



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ
„Чл.-кор. проф. д-р Иван Митов, дмн“

Проф. д-р Таня Василева Стратева, дм

АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ, ВИРУЛЕНТНОСТ И
ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ТЕРАПЕВТИЧНО ПРОБЛЕМНИ
ИЗОЛАТИ ОТ ГРУПА „НЕФЕРМЕНТИРАЩИ ГЛЮКОЗА
ГРАМ-ОТРИЦАТЕЛНИ БАКТЕРИИ“ (2004 – 2023)

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за
за присъждане на научна степен „Доктор на науките“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Научна специалност „Медицинска микробиология“

СОФИЯ, 2024 г.

Дисертационният труд е обсъден на катедрен съвет на Катедрата по медицинска микробиология „Чл.-кор. проф. д-р Иван Митов, дмн“ на Медицински факултет при Медицински университет – София, на 05.11.2024 г. и предложен за публична защита пред научно жури.

Дисертацията съдържа 464 страници и е онагледена с 58 таблици и 78 фигури. Библиографията включва 1322 литературни източника, от които 14 на кирилица и 1308 на латиница.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 03.02.2025 г. от 13:00 часа в Първа аудитория на Медико-биологичния комплекс на МФ, МУ – София, ул. „Здраве“ № 2 пред научно жури в състав:

1. Проф. д-р Райна Цветанова Гергова, дм – председател, вътрешен член за МУ – София
2. Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, дмн – вътрешен член за МУ – София
3. Проф. д-р Ива Стефанова Христова, дмн – външен член за МУ – София
4. Проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дмн – външен член за МУ – София
5. Проф. д-р Христинка Йотова Хиткова, дм – външен член за МУ – София
6. Проф. д-р Емма Едмонд Кьолеян-Христова, дм – външен член за МУ – София
7. Доц. д-р Михаил Михайлов Петров, дм – външен член за МУ – София

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в Катедрата по медицинска микробиология „Чл.-кор. проф. д-р Иван Митов, дмн“ на МФ при МУ – София.

Номерацията на таблиците и фигурите не отговаря на номерацията в дисертацията. Пълното библиографско описание на цитираните в автореферата литературни източници е налично в раздел „Библиография“ на дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	10
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	11
1. Бактериални щамове	11
2. Изследвани пациенти	14
3. Изпитване на чувствителност към АМЛС	15
4. Молекулярно-генетични техники	16
5. Целогеномно секвениране (Whole-genome sequencing – WGS)	19
6. Методи за доказване на извънклетъчни фактори на вирулентност	21
7. Изследване на биофилм образуване	21
8. Епидемиологично типизиране на проучените НФГБ изолати	22
9. Статистически анализ	24
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	25
1. Антимикробна лекарствена резистентност на проучените НФГБ изолати	25
2. Водещи механизми на резистентност сред проучените НФГБ изолати	42
3. Фактори на вирулентност на проучените НФГБ изолати	79
4. Образуване на биофилм от изследваните НФГБ изолати	95
5. Епидемиологично типизиране на проучените терапевтично проблемни НФГБ изолати	104
V. ИЗВОДИ	127
VI. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ	134
VII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА	137

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AK – аминокиселина	CRAB – карбапенем-резистентни <i>A. baumannii</i>
AMLС – антимикробни лекарствени средства	CRPA – карбапенем-резистентни <i>P. aeruginosa</i>
БЗТ – бъбречнозаместителна терапия	CZA – ceftazidime-avibactam
ИСМО – инфекции, свързани с медицинско обслужване	DOR – doripenem
МВ – муковисцидоза	EARS-Net – European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
НФГБ – неферментиращи глюкоза Грам-отрицателни бактерии	ECDC – European Centre for Disease Control and Prevention
СЗО – Световна Здравна Организация	ESAC-Net – European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network
ЦВК – централен венозен катетър	ESBL – широкоспектърна β -лактамаза
ААС – аминогликозид-ацетилтрансфераза	ESKAPE – <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> spp.
ABC complex – <i>Acinetobacter baumannii</i> – <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> complex	ExoS – екзоензим (екзотоксин) S
AMEs – аминогликозид-модифициращи ензими	ExoT – екзоензим (екзотоксин) T
АМК – amikacin	ExoU – екзоензим (екзотоксин) U
AMR – антимикробна резистентност	ExoY – екзоензим (екзотоксин) Y
ANT – аминогликозид-аденилтрансфераза	FEP – cefepime
APH – аминогликозид-фосфотрансфераза	GEN – gentamicin
CAZ – ceftazidime	НАР – болнично придобита пневмония
CDC – Centers for Disease Control and Prevention	IC – International Clone (международен клон)
CFDC – cefiderocol	ICU – отделение / клиника за интензивни грижи
CG – клъстерна група	IMP – imipenem
CHDL – карбапенем-хидролизираща β -лактамаза от клас D	IMP MBL – имипенемаза метало- β -лактамаза
CHL – chloramphenicol	IMR – imipenem-cilastatin-relebactam
CIP – ciprofloxacin	LVX – levofloxacin
COL – colistin	
COVID-19 – Coronavirus Disease 2019	

MBL – метало-β-лактамаза

MDR – множествена лекарствена резистентност (полирезистентен щам)

MDR-AB – *A. baumannii* с множествена лекарствена резистентност

MDR-PA – *P. aeruginosa* с множествена лекарствена резистентност

MEM – meropenem

MEV – meropenem-vaborbactam

MIN – minocycline

NDM – New Delhi MBL

NGS – секвениране от следващо поколение

Omp – външномембранен протеин

OTC – OXA-тип карбапенемаза

OXA – оксацилиназа

PBP – пеницилин-свързващ протеин

PDR-AB – *A. baumannii* с пълна лекарствена резистентност

PIP – piperacillin

QRDR – регион, детерминиращ резистентност към хинолони

ST – секвенционен тип

SXT – trimethoprim-sulfamethoxazole

T3SS – тип III секреторна система

T4P – тип IV пили

TOB – tobramycin

TZP – piperacillin-tazobactam

VAP – пневмония, свързана с механична вентилация

VEB – Vietnamese ESBL

VIM – Verona имипенемаза

XDR – разширена лекарствена резистентност

XDR-AB – *A. baumannii* с разширена лекарствена резистентност

XDR-PA – *P. aeruginosa* с разширена лекарствена резистентност

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Инфекциите с бактерии, притежаващи проблемна антибиотична резистентност, са една от най-честите причини за заболяемост в съвременната медицина, която е довела до разработване на мащабни и координирани програми за борба с тях (World Health Organization 2015; European Commission 2017). През 2019 г. Световната Здравна Организация (СЗО) обявява „Антибиотичната резистентност“ като една от десетте заплахи за общественото здраве (World Health Organization 2019). Понастоящем тя се нарежда и сред водещите причини за леталитет в глобален мащаб, асоциираща се с болестен товар, по-висок от този на СПИН или малария (Murray et al. 2022; Ikuta et al. 2022). Смята се, че през 2050 г. ще бъде на първо място, изпреварвайки дори онкологичните заболявания (O’Neill 2016).

Със сборното наименование „Неферментиращи глюкоза Грам-отрицателни бактерии“ (НФГБ) се означава таксономично хетерогенна група, включваща аеробни, неспорообразуващи Грам-отрицателни бактерии, чиято единствена обща характеристика е тяхната частична или пълна неспособност да метаболизират въглехидратите по ферментативен път. Някои НФГБ, като *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Stenotrophomonas maltophilia*, са признати като важни причинители на инфекции, свързани с медицинското обслужване (ИСМО), със значителен принос към болничната смъртност (Wisplinghoff 2017). Освен това първите два вида са част от група бактерии, обозначена с акронима “ESKAPE”, която обединява шест патогена с множествена лекарствена резистентност (Multidrug Resistance – MDR) и „арсенал“ от фактори на вирулентност: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *Enterobacter species* (spp.) (Rice 2008; De Oliveira et al. 2020). ESKAPE патогените имат способност за „избягване“ (англ. escape) на биоцидното действие на повечето антимикробни лекарствени средства (АМЛС) поради придобиване и/или развитие на MDR механизми (De Oliveira et al. 2020). Систематичен преглед на клиничните и икономически последици от антибиотичната резистентност показва, че група ESKAPE е свързана с най-висок риск от смъртност (Founou et al. 2017).

Поради потенциалната им резистентност към голям брой АМЛС, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* са определени съответно като „сериозна“ и „спешна заплаха за общественото здраве“ от Центъра за контрол и профилактика на заболяванията (CDC) (Centers for Disease Control and Prevention, 2019), а карбапенем-резистентните *P. aeruginosa* (CRPA) и *A. baumannii* (CRAB)

попадат в списъка с микроорганизми на СЗО, които са с „критичен приоритет“ за проучване и създаване на нови, ефективни антибиотици (Taccconelli et al. 2018). CRPA и CRAB са сериозно терапевтично предизвикателство, тъй като повечето от тях демонстрират MDR (нечувствителност към поне един агент в повече от три категории АМЛС с активност срещу НФГБ) или разширена (екстензивна) лекарствена резистентност (Extensive Drug Resistance – XDR, нечувствителност към поне един агент във всички категории, с изключение на две или една от тях) (Magiorakos et al. 2012). През последните години в лечението на инфекциите, причинени от тези микроорганизми, се прилагат антимикуробни стратегии с участие на новогенерационни антибиотици, като ceftolozane-tazobactam, ceftazidime-avibactam и cefiderocol (Soriano et al. 2022; Chumbita et al. 2022). Като последна линия в терапията се включва единият от двата налични полимиксина – colistin, въпреки неговата токсичност (El-Sayed Ahmed et al. 2020).

Най-разпространеният НФГБ етиологичен агент е *P. aeruginosa*, който е отговорен за голямо разнообразие от нозокомиални инфекции, особено сред пациенти с предразполагащи фактори, като обширни изгаряния, имунокомпрометирана защита и метаболитни нарушения (Hasannejad-Bibalan et al. 2021; Reynolds and Kollef 2021; Yakout and Abdelwahab 2022; Gomersall et al. 2023). Също така той е признат за най-честата причина за белодробно заболяване и смъртност при пациенти, страдащи от генетичното заболяване муковисцидоза (МВ) (Bhagirath et al. 2016). Пластичността и адаптивността на генома на *P. aeruginosa*, включващ множество регулаторни гени (>8% от 6-Мб геном), са ключови характеристики в способността на патогена да персистира хронично в гостоприемника и да заобикаля приложеното антибиотично лечение (Gellatly and Hancock 2013). Идентифицирани са десет високорискови клона на *P. aeruginosa*, успешно адаптирани към болничната среда, които се асоциират с глобално разпространение и MDR/XDR профил на антибиотична резистентност, както следва: секвенционен тип (ST) 111, ST175, ST233, ST235, ST244, ST277, ST298, ST308, ST357 и ST654 (del Barrio-Tofiño et al. 2020). ST235 е най-високорисковият от тях, обединяващ продуценти на над 60 различни варианта β -лактамази, в това число множество карбапенемази от класове А и В, които притежават и силно вирулентен фенотип, вероятно поради производство на ExoU цитотоксин.

Acinetobacter spp. са НФГБ, които са сред водещите причинители на ИСМО в съвременната здравна система. Родът включва над 100 геномни и именувани таксономични вида, от които с най-голяма клинична значимост е *A. baumannii*. През последните десетилетия *A. baumannii* глобално се утвърди като

силно обезпокоителен нозокомиален агент (Moubareck and Halat 2020), особено в отделенията за интензивни грижи (Intensive Care Units – ICUs), където причинява широк спектър от ИСМО и продължителни, трудноконтролируеми взривове, в т.ч. пневмония, свързана с механична вентилация (VAP), инфекции на кръвния ток (BSIs), инфекции на уринарния тракт, раневи инфекции и менингити (Lynch et al. 2017; Jiménez-Guerra et al. 2018; Yu et al. 2021; Zhang et al. 2021; Fursova et al. 2023). Продължителният ICU престой увеличава вероятността за развитие на бактериални коинфекции, дължащи се на полирезистентни *A. baumannii* (MDR-AB), сред критично болни от Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) (Yang et al. 2021; Alenazi et al. 2023). Докладвани са и придобити в обществото *A. baumannii* инфекции, предимно при пациенти със съпътстващи заболявания (Dexter et al. 2015; Chen et al. 2018a). Съвременните тенденции сочат висока честота на инфекциите, причинени от CRAB, MDR-AB и *A. baumannii* с разширена лекарствена резистентност (XDR-AB), както и възникване на панрезистентни *A. baumannii* (PDR-AB), за които възможностите за ефективно лечение са силно ограничени (Papathanakos et al. 2020a; Nguyen and Joshi 2021; Raddaoui et al. 2024a). В допълнение към своята забележителна резистентност към много АМЛС *A. baumannii* се характеризира със склонност към клонално разпространение. В продължение на пет десетилетия неговата еволюция се движи главно от два глобални или международни клона (International Clones – ICs) с висок риск (IC1 и IC2) (Holt et al. 2016). Понастоящем са идентифицирани единадесет ICs (IC1–11) (Zarrilli et al. 2013; Al-Hassan et al. 2021; Shelonkov et al. 2023; Xu et al. 2024), с най-широко разпространение на IC2, който обичайно включва CRAB с придобита OXA-23 карбапенемаза от клас D (Higgins et al. 2010a; Zarrilli et al. 2013; Namidian and Nigro 2019).

Актуален проблем за болничната патология представлява и *S. maltophilia*, който се нарежда на трето място сред НФГБ (след *P. aeruginosa* и *A. baumannii*) като причинител на ИСМО сред ICU пациенти, животозастрашаващи инфекции в имунокомпрометирани с хематологични и онкологични заболявания и хронични бронхопулмонални инфекции при болни, страдащи от МВ (Demiraslan et al. 2013; Waters et al. 2013; Dimopoulos et al. 2023). От началото на глобалната пандемия *S. maltophilia* се утвърди като един водещите етиологични агенти на вторични бактериални инфекции, като VAP и BSIs, засягащи болните от COVID-19 в критично състояние (Yang et al. 2021; Raad et al. 2023). Видът притежава вродена устойчивост към β -лактами, вкл. карбапенеми, аминогликозиди, trimethoprim и tetracycline, дължаща се на индуцибелни хромозомно-кодирани β -лактамази, експресия на ефлукс помпи

и ниска пропускливост на външната мембрана. Развитието и на придобитата резистентност, в резултат от пренос на гени, локализирани в интегрони (напр. *sul1*, *sul2*, *sul3* и *dfrA*, детерминиращи резистентност към trimethoprim-sulfamethoxazole), транспозони и плазмиди, ограничава драстично наличните възможности за антимикробна терапия (Sánchez 2015). Проучванията върху молекулярната епидемиология на инфекциите са сравнително малко, но публикуваните доклади сочат преобладаваща генетична хетерогенност на популацията (Pompilio et al. 2016; Mojica et al. 2019; Cruz-Córdova et al. 2020).

P. aeruginosa, *A. baumannii* и *S. maltophilia* се характеризират освен с проблемна антибиотична резистентност, и със способност да образуват биофилм върху абиотични повърхности и тъкани, което им осигурява висока устойчивост към АМЛС и антисептични разтвори, и противодействие на механизмите на имунна защита (Flores-Treviño et al. 2019; Gedefie et al. 2021). Биофилм формирането е най-типичната стратегия за придобиване на адаптивна антибиотична резистентност (Maurice et al. 2018). От друга страна, макар и типични опортюнистични агенти, те притежават истински „арсенал“ от клетъчно-свързани и извънклетъчни фактори на вирулентност, подлежащи на фин контрол от единната регулаторна система “quorum sensing”, в резултат на което се експресират по координиран, зависим от клетъчната плътност начин, с цел преодоляване на защитните механизми на макроорганизма (Trifonova and Strateva 2019; Moubareck and Halat 2020; Jurado-Martín et al. 2021). Факторите на вирулентност на НФГБ, клетъчните и молекулярните патогенетични механизми все още не са напълно изяснени, въпреки, че са обект на интензивни изследвания през последните години. Проучванията върху генетичните детерминанти на вирулентност са с особена значимост за допълване на фундаменталните познания за патогенезата на инфекциите, както и за разработване на нови терапевтични подходи (Qin et al. 2022).

В условията на нарастваща глобална резистентност от ключово значение е оценката на настоящите антимикробни стратегии и търсенето на съвременни алтернативи за лечение на инфекциите, причинени НФГБ с MDR, XDR и PDR. Интензивни проучвания са насочени както към новите антибиотици, така и към неантибиотичните подходи, включващи quorum sensing инхибиране, лектин инхибиране, хелиране на желязото, фагова терапия, приложение на антимикробни пептиди, наночастици, ендолизини и разбира се към разработването на ваксини (Lee et al. 2017; Adegoke et al. 2017; Pang et al. 2019).

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се извърши комплексно проучване върху антибиотичната резистентност, факторите на вирулентност и молекулярната епидемиология на терапевтично проблемни НФГБ изолати (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*), циркулиращи в единадесет български болници в периода 2004–2023 г.

За реализиране на тази цел бяха поставени следните **задачи**:

1. Да се определи чувствителността към антимикуробни лекарствени средства, включително нови одобрени антибиотици, на проучените НФГБ, след което изолатите да се класифицират според критериите за проблемна антибиотична резистентност и да се анализират хронологичните тенденции в мониторираните болници.
2. Да се изследват генетичните механизми на резистентност към антимикуробни лекарствени средства, използвани в лечението на НФГБ-асоциирани инфекции, с основен акцент върху карбапенеми (при *P. aeruginosa* и *A. baumannii*) и trimethoprim-sulfamethoxazole (при *S. maltophilia*).
3. Да се проучат и анализират ключови генотипни и фенотипни характеристики на вирулентността на НФГБ чрез скрининг за наличие на генетични детерминанти, кодиращи фактори на вирулентност, и биохимични тестове за доказване продукцията на извънклетъчни ензими.
4. Да се изследват основните генотипни и фенотипни характеристики на биофилм образуването от *S. maltophilia* и *A. baumannii* чрез скрининг за биофилм-асоциирани гени, оценка на тяхната мутационна вариабилност, доказване на прикрепен растеж върху полистиренова повърхност и търсене на корелация между тях.
5. Избрани изолати *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia* с множествена или разширена лекарствена резистентност да бъдат подложени на целогеномно секвениране за изследване на резистом, вирулом и принадлежност към секвенционен тип / клонален комплекс.
6. Да се проучи молекулярната епидемиология на инфекциите, причинени от терапевтично проблемни НФГБ, като се оцени клоналното сходство между циркулиращите изолати в мониторираните болници.
7. Да се извърши високорезолуционно субтипизиране (филогеномен анализ), включващо изолати от настоящото проучване и различни части на света със сходни профили и генетични детерминанти на антибиотична резистентност, и да се открият техните епидемиологични връзки.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Бактериални щамове

1.1. Изследвани бактериални щамове

В настоящия дисертационен труд бяха проучени **общо 922 неповтарящи се, нозокомиални, терапевтично проблемни НФГБ изолата**, в това число *P. aeruginosa* (254 броя), *A. baumannii* (417), *A. nosocomialis* (1) и *S. maltophilia* (250), циркулирали в 11 университетски болници в България за 20-годишен период (от 2004 до 2023 г.). Щамовете бяха събирани по предварително формулирани критерии:

- *P. aeruginosa* – фенотипна резистентност към поне един агент в три или повече от следните категории АМЛС: антипсевдомонадни пеницилини + β -лактамазен инхибитор (piperacillin-tazobactam), антипсевдомонадни цефалоспорини от 3. и/или 4. генерация (ceftazidime и/или cefepime), карбапенеми, аминогликозиди, флуорохинолони и полимиксини (colistin). С оглед нарастващото разпространение на глобални високорискови клонове, включващи карбапенемаза-продуциращи *P. aeruginosa*, към събираните изолати от 2015 до 2023 г. беше поставено задължително изискване да бъдат нечувствителни към карбапенеми.
- *A. baumannii* – фенотипна резистентност към поне един агент в три или повече от следните групи АМЛС: пеницилини + β -лактамазен инхибитор (ampicillin-sulbactam), карбапенеми, аминогликозиди, флуорохинолони, инхибитори на синтеза на фолиева киселина (trimethoprim-sulfamethoxazole), полимиксини и тетрациклини. По аналогия с *P. aeruginosa*, задължително изискване към събираните изолати след 2014 г. беше фенотипно проявена нечувствителност към карбапенеми.
- *S. maltophilia* – не бяха приложени селективни критерии в подбора на щамовете поради: сравнително рядко изолиране; вродена резистентност към стратегически антибиотици за лечение на НФГБ, определяща патогена като терапевтично проблемен; ограничени проучвания в страната, касаещи генетичните аспекти на антимикробна лекарствена резистентност, вирулентност и молекулярна епидемиология на инфекциите, причинени от *S. maltophilia*.

Проучените НФГБ щамове бяха изолирани предимно от хоспитализирани пациенти, лекувани в общо 11 университетски болници в България. На **Таблицы 1.–3.** е представено разпределение на щамовете по място и периоди на изолиране, а тяхното разпределение по материали е изложено в **Таблицы 4.–6.**

Таблица 1. Разпределение на изследваните щамове *P. aeruginosa* по място на изолиране.

Лечебно заведение	Период на изолиране	Брой изолати
УМБАЛ "Св. Иван Рилски" – София	2004–2009	55
	2015–2016	2
	2019–2020	5
	2022	2
УМБАЛ "Александровска" – София	2005–2009	62
СБАЛББ "Св. София" – София	2004	38
Военномедицинска академия – София	2015–2016	26
СБАЛО "Проф. Б. Бойчев" – София	2004–2009	21
УМБАЛ "Св. Марина" – Варна	2015	20
УМБАЛ "Лозенец" – София	2021–2023	17
УМБАЛ "Св. Анна" – София	2019	2
Извънболнична помощ	2022	4
ОБЩО		254

Таблица 2. Разпределение на изследваните щамове *A. baumannii* по място на изолиране.

Лечебно заведение	Период на изолиране	Брой изолати
УМБАЛ "Александровска" – София	2005–2011	70
	2014–2018	70
УМБАЛ "Св. Иван Рилски" – София	2004	5
	2015–2022	94
УМБАЛ "Св. Марина" – Варна	2014–2016	74
	2019	1
Военномедицинска академия – София	2014–2017	62
УМБАЛ "Д-р Г. Странски" – Плевен	2004–2006	28
СБАЛББ "Св. София" – София	2004	13
ОБЩО		417

Таблица 3. Разпределение на изследваните щамове *S. maltophilia* по място на изолиране.

Лечебно заведение	Период на изолиране	Брой изолати
Военномедицинска академия – София	2011–2016	151
УМБАЛ "Лозенец" – София	2021–2023	44
УМБАЛ "Св. Иван Рилски" – София	2015	1
	2018–2022	19
УМБАЛ "Св. Марина" – Варна	2020–2023	14
УМБАЛ "Токуда" – София	2012–2014	10
УМБАЛ "Александровска" – София	2015–2016	4
СБАЛО "Проф. Б. Бойчев" – София	2021–2022	3
Медицински институт – МВР	2011	2
Извънболнична помощ	2021 и 2023	2
ОБЩО		250

Таблица 4. Разпределение на изследваните изолати *P. aeruginosa* по клинични материали.

Материал	Брой	Материал	Брой
Урина	85	Гърлен секрет	9
Трахеобронхиален аспират	52	Носен секрет	9
Ранев секрет	40	Медицински устройства*	6
Бронхоалвеоларен лаваж	17	Жлъчка	3
Храчка	16	Плеврален пунктат	2
Кръв	14	Фецес	1
ОБЩО			254

* Изолати от: централен венозен катетър ($n = 3$), дрен ($n = 2$) и уретрален катетър ($n = 1$).

Таблица 5. Разпределение на изследваните изолати *A. baumannii* по материали.

Клиничен материал	Брой	Клиничен материал	Брой
Трахеобронхиален аспират	201	Ликвор	11
Ранев секрет	81	Храчка	5
Медицински устройства*	30	Плеврален пунктат	4
Кръв	29	Болнична среда	2
Урина	23	Очен секрет	1
Гърлен секрет	15	Ушен секрет	1
Бронхоалвеоларен лаваж	13	Носен секрет	1
ОБЩО			417

* Изолати от: централен венозен катетър ($n = 15$), дрен ($n = 7$), стомашна сонда ($n = 3$), диализен катетър ($n = 2$), спинален катетър ($n = 1$), уретрален катетър ($n = 1$) и нефростома ($n = 1$).

Таблица 6. Разпределение на изследваните изолати *S. maltophilia* по материали.

Материал	Брой	Материал	Брой
Трахеобронхиален аспират	68	Носен секрет	5
Храчка	34	Болнична среда	5
Ранев секрет	30	Фецес	4
Бронхоалвеоларен лаваж	29	Асцит	2
Гърлен секрет	28	Жлъчка	1
Кръв	21	Ликвор	1
Урина	11	Ставен пунктат	1
Медицински устройства*	9	Влагалищен секрет	1
ОБЩО			250

* Изолати от: дрен ($n = 6$), уретрален катетър ($n = 2$) и централен венозен катетър ($n = 1$).

1.2. Референтни бактериални щамове

P. aeruginosa ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 19606, *A. nosocomialis* ATCC 17903 и *S. maltophilia* ATCC 13637 (Microbiologics, USA).

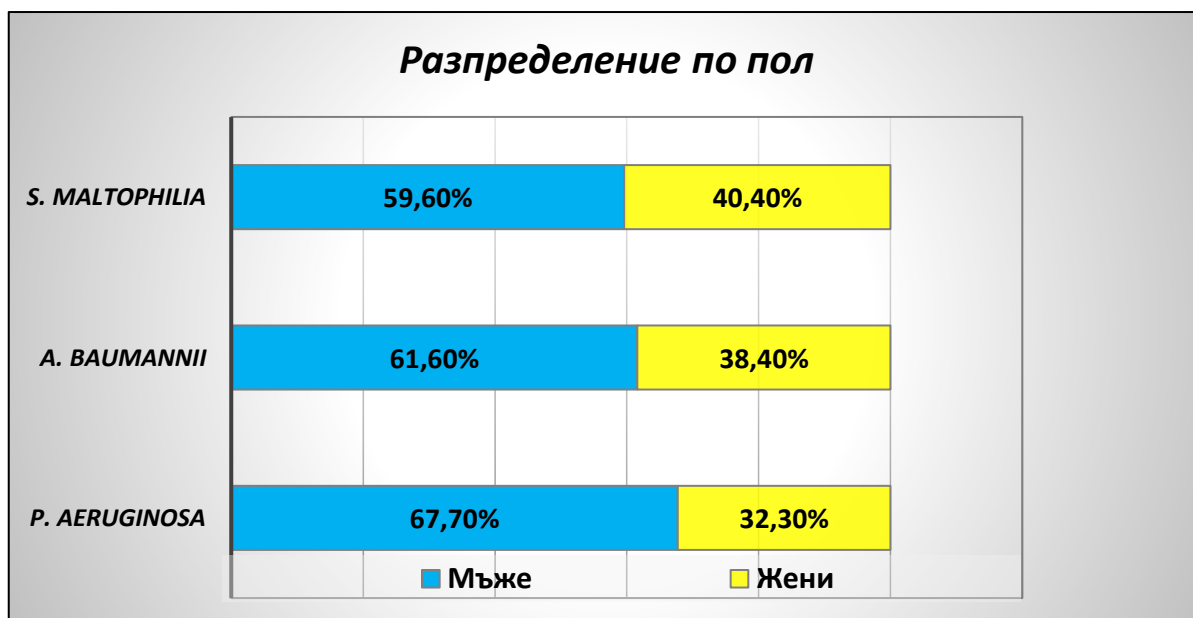
WGS-базираният вируломен анализ на тестваните изолати *S. maltophilia* беше проведен спрямо генома на референтния щам *S. maltophilia* K279a.

1.3. Идентификация на изследваните щамове

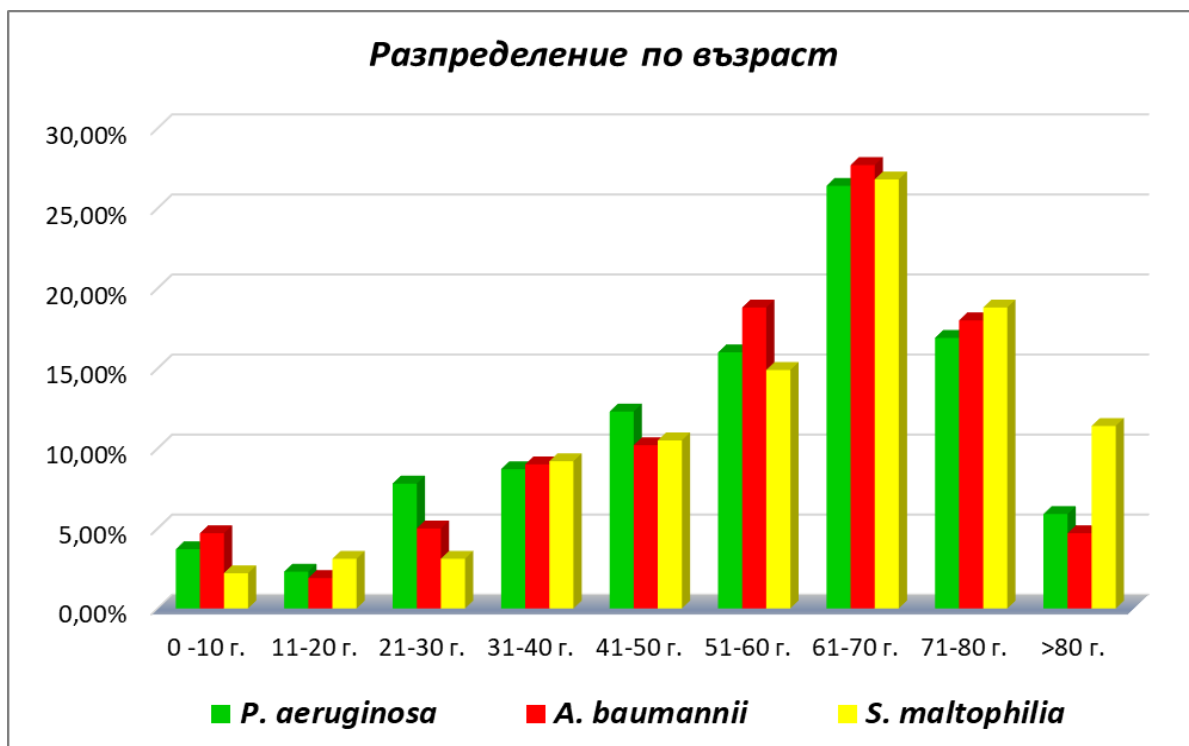
Мануални биохимични тестове, полуавтоматизиран кит BBL Crystal Enteric/Nonfermenter (E/NF) ID (BD, Franklin Lakes, NJ USA), автоматизирани системи VITEK 2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), BD Phoenix M50 (BD) и Bruker Microflex LT MALDI-TOF System (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

2. Изследвани пациенти

На **Фигура 1.** е представено разпределението по пол на изследваните пациенти с установена инфекция, причинена от трите проучени НФГБ, а на **Фигура 2.** – тяхното възрастово разпределение. Според наличните данни инфекциите са по-чести при мъжете и най-разпространени във възрастта от 61 до 70 години (26.4% – 27.7%).



Фигура 1. Процентно разпределение по пол на изследваните пациенти ($n = 914$) с установена инфекция, причинена от *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*.



Фигура 2. Възрастово разпределение на изследваните пациенти ($n = 914$) с установена инфекция, причинена от *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*.

3. Изпитване на чувствителност към АМЛС

Чувствителността на всички НФГБ изолати беше изпитана чрез *дисково-дифузионния метод (ДДМ)* върху средата Cation-Adjusted Mueller-Hinton (САМН) Agar (Liofilchem) с търговски антибиотични дискове според микробния вид.

Чувствителността на изолатите към избрани АМЛС беше изпитана и чрез определяне на минимални потискащи концентрации (МПК) с *градиентен метод*, популярен като епсилометър (Е)-тест, или *метод на серийни разреждания в бульон*, наричан още микродилуционен тест (МДТ). За изпълнение на Е-теста бяха използвани стрипове според микробния вид, с различен концентрационен обхват, произведени от Liofilchem (MIC Test Strip), както следва: ceftazidime (CAZ), ceftazidime-avibactam (CZA), cefepime (FEP), imipenem (IMP), imipenem-relebactam (IMR), meropenem (MEM), meropenem-vaborbactam (MEV), doripenem (DOR), amikacin (AMK), gentamicin (GEN), tobramycin (TOB), plazomicin (PLZ), levofloxacin (LVX), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), minocycline (MIN), tigecycline (TGC), chloramphenicol (CHL) и ticarcillin-clavulanic acid (TTC). МДТ беше приложен за МПК определяне на colistin (COL) и cefiderocol (CFDC), съответно с микроплаки

SensiTest™ Colistin 0.25–16 µg/mL и ComASP® Cefiderocol 0.008–128 µg/mL (Liofilchem).

Получените резултати бяха интерпретирани според ежегодните препоръки на американския Институт по клинични и лабораторни стандарти (CLSI) до 2015 г. и Европейския комитет за тестване на антимикробната чувствителност (EUCAST) след 2015 г. (Clinical and Laboratory Standards Institute 2020; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2023). При липса на критерии в документите на EUCAST изолатите бяха категоризирани по критериите на CLSI и след 2015 г. Граничните стойности на МПК в документите на EUCAST, представени за *Enterobacterales*, бяха приложени за тълкуване на чувствителността на *A. baumannii* към TGC.

Дефиниране на изолати с множествена лекарствена резистентност (MDR), разширена лекарствена резистентност (XDR) и пълна лекарствена резистентност (PDR)

Европейският център за контрол и профилактика на заболяванията (ECDC) и Центровете за контрол и профилактика на заболяванията на САЩ (CDC) категоризират терапевтично проблемните изолати *P. aeruginosa* и *A. baumannii* като **MDR-PA** и **MDR-AB** при нечувствителност към поне 1 препарат в 3 или повече от съответните групи (категории) АМЛС, използвани в терапията на НФГБ инфекции; **XDR-PA** и **XDR-AB** – нечувствителните към поне 1 препарат във всички, с изключение на 2 или 1 от тези групи; и **PDR-PA** и **PDR-AB** – нечувствителните към всички АМЛС (Magiorakos et al. 2012).

Според критериите на Дружеството по инфекциозни болести на САЩ категорията “*P. aeruginosa* с трудна за лечение резистентност – **DTR-PA**” включва изолатите, които са интермедиерни или резистентни към всички β-лактами с антипсевдомонадна активност (CAZ, FEP, TZP, ATM, IMP и MEM) и флуорохинолоните CIP и LVX (Kadri et al. 2018).

4. Молекулярно-генетични техники

4.1. Изолиране на ДНК (обща и плазмидна) и РНК от изследваните НФГБ изолати

Изолирането на ДНК от щамовете *P. aeruginosa* беше извършено чрез термоекстракция, освен в случаите на целогеномно секвениране, когато беше използван метод на изолиране с търговски кит.

Изолиране на обща ДНК от изолатите *A. baumannii* и *S. maltophilia* беше извършено чрез DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilgen, Germany). От CRAB изолати, показали присъствие едновременно на *bla*_{OXA-23} и *armA*, беше изолирана плазмидна ДНК чрез FlexiPrep Kit (GE Healthcare, Chicago, IL USA).

За нуждите на някои от изследванията за механизми на резистентност към CFDC от тестваните и контролните щамове *A. baumannii* беше изолирана обща РНК с помощта на RNeasy Mini Kit (QIAGEN), започвайки с 5×10^8 бактериални клетки.

4.2. Полимеразна верижна реакция (PCR) за видова идентификация

A. baumannii: PCR за детекция на *gyrB* (ген, кодиращ субединица В на ензима гираза), която позволява успешно разграничаване на биохимично неразличимите видове от група *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* (ABC) complex (Higgins et al. 2007).

S. maltophilia: PCR за откриване на 278-бр фрагмент от 23S рРНК гена, с използване на специфични праймери и условия на амплификация, описани по-рано (Gallo et al. 2013).

4.3. PCR за детекция на детерминанти на антимикробна резистентност (AMR)

P. aeruginosa: Скрининг за наличие на гени, кодиращи основни широкоспектърни β -лактамази (ESBLs) (VEB и PER-тип), карбапенемази от молекулярни класове А и В, и ArmA 16S рРНК метилаза, асоциирана с високо ниво на устойчивост към аминогликозиди.

A. baumannii: Всички CRAB изолати бяха изследвани за наличие на AMR детерминанти, отговорни за развитие на резистентност към карбапенеми, широкоспектърни антипсевдомонадни цефалоспорини, аминогликозиди и антифолатни агенти, в т.ч. кодиращи гени за карбапенем-хидролизиращи β -лактамази от клас D (CHDLs), карбапенемази от клас А, MBLs от клас В, ESBLs (PER и VEB), 16S рРНК метилази (ArmA) и дихидроптероат синтази (тип I). PCR амплификация и PCR картиращи експерименти бяха използвани за определяне на инсерционни последователности (ISs), асоциирани с CHDL структурни гени: IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* и IS*Aba3-like* (Héritier et al. 2006).

S. maltophilia: Детекция на гени за дихидроптероат синтази, дихидрофолат редуктази и интегрази от клас 1–3, които медиират резистентност към SXT.

4.4. PCR за откриване на гени, кодиращи фактори на вирулентност

P. aeruginosa: Скрининг за структурни гени за ефекторните протеини (цитотоксини), транспортирани и „инжектирани“ в клетките на гостоприемника чрез тип III секреторната система (Т3SS): EхoS (екзоензим S), EхoТ (екзоензим Т), EхoU (екзоензим U) и EхoY (екзоензим Y).

A. baumannii: Откриване на гени, кодиращи фактори на вирулентност с разнородни функции, сред които основните са участие в бактериалната адхезия и биофилм образуването: *ompA* (кодиращ външномембрания протеин OmpA), *epsA* (капсулен екзополисахарид А / външномембранен протеин за износ на полизахариди), *csuE* (субединица E на тип 1 пилусна система Csu) и *bar* (биофилм-асоцииран Bar протеин, отговорен за вътреклетъчната адхезия в зрелия биофилм) (Da silva et al. 2021; Gedefie et al. 2021; Urmanyu et al. 2022).

S. maltophilia: Скрининг за следните детерминанти на вирулентност: *stmPr1* с два алелни варианта (къс и дълъг, съотв. 868-bp и 1621-bp), кодиращ голямата извънклетъчна протеаза StmPr1, *stmPr2* (малка извънклетъчна протеаза StmPr2), *Smlt3773* локус (външномембранна естераза), *plcN1* (нехемолитична, фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза C) и *smf-1* (SMF тип 1 фимбрии, биофилм-свързан ген).

4.5. PCR за детекция на гени, кодиращи биофилм-асоциирани гени (БАГ)

Генетичните механизми, детерминиращи биофилм формиране от *S. maltophilia*, включват участие на няколко БАГ, от които за PCR скрининг в настоящата работа бяха избрани следните: *spgM* (кодиращ бифункционален ензим с фосфоглюкомутазна и фосфоманомутазна активност), *rmlA* (глюкозо-1-фосфат тимидилтрансфераза) и *rpfF* (синтаза за дифузионния сигнализиращ фактор (DSF), опериращ като медиатор на междуклетъчната сигнализация).

