

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА МИКРОБИОЛОГИЯ**

Д-Р ВИРНА-МАРИЯ ЦИТУ

**МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ
ВИРУЛЕНТНОСТТА, РЕЗИСТЕНТНОСТТА И МОЛЕКУЛЯРНАТА
ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ *Staphylococcus aureus***

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъжданена
научна и образователна степен „доктор”**

**Научна специалност
“Микробиология”**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ
Проф. Д-р Райна Гергова, дм**

София 2021 г.

Дисертационния труд се състои от 183 стр. и е онагладен с 18 таблици и 35 фигури. В библиографията са включени 353 литературни източници от които 72 % от последните 5 години.

Експерименталната работа е извършена в Катедра по медицинска микробиология, МФ, МУ – София, Центъра по молекулярна медицина МУ - София.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от Катедрен съвет на Катедра “ Медицинска микробиология ”, състоял се на 14.04.2021г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 15.06.2021г., в 13:00ч., в I аудитория на Медицински факултет.

Научно жури:

Членове

Проф. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм - Катедра по медицинска микробиология, МФ, МУ – София - вътрешен член

Проф. д-р Таня Василева Стратева, дм - Катедра по медицинска микробиология, МФ, МУ – София - вътрешен член

Проф. д-р Ива Стефанова Христова, дмн - НЦЗПБ – външен член

Проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм- Катедра по микробиология и вирусология, МУ – Варна - външен член

Доц. д-р Елизабета Василева Бачийска, дм -НЦЗПБ – външен член

Резервни членове

Доц. д-р Весела Васкова Райкова, дм -Катедра по медицинска микробиология, МФ, МУ – София - вътрешен член

Доц. Виктория Стефанова Левтерова, дм - НЦЗПБ – външен член

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение	5
II. Цел и задачи	7
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	10
V. Изводи:.....	70
VI. Справка за приносите на дисертационния труд.....	72
VII. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд.....	74
VIII. Участия в проекти, свързани с дисертационния труд:	75
Summury.....	76

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

CDC -	Center for disease control and prevention
ECDC -	European center for disease control and prevention
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing
<i>erm(A)</i> -ген,	кодиращ метилаза, отговорен за резистентността към MLS
<i>erm(B)</i> - ген,	кодиращ метилаза, отговорен за резистентността към MLS
<i>mef(A)</i> - ген,	отговорен за ефлукс механизма при макролидна резистентност
<i>mecA</i> - ген,	отговорен за метицилиновата резистентност
MIC -	минимална инхибираща концентрация
MLS -	(M -макролиди, L-линкозамиди, S-стрептограмини)
MLST -	(Multi locus sequence typing) – Мултилокусно секвениране
PCR –	(Polymerase chain reaction), Полимеразна верижна реакция
RAPD-PCR reaction	Randomy amplification of polymorphic DNA polymerase chain
ST -	(sequence type), секвенционен тип
SAgs -	суперантигени
TSS –	токсичен шок синдром
WHO –	(World Health Organization), Световна Здравна Организация
ГДП -	горни дихателни пътища
ДДП -	долни дихателни пътища
ДДМ-	дисково-дифузионен метод
ДНК -	дезоксирибонуклеинова киселина
рРНК-	рибозомална РНК

I. Въведение

Staphylococcus aureus причинява широк спектър от инфекции, с различно протичане - от леки самоограничаващи се локални гнойни (напр кожни-пидермии или раневи) или леки лигавични възпаления с протрахирано протичане (напр респираторни) до тежки токсин-медиирани (токсичен шок синдром; хранителна токсико-инфекция, синдром на «попарената кожа») или инвазивни системни инфекции (пневмония, абсцес, остеомиелит, ендокардит, менингит, сепсис) с възможен фатален изход (Нашев ДГ. 2013; Flick MJ et al. 2014; Pereira V et al. 2009).

Предразполагащ фактор за развитие на сериозни стафилококови инфекции, в т.ч. и особено на вътрешболнични (ВБИ) такива са различни импланти, катетри и др. чужди тела в организма на пациента, които се явяват предпоставка за развитие на биофилм-асоциирана инфекция с тенденция към протрахиране и/или хронифициране и трудно терапевтично повлияване (Gergova RT et al. 2015; Lowy FD. 1998; Pereira V et al. 2009; Shakibaie MR et al. 2014).

Стафилококовите инфекции се срещат със сезонна тенденция, като най-висока е тя през лятото и най-ниска през зимата (Chen LF et al. 2013).

След въвеждане на пеницилиновата терапия настъпва успокоение, че стафилококовите и стрептококовите инфекции вече не са сериозен здравен проблем. Стафилококите започват бързо да продуцират бета-лактамаза, с която инактивират пеницилин и аминопеницилини без инхибитор, а по-късно се появява и нов механизъм на резистентност – промяна в пеницилин-свързващите протенини, при което те могат да станат резистентни към всички бета-лактамни антибиотици, т.нар. метицилин-резистентни *S.aureus* - MRSA (Shakibaie MR et al. 2014). Често този механизъм се комбинира с други, отговорни за резистентността към няколко групи антимикробни средства и с това се създава световен труднорешим проблем за лечението на инфекции, причинени от полирезистентни стафилококи, особено при нозокомиалните инфекции (Нашев ДГ. 2013; Gergova RT et al. 2016; Leclercq R et al. 2002; Shakibaie MR et al. 2014; Wong H et al. 2009). Една от причините за високата смъртност от стафилококови инфекции е наличието на метицилиновата резистентност, а другата причина е възможността за развитие на сериозни инвазивни заболявания. MRSA причинява приблизително 80,64% от инфекциите в САЩ през

2011 г. От тези инфекции 78% са настъпили в амбулаторни условия (Dantes R et al. 2013).

Във всеки един момент, от 30% до 50% от здравите възрастни хора са инфектирани със *S.aureus*, а една по-малка част от тях (около 20%) са постоянни носители (Brown et al. 2014; Lowy FD. 1998).

Може да се твърди, че всеки човек в даден момент се е срещал със *S.aureus*, тъй като серумните имуноглобулинови G (IgG) антитела срещу стафилококови антигени могат да бъдат открити във всички хора, въпреки липсата на история за стафилококова инфекция (Stentzel S et al. 2015).

Степента на разпространяване на *S.aureus* се различава на базата на етническа принадлежност, пол и възраст (Wertheim HF et al. 2005).

В настоящата работа се фокусира вниманието върху важното клинично и епидемиологично значение на този микробен вид, което налага бързо и адекватно поставяне на етиологичната диагноза с помощта на сигурни, съвременни и експресни методи. Освен оптимизиране на диагностиката и идентификацията на този важен причинител, с проучването на генетичните механизми, кодиращи факторите на вирулентност, видовете резистентност към важни антимикробни средства и сенквенционните типове при *S. aureus* се определя прецизно токсигенния арсенал, мутагенният потенциал за развитие на нови варианти и степени на антибиотична резистентност, както и клоналният произход на българските изолати през последните пет години. Едновременно с изследванията на молекулярно ниво, развитието на резистентността се мониторира и с фенотипни методи като се дава комплексна оценка на състоянието на проблема. Получената информация може да се използва за разработване на правилна регионална антибиотична политика и адекватна прогноза за емпирична терапия.

II. Цел и задачи

Цел на настоящия дисертационен труд е:

Да се проведат изследвания върху факторите на вирулентността, антибиотичната резистентност и молекулярната епидемиология на клинично значими изолати *S. aureus*.

Задачи:

1. Да се колекционират клинично-значими щамове *S. aureus*, изолирани от български пациенти с различни стафилококови инфекции.
2. Да се разработи алгоритъм за бързо откриване на *S. aureus*, както и MRSA директно в положителни хемокултури и / или при пунктати от абсцеси чрез откриване на *mecA* (кодиращ метицилинова резистентност) и специфичен ген за видова идентификация на *S. aureus* чрез мултиплекс PCR.
3. Да се установи чувствителността на стафилококовите изолати към подходящи за терапията антимикробни средства и механизмите, кодиращи клинично значимата резистентност към бета-лактами, макролиди и линкозамиди.
4. Да се проучи разпределението на важни фактори на вирулентност в български клинични изолати *S. aureus*.
5. Да препоръча адекватна терапия въз основа на анализиране чувствителността на изследваните клинични изолати през последните 5 години, особено касаеща повлияването на MRSA, доказани в инвазивни материали.
6. Да се извърши епидемиологично типизиране и да се анализира разпространението на факторите на вирулентност и основните механизми на резистентност при секвенционни типове и клонове.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За осъществяване на целите на дисертационният труд бяха използвани микробиологични и молекулярно - генетични методи за диагностициране и идентифициране на *S.aureus* директно в клинични проби от пациенти, а за допълнително охарактеризиране на изследваните изолати бяха използвани биохимични, микробиологични, серологични и отново различни варианти на молекулярно – генетичните техники за доказване на важни гени, кодиращи вирулентност, резистентност, епидемични типове и определяне на клоналност при проучвания бактериален вид.

1. Бактериални изолати и пациенти

Клинично значимите 558 изолати *S. aureus*, включени в дисертационния труд са от пациенти, изследвани през периода 2016-2020г. Болните, от които са изолирани тези патогенни агенти и чиито данни са използвани в проучването бяха разделени в различни групи според критериите: възраст, пол, клиничните диагнози.

Пациентите бяха от град София, консултирани, хоспитализирани с различни инфекции в клиниките на МБАЛ “Св. Иван Рилски”, СБАЛ Ортопедия “Бойчо Бойчев”, от различни клиники на ВМА и амбулаторно лекувани в други лечебни заведения на София.

2. Методи за диагностициране и идентификация

Бяха използвани рутинни културелни микробиологични и молекулярно - генетични методи за диагностициране и идентифициране на *S.aureus* директно в клинични проби от пациенти, а за допълнително охарактеризиране на изследваните изолати бяха използвани биохимични, микробиологични и отново различни варианти на молекулярно – генетичните техники за доказване на важни гени, кодиращи вирулентност, резистентност, епидемични типове и определяне на клоналност при проучвания бактериален вид.

- Мануални, рутинни, биохимични методи за идентифициране
- Идентификация чрез полуавтоматизираните системи Crystal GP (Becton Dickinson) и RapID STAPH System (Remel, BiotechLtd, UK)
- Микроскопско изследванес оцветяване по Грам, модификация по Atkins.

3. Определене на антимикробна чувствителност с фенотипни методи

- **Определяне чувствителността чрез стандартизиран дисково-дифузионен метод на Бауер-Кърби**

- **Определяне на Минимални инхибираща концентрации (MIC) с методите на Epsilon test (E-test) и с разреждане в бульон.**

4. Молекулярно-генетични техники

- **Изолиране на бактериална ДНК - чрез химична екстракция с търговски кит.**

- **Полимеразо-верижна реакция (PCR) - моноплекс и мултиплекс.**

- **Конвенционален мултиплекс PCR за директно откриване на гени на *S. aureus* и метицилинова резистентност в клинични проби: вхомокултури и пунктати**

- **PCR за откриване на гени за резистентност при *S. aureus* - *blaZ*, кодиращ бета-лактамаза; *mecA* и *mecC*, свързани с метицилиновата резистентност; *ermA*, *ermB*, *ermC*, *mefA*, *msrA* - отговорни за макролидната резистентност.**

- **Конвенционален мултиплекс PCR за откриване на гени на вирулентност при *S. aureus*, кодиращи предимно токсини и суперантигени: *hlg* - за γ -хемолизин, *cna* - за колаген-свързващ протеин, *tst* - токсичен шок синдром токсин-1, гени за ентеротоксините A-J: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *she*, *sei*, *sej*. Всички тези гени бяха разделени в 4 отделни микса, като всяка смес беше използвана за мултиплекс PCR.**

5. Епидемиологично типизиране

- **Епидемиологично типизиране посредством RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA)**

- **Обработка и графично представяне на резултатите от RAPD-PCR**

- **Мултилокусно секвениране, MLST (Multi Locus Sequence Typing)**

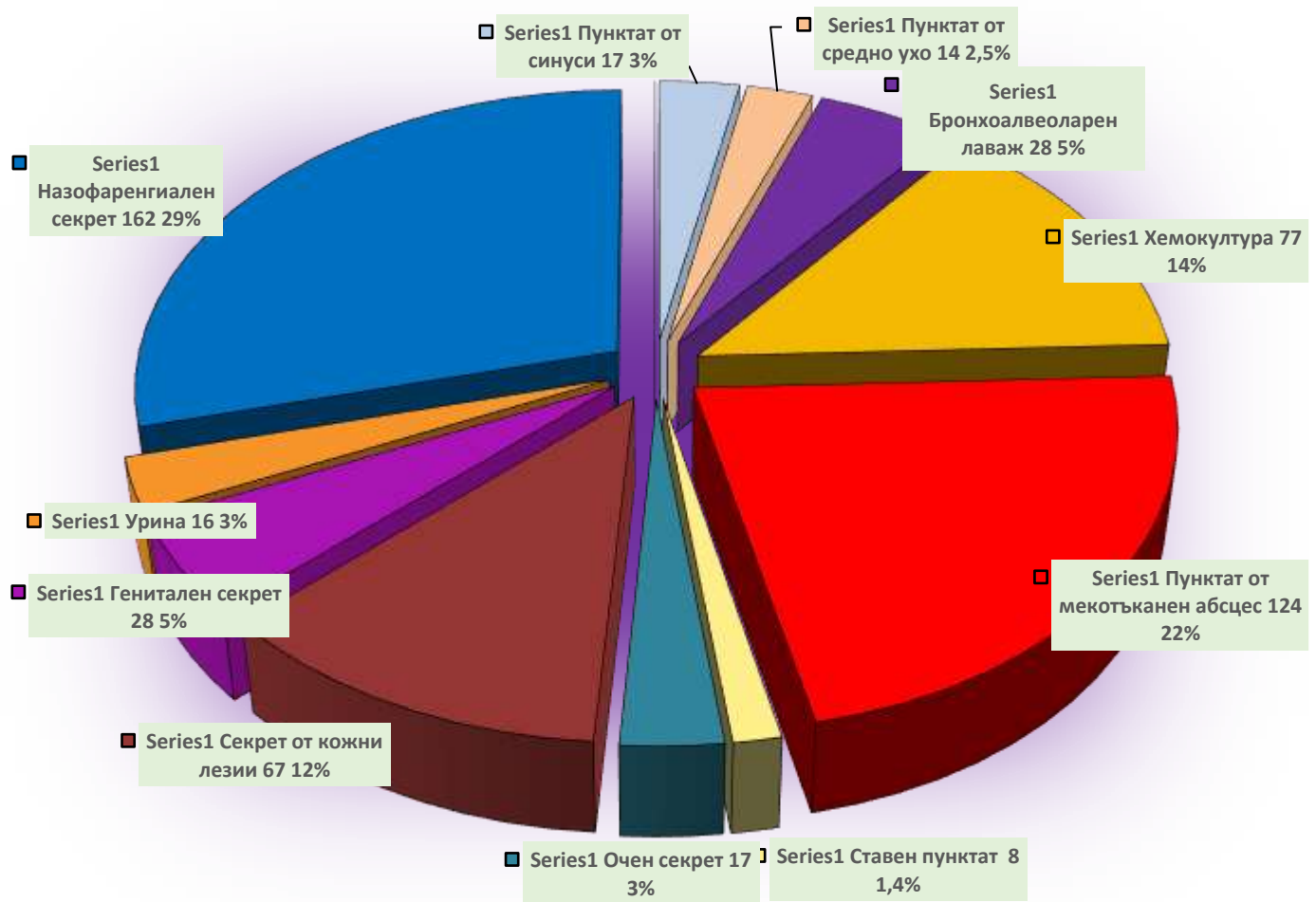
6. Статистически анализ и интерпретиране на резултатите

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Демографски и клинични данни за пациентите с изолати *S.aureus*

В проучването са включени 558 изолата *S. aureus*, изолирани през 5 годишен период 2016-2020г. от инвазивни и неинвазивни инфекции. Идентификацията беше направена най-напред чрез рутинни критерии за определяне на чиста култура от Грам-положителни коки с гроздоподобно кълъстерно подреждане и културални свойства: кремаво-златист пигмент, по-често налична бета-хемолиза, позитивни за тест на каталаза, кълмпинг-фактор и плазмокоагулаза, характерни за вида *S. aureus*. Използван е Crystal GP (Becton Dickinson) за по-подробна биохимична видова идентификация, когато е наложително при изолати от хемокултури, пунктати и други инвазивни материали. Първата група изолати от стерилни в норма ниши са от: хемокултури - (n=73; 13%), пунктати от мекотъканни абсцеси (n=128; 23%), бронхоалвеоларни лаважи (28; 5%), пунктати от синуси (n=17; 3%), пунктати от средно ухо (n=14; 2,5%), ставни пунктати (n=8; 1,5%); неинвазивните изолати от кожни и лигавични области са от: назофаренгиални секрети (n=162; 29%), кожни лезии (n=67; 12%), очни (n=17; 3%), генитални секрети (n=28; 5%), урини (n=17; 3%). Разпределението според източника на изолата е представено на **Фигура 1**.

Болните, чиито данни са използвани в епидемиологичното проучване бяха разделени в различни групи според критериите: възраст, пол и клинични диагнози. Разпределението на пациентите с изолати *S. aureus* по пол беше приблизително по равно с леко преобладаване на мъжкия пол в 54%, представено във **Фигура 2**. Има единични нови експериментални данни, че женския пол е по-устойчив на стафилококви инфекции, което до известна степен може да обясни и нашия резултат (Castleman MJ et al. 2017).

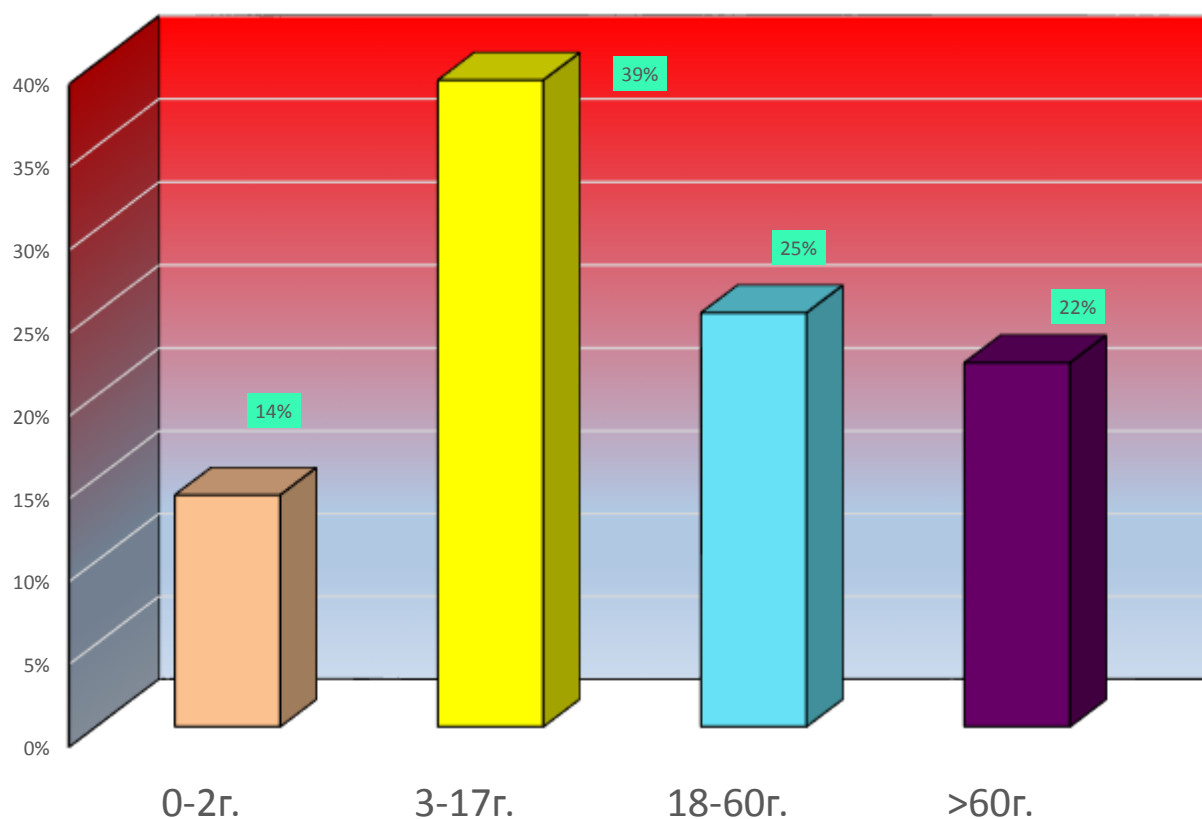


Фигура 1. Разпределение на изолатите според източника на материала.



