global Antibiotic Research & Development Partnership.*
8. Hill JT, Tran KD, Barton KL, Labreche MJ, Sharp SE. Evaluation of the nanosphere Verigene BC-GN assay for direct identification of Gram-negative bacilli and antibiotic resistance markers from positive blood cultures and potential impact for more-rapid antibiotic interventions. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3805–7.
9. Metzgar D, Frinder MW, Rothman RE, Peterson S, Carroll KC, Zhang SX, et al. The IRIDICA BAC BSI assay: rapid, sensitive and culture-independent identification of bacteria and *Candida* in blood. *PLoS One.* 2016;11:e0158186.
10. Oueslati S, Girlich D, Dortet L, Naas T. Evaluation of the Amplidag CarbaR+VRE kit for accurate detection of carbapenemase-producing bacteria. *J Clin Microbiol.* 2018;56(3):e01092–17.
11. Spanu T, Fiori B, D’Inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, et al. 2012. Evaluation of the new NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (*blaKPC*). *J Clin Microbiol.* 2012;50:2783–5.
12. Binnicker MJ. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: performance, result interpretation, and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3723–8.
13. Roberts AA, Tekle T, Stamper PD, Carroll KC. Evaluation of a PCR-microarray assay (Check-MDR CT101, Wageningen, Netherlands) for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Poster Johns Hopkins Medicine.*
14. Cunningham SA, Vasoo S, Patel R. Evaluation of the Check-Points Check MDR CT103 and CT103 XL microarray kits by use of preparatory rapid cell lysis. *J Clin Microbiol.* 2016;54:1368–71.

15. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1608–13.
16. Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, van Zwet A. Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77:316–20.
17. Lau AF, Fahle GA, Kemp MA, Jassem AN, Dekker JP, Frank KM. Clinical performance of Check-Direct CPE, a multiplex PCR for direct detection of bla(KPC), bla(NDM) and/or bla(VIM), and bla(OXA)-48 from perirectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3729–37.
18. Souverein D, Euser SM, van der Reijden WA, Herpers BL, Kluytmans J, Rossen JWA, et al. Clinical sensitivity and specificity of the Check-Points Check-Direct ESBL screen for BD MAX, a real-time PCR for direct ESBL detection from rectal swabs. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72:2512–8.
19. Gillis M, Wiegel P, Licanin B, Plum G. Evaluation of the fully automated Qiagen artus VanR QS-RGQ method for the detection of glycopeptide-resistant enterococci in clinical samples. ECCMID. Copenhagen, Denmark, 2015.
20. Veenemans J, Overdeest IT, Snelders E, Willemsen I, Hendriks Y, Adesokan A, et al. Next-generation sequencing for typing and detection of resistance genes: performance of a new commercial method during an outbreak of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2454–60.
21. Bloemberg GV, Polsfuss S, Meyer V, Bottger EC, Hombach M. Evaluation of the AID ESBL line probe assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and KPC carbapenemase genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:85–90.
22. Ramos AC, Gales AC, Monteiro J, Silbert S, Chagas-Neto T, Machado AMO, et al. 2017. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of distinct variants of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in Enterobacteriaceae. *J Microbiol Meth.* 2017;142:1–3.
23. Riccobono E, Antonelli A, Pecile P, Bogaerts P, D'Andrea MM, Rossolini GM. Evaluation of the KPC K-SeT(R) immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC carbapenemase producers from positive blood cultures. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73:539–40.
24. Nodari CS, Gales AC, Barth AL, Magagnin CM, Zavascki AP, Carvalhaes CG. Detection of OXA-370 directly from rectal swabs and blood culture vials using an immunochromatographic assay. *J Microbiol Meth.* 2017;139:92–4.
25. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, de Belder D, Glupczynski Y, et al. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 subfamilies in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2832–6.
26. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MH. Evaluation of an immunochromatographic lateral flow assay (OXA-48 K-SeT) for rapid detection of OXA-48-like carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2016;54:471–3.
27. Buchan BW, Reymann GC, Granato PA, Alkins BR, Jim P, Young S. Preliminary evaluation of the research-use-only (RUO) iCubate iC-GPC assay for identi-