4.6. Обратно-транскрипционна количествена полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR)

RT-qPCR беше използвана за определяне на експресията на *oprD* гена, който кодира външномембрания порин OprD при *P. aeruginosa*, с използване на праймери и условия, описани в предходно проучване (Nazari et al. 2023). Експресията на мРНК на *oprD* гена беше изчислена по метода $2^{\Delta(\Delta Ct)}$ (Schmittgen and Livak 2008). Степента на експресия от $\leq 30\%$ в сравнение с референтния щам *P. aeruginosa* PAO1 беше показателна за намалена генна експресия в проучените клинични изолати.

RT-qPCR беше приложена също при изследване на механизмите на устойчивост към CFDC на първия открит изолат *A. baumannii* (Aba52), показал резистентност към антибиотика. Околичествяването на експресията на гените *pirA* и *piuA*, кодиращи TonB-зависими сидерофорни рецептори, беше извършено чрез двустъпална RT-qPCR, проведена в Rotor-Gene Q real-time PCR System (QIAGEN), по метода $2^{-(\Delta\Delta ct)}$ (Schmittgen and Livak 2008).

4.7. Директно секвениране с флуоресцентно белязани дидеоксинуклеотиди

В по-ранните етапи на настоящата работа нуклеотидно секвениране на избрани гени, кодиращи значими за НФГБ β -лактамази от различни молекулярни класове и фактори на вирулентност, беше извършвано по метода на Sanger et al. с флуоресцентно белязани дидеоксинуклеотиди (Sanger et al. 1977). Секвенционният анализ беше осъществяван чрез софтуер, достъпен от сайта на *the National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), като нуклеотидните последователности на изследваните ампликони бяха сравнявани с еталонни секвенции от GenBank.

5. Целогеномно секвениране (Whole-genome sequencing – WGS)

Избрани изолати CRPA, CRAB и *S. maltophilia* бяха подложени на WGS от следващо поколение (NGS). Те бяха култивирани в течна среда Brain Heart Infusion (Liofilchem). Впоследствие от тези култури беше изолирана геномна ДНК чрез DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Пречистената геномна ДНК беше анализирана количествено (спектрофотометрично) и качествено (електрофоретично чрез агарозна електрофореза), за да се потвърди наличието на достатъчно количество интактна матрица за изготвянето на секвенционни библиотеки от пробите.

5.1. Приложена технология за NGS

Беше приложена DNA nanoball секвенираща технология. Библиотеките бяха секвенирани с помощта на платформата MGISEQ-2000 (BGI Group, Hong Kong, China) в режим на прочити с 2 x 150-bp свързани краища (Peukov et al. 2022).

5.2. Сглобяване на геномите и биоинформатичен анализ

Генерираните секвенционни прочити (във FASTQ формат) бяха качени в свободната онлайн платформа за биоинформатични анализи Galaxy (Galaxy

Version 2.19.0, <https://usegalaxy.eu/>), където бяха проведени всички по-нататъшни стъпки на качествен контрол, сглобяване и оценка на геномите на изследваните изолати посредством интегрираните инструменти FastQC v0.11.9, Trimmomatic v0.38, SPAdes v3.12.0 и Quast v5.2.0 (Afgan et al. 2022).

5.3. WGS-базирана видова идентификация на НФГБ изолати

Беше направен анализ на сглобените „драфт“ геномни последователности посредством веб сървъра Microbial Genomes Atlas (MiGA) (Rodriguez-R et al. 2018), с използване на NCBI Genome Database, секция Prokaryotes (настройки по подразбиране).

5.4. Резистомен анализ

Получените „драфт“ геномни контиги от изследваните изолати *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia* бяха проверени за AMR детерминанти чрез инструмента ABRicate (Galaxy Version 1.0.1).

Откритите β -лактамазни последователности бяха анализирани за точкови, frameshift и indel мутации като част от процедурата. За точкови мутации бяха скринирани също 19 хромозомни гена, асоциирани с резистентността към CFDC, в първия CFDC-резистентен изолат *A. baumannii* Aba52 посредством инструмента Snippy v.4.6.0 с настройки по подразбиране (<https://github.com/tseemann/snippy>). Quinolone-resistance-determining regions (QRDRs) на изолатите *P. aeruginosa* и *A. baumannii* бяха сравнени със съответния регион на референтните щамове *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *A. baumannii* ATCC 19606 с цел идентифициране на аминокиселинни (АК) замени в *gyrA* и *parC* гените.

Пълните дължини на *oprD* и регулаторния *mexT* гени бяха проверени за точкови, frameshift и indel мутации, асоциирани с резистентност към карбапенеми. Анализът беше извършен с помощта на blastn сравнения със съответните последователности в референтния щам *P. aeruginosa* PAO1 (Gene IDs: 881970, 880417).

Мобилните генетични елементи бяха открити с помощта на инструмента MobileElementFinder с настройки по подразбиране (Johansson et al. 2021).

5.5. Вируломен анализ

При *P. aeruginosa* и *A. baumannii* беше извършен скрининг за идентифициране на детерминанти на вирулентност с помощта на инструмента

VFAnalyzer, наличен в базата данни Virulence Factor Database (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) (Liu et al. 2019).

При *S. maltophilia* аминокиселинни (АК) замени в идентифицираните чрез PCR гени на вирулентност бяха калкулирани чрез BLASTP алгоритъм спрямо еквивалентните секвенции на референтния щам *S. maltophilia* K279a. Идентифицирането на нуклеотидните последователности на изследваните БАГ (*spgM*, *rmlA* и *rpfF*) беше извършено посредством инструмента MyDbFinder 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MyDbFinder/>). Впоследствие те бяха сравнени с тези в еталонния щам *S. maltophilia* ATCC 13637 (CP008838.1). Нивата на ДНК и белтъчна идентичност бяха изчислени със съответните BLAST сравнения (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) спрямо кореспондиращите последователности в *S. maltophilia* ATCC 13637.

5.6. Откриване на CRISPR-Cas системи

За откриване на CRISPR-Cas системи в сглобените „драфт“ геноми беше използван инструментът CRISPRCasTyper (Russel et al. 2020). Попаденията с нива на интерференция и адаптация над 90% бяха приети за положителни.

6. Методи за доказване на извънклетъчни фактори на вирулентност

Някои от извънклетъчните фактори на вирулентност на *S. maltophilia* (протеаза, естераза и лецитиназа) бяха изследвани чрез биохимични тестове. За целта изолатите бяха култивирани в бульон Luria Bertani (Liofilchem) до достигане на $OD_{600}=1$ (оптична плътност при $\lambda=600$ nm). Тяхната извънклетъчна ензимна активност беше оценявана чрез посявка на 2- μ L петна от културалната течност върху специфични агари (Nicoletti et al. 2011).

7. Изследване на биофилм образуване

7.1. Определяне на количество образуван биофилм върху абиотична повърхност (полистиренови плаки) по метода „Кристал виолет“ (Soto et al. 2006)

Отчитане на оптична плътност (OD) чрез ELISA ридер LP 400.

7.2. Наблюдаване на биофилми чрез сканираща електронна микроскопия

8. Епидемиологично типизиране на проучените НФГБ изолати

8.1. Случайно амплифициране на полиморфна ДНК чрез PCR (RAPD-PCR)

За типизиране на нозокомиалните изолати *A. baumannii* бяха използвани праймери RAPD-4 (5'-AAGAGCCCGT-3') и M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), а при *S. maltophilia* – праймер 270 (5'-TGCGCGCGGG-3') (Grundmann et al. 1997; Krzewinski et al. 2001).

Филогенетичното родство между проучените нозокомиални НФГБ изолати беше определено чрез Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), с помощта на софтуер GeneTools 4.01 (Syngene, Cambridge, UK). Като критерий за клонална свързаност на щамовете беше приеман коефициент на сходство (известен и като *Dice* коефициент) над 70% (Grundmann et al. 1997).

8.2. Мултиплекс PCR-базиран метод за идентификация на секвенционни групи (клонални линии) на *A. baumannii*

Епидемиологично типизиране на избрани CRAB изолати ($n = 60$) от периода 2017–2022 г. беше извършено по метода на Turton et al., основаващ се две мултиплексни PCR за откриване на алелни варианти в три гена под селективен натиск: *ompA* (кодиращ външномембранен протеин A), *csuE* (част от *Csu* пилусната система, участващ в образуване на биофилм) и *bla*_{OXA-51-like} (вродена карбапенемаза от клас D) (Turton et al. 2007). Интерпретацията беше направена по схемата на Karah et al. (Karah et al. 2012).

8.3. Типизиране чрез мултилокусно секвениране (MLST)

Беше извършен MLST анализ на сглобените „драфт“ геномни секвенции при всички изолати *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*, подложени на NGS, чрез интегрирания в платформата Galaxy MLST инструмент (Galaxy Version 2.19.0, <https://usegalaxy.eu/>). Класификацията в STs беше направена в съответствие с MLST схемите за трите вида (<https://pubmlst.org/organisms>), като при *A. baumannii* беше приложена схема Pasteur.

8.4. Филогеномен анализ

8.4.1. Филогеномен анализ на CRPA изолати на база корови гени в пангенома

Първата група CRPA изолати, подложени на филогеномен анализ, включи NDM-1-продуцентите от УМБАЛ „Лозенец“ и всички публикувани *bla*_{NDM-1}-положителни изолати *P. aeruginosa* с депозирани геноми в свободно достъпните бази данни (към 01.04.2024 г.) с произход от Балканите, както следва: Албания ($n = 2$) (Tafaj et al. 2020), България ($n = 3$) (Kostyanev et al. 2020), Гърция ($n = 2$) (Tsilipounidaki et al. 2023) и Сърбия ($n = 4$) (Kabic et al. 2023). Всички геномни последователности бяха качени в онлайн платформата Galaxy, където първо бяха анотирани с помощта на инструмента Prokka (v1.14.6) с настройки по подразбиране. Получените GFF3 файлове бяха подадени към програмата за пангеномен анализ Roary (v3.13.0). Приложени бяха настройки, изискващи 95% сходство при blastp подравняванията и наличие на ген в 99% от изолатите, за да бъде разглеждан като коров. Maximum-likelihood филогенетично дърво беше построено, използвайки файла с подравнените нуклеотидни последователности на всички корови гени и програмата RAxML (v7.7.6). За неговата визуализация беше използван онлайн инструментът Interactive Tree Of Life (iTOL).

Втората група изолати обедини два *bla*_{VEB-9}-положителни XDR-PA от ICU на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ и всички *bla*_{VEB-9}-съдържащи щамове *P. aeruginosa*, без ограничения в географския произход, с депозирани геноми в NCBI Nucleotide database и The Pseudomonas Genome Database към 01.07.2024 г. Геномите бяха подложени на MLST и скрининг за AMR гени чрез ABRicate v1.0.1. След потвърждаване на наличието на *bla*_{VEB-9} всички секвенции бяха анотирани с помощта на Prokka v1.14.6. Както е описано по-горе, беше извършен пангеномен анализ посредством инструмента Roary v3.13.0 с описаните настройки. Последва построяване на филогенетично дърво с помощта на програмата RAxML v8.2.12, като беше приложен neighbor-joining метод с bootstrap 1000 (Stamatakis 2015). За създаване на графично изображение на филогенетичното дърво беше използван порталът Interactive Tree Of Life (Letunic and Bork 2021).

8.4.2. Филогеномен анализ на CRAB изолати

Първоначално набор от 66 генома на colistin-чувствителни CRAB изолати от югоизточни европейски държави с близко географско положение на България бяха качени в онлайн платформата KBase (<https://www.kbase.us/>) (Arkin et al. 2018) заедно със сглобените геноми на три наши CRAB (означени като Aba52, Aba176 и Aba190). Те бяха изолирани през 2018 и 2019 г. от ICU пациенти в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София и УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Всички секвенции бяха анотирани с помощта на Prokka (v1.14.5) с

настройки по подразбиране. Чрез SpeciesTree (v2.2.0) беше конструирано филогенетично дърво, въз основа на секвенционните варианти в 49 универсални гена. Инструментът iTOL беше приложен за създаване на графично изображение на полученото филогенетично дърво (Letunic and Bork 2007).

Цялостната процедура беше приложена и за откриване на епидемиологични връзки между cefiderocol-резистентния XDR *A. baumannii* Aba52 и 69 cefiderocol-резистентни CRAB, XDR-AB и PDR-AB изолати от няколко държави в Европа, Северна Америка, Африка и Азия, чиито геноми са депозирани в NCBI GenBank.

9. Статистически анализ

Нивата на антимикробна резистентност на изследваните НФГБ изолати от различните хронологични периоди бяха сравнявани помежду си, както и с резултати от други проучвания, чрез *t*-тест на Student. При анализи, включващи групи от малък брой изолати, беше приложен точният тест на Fisher (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1>). Честотата на разпространение на гените за фактори на вирулентност и БАГ, и съответните генни профили на изолатите от това проучване, бяха сравнявани с актуални резултати от други научни изследвания също чрез *t*-теста на Student. И при двата теста за статистически значими бяха приети стойности на *p* под 0.05.

Резултатите от биофилм образуването върху полистиренова плака бяха обработвани с програма Excel (Microsoft Office 365), с извеждане на средна стойност и стандартно отклонение (standard deviation – SD). Беше определяна гранична стойност на оптичната плътност (OD_c), представена като 3 x SD над средната OD на контролните ямки (Stepanović et al. 2007). Класифицирането на щамовете включва следните категории: **OD ≤ OD_c** – непродуциращи биофилм; **OD_c < OD ≤ 2 x OD_c** – слабо продуциращи биофилм; **2 x OD_c < OD ≤ 4 x OD_c** – умерено продуциращи биофилм; и **4 x OD_c < OD** – силно продуциращи биофилм.

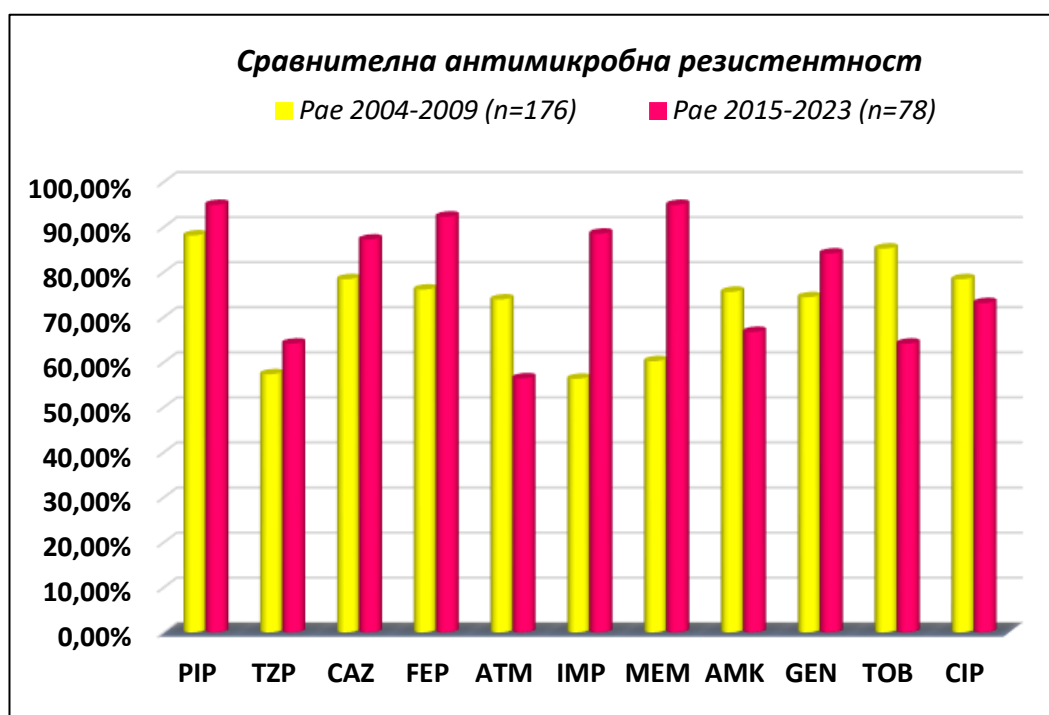
Зависимостта между фенотипни и генотипни характеристики на образуването на биофилм от нозокомиалните изолати *A. baumannii* и *S. maltophilia* беше оценена чрез корелационен коефициент на Spearman, изчисляван с помощта на R 4.2.2. Стойности на $p \leq 0.05$ са статистически значими.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Антимикробна лекарствена резистентност на проучените НФГБ изолати

1.1. Антибиотична резистентност на проучените изолати *P. aeruginosa*

В настоящия труд бяха изследвани само терапевтично проблемни изолати *P. aeruginosa* (250 нозокомиални и 4 от амбулаторно лекувани пациенти), събирани периодично от 2004 до 2023 г. и подбрани по предварително дефинирани критерии за множествена резистентност. На **Фигура 3.** е представена сравнителната антимикробна резистентност на изолатите, разделени в две групи – *стари* (2004–2009 г.) и *нови* (2015–2023 г.) изолати.



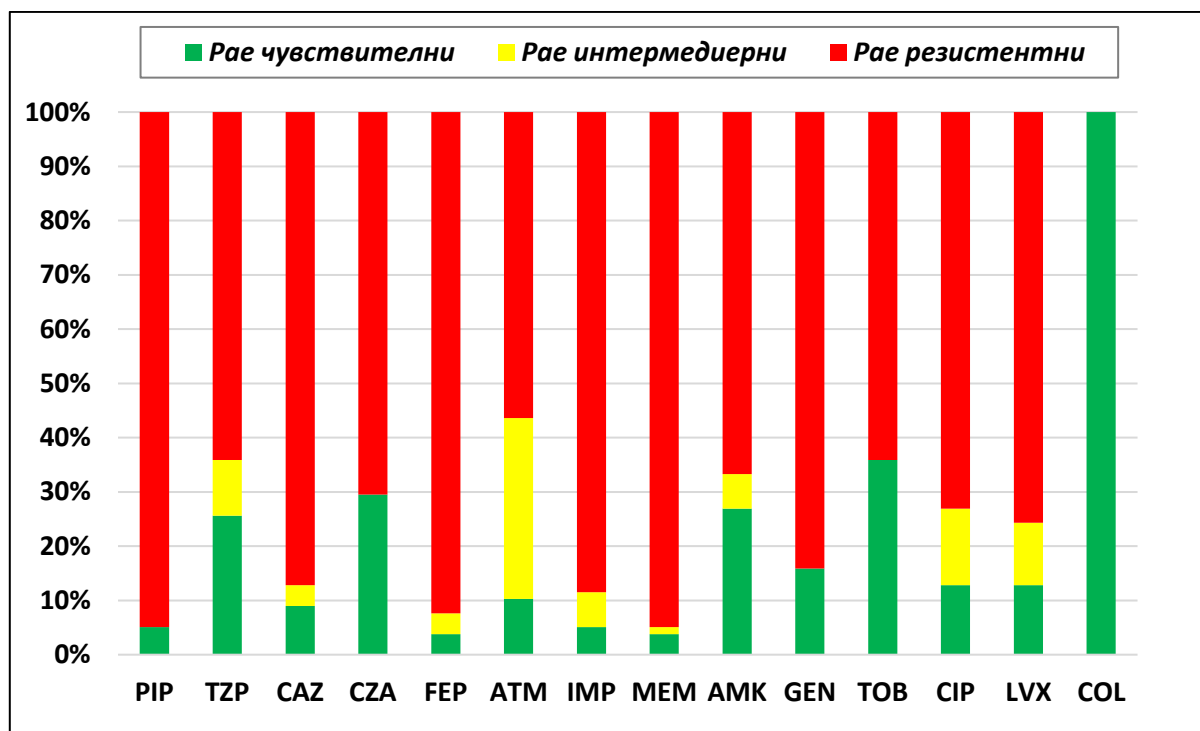
Фигура 3. Сравнителна антимикробна резистентност, изразена в %, на проучените терапевтично проблемни щамове *P. aeruginosa*, изолирани през 2004–2009 и 2015–2023 г.

PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; MEM, meropenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin.

Беше отчетено хронологично нарастване на резистентността към β -лактами, с изключение на ATM, което беше статистически значимо при 4-генерационния цефалоспорин FEP (76.1% резистентни (R) изолати *P. aeruginosa* от 2004–2009 г. спрямо 92.3% в групата от 2015–2023 г.; $p < 0.001$) и карбапенемите IMP (56.3% срещу 88.5%; $p < 0.001$) и MEM (60.2% срещу

94.9%; $p < 0.001$). При монобактама АТМ беше установен спад в резистентността (73.9% спрямо 56.4%; $p < 0.01$). Подобна тенденция беше констатирана и при ТОВ (85.2% R изолати от по-ранния период срещу 64.1% R изолати в групата 2015–2023 г.; $p < 0.001$).

Проучванията през втория хронологичен период (2015–2023 г.) бяха насочени изцяло към MDR-PA и XDR-PA изолати, демонстрирали намалена чувствителност към карбапенеми при първичното тестване в колабориращите лаборатории, които впоследствие бяха подложени на молекулярно-генетични и геномни изследвания за определяне на механизмите на резистентност. На **Фигура 4.** е илюстрирана тяхната обща антимикробна чувствителност с процентно разпределение в категориите „чувствителни изолати“, „изолати с намалена чувствителност или интермедиерни“ и „резистентни изолати“. Най-ниски нива на резистентност бяха отчетени към COL (пълна липса на R изолати), АТМ (56.4% R изолати), TZP = ТОВ (64.1% R) и АМК (66.7%). Резистентността към останалите антибиотици варираше в диапазона от 70.5% (CZA) до 94.9% (MEM и PIP).

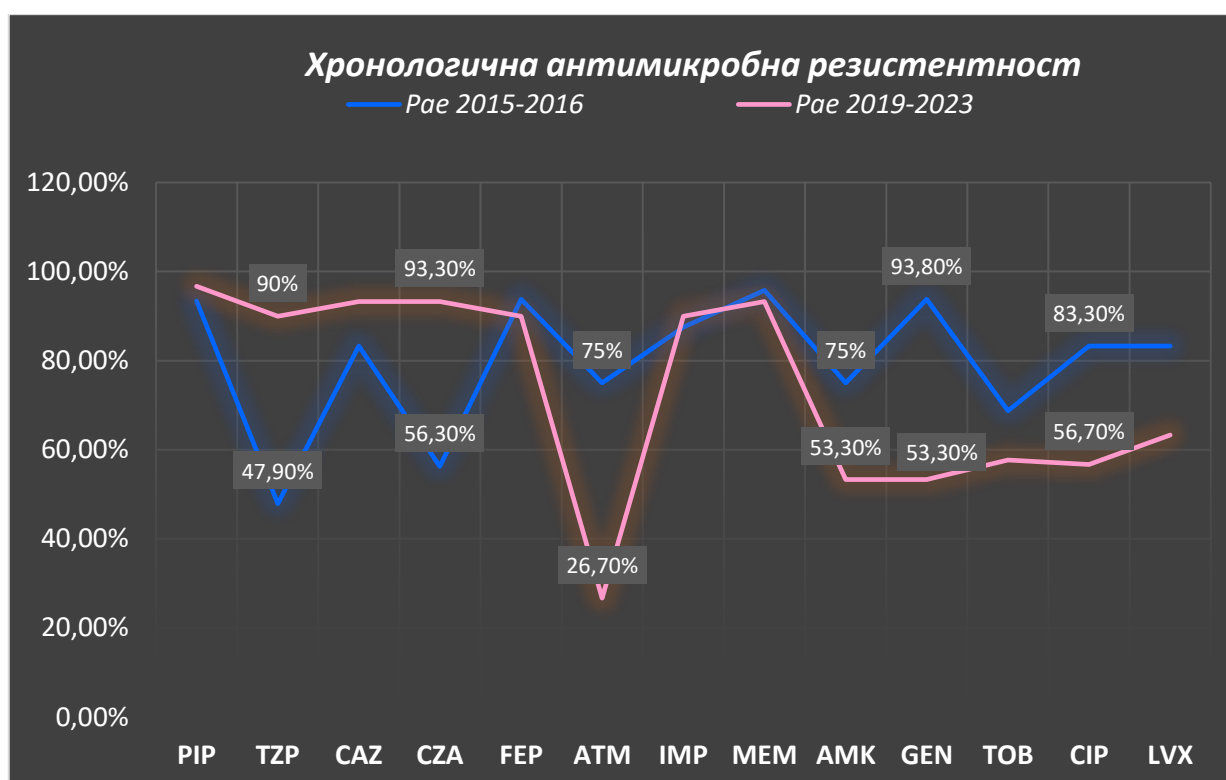


Фигура 4. Обща антимикробна чувствителност на изследваните 78 изолата *P. aeruginosa*, събрани в периода 2015–2023 г.

PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; CZA, ceftazidime-avibactam; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; MEM, meropenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; LVX; levofloxacin; COL, colistin.

В съответствие с критериите на Magiorakos et al. (Magiorakos et al. 2012), 15.4% от изолатите (12 / 78) бяха определени като MDR-PA, а останалите 84.6% (66 / 78) – съответно като XDR-PA. Освен това, 47 от изследваните общо 78 изолата *P. aeruginosa* (60.3%) бяха отнесени към категорията “DTR-PA” поради проявената им резистентност към всички антипсевдомонадни β-лактами и флуорохинолони от първа линия (Kadri et al. 2018).

За извършване на сравнителен анализ допълнително карбапенем-нечувствителните изолати *P. aeruginosa* бяха разделени в две групи: получени през 2015–2016 г. ($n = 48$) и в периода 2019–2023 г. ($n = 30$) (Фигура 5).



Фигура 5. Хронологична антимикробна резистентност, изразена в %, на проучените карбапенем-нечувствителни изолати *P. aeruginosa* в периода 2015–2023 г.

PIP, piperacillin; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; CZA, ceftazidime-avibactam; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; MEM, meropenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; LVX; levofloxacin.

Беше установено значимо хронологично увеличаване на резистентността към комбинираните препарати β-лактам с β-лактамазен инхибитор, TZP и CZA ($p < 0.001$), както и по-ниски нива на резистентност на по-новите изолати към ATM ($p < 0.001$), AMK ($p < 0.05$), GEN ($p < 0.001$) и CIP ($p < 0.05$). Също така

беше отчетен ръст в процентния дял на DTR-PA изолати през последните години на мониторирания период (50% през 2015–2016 г. срещу 76.7% през 2019–2023 г.; $p < 0.05$).

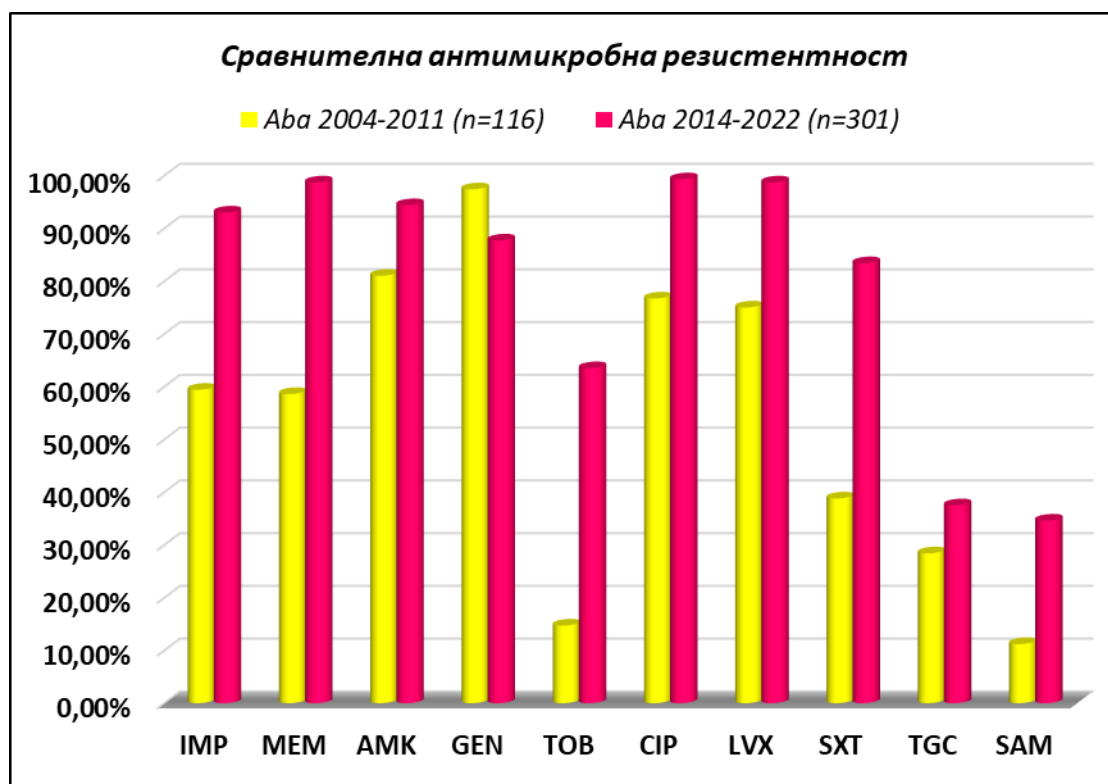
Статистически значимите разлики в нивата на антибиотична резистентност на терапевтично проблемните изолати *P. aeruginosa* от двата главни периода (2004–2009 и 2015–2023 г.) могат да бъдат свързани със следните фактори: критерии за селекция на щамовете; промени в механизмите на резистентност (напр. към карбапенеми) и разлики в националната антибиотична консумация на отделните групи АМЛС през годините. Задължителното условие за намалена чувствителност към карбапенеми на включените в проучването MDR-PA изолати след 2014 г. несъмнено допринася за установеното значимо нарастване на резистентността към IMP и MEM спрямо констатираната през 2004–2009 г. ($p < 0.001$). От друга страна, данните на ECDC (<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/>) за общата консумация на карбапенеми в България (извънболничен и болничен сектор), изразена като брой дефинирани дневни дози (DDD) на население от 1000 жители на ден, представят по-високи стойности в по-новия период (средна DDD=0.0582, изчислена на база на DDD за 2015, 2016 и 2019–2022 г.), сравнени с ранните години на проведения от нас надзор на антибиотичната резистентност (средна DDD=0.0078 за шестте последователни години от 2004 до 2009). Увеличаване бележи и консумацията на цефалоспорини от 4-та генерация (средна DDD за двата периода: 0.0091 спрямо 0.0172), което може да се свърже с по-високата устойчивост ($p < 0.001$) на по-новите терапевтично проблемни изолати *P. aeruginosa* към FEP (92.3%), съпоставена с резистентността към антибиотика сред изолатите от 2004–2009 г. (76.1%).

Резистентността към основните антипсевдомонадни антибиотици в настоящото проучване за периода 2015–2023 г. беше значимо по-висока ($p < 0.001$) от обобщената средна резистентност на изолатите *P. aeruginosa* в България през 2015–2021 г., базирана на данните на Националната програма BulSTAR (Bulgarian Tracking Antimicrobial Resistance): 64.1% срещу 22.1% към TZP; 87.2% / 23.7% към CAZ; 92.3% / 26.2% към FEP; 88.5% / 18.2% към IMP; 94.9% / 16.5% към MEM; 66.7% / 15.3% към АМК и 73.1% / 22.7% към СІР (Българска Асоциация на Микробиолозите: <https://bam-bg.net>). Честотата на разпространение на colistin-резистентни изолати *P. aeruginosa* в национален мащаб за съответния период е 3.3%. Ново кохортно проучване на НРЛ „Контрол и мониторинг на антибиотичната резистентност“ към НЦЗПБ съобщава 13% резистентност към COL сред извадка от 100 MDR български клинични изолата *Pseudomonas* spp. с различен географски произход от периода 2010–2023 г.

(Стойков 2023). Както е показано на **Фигура 4.**, такива щамове не бяха идентифицирани в настоящата работа.

1.2. Антибиотична резистентност на проучените изолати *A. baumannii*

Проучванията бяха проведени върху голям брой ($n = 417$) нозокомиални изолати *A. baumannii*, които отговаряха на поставените критерии за MDR (всички изолати) и нечувствителност към карбапенеми (получените след 2013 г.). На **Фигура 6.** е представена сравнителната антимикуробна резистентност на изолатите, разделени в две групи – *стари* (2004–2011 г.) и *нови* (2014–2022 г.). Беше отчетено хронологично нарастване на резистентността към всички тествани антибиотици, с изключение на GEN. Наблюдаваният ръст беше статистически значим ($p < 0.0001$), с изключение на отчетения при TGC, като той беше най-висок при IMP (59.4% R изолати през 2004–2011 г. срещу 93% през 2014–2022 г.), MEM (58.6% / 98.7%) и TOB (14.7% / 63.5%).



Фигура 6. Сравнителна антимикуробна резистентност, изразена в %, на проучените терапевтично проблемни щамове *A. baumannii*, изолирани през 2004–2011 и 2014–2022 г.

IMP, imipenem; MEM, meropenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; LVX; levofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TGC, tigecycline; SAM, ampicillin-sulbactam.

Проучванията през втория хронологичен период (2014–2022 г.) бяха насочени изцяло към MDR-AB и XDR-AB изолати, демонстрирали редуцирана чувствителност към карбапенеми при първичното тестване в колабориращите лаборатории, които впоследствие бяха подложени на молекулярно-генетични и геномни изследвания за определяне на механизмите на резистентност. В **Таблица 7.** са представени *in vitro* активност на тестваните АМЛС, оценена чрез стойностите на МПК, както и процентното разпределение в категории „чувствителни“, „междинно чувствителни или интермедиерни“ и „резистентни“ изолати. Най-висока активност показаха: COL (пълна липса на R изолати), SAM (34.6% R) и TGC (37.5% R). Общо 71.1% от изолатите (214 от 301) бяха определени като MDR-AB, а останалите 28.9% (87 / 301) – съответно като XDR-AB.

Таблица 7. Антимикробна чувствителност на проучените изолати *A. baumannii* от периода 2014–2022 г. (*n* = 301).

Антимикробни лекарствени средства	МПК диапазон (mg/L)	МПК ₅₀ ^a (mg/L)	МПК ₉₀ ^a (mg/L)	Брой (%) изолати		
				S	I	R
Imipenem	8 – >32	>32	>32	0 (0)	21 (7)	280 (93)
Meropenem	4 – >32	>32	>32	0 (0)	4 (1.3)	297 (98.7)
Doripenem	>32	>32	>32	0 (0)	0 (0)	301 (100)
Amikacin	1.5 – >256	>256	>256	11 (3.6)	6 (2)	284 (94.4)
Gentamicin	0.75 – >256	96	>256	31 (10.3)	6 (2)	264 (87.7)
Tobramycin	0.38 – >256	128	>256	99 (32.9)	11 (3.6)	191 (63.5)
Ciprofloxacin	1 – >32	24	>32	2 (0.7)	0 (0)	299 (99.3)
Levofloxacin	1 – >32	12	>32	4 (1.3)	0 (0)	297 (98.7)
SXT (1:19)	0.38 – >32	>32	>32	48 (15.9)	2 (0.7)	251 (83.4)
Tigecycline ^b	0.125 – >256	1.5	16	106 (35.2)	82 (27.2)	113 (37.5)
Colistin	0.50 – 2	1	1	301 (100)	0 (0)	0 (0)
Ampicillin-sulbactam (1:1) ^c	N/A	N/A	N/A	138 (45.8)	59 (19.6)	104 (34.6)

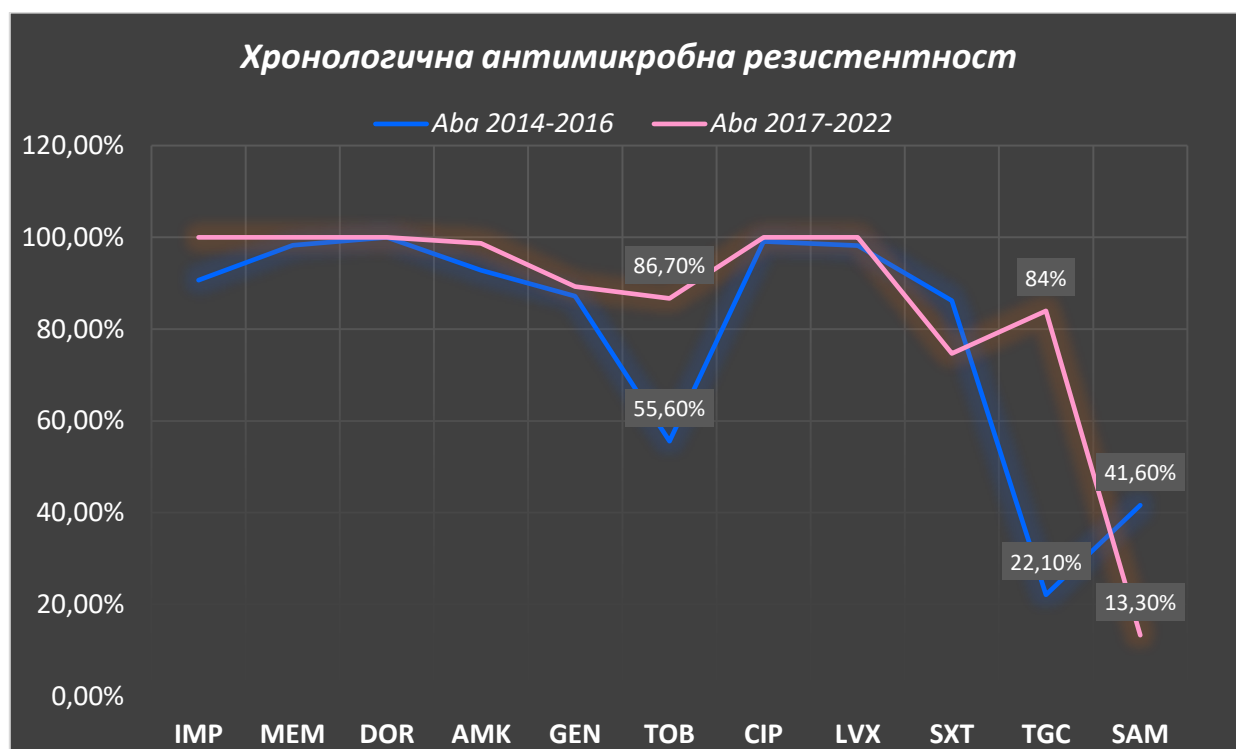
SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; S, чувствителни; I, чувствителни при повишена експозиция (интермедиерни); R, резистентни; МПК, минимална потискаща концентрация; N/A, неприложимо.

^a МПК₅₀ и МПК₉₀ – МПК, при които съответно 50% и 90% от изолатите се потискат.

^b Интерпретацията е извършена според критериите за *Enterobacterales*.

^c Тестването е извършено чрез дисково-дифузионен метод и е интерпретирано по критериите на CLSI.

За извършване на сравнителен анализ на антимикробната лекарствена резистентност карбапенем-нечувствителните изолати *A. baumannii* от последната декада също бяха разделени в две групи: получени през 2014–2016 г. ($n = 226$) и в периода 2017–2022 г. ($n = 75$), като стойностите са показани на **Фигура 7**. Беше установено значимо хронологично увеличаване на резистентността ($p < 0.001$) към TOB (55.6% през 2014–2016 срещу 86.7% през 2017–2022) и TGC (22.1% спрямо 84%), както и по-ниско ниво на резистентност на по-новите изолати към SAM (41.6% / 13.3%; $p < 0.001$). Също така беше отчетен значим ръст ($p < 0.001$) в процентния дял на XDR-AB изолати през последните години на мониторирания период (от 12.4% през 2014–2016 г. до 78.7% през 2017–2022 г.).