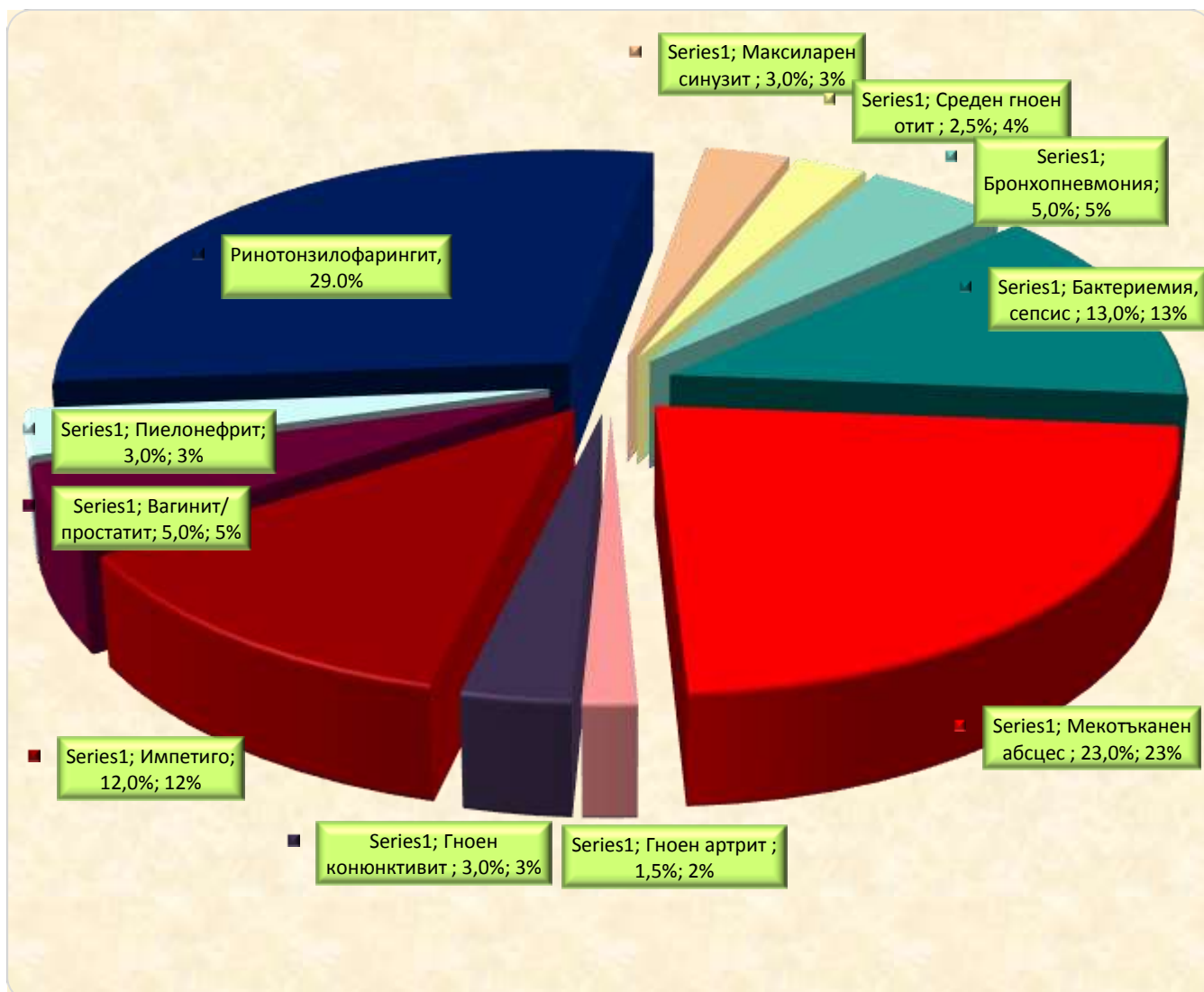
Фигура 2. Разпределение по пол на болните с инфекции, причинени от *S. aureus*.

Стафилококивите инфекции се срещат често във всички възрасти, поради различната локализация и вида на инфекцията и мястото на придобиване. Прави впечатление, от данните на **Фигура 3**, че най-много изолати има от пациенти в детско юношеска възраст, за сметка на значителния брой респираторни изолати, включени в проучването, които са чести причинители на инфекции в тази възраст (Gergova et al. 2016), както и някои от кожните лезии, свързани с хормоналните промени, които се отразяват на по-честите инфекции на космените фоликули в юношеска възраст (Jawetz Melnick, &Adelberg's, 2013).



Фигура 3. Разпределение болните с инфекции, причинени от *S. aureus* според възрастта им.

Пациентите бяха от град София, консултирани, хоспитализирани или амбулаторно лекувани с различни инфекции в клиниките на МБАЛ “Св. Иван Рилски”, СБАЛ Ортопедия “Бойчо Бойчев”, от различни клиники на ВМА, или от амбулаторни кабинети в София. Разпределението на клиничните диагнози, свързани с инфекциите, причинени от *S. aureus* е представено на **Фигура 4**.

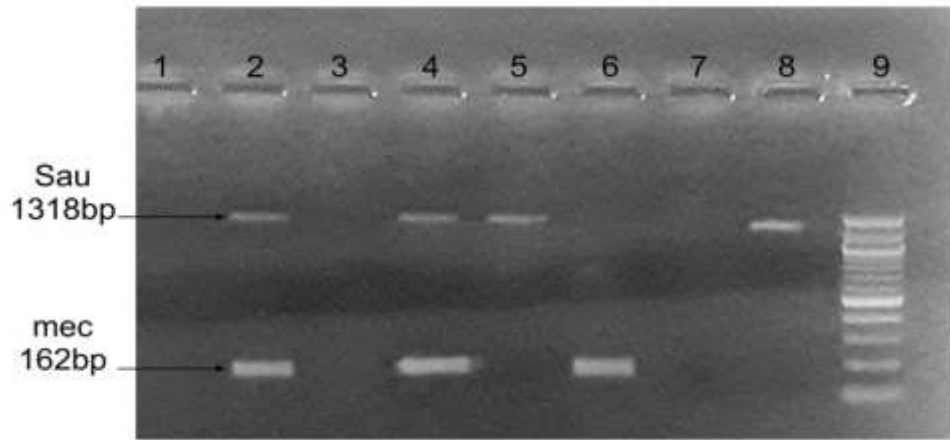


Фигура 4. Разпределение на клиничните диагнози, свързани с инфекциите, причинени от *S. aureus*.

2. Разработване на бърз молекулярно-генетичен метод за директно откриване на *S. aureus* и метицилинова резистентност в хемокултури и пунктати

За разработване на бързия генетичен метод бяха използвани директни проби от пациенти общо 127 проби от хемокултури и абсцеси, включващи 77 хемокултури показали положителен растеж в системата ВАСТЕС (Becton Dickinson) и 50 пунктата от меко-тъканни абсцеси, след микроскопското изследване, доказващо наличие на Грам-позитивни коки в клъстери в хемокултурата, респ. пунктата. Генетичното изследване

беше извършвано едновременно с рутинно микробиологично изследване на всички проби, както е описано в раздела „Материали и методи“. За доказване на вида *S. aureus* са използвани праймерите *Sau327*, *Sau1645* за видово специфичния ген.



Фигура 5. Мултиплекс PCR за откриване на *S. aureus* *mecA*. Електрофоретично разделяне на ампликони, представени в bp (*Sau* 1318bp и *mecA* 162bp).

1 - отрицателна контрола с *E. faecalis* от хемокултура; 2 - положителна проба MRSA от хемокултура; 3 - отрицателна контрола с *E. coli* от хемокултура; 4 - положителна контрола с ATCC 43300 MRSA; 5 - положителна проба MSSA в хемокултура; 6 - положителна проба само за *mecA* (MRSCoN) - *S. epidermidis* в хемокултура; 7 - отрицателна контрола със *S. ruogenes* от пунктат; 8 - положителна проба MSSA - пунктат; 9 - ДНК маркер.

За доказване на метицилиновата резистентност са използвани праймери за *mecA*. Този ген се среща доминиращо, както при вида *S. aureus*, така и при другите коагулазо-негативни стафилококи (CoNS). Сравнени са резултатите от двата метода (PCR анализ и стандартна микробна култура). Някои от резултатите, получени с PCR са представени на **Фигура 5**. От изолатите 36,4% са определени като *S. aureus*, с PCR и с културелно изследване, последвано и потвърдено от идентификация с Crystal GP (Becton Dickinson) останалите 63,6% са идентифицирани до вид с Crystal GP (Becton Dickinson) като CoNS. Ампликони на специфичния ген за *S. aureus* липсваха при всички CoNS, идентифицирани биохимично. Има пълно съвпадение на видовата идентификация на *S. aureus* с PCR и с рутинното микробиологично изследване от хемокултурите. Има разминаване само в 5,2% от пробите от мекотъканен абсцес, поради липсващ микробен растеж в някои от пробите и доказани гени с PCR за *S. aureus* и *mecA*.

По отношение на метицилиновата резистентност - 39,3% от *S. aureus* и 93,9% от CoNS, изолирани от хемокултурите бяха доказани чрез cefoxitine диск, че са метицилин резистентни, респ. MRSA и MRCoNS. ДНК екстрактите на съответните хемокултури и пункти позитивираха при PCR реакцията, както е представено в **Таблица 1**. Резултатите показаха пълно съвпадение по двата метода на доказването на метицилиновата резистентност при всички хемокултури, когато има бактериален растеж.

От 50 пунктата ние изолирахме 15,6% MRSA, докато използвайки PCR, беше определено, че MRSA са 20,8% (**Таблица 1**). Три проби от пунктатите не доведоха до растеж на микроорганизми, но бяха положителни за MRSA чрез PCR. Може да предположим, че растежа е потиснат, което често се случва в биологични течности.

Използвани са ДНК екстракти като отрицателни контроли от 23 допълнителни контролни проби от хемокултури или пункти с различни бактериални изолати (*Streptococcus pneumoniae* (n=2), *S. pyogenes* (n=3), *S. agalactiae* (n=2), *S. bovinum* (n=1), *S. sanguis* (n=2), *Enterococcus faecalis* (n=3), *E. faecium* (n=1), *Escherichia coli* (n=2), *Klebsiella pneumoniae* (n=2), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1), *Acinetobacter baumannii* (n=2), *Candida albicans* (n=1), *Candida parapsilosis* (n=1),) липсваха ампликони за *Sau* и *mecA* гени в PCR теста, т.е. пробите бяха с отрицателен резултат, което показва абсолютната специфичност на реакцията. Наличието на MSSA или *mecA* ген, респ. MRSA и MRCoNS в 127 проби на пациентски хемокултури и абсцеси са открити едновременно чрез PCR и рутинно микробно култивиране. PCR отне само няколко часа за разлика от рутинната техника. Тестването на 23 грам-положителни, грам-отрицателни и гъбични изолати от 15 различни вида от хемокултури и пункти показаха отрицателен резултат и метода имаше отлична специфичност.

PCR анализът беше по-чувствителен при откриване на MRSA в пункти от абсцеси според това проучване, отколкото рутинното микробиологично изследване. Пробата от абсцес, подобна на други биологични течности, съдържа много фактори на гостоприемника като медиатори на възпалението, система на комплемента, фагоцитни клетки с бактерициден ефект и когато живите бактериални клетки не са достатъчни или не растат *in vitro*, може да открие само бактериална ДНК (Tsatsaronis JA et al. 2014).

Таблица 1. Сравнение на резултатите при откриване на метицилинова резистентност чрез използване на PCR и рутинно тестване

Група I. Стафилококови изолати от 77 положителни на растежа хемокултури	Идентифициране чрез PCR	Идентифициране чрез рутинен метод	Резистентност към метицилин (<i>mecA</i>), открита чрез PCR	Резистентност към метицилин, открита чрез Цефокситин диск
<i>S. aureus</i>	28	28	11	11
<i>S. epidermidis</i>		42	39	39
<i>S. haemolyticus</i>		2	2	2
<i>S. capitis</i>		1	1	1
<i>S. cohnii</i>		2	2	2
<i>S. lugdunensis</i>		1	1	1
<i>S. warneri</i>		1	1	1
II група. Стафилококови изолати от 50 пунктати на абсцес	Идентифициране чрез PCR	Идентифи- циране чрез рутинен метод	Резистентност към метицилин (<i>mecA</i>), открита чрез PCR	Резистентност към метицилин, открита чрез Цефокситин диск
<i>S. aureus</i>	48	45		10
<i>S. epidermidis</i>		1		
<i>S. haemolyticus</i>		1		1

PCR анализът е по-чувствителен при откриване на MRSA от биологични течности, особено когато живите бактериални клетки не са достатъчни или не растат *in vitro*. С настоящото проучване беше установена бактериемия от силно вирулентните *S. aureus* в повече от 36% от изследваните с PCR хемокултури. Изследваните с PCR абсцеси със същата етиология бяха 96%, което показва значимостта на бързата диагноза. MRSA и MRCoNS са основна причина за животозастрашаващи инфекции на кръвоносната система като ендокардит, постоперативни инфекции на меките тъкани, остеомиелит, септичен артрит, метастатични абсцеси, особено нозокомиални, и представляват глобален проблем за общественото здраве (Ivić I et al. 2013; Mehrshad S et al. 2016; Tevell S et al. 2017). Инфекциите, причинени от този вид са свързани най-вече с чужди тела в

организма - импланти, изкуствени сърдечни клапи, интраваскуларни катетри, ставни протези, черепно-мозъчни шънтове. Предпоставка за колонизацията и участието в протрахиранни инфекции на този вид и на подобния му *S. haemolyticus* е възможността им да продуцират извънклетъчна слуз и протеино-свързващи вещества, които стимулират лесното образуване на биофилм (Schleifer KH & Kloos WE. 1975; (Czekaj T et al. 2015; Mitova Y et al. 2017; Nguyen TH et al. 2017; Seng R et al. 2017; Usha MG et al. 2013; WiderStröm M. 2016).

Други сравнително чести причинители на бактериемии от тази група са *S. lugdunensis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. conhii*. Повечето изолати *S. lugdunensis* произхождат от абсцеси, целулит, остеомиелит или други рани (Bieber L. 2010; Lucas A et al 2017). *S. warneri* се изолира по-рядко от пациенти с изкуствени сърдечни клапи, при извличане на цереброспинална течност, интраваскуларни катетри, подобно на другите представители на CoNS, но са съобщени някои случаи на сепсис и при имунокомпетентни пациенти с липса на рискови фактори, причинени то този вид (Ivić I et al. 2013). Друг рядък причинител, който може да бъде изолиран от пациенти с рискови фактори, е *S. capitis*. Има някои съобщения за неговата роля в перитонеален диализен перитонит, пейсмейкър и протезно-клапанния ендокардит, менингит, остеомиелит и други (Bianco C et al. 2014; Tevell S et al. 2017). Определен е клонът *S. conhii subsp. cohnii* hu-01 се изолира от болнична среда с нарастваща честота в сравнение с други CoNS в Китай и Полша през последните години (Hu XJ et al. 2014; Szewczyk EM et al. 2013).

Нараства броят на болнично-придобитите инфекции, особено тези на сърдечно-съдовата система от *Staphylococcus spp.*, През последните години това е тясно свързано с разпространението на гена *mecA* в щамове, живеещи в болничната среда, което улеснява способността им да оцелеят там (Mehrshad S et al. 2016; Sipahi OR et al. 2017; Pérez-Montarelo D et al. 2017). В настоящото проучване, *mecA* се открива в 77,9% от положителните хемокултури със стафилококови изолати. Съответно бактериемията със стафилококова етиология се усложнява от появата на резистентни на метицилин патогени. Това е още една причина да се използва бърз PCR анализ за стриктно откриване на *mecA* както в MRSA, така и в MRSCoNS инвазивни изолати. Този метод е

много полезен за правилния избор на етиологична терапия, която е изключително важна за ликвидиране на резистентните причинители и спасяване живота на пациентите.

Обобщение

За първи път в България е разработен и апробиран в практиката нов алгоритъм за бързо откриване на *S. aureus* чрез PCR на MRSA и MRSCoN директно в положителни хемокултури и / или при пунктати от абсцеси чрез откриване на *mecA* (кодиращ метицилинова резистентност) и специфичен ген за видова идентификация на *S. aureus*. Наличието на *mecA* ген, респ. MRSA и MRCoNS в 127 проби на пациентски хемокултури и абсцеси са открити едновременно чрез PCR и рутинно микробно култивиране. С генетичния метод бяха доказани етиологични агенти и в в 5,2% от пунктатите от мекотъканен абсцес, при които беше потиснат микробния растеж. PCR отне само няколко часа за разлика от рутинната техника и показва отлична чувствителност и специфичност. Методът дава ценна информация за избор на ранна етиологично насочена терапия при тежко болни пациенти.

3. Определене на антимикробната чувствителност при *S. aureus* и клинично значимите механизми на резистентността

3.1. Определяне на чувствителността и интерпретация на резултатите

С помощта на дисково-дифузионния метод, а за някои групи и с MIC техники бяха определени резултатите от антимикробната чувствителност към 12 антимикробни препарати, представени на **Таблицы 2 и 3** и **Фигура 6**. Почти всички тествани 558 щама *S. aureus* бяха резистентни към пеницилин (96,06%), а 10,93% от тях бяха цефокситин, съответно метицилин резистентни. Нивата на резистентност към гентамицин, левофлоксацин, тетрациклин, хлорамфеникол и комбинацията триметоприм / сулфаметоксазол, бяха както следва: 5,91%, 1,30%, 10,04%, 5,20% и 5,73% са ниски и не се отразяват съществено при избора на терапията

Таблица 2. МІС към различни групи антимикробни средства.

Антимикробен агент	МІС	МІС ₉₀ *	R** (%)
Erythromycin	0.75 - >256 mg/L	4 mg/L	34,05
Clindamycin	0.25 - >256 mg/L	2 mg/L	23,30
Gentamicin	0.125 - 8 mg/L	0.5 mg/L	5,20
Tetracyclin	0.125 - >256 mg/L	4 mg/L	10,04
Trimethoprim/ sulphamethoxazole	0.125 - 4 mg/L	0.5 mg/L	5,73
Tigecycline	0.064 - 0.25 mg/L	0.125 mg/L	0
Vancomycin	0.5 - 2 mg/L	1mg/L	0

* МІС₉₀, най-ниското разреждане на изпитвания антимикробен агент, което инхибира 90% от изследваните изолати; **R, резистентен;

Не се установиха резистентни щамове към ванкомицин, тигециклин или линезолид. Значително по-висока резистентност се наблюдаваше срещу групата на макролиди-линкозамидните (MLSB) антибиотици. Нивата на еритромицин и клиндамицин нечувствителните през периода 2017 - 2020 г. бяха определени в 34,05% и 23,30% от тестваните стафилококови изолати. Определените МІС на тези антимикробни средства бяха в диапазона от 0,25- \geq 256 mg/L за еритромицин и между 0,25 до \geq 256 mg/L за клиндамицин и резултатите бяха съпоставими с тези от дифузионно-дисковия метод на Бауер-Кърби (Таблицы 2 и 3). Беше отчетена известна разлика в чувствителността на изолати *S. aureus* от хемокултури и абсцеси (Таблица 3).

Таблица 3. Определяне и сравнение на резистентността при изолати *S. aureus* от хемокултури и от абсцеси с MIC към различни групи антимикробни средства

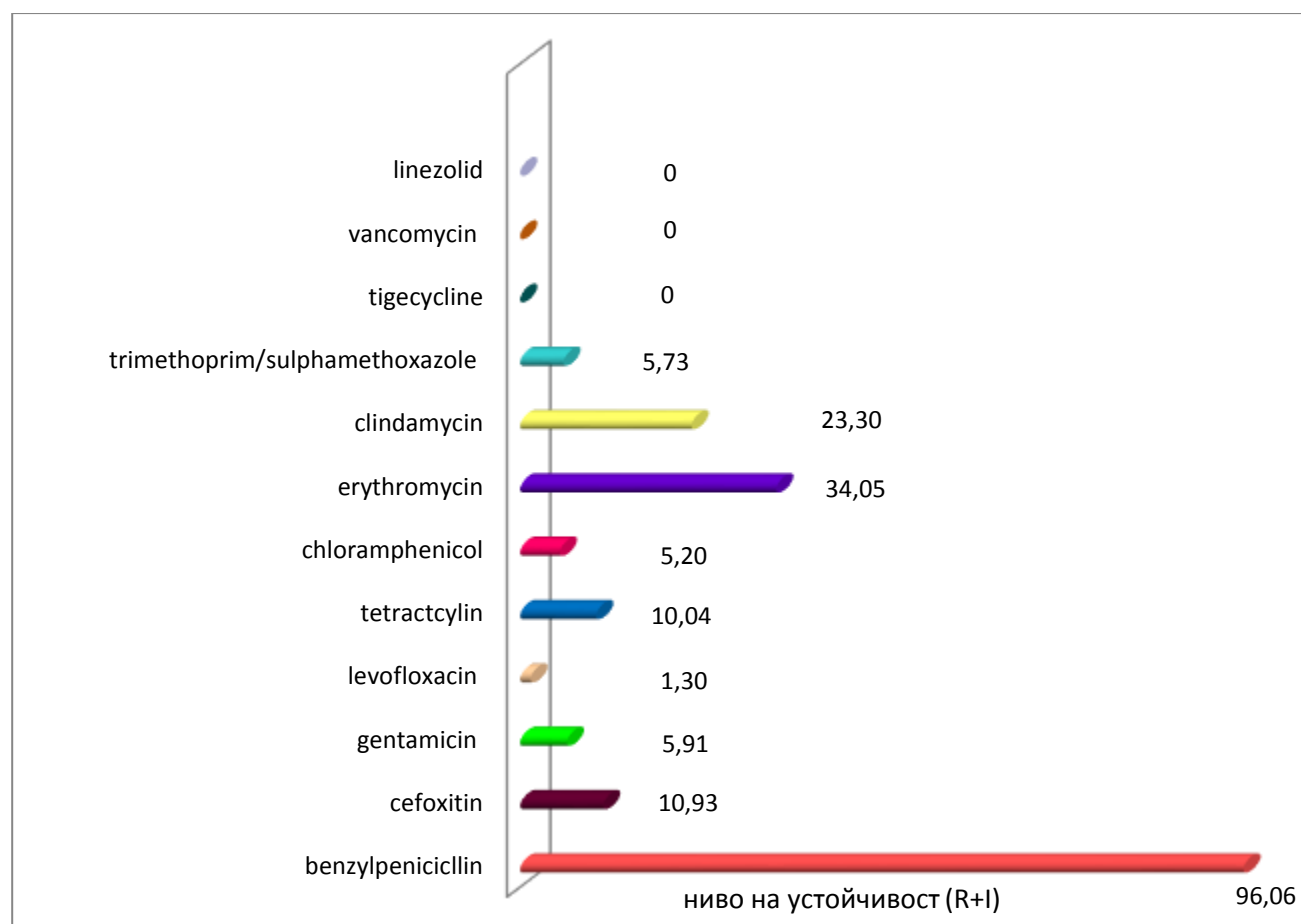
Антимикробен агент Брой тествани n=127	<i>S. aureus</i> изолати от Група I. хемокултура резистентни / общ брой (%) (MIC mg/l)	<i>S. aureus</i> изолати от Група II. абсцес резистентни/ общ брой (%) (MIC mg/l)	P value*
Benzylpenicillin	22/28 (89,29)	41/45 (91,11)	0,1679
Cefoxitin	11/28 (39,29)	7/45 (15,56)	<u>0,0100</u>
Oxacillin	(4 - ≥ 256)	(4 - 32)	
Erythromycin	8/28 (28,57) (0,125 – ≥ 256)	17/45 (37,78) (0,25 – ≥ 256)	0,4583
Clindamycin	5/28 (17,86) (0,125 – ≥ 256)	11/45 (24,44) (0,125 – ≥ 256)	0,5730
Gentamicin	3/28 (10,71)	1/45 (2,22)	0,1543
Chloramphenicol	0/28 (0)	1/45 (2,22)	1,0000
Tetracyclin	4/28 (14,29)	2/45 (4,44)	0,1951
Minocycline	0/28 (0) (0,125 – 0,5)	1/45 (2,22) (0,125 - 8)	1,0000
Trimeth/sulph**	3/28 (10,71)	3/45 (6,67)	0,6692
Levofloxacin	0/28 (0) (0,125 – 0,5)	1/45 (2,22) (0,125 – 8)	1,0000
Vancomycin	0/28 (0) (1 - 2)	0/45 (0) (1 - 2)	1,0000
Linezolid	0/28 (0) (1 - 2)	0/45 (0) (1 - 4)	1,0000
Tigecycline	0/28 (0) (0,064 – 0,25)	0/45 (0) (0,064 – 0,25)	1,0000

*сигнификантна разлика ($p < 0.05$), изразено с подчертаните цифри

** Trimethoprim/sulphamethoxazole

Резистентността към пеницилин е известна отдавна и прогресира постепенно в нашата страна в съответствие с по-ранни данни от 2014 г., когато българските стафилококови изолати са били 90% резистентни (Gergova R et al 2016). Същата честота на настоящата резистентност (96,06%) е установена през последните години и при турски педиатрични

пациенти с НА инфекции (Karbuз A et al. 2017). Основният механизъм, кодиран от *blaZ*, свързан с резистентността към пеницилини, е продукцията на бета-лактамази, които подобно на ензимите на *Moraxella catarrhalis* са екстрацелуларни и разрушават бета-лактамния пръстен, т.е. активния център на антимикробните агенти и може да попречи на успешното лечение на респираторни итфекции, причинени от други патогенни бактерии в комбинация със стафилококи, или респ. мораксели (Gergova R et al 2016; Gergova R & Markovska R 2020).