- fication of select Gram-positive bacteria and their resistance determinants in blood culture broths. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3931–4.
28. Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, Schreckenberger P, Desjarlais SM, Johnson JK, et al. Evaluation of the FilmArray blood culture identification panel: results of a multicenter controlled trial. *J Clin Microbiol.* 2016;54:687–98.
 29. Afshari A, Schrenzel J, Ieven M, Harbarth S. Bench-to bedside review: rapid molecular diagnostics for bloodstream infection — a new frontier? *Crit Care.* 2012;16:222.
 30. Karumaa S, Karpanoja P, Sarkkinen H. PCR identification of bacteria in blood culture does not fit the daily workflow of a routine microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1031–3.
 31. Henares D, Brotons P, Buysse X, Latorre I, de Paz HD, Munoz-Almagro C. Evaluation of the eazyplexMRSA assay for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* in pleural and synovial fluid. *Int J Infect Dis.* 2017;59:65–8.
 32. Niemz A, Boyle DS, Ferguson TM. Point-of-care nucleic acid testing: clinical applications and current technologies. In: Huggett J, editor. *Molecular diagnostics.* New York City: Caister Academic Press; 2014.
 33. Nielsen XC, Madsen TV, Engner J. 2017. Evaluation of Xpert MRSA Gen 3 and BD MAX MRSA XT for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening in a routine diagnostic setting in a low-prevalence area. *J Med Microbiol.* 2017;66:90–5.
 34. Jacqmin H, Schuermans A, Desmet S, Verhaegen J, Saegeman V. Performance of three generations of Xpert MRSA in routine practice: approaching the aim? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36:1363–5.
 35. Yarbrough ML, Warren DK, Allen K, Burkholder D, Daum R, Donskey C, et al. Multicenter evaluation of the Xpert MRSA NxG assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal swabs. *J Clin Microbiol.* 2017;56:e01381–17.
 36. Denys GA, Collazo-Velez V, Young S, Daly JA, Couturier MR, Faron ML, et al. Multicenter evaluation of the Portrait Staph ID/R blood culture panel for rapid identification of staphylococci and detection of the *mecA* gene. *J Clin Microbiol.* 2017;55:1140–6.
 37. Patel PA, Ledebouer NA, Ginocchio CC, Condon S, Bouchard S, Qin P, et al. Performance of the BD GeneOhm MRSA achromopeptidase assay for real-time PCR detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal specimens. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2266–8.

ОПИСАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ АМР

Методы на основе амплификации

Тесты на основе амплификации производят множество копий специфической последовательности ДНК-мишени (амплификация). Это позволяет обнаруживать определенные фрагменты ДНК, например, гены, обуславливающие устойчивость к АМП, путем включения флуоресцентных меток во время амплификации или последующего электрофореза.

Полимеразная цепная реакция

Тесты на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) обладают высокой чувствительностью и специфичностью и могут использоваться для одновременного обнаружения ряда генов, связанных с АМР. Они относительно просты в использовании и могут быть доступны в виде портативных, автоматизированных универсальных устройств, требующих минимального обучения. Некоторые тесты ПЦР предназначены для обнаружения конкретного гена устойчивости у конкретного патогена, тогда как мультиплексная ПЦР может одновременно обнаруживать несколько генов устойчивости и/или возбудителей. Более того, количественная ПЦР (кПЦР) может использоваться для количественной оценки нагрузки возбудителя у инфицированного человека путем включения флуоресцентного красителя в амплифицированные сегменты ДНК и измерения последующего флуоресцентного сигнала.

Принцип ПЦР аналогичен естественному процессу репликации ДНК в клетках, при котором каждая из двух комплементарных цепей ДНК может действовать как матрица для синтеза новой цепи. Фермент, который синтезирует новую цепь вдоль матричной цепи, называется «ДНК-полимеразой» (термостойкий фермент, впервые обнаруженный в термофильной бактерии *Thermus aquaticus*). Из-за химических ограничений синтез ДНК может происходить только в одном направлении, от 5' до 3' конца новой цепи. ДНК-полимеразе требуется, по крайней мере, небольшой начальный сегмент (праймер) новой цепи, чтобы начать добавлять нуклеотиды, строительные блоки ДНК. Если выбрана правильная последовательность праймера, амплифицируются только представляющие интерес последовательности.

ПЦР состоит из нескольких последовательных циклов реакции, в каждом из которых количество целевых молекул ДНК удваивается, что приводит к экспоненциальному увеличению числа целевых молекул ДНК. Каждый цикл состоит из трех шагов (Рисунок А2.1):

- денатурация, при которой реакционная смесь нагревается для плавления ДНК с целью разделения комплементарных двойных цепей;

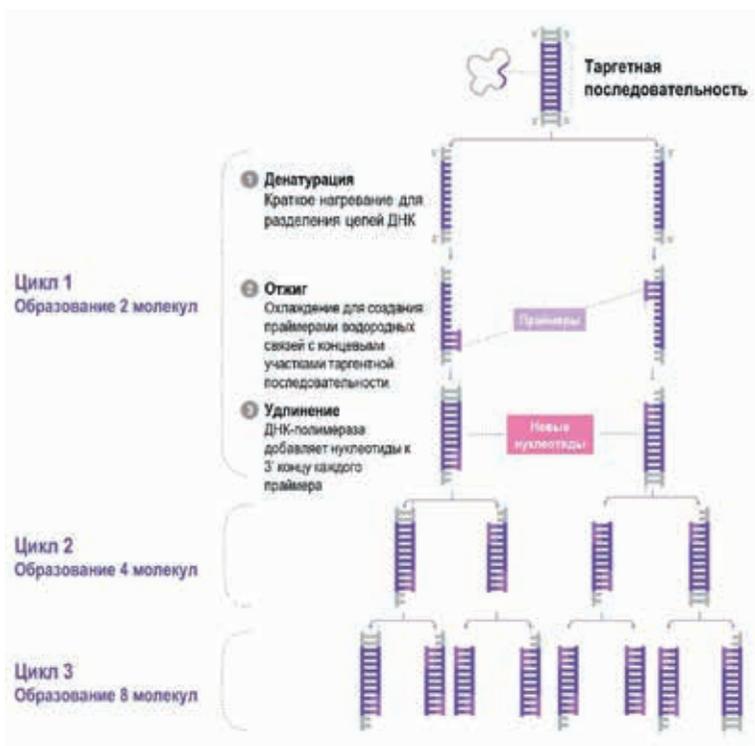


Рисунок А2.1. Полимеразная цепная реакция

Сиквенс-специфичные праймеры (светло-пурпурный цвет), можно использовать для амплификации специфичных (мишеней) последовательностей ДНК (темно-пурпурный цвет), например, генов резистентности к АМП.