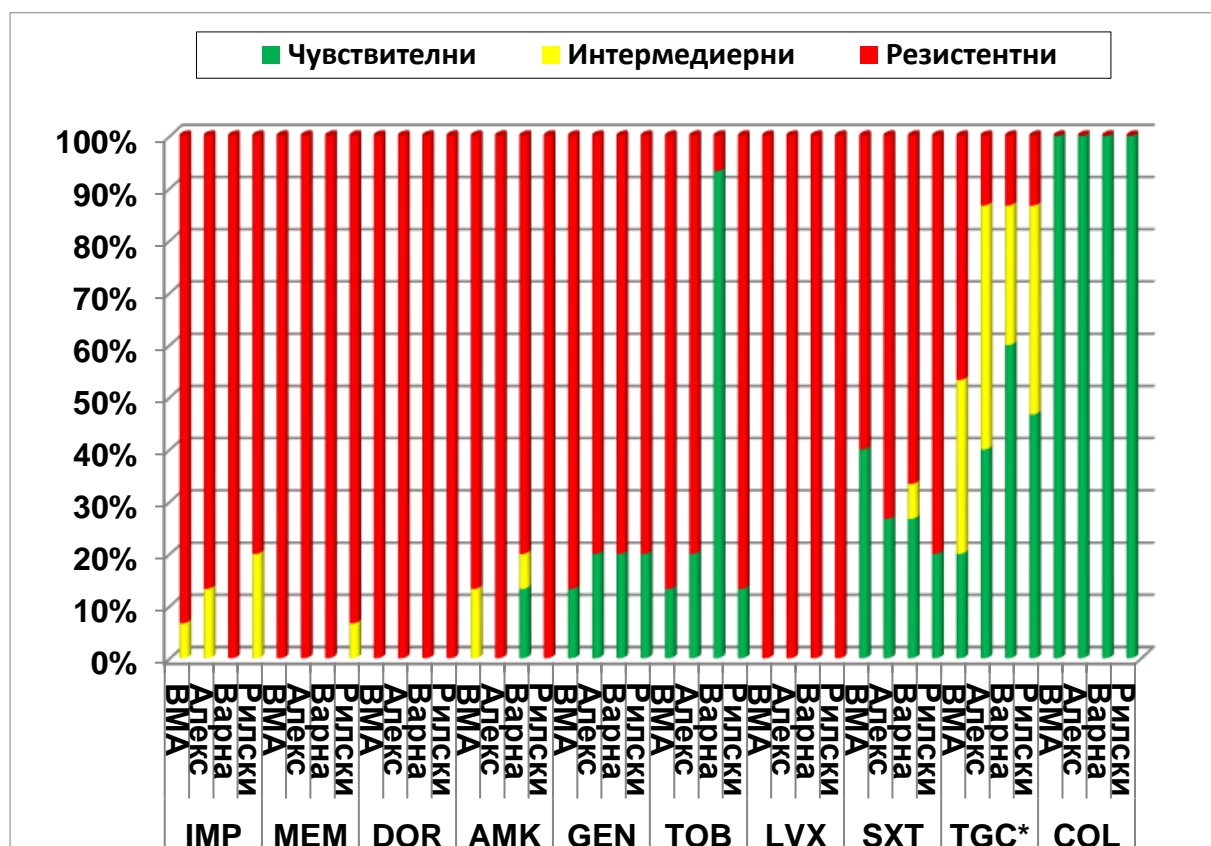


Фигура 7. Хронологична антимикробна резистентност, изразена в %, на проучените карбапенем-нечувствителни изолати *A. baumannii* в периода 2014–2022 г.

IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; LVX; levofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TGC, tigecycline; SAM, ampicillin-sulbactam.

По-големият брой на изследваните терапевтично проблемни изолати от периода 2014–2016 г. ($n = 226$) позволи извършването на сравнителен анализ на антибиотичната резистентност на карбапенем-нечувствителните *A. baumannii*, изолирани в четири университетски болници в България: Военномедицинска

академия (ВМА) – София, УМБАЛ „Александровска“ – София, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна и УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София (**Фигура 8**). Изолатите от Университетската болница във Варна показаха значимо по-висока чувствителност ($p < 0.001$) към ТОВ (93.3%) от нозокомиалните изолати *A. baumannii* от трите болници в София (13.3%–20%). Също така изолатите от Варна демонстрираха значимо по-висока чувствителност към ТГС в сравнение с тези от ВМА (60% спрямо 20%, $p < 0.001$).



Фигура 8. Сравнителна антимикробна чувствителност (в %) на нозокомиалните полирезистентни, карбапенем-нечувствителни *A. baumannii* в четири университетски болници в България (2014-2016 г.).

IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; AMK, amikacin; TOB, tobramycin; LVX; levofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TGC*, tigecycline (интерпретация според критериите на EUCAST за *Enterobacteriales*); COL, colistin.

В настоящото проучване бяха изследвани терапевтично проблемни нозокомиални щамове *A. baumannii* (415 клинични и 2 от болнична среда), които независимо от годината на изолиране се характеризираха с фенотип “MDR” или “XDR”. Бяха установени хронологични тенденции за значимо

нарастване на резистентността към ключови антибиотици, използвани в лечението на *A. baumannii*-асоциирани инфекции (карбапенеми, аминогликозиди, флуорохинолони и SXT), което отразява докладваното от ESAC-Net тревожно покачване на общото потребление на антибактериални препарати за системна употреба в България и негативния тренд в използването на карбапенеми в болничния сектор (19.6% годишен растеж за периода 2013–2022) (European Centre for Disease Prevention and Control 2023b). Установената от нас резистентност към карбапенеми сред MDR/XDR-AB от по-ранния период беше около 60%, докато 93% от нозокомиалните MDR/XDR-AB изолати през 2014–2022 г. бяха устойчиви едновременно на трите антибиотика от групата (IMP, MEM и DOR). Тези нива корелират с данните на ECDC (<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/>) за общата консумация на карбапенеми в страната, изразена като брой DDD на 1000 жители на ден, които представят по-високи стойности в по-новия период (средна DDD=0.0470 за деветте последователни години от 2014 до 2022) спрямо ранните години на проведения от нас надзор на антибиотичната резистентност (средна DDD=0.0081 за периода 2004–2011).

Счита се, че резистентността към карбапенеми сама по себе си е достатъчно основание *A. baumannii* да се разглежда като високо резистентен и терапевтично проблемен патоген (Eikelenboom-Boskamp et al. 2019). Според данни на Националната програма VulSTAR, през 2015–2016 г. резистентността към IMP и MEM на нозокомиалните изолати *A. baumannii* в България е била съответно 60% и 64.8% (Българска Асоциация на Микробиолозите: <https://bam-bg.net>), което е значително по-ниско ($p < 0.001$) от нивата на резистентност към карбапенеми (съотв. 90.7% и 98.3%) на избраните в настоящата работа нозокомиални изолати за периода 2014–2016 г. Данните на EARS-Net, касаещи 2014–2016 г., сочат много високо разпространение на инвазивни карбапенем-резистентни изолати *Acinetobacter* spp. в някои Балкански и Средиземноморски държави – напр. Гърция (93.2-95.4%), Хърватия (87.3-94.5%), Италия (78.3-89.9%), Румъния (81.3-85%) и Кипър (71.4-83.1%), което е в пряка корелация с антибиотичната консумация на карбапенеми в тези страни (<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/>). В България за тези три години е отчетен значим ръст на резистентността към карбапенеми (от 59.1% през 2014 г. до 74.8% през 2016 г.) (European Centre for Disease Prevention and Control 2017).

Общо за ЕС/ЕИП, 31.7% от инвазивните нозокомиални *Acinetobacter* spp. са демонстрирали комбинирана резистентност към флуорохинолони, аминогликозиди и карбапенеми, по данни на EARS-Net за 2016 г. (European

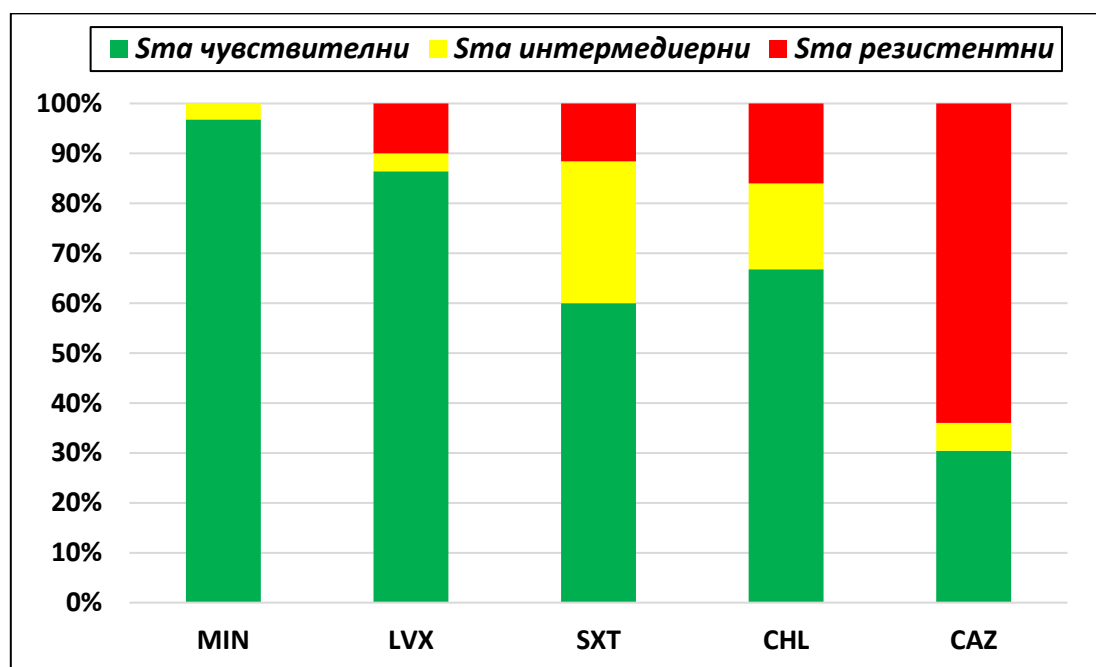
Centre for Disease Prevention and Control 2017). Традиционно най-висока честота на разпространение на *Acinetobacter* spp. с кръстосана резистентност към трите класа АМЛС са установени в Балканските страни – Гърция (84%), Румъния (82.9%) и Хърватия (81.1%). Честотата им в България е била значимо по-висока от средната за Европа (72.4% спрямо 31.7%, $p < 0.001$), съпроводена с проявена тенденция за значимо нарастване (от 47.1% през 2014 г. до 72.4% през 2016 г.).

В периода 2018–2021 г. в България е регистрирана по-висока резистентност на нозокомиалните *A. baumannii* към карбапенеми спрямо предходните години (68.9% и 73.8%, съответно към IMP и MEM) (Българска Асоциация на Микробиолозите: <https://bam-bg.net>). Контрастно на тези находки, в Германия (Западна Европа) е отчетено хронологично понижаване на резистентността към карбапенеми на клиничните изолати *A. baumannii*, на база на резултатите от няколко мултицентрови надзорни проучвания в периода 2010–2019 г. Относителният дял на CRAB изолати през 2010 г. е бил 21.3%, през 2013 г. нараства до 33.3%, след което се установява спад – 13.8% и 12.3%, съответно през 2016 г. и 2019 г. (Wohlfarth et al. 2022).

Както и през по-ранния период (2014–2016), през 2020 г. европейската надзорна мрежа EARS-Net докладва много високо разпространение на инвазивни карбапенем-резистентни *Acinetobacter* spp. (над 80%) във всички балкански държави, при средна честота от 37.8% общо за Европа. Във възходящ ред отчетените нива на резистентност са следните: България (82.9%), Косово (84.7%), Турция (93.1%), Румъния (93.3%), Гърция (94.6%), Хърватия (96.4%), Северна Македония (97.4%), Босна и Херцеговина (97.9%), Сърбия (98.6%) и Черна гора (100%) (European Centre for Disease Prevention and Control 2022). Данните недвусмислено представят целия Балкански регион като „гореща точка“ на картата за наблюдение. От друга страна разпространението на *Acinetobacter* spp. с комбинирана резистентност към карбапенеми, флуорохинолони и аминогликозиди на Балканите е над 70 %, като най-високите стойности са отчетени в Сърбия (95.9 %) и Хърватия (95.1 %), а най-ниските – в Косово (71.2 %). Разпространението на инвазивни MDR изолати *Acinetobacter* spp. в България е значително по-високо от средното за ЕС/ЕИП (72.9% спрямо 34.1%; $p < 0.001$) (European Centre for Disease Prevention and Control 2022).

1.3. Антибиотична резистентност на проучените изолати *S. maltophilia*

Антимикробната чувствителност на изолатите *S. maltophilia* беше тествана спрямо SXT и няколко други антибиотика (MIN, LVX, CAZ, CHL и TCC), които се включват в терапевтичните режими и за които са налични критерии за категоризиране на щамовете в документите на CLSI. Интерпретацията за SXT от началото на 2020 г. беше съобразена с нововъведените критерии на EUCAST, според които като чувствителни могат да бъдат определени само изолати с МПК ≤ 0.001 mg/L и диаметър на зоната на инхибиране при ДДМ ≥ 50 mm. Това обяснява наличието на изолати с междинна чувствителност (28.4%) в представените резултати за обща антибиотична чувствителност за целия период на наблюдение (2011–2023 г.), представени на **Фигура 9.**, както и ниския процентен дял на чувствителни изолати сред изследваните *S. maltophilia* от 2018–2023 г. Критериите за категория „SXT-резистентни“ не бяха хронологично променяни (МПК > 4 mg/L и диаметър на зоната на инхибиране < 16 mm). Общо за 12-годишния период, най-висока активност демонстрира MIN (0% R изолати), следван от LVX (10% R). Установените нива на резистентност към SXT и CHL бяха близки – съответно 12% и 16%. Устойчивостта към CAZ (64%) беше значимо по-висока, в сравнение с всички останали антибиотици ($p < 0.0001$).



Фигура 9. Обща антимикробна чувствителност на изследваните 250 изолата *S. maltophilia*, събрани в периода 2011–2023 г.

MIN, minocycline; LVX, levofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; CHL, chloramphenicol; CAZ, ceftazidime.

Определената чрез градиентен МПК-тест антимикуробна чувствителност на изолатите, разделени в две хронологични групи (2011–2016 и 2018–2023), е представена в Таблицы 8. и 9.

Таблица 8. Антимикуробна чувствителност на проучените изолати *S. maltophilia* от периода 2011–2016 г. ($n = 168$).

Антимикуробни лекарствени средства	МПК диапазон (mg/L)	МПК ₅₀ ^a (mg/L)	МПК ₉₀ ^a (mg/L)	Брой (%) изолати		
				S	I	R
Minocycline	0.032 – 8	0.19	0.75	164 (97.6)	4 (2.4)	0 (0)
Levofloxacin	0.19 – >32	2	2	148 (88.1)	6 (3.6)	14 (8.3)
Trimethorim- sulfamethoxazole (1:19) ^b	0.032 – >32	0.75	0.75	145 (86.3)	0 (0)	23 (13.7)
Chloramphenicol	3 – >256	8	48	104 (61.9)	38 (22.6)	26 (15.5)
Ceftazidime	0.125 – >256	4	32	65 (38.7)	10 (6)	93 (55.3)
Ticarcillin-clavulanic acid	1 – >256	8	128	102 (60.7)	35 (20.8)	31 (18.5)

S, чувствителни; I, чувствителни при повишена експозиция (интермедиерни); R, резистентни; МПК, минимална потискаща концентрация.

^a МПК₅₀ и МПК₉₀ – МПК, при които се потискат съответно 50% и 90% от изолатите.

^b EUCAST критерии за интерпретация: S ≤ 4 mg/L, R > 4 mg/L.

Таблица 9. Антимикуробна чувствителност на проучените изолати *S. maltophilia* от периода 2018–2023 г. ($n = 82$).

Антимикуробни лекарствени средства	МПК диапазон (mg/L)	МПК ₅₀ ^a (mg/L)	МПК ₉₀ ^a (mg/L)	Брой (%) изолати		
				S	I	R
Minocycline	0.125 – 8	0.75	2	78 (95.1)	4 (4.9)	0 (0)
Levofloxacin	0.25 – >32	2	>32	68 (82.9)	3 (3.7)	11 (13.4)
Trimethorim- sulfamethoxazole (1:19) ^b	0.032 – >32	0.50	0.75	5 (6.1)	71 (86.6)	6 (7.3)
Chloramphenicol	1.5 – >256	6	64	63 (76.8)	5 (6.1)	14 (17.1)
Ceftazidime	1 – >256	128	>256	11 (13.4)	4 (4.9)	67 (81.7)

S, чувствителни; I, чувствителни при повишена експозиция (интермедиерни); R, резистентни; МПК, минимална потискаща концентрация.

^a МПК₅₀ и МПК₉₀ – МПК, при които съответно 50% и 90% от изолатите се потискат.

^b EUCAST критерии за интерпретация: S ≤ 4 mg/L, R > 4 mg/L (2018–2019 г.); S ≤ 0.001 mg/L, R > 4 mg/L (2020–2023 г.).

MIN демонстрира най-висока активност и в двата периода на настоящото проучване, но се забелязва леко нарастване на процентния дял с интермедиерна чувствителност (от 2.4% на 4.9%), както и на отчетените МПК₅₀ и МПК₉₀ спрямо по-късните нозокомиални изолати *S. maltophilia*.

По отношение на най-използваните АМЛС в терапията на *S. maltophilia* инфекции, SXT и LVX, бяха установени реципрочни находки – понижаване на резистентността към SXT във втория период (от 13.7% до 7.3%) и увеличаване към LVX (8.3% срещу 13.4%), които не са статистически значими. Тези резултати могат да бъдат асоциирани с произхода на изолатите в последните години на нашето проучване. Общо 61% от тях (50 от 82) бяха изолирани от ICU пациенти с тежък COVID-19, от края на 2021 до февруари 2022 г., при които лечението е провеждано основно с LVX. По данни на европейската надзорна мрежа ESAC-Net, употребата на флуорохинолони в страната, в частност LVX, бележи сериозен ръст по време на пандемията (средната обща консумация в доболнична помощ и болничен сектор през 2019 г. е била оценена на DDD=2.933 на население от 1000 души на ден, докато през 2021 г. се покачва до DDD=4.262) (European Centre for Disease Prevention and Control 2023b), което води до висок селективен натиск и създава предпоставки за възникване на резистентни мутантни щамове. За разлика от *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, при които бяха установени значими хронологични тенденции за нарастване на резистентността към ключови антибиотици в хода на 20-годишното проучване, профилът на антимикробна чувствителност на изследваните нозокомиални *S. maltophilia* се запази относително стабилен, с изключение на по-високата резистентност към CAZ в периода 2018–2023 (81.7% R изолати vs. 55.3% през 2011–2016 г.; $p < 0.0001$).

Основният подход в лечението на инфекции, причинени от *S. maltophilia*, включва приложение на SXT, който остава лекарството на първи избор и понастоящем (Gibb and Wong 2021). Макар че чувствителността към препарата като цяло остава висока, резистентността в световен мащаб бележи ръст и проявява значителна регионална вариабилност (Brooke 2014, 2021). В България все още липсва национално надзорно проследяване на чувствителността на клиничните изолати *S. maltophilia* към SXT. През 2007–2015 г. процентният дял на SXT-резистентни щамове в три мониториращи болници във Варна и Плевен е бил 4.1% (Божкова 2016). Той е по-нисък спрямо отчетения в дисертационния труд, обхващащ нозокомиални изолати *S. maltophilia* от София и Варна, получени в периода от 2011 до 2023 г. (11.6%). Надзорната програма SENTRY също докладва по-ниска резистентност към SXT (5.4%, $p < 0.001$) сред клиничните изолати *S. maltophilia* от 87 медицински центрове в САЩ през

2014–2018 г. (Flamm et al. 2019). Нивото на SXT резистентност в нашето проучване е много близко до установеното в 10-годишно кохортно проучване (2008–2017), в което е анализирана антимикробната чувствителност на нозокомиални респираторни изолати *S. maltophilia* от голяма болница в унгарския град Сегед (11.6% vs. 12.1%) (Gajdács and Urbán 2019). Подобна честота на разпространение на SXT-резистентни изолати (12.7%) е докладвана и в Корея (2009–2010 г.), като 71.9% от тях са демонстрирали high-level резистентност към антибиотика с МПК стойности 64–128 mg/L (Chung et al. 2015). Високо разпространение на устойчиви към SXT клинични изолати *S. maltophilia* са отчетени в срезови проучвания в Индия (26%) (Gupta et al. 2018), Мексико (32.8%) (Flores-Treviño et al. 2014) и Китай (38.7%) (Hu et al. 2016), значимо надвишаващи установения от нас процентен дял (11.6%, $p < 0.01–0.001$).

1.4. Антимикробна активност на нови антибиотици срещу избрани НФГБ изолати

Откритите високи нива на резистентност на изолатите *P. aeruginosa* и *A. baumannii* към всички АМЛС, използвани в терапията на инфекциите с проблемни НФГБ, беше предпоставка за изпитване на антимикробната активност на няколко одобрени нови антибиотици: ceftazidime-avibactam (CZA), imipenem-relebactam (IMR), meropenem-vaborbactam (MEV), cefiderocol (CFDC) и plazomicin (PLZ). За целта беше използван градиентен МПК-базиран тест, а при CFDC беше приложен МДТ. Антимикробната чувствителност на избрани 135 изолата е представена в **Таблица 10**. Бяха включени карбапенем-нечувствителни *P. aeruginosa* и CRAB от последната декада, както и нозокомиални изолати *S. maltophilia* с различна чувствителност към SXT от периода 2019–2023 г., като при последните поради вродена резистентност към аминогликозиди и карбапенеми беше тестван само CFDC.

CFDC се отличи с най-висока *in vitro* активност срещу трите НФГБ патогена, както следва: *S. maltophilia*, 100%, *P. aeruginosa*, 97.5% и *A. baumannii*, 83.6%. Резистентните на CFDC CRAB изолати ($n = 9$) показаха широк МПК диапазон – от 4 mg/L до 128 mg/L. Към комбинираният нови препарати, съдържащи β -лактам (BL) и β -лактамазен инхибитор (BLI), чувствителност демонстрираха само 22.5–25% от изолатите *P. aeruginosa*. Поради липсващи критерии за категоризиране на щамове *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. в документите на EUCAST, CLSI и USCAST, резултатите от тестването на аминогликозида PLZ са представени само като МПК диапазон,

МПК₅₀ и МПК₉₀. Бяха отчетени еднакви МПК₅₀ за двата вида (8 mg/L) и висока МПК₉₀ срещу CRAB изолатите (>256 mg/L).

Таблица 10. Антимикробна чувствителност на проблемни НФГБ изолати ($n = 135$) към нови, одобрени за клинично приложение антибиотици.

Антибиотици	МПК диапазон (mg/L)	МПК ₅₀ (mg/L) ^a	МПК ₉₀ (mg/L) ^a	Брой (%) изолати	
				S	R
Карбапенем-нечувствителни <i>P. aeruginosa</i> ($n = 40$)					
Ceftazidime-avibactam ^b	1 – >256	8	>256	9 (22.5)	31 (77.5)
Imipenem-relebactam ^b	0.125 – >32	16	>32	9 (22.5)	31 (77.5)
Meropenem-vaborbactam ^c	0.064 – >256	12	>32	10 (25)	30 (75)
Cefiderocol	0.008 – 4	0.25	1	39 (97.5)	1 (2.5)
Plazomicin	1.5 – >256	8	16	N/A	N/A
Карбапенем-резистентни <i>A. baumannii</i> ($n = 55$)					
Ceftazidime-avibactam ^b	32 – >256	64	>256	0 (0)	55 (100)
Imipenem-relebactam ^b	8 – >32	>32	>32	0 (0)	55 (100)
Meropenem-vaborbactam ^c	8 – >256	32	>32	1 (1.8)	54 (98.2)
Cefiderocol	0.064 – 128	0.25	8	46 (83.6)	9 (16.4)
Plazomicin	2 – >256	8	>256	N/A	N/A
<i>S. maltophilia</i> ($n = 40$)^d					
Cefiderocol	0.016 – 0.50	0.032	0.25	40 (100)	0 (0)

S, чувствителни; R, резистентни изолати; МПК, минимална потискаща концентрация.

^a МПК₅₀ и МПК₉₀ – МПК, при които съответно 50% и 90% от изолатите се потискат.

^b Концентрацията на avibactam и relebactam е фиксирана на 4 mg/L.

^c Концентрацията на vaborbactam е фиксирана на 8 mg/L.

^d От тестваните 40 изолата *S. maltophilia*, 5 са резистентни на trimethoprim-sulfamethoxazole.

Сравнителната антимикробна чувствителност на тестваните изолати *P. aeruginosa*, разделени на две групи според продукцията на MBLs (разгледана в т. 2.1.), е изложена в **Таблица 11**. Продуцентите на MBLs демонстрираха абсолютна резистентност към всички комбинирани BL/BLI препарати. От друга страна, непродуциращите MBLs изолати показаха значимо по-висока чувствителност ($p < 0.05$), варираща от 31% (при CZA и IMR) до 34.5% (MEV). Единственият CFDC-резистентен щам *P. aeruginosa* (МПК=4 mg/L) беше идентифициран сред карбапенем-нечувствителните изолати без MBLs. Въпреки статистическата обработка с точния тест на Fisher, следва да се има предвид малкият брой на изолатите, особено в MBL-групата.

Таблица 11. Сравнителна антимикробна чувствителност на MBL-продуциращи и MBL-непродуциращи изолати *P. aeruginosa* към нови β -лактамни антибиотици.

Антибиотици	MBL продуценти (<i>n</i> = 11)		non-MBL продуценти (<i>n</i> = 29)		P стойност
	Брой (%) изолати		Брой (%) изолати		
	S	R	S	R	
Ceftazidime-avibactam	0 (0)	11 (100)	9 (31)	20 (69)	0.043
Imipenem-relebactam	0 (0)	11 (100)	9 (31)	20 (69)	0.043
Meropenem-vaborbactam	0 (0)	11 (100)	10 (34.5)	19 (65.5)	0.0381
Cefiderocol	11 (100)	0 (0)	28 (96.6)	1 (3.4)	1.0000

MBL, метало- β -лактамаза; S, чувствителни; R, резистентни изолати.

В настоящото проучване CFDC демонстрира най-висока *in vitro* активност от новите антибиотици срещу трите НФГБ патогена, варираща от 83.6% до 100%, съответно спрямо CRAB и *S. maltophilia*. Данните отразяват способността на сидерофорния антибиотик да противодейства на карбапенемази от А, В и D молекулярни класове и да проявява висока стабилност срещу AmpC цефалоспориноми, мутации в OMPs и ефлукс помпи, комплексно въввлечени в резистентността към карбапенеми на клиничните щамове *P. aeruginosa* и *A. baumannii* (Canton et al. 2022; Losito et al. 2022; Bassetti et al. 2022).

В проучване върху антимикробната чувствителност на терапевтично проблемни Грам-отрицателни изолати от 52 държави от 2014–2016 г., CFDC е показал мощна *in vitro* активност, с 99.2% чувствителност на MDR-PA и също така 99% и 98.8% чувствителност, съответно, в контекста на СТТ- и CZA-резистентните изолати *P. aeruginosa* (Hackel et al. 2018). Силно обнадеждаващи са и най-новите резултати на глобалната надзорна програма SENTRY, според които 99.6% от изследваните изолати *P. aeruginosa* от 2020 г. от САЩ и Европа са чувствителни на CFDC при интерпретация с критериите на CLSI. Отлична е активността на антибиотика и спрямо XDR-PA (97.3%), при които чувствителността към новите BL/BLI е по-ниска (IMR, 73%; CZA, 73.4% и СТТ, 72.3%) (Shortridge et al. 2022). Запазва се пълна чувствителност към CFDC при изолати, резистентни към IMR, и забележителна чувствителност при изолати, резистентни към CZA и СТТ (съответно 91.6% и 88.3%), както и при комбинирана резистентност към трите нови антимикробни препарата (100 %), което е видно и от нашите резултати.

Нарастващото разпространение на MBL-продуциращи *P. aeruginosa* в глобален мащаб се свързва и с повишени нива на резистентност към CFDC в

последните години. Някои автори считат, че експресията на NDM металоензими с голяма вероятност улеснява възникването на резистентност към CFDC чрез мутации в сидерофорните рецептори (Nurjadi et al. 2022; Karakonstantis et al. 2022).

В настоящата работа най-ниска чувствителност към CFDC от тестваните НФГБ показаха CRAB изолати (83.6% S и 16.4% R). Въпреки откриването на CFDC-резистентни *A. baumannii* в глобален мащаб (Iregui et al. 2020; Mushtaq et al. 2020), на новия сидерофорен цефалоспорин се отрежда важно място като алтернатива на токсичния COL в съвременните терапевтични алгоритми при инфекции, причинени от CRAB с XDR или PDR профил (Piperaki et al. 2019; Coppola et al. 2022; Shields et al. 2023b). Ако е наличен за клинична употреба, CFDR се счита за добра алтернатива на тройната комбинация *COL* + *висока доза MEM* + *висока доза SAM*, използвана в борбата с PDR-AB-асоциирани инфекции (Piperaki et al. 2019). Скорошни кохортни проучвания представят клиничната ефикасност на спасителната терапия с CFDC при тежки BSIs и VAP, причинени от CRAB, сред критично болни пациенти в Италия (Falcone et al. 2021, 2022). Заслужава да се отбележи, че 30-дневната смъртност е по-висока при пациентите, получавали COL, в сравнение с тези, подложени на режими, съдържащи CFDC (56% спрямо 34%, $p = 0.018$) (Falcone et al. 2022).

Струва си да се, че всички CFDC-резистентни CRAB изолати в настоящото проучване бяха PCR-положителни за *bla*_{PER-1} (т. 2.2.1.), което потвърждава установената и от други автори силна корелация между експресията на PER-тип ESBL и развитието на устойчивост към CFDC (Poirel et al. 2021; Uskudar-Guclu et al. 2024). Наскоро He et al. при WGS на избрани нозокомиални CRAB от Китай (2012–2018 г.) откриват *bla*_{PER-1} във всички CFDC-резистентни изолати (МПК стойности от 8 mg/L до ≥ 256 mg/L) (He et al. 2022).

Отличната *in vitro* активност (МПК_{50/90} съответно 0.032 mg/L и 0.25 mg/L) и абсолютната чувствителност към CFDC на изследваните в дисертационния труд нозокомиални изолати *S. maltophilia* напълно съответстват с резултатите от предходни глобални проучвания, в които са тествани клинични изолати (2014–2016 г.) от целия свят (Hackel et al. 2017, 2018; Nakamura et al. 2021). Сидерофорният цефалоспорин демонстрира мощна активност спрямо високорезистентни изолати *S. maltophilia*. Наскоро Biagi et al. тестват *in vitro* активността на CFDC самостоятелно и в комбинация с LVX, MIN, polymyxin B или SXT срещу избрани клинични изолати *S. maltophilia*, които са устойчиви на АМЛС от първа линия – SXT и/или LVX (Biagi et al. 2020b). Важна част от

тяхното проучване са извършените “time-kill” експерименти с участие на CFDC самостоятелно и в комбинация с компараторите. Единствените агенти, за които чувствителността на изолатите е надхвърлила 40%, са били CFDC (100%) и MIN (97.3%). При “time-kill” експериментите авторите отчитат синергизъм в най-висока степен при комбинация на CFDC с MIN и SXT (66.7% и в двата случая).

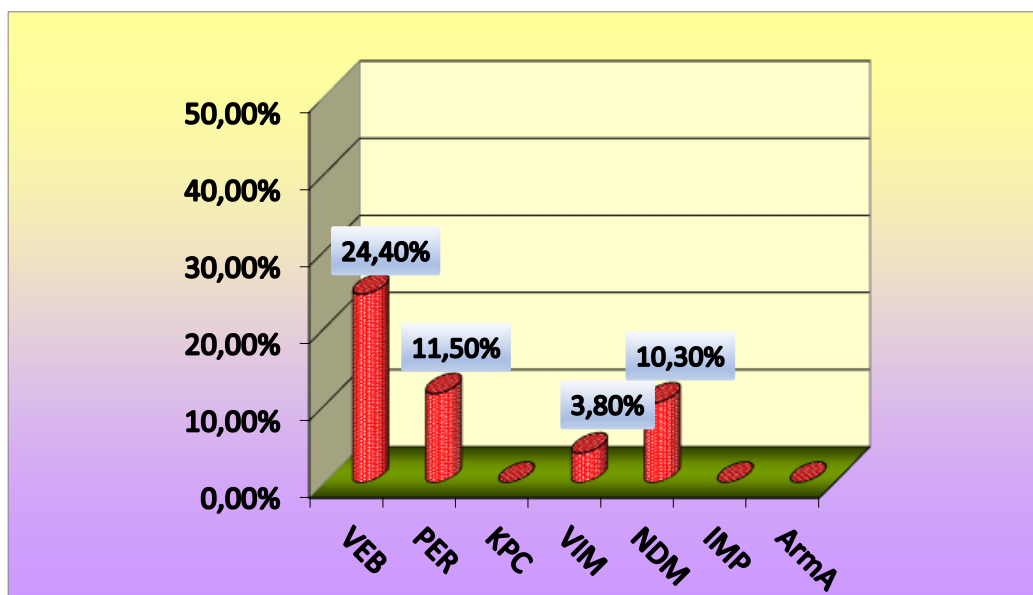
Наскоро Karakonstantis et al. правят систематичен преглед на литературата до май 2023 г. и мета-анализ, касаещи глобалното разпространение на CFDC-нечувствителни (CFDC-NS) Грам-отрицателни патогени (Karakonstantis et al. 2024). Базирано на резултатите от 78 проучвания, 87% от които публикувани между 2020 и 2023 г., авторите докладват най-висок относителен дял на CFDC-NS в групата на CRAB изолати (13.2%, 95% CI 7.8-21.5%) и относително нисък сред CRPA (3.5%, 95% CI 1.6-7.8%). Тези стойности са много близки до докладваните от нас, 16.4% и 2.5% съответно сред CRAB и CRPA. Мета-анализът на гръцките автори акцентира и върху изключителната *in vitro* активност на CFDC срещу клинични изолати *S. maltophilia* (0.4%, 95% CI 0.2-0.7%), което съвпада с нашите находки.

2. Водещи механизми на резистентност сред проучените НФГБ изолати

2.1. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху механизмите на резистентност на карбапенем-нечувствителни *P. aeruginosa*

2.1.1. Откриване чрез PCR на AMR детерминанти

Карбапенем-нечувствителните изолати *P. aeruginosa* от периода 2015–2023 г. ($n = 78$) бяха подложени на PCR скрининг за наличие на AMR гени, кодиращи някои от най-разпространените във вида ESBLs (bla_{VEB} и bla_{PER}), карбапенемази (bla_{KPC} , bla_{VIM} , bla_{NDM} и bla_{IMP}) и 16S рРНК метилази ($armA$). Честотата на разпространение на съответните генетични детерминанти е представена на **Фигура 10**. Най-широко разпространение (24.4%) сред проучените терапевтично проблемни изолати *P. aeruginosa* от четири университетски болници, показва генът $bla_{VEB-like}$. Общо 11 от изолатите бяха идентифицирани като продуценти на металоензими от клас В / подклас В1, от тях 8 на NDM-тип MBLs и 3 на VIM-тип MBLs. Не бяха открити гени за KPC-тип карбапенемази от клас А, IMP-тип MBLs от клас В и ArmA 16S рРНК метилаза.



Фигура 10. Честота на разпространение на гени, кодиращи β -лактамази от класове А и В, и ArmA 16S рРНК метилаза, в нозокомиални изолати *P. aeruginosa* ($n = 78$).

VEB- и PER-тип ESBLs, попадащи в клас А2 по Ambler (Philippon et al. 2016), са едни от най-разпространените придобити β -лактамази в *P. aeruginosa* поради локализацията на кодиращите гени в плазмиди и интегрони (Haghighi and Goli 2022). Мобилизацията и експресията на bla_{VEB-1} се увеличава под влияние на IS1999 елемент (Aubert et al. 2006) и се проявява по-лесно в условията на повишен селективен натиск от масовата употреба на цефалоспорини от трета генерация. VEB-1 е най-честата ESBL от група VEB-like (Strateva and Yordanov 2009). В България първите VEB-1-продуциращи *P. aeruginosa* са идентифицирани при проучване на CAZ-резистентни нозокомиални изолати от няколко университетски болници в периода 2001–2005 г. (Strateva et al. 2007a). Установената понастоящем честота на разпространение на VEB-like ESBLs е значимо по-ниска от докладваната от нас преди 20 години (24.4% vs. 56.7%, $p < 0.0001$). От друга страна, тогава не бяха открити PER ензими (Strateva et al. 2007a, b), а в настоящия труд бяха доказани $bla_{PER-like}$ гени в 9 от изследваните 78 изолата (11.5%), предимно от урина, като следва да се отбележи, че 8 от тях бяха изолирани от хоспитализирани пациенти в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна през 2015 г. и 1 в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София през 2022 г. PCR скрининг сред CRPA от УСБАЛ по онкология, изолирани в периода 2013–2023 г., установява 14.8% продуценти на PER-тип ESBLs (Sabtcheva et al. 2023). Това показва персистиращо разпространение на PER-положителни изолати *P. aeruginosa* в българските болници и до днес, въпреки че усилията на изследователските колективи са насочени най-вече към

търсене, идентификация и молекулярна епидемиология на инфекциите, причинени от MBL-продуциращи *P. aeruginosa* и по-рядко се публикуват данни относно разпространението на ESBLs.

Най-значимата находка от проведения PCR скрининг е откриването на *bla*_{NDM-like} (10.3%) и *bla*_{VIM-like} (3.8%) гени, кодиращи MBLs. В по-старо наше мултицентрово проучване върху генетичните механизми на резистентност на 203 нозокомиални MDR-PA от 2001–2006 г., от които 45% карбапенем-резистентни, не бяха идентифицирани MBL-положителни изолати (Strateva et al. 2007b). След първото в България съобщение за случай на *P. aeruginosa* с MBL (продуцент на VIM-15), изолиран от урина на хоспитализиран пациент през 2006 г. (Schneider et al. 2008), чак от 2017 г. нататък започва идентифициране на единични MBL-продуциращи клинични изолати *P. aeruginosa*. Чрез WGS са определени вариант на металоензимите, точна локализация и генетично обкръжение на структурните гени, както и редица други геномни характеристики (Kostyanov et al. 2020; Stoikov et al. 2023).