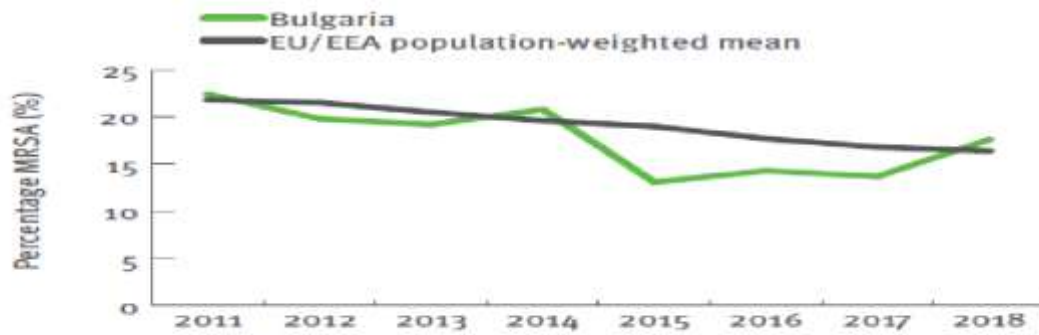


Фигура 6. Резистентност при 558 изолата *S. aureus*, изразена в проценти, към антибиотици от 12 различни антимикробни групи

Географското разпределение на MRSA, породено от *mesA* в момента варира в много широк диапазон според мястото, на което е била придобита инфекция, както и дали е СА или НА. Данните варират от 2,9% - 8,7 % в турските здрави назални носители до 36,2% от турските болнични изолати (Dagi HT et al. 2015; Karbuз A et al. 2017, Sipahi OR

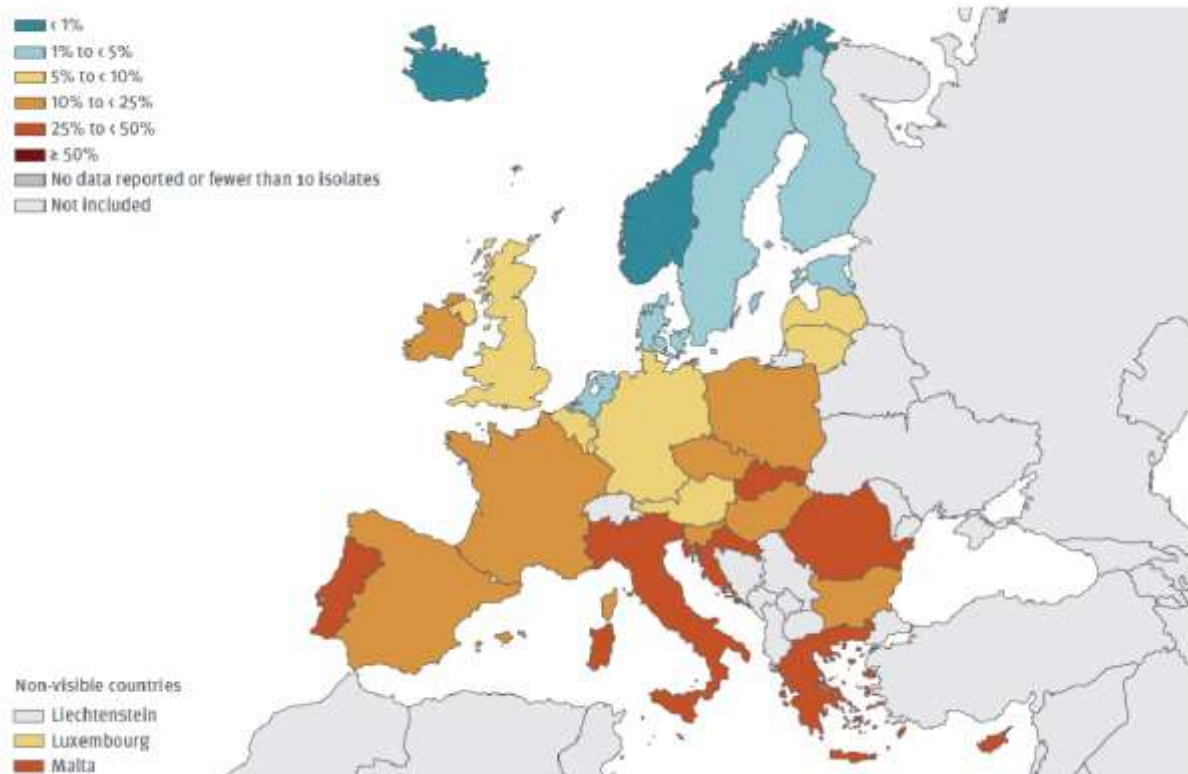
et al. 2017), 25% от болничните изолати в Непал (Adhikari RP et al. 2017), 38,7% са изолираните в Колумбия (Arias LFC et al. 2016), а в 39,6% в Индия (Deodhar D et al. 2015), и в 40,9% до 48% от иранските НА инфектирани пациенти се доказват MRSA (Abbasi M et al. 2017; Sabouni F et al. 2014), около 46% са MRSA в американските болници (Sader HS et al. 2017), 47% MRSA се докладват и от болниците в Гана (Asante J et al. 2019), MRSA са били 52% в ХИВ-позитивни лица за разлика от 20,80%, изолирани от ХИВ-негативни в Етиопия (Manilal A et al. 2019), 44% MRSA в животински изолати са установени в Нигерия ((Nwaogaraku CN et al. 2019) и 55% в китайските болници (Liang Y et al. 2019). Степента на метицилинова резистентност за български изолати *S. aureus* от амбулаторни и хоспитализирани болни през 2016-2020 г., установена в това проучване, е 10,93% и може да се отбележи, че липсва тенденция за увеличаване през последните 5 - 10 години, сравнявайки новите данни за периода и с тези за 2014 г. от предишно българско проучване (Gergova R et al 2016). При анализиране на данните за инвазивните български изолати MRSA, публикувани от Европейския център за превенция и контрол на заболяванията през периода 2011г. и 2018г (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>) се установява, че има флукутираща честота от 15 до 22%, подобна на тази, която установяваме и с това проучване за периода 2016 - 2020г. - около 20% за инвазивните изолати и около 9-10% за неинвазивните (**Фигура 7**) Нашите резултати за инвазивните изолати показват леко по-високи стойности от тези на Европейския център за превенция и контрол на заболяванията (ECDC), без значима разлика, докато за неинвазивните стойностите са двойно по-ниски (**Фигура8**).

Staphylococcus aureus. Percentage (%) of invasive isolates with resistance to meticillin (MRSA), Bulgaria and EU/EEA population-weighted mean, 2011–2018

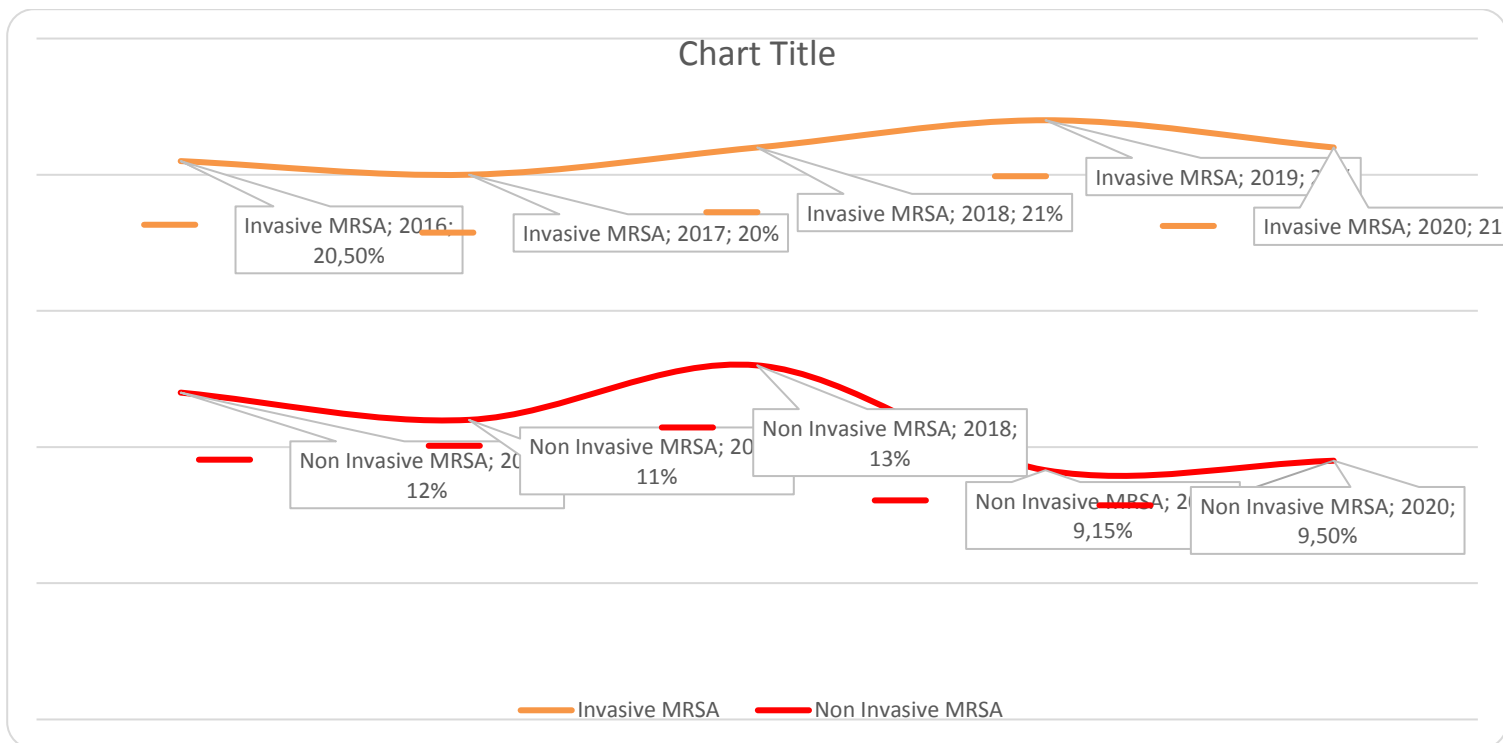


Фигура 7 А.

Figure 3.25. *Staphylococcus aureus*. Percentage (%) of invasive isolates with resistance to meticillin (MRSA), by country, EU/EEA countries, 2018



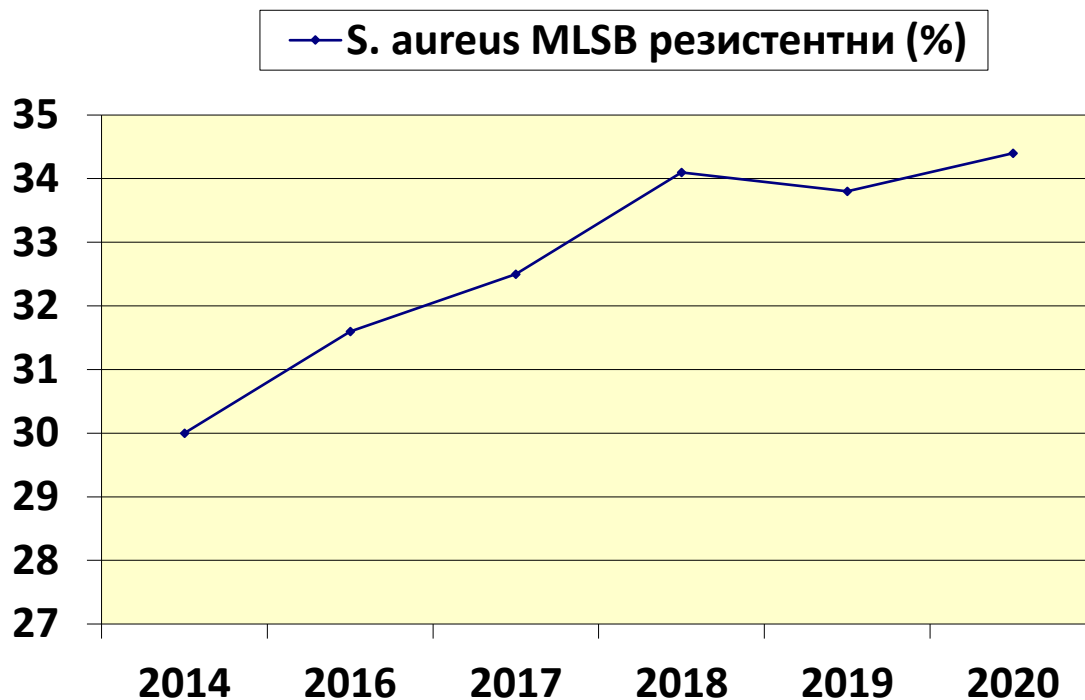
Фигура 7 В. Данни от ECDC за честотата на инвазивните MRSA изолати през последните години



Фигура 8. Честотата, с която е установена метицилинова резистентност в български инвазивни и неинвазивни изолати през периода 2016-2020г. (в %).

Макролидната резистентност в българските стафилококови изолати става проблематична за този период, като повече от 1/3 от изследваните *S.aureus* бяха вече резистентни към тази група лечебни средства, а близо ¼ са резистентни и към двете групи - макролиди и линкозамиди. В изолати от хемокултури беше установена резистентност към еритромицин в 28,57% и към клиндамицин в 17,86%, докато в пункти от абсцеси до 37,78% и респ. 24,44%. Други автори също съобщават за драматично увеличение на комбинираната резистентност към макролиди и линкозамиди, особено в изолати от мекотъканни стафилококови инфекции (Stein M et al. 2016), което затруднява лечението с подходящия за терапия на абсцедирани инфекции клиндамицин.

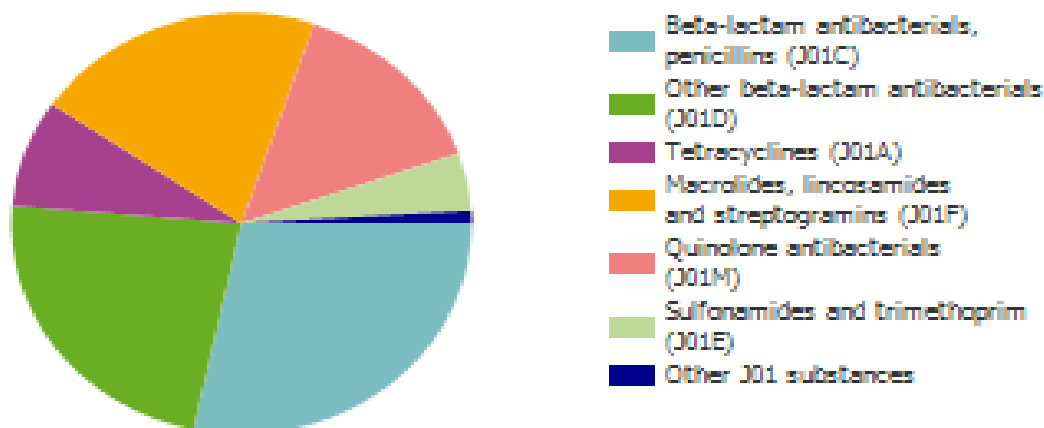
Резистентността към MLS антибиотици (според EUCAST) в българските клинични изолати *S. aureus* се повишава от 30% през 2014 г. (Gergova R et al. 2016) до 34% през 2018 - 2020 г., като се наблюдава по-бързо повишаване на нивото на тази резистентност през периода 2014 - 2018г (**Фигура 9**).



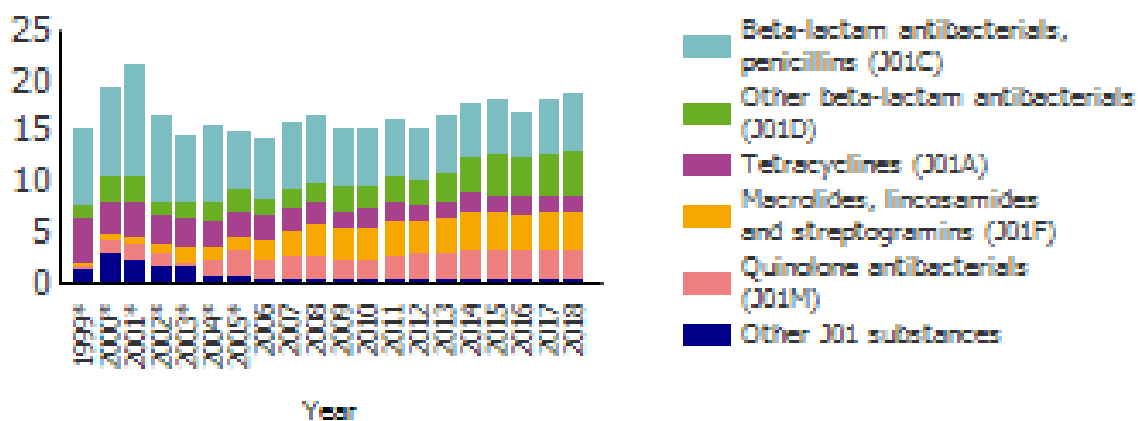
Фигура 9. Разпространение на макролид - резистентните щамове *S. aureus* през периода 2016-2020г., сравнени с предишни данни (Gergova R et al., 2016) за 2014г.

В България консумацията на макролидни антимикуробни средства е на второ място след тази на бета-лактамни антибиотици и се засилва през последните години по данни на EuroStat (**Фигура 10**), което може да обясни увеличените нива на резистентност. (<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/country-overview>).

Distribution of the consumption in the community (primary care sector) of ATC group J01



Trend of the consumption in the community (primary care sector) of ATC group J01 expressed in DDD per 1000 inhabitants and per day



Фигура 10. Консумацията на макролидни антимикробни средства през последните 20 години, с особено увеличаване през последните 10г. по данни на Eurostat 2018–<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/country-overview>

72,13% от MRSA бяха едновременно резистентни и към макролиди (**Таблица 4**). Настоящите резултати потвърждават други данни за значително преобладаване на макролидна резистентност в MRSA, тъй като е известно, че резистентността към множество антибиотици възниква по-често в MRSA щамовете, отколкото в MSSA (Karbuз A et al. 2017; Li T et al. 2017; Sarrou S et al. 2019; Adhikari RP et al. 2017; Khoshnood S et al. 2019). Установената от нас разлика за макролидната резистентност

при MRSA, която достига 72,13% срещу 29,38% при MSSA(P=0,0026) е статистически значима (Таблица 4). Подобни са докладваните данни от гръцко проучване (Sarrou S et al. 2019), където отново има статистически достоверна разлика на макролидната резистентност при MRSA (58,6%) и MSSA(20,7%) (P = 0,002). Значителни разлики в географското разпределение на тази резистентност са установени сред клиничните изолати *S.aureus* през този период. Сегашното ниво на макролидна резистентност от 34,05% в български изолати (и за двете групи пациенти амбулаторни и хоспитализирани), е сходно, но е по-ниско от това в Централна Гърция, където се открива в 40,2% (Sarrou S et al. 2019). До 48,4% е била тази резистентност при ХИВ-позитивни пациенти в Етиопия (Manilal A et al. 2019), а 64,1% от изолатите в китайските болници са били макролид - резистентни (Liang Y et al. 2019). 79% от изолатите *S.aureus* в болница в Измир през 2011–2012 г. са били макролид - резистентни (Uzun B et al. 2014) и резистентността е достигнала през последните години до впечатляващото ниво от 91% в Токио, Япония (Shoji K et al. 2015).