- отжиг, при котором реакционная смесь охлаждается, чтобы позволить праймерам связываться с областями, фланкирующими целевую область;
- удлинение (элонгация или наращивание цепи), при котором ДНК-полимераза добавляет нуклеотиды к 3'-концу каждого праймера.

Таким образом, в каждом цикле ПЦР количество целевых последовательностей ДНК удваивается. Начиная с одной молекулы ДНК, цикл амплификации 1 дает две копии целевой последовательности, цикл 2 дает четыре копии, цикл 3 — восемь копий и так далее.

Амплифицированную ДНК можно подвергнуть электрофорезу для обнаружения или использовать как часть теста на основе гибридизации на следующем этапе. При ПЦР в режиме реального времени этапы удлинения и детекции объединены, например, с использованием флуоресцентно-меченных нуклеотидов или интеркалирующих красителей для обнаружения флуоресцентного сигнала растущей цепи. Примером

использования мультиплексной ПЦР является обнаружение β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter* spp.

Петлевая изотермическая амплификация

Тесты на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP), являются альтернативой ПЦР для амплификации последовательностей ДНК. Принцип LAMP аналогичен принципу ПЦР, но использует ДНК-полимеразу с высокой активностью замещения цепи (*Bst* ДНК-полимераза). Следовательно, стадия денатурации ДНК не требуется, и амплификация может происходить при постоянной температуре (60–65°C); технология LAMP не предполагает использования термоциклера.

В этом варианте амплификации применяется четыре типа праймеров, два внутренних и два внешних, что делает тест очень специфичным. Праймеры с двумя петлями могут быть добавлены для ускорения реакции амплификации, так что 10^9 копий последовательностей могут быть сгенерированы в течение получаса (1, 2). Амплификация при LAMP включает один циклический и один нециклический этап. На нециклическом этапе на каждом конце последовательности ДНК, образуются так называемая «*stem-loops*» петли ДНК в форме гантелей, фланкированные праймерами. Эти структуры служат исходным материалом для циклической стадии. Большая часть целевой амплификации происходит на циклической стадии с внутренними праймерами.

Амплифицированные последовательности связаны через последовательности праймеров. Конечные продукты LAMP представляют собой попеременно инвертированные повторы специфической последовательности на одной и той же цепи ДНК, которые образуют структуры в форме цветной капусты.

LAMP менее уязвим для ингибиторов, которые могут присутствовать в сложных образцах (например, в матричных образцах), что делает его более подходящим для условий с ограниченными ресурсами и повседневной практики, чем ПЦР. Пирофосфат магния, побочный продукт, образующийся во время реакции, увеличивает мутность жидкости в пробирке, так что успешную амплификацию можно определить невооруженным глазом. Интеркалирующие флуоресцентные красители можно использовать для обнаружения продуктов реакции в реальном времени, как и в случае с ПЦР.

Примером использования LAMP является мультиплексный LAMP-тест для обнаружения карбапенемаз у представителей *Enterobacteriaceae*.

Методы на основе гибридизации

Методы на основе гибридизации используются для обнаружения генов АМР путем их гибридизации с мечеными зондами. Диагностические тесты могут быть подразделены на три группы: основанные на использовании

микрочипов (или гибридационные микрочипы), основанные на гибридизации с зондами на стрипах (LPA) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Общий принцип этих методов — обнаружение специфической ДНК (например, генов устойчивости) с помощью меченых зондов или таргетных последовательностей. Микрочипы и LPA предназначены для одновременного обнаружения нескольких целевых последовательностей. Гибридизации предшествует этап амплификации, чтобы гарантировать, что в образце присутствует достаточное количество ДНК для обнаружения.