Въпреки че кръстосаната резистентност към карбапенеми и аминокликозиди е широко разпространена сред MBL-продуциращите изолати *P. aeruginosa*, тя много рядко се свързва с участие на ArmA 16S рНК метилази в комплексните генетични механизми. В настоящото проучване не бяха доказани *armA* гени, както в групата на MBL-продуценти, така и сред останалите CRPA изолати. Първите в света *armA*-положителни *P. aeruginosa* са изолирани през 2008–2009 г. в университетска болница в Южна Корея. Честотата на генетичната детерминанта е 14% сред извадка от 100 изследвани щамове, а от тях половината са идентифицирани като едновременни носители на *armA* и *bla*_{IMP-1} (Gurung et al. 2010). В по-късно индийско проучване върху детерминантите на аминокликозидна резистентност сред клинични изолати *P. aeruginosa* (2014–2015 г.) е установено, че 20.6% от тях са носители на гени за 16S рНК метилази (*rmtB*, *rmtC*, *rmtF* и *armA*), но само един е *armA*-положителен (Mohanam and Menon 2017). Наскоро в Бразилия е идентифициран и *rmtDI* в изолати с *bla*_{KPC} и/или *bla*_{VIM-2}, които са показали пълна антимикуробна резистентност (Costa-Júnior et al. 2021).

2.1.2. Резистомен анализ, базиран на WGS

Шестнадесет карбапенем-резистентни изолата *P. aeruginosa* бяха подложени на резистомен анализ. В подбора бяха включени 11 положителни за VIM/NDM-тип MBLs и 5 MBL-отрицателни изолата. Техните общи WGS характеристики са представени в **Таблица 12**.

Таблица 12. Общи характеристики от WGS анализа на 16 карбапенем-резистентни изолата *P. aeruginosa*.

Геном №	Лаб. №	Дата на изолиране	Болница	Клиника	Материал	Дължина на генома (Mb)	GC%	N50 (bp)	Брой контиги (>1000 bp)	ST / O серотип*
Paе41	3796	04.04.2016	ВМА	КАРИЛ	ТБА	7.06	66.03	416 573	49	233 / O11
Paе48	2204	02.07.2019	Амбулаторен, МВ		Храчка	6.5	66.15	522 447	54	480 / O6
Paе49	3006	25.09.2019	УМБАЛ "Св. Анна"	Коремна хирургия	Гърлен секрет	7.15	65.75	251 876	77	111 / O12
Paе50	3007	25.09.2019	УМБАЛ "Св. Анна"	Коремна хирургия	Урина	7.16	65.75	231 855	78	111 / O12
Paе51	448	08.02.2020	УМБАЛ "Св. Иван Рилски"	ОАИЛ	ТБА	6.72	66.04	425 538	41	357 / O11
Paе52	1030	30.04.2020	УМБАЛ "Св. Иван Рилски"	ОАИЛ	ТБА	6.72	66.03	395 429	47	357 / O11
Paе53	799	02.08.2022	УМБАЛ "Св. Иван Рилски"	ОАИЛ	ТБА	6.74	66.04	398 956	45	235 / O11
Paе55	954	12.11.2021	УМБАЛ "Лозенец"	COVID-19	Урина	6.77	66.03	394 690	49	654 / O4
Paе57	323	04.03.2022	УМБАЛ "Лозенец"	COVID-19	Кръв	6.64	66.13	365 794	131	611 / O5
Paе58	464	06.07.2022	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	БАЛ	6.77	66.03	394 690	49	654 / O4
Paе59	655	04.07.2022	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	Кръв	6.77	66.03	395 137	47	654 / O4
Paе60	657	04.07.2022	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	Кръв	6.77	66.02	394 690	50	654 / O4

Таблица 12. Продължение

Геном №	Лаб. №	Дата на изолиране	Болница	Клиника	Материал	Дължина на генома (Mb)	GC %	N50 (bp)	Брой контиги (>1000 bp)	ST / O серотип*
Paе61	529	25.07.2022	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	Урина	6.86	66	539 571	47	654 / O4
Paе62	502	07.11.2022	УМБАЛ "Лозенец"	Урология	Урина	6.90	65.98	286 072	60	654 / O4
Paе67	527	21.08.2023	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	Кръв	6.80	66.02	285 832	73	654 / O4
Paе68	1170	10.11.2022	УМБАЛ "Св. Иван Рилски"	Гастроентерология	Урина	6.79	66.08	268 384	62	235 / O11

ST, секвенционен тип; MB, муковисцидоза; ОАИЛ/КАИЛ, отделение/клиника по анестезиология и интензивно лечение; ТБА, трахеобронхиален аспират; БАЛ, бронхоалвеоларен лаваж.

*O-серотипът е определен чрез *in silico* серотипизиране посредством Past v1.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PAst-1.0/>).

Резултатите от откриване на AMR генетични детерминанти, свързани с резистентността към различни класове антибиотици, са илюстрирани на **Фигура 11**.

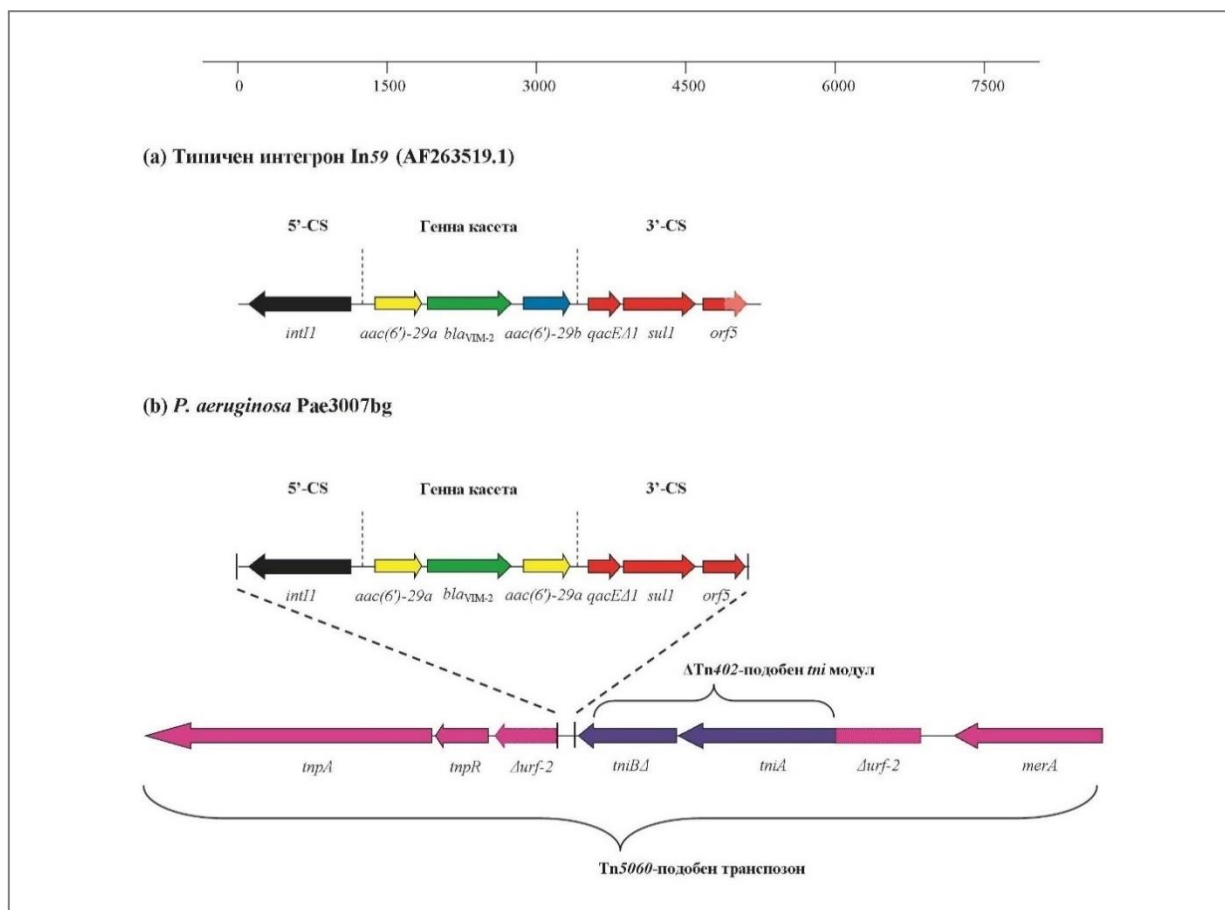
ГЕНИ	Pae41	Pae48	Pae49	Pae50	Pae51	Pae52	Pae53	Pae55	Pae57	Pae58	Pae59	Pae60	Pae61	Pae62	Pae67	Pae68	АМЛС
<i>bla</i> _{GES-1}																	Beta-lactams
<i>bla</i> _{PER-1}																	
<i>bla</i> _{VEB-9}																	
<i>bla</i> _{NDM-1}																	
<i>bla</i> _{VIM-2}																	
<i>bla</i> _{VIM-4}																	
<i>bla</i> _{OXA-2}																	
<i>bla</i> _{OXA-10}																	
<i>bla</i> _{OXA-50}																	
<i>bla</i> _{OXA-74}																	
<i>bla</i> _{OXA-395}																	
<i>bla</i> _{OXA-486}																	
<i>bla</i> _{OXA-488}																	
<i>bla</i> _{PAO/PDC-1}																	
<i>bla</i> _{PDC-2}																	
<i>bla</i> _{PDC-3}																	
<i>bla</i> _{PDC-5}																	
<i>aac</i> (6')-II																	Aminoglycosides
<i>aac</i> (6')-Ib7																	
<i>aac</i> (6')-29a																	
<i>ant</i> (2'')-Ia																	
<i>ant</i> (3'')-Ia																	
<i>ant</i> (3'')-IIa																	
<i>aph</i> (3'')-Ib																	
<i>aph</i> (3'')-IIb																	
<i>aph</i> (3'')-VI																	
<i>aph</i> (6)-Id																	
<i>aphA15</i>																	
<i>crpP</i>																	
<i>gyrA</i> (T83I)																	
<i>parC</i> (S87L)																	
<i>cmIA5</i>																	Phenicolis
<i>cmIB1</i>																	
<i>cmx</i>																	
<i>catB7</i>																	
<i>dfrB2</i>																	TMP
<i>sul1</i>																	
<i>fosA</i>																	SUL
<i>tet(A)</i>																	
																	FOS
																	TET

Фигура 11. Детерминанти на антимикробна резистентност (AMR) и мутации в QRDRs (quinolone-resistance-determining regions) на гените *gyrA* и *parC*, идентифицирани в 16 клинични изолата *P. aeruginosa* чрез ABRicate (Galaxy version 1.0.1). Колоните съответстват на отделните щамове, а редовете – на AMR детерминанти. Цветната схема представя засегнатия клас антибиотици (дясно) и връзката със съответните гени (ляво).

АМЛС, антимикробни лекарствени средства; FQui, флуорохинолони; TMP, trimethoprim; SUL, sulfamethoxazole; FOS, fosfomycin; TET, tetracycline.

В шестнадесетте изолата *P. aeruginosa* бяха идентифицирани множество AMR детерминанти, като най-голямо беше разнообразието на кодиращите резистентност към β -лактами и аминогликозиди. Всички изолати притежават гени за вродената AmpC β -лактамаза от клас C, известна като *Pseudomonas-Derived Cephalosporinase* (PDC) (различни варианти: bla_{PAO} , който е идентичен с bla_{PDC-1} ; bla_{PDC-2} ; bla_{PDC-3} или bla_{PDC-5}); *aph(3')-IIb* (отговорен за вродена резистентност към канамисин и неомисин) и *fosA* (Mn^{2+} и K^{+} -зависима плутатион S-трансфераза, асоциирана с резистентност към фосфомисин). Това корелира с находките от по-рано проведени WGS анализи на клинични щамове *P. aeruginosa* (Ahmed 2022). Също така всички, с изключение на Pae48 (MDR-PA от хрчка на болен с МВ), бяха положителни за *sull*, което предполага носителство на интегрони от клас 1.

Двата CRPA изолата от УМБАЛ „Св. Анна“, които бяха положителни за $bla_{VIM-like}$ гени при PCR скрининга, бяха определени като VIM-2 продуценти. Те принадлежаха към високорисковия ST111 и серотип O12, определен чрез *in silico* серотипизиране с Past v1.0. Pae49 и Pae50 показаха идентичен резистом. На детайлен WGS анализ беше подложен Pae50 (Pae3007bg), чийто геном беше депозиран в GenBank NCBI с Accession No. JAGFBD000000000 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JAGFBD000000000>). Изолатът беше докладван като първият в страната *P. aeruginosa* продуцент на тази MBL (Strateva et al. 2021). Той показва най-висока идентичност (99.9% ANI) с щам PaeAG1 (Accession No CP045739) при MiGA търсения в наличните бази данни. PaeAG1 е изолиран от хрчка на ICU пациент с пневмония от Коста Рика през 2010 г. Определен е като MDR-PA и подобно на нашия изолат, принадлежи към високорисковия ST111. Интересно в случая е, че това е първият докладван в света *P. aeruginosa*, който носи едновременно bla_{VIM-2} и bla_{IMP-18} (Molina-Mora et al. 2020). В Pae3007bg беше идентифициран In59-подобен интегрон от клас 1, съдържащ няколко AMR детерминанти, включително гена за bla_{VIM-2} . Неговата структура е показана на **Фигура 12**. Както е видно от фигурата, 5'-краят на този интегрон включва гена *intI1* (кодиращ клас 1 интеграза). Неговият 3'-край се състои от първите 348 bp от нуклеотидната последователност на *qacE* (детерминанта на ефлуксия SMR транспортер на четвъртично амониево съединение), който се припокрива с гена *sull* (дихидроптероат синтаза тип-1), последван от частично запазен *orf5* (неизвестна функция). Целият интегрон е вмъкнат в *urf-2* гена на Tn5060-подобен транспозон. Освен това, дефектен Tn402-подобен *tni* модул е разположен след *orf5* и в съседство с *merA* гена на Tn5060. Липсва останалата част от *mer* оперона (*merC*, *merP*, *merT* и *merR* гени).



Фигура 12. (а) Линейна карта на типичен *bla*_{VIM-2}-съдържащ In59 интегрон от клас 1, идентифициран в щам *P. aeruginosa* RON-2 (AF263519.1). Позициите на гените и посоката на транскрипция са изобразени с отворени стрелки. Консервативният сегмент в 3' края (3'-CS, елементите с червен цвят на фигурата) на интегрона включва: *qacEΔ1* (ген за SMR ефлукс транспортер на четвъртично амониево съединение), *sul1* (ген за дихидроптероат синтаза тип-1) и *orf5* (неизвестна функция).

(б) Линейна карта на генетичното обкръжение на In59-подобен интегрон от клас 1, идентифициран в *P. aeruginosa* Paе3007bg. Генната касета във вариabilния регион съдържа гена *bla*_{VIM-2} (подклас В1 метало-β-лактамаза VIM-2, означен в зелено), заобиколен от две копия на ген *aac(6')-29a* (аминогликозид ацетилтрансфераза, означени в жълто). In59-подобният интегрон е вмъкнат в *urf-2* гена на Tn5060-подобен транспозон (транспозонните елементи са означени в розово). В непосредствена близост до мястото на инсерция присъства и дефектен Tn402-подобен *tni* модул (Δ Tn402-подобен модул, представен в лилаво), състоящ се от *tniBΔ* и *tniA*, разположени след 3' края на *orf5*.

WGS позволи не само детайлно охарактеризиране на структурата на открития в Paе3007bg In59-подобен интегрон от клас 1, но предостави и информация относно неговата локализация. Той беше разположен на голям контиг с приблизителен размер от 15.7 kb. Отсъствието на плазмид-свързани нуклеотидни последователности внушава възможно хромозомно

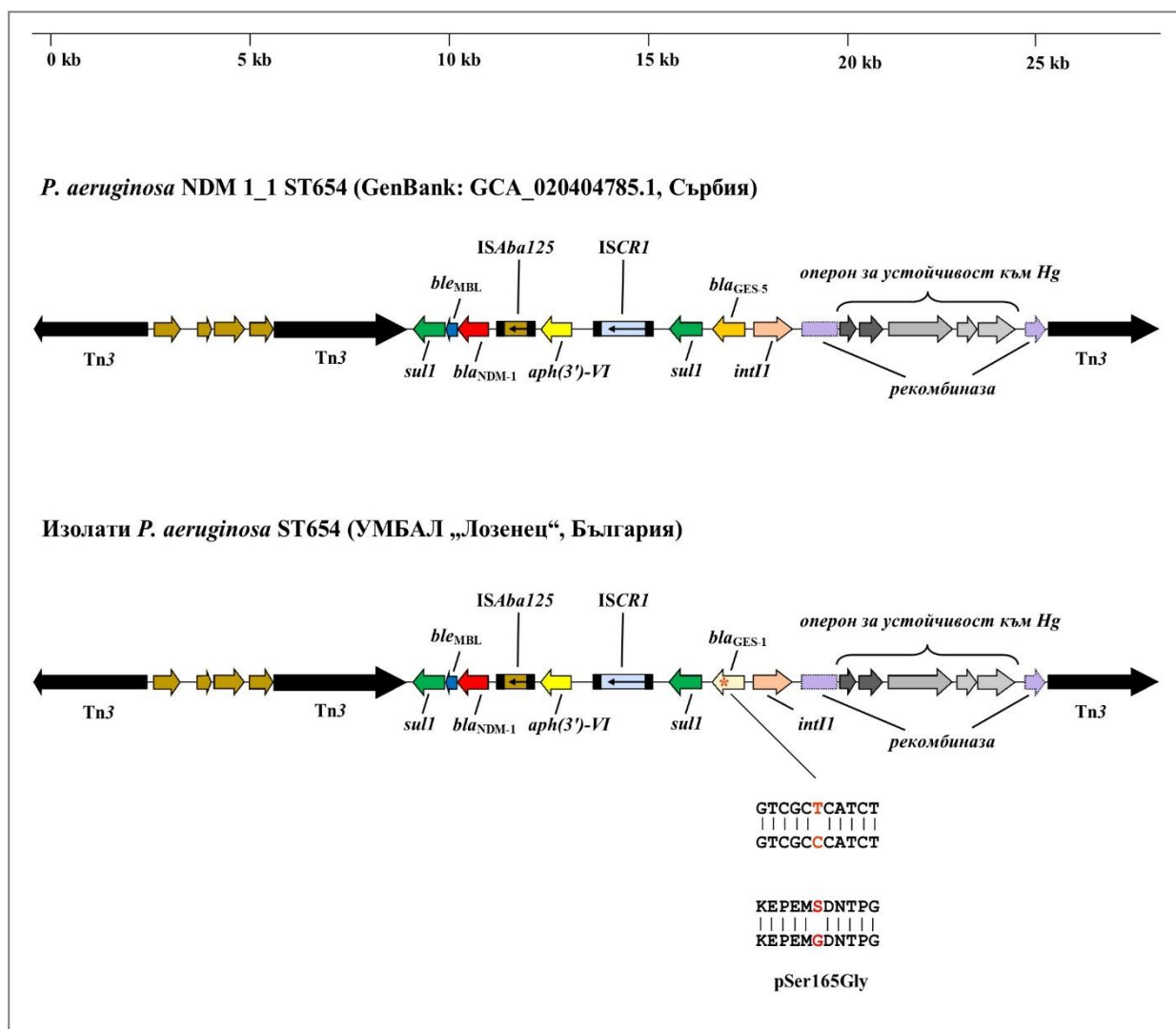
местоположение на интегрона. В предходни проучвания също е докладвана хромозомна локализация на *bla*_{VIM-2} в CRPA изолати, които са генетично родствени с изследвания от нас щам (Paragiannitsis et al. 2017; Molina-Mora et al. 2020). Генът *bla*_{VIM-2} е откриван като част от различни типове интегрони от клас 1 (Halat and Moubareck 2022). Например Vocharova et al. в мащабно проучване, включило CRPA изолати от четири болници в Русия от периода 2012–2017 г., откриват 44.1% VIM-2 продуценти и идентифицират пет типа интегрони от клас 1 сред *bla*_{VIM-2}-положителните изолати: In56, In559, In59-подобен, In59 и In249 (Vocharova et al. 2020). Всички изолати с In59-подобен интегрон (17.2% от носителите на *bla*_{VIM-2}) са били определени като част от високорисковия ST111 клон, какъвто е и нашият Рае3007bg. Понастоящем разпространението на VIM-2-продуциращи изолати *P. aeruginosa* от ST111/серотип O12 е глобално (del Barrio-Tofiño et al. 2020; Pirzadian et al. 2021).

В Рае41 изолата от трахеобронхиален аспират на ICU пациент на ВМА – София (2016 г.), който показва наличие на *bla*_{VIM-like} ген при PCR скрининга, беше идентифициран *bla*_{VIM-4}. В скорошно българско проучване е докладван един CRPA изолат от кръв на пациент с миелоидна левкемия, който продуцира две различни MBLs – новата IMP-100 и VIM-4. Интересно в случая е, че този щам, също като Рае41, е определен като част от високорисковия клон ST233 / CC233 (Stoikov et al. 2023).

След проведения WGS анализ в осемте CRPA изолата от УМБАЛ „Лозенец“ от 2021–2023 г. (Рае: 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62 и 67), които бяха *bla*_{NDM-like}-положителни при PCR скрининга, бяха идентифицирани *bla*_{NDM-1} гени (**Фигура 11**). Всички, с изключение на Рае57, принадлежаха към високорисковия ST654 и притежаваха напълно идентичен резистом. Инвазивният изолат Рае57 се характеризираше с различен вариант на вродената AmpC цефалоспориноза (PDC-5) и OXA-50 β-лактамаза от клас D, за разлика от останалите, при които бяха доказани гени за PDC-3 и OXA-486 (производен ензим на OXA-50). Освен това беше отнесен към ST611. Прави впечатление, че всички NDM-1-положителни CRPA изолати от настоящото проучване продуцират също GES-1 ESBL и няколко аминокликозид фосфотрансферази. С изключение на Рае57 от ST611 и серотип O5, който показва интермедиерна чувствителност към флуорохинолони (МПК стойности за CIP и LVX съответно 0.50 и 0.75 mg/L), останалите NDM-1 продуценти демонстрираха високо ниво на резистентност към CIP и LVX (МПК >32 mg/L), асоциирана с еднакви мутации в QRDR на *gyrA* (T83I) и *parC* (S87L).

Генетично обкръжение на идентифицираните *bla*_{NDM-1} гени в CRPA изолати от УМБАЛ „Лозенец“

В седемте секвенирани генома на CRPA изолати от ST654 / серотип O4 *bla*_{NDM-1} генът е разположен на къс контиг с дължина 3498 bp, заедно с *aph*(3')-VI. Проведените blastn сравнения показаха, че изолатите са носители на транспозон Tn21, включващ, *ble*_{MBL}-*bla*_{NDM-1}-*IS*Aba125, открит по-рано в генома на *P. aeruginosa* ST654 NDM1_1 от Сърбия (GenBank No: GCA_020404785.1) (Фигура 13).



Фигура 13. Схематично изображение на обкръжението на *bla*_{NDM-1} гена в 7 карбапенем-резистентни изолата *P. aeruginosa*, принадлежащи към високорисковия клон ST654, от УМБАЛ „Лозенец“, София (Pae55, Pae58, Pae59, Pae60, Pae61, Pae62 и Pae67). Гените и тяхната транскрипционна ориентация са обозначени със стрелки.

Структурата на Tn21 транспозона в нашите *bla*_{NDM-1}-съдържащи CRPA изолати е локализирана върху 5 контига с еднакво секвенционно покритие, с изключение на този с гените *sull*. Неговото покритие е два пъти по-високо поради сливане на секвенционните прочити от двете генни копия в процеса на сглобяване на геномите. Цялата последователност от 28484 bp е напълно идентична с контролната секвенция, с изключение на една единствена мутация в *bla*_{GES-1} гена, която води до аминокиселинна замяна (pSer165Gly).

Големите размери и липсата на увеличение в секвенционното покритие на граничните контиги, включващи нуклеотидната последователност на Tn21 транспозона, недвусмислено сочат към хромозомна локализация на цялата структура и съответно на *bla*_{NDM-1} гена в генома на седемте CRPA изолата от високорисковия ST654 от УМБАЛ „Лозенец“.

Пълният генетичен контекст на *bla*_{NDM-1} в генома на *P. aeruginosa* Paе57 (ST611) не беше определен успешно поради две причини: **1.** липса на подходяща контролна нуклеотидна последователност и **2.** ограничения на използваното от нас секвениране с къса рамка на четене. Също така трябва да се направи уточнение, че в Paе57 бяха открити 60% от пълната последователност на гена *bla*_{GES-1}.

В последните десет години производството на NDM-1 MBLs придобива застрашителни размери не само сред представителите на *Enterobacterales*, но и сред *P. aeruginosa*, добавяйки още един механизъм към неговия арсенал от оръжия за антимикробна резистентност (Halat and Moubareck 2022). След първоначалното идентифициране на два нозокомиални NDM-1-положителни CRPA (МПК на IMP и MEM >32 mg/L) през 2010 г. в Сърбия (Jovcic et al. 2011), изолати с тази MBL са открити в целия свят (Hong et al. 2015; Peykov and Strateva 2023).

Към момента в България са докладвани единични клинични изолати *P. aeruginosa*, чийто водещ механизъм на резистентност към карбапенеми се асоциира с продукцията на NDM-1. Преди няколко години Kostyanev et al. идентифицират 5 CRPA изолата с чувствителност единствено към COL, получени от хоспитализирани пациенти в две университетски болници в София през 2017–2018 г. В два нозокомиални изолата от УМБАЛ „Александровска“ са установени едновременно *bla*_{NDM-1} и *bla*_{GES-1}, както в нашето изследване, а в останалите три от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – *bla*_{NDM-1} и *bla*_{GES-5} (карбапенемаза от клас А), включени в нов интегрон от клас 1, *In1884*, с хромозомна локализация. Подобно на откритите NDM-1 продуценти в настоящото проучване (7 от 8 или 87.5%), тези изолати са демонстрирали

принадлежност към успешно адаптирания болничен клон ST654 (Kostyanov et al. 2020).

Голям интерес в нашето проучване предизвика карбапенем-резистентният изолат Рае57 от COVID-19 отделението на УМБАЛ „Лозенец“, носещ *bla*_{NDM-1} и *bla*_{GES-1}. Тези интегрон-асоциирани AMR детерминанти бяха открити и в останалите 7 CRPA изолата от различни клиници на болницата. За разлика от тях, а и от описаните по-рано от Kostyanov et al. от други болници в София (Kostyanov et al. 2020), Рае57 не показва принадлежност към глобалния високорисков ST654, а към сравнително редкия ST611. В наскоро проведено проучване върху молекулярната епидемиология на CRPA клинични изолати от провинция Шанси в Китай, от периода 2021–2022 г., авторите откриват разнообразие от STs, от които ST611 е втори по честота на разпространение (14%) (Bai et al. 2024). Интересното в случая е детекцията на хромозомно локализираните *bla*_{OXA-50} и *bla*_{PDC-5}, кодиращи съответно OXA-50 оксацилиназа (клас D) и PDC-5 цефалоспориноза (клас C), които бяха идентифицирани и в Рае57. PDC-5 вариантът на AmpC ензима не беше идентифициран в нито един от останалите CRPA, подложени на WGS анализ, в настоящата работа (**Фигура 11**). В друго китайско проучване, фокусирано върху геномните характеристики на клинични MDR/XDR-PA изолати от провинция Гуандон (2018–2020 г.), също е установена хетерогенна популация, сред която ST611 е определен като успешна клонална линия с потенциален риск. В нито един от изолатите от ST611 не е идентифицирана AMR детерминанта за MBL от Ambler клас B, в т.ч. за NDM-1, въпреки че са демонстрирали резистентност към карбапенеми (Zhao et al. 2023b). Към момента липсват литературни данни за разпространението на ST611 извън Китай. Внимателен преглед на базата данни на PubMLST показва, че са депозирани едва 9 изолата *P. aeruginosa* от този секвенционен тип, съответно 3 от Австралия (2005–2008 г.), 1 от Нидерландия (2007), 1 от Полша (2008) и 4 с неизвестен произход (2016). Сред тях липсват такива с *bla*_{NDM-1}, което ни дава основание да приемем, че в настоящото проучване се касае за първи случай в света на изолиране на NDM-1-продуциращ CRPA изолат, принадлежащ към ST611.

В УМБАЛ „Лозенец“ циркулират клонално свързани NDM-1-положителни изолати *P. aeruginosa* от епидемичния ST654. Конкретно в COVID-19 отделението има засечен такъв изолат (Рае55 от 12.11.2021 г.) 4 месеца преди идентифицирането на Рае57/ST611 (**Таблица 12**). Локализацията и описаното вече генетично обкръжение на *bla*_{NDM-1} предполагат възможност за хоризонтален трансфер между щамове *P. aeruginosa* от различни секвенционни типове. Тази хипотеза се подкрепя и от значителния брой кодирани протеини

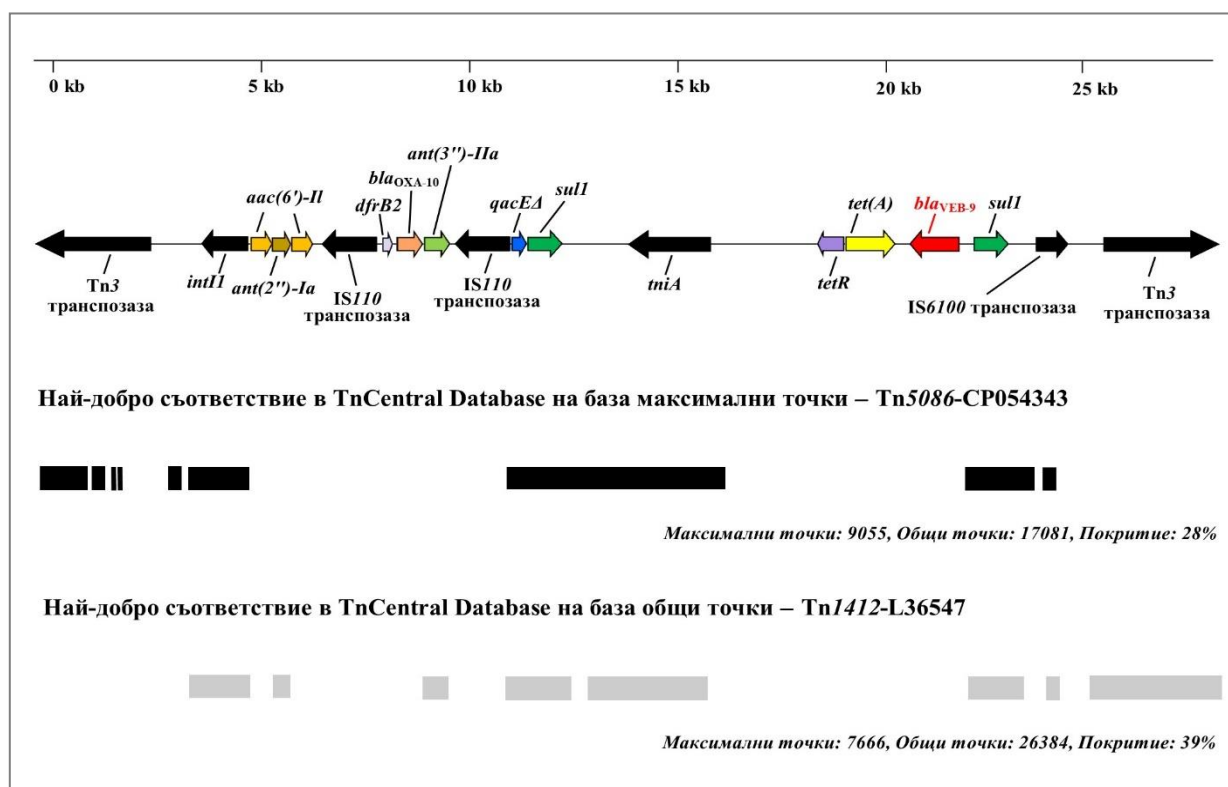
за репликация, рекомбинация и поправка (repair), открити в геномите на изолатите от ST654. Такива генни продукти често участват в „мобилизирането“ на мобилни генетични елементи, като повишават способността им за хоризонтално пренасяне (Botelho et al. 2023). Заслужава да се отбележи, че изолатът Pae57/ST611, който би играл ролята на реципиент в хипотетичното събитие на хоризонтален трансфер, беше единственият сред *bla*_{NDM-1}-положителните изолати *P. aeruginosa* от УМБАЛ „Лозенец“ без открита CRISPR-Cas система в генома си (останалите притежават пълни CRISPR-Cas системи тип I-E). В наскоро проведени проучвания е установено, че системите CRISPR-Cas могат да ограничат хоризонталния пренос на гени при изолати *P. aeruginosa* и техните геноми са значително по-малки от тези на щамове, при които липсват тези структури (Wheatley and MacLean 2021; Botelho et al. 2023). Това наблюдение подчертава потенциала на изолатите *P. aeruginosa* от редкия ST611 да участват в по-нататъшни трансфери, включващи различни AMR детерминанти.

WGS позволи определяне на точния вариант на VEB-like ESBLs при два от общо деветнадесетте *bla*_{VEB-like}-положителни изолата *P. aeruginosa* (**Pae51** и **Pae52** – Таблица 12., Фигура 11.). Двата щама бяха изолирани от трахеобронхиални аспирати на ICU пациенти с VAP, лекувани в ОАИЛ на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Те бяха определени като XDR-PA, демонстриращи чувствителност единствено към CFDC (МПК = 0.5–1 mg/L) и COL (1 mg/L). При проведения резистомен анализ на Pae51 и Pae52 беше установено, че те са продуценти на вариант на VEB-1 ESBL – VEB-9, известна преди като VEB-1a (Lahiri and Alm 2016). Единственият докладван вариант на VEB-тип ESBLs сред MDR-PA в България е VEB-1, а идентифицираните по-рано изолати са показали принадлежност към два международни високорискови клона – ST111 и ST244 (Strateva et al. 2007a, b; Vatcheva-Dobrevska et al. 2013). VEB-9 ESBL е идентифицирана първоначално в два клинични изолата *P. aeruginosa* от ICU пациенти в Кувейт, които са демонстрирали резистентност към CAZ и cefotaxime, както и синергизъм между CAZ и clavulanic acid (Poirel et al. 2001). За първи път в Европа Laudy et al. откриват *bla*_{VEB-9}-положителни *P. aeruginosa* (7.7%) сред CAZ и/или FEP-резистентни клинични изолати от четири болници във Варшава, Полша в периода 2000–2014 г. (Laudy et al. 2017). По-късно Sid Ahmed et al. провеждат WGS на 75 избрани MDR-PA клинични изолати, събрани в няколко болници в Катар през 2014–2015 г., с цел анализ на доминиращите STs и AMR детерминанти на резистентност към β-лактами. Отчетено е, че VEB-9 е най-разпространената ESBL (25.3%), а 18 от общо деветнадесетте *bla*_{VEB-9}-съдържащи изолата *P. aeruginosa* са част от

висорисковите ST235 ($n = 8$), ST357 ($n = 7$) и ST308 ($n = 3$) (Sid Ahmed et al. 2020). Нашите VEB-9 продуценти също бяха класифицирани в ST357.

Генетично обкръжение на идентифицираните *bla*_{VEB-9} гени в XDR-РА изолати (Pae51 и Pae52) от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“

Извършеният ръчен анализ на генетичния контекст на *bla*_{VEB-9} в сглобените геноми на Pae51 и Pae52 разкри характерни черти, показващи носителство на интегрон от клас 1 със сложна структура, която е представена графично на **Фигура 14**. Гените *bla*_{VEB-9} и *tet(A)* са разположени в близост до 3' края на интегрона, което се доказва от наличието в съседство на *sulI*. Различни гени, свързани с мобилни генетични елементи, присъстват пред и след *bla*_{VEB-9} (отбелязани в черно). Сравнителният BLASTN анализ на цялата секвенция в базата данни TnCentral откри различни съвпадения, като Tn5086-CP054343 (открит в *E. coli* SCU-164) и Tn1412-L36547 (*P. aeruginosa* 2293E) показаха съответно най-високо максимално и най-високо общо съвпадение.



Фигура 14. Схематично представяне на генетичното обкръжение на *bla*_{VEB-9} в изолатите *P. aeruginosa* Pae51 и Pae52, принадлежащи към глобалния високорисков клон ST357. Фигурата показва също наличието на гени, свързани с мобилни генетични елементи, и най-добрите съвпадения за VEB-9 региона в базата данни TnCentral.

Размерът и секвенционното покритие на съответните контиги предполагат, че гените *bla*_{VEB-9}, съдържащи се в изолатите *P. aeruginosa* Paе51 и Paе52, са разположени върху техните хромозоми. Въпреки хромозомната локализация, наличието на множество близкоразположени гени, кодиращи протеини, необходими за пренасянето на мобилни генетични елементи, подчертава потенциала за хоризонтален трансфер на *bla*_{VEB-9} към други Грам-отрицателни бактериални изолати.

Резистомният анализ на двата VEB-9-положителни XDR-РА изолата включи и скрининг на кодиращата нуклеотидна последователност на гена *oprD* за мутации, който показва, че Paе51 и Paе52 притежават идентични секвенционни варианти. Всички идентифицирани missense и indel варианти, сравнени със съответния регион в *P. aeruginosa* PAO1, са показани на **Фигура 15**. Освен това OprD поринът, произведен от Paе51 и Paе52, беше сравнен с базата данни Non-redundant Protein Sequence (nr) чрез BLASTP, което доведе до едно-единствено попадение със 100 % идентичност и покритие (AWF58599.1). Тази последователност принадлежи на клиничния щам *P. aeruginosa* AR_0443 (CP029147.1), за който се съобщава, че е резистентен към карбапенемите IMP (МПК = 32 mg/L), MEM (>8 mg/L) и doripenem (>8 mg/L). Направеният от нас анализ на резистома на пълния му геном не откри гени, кодиращи известни карбапенемази, подобно на резултатите от скрининга за AMR детерминанти при Paе51 и Paе52 (**Фигура 11**).

От друга страна беше установено, че генът *mexT*, кодиращ регулатор на MDR ефлукс системата MexE-MexF-OprN на *P. aeruginosa*, притежава делеция от 8 bp (GGCCAGCC), която води frameshift мутация с изместена рамка на четене (**Фигура 15**).

Направеният RT-qPCR анализ показва, че нивата на експресия на *oprD* гените в Paе51 и Paе52 са намалени в сравнение с карбапенем-чувствителния щам *P. aeruginosa* PAO1, използван като калибратор. Относителната експресия беше съответно 0.21 и 0.28.