Таблица 4. Разпределение на макролидната резистентност в MRSA и MSSA

MRSA N=61	MSSAN=497	
Макролид резистентни <i>S.aureus</i>	Макролид резистентни <i>S.aureus</i>	P value*
N=44 (72,13%)	N=146 (29,38%)	<u><0,0001</u>

*сигнификантна разлика (p < 0.05), изразено с подчертаните цифри

Обобщение

Беше установена най-висока резистентност към пеницилин (96,06%), а в 10,93% и към цефокситин, т. нар. метицилинова резистентност. Притеснително нарастване на макролидната до 34,05% и линкозамидната резистентност до 23,03% беше отчетена за периода. Нивото на макролидната резистентност беше значително по-високо в MRSA (72,13%) отколкото в MSSA (29,38%) ($P < 0,0001$). Беше отчетена известна разлика в чувствителността на изолати *S. aureus* от хемокултури и абсцеси. Докато метицилиновата резистентност преобладаваше в изолатите от хемокултури, тази към макролиди-линкозамиди се срещаше по-често в изолати от абсцеси. В изолати от хемокултури беше установена резистентност към еритромицин в 28,57% и към клиндамицин в 17,86%, докато в пунктати от абсцеси до 37,78% и респ. 24,44%. Нивата на резистентност към гентамицин, левофлоксацин, тетрациклин, хлорамфеникол и комбинацията триметоприм / сулфаметоксазол, бяха както следва: 5,91%, 1,30%, 10,04%, 5,20% и 5,73% и поради ниските стойности засега не се отразява съществено при избора на терапията. Не бяха установени резистентни стафилококи към ванкомицин, тигециклин или линезолид.

3.2. Проучване на клинично-значимите механизми на резистентност към пеницилин, метицилин, макролиди и линкозамиди.

3.2.1. Механизми на резистентност към бета-лактами/пеницилин, метицилин.

След амплифицирането на седем гена, които могат да се видят в Таблица 6, определихме потенциалните механизми за клинично значима резистентност към бета-лактами и MLSB антибиотици. 96,06% от 558 *S. aureus*, което представлява 536 пеницилин-резистентни тествани изолата съдържат *blaZ* ген, свързващ се с пеницилинова резистентност. Всички метицилин-резистентни 61 щама *S. aureus* (10,93% от сбирката) позитивираха за *mecA* гена. Не беше установен *mecC* ген, на който да се дължи метицилиновата резистентност при българските изолати MRSA.

3.2.2. Механизми на резистентност към макролиди и линкозамиди.

Тествани бяха 558 изолата с фенотипни методи (Фигури 11 и 12). От тях бяха установени 190 макролид резистенти и те се разделят според MLS фенотипа така, както са представени на Таблица 5, като преобладава cMLS в 58,95%. Другите фенотипове бяха установени, както следва: iMLS в 38,42% и MS най-рядко в 2,63%.



Фигура 11. Дифузионно-дисков метод за установяване на антиминокробната чувствителност и доказване на iMLS фенотип в български клинични изолати *S. aureus*.



Фигура 12. Определяне с E-тест метод за установяване на чувствителността към антиминокробнаи средства при колекционираниите щамове *S. aureus*

Таблица 5. Разпределение на гените за резистентност в 138 макролид-резистентни *S. aureus* според MLS фенотипа и епидемиологията на инфекцията

Гени	cMLS фенотип n= 112	iMLS фенотип n= 23	MS фенотип n=3	P value * между cMLS и iMLS	Общ брой позитивни
<i>ermA</i>	20	3	2	0,7643	25
<i>ermB</i>	16	2	1	0,7374	19
<i>ermC</i>	33	5		0,6126	38
<i>msrA</i>	0	4		0,0007	4
<i>mefA</i>	0	8		<u>0,0001</u>	8
<i>ermA + ermB</i>	17	0		0,0766	17
<i>ermA + ermC</i>	19	0		<u>0,0429</u>	19
<i>ermB+ ermC</i>	4	1		1,0000	5
<i>ermA+ermB+ermC</i>	3	0		1,0000	3

Гени	СА	НА	P value * между СА и НА	Общ брой позитивни
<i>ermA</i>	15	10	0,0348	25
<i>ermB</i>	8	11	0,0001	19
<i>ermC</i>	11	27	<u>0,0001</u>	38
<i>msrA</i>	3	1	0,5307	4
<i>mefA</i>	5	3	0,1359	8
<i>ermA + ermB</i>	2	15	<u>0,0001</u>	17
<i>ermA + ermC</i>	8	11	0,0001	19
<i>ermB+ ermC</i>	0	5	0,0001	5
<i>ermA+ermB+ ermC</i>	0	3	0,0044	3

*Подчертаните цифри са сигнификантни ($p < 0,05$).

От макролид резистентите са проучени 138 щамове за наличието на генетични механизми, кодиращи резистентност. Данните за доказаните *erm*, *msrA* и *mef* гени са дадени в **Таблица 5**. Тези резултати са в контраст с данните от Япония, където са открити преобладаващи iMLS (Shoji K et al. 2015), но са в съответствие с други доклади от Корея (Khodabandeh M et al. 2019), Уругвай (Pardo L et al. 2020) и някои европейски страни (Schmitz FJ et al. 2000). Най-разпространените механизми на резистентност към макролидната и линкозамидната група антикробни средства в тестваните щамове са *erm* гените, предимно *ermA* (64/138; 46,38%) и *ermC* (n=65/138; 47,10%) (**Таблица 5**). *Erm* гените са **отговорни за продукцията на метилаза, водеща до по-високи нива** на резистентност, включително за важният при тежки инфекции на меките тъкани клиндамицин. Данни от различни изследвания, потвърждават нашите резултати за преобладаване на разпространението на *ermA*, и *ermC* последвани от *ermB* самостоятелно или в комбинации. В тези проучвания *msrA* и *mefA* са липсващи или с незначителна честота (Abbasi M et al. 2017; Khodabandeh M et al. 2019; Shahi F et al. 2015; Sarrou S et al. 2018; Uzun B et al. 2014). За разлика от тях в настоящия дисертационен труд *msrA* и *mefA* бяха установени в 2,90% и 5,80%, съответно. *ErmB* гени в настоящето проучване се откриват в значителна част от изолатите (n=39/138; 28,26%). Някои автори съобщават, че нито един от MRSA изолатите не притежава *ermB* ген (Khoshnood S et al. 2019), но настоящето проучване не потвърждава това. Резултатите от нашата работа (**Таблица 5**) се доближават до някои данни от нов доклад от 2020г. за механизмите на резистентност към макролиди в болница на Уругвай (Pardo L et al. 2020) и до известна степен данните от предишно Европейско многоцентрово проучване (Schmitz FJ et al. 2000) относно значително **преобладаване на *ermA* vsMLS**, но за разлика от други предишни данни, ние наблюдаваме връзка между **комбинацията от *ermA*+*ermC* и cMLS** ($P < 0,05$). Най-разпространени са *erm* генотиповете, свързани с присъствието основно на *ermA* и *ermC* гени, и по-рядко с *ermB*. Разпределението на гени за резистентност според фенотипа на MLS и вида на инфекцията (СА или НА), са представени на **Таблица 5**. Обикновено се наблюдава самостоятелно ген *ermC*, последван от самостоятелно представен *ermA*, и двата значително по-често се срещат в стафилококови изолати със cMLS фенотип ($P=0,0001$). Най-честите комбинации *ermA* + *ermC* и *ermA* + *ermB*, бяха детектирани

само в sMLS щамове ($P=0,0001$), но *mefA* беше преобладаващ в групата с iMLS ($P = 0,0068$) с доказана статистическа достоверност. Изолатите с MS фенотип бяха само 3 бройки и резултатите от генетичното им проучване, не бяха подложени на статистическа обработка. Само два резистентни генотипа: *ermC* ($P=0,0065$) и *ermA + ermB* ($0,0015$) са демонстрирали статистически достоверно преобладаване в стафилококови изолати от лежачо болни пациенти.

Обобщение

По-голямата част от българските макролид резистентни *S. aureus* проявяват sMLS фенотип в 58,95%, докато iMLS е в 38,42%, а MS в 2,63%. Най-разпространените механизми на резистентност към макролидната и линкозамидната група антикробни средства в тестваните щамове са *erm* гените, предимно *ermC* (47,10%), *ermA* (46,38%) и *ermB* (28,26%) самостоятелно или в комбинации. Най-честите комбинации *ermA + ermB* ($P=0,0001$), и *ermA + ermC* ($P=0,0001$) бяха доказани само в sMLS щамове, а *mefA* генът беше типичен за iMLS ($P = 0,0068$). Само два резистентни генотипа: *ermC* ($P=0,0065$) и *ermA + ermB* ($0,0015$) са показали, че статистически са по-често срещани в изолати от болнични пациенти със стафилококови инфекции.

4. Проучване на вирулентността чрез откриване на важни гени детерминанти.

За доказване на гените за вирулентност бяха разработени варианти на мултиплекс PCR за следните групи фактори: *hlg* - ген за γ -хемолизин, *sna* -гена колаген-свързващ протеин, *tst* - ген за токсичен шок синдром токсин-1, гени за ентеротоксините A-J: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *she*, *sei*, *sej*. Всички тези гени бяха разделени в 4 отделни микса, така, че да бъдат подходящи условията за амплифициране на всички праймери, участващи в реакцията мултиплекс PCR.

Резултатите са представени на **Таблица 6**, **Таблица 7** и **Фигура 13**. Открихме, че ***hlg* е най-разпространеният ген** (близо до 100%) във всички групи с различен произход (инвазивни или неинвазивни изолати) и независимо от начина на придобиване (придобити в общността или свързани със здравните грижи). Той беше открит без значима разлика в пациентите с инфекции, придобити в обществото и болнично придобити, както и при инвазивни и неинвазивни инфекции (**Таблица 6**). Този ген кодира синтеза на извънклетъчен токсичен полипептид (образуващ пори гама-хемолизин) със силна цитолитична активност срещу широк спектър клетки (Aman MJ and Adhikari RP. 2014), т.е уврежда човешки и заешки еритроцити и проявява токсичност срещу всички левкоцити (неутрофили, моноцити, гранулоцити и макрофаги). В експериментален модел проявява и дермонекротична и летална активност в зависимост от дозата. Тази група хемолизини са двукомпонентни и се състоят от полипептиди, обозначени като S (с бавно действие, HlgA или HlgC) и F (с бързо действие, HlgB) (Vandenesch F et al. 2012). Има данни, че *hlg* и съответно неговият извънклетъчен продукт допринася за отклонения в имунния отговор и потенциалното стафилококово оцеляване в биологични течности. Този двукомпонентен порообразуващ токсин във високи концентрации има дермонекротична и летална активност в експериментален животински модел и се проучва като потенциален компонент на многовалентна ваксина (Aman MJ and Adhikari RP. 2014). Нашите резултати са сходни с данните от САЩ и Иран, които отчитат високо присъствие на *hlg* сред изолатите на MRSA, но и при MSSA (Abbasi M et al. 2013; Shukla SK et al. 2010).

Обратно, генът *сна*, кодиращ колагенов адхезин с инхибиторен ефект върху комплементарната активация беше открит само при около 14% от всички изследвани български стафилококови щамове. При изолатите от хоспитализирани пациенти *сна* беше доказан със статистически значима разлика ($P=0,0001$) по-често в 24%, докато при амбулаторните беше едва в 3% (**Таблица 6**). **Честата корелация на *сна* с инвазивните изолати (Таблица 7) предимно при болни ($P=0,0001$)** показва, че *сна* кодира продукт, придаващ по-висок специфичен вирулентен потенциал, което се докладва и от други автори (Melania Cruciani et al. 2017; Nayeli Alva-Murillo et al. 2017). *S. aureus* може да произвежда колагенов адхезин (CNA), за да взаимодейства с този важен и задължителен протеин - колагена при хората и животните. Този адхезин има водеща роля в колонизацията, удължаването и персистирането на инфекцията в човешкия гостоприемник. Друг механизъм на действие на колагенов адхезин CNA е инхибирането на активирането на комплемента, съответно на имунния отговор. При експериментални животински модели е установено прогресиране на бактериални инфекции, дължащи се на стафилококов колагенов адхезин CNA или други подобни адхезини, като: YadA от *Yersinia enterocolitica*, ACE от *Enterococcus faecalis*, адхезин ACM от *E. faecium* и CNM от *Streptococcus mutans* (Madani A et al. 2017; Giampiero Pietrocola et al. 2017). В настоящият дисертационен труд генът *tst-1* беше установен в 4,3%, а тези за ентеротоксините (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*) бяха установени с честота, между 4,3% и 72,6% (**Таблицы 6 и 7**).

Таблица 6. Честота и разпределение на установените стафилококови гени на вирулентност сред изолати *S. aureus* от болнични (хоспитализирани) и амбулаторни пациенти (*сигнификантна разлика ($P < 0,05$) - подчертани)

Гени	Общ брой изолати			Общо %
	<i>S. aureus</i> (n=368)			
	Болнични (n=185) %	Амбулаторни (n=183) %	Pvalue(между болнични и амбулаторни)	
<i>hlg</i>	95,7	98,9	0,1046	97,3
<i>cna</i>	24,8	3,2	0,0001*	14,2
<i>tst</i>	7,0	6,0	0,8334	6,5
<i>sea</i>	28,6	24,6	0,1257	26,6
<i>seb</i>	69,7	50,8	0,0003*	60,3
<i>sec</i>	52,4	29,5	0,0004*	38,3
<i>sed</i>	12,4	8,2	0,2304	10,3
<i>see</i>	6,5	2,2	0,0706	4,3
<i>seg</i>	69,7	65,0	0,3741	67,4
<i>seh</i>	44,9	37,7	0,1703	41,3
<i>sei</i>	73,0	72,1	0,9072	72,6
<i>sej</i>	34,0	30,6	0,5049	32,3

Генът *tst-1* присъстваше при сходен процент хоспитализирани и амбулаторни пациенти ($P > 0,05$), но по-често се откриваше в инвазивните стафилококови изолати ($P = 0,0358$). Някои от гените, кодиращи ентеротоксини (*seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*) бяха статистически значимо по-чести при MRSA отколкото при MSSA (Таблица 7). Други автори, като Ортега и колектив 2010 г. (Ortega E et al. 2010) съобщават за някои от тези гени като преобладаващи в MRSA: *sea*, *seb*, *sed*, *seg*, *sei*, *sej*. Те откриват *tst-1* по-често в изолатите на MSSA, докато в нашето изследване този ген е по-чест при MRSA. Честотата на *seb* и *sec* – най-често откритите генетични елементи при хоспитализирани пациенти, както и при инвазивни изолати, са със статистическа

разлика спрямо останалите ($P=0.001$). Генът *tst-1* е открит при по-малък процент в европейски изолати *S. aureus*, включително в България (**Таблица 8**), в сравнение с други страни, например Китай и Корея, където се среща в около 50% от изолатите.

Комбинации от три гена, *sei*, *seg* и *seb*, които кодират **силни суперантигени (Sags)** са открити в повече от 60% от българските стафилококови изолати, изследвани в това проучване, предимно в **инвазивни изолати** със статистически значима разлика ($P=0,001$). Почти една трета от клиничните изолати на *S. aureus* в това проучване съдържат по седем гена, кодиращи супер-антигенни и токсини: *sei*, *seb*, *seh*, *sec*, *seg*, *sej*, *sea*. **До 25% от изолатите носят поне девет гена, а близо 40% носят най-малко шест от дванадесетте тествани важни гена на вирулентност.** Това създава риск от лесно и бързо разпространение на силно вирулентни щамове с повишен патогенен ефект. Разпределението на проучените генетични детерминанти, кодиращи вирулентност в MRSA и MSSA изолатите, както и в другите диференцирани групи хоспитализирани пациенти с и амбулаторни пациенти с инфекции, придобити в общността, е представено в **Таблица 6**. Докладвани са различни данни за честота на тези гени и SAg от изследователи от други страни (**Таблица 8**). Подобно разпространение на гените *sei* и *seg*, в комбинация с общ ДНК фрагмент, се съобщава от турски педиатри при пациенти и здрави ученици (Karbuз A et al. 2017; Dagi HT et al. 2015), а също така и в Чешката република, Франция, Колумбия, Мексико и Корея (Arias LF et al. 2016; Paniagua-Contreras GL et al. 2014; Madani A et al. 2017; Sauer P et al. 2008; Jarraud S et al. 2001; Peck KR et al. 2009). Данните от Индия, Китай, Иран и Канада се различават от нашите и от тези в посочените по-горе държави, защото представят *sea* като най-честия ген на Sags (Abbasi M et al. 2017; Deodhar D et al. 2015; Wang LX et al. 2013; Mehtrotra M et al. 2010).

Генетичният профил на инвазивните изолати на *S. aureus*, установен в настоящото изследване е различен, съдържа статистически значимо повече гени на вирулентност ($P=0,009$) в тази група. Гените, открити главно в инвазивните стафилококови изолати, бяха: *cna*, *tst-1*, *seb*, *seh*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* и *sei* в различни комбинации (**Таблица 7**). Някои от откритите гени се свързват по-често с нозокомиални

и инвазивни инфекции и от други автори (Arias LFC et al. 2016; Paniagua-Contreras GL et al. 2014; Deodhar D et al. 2015). Поне пет гена на SAg от 22-те тествани генетични елемента са открити в инвазивни изолати в колумбийско проучване (Arias LFC et al. 2016). Някои от гените, които са с най-голяма честота в български щамове, като *sei*, *sea* и *seg*, са били открити при повече от 33% в изолати *S. aureus*, от пациенти, починали от стафилококова бактериемия (Deodhar D et al. 2015).

Повече от 60% от изследваните стафилококови изолати имат комбинации от три гена, *sei*, *seg* и *seb*, за SAgS, които бяха намерени предимно (P=0,001) в инвазивни изолати плюс *hlg*, кодиращ цитолитичен токсин. Почти една трета от клиничните изолати *S. aureus* съдържат седем гена, кодиращи супер-антигенни токсини от дванадесетте тествани важни гена на вирулентност, а именно гените *sei*, *seb*, *seh*, *sec*, *seg*, *sej* и *sea*, и *hlg*.