Методики на основе микрочипов

Микрочипы можно использовать для обнаружения генов устойчивости, некоторых маркеров мутаций и видов бактерий в рамках молекулярно-диагностического исследования. Микрочип состоит из пятен (*spots*) интересующих последовательностей ДНК, прикрепленных к твердой поверхности в известной конфигурации (Рисунок А2.2). ДНК в пятнах представляет собой одноцепочечную последовательность, поэтому может связываться с комплементарной ДНК денатурированного образца. В «денатурированной» ДНК две цепи разделены, как правило, путем термической обработки. ДНК в образце помечают флуоресцентным маркером (амплифицируют с использованием ПЦР) и добавляют в микрочип

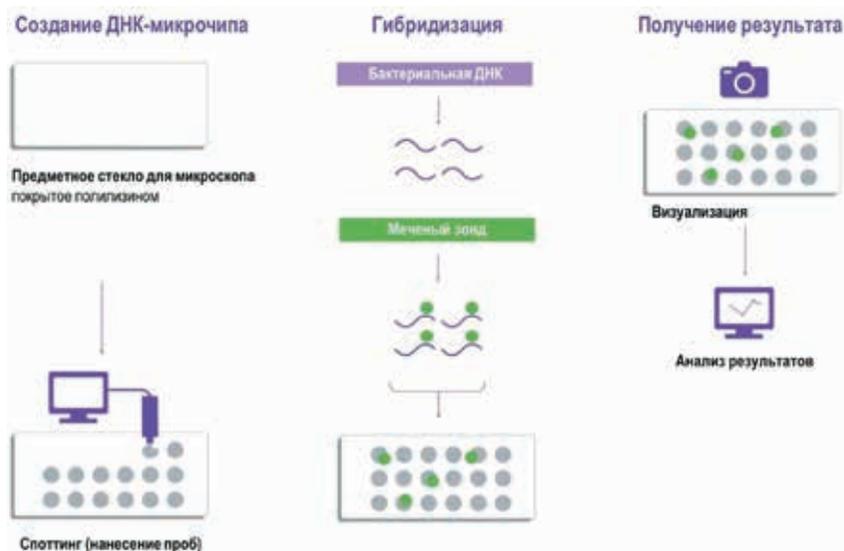


Рисунок А2. Метод детекции генов на основе использования микрочипов Су3 и Су5, зеленые и красные флуоресцентные красители; ФЭУ, фотозлектронный умножитель для обнаружения слабых световых сигналов.

для гибридизации. После смывания несвязанной ДНК лазерный сканер может обнаружить пятна, с которыми связана ДНК образца, и идентифицировать гены, присутствующие в образце. Поскольку микрочипы потенциально могут обнаруживать множество различных генов, они наиболее полезны в диагностике АМР при использовании в составе больших панелей для тестирования комбинаций различных патогенов и генов резистентности.

Примером использования микрочипов является определение видов возбудителей и генов резистентности при инфекциях кровотока.

Тесты на основе гибридизация с зондами на стрипах

При LPA за ПЦР следует обратная гибридизация на полосках, покрытых ДНК-зондами, расположенными дискретными полосами (Рисунок А2.3). LPA требует амплификации ДНК, выделенной из клинического образца, во время которой метка биотина добавляется к каждой последовательности ДНК в образце. Амплифицированная ДНК денатурируется, и одноцепочечные ДНК-зонды для маркеров генов устойчивости или видов бактерий прикрепляются к полоске, с которой они будут связываться в случае комплементарности последовательностям зонда. Расположение каждого зонда на полоске известно. Несвязанная ДНК образца смывается, и к полоске добавляется щелочная фосфатаза со стрептавидиновым якорем, которая связывается с последовательностями

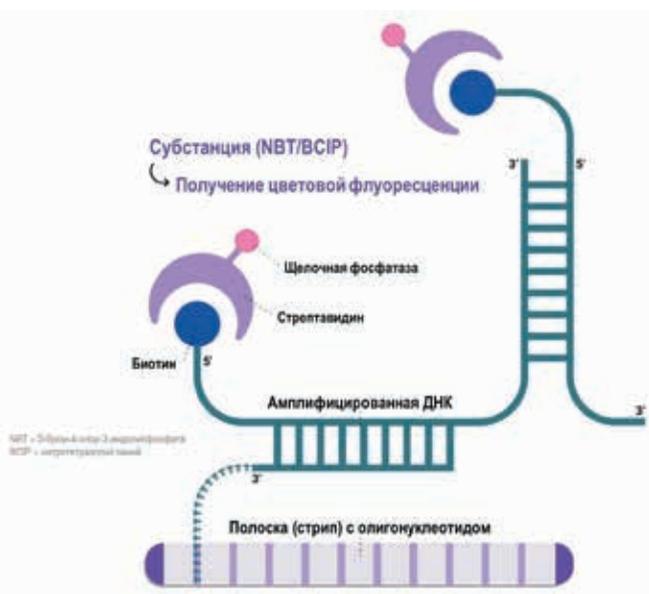


Рисунок А2.3. Метод гибридизации с зондами на стрипах

Синий кружок, биотиновая метка; розовый кружок, щелочная фосфатаза; фиолетовый полумесяц, стрептавидиновый «якорь».

ДНК, меченными биотином. Затем добавляются нитро-синий тетразолий (NCT) и 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP), которые расщепляются щелочной фосфатазой, превращаясь в темно-синий краситель, он окрашивает полосы в местах связывания ДНК образца.

О наличии генов резистентности можно судить, сравнивая рисунок цветных полос на тест-полоске с рисунком на контрольном шаблоне. Примером использования LPA является идентификация полирезистентного золотистого стафилококка (MRSA) в культурах крови.

Флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH)

При FISH флуоресцентные ДНК-зонды используются для определения наличия генов устойчивости непосредственно в бактериальных клетках, выделенных от пациентов (Рисунок А2.4). FISH обычно используется для обнаружения определенных мутаций в раковых клетках и в онтогенетике для обнаружения мутаций, которые могут привести к врожденным дефектам. Клетки из образцов наносят на предметные стекла для микроскопии и добавляют флуоресцентно-меченные зонды. И зонды, и бактериальная ДНК должны быть денатурированы, чтобы позволить зонду связаться со своей целевой последовательностью.

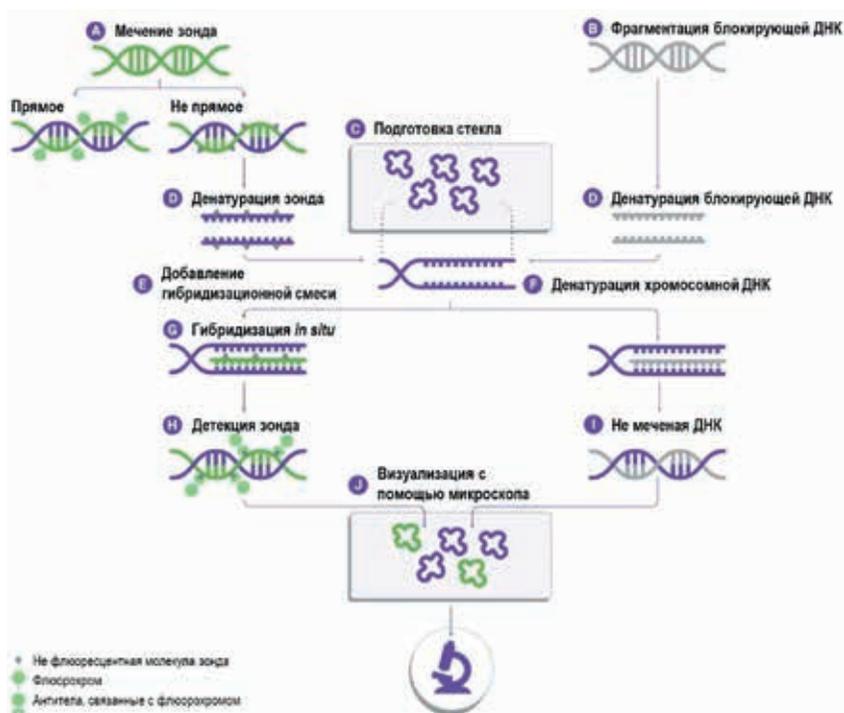


Рисунок А2.4. Флуоресцентная гибридизация *in situ*

После гибридизации весь оставшийся зонд смывается, а для визуализации связывания зондов с последовательностями-мишенями и для обнаружения присутствия генов устойчивости используют флуоресцентный лазерный микроскоп. Более дешевыми альтернативами для визуализации являются ртутные лампы и светодиоды [3]. Пример использования FISH — определение MRSA непосредственно в клиническом образце.

Иммунологические тесты

Иммунохроматографический анализ (антитело-независимый)

Иммунохроматографический анализ для обнаружения маркеров резистентности основан на хроматографии с боковым потоком (*lateral flow chromatography*).

Формат тестов часто аналогичен тестам на беременность. Иммунохроматографический анализ (LFIA) включает антитела, которые распознают белки, кодируемые генами устойчивости (Рисунок А2.5). Например, различные гены, кодирующие карбапенемазы, определяют устойчивость микроорганизмов к карбапенемам. Ферменты карбапенемазы имеют разные аминокислотные последовательности, и поэтому их можно отличить с помощью специфических антител. Поскольку LFIA может быть применен непосредственно для жидкого образца (например, суспендированная бактериальная колония) и методика не требует ПЦР-амплификации, тесты являются быстрыми (результаты можно получить в течение 15 минут) и простыми в использовании. В случае получения культуры микроорганизма, время получения результата увеличивается до 18–48 часов для выделения микроорганизма.

Методики определения нуклеиновых кислот с помощью иммунохроматографического анализа аналогичны LPA, но используются для обнаружения предварительно амплифицированных сегментов ДНК с помощью антител, а не с помощью зондов гибридизации. В ходе реакции ПЦР антигенные метки включаются в сегменты ДНК, которые впоследствии могут распознаваться антителами в ячейке с латеральным потоком. Жидкий образец добавляется к одному концу мембранного устройства или полоски, которая содержит антитела, конъюгированные с окрашенными флуоресцентными или золотыми нано частицами. Эти компоненты распознают и специфически связываются с представляющими интерес молекулами, такими как последовательности ДНК генов резистентности или мутантными белками. По мере того, как образец мигрирует через мембрану, он связывается с конъюгированными антителами. Цветные маркеры конъюгата накапливаются в зоне обнаружения образуя плотную окрашенную полоску, которая сигнализирует о наличии маркеров устойчивости. Если маркеры резистентности отсутствуют, цветные линии не образуются. Контрольная линия указывает на правильный поток жидкости через мембрану. Цветовой сигнал может иметь разную