OrpD		
		бримка 1
Pae 51/52	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDG KEGRG	60
Pae PAO1	MKVMKWSAIALAVSAGSTQFAVADAFVSDQAEAKGFIEDSSLDLLLRNYYFNRDGK G G	60
		бримка 2
Pae 51/52	DRVVDWTQGGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAGFYLGKLDGTSDKTGTGNLPMVNDGKPRDDY	120
Pae PAO1	DRVVDWTQGGFLTTYESGFTQGTVGFGVDAGFYLGKLDGTSDKTGTGNLPMVNDGKPRDDY	120
		бримка 3
Pae 51/52	SRAGGA L KVRI SKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF	180
Pae PAO1	SRAGGA V KVRI SKTMLKWGEMQPTAPVFAAGGSRLFPQTATGFQLQSSEFEGLDLEAGHF	180
		бримка 4
Pae 51/52	TEGK Q GT T TKSRGELYATYAG Q TAKSADF A GGRYAITDNLASLYGAEL K DIYRQYYL N T	240
Pae PAO1	TEGK E PT T VKSRGELYATYAG E TAKSADF I GGRYAITDNLASLYGAEL E DIYRQYYL N S	240
		бримка 6
Pae 51/52	NYTIPLASDQSLGFDFNIYRT T DEGKAKAGDISNT A WSL A GAYTLDAHTFTLAY Q VHGD	300
Pae PAO1	NYTIPLASDQSLGFDFNIYRT N DEGKAKAGDISNT T WSL A AAYTLDAHTFTLAY Q VHGD	300
		бримка 7
Pae 51/52	E PFDYIGF G E NGSG G GGDSIFLANSVQYSDFNPGPEKSWQARYDLN M ASYGVPGLTFMVR	360
Pae PAO1	Q PFDYIGF R N SG A GGDSIFLANSVQYSDFNPGPEKSWQARYDLN L ASYGVPGLTFMVR	360
		бримка 8
Pae 51/52	YINGKDIDG T K V - D S S S Y A G L -YGEDGKHNETNLEAKYVV Q A GPAKDLSFRIRQ A T A P M	418
Pae PAO1	YINGKDIDG T K M S D N N V G Y K N Y G YGEDGKHNETNLEAKYVV Q S GPAKDLSFRIRQ A W H R A	418
		бримка 9
Pae 51/52	P T R V K A T R T S S A 430	
Pae PAO1	xxxxxx ф реймшифтxxxxxx N A D Q G E G D Q N E F R L I V D Y P L S I L 443	
		texT
		фреймшифт
Pae 51/52	GATGCACGAACGCAGCGTGACCCGCGCCGAGAGAACTGTTCCCT-----CGGCCAG	232
Pae PAO1	 GATGCACGAACGCAGCGTGACCCGCGCCGAGAGAACTGTTCCCT CGGCCAG CGGCCAG	240

Фигура 15. Аминокиселинни (АК) последователности на външноембранния протеин OrpD при изолатите *P. aeruginosa* Pae51 и Pae52, подравнени с тази на щам *P. aeruginosa* PAO1. Цветовото кодиране в ред Pae51/52 представя консервативни (дадени в синьо) и неконсервативни (в червено) АК замени, определени чрез матрицата за подравняване BLASTP/BLOSUM62. Бримковите области, определени от кристалната структура на OrpD, са очертани с дебела зелена линия върху подравняването. Мутациите вътре в бримките са отбелязани в зелено (линия PAO1).

Извършеният анализ на кодиращата последователност на *oprD* разкри многобройни missense мутации и една frameshift мутация в регулаторния *texT*, повечето от които засягат бримковите области на кодиращия порин. Подобни

наблюдения са докладвани по-рано при CRPA изолати, показващи, че промените в OprD намаляват способността му да свързва IMP, като по този начин придават резистентност към този антибиотик (Suresh et al. 2020). Откритата намалена експресия на *oprD* също допринася за наблюдаваната резистентност към IMP (МПК >32 mg/L) при изолатите Paе51 и Paе52 (Glen and Lamont 2021). Както беше посочено по-горе, тя е придружена от 8-bp делеция в гена *texT*, която води до изместване на рамката на четене. Този вариант присъства във всички 29 MDR-PA клинични изолати, събрани от различни лаборатории в Керала, Индия, между 2012 и 2016 г. в по-ранно проучване, а *oprD* е показал понижена експресия в 89.7% ($n = 26$) от тези изолати (Suresh et al. 2020).

2.2. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху механизмите на резистентност на карбапенем-нечувствителни *A. baumannii*

2.2.1. PCR скрининг и секвенционен анализ на AMR детерминанти

За провеждане на молекулярно-генетични проучвания в ранния хронологичен период бяха избрани 70 MDR-AB, изолирани от пациенти в четири ICUs на УМБАЛ „Александровска“ от началото на 2005 г. до септември 2011 г. От тях 49 изолата (70%) бяха карбапенем-нечувствителни с МПК стойности (IMP и MEM) в диапазона от 8 до >256 mg/L. Във всички проучени MDR-AB бяха доказани *bla*_{OXA-51-like} гени. Чрез multiplex PCR (Woodford et al. 2006) в карбапенем-нечувствителните изолати бяха идентифицирани *bla*_{OXA-23-like} и *ISAbal* (100%). Не бяха открити кодиращи гени за OXA-24/40-like и OXA-58-like придобити CHDLs. Също така не бяха установени *bla*_{VIM-like} и *bla*_{IMP-like} гени за MBLs. Дванадесет CRAB изолата, по три от всяка мониторирана ICU, бяха избрани за секвениране по Sanger на доказани чрез PCR *bla*_{OXA-23-like} ген. Анализът потвърди наличието на *bla*_{OXA-23} ген и показва 100% хомоложност с нуклеотидната последователност на съответния ген в щам *A. baumannii* DR25547/96, депозирана в GenBank (AY795964). Sanger секвенирането и PCR картиращите експерименти (*ISAbal*/*OXA-23*) определиха и локализацията на *ISAbal* – вмъкната непосредствено пред структурния *bla*_{OXA-23} ген. Разпространението на OXA-23 продуценти сред нозокомиалните MDR-AB изолати в УМБАЛ „Александровска“ в периода от 2009 до 2011 г. беше значимо по-високо спрямо наблюдаваното през 2005–2008 г. (83.7% vs. 48.1%, $p < 0.001$).

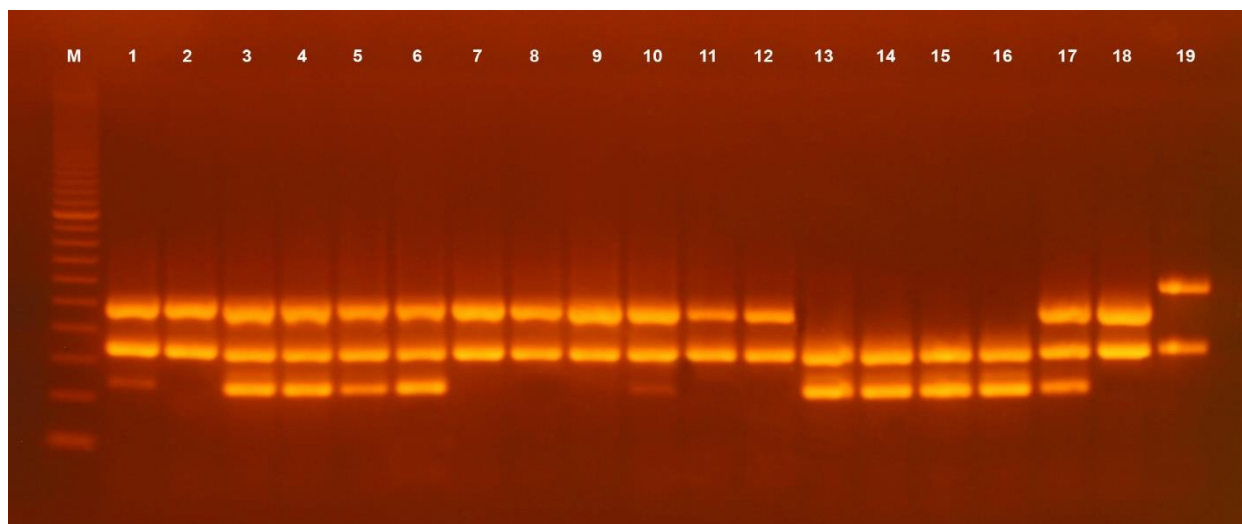
Интензивните молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност към β -лактами, с основен акцент карбапенемни, продължиха във втория главен хронологичен период на настоящото проучване (2014–2022 г.). За целта беше събрана колекция от 301 нозокомиални CRAB изолата от три

университетски болници в София (ВМА, УМБАЛ „Александровска“ и УМБАЛ „Св. Иван Рилски“) и УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Честотата на гените, кодиращи най-разпространените CHDLs (оксацилинази) в *A. baumannii*, е представена в Таблица 13. На Фигура 16. е показано дигитално изображение на резултат от мултиплекс PCR за определяне на генетичните детерминанти на тези ензими.

Таблица 13. Честота на основните групи оксацилинази с карбапенемазна активност сред проучените изолати *A. baumannii* ($n = 301$) в периода 2014–2022 г.

Група CHDL		Брой (%)
Вродена	OXA-51	301 (100)
	OXA-23	129 (42.9)
Придобити	OXA-24/40	107 (35.5)
	OXA-23 + OXA-24/40	48 (15.9)
	OXA-58	1 (0.3)
	OXA-143	0 (0)
	OXA-235	0 (0)
	Мобилни генетични елементи	
	<i>ISAbal</i>	257 (85.4)

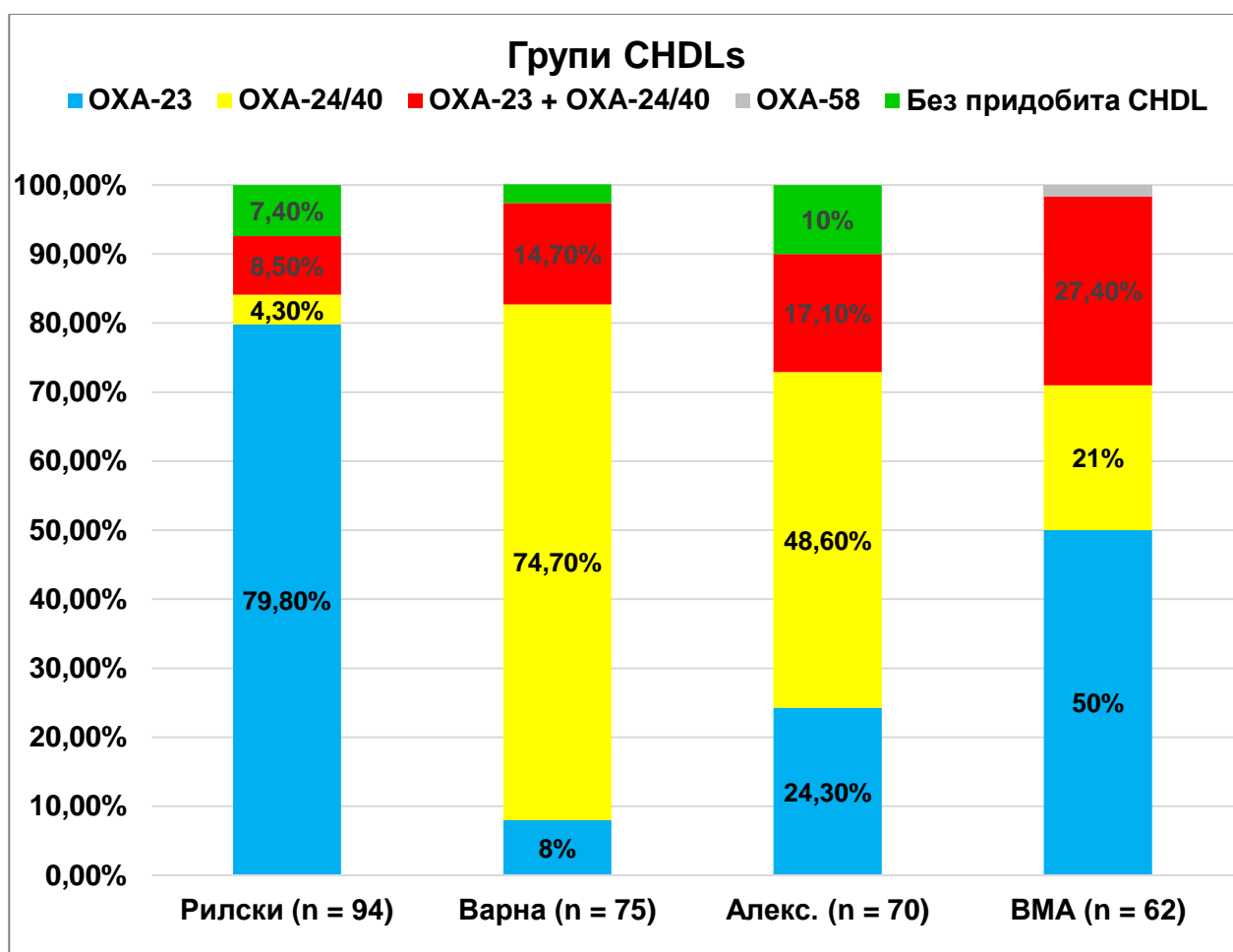
CHDL – карбапенем-хидролизираща β -лактамаза от клас D.



Фигура 16. Мултиплексна полимеразна верижна реакция, илюстрираща детекция на гени за 4 групи CHDLs в изследваните карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* (агарозна гелелектрофореза): OXA-24/40-like (246 bp), OXA-51-like (353 bp), OXA-23-like (501 bp) и OXA-58-like (599 bp). Линия М – **100-bp Ladder**; линии 1, 3-6, 10 и 17 – OXA-51-like + OXA-24/40-like + OXA-23-like; линии 2, 7-9, 11-12 и 18 – OXA-51-like + OXA-23-like; линии 13-16 – OXA-51-like + OXA-24/40-like; линия 19 – OXA-51-like + OXA-58-like.

Във всички изолати *A. baumannii* бяха доказани $bla_{\text{OXA-51-like}}$ гени. Честотата на разпространение на придобитите CHDLs беше близка. Общо 58.8% от изследваните 301 CRAB щама притежаваха $bla_{\text{OXA-23-like}}$ гени (42.9% самостоятелно и 15.9% в комбинация с $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$), а 51.5% съдържаха $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$ (35.5% самостоятелно и 15.9% едновременно с $bla_{\text{OXA-23-like}}$). Идентифициран беше само един $bla_{\text{OXA-58-like}}$ -положителен CRAB изолат. Не бяха доказани OXA-тип карбапенемази (OTCs) от по-редките групи OXA-143 и OXA-235. В обобщение, 94.7% от проучените изолати *A. baumannii* (2014–2022 г.) бяха определени като продуценти на придобити OTCs, а останалите 5.3% бяха асоциирани единствено с вродени OXA-51-like ензими.

Разпределението на продуцентите на придобити CHDLs през 9-годишния период на наблюдение (2014–2022) в четирите университетски болници (3 в София и 1 във Варна) е представено на **Фигура 17**.



Фигура 17. Разпространение на придобити карбапенем-хидролизиращи β -лактамази от клас D (CHDLs) сред карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* от мониторираните болници в периода 2014–2022 г.

В УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ и ВМА преобладаваха продуцентите на OXA-23-like карбапенемази от Ambler клас D, докато в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна и УМБАЛ „Александровска“ доминираха CRAB изолати с OXA-24/40-like CHDLs. Относителният дял на OXA-23-положителни *A. baumannii* изолати беше най-висок в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (88.3%, предимно с наличие единствено на *bla*_{OXA-23-like}). Във ВМА също беше установен висок дял на CRAB изолати с *bla*_{OXA-23-like} детерминанти (77.4%), но копродукция на двете основни групи CHDLs беше отчетена в 27.4% от тях. Доминирането на OXA-24/40 беше най-проявено в университетската болница във Варна, където 74.7% от CRAB изолатите бяха самостоятелни продуценти на ензими от тази група, а 14.7% в съчетание с OXA-23-like. Единственият щам с доказан чрез PCR *bla*_{OXA-58-like} ген беше изолиран във ВМА през 2014 г. Шестнадесет CRAB (5.3%) от всички изолати, събрани от 2014 до 2022 г., бяха отрицателни за детерминанти на придобити OTCs. Тяхното разпределение по болници беше както следва: 10% от изследваните изолати от УМБАЛ „Александровска“, 7.4% в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ и 2.7% в УМБАЛ „Св. Марина“.

Избрани PCR-продукти на груповите гени за придобити OTCs бяха подложени на нуклеотидно секвениране за определяне на точния вариант на продуцираните ензими и установяване на локализацията на доказаната чрез PCR инсерционна последователност IS*AbaI* (Таблица 14).

Таблица 14. Механизми на резистентност към карбапеними в избрани изолати *A. baumannii*, установени чрез секвениране по Sanger и PCR картиращи експерименти.

<i>bla</i>_{OXA-23-like} (n = 5)
Вариант: OXA-23 (n = 5) 100% идентичност: Accession no AJ132105 (GenBank, NCBI) IS <i>AbaI</i> е разположена пред структурния <i>bla</i> _{OXA-23} ген при всички (+) за този ген изолати, генерирайки продукт 1.3-kb.
<i>bla</i>_{OXA-24/40-like} (n = 5)
Вариант: OXA-72 (n = 5) 100% идентичност: Accession no: NG_049813, KU870994, JX968505, HQ219688
<i>bla</i>_{OXA-58-like} (n = 1)
Вариант: OXA-58 100% идентичност: Accession no: NG_049798, KY202456, KF740448

Общо 10.6% (n = 32) от изследваните CRAB изолати в периода 2014–2022 г. (n = 301) притежаваха *bla*_{PER-like} гени. PER продуценти бяха идентифицирани във всички мониториращи болници, но най-голямо беше разпространението им във ВМА (18 от всички 32 изолата с налична *bla*_{PER-like} детерминанта) и УМБАЛ

„Александровска“ (10 от 32). PCR-продукти на *bla*_{PER-like} гени, съдържащи се в избрани CRAB изолати от различни клиници на ВМА ($n = 5$), УМБАЛ „Александровска“ ($n = 5$), УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ($n = 3$) и в единствения *bla*_{PER-like}-положителен CRAB изолат от УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна (Клиника по нервни болести, 2015 г.) бяха подложени на нуклеотидно секвениране с флуоресцентно белязани дидеоксинуклеотиди за определяне на точния вариант на PER-тип ESBLs. Резултатите показаха 99-100% идентичност с *bla*_{PER-1}, идентифициран първоначално в клиничен изолат *P. aeruginosa* от урина на хоспитализиран пациент от Франция (GenBank No. Z21957) (Nordmann and Naas 1994).

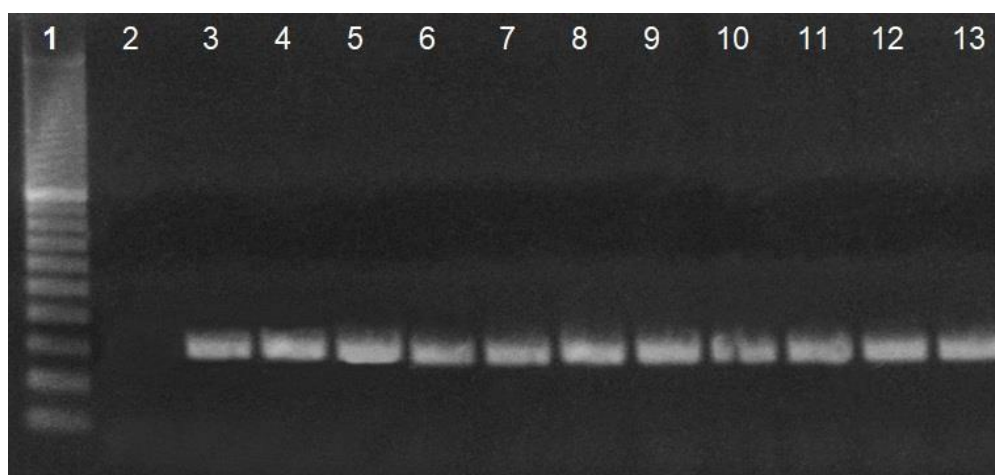
Установената честота на PER-1-положителни изолати в настоящото проучване (10.6%) беше значимо по-ниска ($p < 0.0001$) от тяхното разпространение сред CRAB изолати от други географски региони. Така например мащабно проучване върху AMR детерминанти и молекулярната епидемиология на CRAB изолати в болница в Рияд, Саудитска Арабия, в периода 2006–2014 г. показва 76.3% PER-1 продуценти (Aly et al. 2016). По-ново проучване в Тунис отчита 47.6% изолати с *bla*_{PER-1} сред клонално свързани CRAB щамове, изолирани при вътреболничен взрив в ICU за лечение на изгаряния (Mabrouk et al. 2020).

В хода на разработване на настоящия труд, чрез *gyrB* PCR-базирания метод (Higgins et al. 2007) беше идентифициран клиничен карбапенем-резистентен щам *A. nosocomialis* (AN10691), изолиран през октомври 2014 г. от урина на 53-годишна жена, хоспитализирана в Клиниката по урология на ВМА в София. Изолатът показва резистентност към всички клинично използвани карбапеними (IMP, MEM и DOR – МПК > 32 mg/L). Той също беше резистентен на CIP (> 32 mg/L), LVX (16 mg/L), AMK (24 mg/L) и GEN (8 mg/L). AN10691 беше чувствителен към следните АМЛС: TOB (4 mg/L), TGC (0.75 mg/L), SXT (0.5 mg/L) и COL (1 mg/L). Извършеният PCR скрининг за продукция на вероятни CHDLs и MBLs откри в AN10691 единствено *bla*_{OXA-58-like} ген, който чрез секвениране беше определен като *bla*_{OXA-58} (100% идентичен с депозираните в GenBank секвенции на този ген: KF700121/*A. baumannii*, KF740448/*A. baumannii*, KF208466/*A. pittii*, GU064937/*Acinetobacter* genomospecies 13TU). Генетичното обкръжение на *bla*_{OXA-58} беше дефинирано като IS*Aba3*-like и IS*Aba3*, локализираните съответно пред и след структурния ген. Подобно генетично обкръжение на установеното от нас е първоначално открито в карбапенем-резистентен изолат *A. nosocomialis* от Тайван с високо ниво на транскрипция на *bla*_{OXA-58}. Авторите докладват генетичната структура IS1006–ΔIS*Aba3*-like–*bla*_{OXA-58}–IS*Aba3* и доказват, че вмъкването на IS1006 в

инсерционната последователност IS*Aba-3-like* генерира хибриден промотор, който увеличава транскрипцията на структурния ген и медира хоморезистентност към карбапенеми (Chen et al. 2010).

Към настоящия момент ОХА-58-продуциращи клинични изолати *A. nosocomialis* са докладвани само от азиатски държави – Тайван, Китай, Индия и Малайзия (Lee et al. 2012; Fu et al. 2014; Chatterjee et al. 2016; Alattraqchi et al. 2021). Според направения литературен преглед, идентифицираният в настоящото проучване ОХА-58-продуциращ *A. nosocomialis* AN10691 е първият non-*A. baumannii* изолат, открит и докладван в Европа (Strateva et al. 2018). Същевременно неговото откритие показва вероятен хоризонтален трансфер на *bla*_{ОХА-58} между различни видове ABC complex.

Още в ранния период (2005–2011 г.) на молекулярно-генетични проучвания върху AMR детерминанти на нозокомиалните MDR-AB бяха открити изолати, показващи високо ниво на резистентност към всички аминогликозиди с клинично приложение. Двадесет и три от тестваните 70 изолата от ICUs на УМБАЛ „Александровска“ (32.9%) попаднаха в тази категория (МПК на AMK, GEN и TOB >256 mg/L). При PCR скрининг във всички MDR-AB изолати с високо ниво на резистентност към аминогликозиди за първи път в страната бяха идентифицирани *armA* гени, кодиращи продукцията на 16S рРНК метилаза ArmA (**Фигура 18**). Освен това във всички тях беше доказан тандемът *bla*_{ОХА-23} и *armA*.



Фигура 18. Агарозна гел-електрофореза, представяща идентифицирането на *armA* гени (315-bp фрагмент) в клинични изолати *A. baumannii*. Линия 1 – Ladder 100 bp; линия 2 – отрицателна контрола; линии 3-13 – PCR-положителни изолати.

Проведените експерименти за изолиране на плазмидна ДНК показаха наличие на един плазмид с приблизителна големина 55 kb. След това плазмидната ДНК беше подложена на PCR анализ с праймерите за детекция на *bla*_{OXA-23-like} и *armA*, при който беше получен само един специфичен продукт (315-bp), което предполага вероятна плазмидна локализация на *armA*, но хромозомна локализация на *bla*_{OXA-23}.

Във втория основен хронологичен период (2014–2022 г.) честотата на разпространение на *armA*-положителни CRAB изолати беше по-висока (45.5%), но без статистически значима разлика спрямо ранния период на проследяване (32.9%). Беше доказано циркулиране на копродукенти на OXA-23 карбапенемаза и ArmA 16S рРНК метилаза в четирите мониторирувани университетски болници. От 2017 до 2022 г. при всички CRAB с високо ниво на резистентност към аминокликозиди (65 от общо 75) беше открита комбинация *bla*_{OXA-23} + *armA*, в това число и сред изолатите от пациенти в критично състояние с тежък COVID-19 и вторична VAP, причинена от *A. baumannii*. Глобалното разпространение на клонално-свързани CRAB от IC2, които са копродукенти на тези ензими, представлява сериозно терапевтично предизвикателство за съвременната здравна система (Palmieri et al. 2020; Camargo et al. 2022; Findlay et al. 2023; Jun et al. 2023).

SXT-резистентните изолати *A. baumannii* от периода 2014–2022 г. (83.4%) бяха *sul1*-положителни. В свое проучване Giriya et al. установяват, че 52% от изолатите *A. baumannii* от урина на пациенти с тежки инфекции на уринарния тракт са носители на *sul1*, 45.2% на *sul2*, като преобладават изолатите с едновременно присъствие на двата гена (37%) (Giriya et al. 2019). Авторите докладват също SXT-резистентни изолати (32.8%), в които не са идентифицирани *sul1*, *sul2*, *dfr-A1* и *dfr-A5*.

2.2.2. Резистомен анализ, базиран на WGS

Групата изолати, подложени на WGS, с цел провеждане на детайлен резистомен анализ включи три XDR-AB от ICUs, изолирани в периода 2018–2019 г. Селективните критерии бяха следните: различно място (София и Варна) и година на изолиране; различен клиничен материал (при изолатите от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София); различно ниво на резистентност към аминокликозиди, оценено въз основа на определените преди това МПК; различни AMR детерминанти, доказани при предшестващия PCR скрининг; PCR-отрицателни за *ISAbal1*. Фенотипните и генотипните характеристики на избраните XDR-AB изолати са обобщени в **Таблица 15.**, а техните общи WGS-базирани характеристики са представени в **Таблица 16.**

Таблица 15. Фенотипни и генотипни характеристики на карбапенем-резистентни, XDR изолати *A. baumannii*, подложени на WGS.

Геном №	Произход	Болница	Година	Антибиотици: МПК [mg/L] (Интерпретация)										AMR детерминанти, определени чрез PCR
				IMP	MEM	AMK	GEN	TOB	LVX	TGC	SXT	COL	CFDC	
Aba52	Кръв	Рилски	2018	>32 (R)	>32 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	24 (R)	2 (R)	>256 (R)	1 (S)	64 (R)	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like} , <i>bla</i> _{PER-like} , <i>armA</i> , <i>sull</i>
Aba176	ТБА	Рилски	2019	16 (R)	>32 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	16 (R)	1.5 (R)	>256 (R)	1 (S)	0.25 (S)	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like} , <i>armA</i> , <i>sull</i>
Aba190	ТБА	Св. Марина	2019	>32 (R)	>32 (R)	48 (R)	8 (R)	6 (R)	8 (R)	1.5 (R)	128 (R)	1 (S)	0.50 (S)	<i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>bla</i> _{OXA-23-like} , <i>bla</i> _{OXA-24/40-like} , <i>sull</i>

XDR, разширена лекарствена резистентност; WGS, целогеномно секвениране; AMR, антимикробна резистентност; PCR, полимеразна верижна реакция; IMP, imipenem; MEM, meropenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; LVX, levofloxacin; TGC, tigecycline; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; COL, colistin; CFDC, cefiderocol; R, резистентен; S, чувствителен; ТБА, трахеобронхиален аспират; Рилски, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София; Св. Марина, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.

Таблица 16. Общи характеристики от WGS анализа на 3 карбапенем-резистентни, XDR изолати *A. baumannii*.

Геном №	Дължина на генома (Mb)	GC%	N50 (bp)	Брой контиги (>1000 bp)	ST	Алели						
						<i>cnp60</i>	<i>fusA</i>	<i>gltA</i>	<i>pyrC</i>	<i>recA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>
Aba52	3.96	38.9	122 028	109	2	2	2	2	2	2	2	2
Aba176	3.97	38.9	83 512	131	2	2	2	2	2	2	2	2
Aba190	4.14	38.9	92 248	182	636	2	1	2	2	2	1	1

WGS, целогеномно секвениране; XDR, разширена лекарствена резистентност; ST, секвенционен тип.

Всички идентифицирани AMR детерминанти, мобилни генетични елементи и мутации в QRDR региона на гените *gyrA* и *parC* са представени в **Таблица 17**.

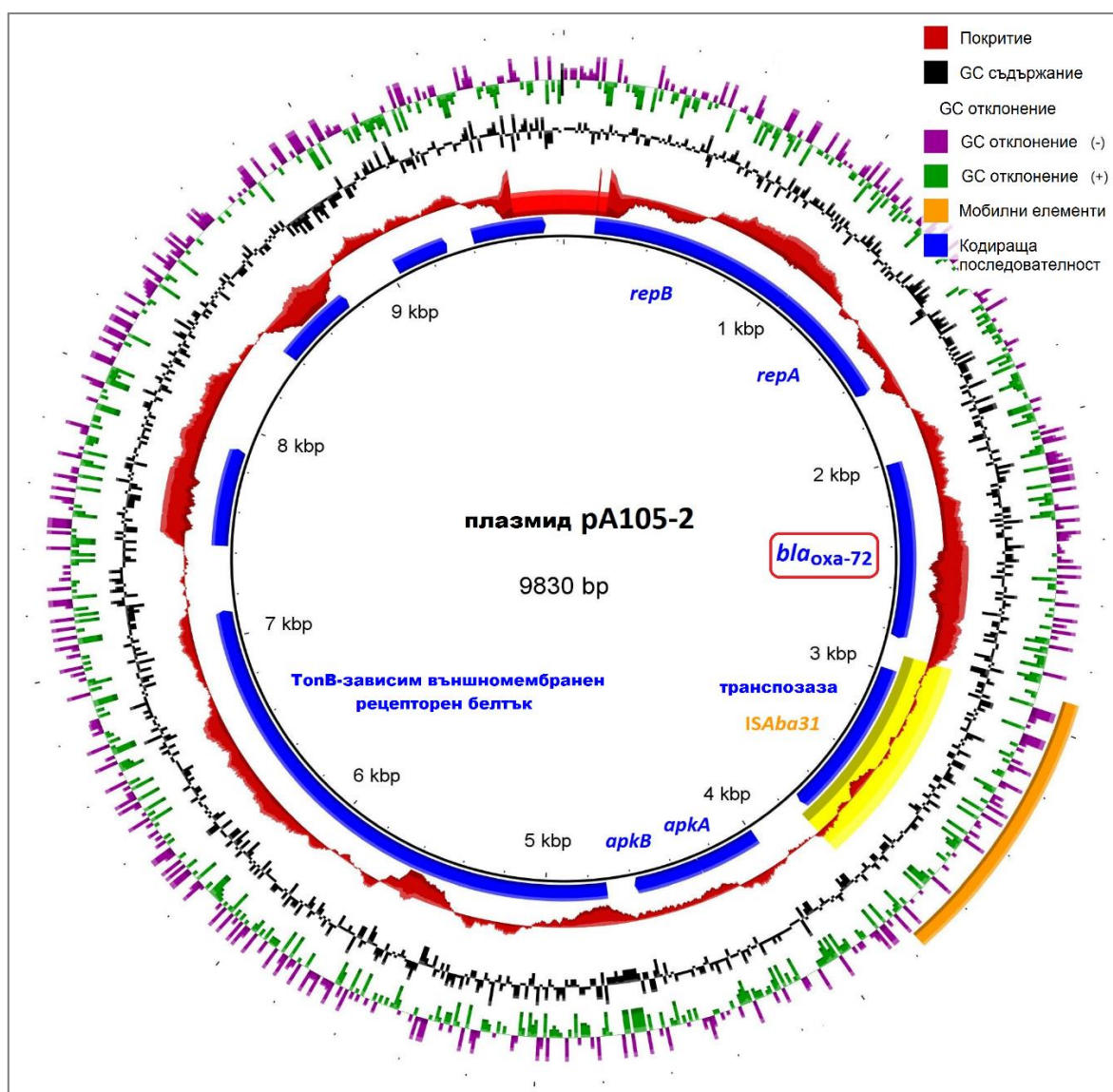
Таблица 17. Резистомен анализ на клиничните изолати *A. baumannii*, подложени на WGS.

AMR гени/MGEs	Aba52	Aba176	Aba190
MGEs	IS <i>Aba24</i> , IS <i>Aba125</i> , IS <i>Vsa3</i> , IS <i>6100</i>	IS <i>Aba24</i> , IS <i>Aba125</i> , IS <i>Vsa3</i> , IS <i>6100</i>	Tn <i>6018</i> , IS <i>Aba31</i> , IS <i>17</i>
Резистентност към β-лактами	<i>bla</i> _{ADC-73} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{PER-1}	<i>bla</i> _{ADC-73} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{ADC-74} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
Резистентност към аминокликозиди	<i>armA</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aac(3)-Ia</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> , <i>aadA1</i>	<i>armA</i> , <i>aph(3')-VIa</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aac(3)-Ia</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> , <i>aadA1</i>	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-VIa</i> , <i>aac(3)-Ia</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> , <i>aadA1</i>
Резистентност към макролиди	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>
Други класове	<i>sul1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>catA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tet(B)</i> , <i>catA1</i>	<i>sul1</i>
* Хинолони: Мутации в QRDR на <i>gyrA/parC</i>	<i>gyrA</i> (pS83L) <i>parC</i> (pS80I)	<i>gyrA</i> (pS83L) <i>parC</i> (pS80I)	<i>gyrA</i> (pS83L) <i>parC</i> (pS80I)

WGS, целогеномно секвениране; AMR, антимикробна резистентност; MGEs, мобилни генетични елементи; QRDR, регион, детерминиращ резистентност към хинолони. * Мутациите са определени спрямо съответните области в *gyrA* и *parC* гените на референтния щам *A. baumannii* ATCC 19606, който е чувствителен на флуорохинолони.

В трите CRAB, XDR-AB изолата беше установено, че 5'-краищата на *bla*_{ADC-73/74} (кодиращи широкоспектърните β-лактамази от клас C) и *bla*_{OXA-23} гените винаги се разполагат до края на контига, което предполага наличието на ISs в началото на съответните промоторни области. В изолат Aba190 беше идентифициран и *bla*_{OXA-72} ген, който кодира OXA-72 карбапенемаза от филогенетична група OXA-24/40. Секвенционното покритие на неговия кореспондиращ контиг беше над 6 пъти по-високо в сравнение с контига, включващ *bla*_{OXA-66} (вариант на *bla*_{OXA-51-like}), който е вродена AMR детерминанта в генома на *A. baumannii* с хромозомна локализация. Подобно различие в покритието предполага, че *bla*_{OXA-72} се носи от плазмид. Тази хипотеза беше подкрепена и от факта, че точно до него бяха открити два гена, кодиращи протеини, които имат участие в репликацията на ДНК. Търсенето чрез Blast с дългия 3785-bp контиг генерира перфектно попадение (100% покритие и идентичност) срещу плазмид pA105-2 (GenBank No: KR535993.1), носител на *bla*_{OXA-72}, който е бил изолиран от карбапенем-резистентния щам *A. baumannii* A105 от Стокхолм, Швеция (Karah et al. 2016). Картирането на

секвенционните прочити спрямо неговата нуклеотидна последователност показва, че Aba190 притежава и останалите плазмидни елементи (Фигура 19).



Фигура 19. Плазмид pA105-2, идентифициран в карбапенем-резистентния изолат *A. baumannii* Aba190: картиране на секвенционните прочити, кодиращи последователности (CDS) и мобилни генетични елементи. Подравняванията са извършени с инструмента BLAST+. Изображението е генерирано посредством BRIG.

Разнообразие от структурни гени, кодиращи AMEs, бяха идентифицирани при WGS-базирания резистомен анализ. В изолатите от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (Aba52 и Aba176) бяха открити *armA*, което корелира с тяхната висока устойчивост към аминокликозиди – МПК >256 mg/L (Таблица 17).

Всички WGS-проучени изолати бяха положителни за *sull*, *qacED1* и *intI1* гени, което предполага наличие на интегрони от клас 1. Генните касети с AMR детерминанти, вмъкнати в техните вариабилни региони, бяха възстановени частично поради ограниченията на използваната технология за секвениране с къса рамка на четене. Те съдържаха *aac(3)-Ia* и *ant(3'')-Ia* гени, кодиращи AMEs.

Откритите замени на аминокиселини в QRDR региона на *gyrA* (pS83L) и *parC* (pS80I) са докладвани в предходни проучвания като причина за развитие на резистентност към флуорохинолоните CIP и LVX в клинични изолати *A. baumannii* (Park et al. 2011a).

Проучвания върху механизмите на резистентност към CFDC при *A. baumannii* Aba52

В настоящото проучване беше идентифициран XDR-AB изолат (Aba52), който демонстрира високо ниво на резистентност към новия антибиотик CFDC (64 mg/L) (**Таблица 15**).

Списъкът с 19 хромозомни гена, свързани с резистентността към CFDC, беше съставен от нас в съответствие с литературните данни и включваше: гени, кодиращи преносители на Fe (*bauA*, *pfeA*, *piuA*, *pirA* и *feoB*); протеини, асоциирани с транспорта на Fe (*exbB1-3*, *exbD1-4* и *tonB1-3*), PBPс (*ftsI*), порини (*carO*) и двукомпонентна регулаторна система (*baeS* и *baeR*) (Nordmann et al. 2022; Liu et al. 2023). Всички идентифицирани секвенционни варианти ($n = 23$), които водят до АК замени, са показани в **Таблица 18**. Седем от идентифицираните мутации са неконсервативни, а *feoB* е единственият ген, който съдържа повече от един вариант от този тип. Анализът на честотата показва, че само вариантите p.Val33Ile и p.Thr61Ala в *bauA* не се срещат сред геномите на *A. baumannii*, присъстващи в базите данни на NCBI.

Извършеният RT-qPCR анализ показва, че експресията на *pirA* гена на Aba52 е намалена в сравнение с чувствителния към CFDC изолат *A. baumannii* (МПК=0.064 mg/L), използван като калибратор (относителна експресия: 0.17). Освен това изолатът Aba52 демонстрира липса на експресия на *piuA*.

Обобщен преглед на литературата показва, че резистентността към CFDC обикновено е резултат от комбинация от няколко механизма, включително продукцията на различни β -лактамази от ОХА тип (особено ОХА-23 карбапенемаза); PER-1 ESBL; мутации в гените, кодиращи сидерофорни рецептори; мутации, засягащи генните детерминанти за порини и ефлуксни помпи и мутации в гена за PBP3 (Karakonstantis et al. 2022).

Таблица 18. Мутации с промяна в аминокиселинната последователност в гените, свързани с резистентността към cefiderocol, в изолата *A. baumannii* Aba52.