Таблица 7. Честота и разпределение на установените стафилококови гени на вирулентност сред MRSA и MSSA изолати и от пациенти с инвазивни и неинвазивни инфекции

Гени	MRSA (n=34)	MSSA (n=324)				Общ брой изолати <i>S. aureus</i> (N=368)
	Общо (%)	Общо (%)	Инвазивни изолати (n=168) %	Неинвазивни изолати (n=200) %	P value (между инвазивни и неинвазивни)	Общо (%)
<i>hlg</i>	88,6	98,5	98,8	96,0	0,1179	97,3
<i>cna</i>	22,7	13,0	24,8	3,0	0,0001	14,1
<i>tst</i>	22,7	4,3	9,5	4,0	0,0358	6,5
<i>sea</i>	63,6	21,6	30,4	23,5	0,1159	26,6
<i>seb</i>	90,9	56,2	76,2	47,0	0,0001	60,3
<i>sec</i>	63,6	34,9	52,4	26,5	0,0001	38,3
<i>sed</i>	9,1	10,5	14,9	6,5	0,0098	10,3
<i>see</i>	0	4,9	7,1	2,0	0,0201	4,3
<i>seg</i>	90,9	64,2	79,2	57,5	0,0001	67,4
<i>seh</i>	63,6	38,3	49,4	34,5	0,4210	41,3
<i>sei</i>	93,2	69,8	81,0	65,5	0,0010	72,6
<i>sej</i>	38,6	31,5	36,9	59,5	0,0940	32,3

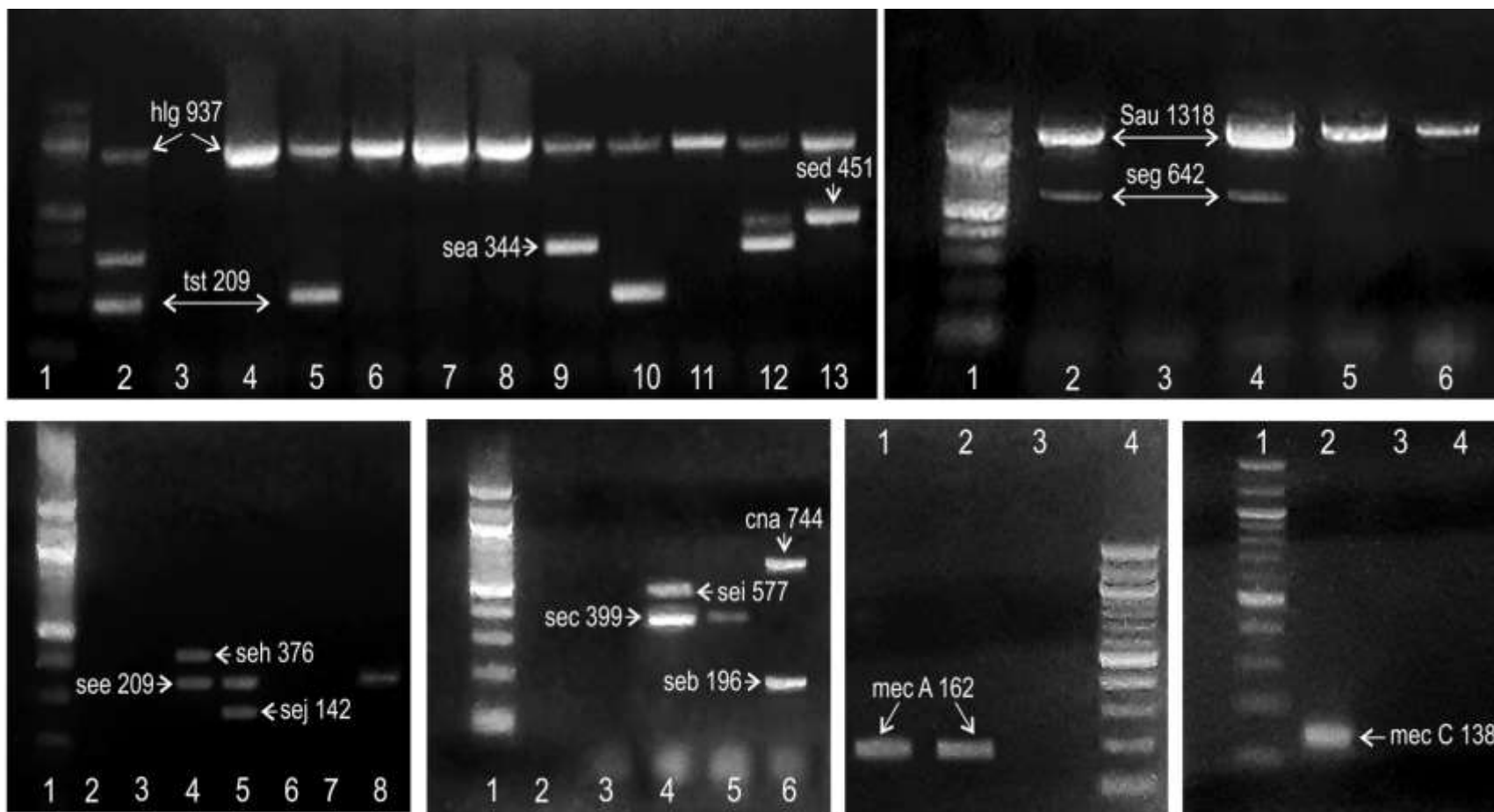
*сигнификантна разлика ($p < 0,05$) - в тъмно поле

Таблица 8. Сравнение на честотата на гените на вирулентност при изолати *S. aureus* в България и други страни

Гени на супер-антигени (SAgs)	България %	Турция ^a %	Чехия ^b %	Франция ^c %	Колумбия ^c %	Канада ^e %	Китай ^f %	Индия ^g %	Корея ^h %	Иран ⁱ %
<i>tst</i>	6,5	27,9	2	0 - 38	6,2	24,3	48,1	24,3	52,6	25,0
<i>sea</i>	26,6	4,6 – 13,5	12	6 - 34	11,1	19,6	44,4	38,6	47,4	40,6
<i>seb</i>	59,8	8,7	3	0 - 31	9,9	5,6	6,48	26,8	0	25,0
<i>sec</i>	38,3	4,0 – 52,9	2	0 - 19	16,0	7,5	9,26	0		0
<i>sed</i>	10,3	4,8	17	0 - 14	3,7	1,9	5,56	0	0	0
<i>see</i>	4,3	0	0	0	3,2	0	0	0	0	0
<i>seg</i>	67,4	24,6 - 89,4	77	75	51,9		40,7		61,1	
<i>seh</i>	41,3	35,6	0	0 - 20	35,8		1,85			
<i>sei</i>	72,6	51,3 - 65,4	77	75	44,4		14,8		70,5	
<i>sej</i>	32,3	0,66 - 22,1	17		3,7		13,9			

^a Dagi HT. et al. 2015; Karbuz A. et al. 2017; ^b Sauer P. et al. 2008; ^c Jarraud S. et al. 2001; ^d Arias LFC. et al. 2016;

^e Mehtrotra M. et al. 2000; ^f Wang LX. et al. 2013; ^g Deodhar D. et al. 2015; ^h Peck KR. et al. 2009; ⁱ Abbasi M. et al. 2017; Sabouni F. 2014.



Фигура 13. Мултиплекс PCR за откриване на гени на вирулентност при *S. aureus*, разпределени в 4 микса и отделна детекция с моноплекс PCR на гените за резистентност *mecA* и *mecC*. Електрофоретично разделяне на ампликони, представени в бр.

Асоциацията между профилите на вирулентност и макролидната резистентност е представена на **Таблица 9**. PCR анализът разкрива, че много генетични елементи на вирулентност са установени в двете групи макролид чувствителни и резистентни стафилококови изолати без статистическа разлика, но някои от гените като самостоятелно *hlg*; *hlg* и *seb*; комбинациите: *hlg, seb, sec*; *hlg, seb, seh*; *hlg, sec*; *hlg, sec, sei*; *hlg, sec, sei*; *hlg, sei*; *hlg, sei, sej*; *hlg, sej* са значително по-чести при резистентните (Таблица 9).

Таблица 9. Корелация на макролидната резистентност с гените, детерминиращи вирулентност при 435 *S. aureus*

Превалиращи гени на вирулентност	Гени на вирулентност в макролид чувствителни (N=333) Брой позитивни	Гени на вирулентност в макролид резистентни щамове (N=102) Брой позитивни	P value*
<i>hlg</i>	30	17	<u>0,0432</u>
<i>hlg, sea, seb</i>	2	2	0,2353
<i>hlg, sea, seb, sec, seg</i>	0	2	0,0546
<i>hlg, sea, seb, sec, seg, sei</i>	0	1	0,2345
<i>hlg, sea, seb, sec, seg, seh, sei</i>	2	2	0,2353
<i>hlg, sea, seb, sec, tst</i>	1	2	0,1385
<i>hlg, sea, seb, sed, seg, seh, sei</i>	2	1	0,5523
<i>hlg, sea, seb, sec, sei, eh, tst</i>	1	1	0,4144
<i>hlg, sea, sed, sei</i>	2	0	1,0000
<i>hlg, seb</i>	11	17	<u><0,0001</u>
<i>hlg, seb, sec</i>	18	15	<u>0,0044</u>
<i>hlg, seb, sec, seg, sei, tst</i>	0	2	0,0546
<i>hlg, seb, sec, sei</i>	4	3	0,3625
<i>hlg, seb, sed, sej, can</i>	3	0	1,0000

<i>hlg,seb,seh</i>	2	4	<u>0,0290</u>
<i>hlg,seb,seg,sei</i>	3	2	0,3343
<i>hlg,seb,seh,sei,can</i>	6	1	1,0000
<i>hlg,seb,seh,sei,sej</i>	2	3	0,0866
<i>hlg,seb,seh,sei</i>	2	0	1,0000
<i>hlg, seb, sei</i>	4	3	0,3625
<i>hlg,seb,sei,tst</i>	0	2	0,0546
<i>hlg,seb,sei,sej</i>	0	2	0,0546
<i>hlg,sec</i>	6	9	<u>0,0022</u>
<i>hlg,sec,seg,sei</i>	2	2	0,2353
<i>hlg,sec,sei,sej</i>	2	0	1,0000
<i>hlg,sec,sei</i>	2	5	<u>0,0091</u>
<i>hlg,seh</i>	5	3	0,3978
<i>hlg,seh,sei</i>	2	1	0,5523
<i>hlg,seh,sei,sej</i>	2	2	0,2353
<i>hlg,seh,sei,tst</i>	0	2	0,0546
<i>hlg,sei</i>	9	23	<u>0,0001</u>
<i>hlg,sei,sej</i>	2	4	<u>0,0290</u>
<i>hlg,sej</i>	11	12	<u>0,0020</u>
<i>seb,seg,sei</i>	2	3	0,0866

*Подчертаните цифри са сигнификантни ($p < 0,05$).

Изглежда, че комбинациите, състоящи само от два или три гена, а понякога появата и само на един ген, от проучваните, са присъщи предимно на макролид-резистентните стафилококови изолати, докато тези генотипове с множество гени не се срещат толкова често, както при чувствителните щамове.

Съобщава се за два теоретични модела, обясняващи връзката между вирулентността и резистентността към антимикробните средства (Schroede RM et al. 2017). Един от механизмите е хоризонталният трансфер на генетични елементи за вирулентност и антимикробна резистентност, който често е улеснен от образуването на биофилми, особено при пациенти с хронични инфекции. Повишаването на вирулентността и появата на нова антибиотична резистентност може да се случи почти едновременно. Това може да доведе до големи промени в генната експресия, увеличаване на вирулентността и бързо придобиване на резистентност към антимикробни агенти (Schroede RM et al. 2017). Във втория механизъм, в съответствие с модела на отрицателна връзка между висока резистентност към антимикробни средства и ниска вирулентност (Schroede RM et al. 2017). Някои експерименти демонстрират активиране при MRSA, поради наличието на *tecA* и последващи промени във вирулентността на щамовете, които стават с ниско ниво на токсичност (Rudkin JK et al. 2012). Настоящите резултати от преобладаване на профили с по-малък брой гени в устойчиви на макролиди изолати *S. aureus* могат да бъдат отнесени към втория тип на взаимоотношения, свързани с устойчивостта и вирулентността - модела на отрицателната връзка. При шест комбинации има по-висок процент вирулентни при резистентните щамове срещу само два при чувствителните.

Обобщение

Установена е честа корелация на *spa* с инвазивните изолати, предимно при хоспитализирани пациенти ($P=0.0001$). Генът *tst-1* е присъствал със сходна честота в изолати от хоспитализирани и амбулаторни пациенти ($P>0,05$), но по-често в инвазивните стафилококови изолати ($P=0,0358$). Комбинации от три гена, *sei*, *seg* и *seb*, които кодират силни SAgс са открити в повече от 60% от българските стафилококови изолати, изследвани в това проучване, предимно в инвазивни изолати със статистически значима разлика ($P=0,001$). Почти една трета от клиничните изолати на *S. aureus* в това проучване съдържат по седем гена, кодиращи суперантигенни и токсини: *sei*, *seb*, *seh*, *sec*, *seg*, *sej*, *sea*. До 25% от изолатите носят поне девет гена, а близо 40% носят най-малко шест от дванадесетте тествани важни гена на вирулентност. Много генетични елементи на вирулентност са установени в двете групи макролид чувствителни и резистентни стафилококови изолати без статистическа разлика, но някои от гените като самостоятелно *hlg*; *hlg* и *seb*; комбинациите: *hlg,seb,sec*; *hlg,seb,seh*; *hlg,sec*; *hlg,sec,sei*; *hlg,sec,sei*; *hlg,sei*; *hlg,sei,sej*; *hlg,sej* са значително по-чести при резистентните.

Резултатите от настоящото проучване показват, че геномът на клиничните изолати на *S. aureus* включва разнообразен арсенал от гени, кодиращи имуномодулаторни молекули. Това създава риск от разпространение на високо вирулентни изолати в нашия географски район.

5. Препоръки за адекватна терапия въз основа на анализиране чувствителността на изследваните клинични изолати през последните 5 години.

5.1. Регионална информация за стафилококовите етиологични агенти

Проучването на чувствителността и точното откриване на механизмите за резистентност към антимикробните средства създава регионална информация за характеристиките на стафилококови етиологични агенти, която е много важна и полезна за правилния избор на комплексно лечение, което е изключително важно при тежки инфекции.

От направените изследвания се установява, че при извънболничните, амбулаторните изолати метицилиновата резистентност комбинацията ѝ с макролидната резистентност са значително по-рядко за разлика от тази при вътреболничните изолати, което се установява и от други проучвания (Karbuz A et al. 2017; Li T et al. 2017; Sarrou S et al. 2018; Adhikari RP et al. 2017; Khoshnood S et al. 2019). Това дава възможност да бъдат използвани всички подходящи за терапията групи антимикробни средства в България според локализацията и тежестта на инфекцията, както и възрастовите и други здравословни особености на амбулаторните пациенти, с изключение на пеницилини, аминопеницилини без инхибитор на бета-лактамазата, поради много честото продуциране на тези ензими - в над 96% от изолатите. За респираторните инфекции като най-подходяща емпирична терапия остава аминопеницилин с β -лактамазен инхибитор, особено в детската възраст. Малко над 10% са резистентните на тетрациклинови препарати, които не се използват често в България, но би следвало и в тези случаи да се избягва емперичната им употреба. Предпочитаните, особено в детска възраст и подходящи за терапия на различни респираторни инфекции макролиди (Gergova R et al 2016; Gergova R & Markovska R 2020) трябва да се прилагат задължително след антибиограма, тъй като резистентността към тях нараства и вече е приблизително 34% в българските клинично значими изолати *S. aureus*. Нивото на **макролидната резистентност е значително по-високо в MRSA (72,13%) отколкото в MSSA (29,38%)**, със сигнификантна разлика $P=0,0026$, което затруднява лечението на инвазивни инфекции и нозокомиални такива, където и честотата на метицилиновата и макролидно-линкозамидната резистентност е по-висока от тази в амбулаторни условия - *tesA* е откриван в 77,9% от положителните хемокултури със стафилококови изолати и при 63,6% от инвазивните изолати *S. aureus*, а над 68% от изолатите MRSA са болнични. В тези случаи използването на бета-лактамни антибиотици е неприемливо и несигурно. Често в случаите на изолат MRSA от болнично лекуван пациент се установява и неговата множествена резистентност (Karbuz A et al. 2017; Li T et al. 2017; Sarrou S et al. 2018; Adhikari RP et al. 2017; Khoshnood S et al. 2019)., което налага използването на сигурните антимикробни средства, към които засега в България няма установена резистентност, а именно ванкомицин, тигециклин или линезолид. Разработеният и апробиран бърз метод

за доказване на метицилинова резистентност и наличие на *S. aureus* в хемокултури и пункти е изключително полезен и подходящ за подпомагане на избора на вече насочена етиологично терапия. Беше наблюдавана разлика в чувствителността на изолати от хемокултури и мекотъканни абсцеси като при тези от хемокултури беше установена резистентност към еритромицин в 28,57% и към клиндамицин в 17,86%, докато в пункти от абсцеси до 37,78% и респ. 24,44%. Това драматично увеличение на комбинираната резистентност към макролиди и линкозамиди, особено в изолати от мекотъканни стафилококови инфекции се наблюдава и в някои други страни (Stein M et al. 2016). Според нашите резултати се налага да се избягва емперична монотерапия с клиндамицин, който е изключително подходящ за лечение на тези инфекции, поради проникване в тези тъкани, където малко антибиотици имат добра проникваемост и допълнително потиска токсинемията. Установените генетични профили на резистентност показват, че преобладават *erm* гените, кодиращи високо ниво на макролидна резистентност, често кръстосана с линкозамидна. Терапията с клиндамицин в тези случаи, особено при индуцируеми фенотипове, когато може да се пропусне дискретна промяна в чувствителността от антибиограмата, може да доведе до клиничен провал на лечението (Chancey ST et al. 2015; Rao GG. 2000; ShojiK et al. 2015; Uzun B et al. 2015). При доказана *in vitro* чувствителност е препоръчително неговото приложение според конкретния случай самостоятелно или в комбинация с аминогликозиден или друг подходящ антимикробен препарат. Правилният и своевременен избор на подходяща емперична, а когато е възможно и насочена етиологичната терапия, например след доказване на метицилинова резистентност с PCR директно в пробата от хемокултура или пункт при животозастрашаващи инфекции имат решаващо значение за спасяването живота на пациентите.

5.2. Инхибиране на бактериалния кворум (Quorum Sensing Inhibition)

Инхибиране на бактериалния кворум е феномен, при който бактериалните клетки регулират поведението на бактериалните популации чрез произвеждане на самоиндуктори. Бактериите секретират сигнални молекули, наречени автоиндуциращи вещества (Perez-Perez M et al. 2017). Когато извънклетъчната концентрация на тези

вещества се увеличи до определен праг с нарастване на популацията, бактериите включват експресията на специфични гени, като по този начин регулират груповото поведение на бактериите (Yin SL et al. 2011). Това е ефективно средство за обмен на информация между бактериите, включително биолуминесценция, биофилм и токсична генна експресия, а много други поведения се регулират от системата на кворум за чувствителност (Kalia VC & Purohit NJ 2011). МСРобните патогенни свойства на *S. aureus* са много сложни и са свързани главно с факторите на вирулентност (Yin SL et al. 2011). Тези фактори на вирулентност са главно екзотоксини, които нарушават клетките на гостоприемника, пречат на имунните реакции и някои протеини, участващи в адхезията и защитата срещу защитата на гостоприемника (Kalia VC & Purohit NJ 2011; Yin SL et al. 2011). Експресията на токсините се регулира от сложна мрежа, съставена от множество гени, от които *agr* глобален регулаторен фактор H1, е най-важният ген, регулиран от механизмите за чувствителност на кворума (Haseeb A et al. 2019). Инхибирането на този механизъм за наблюдение на кворума при бактериите може да доведе до възпрепятстване на образуването на биофилми, намаляване на бактериалната вирулентност и намалена бактериална резистентност (Wang J et al. 2017; Haseeb A et al. 2019).

5.3. Инхибиране на лектина

Лектинът е неимуниен продукт, производно на захар-свързващ протеин, който позволява клетъчна аглутинация или утаяване на гликоконюгати (Aretz J et al. 2018). Съобщава се, че лектините могат не само да аглутинират червените кръвни клетки, но и да аглутинират с различни клетки, като патогени, имунни клетки и зародишни клетки (Aretz J et al. 2018; Alghadban S et al. 2019). Понастоящем приложението на лектин в медицинската област е главно специфичното разпознаване и адхезия на лектини, което позволява на различни патогенни микроорганизми да се свързват и инфектират техните клетки реципиенти (Alghadban S et al. 2019). Например, някои манозни лектини могат значително да повлияят на токсичността на ХИВ, което позволява разработването на антивирусни лекарства (Barte A et al. 2019). Следователно е възможно да се използват характеристиките на лектина за проектиране и разработване на нови клинични лекарства

и фундаментално да се предотврати свързването на патогенни микроорганизми с клетките реципиенти, като по този начин се предотвратяват повечето инфекциозни заболявания (Aretz J et al. 2018).

5.4. Хелатиране на желязо.

Железните йони са основни хранителни вещества за повечето организми, включително бактериите (Carver PL 2018). Изследванията показват, че железните йони представляват каталитичния център на важни биологични ензими като оксидоредуктаза и участват в различни жизнени дейности като електронен транспорт, антиоксидантни реакции и синтез на нуклеинови киселини (Nutì R et al. 2017). Един от важните механизми на бактериална резистентност е да се намали пропускливостта на външната мембрана и по този начин да се възпрепятства навлизането на лекарствени молекули в клетките (Carver PL 2018). За да се заобиколи лекарствената резистентност, медирана от този механизъм, един от методите е да се прикрепят антибиотичната молекула към железен носител, образувайки конюгат железен носител-антибиотик и този конюгат железен носител-антибиотик може селективно да взаимодейства с повърхността на бактериалната клетъчна мембрана. Рецепторите на външната мембрана на железния носител взаимодействат с този конюгат; след това конюгатът пресича външната клетъчна мембрана чрез активен транспорт през транспортна система на железни йони (Bogdan AR et al. 2016). В този случай железният носител, свързан с антибиотика, може да бъде свързан с Fe^{3+} и полученият комплекс (антибиотик-железен носител- Fe^{3+}) навлиза в клетката. И накрая, лекарството се освобождава вътре в клетката, като по този начин упражнява антибактериално действие (Bogdan AR et al. 2016).

5.5. Фагова терапия

В началото на своето откритие фагите са били използвани от бившия Съветски съюз и източноевропейските медицински общности за лечение на бактериални инфекции (Cisek AA et al. 2017). С въвеждането на антибиотичната ера обаче хората постепенно пренебрегват задълбочените изследвания на фагите. През последните години, поради нарастващата световна резистентност към антимикробни средства, използването на

антибиотици за лечение на бактериални инфекции се сблъсква с безпрецедентни предизвикателства (Lin DM et al. 2017). Голям брой експерименти са доказали, че фагите могат ефективно да подобрят степента на оцеляване на животни, заразени с бактерии (Shlezinger M et al. 2017). В сравнение с антибиотиците, фаговите препарати имат предимствата на висока специфичност, бързо саморазпространение и кратко време за развитие (Krut O & Bekeredjian D. 2018). Фаговата терапия се счита за една от най-обещаващите терапии срещу човешки патогени, включително устойчиви на антибиотици щамове (Shlezinger M et al. 2017). Още през 1921 г. фагите се използват за лечение на кожни инфекции, причинени от стафилококи (Wang Q et al. 2017). През 2007 г. италиански изследователи демонстрират, че фагът Msa може ефективно да контролира летални инфекции, причинени от *S. aureus*, чрез установяване на модел за интравенозно инжектиране на мишки (Delgado G Jr et al. 2000). С увеличаването на резистентните към лекарства бактерии предимствата на фагите са признати от повече учени. Въпреки това, биологичните характеристики на фагите на *S. aureus* и свързаните с тях проучвания върху животни през годините показват, че има много ограничения в подготовката, съхранението и условията на фагите (Lin DM et al. 2017). Подобно на антибиотиците, бактериите също могат да бъдат устойчиви на фаги. Разнообразието на фагите в природата обаче също осигуряват неизчерпаем ресурс за контролирани от фаги бактерии (Shlezinger M et al. 2017). Освен това понастоящем фаговата терапия е все още незряла в клиничното приложение. Основните проблеми са следните (Lin DM et al. 2017; Shlezinger M et al. 2017): (1) повечето фаги са силно специфични и могат да убият само една или няколко подгрупи от бактерии; (2) фаговата терапия при специфичен *in vitro* тест е ефективна, но не означава, че е еднакво ефективна *in vivo*; (3) Фагите започват да се размножават едва когато бактериите достигнат определена плътност. Фагите могат да бъдат инокулирани преждевременно или в неподходящи дози и могат да бъдат елиминирани от организма, преди да започнат да се размножават. Следователно **определянето на оптималното време за инокулация и дозата ще се превърне в основна трудност при лечението с фаги.** Гореизброените са често срещани проблеми при фаговата терапия. Следователно тези проблеми съществуват и в хода на лечението на стафилококовите инфекции.