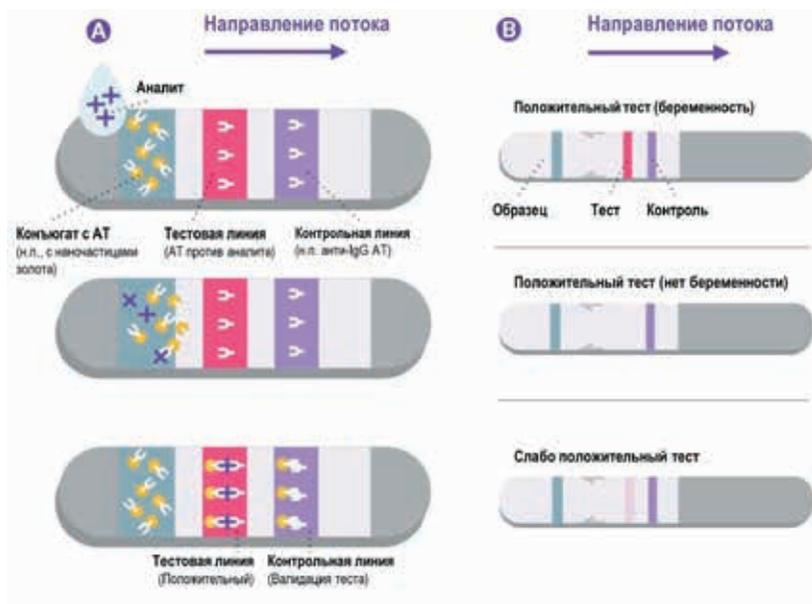


Рисунок А2.5. Иммунохроматографический анализ

А. Жидкий экстракт пробы добавляется к одному концу пористой мембраны и мигрирует к другому концу. Мембрана содержит антитела, конъюгированные с окрашенными флуоресцентными или золотыми частицами, которые распознают и связываются с представляющими интерес молекулами; например, в зоне обнаружения (тестовая линия, красная) иммобилизованные антитела связываются с комплексом конъюгированных антител и маркерами резистентности. Цветные маркеры конъюгата накапливаются в зоне обнаружения. Контрольная линия (пурпурная) указывает на то, что образец правильно проникает через мембрану.

Б. Пример результатов на тест-полоске. Верхний рисунок показывает положительный результат, средний показатель — отрицательный результат, а нижний показатель — слабоположительный результат, например, когда экспрессируется мало белка, являющегося причиной резистентности. Чтобы избежать сообщения о ложноположительном результате, можно повторить тест в случае слабоположительного результата.

интенсивность и оцениваться визуально или с помощью считывающего устройства [4]. Примером использования LFIA является обнаружение в изолятах эпитопов карбапенемазы *Klebsiella pneumoniae*.

Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование (ПГС) предоставляет информацию о «полном» геноме бактериального изолята. Существует несколько

методов секвенирования целых геномов. Чаще всего используется секвенирование красителей Illumina, в котором используется подход «последовательность путем синтеза» (Рисунок A2.6). К другим методам относятся пиросеквенирование и секвенирование отдельных молекул в реальном времени. На первом этапе геномная ДНК случайным образом разрезается на короткие сегменты, служащие матрицами для синтеза ДНК, и прикрепляется к внутренней поверхности проточной ячейки, в которой будет происходить секвенирование. После нескольких этапов предварительной обработки начинается основной цикл секвенирования. Принцип секвенирования путем синтеза заключается в том, что последовательность ДНК определяется с использованием разных флуоресцентных красителей для различных видов нуклеотидов. На каждой стадии синтеза только один нуклеотид инкорпорируется путем присоединения обратимых терминаторов. Когда меченный флуоресценцией нуклеотид

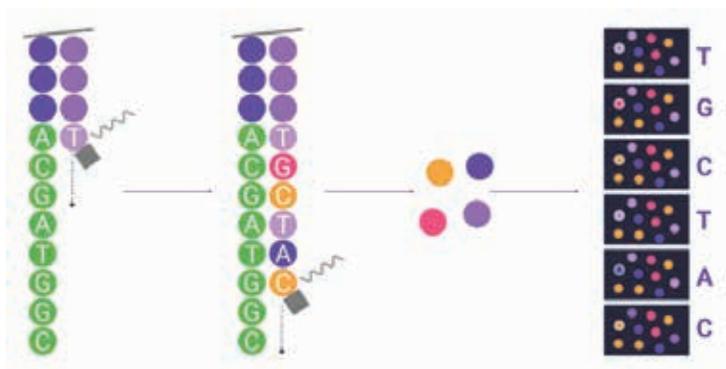


Рисунок A2.6. Пример полногеномного секвенирования с помощью *Illumina dye sequencing*

Сегменты разрезанной геномной ДНК прикреплены к внутренней части проточной кюветы (левая часть панели). Последовательность сегмента ДНК может быть определена путем добавления меченных флуоресценцией нуклеотидов во вновь синтезированную цепь. Для каждого вида нуклеотидов (A, T, G, C) используется различный флуоресцентный краситель, и во время каждого цикла элонгации добавляется только один нуклеотид. Фотодетектор (прямоугольник серого цвета) регистрирует длину волны, излучаемую недавно введенным нуклеотидом (волнистая линия). Затем начинается следующий цикл элонгации, добавляется и записывается еще один нуклеотид и так далее, пока не будет секвенирован весь сегмент. Внутри проточной кюветы множество сегментов ДНК прикреплены к поверхности рядом друг с другом и могут быть секвенированы параллельно. Фотодетектор регистрирует, какой нуклеотид включен в каждый сегмент во время каждого цикла элонгации (правая панель, белый кружок выделяет один сегмент ДНК, за которым следует шесть последующих циклов элонгации, в каждый из которых добавляется один нуклеотид).