Ген (CDS)			
Мутации		Идентичност (%)	Сходства (%)
p.Met82Val	<i>exbD1</i> (429 bp)	99.3	100
p.Asp11Glu	<i>exbD3</i> (423 bp)	99.3	100
p.Ser61Pro , p.Ile63Val, p.Lys97Gln	<i>exbD4</i> (414 bp)	97.8	99.3
p.Leu161Val	<i>exbB2</i> (621 bp)	99.5	100
p.Thr226Ser	<i>tonB1</i> (756 bp)	99.6	100
p.Ala268Val	<i>tonB2</i> (885 bp)	99.7	99.7
p.Val33Ile, p.Thr61Ala	<i>bauA</i> (2274 bp)	99.7	99.9
p.Ser429Pro , p.Thr595Ala	<i>feoB</i> (1854 bp)	99.7	99.7
p.Thr77Ser, p.Asn233Asp, p.Glu236Lys, p.Met238Leu, p.Tyr248Phe	<i>carO</i> (750 bp)	98	100
p.Ala515Val	<i>ftsI</i> (1833 bp)	99.8	99.8
p.Gly216Val , p.Asn489Asp, p.Lys658Arg	<i>piuA</i> (2232 bp)	99.6	99.9
p.Arg230Gln, p.Ser437Thr	<i>baeS</i> (1659 bp)	99.6	100

CDS, кодираща секвенция (нуклеотидна последователност).

Позициите на мутациите са представени в съответствие с кореспондиращите секвенции в референтния щам *A. baumannii* ATCC 19606. Сходните (консервативни) и несходните (неконсервативни, изписани в **bold**) замени на аминокиселини са определени чрез BLASTP подравняване / BLOSUM62 матрица. Идентичност (%) и сходства (%) са изчислени чрез BLASTP сравнения с еквивалентните секвенции на *A. baumannii* ATCC 19606 (AP025740.1).

Както беше описано по-горе, WGS-базираният резистомен анализ на Aba52 установи наличието на няколко гена, кодиращи β -лактамази: *bla*_{PER-1}, *bla*_{ADC-73}, *bla*_{OXA-66} и *bla*_{OXA-23}. В предходно проучване Poirel et al. изследват клинични изолати *A. baumannii* с повишени МПК на CFDC и установяват, че PER-тип ESBLs и в по-малка степен NDM-тип MBLs допринасят значително за намалената чувствителност към сидерофорния цефалоспорин (Poirel et al.

2021). От друга страна авторите показват, че комбинацията CFDC + avibactam проявява отлична активност срещу всички MDR-AB, които продуцират едновременно PER и OXA-23 β -лактамази.

От β -лактамазите от молекулярен клас D единствената оксацилиназа, която е пряко свързана с резистентността към CFDC, е OXA-427. Към момента тя е открита само в изолати от разред *Enterobacterales* (Jacob et al. 2021; Poirel et al. 2022). По-ранни проучвания съобщават също, че клинични изолати *A. baumannii* с високо ниво на устойчивост към CFDC (MIC >32 mg/L) се характеризират с копродукция на карбапенем-хидролизиращите ензими OXA-23 и OXA-66, установени и в нашия изолат Aba52 (Kohira et al. 2020). Като се има предвид, че хетероложната експресия на OXA-23 в *A. baumannii* не оказва влияние върху МПК стойностите на CFDC (Poirel et al. 2021) и антибиотикът проявява стабилност спрямо пречистения ензим в *in vitro* тестове (Poirel et al. 2018), OXA-66 е по-вероятният кандидат с роля в комплексните механизми, отговорни за резистентността към CFDC.

Идентифицираната в *A. baumannii* Aba52 хромозомно кодирана ADC-73 (цефалоспориноза от клас C) не съдържа мутации в близост до YSN бримката, така че може да се изключи разширяване на джоба за свързване на субстрата и съответстващата на това резистентност към CFDC, свързана с ензима (Streling et al. 2021). Непосредствено преди кодиращия ген *bla*_{ADC-73} беше идентифицирана IS. Известно е, че наличието на IS елемент, осигуряващ силен промотор непосредствено преди структурния *bla*_{ampC} ген, е често срещано в клиничните изолати *A. baumannii* и води до неговата свръхекспресия. В наскоро проведено проучване е установено, че резистентността към CFDC на клинични изолати *A. baumannii* от Ню Йорк е свързана със свръхекспресия на *bla*_{ADC}. Освен това потискането на производството на ADC β -лактамазата е довело до ≥ 8 -кратно намаляване на МПК на CFDC (Asrat et al. 2023).

Извършеният скрининг за мутации разкри, че Aba52 съдържа единична АК замяна в гена *ftsI* (p.Ala515Val). Тази мутация е неконсервативна и се намира близо до активния център на кодиращия РВРЗ. По-рано тя е открита както в CFDC-резистентни, така и в CFDC-чувствителни изолати, което предполага възможен принос за наблюдавания фенотип на резистентност на Aba52 (Vannatta et al. 2023).

Три неконсервативни АК замени бяха идентифицирани в кодиращите последователности на гените за TonB-зависимите сидерофорни рецептори *exbD4*, *tonB2* и *piuA* (Таблица 18). Въпреки това анализът на честотата показва, че всички тези варианти са широко разпространени сред изолати *A. baumannii*

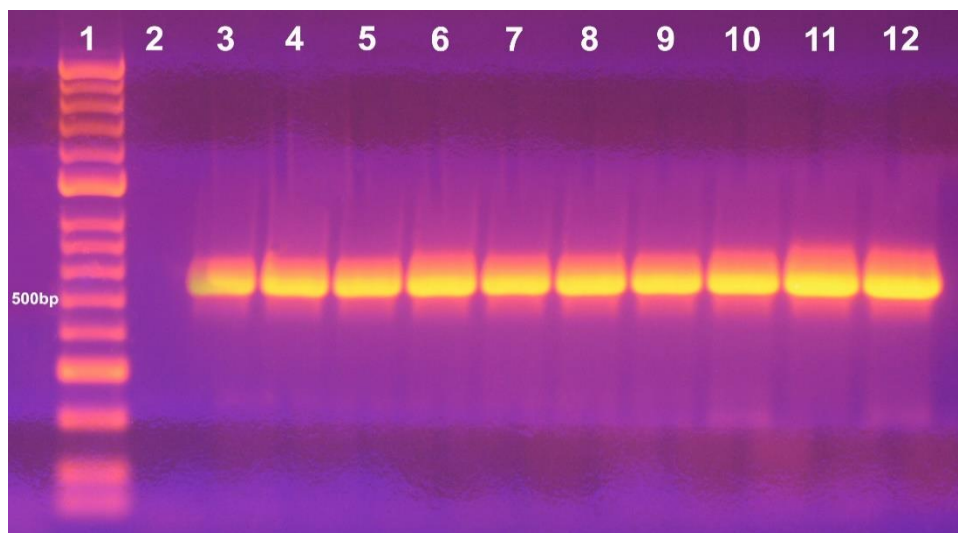
с различен произход, което предполага малка вероятност за техен принос към резистентността към CFDC при Aba52. За разлика от това нито една от двете missense мутации, открити в гена *bauA* (p.Val33Ile и p.Thr61Ala), не присъства в базите данни на NCBI. Преацинетобактиновият транспортиращ протеин BauA има типичната външномембранна TonB-зависима транспортна структура, което го представя като възможен кандидат за участие в резистентността към CFDC при *A. baumannii* (Moynié et al. 2018).

Извършеният RT-qPCR анализ показва намалена експресия на *pirA* и липсваща експресия на *piuA*. Подобни резултати са докладвани и в по-стари проучвания на CFDC-резистентни изолати *A. baumannii*, принадлежащи към ST2 и други STs (Malik et al. 2020). Като се вземат предвид тези констатации, силно намалените нива на експресия на *pirA*, вероятно в комбинация със загубата на *piuA*, играят важна роля в развитието на резистентност към CFDC при Aba52.

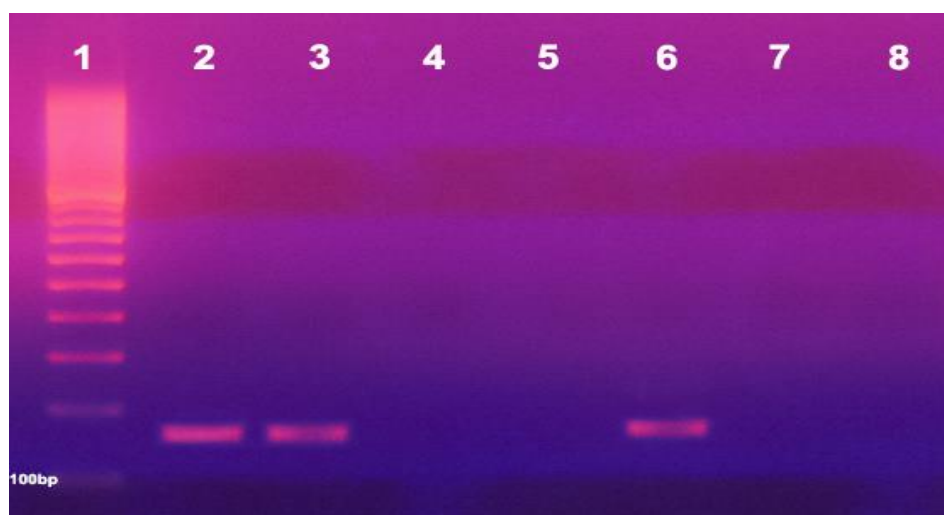
2.3. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху механизмите на резистентност на *S. maltophilia*

2.3.1. Молекулярно-генетични проучвания, свързани с резистентността към SXT

Резистентните на SXT (МПК >32 mg/L) изолати *S. maltophilia* ($n = 29$) бяха изследвани за генетичните детерминанти, асоциирани с главните механизми на устойчивост към препарата, както следва: *sul* гени, кодиращи продукция на дихидроптероат синтази типове 1-3; *dfrA* гени за петте групи дихидрофолат редуктази, открити при този бактериален вид; и клас 1, 2 и 3 интегрази, свързани със съответните класове интегрони. При всички изследвани SXT-резистентни изолати беше открит *sull* ген (**Фигура 20**). Гените *sul2*, *sul3* и *dfrA* не бяха идентифицирани. При 75.9% ($n = 22$) от *sull*-позитивните изолати *S. maltophilia* беше доказано наличие на интегрон от клас 1 чрез детекция на къс фрагмент (160-bp) от гена, кодиращ клас 1 интеграза (*intI1*) (**Фигура 21**). Не бяха открити генетичните детерминанти на интегрази, асоциирани с интегрони от класове 2 и 3.



Фигура 20. Агарозна гел-електрофореза, представяща идентифициране на *sulI* гени (581-bp фрагмент) в клинични изолати *S. maltophilia*. Линия 1 – HyperLadder 50 bp; линия 2 – отрицателна контрола; линии 3-12 – PCR-положителни изолати.



Фигура 21. Агарозна гел-електрофореза, представяща идентифициране на *intI1* гени (160-bp фрагмент) в клинични изолати *S. maltophilia*. Линия 1 – Ladder 100 bp; линии 2, 3, 6 – PCR-положителни изолати; линии 4, 5, 7, 8 – PCR-отрицателни продукти.

Глобалното нарастване на резистентността към SXT се отдава на лесното разпространение на *sul* и *dfrA* гени, част от интегрони от клас 1, които често са плазмид-медиранни (Hu et al. 2011; Трифонова 2020). В голямо проучване, включващо нозокомиални клинични изолати *S. maltophilia* от 25 болници в Китай, е установено, че честотата на разпространение на *sul* гени и *intI1* се увеличава постепенно с развитието на резистентност към SXT през 10-годишния период на наблюдение (2005–2014) (Hu et al. 2016).

Въпреки че *sull* гени са открити и при SXT-чувствителни клинични изолати *S. maltophilia* (Hu et al. 2016; Bostanghadiri et al. 2019; Li et al. 2019b), тяхната водеща роля в придобиване на високо ниво на SXT резистентност от патогена е докладвана многократно. Продукцията на дихидроптероат синтази е главният механизъм на резистентност към sulfamethoxazole при този микробен вид (Chung et al. 2015; Brooke 2021). Подобно на получените от нас резултати, по-ранни изследвания също отчитат МПК на SXT >32 mg/L при *sull*-положителните щамове *S. maltophilia* (Toleman et al. 2007; Hu et al. 2011; Божкова 2016). Съобщават се 100% наличие на *sull* сред високорезистентните на SXT изолати (МПК 64-128 mg/L), а при тези с по-ниски нива на резистентност (МПК 4-8 mg/L) *sull* ген не се открива. Въз основа на тези данни Chung et al. предполагат, че високите нива на резистентност към препарата са свързани със специфичен и ефективен механизъм, включващ *sull*, докато ниските нива на резистентност вероятно са резултат от други механизми. Селектирането на ниски нива резистентност сред клиничните изолати *S. maltophilia* се обуславя от генетични вариации, в отговор на ниски антимикробни концентрации. Освен това, следва да се приемат като предупредителен сигнал за възможна еволюционна тенденция към високо ниво на устойчивост (Chung et al. 2015).

Различните автори докладват разнообразни резултати, касаещи локализацията на *sull* върху интегрони от клас 1. В изследване на бразилски изолати *S. maltophilia* от клинични материали и болнична среда е намерена 100% честота на *intI1* (Gallo et al. 2016). По-нисък от установения от нас процент на *sull* гени с вероятна локализация в клас 1 интегрони (75.9%) при SXT-резистентни изолати *S. maltophilia* е съобщен в по-ранни проучвания в Корея (65%) (Chung et al. 2015) и Индия (41.6%) (Kaur et al. 2015). При *S. maltophilia* е доказано, че интегроните от клас 1 допринасят за резистентността към SXT, носейки *sull* гена в своя 3' край (Barbolla et al. 2004). Те варират на дължина и структура, но интересен факт е забелязан от Toleman et al., а именно, че изолати от един и същ географски регион носят интегрони с еднакъв размер, въпреки че не са клонално свързани (Toleman et al. 2007). В 5' края на интегроните от клас 1 е разположен генът, кодиращ интеграза (*intI1*). Чрез този сайт-специфичен рекомбинационен ензим интегроните могат да „улавят“ различни кодиращи резистентност гени от заобикалящата ги среда и да ги сглобяват във вид на тандемни генни касети, осигурявайки по този начин разпространяването на антимикробната резистентност (Hu et al. 2011; Трифонова 2020). Различният размер на интегроните се дължи на различия в

генните касети, намиращи се в техния вариабилен регион. Тези касети могат да включват гени за различни групи АМЛС и дезинфектанти.

Срещат се и SXT-резистентни *S. maltophilia*, които притежават *sulI* гени, но при тях не са идентифицирани интегрони от клас 1, каквито са 24.1% от *sulI*-положителните изолати в настоящото проучване. Изследователите считат, че е възможно да съществуват интегрони с необичайна структура на техните 3' консервативни участъци, поради което в такива случаи наличието им не може да бъде потвърдено чрез PCR, насочена към известните до момента генетични детерминанти (Hu et al. 2011, 2016). Докладвани са и резистентни на SXT щамове, при които се открива генът, кодиращ клас 1 интегразата (*intI1*), но липсва *sulI*. Предполага се, че интегроните от клас 1 могат да загубят региона, носещ този ген, както и че *sulI* може да присъства в други генетични елементи, което пък допълва гореспоменатата теория за наличие на *sulI* при отсъствие на интегрони от клас 1 (Kaur et al. 2015).

Установено е, че *dfrA* гените, локализирани в генни касети на клас 1 интегрони, водят до по-високи нива на резистентност към SXT, както и че могат да имат синергично действие със *sul* гените (Hu et al. 2011). Други изследвания не откриват *dfrA* гени сред резистентни на SXT клинични изолати *S. maltophilia*, какъвто е случаят и в нашето проучване (Chung et al. 2015; Bostanghadiri et al. 2019). Гените *dfrA* биват различни субтипове и кодираните от тях ензими от семейство дихидрофолат редуктази обуславят резистентност към trimethoprim при този бактериален вид.

2.3.2. Резистомен анализ, базиран на WGS

Девет от проучените изолати *S. maltophilia* от ВМА, събрани в първия хронологичен период (2011–2016 г.), бяха избрани за WGS. Подборът беше направен след комплексна оценка на получените резултати от тестване на антимикробна чувствителност, молекулярно-генетични изследвания върху механизмите на резистентност към SXT и факторите на вирулентност, фенотипните тестове за ензимна активност и способност за биофилм образуване върху полистиренова повърхност, и RAPD/UPGMA анализа. **Селективните критерии** включваха: различни години на изолиране, клиници и източници (материали от ДДП, рани, медицински устройства и болнична среда); различни количества биофилм, образуван върху полистиренова повърхност; различни *stmPr1*-генотипове и вариации във фенотипна експресия на ензимна активност; и принадлежност към различни клъстерни групи при RAPD типизиране. Общите WGS-базирани характеристики на анализираните изолати *S. maltophilia* са изложени в **Таблица 19**.

Таблица 19. Общи характеристики от WGS анализа на 9 нозокомиални изолата *S. maltophilia* от ВМА.

Геном №	Лаб. №	Дата на изолиране	Клиника	Материал	Чувствителност към SXT	Дължина на генома (Mb)	GC%	ANI (%)	ST
SM8	4497-11	09.05.2011	Пулмология	Храчка	S	4.62	66.62	98.17	<u>820</u>
SM49	3603-13	29.03.2013	Урология	Ранев секрет	S	4.92	65.80	97.26	172
SM62	9852-13	24.09.2013	КОТ	Ранев секрет	S	4.47	65.93	92.30	<u>826</u>
SM64	10244-13	07.10.2013	КЧПХТ	Ранев секрет	S	4.68	66.50	98.70	27
SM79	1932-14	17.02.2014	Гастроентерология	Гастроскоп	S	4.99	65.83	98.22	<u>820</u>
SM105	11186-14	17.10.2014	КЧПХТ	Дрен	S	4.50	66.71	98.33	139
SM130	10511-15	19.10.2015	КАИЛ	ТБА	R	4.47	66.67	97.50	119
SM135	11111-15	30.10.2015	Пулмология	БАЛ	S	4.53	66.57	98.10	172
SM148	3690-16	31.03.2016	КАИЛ	ТБА	R	4.38	66.78	92.58	<u>819</u>

WGS, целогеномно секвениране; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; ANI, средна нуклеотидна идентичност (изчислена с ANI калкулатора на ezbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) спрямо генома на щам *S. maltophilia* K279a); КОТ, Клиника по ортопедия и травматология; КЧПХТ, Клиника по чернодробно-панкреатична хирургия и трансплантология; КАИЛ, Клиника по анестезиология и интензивно лечение; ТБА, трахеобронхиален аспират; БАЛ, бронхоалвеоларен лаваж; S, чувствителен; R, резистентен; ST, секвенционен тип.

Забележка: Подчертаните секвенционни типове са идентифицирани за първи път в настоящото проучване. Техните геноми са депозираны в PubMLST database.

Идентифицираните AMR детерминанти в подложените на WGS изолати *S. maltophilia* са показани в Таблица 20. Всички геноми притежаваха типичните детерминанти, отговорни за вродената резистентност към β -лактами, в това число карбапенеми, аминогликозиди и tetracycline.

Таблица 20. Детерминанти на антимикуробна резистентност в изолатите *S. maltophilia*, подложени на целогеномно секвениране.

Изолат №	АМРД на вродена резистентност	Вродена резистентност към:	АМРД на придобита резистентност	Придобита резистентност към:
SM8	<i>bla_{L1}</i> , <i>bla_{L2}</i> <i>aph(3')-IIc</i> , <i>aac(6')-Iz</i> <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	β -лактами, вкл. карбапенеми Аминогликозиди Tetracycline		
SM49	<i>bla_{L1}</i> , <i>bla_{L2}</i> <i>aph(3')-IIc</i> , <i>aac(6')-Iz</i> <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	β -лактами, вкл. карбапенеми Аминогликозиди Tetracycline		
SM62	<i>bla_{L1}</i> , <i>bla_{L2}</i> <i>aph(3')-IIc</i> <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	β -лактами, вкл. карбапенеми Аминогликозиди Tetracycline		
SM64	<i>bla_{L1}</i> , <i>bla_{L2}</i> <i>aph(3')-IIc</i> <i>tetA</i>	β -лактами, вкл. карбапенеми Аминогликозиди Tetracycline		
SM79	<i>bla_{L1}</i> , <i>bla_{L2}</i> <i>aph(3')-IIc</i> , <i>aac(6')-Iz</i> <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	β -лактами, вкл. карбапенеми Аминогликозиди Tetracycline	<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i>	Аминогликозиди
SM105	<i>bla_{L1}</i> , <i>bla_{L2}</i> <i>aph(3')-IIc</i> , <i>aac(6')-Iz</i> <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	β -лактами, вкл. карбапенеми Аминогликозиди Tetracycline		
SM130	<i>bla_{L1}</i> , <i>bla_{L2}</i> <i>aph(3')-IIc</i> , <i>aac(6')-Iz</i> <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	β -лактами, вкл. карбапенеми Аминогликозиди Tetracycline	<i>sulI</i> ^a <i>bla_{OXA-74}</i> ^b <i>aac(6')-Ib-cr5</i> ^b <i>cmlA7</i> ^b <i>Smqnr11</i>	Сулфонамиди Цефалоспорини и карбапенеми Флуорохинолони и аминогликозиди Chloramphenicol Хинолони
SM135	<i>bla_{L1}</i> , <i>bla_{L2}</i> <i>aph(3')-IIc</i> , <i>aac(6')-Iz</i> <i>tetA</i>	β -лактами, вкл. карбапенеми Аминогликозиди Tetracycline		
SM148	<i>bla_{L1}</i> , <i>bla_{L2}</i> <i>aph(3')-IIc</i> <i>tetA</i> , <i>tetB</i>	β -лактами, вкл. карбапенеми Аминогликозиди Tetracycline	<i>sulI</i> ^a <i>qnrE1</i> ^c	Сулфонамиди Хинолони

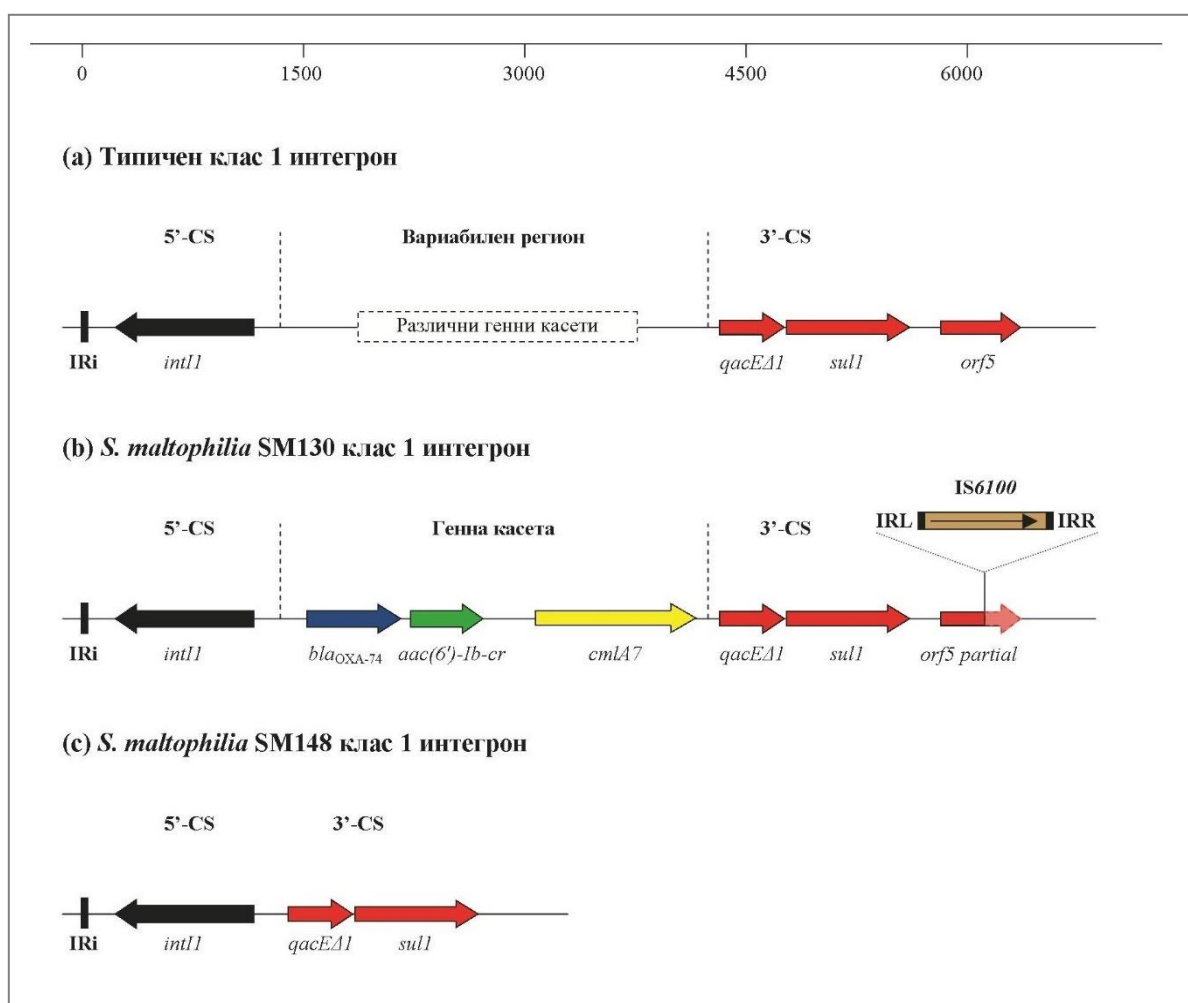
АМРД, детерминанти на антимикуробна резистентност.

^a част от 3' консервативния край на интегрон от клас 1; ^b част от генна касета (вариабилен регион) на клас 1 интегрон; ^c частична секвенция (60% покритие).

SXT-резистентните изолати (SM130 и SM148) бяха носители на интегрони от клас 1, съдържащи *sulI* ген в 3' консервативните си краища.

Идентифицираните AMR детерминанти в SM130 и SM148 съответстваха на техните профили на антибиотична резистентност (SM130 беше определен като изолат с XDR, включваща SXT, LVX, CAZ и CHL, а SM148 демонстрира резистентност към SXT и LVX).

Структурата на идентифицираните в изолатите *S. maltophilia* SM130 и SM148 интегрони от клас 1 е представена на **Фигура 22**. Интегронът на SM130 съдържа генна касета в своя вариabilен участък, докато в SM148 беше открит „празен“ интегрон без генна касета, чиято дължина е само 2.6 kb.



Фигура 22. Структура на интегроните от клас 1, идентифицирани в *S. maltophilia* SM130 и SM148: (a) Типичен интегрон от клас 1; (b) Интегрон на SM130 (7-kb); (c) Интегрон на SM148 (2.6-kb).

CS – консервативен сегмент; Гени: *intI1* – интеграза клас 1, *qacEΔ1* – SMR транспортер за четвъртични амониеви съединения, *sul1* – дихидроптероат синтаза тип-1, *orf5* – неизвестна функция, *bla_{OXA-74}* – OXA-74 клас D β-лактамаза от семейство OXA-10, *aac(6)-Ib-cr* – флуорохинолон-ацетилираща аминогликозид ацетилтрансфераза, *cmlA7* – хлорамфеникол ацетилтрансфераза.

Вариабилният регион на интегрона на SM130 носи тандемна генна касета, детерминираща полирезистентност към АМЛС. Нейната дължина е приблизително 3.2 kb и включва следните гени: *bla*_{OXA-74} (кодиращ OXA-74 β-лактамаза от семейство OXA-10, клас D), *aac(6')-Ib-cr* (флуорохинолон-ацетилираща аминокгликозид ацетилтрансфераза) и *cmlA7* (MFS ефлукс транспортер на chloramphenicol) – **Фигура 22**. BLAST търсенето в пълните и драфт бактериални геноми на *Stenotrophomonas* spp., налични в NCBI към момента на геномните изследвания и депозиране на SM130 (GenBank No: JABVAZ000000000), не откри идентични нуклеотидни последователности, което предполага идентифицирането на тази генна касета за първи път в света във вида *S. maltophilia*. Проведеното разширено търсене откри идентична касета във вариабилния регион на клас 1 интегрон, част от генома на изолат *P. aeruginosa* (EU161636.1 в GenBank, NCBI) от Будапеща, Унгария. В по-ранно проучване са охарактеризирани два PER-1-продуциращи изолата *P. aeruginosa*, носещи *bla*_{OXA-74}–*aac(6')-Ib-cr*–*cmlA7* гени. Те са изолирани от пациенти, лекувани в ICUs в Будапеща, в периода 2002–2005 г. (Libisch et al. 2008). Това откритие предполага междувидов трансфер на генната касета в нашия изолат *S. maltophilia* SM130 от *P. aeruginosa*.

Интегронът на *S. maltophilia* SM130 беше открит в края на контиг с приблизителен размер от 53 kb. Относително големият размер на контига, заедно с отсъствието на плазмид-свързани последователности в него, насочва към хромозомна локализация. В полза на това предположение е и направеното откритие, че първият идентифициран участък на границата с 3'-CS на интегрона е ген, подобен на *smlt3771* (локус с известна хромозомна локализация в генома на *S. maltophilia*, кодиращ предполагаем транмембранен протеин).

В сглобения геном на *S. maltophilia* SM130 посредством ABRicate (Galaxy Version 1.0.1) бяха открити и следните AMR детерминанти: *bla*_{L1}, *bla*_{L2}, *aac(6')-Iz*, *aph(3'')-IIC*, *tetA*, и *tetB* (вроден резистом); хромозомно-носени гени, кодиращи MDR ефлукс помпи – *smeABC*, *smeDEF*, *smeGH*, *smeIJK*, *smeMN*, *smeOP-tolCsm*, *smeVWX*, *smeYZ* (RND семейство); *smrA*, *macABCsm* (ABC семейство); *emrR-emrCABsm* (MFS семейство); *fuaR-fuaABC* (трикомпонентна ефлукс помпа за fusaric acid); и *Smqnr11* (хромозомен ген за резистентност към хинолони).

Главният механизъм на придобита резистентност към хинолони в *S. maltophilia* е свръхекспресията на ефлукс помпи с широка субстратна специфичност, най-вече на *SmeDEF*. Доказано е, че свръхекспресията на

smcVWX води до високо ниво на резистентност към хинолони (Chang et al. 2015; Brooke 2021). *Smqnr* детерминанти са доказани с висока честота сред клинични изолати *S. maltophilia* в Япония (57.5%), като доминиращ сред популацията е *Smqnr6*, следван от *Smqnr8* и *Smqnr11*, открит и в нашия изолат. Единственият плазмидно-медиран ген за резистентност към хинолони, идентифициран в цитираното проучване, е *aac(6)-Ib-cr* (5%) (Kanamoto et al. 2015).

3. Фактори на вирулентност на проучените НФГБ изолати

3.1. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху ключови фактори на вирулентност на изолатите *P. aeruginosa*

3.1.1. PCR скрининг и секвенционен анализ на гените за Т3SS ефекторни протеини

Всички нозокомиални изолати *P. aeruginosa* от настоящото проучване ($n = 254$) бяха изследвани чрез PCR за наличие на гени, кодиращи Т3SS ефекторните протеини (екзоензими/цитотоксини) *ExoS*, *ExoU*, *ExoT* и *ExoY*. Фокусът на молекулярно-генетичните проучвания падна върху тези секреторни фактори на вирулентност поради тяхната ключова роля в инфекциозната патогенеза и влияние върху заболяемост и продължителност на болничния престой, свързани с опортюнистичните *P. aeruginosa* инфекции (Yousefi-Avarvand et al. 2015; Javanmardi et al. 2019). От друга страна мониторингът върху разпространението на глобални високорискови клонове освен карбапенем-хидролизиращи ензими, отчита и продукцията на Т3SS ефекторни протеини (*ExoS*⁺ и *ExoU*⁺) като маркер за тяхната вирулентност (Oliver et al. 2024).

Установената обща честота на разпространение на *exo* гени сред изследваните клинични изолати *P. aeruginosa* беше както следва: *exoS* – 62.3%, *exoU* – 39%, *exoT* – 88.6%, и *exoY* – 78.7%. Два от доказаните чрез PCR гени (*exoS* и *exoU*) в избрани нозокомиални изолати *P. aeruginosa* ($n = 10$) бяха подложени на директно нуклеотидно секвениране по Sanger. Получените нуклеотидни последователности бяха сравнени с аналогични, депозирани в GenBank, NCBI. Резултатите показаха пълна идентичност с *exoU* от съответния оперон на еталонен щам с GenBank No U97065 и *exoS* на щам *P. aeruginosa* CCU6 (GenBank No AY029250).

Систематичен преглед и мета-анализ, включващи 58 проучвания от всички части на света в периода 2001–2018 г., показват голяма вариабилност в разпространението на генетични детерминанти за Т3SS ефекторни протеини сред нозокомиалните изолати *P. aeruginosa* (Javanmardi et al. 2019). Според

авторите честотата на *exoS* и *exoU* варира съответно в диапазона 58%–72% и 24%–42%, където попадат и установените от нас (62.3% и 39%, съответно за *exoS* и *exoU*). По отношение на широкоразпространените гени за ExoT (бифункционален ензим с GAP и ADP рибозилтрансферазна активност) и ExoY (аденилат циклаза) са отчетени големи разлики между проучванията. Така например разпространението на *exoT* варира от едва 5% сред клинични изолати от хоспитализирани пациенти в Иран (2013–2014) (Azimi et al. 2016) до 99–100%, докладвани в САЩ, Австралия и Испания (Feltman et al. 2001; Bradbury et al. 2010; Sánchez-Diener et al. 2017). Най-ниска честота на *exoY* също е установена в Иран (22.5%) (Fazeli and Momtaz 2014), а най-висока (100%) в Австралия (Bradbury et al. 2010). Отчетеното високо разпространение на *exoT* (88.6%) и *exoY* (78.7%) сред нашите нозокомиални изолати *P. aeruginosa*, получени от 2004 г. до 2023 г., е най-близко до докладваното от Ferreira et al. при проучване на клинични изолати от хоспитализирани ICU пациенти с бактериемия и VAP – 87.5% (*exoT*) и 81.2% (*exoY*) (Ferreira et al. 2015). Идентичен с нашия резултат за *exoT* (88.5%) е получен и при изследване на *P. aeruginosa* изолати от деца с уроинфекции в Полша през 2015 г. (Pobiega et al. 2016).

В Таблица 21. са обобщени всички генни профили на T3SS ефекторни протеини, открити в проучените 254 изолата *P. aeruginosa*. Най-голям беше процентният дял на изолатите, които притежаваха комбинацията *exoS* + *exoT* + *exoY* (41.3%). В 17.3% от тях присъстваха *exoU* + *exoT* + *exoY*. Генният *exo* профил на 63.4% от изследваните изолати беше представен от 3 кодирщи гена за секреторни цитотоксини. Най-малък беше процентният дял (7.1%) на изолатите, които бяха PCR-положителни за всички екзоензими. Частта на изолатите *P. aeruginosa*, които носеха само *exoS* (50.3%) или само *exoU* (26.8%), беше значимо по-голяма ($p < 0.0001$) от *exoS*⁺/*exoU*⁺-положителните изолати (12.2%).

Авторите на редица проучвания установяват, че *exoS* и *exoU* почти винаги се изключват взаимно, така че в генома на щамовете *P. aeruginosa* се открива или единият, или другият ген (Feltman et al. 2001; Hauser 2009; Bradbury et al. 2010; Juan et al. 2017a; Oliver et al. 2024), което може да се свърже с вероятност да осигуряват повишена пригодност в различни екологични ниши (Rutherford et al. 2018). В контраст на тези резултати има и доклади за едновременно наличие на *exoS* и *exoU* в значителен брой клинични изолати *P. aeruginosa* (Finnan et al. 2004; Morales-Espinosa et al. 2017; Mohamad et al. 2017; Horna et al. 2019a; Song et al. 2023; Akrami et al. 2024).

Таблица 21. Разпределение на *exo* генни профили сред проучените клинични изолати *P. aeruginosa* ($n = 254$).

Генен профил	Брой (%) изолати	Брой <i>exo</i> гени	Брой (%) изолати
<i>exoS</i> ⁺ / <i>exoU</i> ⁻ / <i>exoT</i> ⁺ / <i>exoY</i> ⁺	105 (41.3)	3	161 (63.4)
<i>exoS</i> ⁻ / <i>exoU</i> ⁺ / <i>exoT</i> ⁺ / <i>exoY</i> ⁺	44 (17.3)	2	53 (20.9)
<i>exoS</i> ⁻ / <i>exoU</i> ⁻ / <i>exoT</i> ⁺ / <i>exoY</i> ⁺	20 (7.9)	1	22 (8.7)
<i>exoS</i> ⁺ / <i>exoU</i> ⁺ / <i>exoT</i> ⁺ / <i>exoY</i> ⁺	18 (7.1)	4	18 (7.1)
<i>exoS</i> ⁺ / <i>exoU</i> ⁻ / <i>exoT</i> ⁺ / <i>exoY</i> ⁻	15 (5.9)		
<i>exoS</i> ⁻ / <i>exoU</i> ⁺ / <i>exoT</i> ⁺ / <i>exoY</i> ⁻	10 (3.9)		
<i>exoS</i> ⁺ / <i>exoU</i> ⁻ / <i>exoT</i> ⁻ / <i>exoY</i> ⁻	8 (3.1)		
<i>exoS</i> ⁺ / <i>exoU</i> ⁺ / <i>exoT</i> ⁺ / <i>exoY</i> ⁻	7 (2.8)		
<i>exoS</i> ⁻ / <i>exoU</i> ⁺ / <i>exoT</i> ⁻ / <i>exoY</i> ⁺	7 (2.8)		
<i>exoS</i> ⁻ / <i>exoU</i> ⁺ / <i>exoT</i> ⁻ / <i>exoY</i> ⁻	7 (2.8)		
<i>exoS</i> ⁻ / <i>exoU</i> ⁻ / <i>exoT</i> ⁺ / <i>exoY</i> ⁻	6 (2.4)		
<i>exoS</i> ⁺ / <i>exoU</i> ⁺ / <i>exoT</i> ⁻ / <i>exoY</i> ⁺	5 (2)		
<i>exoS</i> ⁺ / <i>exoU</i> ⁺ / <i>exoT</i> ⁻ / <i>exoY</i> ⁻	1 (0.4)		
<i>exoS</i> ⁻ / <i>exoU</i> ⁻ / <i>exoT</i> ⁻ / <i>exoY</i> ⁺	1 (0.4)		

Резултатите от сравнителното проучване за разпространение на гените, кодиращи T3SS ефекторни протеини сред нозокомиалните изолати *P. aeruginosa* от инфекции с различна локализация, са представени в **Таблица 22**. Честотата на *exoS* варира от 58.6% при изолатите от долни дихателни пътища (ДДП) до 85.7% при изолатите от кръв, но установените разлики не са статистически значими. Разпространението на *exoU* е най-голямо сред изолатите от раневи секрети (55%) и ДДП (44.8%), и значимо по-високо в сравнение с изолатите от урина (29.4%, $p < 0.05 - 0.001$). Генът *exoY* е открит във всички изолати от кръв, което е значимо по-висока стойност ($p < 0.05$) от дисеминацията му сред изолати *P. aeruginosa* от ДДП и раневи секрети (70%).

Проучванията през последните 20 години представят вариабилно разпространение на генетичните детерминанти за T3SS цитотоксини сред изолатите от различни клинични източници. Продукцията на най-токсичния от тях, *ExoU*, се свързва с тежки *P. aeruginosa* инфекции (Juan et al. 2017a; Foulkes et al. 2019). Неговата секреция е маркер за висока вирулентност на щамовете, изолирани от пациенти с болнично придобита пневмония (HAP) (Schulert et al. 2003).