5.6. Нанотехнологията

Нанотехнологията се отнася до подготовката, изследванията и индустриализацията на вещества в наномащаба, както и цялостни технически системи за кръстосани изследвания и индустриализация, използващи наномащабни материали (Wu W et al. 2020). Проучванията показват, че нанотехнологиите могат да се прилагат в областта на медицината, биологията, химията и информационните технологии; поради това може да играе важна роля в неинвазивната и минимално инвазивната медицина (Barbero F et al. 2017). В медицинската област наночастиците подобряват способността да доставят лекарство в различни екологични ниши на човешкото тяло (Li M et al. 2010). След като няколко слоя инкапсулирани с наночастици интелигентни лекарства влязат в човешкото тяло, те могат активно да търсят и атакуват ракови клетки или да възстановяват увредените тъкани (Wang Q et al. 2020). Китай успешно разработва ново поколение наномащабни антибактериални лекарства. Прахообразните наночастици са с диаметър само 25 нанометра и имат силно инхибиращо и убиващо въздействие върху патогенни микроорганизми като *Escherichia coli* и *S. aureus* (Li M et al. 2017). Наномащабните антибактериални лекарства имат много свойства като спектър, хидрофилност и опазване на околната среда и не предизвикват устойчивост поради използването на естествени минерали (Howden BP et al. 2010).

Широкото използване на антибиотици доведе до увеличаване на честотата на бактериална резистентност, започвайки с появата на резистентни към различни лекарства щамове като MRSA, което се счита за клинично важен проблем (Klein EY et al. 2017). Поради характеристиките си на лесно преносима инфекция, висока смъртност и мултирезистентност, MRSA се превърна в препъни камък в клиничното лечение (Khoshnood S et al. 2019). Следователно, как ефективно да се предотврати и контролира MRSA се превърна в гореща тема в съвременните изследвания. В момента ванкомицин все още е най-доброто лекарство за лечение на MRSA инфекция. Резистентността на MRSA към много лекарства обаче значително увеличава трудностите при препоръчване на терапията (Vestergaard M et al. 2019).

Необходими са по-нататъшни изследвания за способността на MRSA да причинява инфекция, пътищата на разпространение на резистентността към

антибиотици при MRSA, както и да се насърчава разработването на нови лекарствени средства срещу MRSA инфекцията, което ще даде на лекарите повече възможности за лечение на инфекции, причинени от MRSA, осигурявайки по-голяма защита на човешкото здраве.

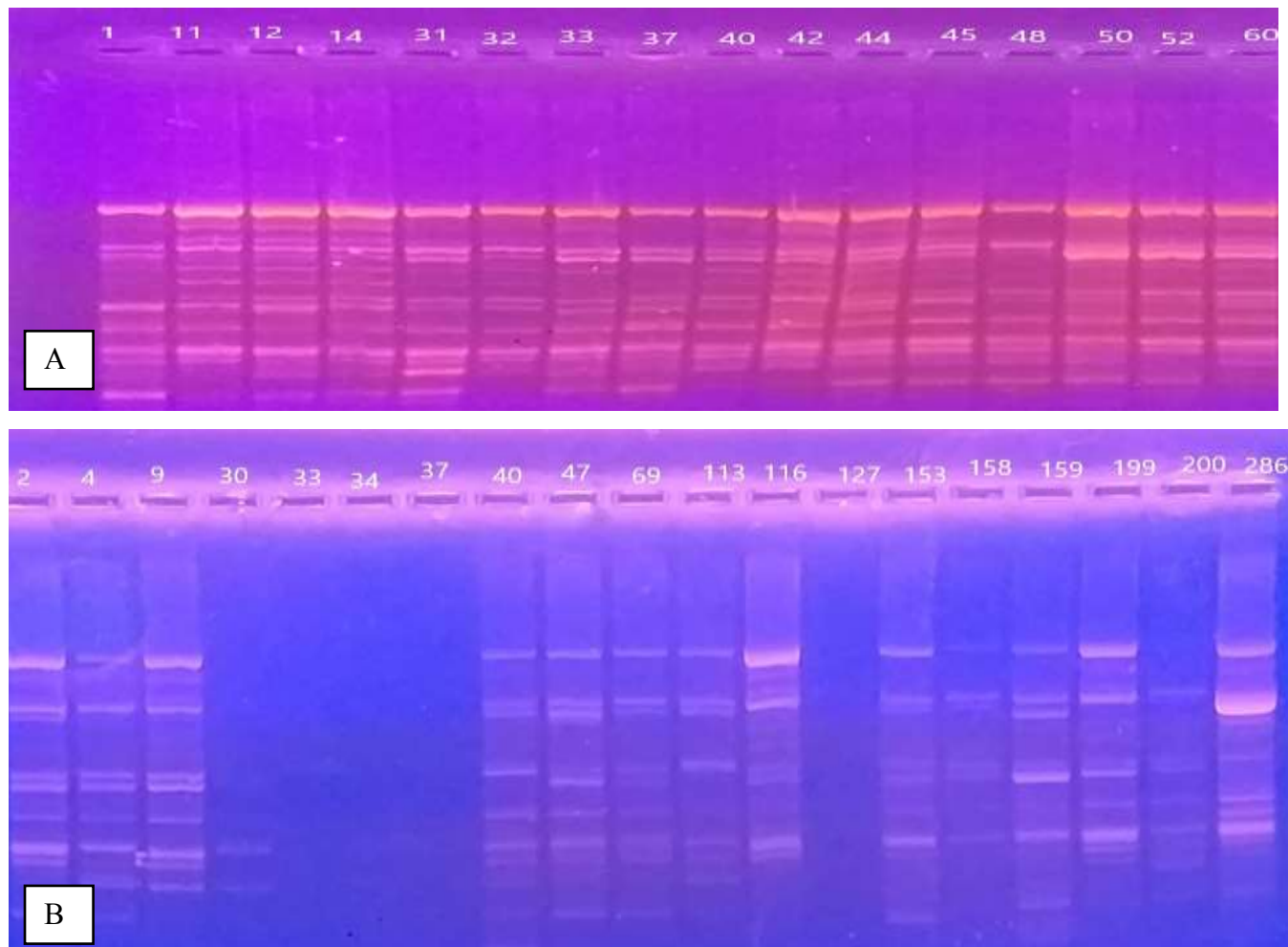
6. Епидемиологично охарактеризиране и типизиране на щамове *S. aureus*.

За RAPD сме апробирали отначало праймерите S - TCACGATGCA; S224 - CCCCTCACGA; S232 - ACCCCCCACT; AP4: 5'- TCACGCTGCA-3'; P2: 5'- ATGTAACGCC-3' и C - AGGGAACGAG (Yoon JM. 2013; Yoon JM. 2018), всеки с с едни и същи 35 ДНК екстракта. След сравнително проучване на резултатите с еднакви ДНК проби с всеки от тези праймери се стигна до заключението, че с праймер C - AGGGAACGAG се получават най-много и най-отчетливи бендове, затова този праймер беше избран за работа в следващите реакции и с него бяха типизирани представителна извадка от щамове *S. aureus* от колекцията.

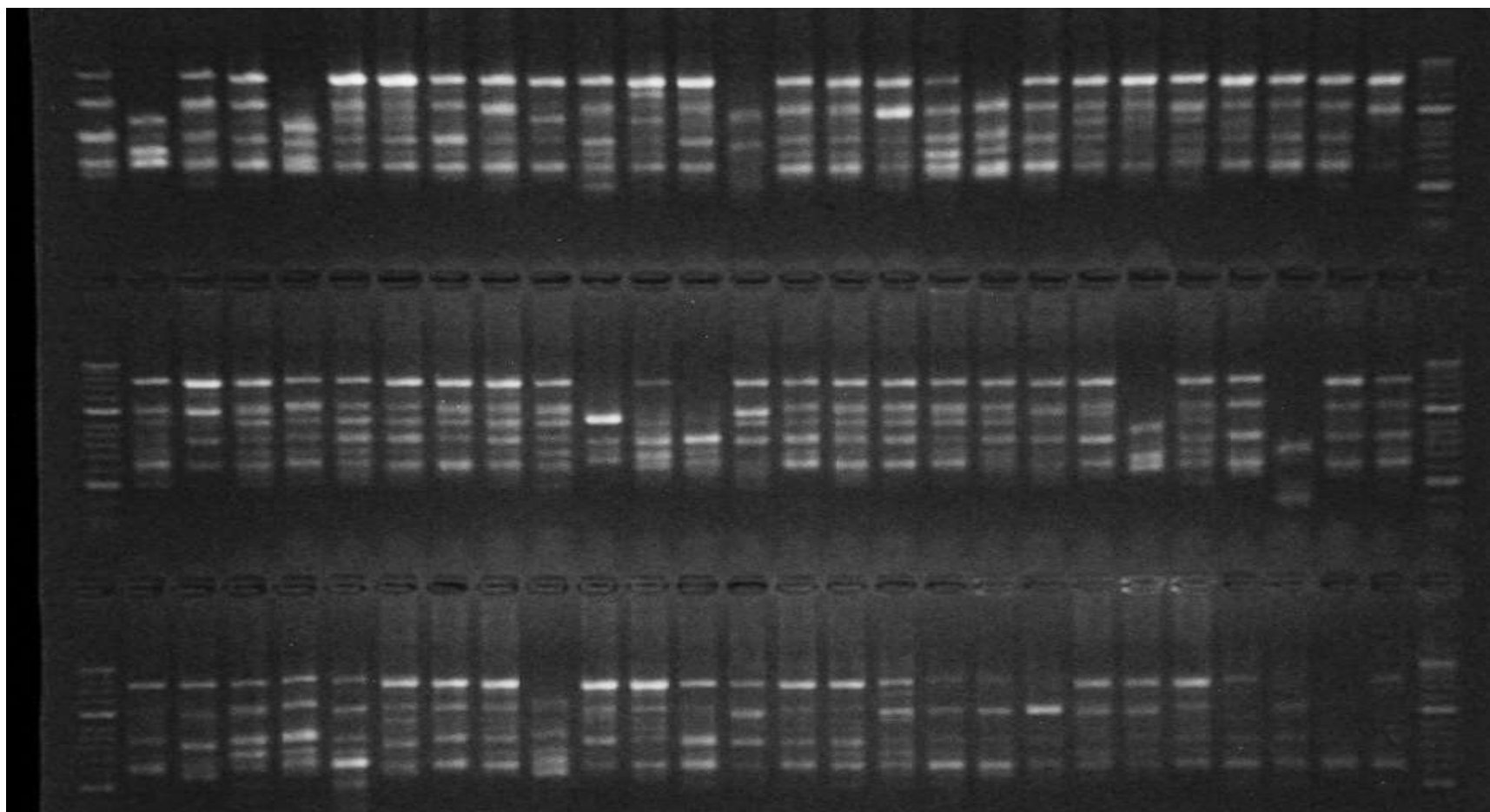
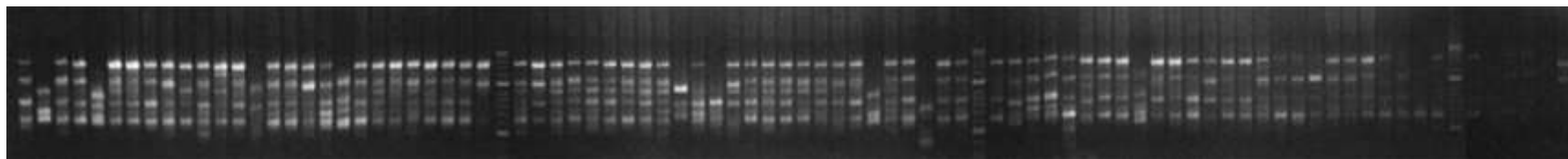
Беше извършено епидемиологично охарактеризиране на двете групи стафилококи, а именно MSSA и MRSA посредством RAPD. Проучени с RAPD бяха общо 112 изолата, които да представляват различни по произход, както от различни болници, отделения, амбулаторни, така и от различни локализации на инфекции, както инвазивни, така и неинвазивни изолати *S. aureus* (85 MSSA, 27 MRSA), изолирани в периода 2016-2020 г. от различни пациенти с инвазивна и неинвазивна инфекция, хоспитализирани в три Университетски болници в София УМБАЛ „Свети Иван Рилски“ (**SIR**); СБАЛ по Ортопедия “Проф. Бойчо Бойчев” (**ORT**); Военно Медицинска Академия (**ММА**), както и изолирани от амбулаторни пациенти. Означенията на клиниките в две от болниците са представени със сл. съкращения - легенда: **SIR**: HD - Hemodialysis (Хемодиализа); ID - Therapy of Internal diseases (Терапия на вътрешните болести); NS-Neurosurgery (Неврохирургия); PD - Profesional diseases (Професионални болести); RE - Reumathplogy (Ревматология); **ММА**: AS - Abdominal surgery (Коремна хирургия); CS - Chest surgery (Гръдна хирургия); DE - Dermatology (Дерматологична клиника); NS - Neurosurgery

(Неврохирургия); SS - Septic surgery (Гнойно-септична хирургия); VS - Vascular surgery (Съдова хирургия).

За всеки изолат бяха генерирани разпознаваеми генетични профили, съставени от 5 до 10 бенда (Фигура16 А и В и Фиг. 17).



Фигура 14. RAPD с праймер С - AGGGAACGAG показва най-отчетливи и най-многобройни бендове след сравнение с другите праймери



Фигура 15. RAPD профили на MSSA с праймер C - AGGGAACGAG

За клон приехме изолати с 80% съвпадение във филогенетичното дърво. При анализирането на резултатите от първата група, след построяване на дендрограмите с помощта на UPGMA метода (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Soka. 1973) беше установено, че в проучените болници и при амбулаторни пациенти от София циркулира голямо разнообразие от MSSA, което се отбелязва като характерно за тази група и в други проучвания (Mark CE et al. 2000). При анализиране на резултатите от 85 MSSA бяха установени 24 RAPD типа, от тях 10 типа имаха от 2 до 27 представителя и бяха означени като **A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K** (Фигура 16). От тях клон **A** е преобладаващ при 27 от изследваните щамове, респ. при 31,8%, а следващият по честота (клон **F**) е при 12,9% от тях. На трето място е клон **I** с 9,4% от тестваните щамове. Останалите типове съдържаха значително по-малко или единични изолати от стафилококови инфекции, установени амбулаторно или само в някои клиники (Фигура 16). В клон **A** преобладаваха изолатите от Университетската болница “Св. Ив. Рилски” (общо 14), предимно от Клиниката по хемодиализа - 8 изолата (7 от хемокултури, 1 от пунктат), 3 от този клон бяха изолирани в Клиниката по ревматология, 2 изолата от болни, лежащи в клиниката по Неврохирургия и 1 от пациент в Клиниката по професионални болести. Към този клон се причисляват още 7 щамове, изолирани от пациенти, оперирани в СБАЛ по Ортопедия “Проф. Бойчо Бойчев” и 6 амбулаторни изолата. Различни са видовете материали, от които са изолирани стафилококите, но голямата част от тях са изолати от хемокултури, със сигнификантна разлика $P = 0,0303$ пациенти с бактериемия и сепсис (29,7%, при общо 13% хемокултури като част от всички материали). Инвазивните изолати са 77,78% от всички изолати, в този клон и са от пациенти на хемодиализа **SIR-HD** или с тежки фрактури, по-рядко след ставно протезиране, оперирани в **ORT**, което предизвиква съмнение за по-висока вирулентност на този клон. Гените на вирулентност, които се срещат под различни комбинации в този клон са: *hlg, can, tSt, sea, seb, sec, sed, seg, sei, sej, seh*. Във всички изолати от хемокултури присъстваха *hlg, seg, sei, sej*. В другите изолати от рана, очен, ушен, назофарингеален секрет преобладаваше комбинацията *hlg, seb, sec, sei, sej*. Генът *hlg* кодира синтеза на силен цитолитичен извънклетъчен гама-хемолизин с активност срещу широк спектър клетки - човешки и заешки еритроцити, както и срещу неутрофили, моноцити,

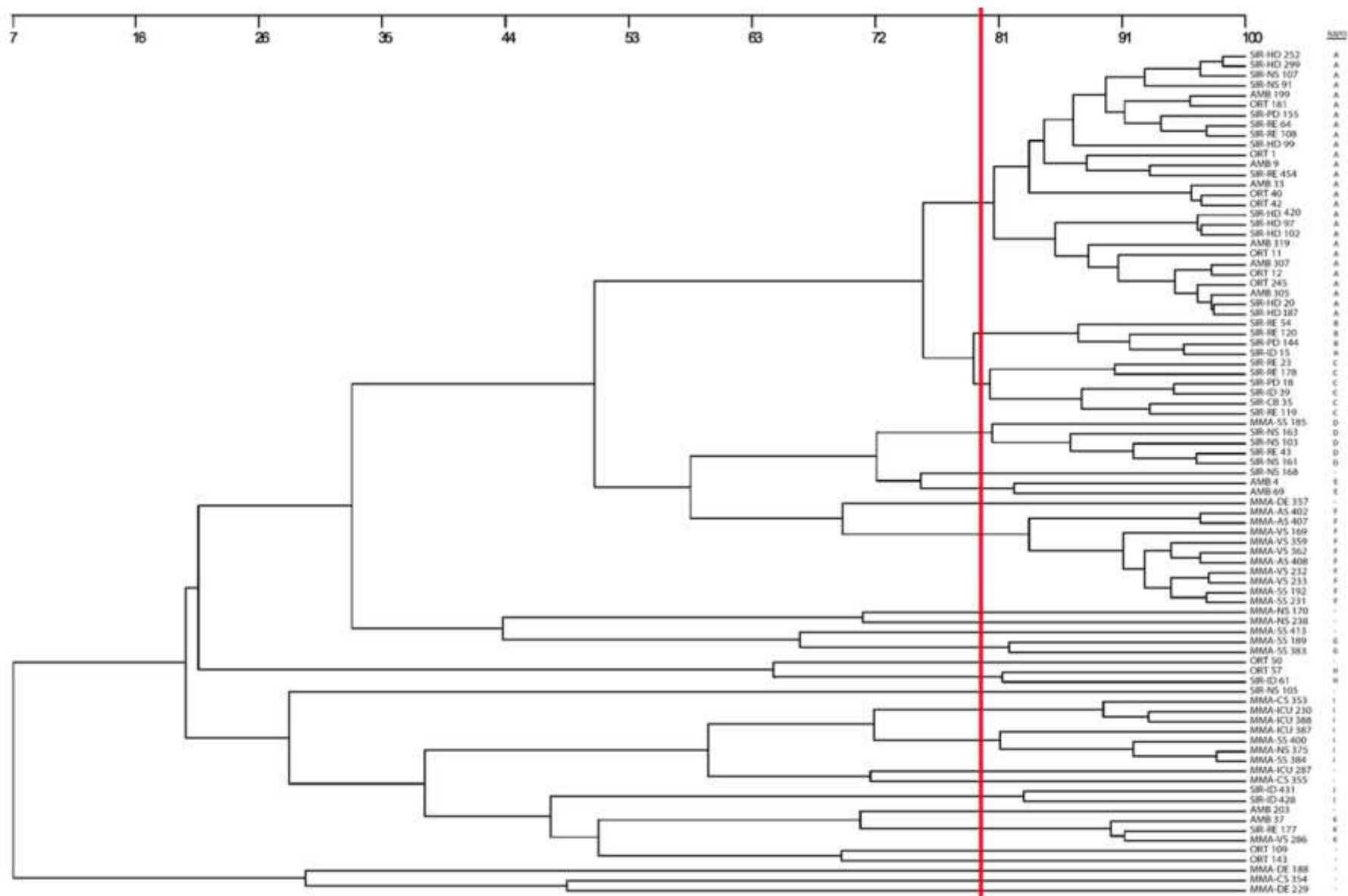
гранулоцити и макрофаги (Aman MJ & Adhikari RP. 2014). Има данни, че *hlg* и съответно неговият извънклетъчен токсичен продукт са причина за отклонения в имунния отговор, неговото модулиране и потенциалното стафилококово оцеляване в биологични течности, т.е. прави изолатите по-инвазивни. Тези резултати още веднаж потвърждават данни от САЩ и Иран на публикации, които съобщават за често наличие на *hlg* сред изолатите MSSA, особено от инвазивни инфекции (Abbasi M et al. 2013; Shukla SK et al. 2010). Комбинацията от трите геназа ентеротоксини *seb*, *seg* и *sei*, които са а силни SAgS са открити в 48,15% при от представителите на клона се срещат предимно в инвазивните изолати ($p < 0.05$) при повече от 60% от изследваните стафилококови изолати при това проучване. Щамове с тази епидемиологична характеристика на първия клон не бяха установени във Военно Медицинска Академия, но значителната честота на този RAPD тип в амбулаторни пациенти, означава, че е въпрос на време да попаднат заедно с пациентите, придобили инфекции в обществото, в други болнични заведения. Интересен е факта, че всички изолати, без №454 (от хемокултура, на пациент в SIR-RE през 2018г.) в тази група бяха от 2016 и 2017 година. Явно през този период RAPD А клон е циркулирал по-интензивно и е бил широко разпространен, за разлика от следващите години, когато е изместен от другите по-нови такива. Макролидната резистентност при представителите на този клон е в 29,7%, която е близка до тази в общата група на хемокултурите 28,6%. Гените, кодиращи тази резистентност бяха предимно *ermA* и *ermC*.