включается в последовательность ДНК, он излучает характерную длину волны, которая регистрируется фотодетектором. Затем обратимый терминатор ферментативно расщепляется, чтобы позволить добавить меченый нуклеотид в следующем цикле элонгации. Путем регистрации того, какой нуклеотид с флуоресцентной меткой включается в растущую цепь ДНК во время каждого цикла элонгации, можно определить последовательность каждого фрагмента ДНК.

Последовательность всего генома собирается путем обнаружения перекрывающихся последовательностей фрагментов. Возникновение мутаций и наличие известных генов устойчивости и вариаций этих генов можно определить путем сравнения последовательности бактериального генома с референтными в доступных базах данных.

ПГС предоставляет огромный объем информации, но использует сложные технологии, и для анализа и интерпретации результатов необходимо пройти специализированный курс обучения. Пример использования ПГС — идентификация генов, обуславливающих БЛРС-опосредованную устойчивость у *Enterobacteriaceae*.

Литература к Приложению 2

1. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino A, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:E63.
2. Nagamine K, Hase T, Notomi N. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 2002;16: 223–9.
3. Lang DS, Zeiser T, Schultz H, Stellmacher F, Vollmer E, Zabel P, et al. LED-FISH: fluorescence microscopy based on light emitting diodes for the molecular analysis of Her-2/neu oncogene amplification. *Diagn Pathol.* 2008;3:49.
4. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 2016;60: 111–20.

ССЫЛКИ НА РУКОВОДСТВА FDA И ЕЭЗ В ОТНОШЕНИИ МЕТОДИК МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Требования к маркировке медицинских изделий как соответствующих стандартам Евросоюза и Европейской экономической зоны (Requirements for marking of medical devices as conforming to the standards of the European Union and European Economic Area): <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32017R0746>

Food and Drug Administration Clinical Laboratory Improvement Amendments guidelines on clearance of molecular diagnostic devices (Поправки к закону по совершенствованию клинических лабораторий FDA — руководство по процедуре получения разрешений на использование средств молекулярной диагностики): <https://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/IVDRegulatoryAssistance/ucm393229.htm>

Requirements of procedure for applying for waiver from Clinical Laboratory Improvement Amendments (Требования к процедуре подачи заявления об отказе от использования Поправок по усовершенствованию клинической лаборатории): <https://www.fda.gov/MedicalDevices/ucm079632.htm>

Дисклеймер

Информация об отдельных диагностических тестах в этом документе является общедоступной и была получена путем поиска в PubMed соответствующих публикаций по молекулярной диагностике АМР для приоритетных патогенов в рамках программы GLASS, а также с помощью поиска в Google диагностических компаний, предлагающих молекулярные тесты для детекции АМР (условия поиска см. в Приложении 1). Все поиски проводились с 13 октября по 4 декабря 2017 года.

ВОЗ самостоятельно не проводила валидацию описанных тестов и не говорит в пользу применения каких-либо коммерческих разработок, упомянутых в этом документе. Молекулярно-диагностические тесты, перечисленные в таблице А1.1, одобрены Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США или имеют маркировку «Compliance Européenne» (соответствуют стандартам Европейского Союза и Европейской экономической зоны). По мере разработки и валидации большего числа молекулярных диагностических тестов, данная таблица будет обновляться с целью включения коммерчески доступных систем, одобренных другими регулирующими органами.

WHO/WSI/AMR/2019.1

© Всемирная организация здравоохранения, 2019

Некоторые права защищены. Этот документ доступен согласно лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 IGO (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>).

В соответствии с условиями этой лицензии вы можете копировать, распространять и адаптировать документ в некоммерческих целях при условии, что работа процитирована надлежащим образом, как это указано ниже. При любом использовании этого документа не должно возникать предположений о том, что ВОЗ поддерживает какую-либо конкретную организацию, продукты или услуги. Использование логотипа ВОЗ запрещено. Если вы адаптируете документ, вы должны лицензировать его согласно той же или эквивалентной лицензии Creative Commons. Если вы создаете перевод этой работы, вы должны добавить следующий отказ от ответственности вместе с предлагаемой цитатой: «Этот перевод не был создан Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). ВОЗ не несет ответственности за содержание или точность этого перевода. Оригинальное английское издание является обязательным и оригинальным изданием».

Любое посредничество, связанное со спорами, возникающими в связи с лицензией, должно осуществляться в соответствии с согласительным регламентом Всемирной организации интеллектуальной собственности.