Таблица 22. Честота на разпространение на гените, кодиращи тип III ефторни протеини, според произхода на проучените нозокомиални изолати *P. aeruginosa*.

Гени	Брой (%) положителни изолати								
	ДДП (n=87)	Урина (n=85)	Ранев секрет (n=40)	ГДП (n=18)	Кръв (n=14)	Медицински у-ва (n=6)	Жлъчка (n=3)	Фецес (n=1)	Общо (n=254)
<i>exoS</i>	51 (58.6)	51 (60)	24 (60)	13 (72.2)	12 (85.7)	4 (66.7)	3 (100)	1 (100)	159 (62.3)
<i>exoU</i>	39 (44.8)	25 (29.4)	22 (55)	6 (33.3)	3 (21.4)	4 (66.7)	0 (0)	0 (0)	99 (39)
<i>exoT</i>	75 (86.2)	76 (89.4)	34 (85)	18 (100)	13 (92.9)	5 (83.3)	3 (100)	1 (100)	225 (88.6)
<i>exoY</i>	61 (70.1)	71 (83.5)	28 (70)	17 (94.4)	14 (100)	5 (83.3)	3 (100)	1 (100)	200 (78.7)

ДДП, долни дихателни пътища; ГДП, горни дихателни пътища.

3.1.2. Вируломен анализ, базиран на WGS

С цел характеризиране на патогенния потенциал на CRPA изолати, подложени на WGS, беше извършен вируломен анализ с помощта на инструмента VFanalyzer. Така например, при първите геномно охарактеризирани *bla*_{VEB-9}-положителни XDR-PA изолати в България, Paе51 и Paе52, бяха открити голям брой генни детерминанти, групирани в **10 класа**, в т.ч. за фактори на вирулентност, свързани с *адхезия и подвижност* (флагели, биосинтез на тип IV пили (Т4Р) и протеини, свързани с функционирането на Т4Р); *антимикробна активност* (биосинтез на феназини); *антифагоцитно действие* (биосинтез на алгинат и регулиране на алгинатната продукция); *биосърфактант* (биосинтез на рамнолипид); *екстрацелуларни ензими* (фосфолипази и протеази); *усвояване на желязо* (пиохелин и пиовердин); *кворум сенсинг* (QS); *регулиране на двукомпонентната система GacS/GacA; системи за секреция* (секреторна система тип VI, секреторна система тип III и T3SS ефекторни протеини) и *токсини* (екзотоксин А и циановодород) (**Фигура 23**). Групирането на гените, свързани с вирулентността, беше осъществено посредством Virulence Factor Database (VFDB) (Liu et al. 2022a), а структурата на опероните е определена в съответствие с базата данни Pseudomonas Genome DB (<https://www.pseudomonas.com>).

В геномите на *P. aeruginosa* Paе51 и Paе52 (ST357) беше установена липса на някои детерминанти на вирулентност в сравнение с референтния щам *P. aeruginosa* PAO1, в т.ч. свързани с Т4Р (*fimT*, *fimU*, *pilA*, *pilC*, *pilV*, *pilW* и *pilY2*) и биосинтез на феназини (*phzA2*, *phzB2*, *phzC2*, *phzD2*, *phzE1*, *phzE2*, *phzF1*, *phzF2* и *phzG1*). Единствената разлика между двата вирулома е наличието на *pilE* в генома на първия изолат, както е показано на **Фигура 23**. Геномите на Paе51 и Paе52 съдържат гени, кодиращи Т3SS ефекторните протеини ExoU, ExoT и ExoY. Бяха открити и много Т3SS гени, което свидетелства за функционален механизъм на секреция.

В съответствие с предишни проучвания, показващи връзката на ST357 с генотипа *exoU*⁺/*exoS*⁻ (del Barrio-Tofiño et al. 2020; Oliver et al. 2024), нашият вируломен анализ показва, че Paе51 и Paе52 от високорисковия клон ST357 също притежават този специфичен генотип. Считаният за основен Т3SS цитотоксин ExoU, който има най-силно въздействие върху тежестта на инфекциите, е маркер за силно вирулентни щамове *P. aeruginosa*, получени от пациенти с НАР (Schulert et al. 2003), каквито са и изследваните в настоящото проучване изолати Paе51 и Paе52.



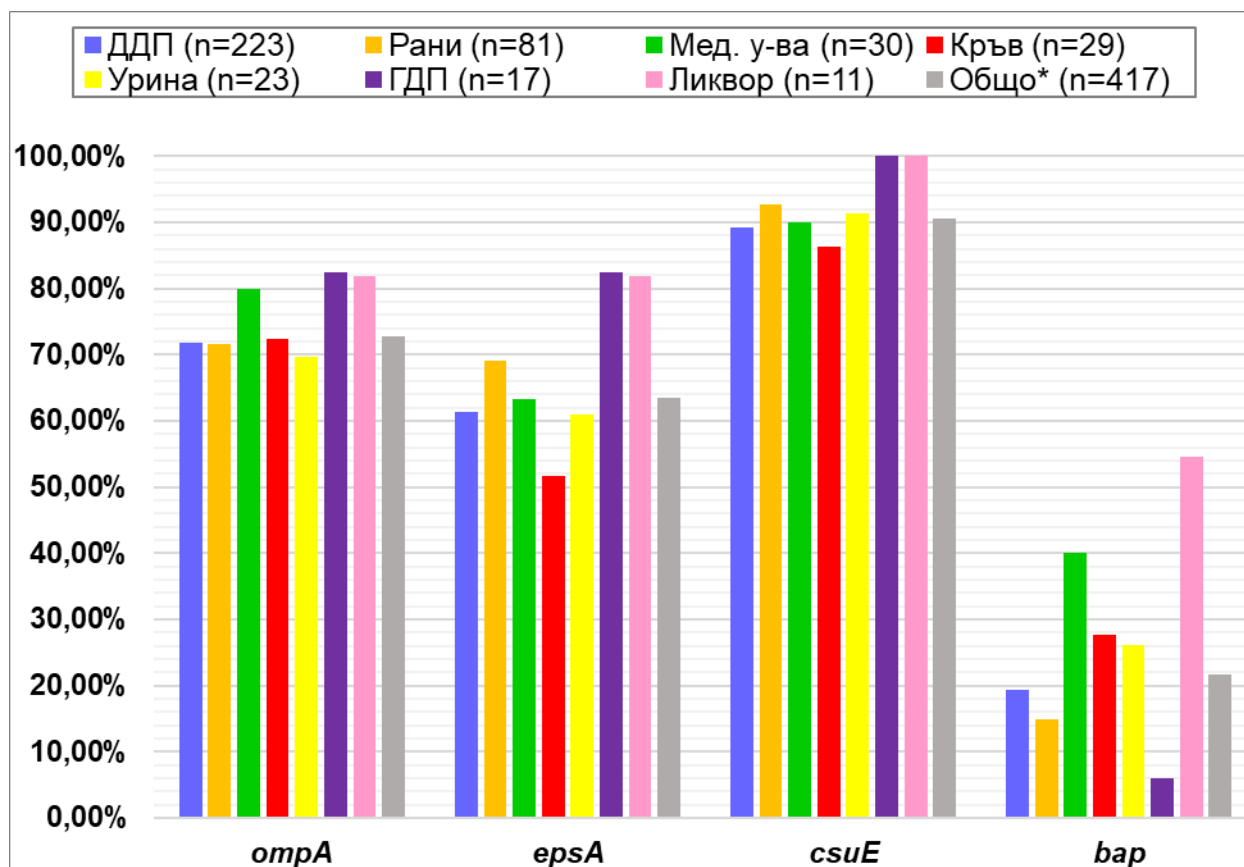
Фигура 23. Вируломен анализ на *bla*_{VEB-9}-положителните респираторни изолати *P. aeruginosa* Paе51 и Paе52, получени от критично болни пациенти на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София.

3.2. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху ключови фактори на вирулентност на изолатите *A. baumannii*

3.2.1. PCR скрининг за детерминанти на вирулентност с участие в образуването на биофилм

Общата честота на разпространение на *oprA*, *epsA*, *csuE* и *bar* сред проучените 417 нозокомиални изолата *A. baumannii* беше както следва: 72.7%, 63.5%, 90.6% и 21.6%. Беше открита статистически значима разлика ($p < 0.0001$) между относителните дялове на *bar*-положителни изолати *A. baumannii* от двата главни хронологични периода, съответно 63.8% в ранния период (2004–2011 г.) и едва 5.3% в по-късния (2014–2022 г.). Честотата на разпространение на генетичните детерминанти на вирулентност според

произхода на изолатите е представена на **Фигура 24**. Сравнителният анализ показва по-малка вариация при *ompA* и *csuE*, и широк диапазон при *epsA* (от 51.7% сред инвазивните изолати *A. baumannii* от кръв до 82.4% сред изолатите от ГДП) и *bar* (от 5.9% сред изолатите от ГДП до 54.5% сред тези от ликвор). Следва да се има предвид малкият брой изолати в някои от обособените групи, което определи и избора на метод за статистическа обработка (точен тест на Fisher). Единствено по отношение на *bar* бяха намерени статистически значими разлики. Честотата на този ген беше значимо по-висока ($p < 0.05-0.01$) сред изолатите *A. baumannii* от ликвор (54.5%) и медицински устройства (40%) в сравнение с разпространението му при изолати от ДДП (19.3%), рани (14.8%) и ГДП (5.9%).



Фигура 24. Сравнителна честота на разпространение на гени, кодиращи основни фактори на вирулентност сред проучените щамове *A. baumannii*, изолирани в периода 2004–2022 г. в шест университетски болници в България.

***Забележка:** В обособените групи не са включени 2 изолата *A. baumannii* от болнична среда и 1 изолат от очен секрет.

Сред идентифицираните OMPs OmpA е добре охарактеризиран фактор на вирулентност поради разнообразните му ключови роли в оцеляването и патогенезата на инфекциите, причинени от *A. baumannii*, включително поддържане на целостта на клетъчната мембрана, медиране на антимикубната лекарствена резистентност, модулиране на имунния отговор на гостоприемника, инициране на образуването на биофилм, инвазия в епителните клетки на макроорганизма и задействане на апоптозата на клетките на гостоприемника (Nie et al. 2020). Честотата на разпространение на *ompA* сред клиничните изолати *A. baumannii* варира в широк диапазон – от 77.1% до 100% (Ghasemi et al. 2018; Yang et al. 2019a; Zeighami et al. 2019; Da silva et al. 2021; Saadati et al. 2021; Park et al. 2023). Установената в настоящата работа честота на *ompA* (72.7%) беше най-близка до докладваната от Park et al. (77.1%) при проучване на молекулярните характеристики и профили на вирулентност на CRAB изолати от кръв, получени в периода 2015–2021 г. от пациенти с бактериемия в университетска болница в Корея (Park et al. 2023). В повечето доклади от последните години се съобщават по-високи нива на *ompA*-положителни *A. baumannii* изолати с проблемна антибиотична резистентност в сравнение с техния относителен дял в нашето изследване, при това бяха отчетени статистически значими разлики спрямо честотата на *ompA* сред нозокомиални изолати от Китай (89.4%, $p < 0.001$) (Shenkutie et al. 2020), Тайван (91.5%, $p < 0.0001$) (Yang et al. 2019a) и Иран (100%, $p < 0.0001$) (Ghasemi et al. 2018). Следва да се има предвид различният географски произход на изолатите (Азия и Латинска Америка), както и фактът, че проучванията включват щамове, събрани в по-кратки времеви интервали и от едно лечебно заведение. От друга страна броят на изследваните терапевтично проблемни *A. baumannii* ($n = 417$) в настоящия труд е неколkokратно по-голям, изолирани са в продължение на 19 години (2004–2022) от няколко университетски болници в страната, което предполага по-хетерогенна популация от щамове.

Процентният дял на *epsA*-положителните нозокомиални MDR-AB изолати в настоящото проучване (общо 63.5%) е значимо по-висок ($p < 0.0001$) от докладвания от Park et al. сред инвазивни CRAB от кръв в Корея (15.9%). Статистически значима е и разликата между честотата на тази генетична детерминанта сред нашите и корейските изолати от пациенти с бактериемия и сепсис (51.7% срещу 15.9%, $p < 0.0001$) (Park et al. 2023). По-ниско е разпространението на *epsA* и сред нозокомиални изолати *A. baumannii* от различни клинични източници ($n = 225$), събрани от три провинции в Тайланд в периода 2013–2014 г. (22.2% срещу 63.5%, $p < 0.0001$) (Thummeepak et al. 2016).

Генът *csuE* (субединица E на *Csu* пили от тип 1) се среща в 85%–100% от клиничните изолати *A. baumannii* (Sung 2018; Zeighami et al. 2019; Da Silva et al. 2021), което се потвърждава и от настоящото проучване (90.6%).

Авторите на различни кохортни проучвания докладват следната честота на *bar* гена: 9.6% в Китай (Shenkutie et al. 2020), 8.4%–89% в Иран (Azizi et al. 2016; Ghasemi et al. 2018; Zeighami et al. 2019; Saadati et al. 2021), 48% в Тайланд (Thummeepak et al. 2016), 79.2% в Тайван (Yang et al. 2019a), 75%–92.4% в Корея (Sung 2018; Park et al. 2023), 91.7% в Австралия (Sharon Goh et al. 2013), 100% в Бразилия и Полша (Da silva et al. 2021; Derka et al. 2023). В настоящото проучване общата честота на *bar* сред 417 нозокомиални MDR-AB изолата от шест университетски болници в България е 21.6%. Тази стойност е значимо по-висока ($p < 0.01$) от отчетената от Ghasemi et al. при изследване на 98 клинични изолата от университетска болница в Иран през 2014 г. (8.4%), както и спрямо докладваната от Shenkutie et al. при проведен скрининг на 104 нозокомиални изолата (клинични и болнична среда) *A. baumannii* от Хонг Конг, Китай (9.6%) (Ghasemi et al. 2018; Shenkutie et al. 2020). Спрямо останалите цитирани проучвания, осъществени в Азия, Австралия и Латинска Америка, разпространението на *bar* в българските нозокомиални MDR/XDR-AB изолати е значимо по-ниско ($p < 0.0001$).

3.2.2. Вируломен анализ, базиран на WGS

В **Таблица 23**. са представени всички детерминанти на вирулентност, идентифицирани в генома на първия за страната CFDC-резистентен изолат *A. baumannii* Aba52 от кръв, който притежава XDR профил на антимикробна лекарствена резистентност. Бяха открити много гени за фактори на вирулентност, участващи в адхезия, образуване на биофилм, производство на извънклетъчни ензими, избягване на имунната система на гостоприемника, усвояване на желязо, QS и двукомпонентни регулаторни системи. Разнообразието от идентифицирани гени и оперони предполага значителен патогенен потенциал на инвазивния изолат Aba52. Много от кодираните продукти участват пряко или непряко в придобиването и използването на Fe в условията на намалени концентрации. От особен интерес са генетичните детерминанти, кодиращи TopV-свързани рецептори, като *bauA* и *pirA*. Те са основни участници в стратегията на „Троянския кон“ за усвояване на CFDC, като позволяват на високи дози от антибиотика да достигнат до мястото на действие (Karakonstantis et al. 2022).

Таблица 23. Гени / оперони за фактори на вирулентност, идентифицирани в генома на cefiderocol-резистентния изолат *A. baumannii* Aba52 от ST2.

Клас	Фактори на вирулентност	Идентифицирани гени / оперони
Адхезия	Външномембранен протеин	<i>ompA</i>
Биофилм формиране	AdeFGH ефлукс помпа / транспортен автоиндуктор	<i>adeFGH</i>
	Биофилм-асоцииран протеин ВарAb	<i>var</i>
	Csu пили	<i>csuABCDE</i>
	Полизахарид поли-N-ацетил-глюкозамин	<i>pgaABCD</i>
Ензими	Фосфолипаза C	<i>plc</i>
	Фосфолипаза D	<i>plcD</i>
Избягване на имунната система на гостоприемника	Капсула	18 предполагаеми капсуло-свързани генетични детерминанти
	Липополизахарид	<i>lpsB, lpxABCDLM</i>
Усвояване на желязо	Ацинетобактин	<i>barAB, basABCDFGHIJ, bauABCDEF, entE</i>
	Използване на хема	<i>hemO</i> и 9 предполагаеми генетични детерминанти, кодиращи LysR, FecR, TonB-хемин, енергиен преобразувател TonB и Tf-свързващ протеин B
Регулация	Quorum sensing	<i>abaIR</i>
	Двукомпонентна система	<i>bfmRS</i>
Серумна резистентност	Penicillin-свързващ протеин G	<i>pbpG</i>
Адаптация към стрес	Каталаза	<i>katA</i>

3.3. Фенотипни, молекулярно-генетични и геномни проучвания върху ключови фактори на вирулентност на изолатите *S. maltophilia*

3.3.1. PCR скрининг за детерминанти на вирулентност

Общата честота на търсените детерминанти на вирулентност сред проучените изолати *S. maltophilia* ($n = 221$) беше следната: *stmPr1* (голяма извънклетъчна протеаза StmPr1) 87.3%, *stmPr2* (малка извънклетъчна протеаза StmPr2) 99.1%, *Smlt3773* локус (външномембранна естераза) 98.2%, *plcN1* (нехемолитична, фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза C) 99.1% и *smf-1* (SMF тип 1 фимбрии) 96.4%. Разпределението на алелните варианти на *stmPr1* според произхода на изолатите е представено в **Таблица 24**.

Таблица 24. Генотипове на голямата извънклетъчна протеаза StmPr1 според произхода на изследваните изолати *S. maltophilia* ($n = 221$).

Произход (Брой)	<i>stmPr1</i> (868 bp) Брой (%)	<i>stmPr1</i> (1621 bp) Брой (%)	Комбиниран Брой (%)	Липсва ген Брой (%)
<i>Клинични материали</i>				
ДДП (120)	11 (9.2)	83 (69.2)	14 (11.7)	12 (10)
Рани (27)	5 (18.5)	15 (55.6)	2 (7.4)	5 (18.5)
ГДП (26)	1 (3.8)	9 (34.6)	14 (53.8)	2 (7.7)
Кръв (17)	1 (5.9)	7 (41.2)	7 (41.2)	2 (11.8)
Урина (11)	1 (9.1)	5 (45.5)	1 (9.1)	4 (36.4)
Смесени ^a (20)	0 (0)	16 (80)	1 (5)	3 (15)
<i>COVID-19 инфекция</i>				
COVID-19 (35)	1 (2.9)	9 (25.7)	25 (71.4)	0 (0)
Не-COVID-19 (186)	18 (9.7)	126 (67.7)	14 (7.5)	28 (15.1)
Общо (221)	19 (8.6)	135 (61.1)	39 (17.6)	28 (12.7)

ДДП, долни дихателни пътища; ГДП, горни дихателни пътища.

^a Изолати от: медицински устройства ($n = 9$), болнична среда ($n = 4$), фецес ($n = 3$), асцит ($n = 2$), жлъчка ($n = 1$) и ликвор ($n = 1$).

Дългият алелен вариант беше най-често откриваният (61.1%), следван от комбинираният 868-bp+1621-bp алелен вариант (17.6%) и *stmPr1*-отрицателният генотип (12.7%). Късият вариант беше доказан в малък брой изолати (8.6%). Алелният вариант 1621-bp значимо преобладаваше ($p < 0.001$) над всички останали *stmPr1* генотипове (868-bp вариант, комбиниран и липсващ ген) сред изолатите от ДДП и рани. Комбинираният алелен генотип

беше по-чест ($p < 0.001$ – 0.01) от късия и *stmPr1*-отрицателния генотип при изолати *S. maltophilia* от ГДП и кръв. Също така неговата честота (71.4%) беше по-висока ($p < 0.001$) спрямо всички други *stmPr1* генотипове сред COVID-19 групата, където дори не бяха открити *stmPr1*-отрицателни изолати.

Сред нашите нозокомиални изолати беше установена висока честота на разпространение (87.3% – 99.1%) на всички детерминанти на вирулентност. Тези данни са много близки до докладваните резултати от наскоро проведени проучвания при клинични изолати *S. maltophilia* от Европа и Южна Корея (Kim et al. 2019b; Fluit et al. 2022). От друга страна разпространението на протеазни гени (*stmPr1* 87.3% и *stmPr2* 99.1%) беше значимо по-високо от това сред нозокомиални изолати *S. maltophila* в Мексико (*stmPr1* 50%; $p < 0.001$) (Cruz-Córdova et al. 2020) и Египет (*stmPr2* 75%; $p < 0.05$) (ElBaradei and Yakout 2022). Доминиращата честота на дългия алелен вариант на *stmPr1*, докладвана в предходни проучвания (Nicoletti et al. 2011; ElBaradei and Yakout 2022), беше потвърдена и от нас. Установената в настоящото изследване честота на *plcNI* беше по-висока от определената сред изолати *S. maltophilia* от пациенти с респираторни инфекции и септикемия в Ирак (2016–2020 г.) – 99.1% срещу 84%; $p < 0.001$ (Saleh et al. 2021). Сходни резултати бяха отчетени и за *smf-1* гена сред нашите изолати (96.4%), спрямо неговото разпространение сред по-стари клинични изолати от Бразилия (23%; $p < 0.001$) (Gallo et al. 2016).

3.3.2. Фенотипни характеристики на вирулентност

Разпределението на продуциращите извънклетъчни ензими изолати *S. maltophilia* от различни източници е показано в **Таблица 25**.

Таблица 25. Ензимна активност на проучените изолати *S. maltophilia* от различни източници.

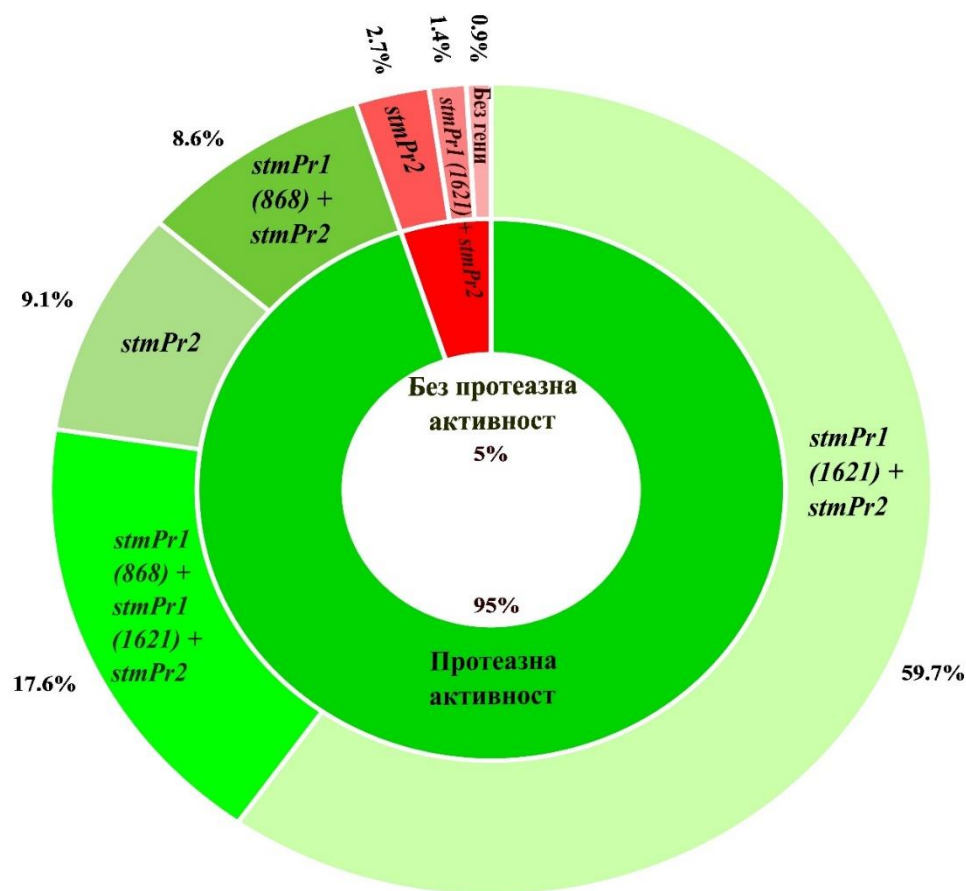
Ензимна активност	Брой (%) положителни изолати						
	ДДП ($n = 120$)	Рани ($n = 27$)	ГДП ($n = 26$)	Кръв ($n = 17$)	Урина ($n = 11$)	Смесени ^a ($n = 20$)	Общо ($n = 221$)
Протеаза	117 (97.5)	25 (92.6)	25 (96.2)	16 (94.1)	8 (72.7)	19 (95)	210 (95.1)
Естераза	120 (100)	27 (100)	26 (100)	17 (100)	10 (90.9)	19 (95)	219 (99.1)
Лецитиназа	22 (18.3)	6 (22.2)	5 (19.2)	3 (17.6)	0	2 (10)	38 (17.2)

ДДП, долни дихателни пътища; ГДП, горни дихателни пътища.

^a Изолати от: медицински устройства ($n = 9$), болнична среда ($n = 4$), фецес ($n = 3$), асцит ($n = 2$), жлъчка ($n = 1$) и ликвор ($n = 1$).

3.3.3. Връзка между генотипове на вирулентност и кореспондираща ензимна активност

Връзката между протеазния (*StmPr1* и *StmPr2*) генотип и демонстрираната от изолатите протеазна активност е илюстрирана на **Фигура 25**. Най-честият генотип сред изолатите *S. maltophilia* с протеазна активност (общо 95%) беше “*stmPr1* (1621-bp) + *stmPr2*”, представляващ 59.7% от всички тествани изолати. Генотип “*stmPr1* (868-bp) + *stmPr1* (1621-bp) + *stmPr2*” беше доказан в 39 от протеаза-продуциращите изолати (17.6%). Доминиращият брой от непродуцентите на ензима (6 от 11 изолата) притежаваха само *stmPr2*.



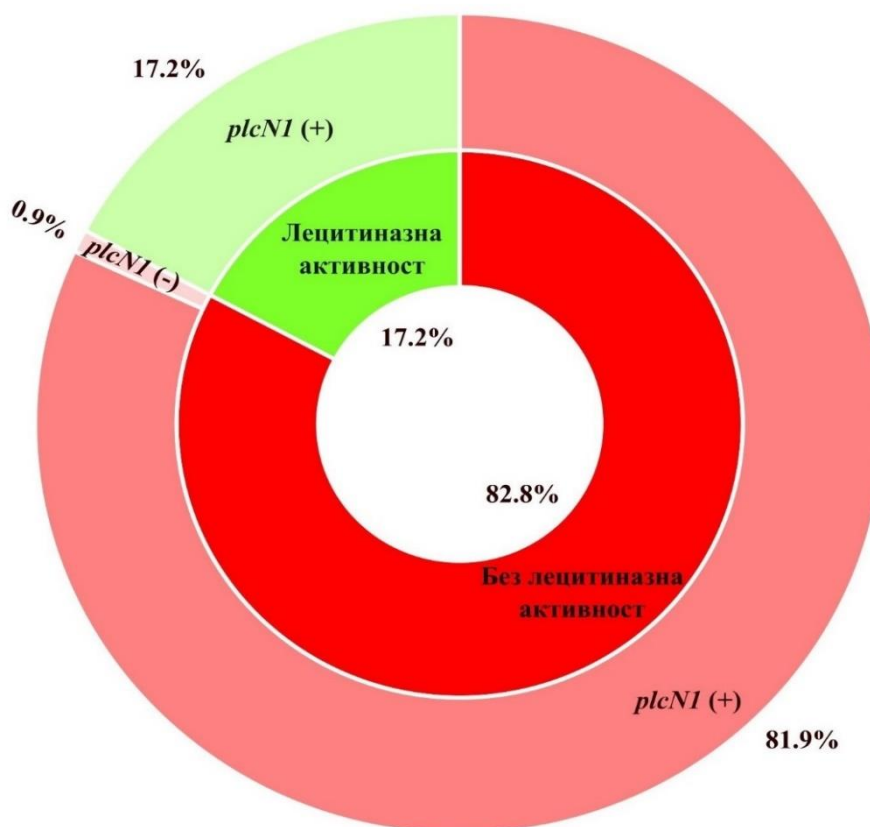
Фигура 25. Връзка между *StmPr1/2* генотипове и протеазна активност в 221 нозокомиални изолата *S. maltophilia*.

Генът *stmPr2* беше открит в почти всички наши тествани изолати (219 от 221), независимо от извънклетъчната продукция на протеаза. Контрастно на това, *stmPr1* алелите бяха доказани предимно в изолати с ензимна активност (90.5%), сравнени с изолатите без такава активност (27.3%). Тези резултати са в потвърждение на ролята на *StmPr1* като главна извънклетъчна протеаза, което е описано по-рано в модел за токсичност в ларви на *G. mellonella* (Nicoletti et

al. 2011). Следва да се отбележи обаче, че 3 от нашите изолати *S. maltophilia*, при които не беше доказана протеазна активност, са *stmPr1* (1621-bp)-положителни. Като възможно обяснение може да се посочи наличието на инактивиращи мутации с изместване на рамката на четене в този ген, описано по-рано от Nicoletti et al. (Nicoletti et al. 2011).

Пълно съответствие между генотип и фенотип беше установено при естеразата: Smlt3773 локус (+) / ензимна активност (+) (98.2% от изолатите) и Smlt3773 локус (-) / липсваща ензимна активност (1.8%).

Всички изолати *S. maltophilia*, които демонстрираха лецитиназна активност (17.2%) бяха *plcNI*-положителни. Също така почти всички изолати без лецитиназна активност притежаваха гена (Фигура 26).



Фигура 26. Връзка между *plcNI* генотип и лецитиназна активност в 221 нозокомиални изолати *S. maltophilia*.

Независимо от наличните данни относно разпространението на нозокомиални изолати *S. maltophilia*, демонстриращи лецитиназна активност, с различен произход и географски локации, твърде малко е известно за генетичната основа на тази фенотипна характеристика, свързана с вирулентността на *S. maltophilia*. За получаване на някои нови прозрения, беше

извършено генотипизирането на нашите изолати по *plcNI*. Генът кодира нехемолитична фосфолипаза С, която хидролизира основния компонент на яйчния лецитин, и така го превръща в силен кандидат за търсене на евентуална връзка с продукцията на лецитиназа от изолатите. Резултатите от настоящото проучване показват, че 99.1% от изолатите са *plcNI*-положителни, което предполага, че този ген е повсеместно разпространен и не корелира с фенотипната експресия на лецитиназната активност.

3.3.4. Геномни характеристики на вирулентност

Геномите на деветте избрани за WGS нозокомиални изолати *S. maltophilia* (Таблица 19.) бяха изследвани за наличие на точкови мутации, засягащи проучените гени на вирулентност. Идентифицираните АК замени бяха разделени на консервативни и неконсервативни мутации. Броят им е представен в Таблица 26. Най-ниска вариация беше открита в *smf-1* гена, кодиращ тип 1 фимбрии. Противоположно на тази находка, късият 868-bp алелен вариант на *stmPr1* показва най-висока вариабилност. Изолатите образуваха две групи на базата на *stmPr1* гена. Пет от тях (SM49, SM64, SM79, SM105 и SM130) притежаваха единствено дългия алел (1621-bp). Те демонстрираха по-висока биофилм-формираща способност (OD₅₅₀: 1.253–1.789) и малък брой мутации в протеазните гени и *smf-1*. Три други изолати (SM8, SM62 и SM148) имаха единствено късия алелен вариант (868-bp), показаха по-слаба продукция на биофилм (OD₅₅₀: 0.788–1.108), както и по-голям брой мутации в *stmPr1*, *stmPr2* и *smf-1*. Единственият умерен продуцент на биофилм в настоящото проучване (SM135, OD₅₅₀=0.177) не притежаваше *stmPr1* алели. Мутациите в *Smlt3773* и *plcNI* бяха равномерно разпределени между групите изолати. Както е видно от Таблица 26., всички изолати *S. maltophilia*, подложени на WGS, продуцират извънклетъчна протеаза независимо от наличния протеазен генотип. От друга страна, не беше намерена асоциация между вирулома и фенотипната експресия на естераза и лецитиназа.

Въпреки големия брой идентифицирани АК замени чрез WGS в настоящото изследване, не бяха установени “frameshift” мутации, както преждевременни стоп кодони в избраните гени на вирулентност. Това откритие подкрепя тяхната роля в патогенността на *S. maltophilia*.

Таблица 26. Аминокиселинни замени, открити в нуклеотидните последователности на гените на вирулентност, продукция на биофилм върху полистиренова повърхност и ензимна активност на избрани изолати *S. maltophilia*, подложени на целогеномно секвениране.

Изолат № (източник)	ST	<i>stmPr1</i> (868 bp) 617 АК	<i>stmPr1</i> (1621 bp) 630 АК	<i>stmPr2</i> 580 АК	Smlt3773 611 АК	<i>plcN1</i> 707 АК	<i>smf-1</i> 169 АК	Биофилм OD ₅₅₀ ±CO	Ензимна активност		
									Протеаза	Естераза	Лецитиназа
SM8 (храчка)	820	32 / 26 ^a	Без алел	1 / 0	0 / 0	0 / 1	3 / 1	1.108±0.143	+	+	-
SM49 (рана)	172	Без алел	3 / 0	0 / 1	1 / 0	11 / 16	0 / 4	1.253±0.191	+	+	-
SM62 (рана)	826	8 / 5	Без алел	16 / 10	15 / 32	18 / 24	2 / 2	0.788±0.098	+	+	+
SM64 (рана)	27	Без алел	0 / 0	0 / 0	0 / 2	4 / 5	0 / 0	1.576±0.150	+	+	-
SM79 (гастроскоп)	820	Без алел	2 / 0	1 / 0	0 / 0	0 / 1	0 / 0	1.391±0.116	+	+	-
SM105 (дрен)	139	Без алел	1 / 0	0 / 0	0 / 0	5 / 3	0 / 0	1.789±0.171	+	+	+
SM130 (ТБА)	119	Без алел	2 / 0	1 / 0	10 / 25	5 / 9	0 / 4	1.430±0.125	+	+	-
SM135 (БАЛ)	172	Без алел	Без алел	0 / 1	1 / 2	9 / 14	4 / 4	0.177±0.024	+	+	-
SM148 (ТБА)	819	28 / 25	Без алел	11 / 14	32 / 48	14 / 28	5 / 6	0.989±0.033	+	+	-

ST, секвенционен тип; АК, аминокиселина; OD₅₅₀, оптична плътност при λ=550 nm; CO, стандартно отклонение; ТБА, трахеобронхиален аспират; БАЛ, бронхоалвеоларен лаваж.

^a Брой консервативни АК замени (ляво) / неконсервативни АК замени (дясно), изчислени чрез BLASTP алгоритъм, спрямо еквивалентните секвенции на референтния щам *S. maltophilia* K279a.

Забележка: Количеството биофилм, образуван от изолатите върху абиотична повърхност, е определено чрез метода „Кристал виолет“. Резултатите са подробно описани в т. 4.2.2.

4. Образуване на биофилм от изследваните НФГБ изолати

4.1. Проучвания върху биофилм-формиращата способност на клинично значими изолати *A. baumannii*

Резултатите от скрининга за гени, кодиращи фактори на вирулентност с доказана роля в образуването на биофилм от клиничните изолати (*bar*, *otrA*, *epsA* и *csuE*), наричани по-долу биофилм-асоциирани гени (БАГ), бяха представени в т. 3.2.1.

При 89 изолата (88 клинични MDR-AB и референтния щам *A. baumannii* ATCC 19606) с различни БАГ генни профили беше изследвана способността за биофилм образуване върху полистиренова повърхност. Преобладаващата част от клиничните изолати (78 от 88) притежаваха *bar* ген, а останалите (10 от 88) бяха *bar*-отрицателни. Резултатите за всеки от тестваните щамове бяха съотнесени към отрицателна контрола със стойност на оптичната плътност $OD_{570} = 0.033 \pm 0.01$. Оценка на способността за образуване на биофилм беше извършена според въведените от Stepanović et al. критерии (Stepanović et al. 2007), които са широко прилагани за класифициране на биофилм-продуциращите изолати в следните категории: „силни продуценти“, „умерени продуценти“, „слаби продуценти“ и „непродуциращи биофилм“. Общо 84 от проучените 88 MDR-AB изолати (95.5%) демонстрираха биофилм-формираща способност, а количеството на биофилма варираше от 0.035 ± 0.01 до 1.77 ± 0.229 . Средната стойност (OD_{570}) беше 0.252 ± 0.045 . Силни продуценти бяха 72.7%, умерени – 18.2%, слаби – 4.5%, а непродуциращи биофилм – 4.5% (Таблица 27). Референтният щам *A. baumannii* ATCC 19606, в чийто геном не е идентифициран *bar*, образува силен биофилм (0.892 ± 0.025 , което е над 3.5 пъти повече от средната стойност за изследваната група от клинични изолати).

Таблица 27. Биофилм-формираща способност върху полистиренова повърхност на 88 нозокомиални MDR-AB изолата, измерена след 24 часа инкубация.

Брой (%) изолати	Биофилм	$OD_{570} \pm CO$ диапазон	Средна $OD_{570} \pm CO$
64 (72.7)	Силен	$0.134 \pm 0.013 - 1.77 \pm 0.229$	0.314 ± 0.054
16 (18.2)	Умерен	$0.088 \pm 0.018 - 0.132 \pm 0.015$	0.112 ± 0.028
4 (4.5)	Слаб	$0.035 \pm 0.01 - 0.066 \pm 0.009$	0.051 ± 0.01
4 (4.5)	Непродуциращи	$0.013 \pm 0.002 - 0.018 \pm 0.004$	0.016 ± 0.03

MDR-AB, *A. baumannii* с множествена лекарствена резистентност; OD_{570} , оптична плътност при $\lambda=570$ nm; CO, стандартно отклонение.

Въпреки използването на единен метод и критерии за интерпретация (Soto et al. 2006; Stepanović et al. 2007) се отчита голяма вариабилност както в способността за прикрепен растеж в биофилм върху абиотични повърхности, така и в измерената биомаса при проучвания върху терапевтично проблемни изолати с различен географски произход. Например Ghasemi et al. при изследвания върху клинични изолати *A. baumannii*, събрани през 2014 г. в университетска болница в Техеран, Иран, откриват едва 7.1% способни да продуцират биофилм (Ghasemi et al. 2018), докато Saadati et al. установяват 84% нозокомиални MDR-AB, способни да образуват биофилм, сред кохорта от ирански щамове от по-късен период (2017–2018 г.) от Тебриз (Saadati et al. 2021). Авторите на трето проучване в Иран дори докладват абсолютна честота на биофилм-формиращи изолати *A. baumannii*, получени от имунокомпрометирани ICU пациенти с клинично проявени нозокомиални инфекции, от които силните и умерени продуценти са били съответно 58% и 42% (Zeighami et al. 2019). Демонстрираната биофилм-образуваща способност от 95.5% от нашите нозокомиални MDR-AB е сходна с отчетената в проучвания в Иран (98.7%) (Bardbari et al. 2017) и Тайван (93.5%) (Yang et al. 2019a), където най-висок е относителният дял на силните продуценти, съответно 58.7% и 45.4%.

Зависимостта между фенотипни и генотипни характеристики на образувания биофилм от изследваните MDR-AB изолати е представена в **Таблица 28**.