➤ Втората по големина група, означена като **клон F**, съдържаше 10 изолата, всички, циркулиращи във Военно Медицинска Академия, липсваха амбулаторни или други изолати, което показва регионално разпространение, доказано засега само в тази болница. Най-много бяха изолатите с този тип от Клиниката по съдова хирургия ($n=5$), следвани от Клиниката по коремна хирургия ($n=3$) и Клиниката по септична хирургия ($n=2$). За разлика от първата група, в тази всички изолати бяха НА, от постоперативни раневни инфекции, като половината от тях бяха аспирати от абсцеси, т.е. от инвазивни изолати, другите бяха секрети от постоперативни рани. Друга разлика с първата група е че, щамовете в клон F, са изолирани предимно в периода 2018-2019г. Има само 2 изолата от 2017г и няма нито един от 2016г. Липсва съществена разлика във факторите на

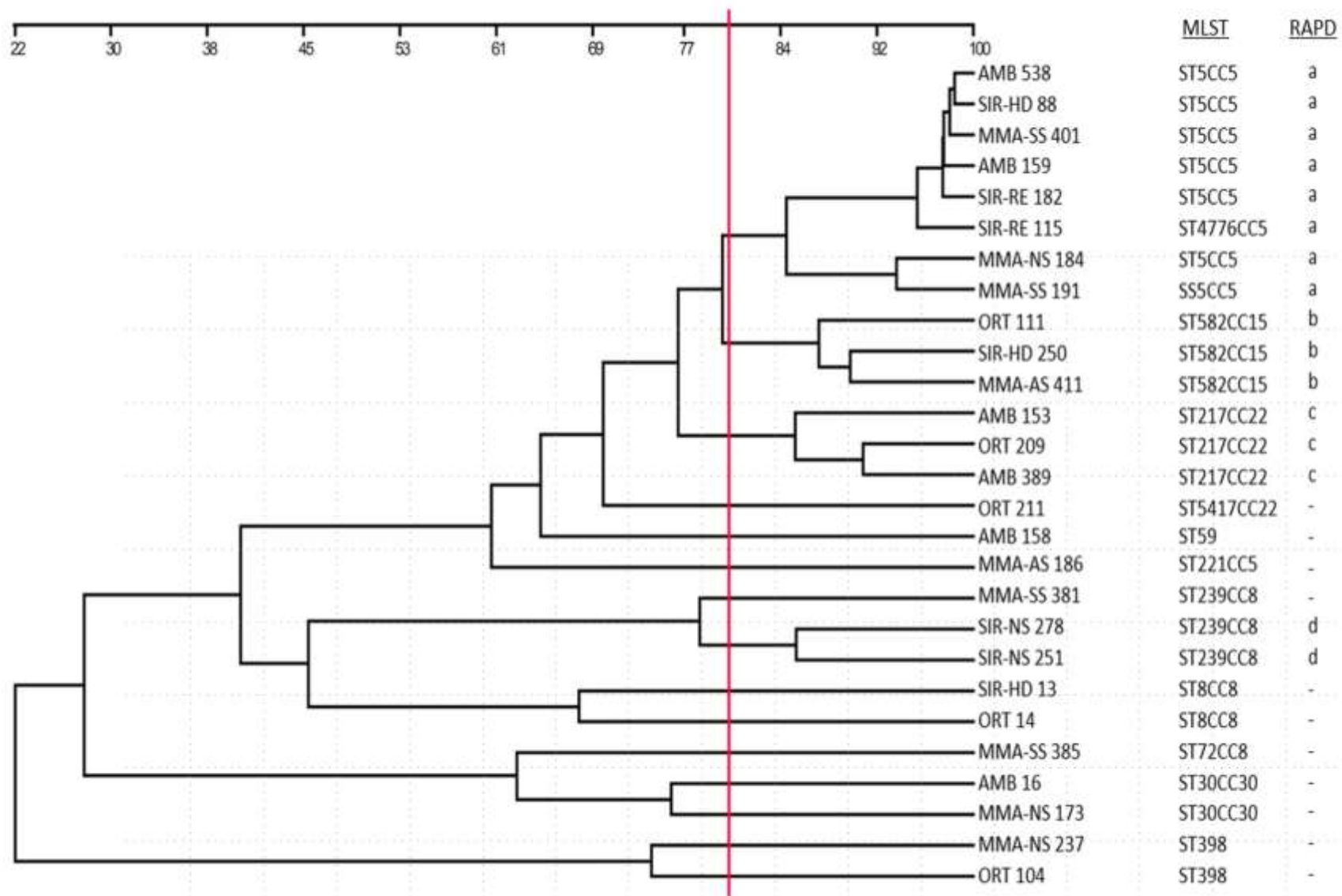
вирулентност. Отново се срещаха комбинации от гените *hlg*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *sei*, *sej*, *seh*, липсваше само *seg*, като преобладаваха в повечето изолати генетичните елементи: *hlg*, *sei*, *sej*. Два от тези гена са отново от силните суперантигени, с изразена имуномодулираща роля, потискаща ефективния имунен отговор и подпомагаща навлизането на стафилококите в тъканите (Argudin MA et al. 2010; Jawetz, Melnick, & Adelberg's 2013; Karbuz A et al. 2017). Всички представители на този клон бяха чувствителни към макролиди и линкозамиди, както и към другите групи антимикробни средства.

➤ В третата група, RAPD **клон I**, отново всички стафилококи бяха от Военно Медицинска Академия, не се установиха при амбулаторни или изолати от другите две болници. Този клон се разпространяваше през 2018-2019г. в клиниките на ММА по Интензивна терапия и реанимация (n=3), Септична хирургия (n=2), Неврохирургия (n=2), Гръдна хирургия (n=1). Материалите в тази група бяха инвазивни, предимно от абсцедиращи инфекции - пунктати и аспирати. Клиниките, в които се лекуваха пациентите също всички бяха интензивни. Този клон явно е по-нов, липсваше през 2016-2017г. Макролидната резистентност, установена при представителите на този клон е значително по-висока в 42,9%. Генетичните детерминанти, кодиращи резистентността към макролиди и линкозамиди бяха *ermB* и *ermC*.

➤ Интересен е и **клон C** (7,1%), състоящ си от малко представители (n=6), но циркулиращ само в клиники на SIR и явно е и по-стар, защото щамовете са изолирани през 2016-2017г., а липсваха представители от и след 2018г. Отново всички изолати (с изключение на една урина) са инвазивни - от хемокултури, трахеален аспират, бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ). Резистентността към групата на макролиди-линкозамиди е 30% и е генетично кодирана от *ermA* и *ermC*. Още през 2016г в щам от БАЛ е доказана комбинация на гените *ermA* и *ermC* в един изолат.



Фигура 16. Епидемиологично типирание с RAPD на 83 изолата MSSA от три Университетски болници и от амбулаторни пациенти, уникален RAPD тип



Фигура 17. Епидемиологично типирание с RAPD на 27 изолата MRSA от 3 Университетски болници и от амбулаторни пациенти уникален тип.

➤ Подобен е и **клон D** циркулиращ само в клиники на SIR и преставаляващ 5,9% от RAPD типове. Неговите представители (n=5), са отново предимно инвазивни - от хемокултури, трахеален аспират, и един назофаренгеален секрет. В 40 % се установява резистентността към групата на MLS. Гените, кодиращи тази резистентност бяха *ermA* и *ermC*, които се оказаха доминиращи през 2016-2017г. и то в изолатите, циркулиращи предимно в SIR през този период, както се установява в предишните клонове А и С. И този клон не се установява в последните години след 2016- 2017г. .

В другите клонове влизат единични амбулаторни изолати, както и едновременно от различни болници от различни години, без явна епидемиологична връзка. Това показва дивергенция на MSSA през годините и поселяване в различни болнични звена от постъпващи пациенти, а евентуално и от пресонала на здравните заведения (Patel D et al. 2015) Стафилококите са широко разпространени навсякъде в околната среда, поради преобладаващо носителство в ГДП на хора и животни. Тези естествени местообитания благоприятстват разпространението и на детерминанти на резистентност към различни антибактериални средства в това число и към стратегически терапевтични средства (Brown et al. 2014; Dantes R et al. 2013; Planet P. 2017; Tzaneva V et al. 2016). Откриват се често и в хранителни продукти, поради тяхната халофилност, което прави стафилококите изключително устойчиви към повишени концентрации натриев хлорид, използван за консервиране на животински храни (Argudín M^Á et al. 2010; Jung BS et al. 2015; Momtaz H et al. 2013; Özdemiri H & Keyvan E. 2016; Ortega E et al. 2010).

Бактериалните щамове, принадлежащи към MRSA бяха анализирани с RAPD и с мултилокусно секвениране (MLST, multilocus sequence typing). На 7 постоянно присъстващи при *S.aureus* гени (housekeeping genes) бяха определени алелните профили и принадлежността към съответен секвенционен тип с помощта на уебсайт (<http://www.mlST.net>), за да се получи алелен профил, което осигурява данни за проследяване на еволюционната биология на вида. MLST предоставя информация за родословната линия, която е много важна за разбиране на цялостната епидемиология на MRSA инфекциите след определяне на типа последователност (ST) за даден бактериален изолат. Тази техника печели популярност сред изследователите, особено за изучаване на

еволюцията на MRSA (CrisoStomo MI et al. 2001; Enright MC et al. 2002; Robinson DA et al. 2003; Feil EJ et al. 2003)

При епидемиологичното типизиране с RAPD на 27-те **MRSA** изолати бяха определени **4** клона и **11** изолата с уникален **RAPD** профил. Клоновете се състояха от между два и осем изолата и включваха **59,3 %** от изолатите. Те бяха означени като **a, b, c, d** (Фигура 17). Най-разпространен беше клон **a**, в 29,6% от тестваните изолати, а по 11,1% от щамовете попадаха в клон **b** и респективно в клон **c** и 7,4% са тези в клон **d**. Анализът на типизиране на мулти-локусни последователности при същите 27 изолати MRSA показва наличието на пет клонални комплекси и 11 ST типа, включващи **CC5 (ST5, ST221, ST4776)**, **CC8 (ST8, ST239,ST72)**, **CC15 (ST582)**, **CC22 (ST217, ST5417)**, **CC30 (ST30)** и **ST59, ST398**, които не попадат в клонален комплекс (Таблица 20). Разпределение на ST типовете сред колекцията от 27 MRSA клинични изолатае представено на **Фигура17**. Най-честият клонален комплекс е **CC5** в 33,3%, а най-честия ST тип е **ST5CC5** (26,9%). На второ място с 22,2% е **CC8** и на трето (14,8%) е **CC22**. Три ST типове с еднаква честота от 11,1% се подреждат след най-честия **ST5CC5**. Това са **ST239CC8, ST582CC15, ST217CC22**. При сравнение с по-старо българско проучване върху стафилококови изолати за периода 2005-2011г. в НЦЗПБ, д-р Д. Нашев установява като най-чест секвенционен тип **ST5** в 38% от MRSA. С близка честота (37%) е установен тогава **ST239**, който сега се открива само в 11,5% и други съотваствия не се установяват (Нашев, 2013).

Клон а според епидемиологичното типизиране сRAPD съответства на **клонален комплекс CC5**. Този клон а включва основно ST5, –като само един изолат е с различен ST тип - ST 4776, но от същия клонален комплекс. Към **CC5 се включва и още един изолат ST 221, но с различен RAPD** профил.

Първият **клон а**, респ. **клонален комплекс CC5**, който включва и най-много изолати (n=8) циркулира през целия период 2016 - 2020г в две от големите Университетски болници SIR и MMA, както и сред амбулаторни пациенти. За ST5-CC5 е известно, че е опасен епидемичен клон, причиняващ тежки нозокомиални инфекции, наречен EMRSA Ню Йорк / Япония , защото има доказано разпространение в САЩ, Австралия и Азия (Geoffrey WC et al. 2006). Установени са няколко международни

епидемични клона MRSA (EMRSA), циркулиращи на различни континенти и в различни държави. ST22-CC22 (EMRSA-15), ST239-CC8 (Aus-2 и Aus-3 EMRSA), ST8-CC8 педиатричен (ирландски-2 EMRSA), ST36-CC30 (EMRSA-16), ST5-CC5 (Ню Йорк / Япония EMRSA), ST8-CC8 вариант (ирландски-1 EMRSA) и класическия MRSA клон ST250-CC8. Само 3 EMRSA клона обикновено са полирезистентни ST239-CC8 (устойчив на тетрациклин, еритромицин, триметоприм, ципрофлоксацин и гентамицин), ST8-CC8 педиатричен (устойчив на еритромицин, триметоприм, и ципрофлоксацин) и варианта ST8-MRSA-II (устойчив на тетрациклин, еритромицин, триметоприм, ципрофлоксацин, гентамицин и мупиноцин). (Geoffrey WC et al. 2006). Три от тези опасни епидемични клона EMRSA бяха установени в проучваните български изолати от болни със стафилококови инфекции, като един от тях **ST5CC5** е най-честият български клон MRSA. **75% от изолатите, принадлежащи към Клон а, респ. ST5CC5, са инвазивни** - от хемокултури и аспирати от абцес или от трехея на лежащо болни. Половината от изолатите съдържаха значителен брой гени, кодиращи фактори на вирулентност *hlg*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, а останалите с 1-2 гена по-малко, което прави впечатление, че притежават голям брой от екзотоксините, които са същевременно и суперантигени. Тези данни са в унисон с изразената имunosупресираща роля и подпомагаща инвазията на стафилококите в тъканите и преживяването в биологичните течности (Argudin MA et al. 2010; Jawetz, Melnick, &Adelberg's 2013; Karbuz A et al. 2017). Освен присъщата им **повишена вирулентност е доказана пре всички от ST5CC5 и високо ниво на макролидна-линкозамидна резистентност от cMLSb тип (Таблица 9)**, кодирана предимно от *erm B*. Този клон освен като Ню Йорк е известен още като Марсилски клон, когато е свързан с муковисцидоза (Liu Y et al. 2016) Щамове, свързани с този клон са докладвани в Португалия, Полша, Франция, Испания, Швеция, Дания, Великобритания, Колумбия, Бразилия, Аржентина, САЩ и Корея както като свързани с болнични инфекции, така и като придобити в обществото (Deurenberg et al. 2006, Monecke et al. 2011).

Клон b, съответстващ на секвенционен тип **ST582CC15**, беше установен през 2016 - 2020г. и в трите болници, от които произхождаха изолатите. **В 2/3 от случаите изолатите бяха инвазивни и съдържаха сл. гени, кодиращи вирулентност *hlg*, *seb*,**

sei, seh, sej, а резистентността към макролиди-линкозамиди беше **ind MLSB** тип и се медираше от *ermA*. Представителите показаха голяма генетично сходство, запазено през годините, както по своите генетични детерминанти за патогенност, така и за отнасяне към антимикробни средства. Това е следващият секвенционен тип, който може да се асоциира с инфекции при болни с муковисцидоза муковисцидоза (Liu Y et al. 2016).

Клон с, който кореспондираше с **ST217CC22** беше установен само в 1 болница ORT и в амбулаторни пациенти. За разлика от предишната група, тук се наблюдаваше **значителна хетерогенност**, както при факторите на вирулентност, така и при резистентността - имаше чувствителни към макролиди/линкозамиди, а се откриваше и от трите типа на макролидна резистентност (**Таблица 10**) **ST 5417 CC22**, отново беше изолат от ORT. Този клон не се среща през 2019-2020г.

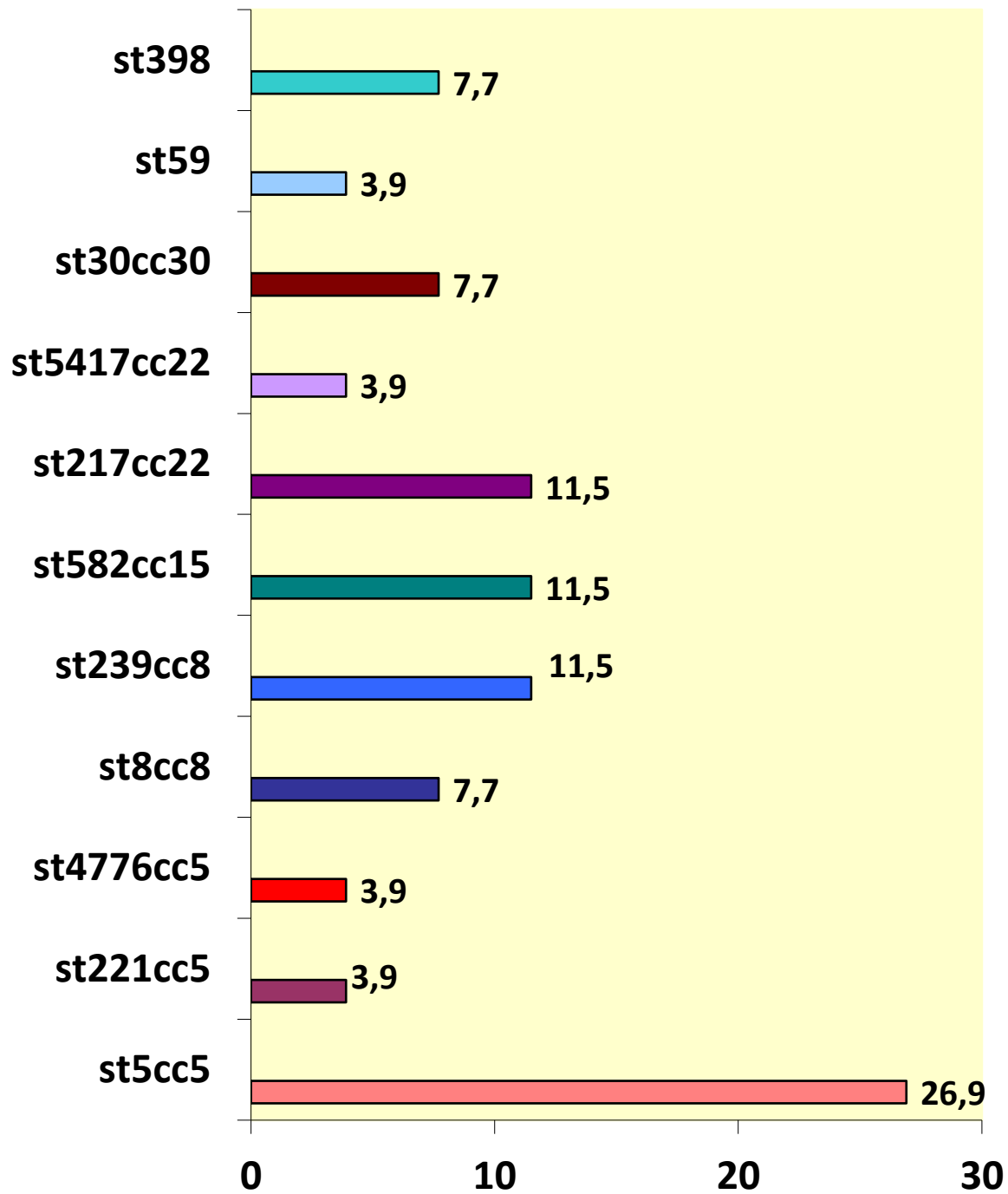
Следващият по честота **клонален комплекс CC8**, част от който се идентифицираше с **клон d** съдържаше **само HA-MRSA**, **липсваха амбулаторни представители, и всички изолати бяха инвазивни** - от хемокултура и пунктат от абсцес. Всички MRSA от клон **ST8-CC8**, който също е известен като педиатричен ирландски EMRSA (Geoffrey WC et al. 2006), съдържаша генетичните детерминанти *hlg, seb, sec, seh, sei, sej*, а тези от **ST239CC8** се различаваха, както помежду си, така и с другите от CC8 по комбинациите от гените за вирулентност и резистентност. **ST8** е установяван в 8% преди 10 години в България (Нашев, 2013), докато сега беше открит в 19,2% изследваните щамове.

Три от доказаните ST типове в български изолати, вкл. най-честият са установени с друго проучване като преобладаващи при деца с муковисцидоза. Това са ST5 (14%), ST30 (14%) и ST8 (10%). Допълнителен анализ разкрива, че изолатите със ST5 и ST30 са по-малко токсични от изолатите ST8 и ST15 и че типовете ST5, ST15, ST59 и ST87 на CF *S. aureus* са по-малко способни да нахлуят в клетки от клетъчна линия A549 (Liu Y et al. 2016). За Китай през периода 2012-2014г преобладаващият тип от 13 открити типове е бил ST239 (27,9%), следван от ST59 (16,3%) (Yi TT et al. 2018), последният в България се среща рядко в 3,9%. ST239 преди 10 години е откриван в 37%, докато сега едва в 11,5%. В същото китайско проучване CC7-ST7, CC239 и CC59 са доказани като местните

основни епидемични клонални комплекси и CC239-ST239 и CC59-ST59 са били основните епидемични типове (Yi TT et al. 2018).

Докато в Съединените щати CA-MRSA епидемията се дължи главно на драматичния възход на единичен клон, наречен USA300, идентичен с ST5, в Европа и други страни по целия свят щамове CA-MRSA се характеризират с клонална хетерогенност (Boswih SS. 2018; Udo EE. 2018; Planet P. 2017). В северната част на Южна Америка, CA-MRSA инфекциите са причинени от щам подобен на USA300 и е наречен „вариант на Латинска Америка“ или USA300-LV.