Предлагаемое цитирование. Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. Geneva: World Health Organization; 2019 (WHO/WSI/AMR/2019.1). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Библиографическая запись. Данные доступны на сайте <http://apps.who.int/iris>.

Продажа, права и лицензирование. Чтобы приобрести публикации ВОЗ, см. <http://apps.who.int/bookorders>. Для подачи запросов на коммерческое использование и запросов о правах и лицензировании см. <http://www.who.int/about/licensing>.

Сторонние материалы. Если вы хотите повторно использовать материалы из этого документа, что имеет отношение к третьей стороне, такие как таблицы, рисунки или изображения, вы обязаны определить, требуется ли разрешение для такого повторного использования, и получить разрешение от правообладателя. Риск предъявления претензий в связи с нарушением прав на любой сторонний компонент в работе лежит исключительно на пользователе.

Общие заявления об отказе от ответственности. Используемые обозначения и представление материала в этой публикации не подразумевают выражения какого-либо мнения со стороны ВОЗ относительно правового статуса какой-либо страны, территории, города, района или его властей, или относительно определения границ их территории, границы или границы. Пунктирные линии на картах обозначают приблизительные границы, по которым еще не достигнуто полного согласия.

Упоминание конкретных компаний или продуктов определенных производителей не означает, что они одобрены или рекомендованы ВОЗ в сравнении с другими подобными продуктами, которые не упоминаются в документе. За исключением случаев, когда есть ошибки и пропуски, названия патентованных продуктов выделяются начальными заглавными буквами.

ВОЗ приняла все разумные меры предосторожности для проверки информации, содержащейся в этой публикации. Однако опубликованные материалы распространяются без каких-либо явных или подразумеваемых гарантий. Ответственность за интерпретацию и использование материала лежит на читателе. Ни при каких обстоятельствах ВОЗ не несет ответственности за ущерб, возникший в результате его использования.

Вклад сотрудников ВОЗ:

Sheick Oumar Coulibaly и Laetitia Gahimbare из Африканского регионального бюро (AFRO); Nienke Bruinsma, Marcelo Galas и Pilar Ramon Pardo из Регионального бюро стран Америки (ПАНО); Mona Elshokry и Franciscus Konings из Регионального бюро стран Восточного Средиземноморья (EMRO); Danilo Lo Fo Wong из Европейского регионального бюро (EURO);

Aparna Singh Shah из Регионального офиса стран Юго-Восточной Азии (SEARO); Raynal Squires и Babatunde Olowokure из Регионального офиса для стран Западно-Тихоокеанского региона (WPRO). Сотрудники штаб-квартиры ВОЗ: Jorge Raul, Matheu Alvarez, Sebastien Cognat, Sergey Romualdovich Eremin, Sapna Manglani, Francis Gabriel Moussy, Christopher Oxenford и Carmem Lucia Pessoa-Silva, Matteo Zignol.

Внешние рецензенты:

Till Bachmann (Эдинбургский университет), Celia Carlos, Alejandra Corso, Diego Faccione (Национальная референтная лаборатория по борьбе с антимикробной резистентностью Министерства здравоохранения, Аргентина), Pilar Donado-Godo, John Ndemi Kiiru (Центр микробиологических исследований, Институт медицинских исследований Кении, Кения), Roberto Melano (Университет Торонто, Канада), Mario Fabian Martinez Mora (Центральная лаборатория общественного здоровья, Парагвай), Jose E. Moreno (Центральная справочная лаборатория в области общественного здравоохранения (LCRSP)-Мемориальный институт исследований здоровья Горгаса (ICGES), Комиссия по антимикробной резистентности, Панама), Iruka Okeke, Alejandro Petroni, (Национальная референтная лаборатория по борьбе с антимикробной резистентностью Министерства здравоохранения, Аргентина), K.L. Ravikumar Soledad Ulloa (Институт общественного здоровья, Чили), David Whiley (Университет Квинсленда, Брисбен, Австралия), Tomoyuki Yamaguchi (Университет Хоккайдо, Япония).

Группа разработчиков: David Aanensen, Роман Козлов, Monica Lahra, Sapna Manglani, Carolin Vegvari и Neil Woodford

Исполнительная группа: David Aanensen, Carmem Lucia Pessoa-Silva

Редакция: Elisabeth Heseltine

Графический дизайн: Ali Molloy

Финансовая поддержка: Правительство Соединенных Штатов Америки. Правительство Республики Корея через Корейское агентство международного сотрудничества (KOICA).

Научное издание

**Молекулярные методы диагностики
антимикробной резистентности для совершенствования
Глобальной системы эпиднадзора за устойчивостью
к антимикробным препаратам (GLASS)**

Дизайнер обложки, макета А.А. Шашкевич
Технический редактор Н.С. Малышева

Формат 60×90¹/₁₆. Бумага мелованная. Печать офсетная.
Гарнитура «OrenburgC». Печ. л. 4,5. Тираж 2000 экз.

Отпечатано в ОАО «Смоленский полиграфический комбинат».
214020, Смоленск, ул. Смольянинова, 1



Всемирная организация
здравоохранения