В българските изолати MRSA, беше открит в по-нисък процент (7,7%) ST398. В друго проучване е установен нов клонален комплекс (CC) 398, свързани с инфекции по добитъка (LA-MRSA). Честотата на LA-MRSA се е увеличил значително в Европа и може да колонизира или директно заразяват коне, кучета и хора. LA-MRSA CC398 проявява полирезистентен фенотип (повечето изолати са устойчиви на оксацилин, еритромицин и клиндамицин (*ermC*) и към окситетрациклин (*tetM*, отчасти и *tetK*). Установено е, че това е причината на MRSA инфекция при няколко хоспитализирани пациенти (Cuny C et al. 2015).



Фигура 18. Разпределение на ST типовете сред колекции от 27 MRSA клинични изолата

Инфекциите, особено инвазивните, причинени от устойчиви или чувствителни *S. aureus*, и в двата случая предизвикват сериозно безпокойство, но щамовете MRSA са свързани с по-лоши клинични резултати от лечението в сравнение с MSSA. Данни от Центъра за контрол и превенция на заболяванията от 2006–2007 г. наблюдения показват, че почти 60% от всички свързани със здравеопазването инфекции на *S. aureus* в САЩ се дължат на MRSA (CDC. Healthcare-associated Infections in the United States, 2006–2016). *S. aureus* е вторият най-често срещан организъм, причиняващ инфекции на ССС и че делът на MRSA изолатите се увеличава от 22% през 1995 г. на 57% през 2001 г. (Wisplinghoff H et al. 2004). По-нови проучвания показват, че е имало известен спад в процента на причинените от MRSA бактериемии в американските болници от 2012 до 2016 г. Независимо от това успокоение, разпространението на MRSA в други страни остават значително чести (Hassoun A et al. 2017).

В заключение, епидемиологичното типизиране чрез RAPD и MLST доказва широко вътреболнично разпространение на **26 клона MSSA** и **4 клона MRSA** в периода 2016 – 2020г. Първият **MSSA RAPD клон А** е циркулирал по-интензивно през 2016 и 2017 година и е бил широко разпространен в 2 болници, за разлика от следващите години, когато е изместен от другите по-нови такива. **Доминирацият тип А демонстрира висок епидемичен и инвазивен потенциал**. Всички MSSA представители на втория по честота клон F, са изолирани от ММА предимно в периода 2018-2019г и бяха чувствителни към макролиди и линкозамиди, както и към другите групи антимикробни средства. **По-новият клон I, липсващ през 2016-2017г. е със значително по-висока вирулентност и макролидна резистентност в 42,9%, кодирана от *ermB* и *ermC***. Още два малки клона циркулират вътреболнично и се асоциират предимно с инвазивни инфекции. В другите клонове влизат единични амбулаторни изолати, както и едновременно от различни болници от различни години, без явна епидемиологична връзка. Това показва дивергенция на MSSA през годините и поселяване в различни болнични звена от постъпващи пациенти, а евентуално и от персонала на здравните заведения.

Беше установено, че **сред MRSA доминирацият тип е ST5CC5, съответстващ на RAPD тип а е персистиращ през целия проучван период (2016-2020г.)**, в две от

големите Университетски болници SIR и MMA, както и сред амбулаторни пациенти. Това е известен **международен епидемичен секвенционен тип**, който е откриван и преди 10г. в България. **Клон b**, съответстващ на секвенционен тип **ST582CC15** съдържаше щамове **с висок епидемичен и инвазивен потенциал** и циркулираше и в трите болници. **Клон c**, който кореспондираше с **ST217CC22** беше установен само в 1 болница и в амбулаторни пациенти. За разлика от предишни групи, тук се наблюдаваше **значителна хетерогенност**. **Клон d**, респ. **ST8-CC8** съдържаше само **HA-MRSA** и **всички изолати бяха инвазивни**. Този клон е известен като **педиатричен ирландски EMRSA**.

Таблица 10. Разпределение на 27 изолата MRSA според MLST ST-CC, RAPD профила, клиничен материал, клиника, година на изолиране, носителство на гени за вирулентност и за резистентност към макролиди/линкозамиди, както и фенотипа макролидна резистентност

ДНК №	STтип-клонален комплекс	RAPD тип	Материал	Клиника	Година на изолиране	Гени на вирулентност	Детерминанти на макролидна резистентност	Фенотип макролидна резистентност
88	ST5CC5	а	назален секрет	SIR-RE	2016	<i>hlg, sec, seg, sei, sej</i>	<i>erm C</i>	с MLSB
159	ST5CC5	а	простатаен секрет	Amb	2017	<i>hlg, sea, seb, sec, seg</i>	<i>erm B</i>	с MLSB
182	ST5CC5	а	трахеален аспират	SIR-RE	2017	<i>hlg, seb, sec, seg, seh, sei, sej</i>	<i>erm B& erm C</i>	с MLSB
184	ST5CC5	а	аспират от абцес	MMA-NS	2017	<i>hlg, seb, sed, seg, seh, sei, sej</i>	<i>erm C</i>	с MLSB
191	ST5CC5	а	хемокултура	MMA-SS	2017	<i>hlg, seb, sec, seg, seh, sei, sej</i>	<i>erm B</i>	с MLSB
401	ST5CC5	а	ранев секрет	MMA-SS	2019	<i>hlg, seb, sec, seg, sei, sej</i>	<i>erm B</i>	с MLSB
538	ST5CC5	а	хемокултура	SIR-RE	2020	<i>hld, seb, seh, sei, sej</i>	<i>erm C</i>	с MLSB
115	ST 4776CC5	а	назален секрет	SIR-RE	2016	<i>seb, seg, sei</i>	<i>ermA</i>	с MLSB
186	ST221CC5	-	аспират от абцес	MMA-AS	2017	<i>hlg, cna,seb, seh,sej seg</i>	n	suscept

111	ST582CC15	b	гърлен секрет	Ort	2016	<i>seb, sei, hlg</i>	<i>ermA</i>	ind MLSB
250	ST582CC15	b	хемокултура	SIR-HE	2017	<i>hlg, seb, sei, seh, sej</i>	<i>ermA</i>	ind MLSB
411	ST582CC15	b	аспират от абцес	MMA-AS	2020	<i>hld, cna, seh, sei, sej</i>	<i>ermA</i>	ind MLSB
13	ST8CC8	-	хемокултура	SIR-HE	2016	<i>hlg, sea, seb, sec, seh, sei</i>	<i>ermB</i>	c MLSB
14	ST8CC8	-	аспират от абцес	Ort	2016	<i>hlg, seb, sec, seh, sei, sej</i>	n	suscept
251	239CC8	d	аспират от абцес	SIR-NS	2017	<i>hlg, sea, seb, seh, sei, sej</i>	<i>ermB</i>	MS фенотип
381	239CC8	-	хемокултура	MMA-SS	2018	<i>hlg, sej</i>	<i>ermB</i>	c MLSB
278	239CC8	d	аспират от абцес	SIR-NS	2018	<i>hlg, sei, sea,</i>	n	suscept
385	ST72CC8	-	ранев секрет	MMA-SS	2018	<i>hlg, sei, seb, seh</i>	<i>erm C</i>	c MLSB
153	217CC22	c	аспират от синус	Amb	2016	<i>tst, hlg, sea, seb, sec, seg, sei</i>	n	suscept
209	217CC22	c	аспират от абцес	Ort	2017	<i>hlg, cna, seb, sei, seh</i>	<i>ermA</i>	MS фенотип
389	217CC22	c	назален секрет	Amb	2018	<i>hld, seh, sei, sej</i>	<i>ermA</i>	ind MLSB

211	ST5417CC2 2	-	ставен пунктат	Ort	2017	<i>hlg, cna, seb, seh, sei</i>	<i>erm B</i>	с MLSB
116	ST30CC30	-	назален секрет	Amb	2016	<i>seb, seg, sei</i>	<i>ermA</i>	с MLSB
173	ST30CC30	-	ранев секрет	MMA-NS	2017	<i>tst, hlg, sea, seb, she, sei, sej</i>	n	suscept
158	ST59	-	гърлен секрет	Amb	2017	<i>hlg, sea, seb, sec, seg, seh, sei</i>	<i>ermA</i>	MS фенотип
104	ST398	-	аспират от абцес	Ort	2016	<i>hlg, cna, sei, sej</i>	<i>erm B&erm C</i>	с MLSB
237	ST398	-	аспират от абцес	MMA-NS	2017	<i>hlg, cna, seb, sei, sej</i>	<i>ermB</i>	с MLSB

V. Изводи:

1. Разработеният и апробиран в практиката нов PCR алгоритъм за бързо откриване на *S. aureus*, MSSA и MRSA/CoN, директно в положителни хемокултури и/или при пунктати от абсцеси показва отлична специфичност и чувствителност. Той се явява много добра и по-бърза алтернатива на културелното изследване.
2. Установени са значителни нива на макролидна резистентност (34,05% за erythromycin и 23,03% за clindamycin) в проучените изолати *S. aureus* от 2016 – 2020г. Нивото на метицилиновата резистентност (10,93%) леко намалява през последните пет години в сравнение с предишен 10г. период. Устойчивостта към гентамицин, левофлоксацин, тетрациклин, хлорамфеникол и комбинацията триметоприм / сулфаметоксазол не превишава 10% и е недостатъчно клинично значима.
3. Докладват са нови факти за разпределението на важни фактори на вирулентност в различни по произход и антимикробна чувствителност изолати *S. aureus*. Честотата на *cna* и *tst* е 14,2% и 6,5%, а гените за ентеротоксините се срещат в диапазона от 4,3% до 72,6%. Комбинации от три гена, *sei*, *seg* и *seb*, кодиращи суперантигени се доказват в повече от 60% от българските стафилококови изолати.
4. Открити са гените, преобладаващи в инвазивните *S. aureus*, независимо от тяхната антимикробна чувствителност, в различни комбинации: *cna*, *tst-1*, *seb*, *seh*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* и *sei*, докато сред MRSA, които бяха изолирани в 63,6% от инвазивни инфекции и предимно от болнично лекувани пациенти доминират следните гени, кодиращи вирулентност: *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh* и *sei*.
5. Установено е, че при пеницилин резистентните стафилококови изолати се открива *blaZ* ген. Докато при метицилин резистентните се доказва само *mecA* гена.
6. Доказано е, че за резистентността към макролиди и линкозамиди в България са отговорни предимно *ermC* и *ermA*, следвани от *ermB* самостоятелно или в комбинации, а изключително рядко *msrA* и *mefA*.

7. Открива се ново доказателство за връзка между комбинацията от *ermA+ermC* със стафилококовия фенотип *sMLS* в проучените щамове *S. aureus*.
8. Препоръчва се подходяща емпирична терапия за инфекции, придобити в обществото и за такива, свързани с болничното обслужване, където са по-чести MRSA, с акцент към инвазивните инфекции. Ванкомицин, тигециклин или линезолид при инвазивни, системни инфекции. Нарастващата макролидна и линкозамидна резистентност налага тази група да се прилага само след доказана *in vitro* чувствителност.
9. Епидемиологичното типизиране чрез RAPD демонстрира широко вътреболнично разпространение на 24 клона и дивергенция на MSSA в периода 2016 – 2020г. Доминиращият тип А, циркулирал по-интензивно през 2016 и 2017 година, показва висок епидемичен и инвазивен потенциал. Изолатите от по-новия клон I, от 2018г. демонстрираха значително по-висока вирулентност и макролидна резистентност в 42,9%, кодирана от *ermB* и *ermC*.
10. Установени са чрез RAPD 15 клона MRSA, а посредством MLST пет клонални комплекса и 11 ST типа. Сред тях доминиращият секвенционен тип е ST5CC5 - известен международен епидемичен клон (EMRSA), съответстващ на RAPD клон **a** и персистиращ през целия проучван период с висок епидемичен и инвазивен потенциал. Секвенционен тип ST582CC15, съответстващ на клон **b**, отново съдържаше щамове с високи вирулентност и епидемичност от трите болници. Клон **c**, който кореспондираше с ST217CC22, проявяващ значителна хетерогенност, е установен само в 1 болница и в амбулаторни пациенти. Клон **d**, респ. ST8-CC8, съдържащ само инвазивни HA-MRSA, също е известен международен EMRSA.

VI. Справка за приносите на дисертационния труд

❖ Приноси с оригинален характер

1. Установени са най-честите механизми, кодиращи клинично значимата резистентност към бета-лактами от *blaZ* ген, обуславящ пеницилинова резистентност и *mecA*, откриван при MRSA. За първи път са получени доказателства, че в България резистентността към макролиди и линкозамиди се дължи на *ermC* и *ermA*, последвани от *ermB* самостоятелно или в комбинации, а изключително рядко се откриват *msrA* и *mefA*
2. Проучен е за първи път в България подробно генетичния профил на патогенния потенциал и разпределението на важни фактори на вирулентност в различни по произход и антимикробна чувствителност български клинични изолати *S. aureus*, Комбинации от три гена, *sei*, *seg* и *seb*, които са а силни SAgs са открити в повече от 60% от българските стафилококови изолати.
3. За първи път в български изолати *S. aureus* е доказана асоциацията на гените на вирулентност *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh* и *sei* с MRSA и инвазивността на инфекциите.
4. Открива се за първи път връзка между комбинацията от *ermA+ermC* със стафилококовия фенотип cMLS в проучените щамове *S. aureus* и доминиращият секвенционен тип ST5CC5.
5. Извършено е мащабно епидемиологичното типизиране на подбрани *S. aureus* чрез RAPD. Доказва се широко вътреболнично разпространение на 24 клона MSSA в периода 2016 – 2020г. като преобладаващ е клон А в 31,8%. Установена е дивергенция на MSSA през годините.
6. При MRSA с RAPD се откриват 15 циркулиращи клона MRSA, а MLST типизирането установява пет клонални комплекса и 15 ST типа. Два от доминиращите клона се оказват известни международни секвенционни типа (EMRSA).

❖ Приноси с потвърдителен характер

1. Установена е преобладаваща честота на стафилококовите инфекции в детско юношеска възраст, за сметка на значителния брой респираторни изолати, включени в проучването; приблизително по равно се установяват при мъже и жени, с леко преобладаване на мъжкия пол в 54%.
2. Потвърдена е високата устойчивост на изолатите *S. aureus* към пеницилин, а метицилиновата резистентност е определена в 10,93% и не показва възходяща тенденция. Резистентността към гентамицин, левофлоксацин, тетрациклин, хлорамфеникол и комбинацията триметоприм / сулфаметоксазол е оценена като недостатъчно клинично значима.

❖ Приноси с научно-приложен характер

1. За първи път в България е разработен и апробиран в практиката нов алгоритъм за бързо откриване на *S. aureus* чрез PCR на MSSA и MRSA, а също и на MRSCoN директно в положителни хемокултури и / или при пунктати от абсцеси чрез откриване на *mecA* (кодиращ метицилинова резистентност) и специфичен ген за видова идентификация на *S. aureus* - методът дава ценна информация за избор на ранна етиологично насочена терапия при тежко болни пациенти.
2. След анализ на резултатите от определяне на чувствителността към изпитаните антимикробни средства и проучените механизми на резистентност се препоръчва подходяща емпирична терапия за инфекции, придобити в обществото, както и за такива, свързани с болничното обслужване.

VII. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд

❖ Реални публикации

1. **Virna-Maria Tsitou**, Ivan Mitov, Raina Gergova (2021) Relationship between MLSB resistance and the prevalent virulence genotypes among Bulgarian *Staphylococcus aureus* isolates. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. DOI: <https://doi.org/10.1556/030.2020.01218> (IF₂₀₁₉**1.086**)

2. Gergova, R.T., **Tsitou, V.S.**, Gergova, I.I., Muhtarova, A.A., Mitov, I.G. (2019) Correlation of methicillin resistance and virulence genes of *Staphylococcus aureus* with infection types and mode of acquisition in Sofia, Bulgaria Afr. J. Clin. Exper. 2019; 20 (4): 280-288; <https://dx.doi.org/10.4314/ajcem.v20i4.3>

3. **Цитю В-М.**, Р. Гергова (2019) *Staphylococcus aureus* – фактори на вирулентност и ролята им в патогенезата на инфекцията Здраве и наука, година IX, брой 3, 46-51

❖ Участия в научни форуми- симпозиуми и конгреси:

1. **Tsitou V-M.**, R. Gergova, A. Muhtarova, I. Gergova, I. Mitov The toxic potential of Bulgarian clinical isolates *Staphylococcus aureus* determined by multiplex PCR. 10th **Balkan Congress** of Microbiology November 16th – 18th, 2017, Sofia, Bulgaria - poSter

2. **Tsitou V-M.**, R. Gergova, I. Gergova, I. Mitov. DiSTribution of virulence genes and *MEC A* in *Staphylococcus aureus* isolates from outpatients and hospitalized patients. 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, October 10th – 13th, 2018, **Hisarya**, Bulgaria - poSter

3. **Tsitou V-M.**, I Mitov, R Gergova. PCR detection of *Staphylococcus aureus* and *mecA* gene in patients with invasive infections. EuroSciCon Conference on Virology and Infectious Diseases April 22-23, 2019; **Athens, Greece** - poster

4. Manti A, AM Kalaitzi, **V.MTsitou.** R Gergova. Health care associated infections - an actual medical problem. International Congress of Medical Sciences, 9 - 12 May, **Bulgaria – Sofia** (AMSB-Sofia) - poster

VIII. Участия в проекти, свързани с дисертационния труд:

- 1. Договор №Д-56/2017 с вх. №8263/2.12.16** на МУ-София, СМН: Проучване токсигенността и макролидната резистентност на клинично значими пиогенни коки *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*.
- 2. Договор № 45 /8.3.2021** на МУ-София, СМН: Епидемиологично типизиране с молекулярно-генетични методи на изолати *Staphylococcus aureus* от различни инфекции

Summary

The aim of this dissertation is to conduct investigations on virulence factors, antibiotic resistance and molecular epidemiology of clinically relevant *S. aureus* isolates.

Results: The new PCR algorithm developed and tested in practice for the rapid detection of *S. aureus*, MSSA and MRSA / CoN, directly in positive blood cultures and / or in punctures from abscesses showed excellent specificity and sensitivity. It is a remarkable and faster alternative to routine microbiological examination.

A total of 558 invasive and non-invasive clinical strains *S. aureus* isolated during 2016-2020 from hospitals in Sofia, were studied and evaluated for the current levels of antimicrobial resistance; mechanisms of resistance to beta-lactams and macrolides, staphylococcal RAPD type and sequence type (ST) distribution.

Significant levels of macrolide resistance (34.05% for erythromycin and 23.03% for clindamycin) were found in the studied *S. aureus* isolates from 2016 - 2020. The level of methicillin resistance (10.93%) has slightly decreased in the last five years compared to the previous 10 years. period. Resistance to gentamicin, levofloxacin, tetracycline, chloramphenicol and the trimethoprim/sulfamethoxazole combination does not exceed 10% and is insufficiently clinically relevant.

New facts have been reported in this survey on the distribution of important virulence factors in *S. aureus* isolates of different origin and antimicrobial susceptibility. The incidence of *cna* and *tst* is 14.2% and 6.5%, respectively as of the genes of enterotoxins, they occur in the range of 4.3% to 72.6%. Combinations of three genes, *sei*, *seg* and *seb*, encoding superantigens are detected in more than 60% of Bulgarian staphylococcal isolates.

Predominant genes in invasive *S. aureus*, regardless of their antimicrobial susceptibility, were discovered in various combinations: *cna*, *tst-1*, *seb*, *seh*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* and *sei*, while among MRSA which were isolated in 63.6% from invasive infections and mainly from hospitalized patients, dominate the following genes encoding virulence: *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh* and *sei*.

It has been found, that in penicillin-resistant staphylococcal isolates the *blaZ* gene is detected. While in methicillin resistant only the *mecA* gene has been detected.

We proved that resistance to macrolides and lincosamides in Bulgaria is mainly due to *ermC* and *ermA*, followed by *ermB* alone or in combination, and very rarely to *msrA* and *mefA*.

New evidence has been discovered for association between the combination of *ermA* + *ermC* with the staphylococcal phenotype cMLS in the studied *S. aureus* strains.

Appropriate empirical therapy is recommended for community-acquired and hospital-related infections, where MRSA is more common, with a focus on invasive infections. Vancomycin, tigecycline or linezolid in invasive, systemic infections. Increasing macrolide and lincosamide resistance requires this group to be administered only after proven in vitro susceptibility.

Epidemiological typing by RAPD method demonstrates widespread nosocomial distribution of 24 clones and divergence of MSSA in the period 2016-2020. The dominant type A, which circulated more intensively in 2016 and 2017, showed high epidemic and invasive potential. The isolates from the newer clone I, from 2018, showed significantly higher virulence and macrolide resistance in 42.9%, encoded by *ermB* and *ermC*. 15 MRSA clones were identified by RAPD, and five clonal complexes and 11 ST types by MLST methods respectively. Among them, the dominant sequence type is ST5CC5 - a known international epidemic clone (EMRSA), corresponding to the RAPD clone **a** and persisting throughout the study period with high epidemic and invasive potential. Sequence type ST582CC15, corresponding to clone **b**, again contained strains with high virulence and epidemicity from the three hospitals. Clone **c** that corresponded to ST217CC22, showing significant heterogeneity, was found in only 1 hospital and in outpatients. Clone **d**, resp. ST8-CC8 containing only invasive HA-MRSA is also known as international EMRSA.

Conclusion: This research of virulence, level and mechanisms of antimicrobial resistance, serotypes distribution and molecular epidemiology of clinically relevant staphylococcal isolates gives us the basis for future monitoring of evolution and genetic relation of Bulgarian *S. aureus* strains in comparison with the globally spread resistant clones.