Таблица 28. Зависимост между генотип, брой биофилм-асоциирани гени и количество образуван биофилм от 88 нозокомиални изолата *A. baumannii* с множествена антибиотична резистентност.

Брой (%) изолати	БАГ генотип	Средна OD ₅₇₀ ± СО спрямо генотипа	Брой БАГ гени	Средна OD ₅₇₀ ± СО спрямо броя БАГ
42 (47.7)	<i>bar+/ompA+/epsA+/csuE+</i>	0.192 ± 0.042	4	0.192 ± 0.042
16 (18.2)	<i>bar+/ompA-/epsA+/csuE+</i>	0.184 ± 0.038	3	0.192 ± 0.036
8 (9.1)	<i>bar+/ompA+/epsA-/csuE+</i>	0.205 ± 0.043		
6 (6.8)	<i>bar+/ompA-/epsA-/csuE+</i>	0.320 ± 0.053	2	0.586 ± 0.084
6 (6.8)	<i>bar+/ompA-/epsA+/csuE-</i>	1.174 ± 0.158		
4 (4.5)	<i>bar-/ompA+/epsA-/csuE+</i>	0.108 ± 0.018		
6 (6.8)	<i>bar-/ompA-/epsA-/csuE-</i>	0.022 ± 0.005	0	0.022 ± 0.005

БАГ, биофилм-асоциирани гени; OD₅₇₀, оптична плътност, измерена при λ=570 nm; СО, стандартно отклонение.

Прави впечатление, че преобладаващата част от изолатите (47.7%) притежават четирите БАГ (*bar-ompA-epsA-csuE*), като групата включва силни и умерени продуценти на биофилм. Липсата на четирите БАГ (*bar, ompA, epsA* и *csuE*) в проучените от нас щамове се свързва с незначително количество до пълна липса на биофилм (средна $OD_{570}=0.022 \pm 0.005$). Не беше открита корелация между генотип, в това число брой БАГ, и количество на формирания биофилм върху абиотична повърхност при присъствие в генната комбинация на *bar* ($p = 0.2$). Всички *bar*-положителни изолати ($n = 78$) бяха продуценти на биофилм (62 силни и 16 умерени). При преобладаващата част от *bar*-отрицателните щамове (8 от 10) беше установена слаба или липсваща биофилм-формираща способност, с изключение на два силни продуцента, изолирани от централен венозен катетър (средна $OD_{570}=0.144 \pm 0.021$). От **Таблица 28.** е видно също, че по-големият брой БАГ не корелира с по-голяма биомаса на биофилма върху полистиренова повърхност, като дори средната OD_{570} при изолати само с два от общо четирите гена е най-висока (0.586 ± 0.084). Откриването на изолати, които при липса на два БАГ са способни да образуват силен биофилм, подчертава комплексния характер на този адаптивен механизъм. Както е известно, изследваните в настоящото проучване БАГ имат ключова роля в биофилм образуването, но генетичните механизми включват участие и на други детерминанти (напр. *pgaB, bfmS, csgA, ptk* и др.) (Urmanу et al. 2022).

4.2. Проучвания върху биофилм-формиращата способност на клинично значими изолати *S. maltophilia*

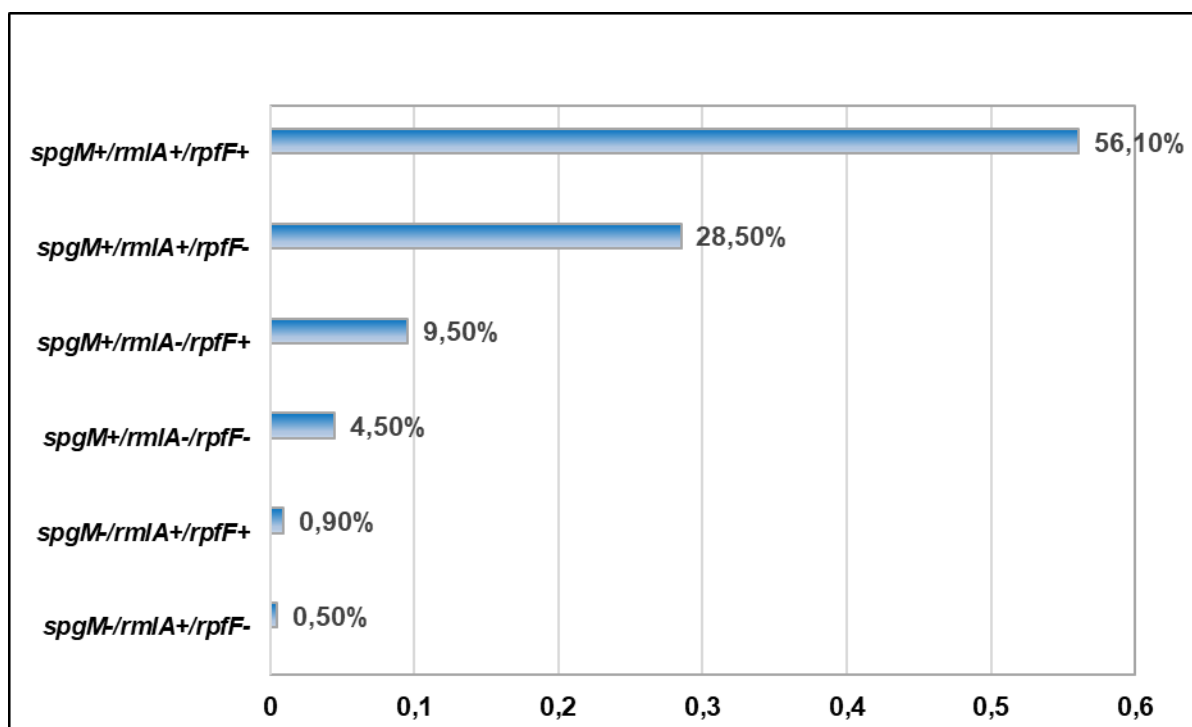
4.2.1. PCR скрининг за БАГ

Общата честота на *spgM, rmlA* и *rpfF* сред колекция, включваща 221 изолата *S. maltophilia* от пациенти с ИСМО ($n = 217$) и от болнична среда ($n = 4$) от периода 2011–2022 г., беше съответно: 98.6%, 86% и 66.5%.

Щамовете *S. maltophilia*, използвани в настоящото проучване, бяха групирани в две категории: „Клинични изолати от секрети и телесни течности“ и „Изолати от медицински устройства и болнична среда, намиращи се в контакт с абиотични повърхности“. Сравнителната честота на разпространение на *spgM, rmlA* и *rpfF* в двете групи беше както следва: 98.6 % спрямо 100 %, 86.5 % / 76.9 % и 66.3 % / 69.2 %. Не бяха установени статистически значими разлики между тях.

В изследваните нозокомиални изолати *S. maltophilia* ($n = 221$) бяха установени 6 БАГ генотипа (различни комбинации от *spgM*, *rmlA* и *rpfF* гени) с честота на разпространение от 0.5% до 56.1%. (**Фигура 27**). Преобладаващият генотип беше *spgM⁺/rmlA⁺/rpfF⁺* (56.1%), а най-редкият генотип, открит само в 1 изолат от ДДП, беше *spgM⁻/rmlA⁺/rpfF⁻* (0.5%).

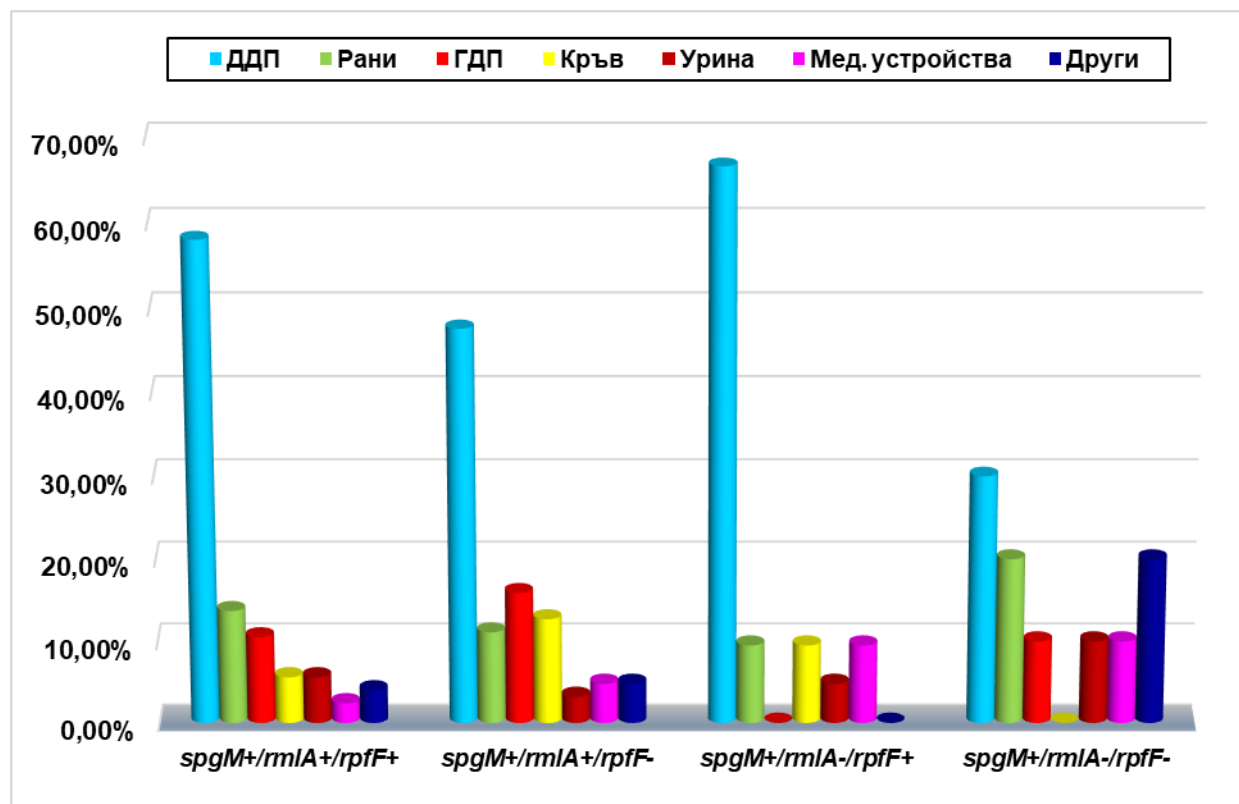
Генотипът *spgM⁺/rmlA⁺/rpfF⁺* е най-често съобщаваният и от други автори, а установената от нас честота е по-висока от честотата, установена за генотипа сред изолати *S. maltophilia* от пациенти с МВ в Италия (56.1% срещу 34.8%, $p < 0.001$) (Pompilio et al. 2011) и по-ниска от тази при клинични щамове от университетски болници в Иран, от периода 2016–2017 г. (68.7%, $p < 0.05$) (Azimi et al. 2020). Вторият по честота профил сред нашите изолати беше с липсващ *rpfF* (28.5%) и честотата му е много близка до посочената от Pompilio et al. (21.3%) сред изследваните изолати *S. maltophilia* от клинични материали и околна среда от Италия (Pompilio et al. 2011). Само един от включените в настоящото проучване клинични изолати демонстрира генен профил *spgM⁻/rmlA⁺/rpfF⁻* и нито един *spgM⁻/rmlA⁻/rpfF⁻*, което е докладвано по-рано и от други автори (Azimi et al. 2020).



Фигура 27. Процентно разпределение на генните профили от биофилм-асоциирани гени сред проучените изолати *S. maltophilia* ($n = 221$).

На **Фигура 28.** е показано разпределението на изследваните изолати *S. maltophilia* с различни БАГ профили според техния произход. Изолатите от ДДП демонстрираха превъзходство над изолатите от други източници в

групата с най-честия БАГ профил $spgM^+/rmlA^+/rpfF^+$ ($p < 0.001$). Разпределението в групите с два БАГ, $spgM^+/rmlA^+/rpfF^-$ и $spgM^+/rmlA^-/rpfF^+$ генотипове, разкри същите статистически значими стойности. Беше установено, че сходен процент изолати от ДДП (30%) и рани (20%), в сравнение с другите клинични материали, имат генен профил $spgM^+/rmlA^-/rpfF^-$.



Фигура 28. Разпределение на изолатите *S. maltophilia* от различни генотипове според техния произход. Генотиповете $spgM^-/rmlA^+/rpfF^+$ и $spgM^-/rmlA^+/rpfF^-$ са изключени, тъй като се състоят от единични изолати, съответно 2 от ГДП и 1 от ДДП.

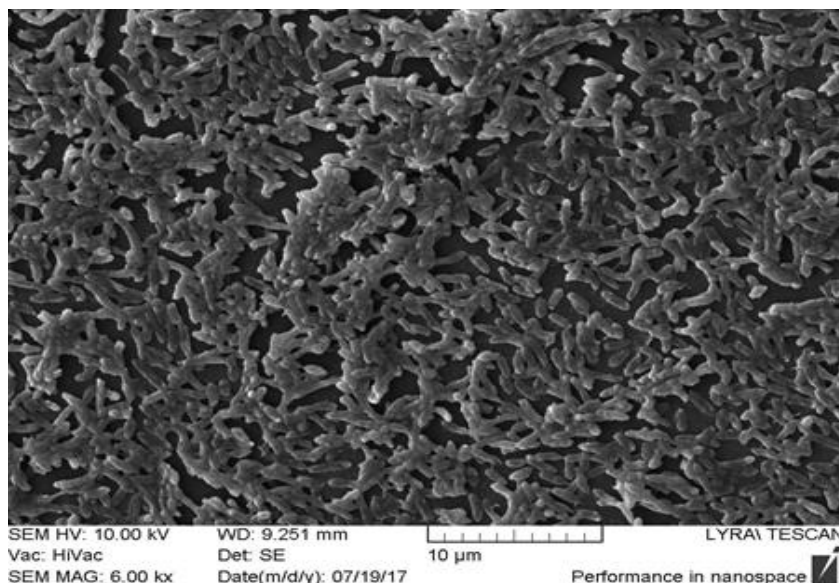
ДДП, долни дихателни пътища; ГДП, горни дихателни пътища.

4.2.2. Способност за образуване на биофилм и връзка между генотипните и фенотипните характеристики на биофилма

Измереното количество на образуван биофилм от изследваните 92 нозокомиални щамове *S. maltophilia*, изразено като стойност на оптична плътност при $\lambda=550$ nm (средна $OD_{550} \pm CO$), варираше в широк диапазон (от 0.177 ± 0.024 до 2.065 ± 0.023). Усреднената стойност за цялата колекция беше $OD_{550}=1.313 \pm 0.090$. Всички тествани щамове с изключение на един от ДДП (умерен продуцент) бяха определени като силни продуценти на биофилм с

OD₅₅₀ над 0.344 (98.9%). Резултатите за всеки от тестваните щамове бяха съотнесени към отрицателна контрола със стойност на оптичната плътност OD₅₅₀ = 0.051 ± 0.008.

Образуваният 24-часов биофилм от избрани щамове *S. maltophilia* беше наблюдаван чрез СЕМ. Представената микрография при силния продуцент *S. maltophilia* SM72 (**Фигура 29.**) е типична за този фенотип (Zhuo et al. 2014; Wang et al. 2016) и показва включени в биофилм бактериални клетки, покриващи почти цялата полистиренова повърхност. Забелязват се специфични кълстери (микроколонии, типични за биофилма), които формират плътна мрежа.



Фигура 29. Сканираща електронна микроскопия, демонстрираща силен биофилм (OD₅₅₀=1.693 ± 0.170), формиран от щам *S. maltophilia* SM72, след 24-часова инкубация върху полистиренова повърхност.

Количеството биофилм, образувано от изолатите от различни източници, както и връзката му с наблюдаваните генотипове, са представени подробно в **Таблица 29.** Като цяло не се наблюдават значителни разлики в количеството на биофилма по отношение на източника на изолиране (почти еднакви средни стойности на OD₅₅₀ за биофилмите, образувани от изолати от ДДП, ГДП и рани). Инвазивните изолати от кръв показаха най-висока способност за образуване на биофилм (1.596 ± 0.077), докато тези от фецес, които обикновено се смятат за колонизиращи стомашно-чревния тракт, демонстрираха най-ниска способност за биофилм формиране (0.956 ± 0.034). Трябва да се вземе предвид малкият брой изолати от тези групи, съответно шест и три.

Таблица 29. Връзка между генотиповете и способността за образуване на биофилм при 92 избрани изолата *S. maltophilia* с различен произход.

Генотип	N	Средна OD ₅₅₀ ± CO	ДДП		Рани		ГДП		Кръв		Урина		Фецес		Мед. у-ва/БС	
			N	Средна OD ₅₅₀ ± CO	N	Средна OD ₅₅₀ ± CO	N	Средна OD ₅₅₀ ± CO	N	Средна OD ₅₅₀ ± CO	N	Средна OD ₅₅₀ ± CO	N	Средна OD ₅₅₀ ± CO	N	Средна OD ₅₅₀ ± CO
<i>spgM⁺/rmlA⁺/rpfF⁺</i>	50	1.278 ± 0.098	22	1.255 ± 0.116	11	1.340 ± 0.106	11	1.199 ± 0.028	2	1.630 ± 0.031	–	–	1	0.847 ± 0.031	3	1.42 ± 0.265
<i>spgM⁺/rmlA⁻/rpfF⁺</i> ^a	12	1.42 ± 0.136	8	1.385 ± 0.117	–	–	–	–	1	1.847 ± 0.160	1	1.303 ± 0.121	–	–	1	1.347 ± 0.195
<i>spgM⁺/rmlA⁺/rpfF⁻</i> ^b	27	1.377 ± 0.06	11	1.377 ± 0.075	1	1.276 ± 0.037	8	1.446 ± 0.050	3	1.489 ± 0.080	1	1.349 ± 0.039	1	1.058 ± 0.041	1	0.772 ± 0.024
<i>spgM⁺/rmlA⁻/rpfF⁻</i>	3	0.888 ± 0.031	–	–	–	–	1	1.356 ± 0.034	–	–	1	0.345 ± 0.029	1	0.962 ± 0.031	–	–
Общо	92	1.313 ± 0.090	41	1.313 ± 0.105	12	1.334 ± 0.100	20	1.305 ± 0.037	6	1.596 ± 0.077	3	0.999 ± 0.063	3	0.956 ± 0.034	5	1.276 ± 0.203

N, брой изолати; ДДП, долни дихателни пътища; ГДП, горни дихателни пътища; БС, болнична среда; OD₅₅₀, оптична плътност, измерена при λ=550 nm; CO, стандартно отклонение.

^a не е включен един изолат от асцит; ^b не е включен един изолат от ликвор.

Не бяха установени статистически значими разлики в средното количество на образувания биофилм сред изолатите *S. maltophilia* с три ($spgM^+/rmlA^+/rpfF^+$) и два БАГ ($spgM^+/rmlA^-/rpfF^+$ и $spgM^+/rmlA^+/rpfF^-$), както показва изчисленият коефициент на корелация на Spearman (0.133; $p = 0.214$). Трите изследвани изолата с генотип $spgM^+/rmlA^-/rpfF^-$ се характеризираха с най-слаба способност за образуване на биофилм върху полистиренова повърхност (средна $OD_{550}=0.888 \pm 0.031$), но като се вземе предвид малкият брой проби, предположението, че съществува пряка връзка между броя на БАГ и количеството произведен биофилм, може да се смята за спекулативно.

В по-ранни проучвания е доказано, че едновременното присъствие на *spgM* и *rpfF* оказва значително влияние върху способността на шамовете да образуват биофилм, докато такава корелация не е установена при други генни комбинации ($spgM + rmlA$ и $rmlA + rpfF$) (Zhuo et al. 2014; Madi et al. 2016). Съобщава се също, че наличието и на трите гена подобрява способността за образуване на биофилм, но не влияе значително върху количеството му (Zhuo et al. 2014; Madi et al. 2016; Bostanghadiri et al. 2019).

Липсата на корелация между количеството биофилм, продуцирано от изолатите, и техния произход, която беше установена в настоящата работа, е открита и от Madi et al. при изследвана популация от сръбски *S. maltophilia*, включваща изолати от трите категории – слаби, умерени и силни продуценти на биофилм. Авторите съобщават, че всички силни продуценти са били респираторни изолати, с изключение на един от кръв (Madi et al. 2016).

4.2.3. Аминокиселинни замени, открити в БАГ на изолати *S. maltophilia*, подложени на WGS

Всички мутации, водещи до АК замени в кодиращите последователности на *spgM*, *rmlA* и *rpfF*, бяха идентифицирани и разделени на две групи: консервативни замени и неконсервативни замени (Таблица 30). Като референтни бяха използвани съответните нуклеотидни последователности в генома на *S. maltophilia* ATCC 13637 (определен в настоящото проучване като силен продуцент на биофилм, при който измерената OD_{550} е 1.374 ± 0.169). Най-малък брой вариации от двата типа бяха установени в *rpfF*, докато генът *rmlA* се оказа най-променлив сред анализиранияте БАГ. Средната честота на консервативните АК замени на базова двойка в кодиращите последователности е както следва: 0.0016 за *spgM*, 0.0014 за *rpfF* и 0.0041 за *rmlA*. Съответните стойности за неконсервативните варианти бяха изчислени съответно на 0.0011, 0.0003 и 0.0045.

Таблица 30. “Missense” мутации, идентифицирани в биофилм-асоцираните гени на избрани изолати *S. maltophilia*, подложени на целогеномно секвениране.

CDS, кодираща последователност.

Изолат	Ген (CDS)		Идентичност (%)	Сходства (%)
	Консервативни мутации	Неконсервативни мутации		
	<i>rmlA</i> (888 bp)			
SM8	pQ79R, pE98D, pD131E, pS154T, pI158V, pN182D, pA188S, pK205R, pS211N	pV130E, pN166I, pG209A, pN212A, pA217P, pC252S, pQ261N, pT265N	94	97
SM49	pE98D, pD131E, pI158V, pN182D, pK205R, pS211N	pV130K, pN166I, pG209A, pN212T, pA217P, pC252S, pQ261N, pT265N	95	97
SM62	pK97R, pE98D, pE189D	pV130T, pG209A, pS211G, pT265N	98	98
SM64			100	100
SM79			100	100
SM105			100	100
SM130	pE98D, pD131E, pI158V, pN182D, pK205R, pS211N	pV130K, pN166I, pG209A, pN212T, pA217P, pC252S, pQ261N, pT265N	95	97
SM135	pS154T		99	100
SM148	pK97R, pE98D, pK124R, pE128Q, pH186Y, pK205Q, pN212H, pQ261K	pR125N, pV130E, pD131Q, pS154D, pA185D, pG209R, pS211G, pT229N	95	97
	<i>rpfF</i> (870 bp)			
SM8	pS35N		99	100
SM49	pS35N		99	100
SM62	pS35N		99	100
SM64	pS35N	pA69T	99	99
SM79	pS35N		99	100
SM105	pS35N		99	100
SM130	pS35N		99	100
SM135	pS35N		99	100
SM148	pS35N, pE59D	pV213A	99	99
	<i>spgM</i> (2343 bp)			
SM8	pM703L		99	100
SM49	pA43S, pA457S	pE10G	99	99
SM62	pD106E, pV220I, pV234I, pS270T, pD306E, pT307S, pE336Q, pV429I, pT564S, pE566D, pR568K, pE694D	pE10G, pE50A, pQ104H, pT114N, pQ132G, pG137A, pK138G, pG140S, pA147G, pQ159P, pT189A, pT198A, pQ204L, pG208S, pA215V, pA236P, pA301G, pA304T, pA305T, pG317E, pG322D, pT385A, pQ446A, pA454V, pG565A, pA677G, pIns314P, pT671A	95	96
SM64			99	99
SM79	pM703L		99	100
SM105	pM703L	pP313del	99	99
SM130	pA43S, pI392V, pD712E		99	100
SM135	pQ293H, pD306N, pE318K, pD328N, pV333I	pT671A	98	99
SM148	pD106E, pV220I, pS270T, pD306E, pT307S, pE336Q, pV449I, pE694D, pD775E	pE10G, pE50A, pQ104H, pT114N, pQ132A, pG137T, pK138G, pG140S, pA147G, pQ159P, pT189A, pT198A, pG208S, pA236P, pA300V, pA301E, pA304T, pA305T, pG317E, pT385A, pA454V, pT722I	96	96

Позициите на мутациите са представени в съответствие с кореспондиращите нуклеотидни последователности на референтния щам *S. maltophilia* ATCC 13637. Консервативните и неконсервативните аминокиселинни замени са идентифицирани чрез инструмента BLASTP alignment/BLOSUM62 matrix. Идентичност и сходство са изчислени чрез BLASTP сравнения спрямо еквивалентните последователности на *S. maltophilia* ATCC 13637 (GenBank CP008838.1).

Анализът на кодиращите последователности на *rmlA* разкрива над 2 пъти повече консервативни и над 4 пъти повече неконсервативни АК замени в сравнение с другите два гена. Подобен висок мутационен товар в *rmlA* е докладвано и в други проучвания (Zhuo et al. 2014), което предполага вторична роля на генния продукт в производството на биофилм. Brooke докладва повишена продукция на биофилм от *rmlA*⁻ мутантен щам *S. maltophilia* върху стъклени и поливинилхлоридни повърхности, както и намалена продукция върху полистиренова повърхност (Brooke 2012). Тези данни могат да обяснят намалената продукция на биофилм от изолатите SM62 и SM148, съответно 0.788 ± 0.098 и 0.989 ± 0.033 , тъй като и двата притежават обща уникална неконсервативна АК замяна pS211G в *rmlA* (Таблица 30). Това откритие може да се счита за обещаващ кандидат за по-нататъшни изследвания. Заслужава да се отбележи липсата на изолати с генотип *spgM*⁺/*rmlA*⁻/*rpfF*⁺ от проби от ДДП и рани. Възможно обяснение на това явление е, че кодиращият от *rmlA* ензим е необходим за образуването на O-антиген, който благоприятства колонизацията на тези хабитати.

Генът *rpfF* натрупва непропорционално по-малки количества от двата типа АК замени в сравнение с другите два БАГ, които бяха изследвани от нас. Тази констатация, съчетана с честотата на откриването му при проведения PCR скрининг (66.5%), предполага, че кодиращият продукт е важен за образуването на биофилм при *rpfF*-положителните изолати. Допълнителни данни в подкрепа на тази хипотеза бяха получени и от публикуваните от Alcaraz et al. сравнителни анализи между щамове *S. maltophilia* K279a и K279a*rpfF*, които показват значението на този ген за образуването на биофилм и вирулентността (Alcaraz et al. 2019).

Анализът на деветте сглобени генома в настоящия труд показва, че *spgM* е единственият ген с неконсервативни АК замени и в трите най-слаби продуценти сред изследваните изолати (SM62, SM135 и SM148). Всичко това подсказва, че неговият продукт играе важна роля при образуването на биофилм и натрупването на възможни инактивиращи мутации в него може да служи като индикатор за намаленото му формиране върху полистиренова повърхност.

5. Епидемиологично типизиране на проучените терапевтично проблемни НФГБ изолати

5.1. Епидемиологично типизиране на карбапенем-резистентни изолати *P. aeruginosa*

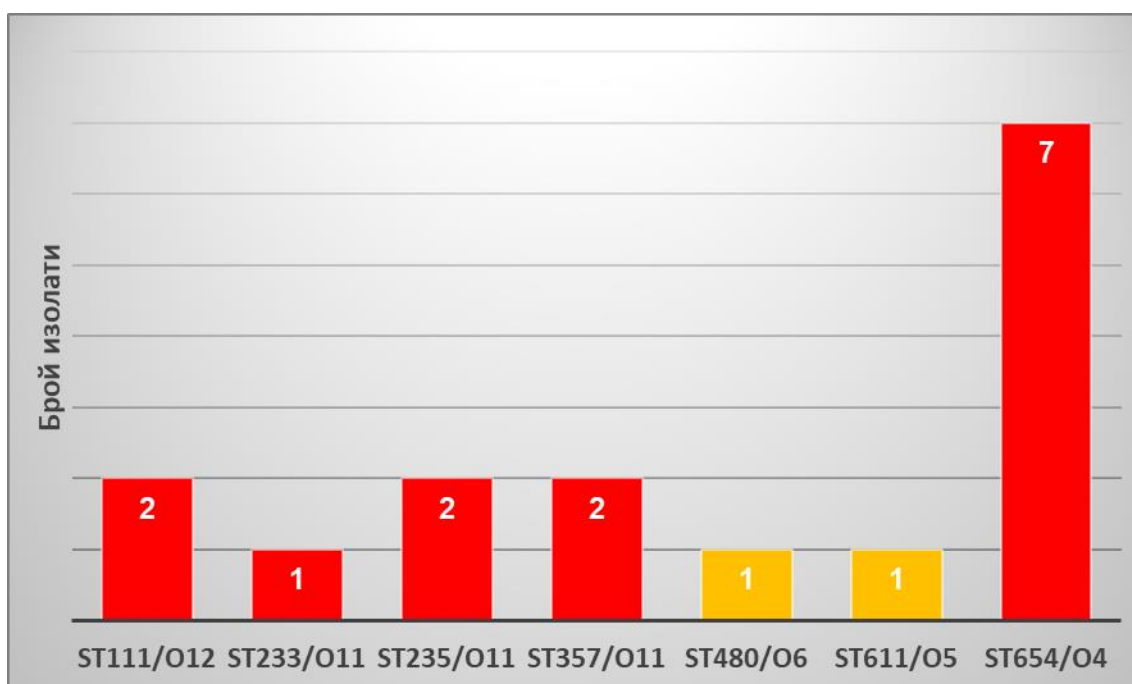
5.1.1. MLST анализ на CRPA изолати, базиран на WGS

MLST анализът при шестнадесетте избрани CRPA изолата, подложени на WGS (11 MBL⁺ и 5 MBL⁻, от които 15 нозокомиални и 1 от амбулаторен пациент), показва групиране в общо 7 секвенционни типа (STs), както следва: ST111, ST233, ST235, ST357, ST480, ST611 и ST654. С изключение на ST480 (изолат Рае48 от хрчка на пациент с МВ) и ST611 (Рае57, *bla*_{NDM-1}-положителен изолат от кръв на пациент с COVID-19, лекуван в УМБАЛ „Лозенец“), останалите идентифицирани STs са част от глобалните 10 високорискови клона на *P. aeruginosa* (del Barrio-Tofiño et al. 2020; Oliver et al. 2024). В Таблица 31. са представени основни геномни характеристики на изолатите, като продукция на MBLs, T3SS цитотоксини и алелни варианти на седемте housekeeping гени при *P. aeruginosa*. Разпределението на STs и свързаните с тях O-серотипове е илюстрирано на Фигура 30.

Таблица 31. Идентифицирани алелни варианти на housekeeping гените и секвенционни типове на 16 карбапенем-резистентни клинични изолата *P. aeruginosa*, подложени на целогеномно секвениране.

Изолат	MBL	T3SS цитотоксин	Алели							ST
			<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	
Рае41	VIM-4	ExoS ⁺	16	5	30	11	4	31	41	233
Рае48	He	ExoS ⁺	11	5	11	3	1	6	27	480
Рае49	VIM-2	ExoS ⁺	17	5	5	4	4	4	3	111
Рае50	VIM-2	ExoS ⁺	17	5	5	4	4	4	3	111
Рае51	He	ExoU ⁺	2	4	5	3	1	6	11	357
Рае52	He	ExoU ⁺	2	4	5	3	1	6	11	357
Рае53	He	ExoU ⁺	38	11	3	13	1	2	4	235
Рае55	NDM-1	ExoS ⁺	17	5	26	3	4	4	26	654
Рае57	NDM-1	ExoS ⁺	17	5	12	98	4	14	10	611
Рае58	NDM-1	ExoS ⁺	17	5	26	3	4	4	26	654
Рае59	NDM-1	ExoS ⁺	17	5	26	3	4	4	26	654
Рае60	NDM-1	ExoS ⁺	17	5	26	3	4	4	26	654
Рае61	NDM-1	ExoS ⁺	17	5	26	3	4	4	26	654
Рае62	NDM-1	ExoS ⁺	17	5	26	3	4	4	26	654
Рае67	NDM-1	ExoS ⁺	17	5	26	3	4	4	26	654
Рае68	He	ExoU ⁺	38	11	3	13	1	2	4	235

MBL, метало-β-лактамаза; T3SS, секреторна система тип III; ST, секвенционен тип.



Фигура 30. Идентифицирани секвенционни типове и свързани с тях O-серотипове при 16 карбапенем-резистентни клинични изолата *P. aeruginosa*, подложени на целогеномно секвениране. Високорисковите клонове са илюстрирани в червено.

В скорошно проучване на Стойков, проведено в НРЛ „Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност“, при изследвана извадка от 91 клинични изолата *P. aeruginosa* с различен географски произход от България (2010–2023 г.) са идентифицирани общо 12 STs, от които 7 високорискови, в това число установените в настоящия труд ST111 (18.7% от извадката), ST233 (15.4%), ST235 (40.7%), ST357 (4.4%) и ST654 (6.6%), както и ST175 (1.1%) и ST244 (6.6%) (Стойков 2023). Авторът докладва още два STs, които принадлежат към глобалните високорискови клонове (ST175 и ST244), както и няколко други STs, представени само от 1-2 щама (ST564, ST621, ST664 и ST4423). Уникалният за нашето изследване ST611 не е открит сред колекцията от клинични изолати *P. aeruginosa* на референтната лаборатория.

Общо 7 от 16 CRPA изолата, подложени на MLST анализ (43.8%), показаха принадлежност към ST654 (CC654). Този секвенционен тип се среща в Северна Америка, Южна Америка, Европа и Азия и често е свързан с носителство на гени за MBLs от NDM, VIM и IMP типове (Oliver et al. 2024). Всички наши изолати от високорисковия клон ST654 бяха идентифицирани като *bla*_{NDM-1}-положителни. Първите в страната NDM-1-продуциращи клинични изолати *P. aeruginosa* от УМБАЛ „Александровска“ и УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ също са от ST654 (CC654) (Kostyanev et al. 2020). Също така в

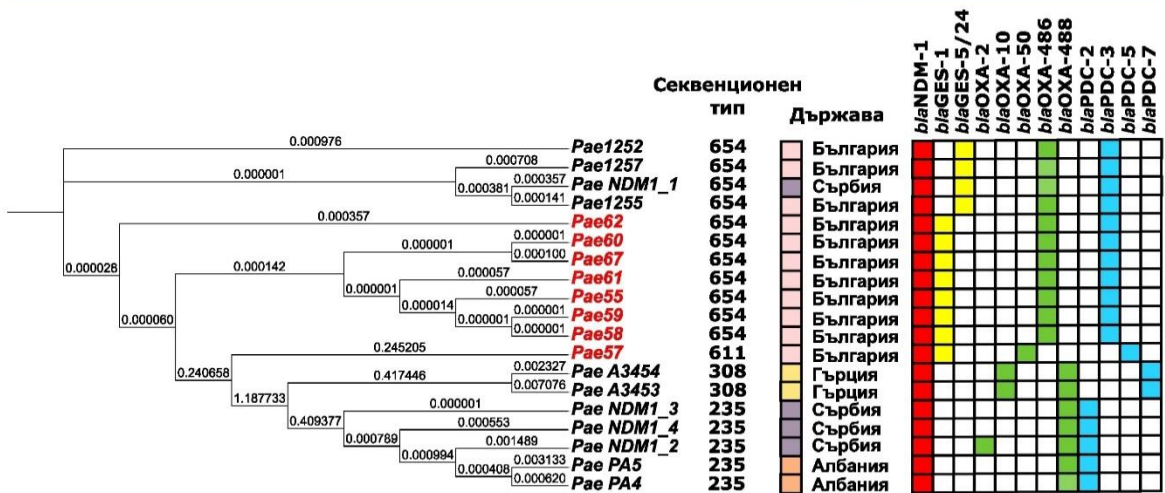
гореспоменатото проучване на Стойков са открити 6 изолата *P. aeruginosa* от ST654, от които 5 също са били носители на *bla*_{NDM-1} гени (от Кюстендил и Бургас), а 1 – на *bla*_{VIM-2} (София). При core genome (cg) MLST анализ авторът установява висока степен на сходство между NDM-1-продуцентите, което подчертава тяхната епидемиологична връзка (Стойков 2023). В световен мащаб е установено, че повечето NDM-1-положителни изолати *P. aeruginosa*, които принадлежат към високорисковия клон ST654, са свързани със серотип O11 (Oliver et al. 2024).

Двата VIM-2-положителни изолата в нашето проучване (Pae49 и Pae50) са първите докладвани български изолати с идентифициран *bla*_{VIM-2} (Strateva et al. 2021). Те показаха принадлежност към високорисковия клон ST111 (CC111) и серотип O12, и демонстрираха присъствие на *exoS*. Тези характеристики отговарят на обобщения глобален профил на *P. aeruginosa* от този секвенционен тип (Oliver et al. 2024). По-късно Стойков открива два различни варианта на VIM-тип MBL при изследването на 91 български клинични изолата *P. aeruginosa* – VIM-2 и VIM-5, които показват същата клонова принадлежност (Стойков 2023).

5.1.2. Филогеномен анализ на NDM-1-продуциращи CRPA изолати

Филогеномният анализ, базиран на корови гени в пангенома на *P. aeruginosa*, включи откритите NDM-1-продуциращи CRPA изолати с XDR профил от УМБАЛ „Лозенец“ (2021–2023 г.) и всички *bla*_{NDM-1}-положителни CRPA изолати от Балканите (2018–2021), описани в научни публикации и с депозираните геноми в свободно достъпните бази данни към 01.04.2024 г. Генерираното филогенетично дърво е представено на **Фигура 31**.

Както е видно от фигурата, 57.9 % (11 от 19) от съдържащите *bla*_{NDM-1} балкански изолати, подложени на филогеномен анализ, принадлежат към високорисковия ST654, част от CC654, 26.3% (5/19) към ST235 (CC235) и 10.5% (2/19) към ST308 (CC308). Освен *bla*_{NDM-1}, всички изолати от доминиращия ST654 съдържат AMR детерминанти *bla*_{GES-1/5}, *bla*_{PDC-3} и *bla*_{OXA-486}. Нашият *P. aeruginosa* Pae57 е единственият изолат, който не е част от циркулиращите глобални високорискови клонове *P. aeruginosa* (ST611). Pae57 показва значителна разлика, над 21 700 единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs), в сравнение с всички останали щамове от Балканите. Другите 7 изолата *P. aeruginosa* от настоящото проучване (ST654), получени от УМБАЛ „Лозенец“ в София, демонстрираха различия помежду си от не повече от 44 SNPs. В рамките на тази група изолатите, обозначени като Pae55, Pae58, Pae59, Pae60 и Pae61, демонстрират много висока степен на клонална свързаност и се отличават с максимум 7 SNPs в коровите си геномни области.



Фигура 31. Филогенетично дърво, конструирано чрез извикване на SNPs от подравняване на коровите гени на 19 *bla*_{NDM-1}-положителни клинични изолата *P. aeruginosa* от Балканите. Номерата на изолатите от настоящото проучване са в червен цвят. Представена е и матрица за присъствие / отсъствие на гени, кодиращи β -лактамази от молекулярни класове А, В, С и D.

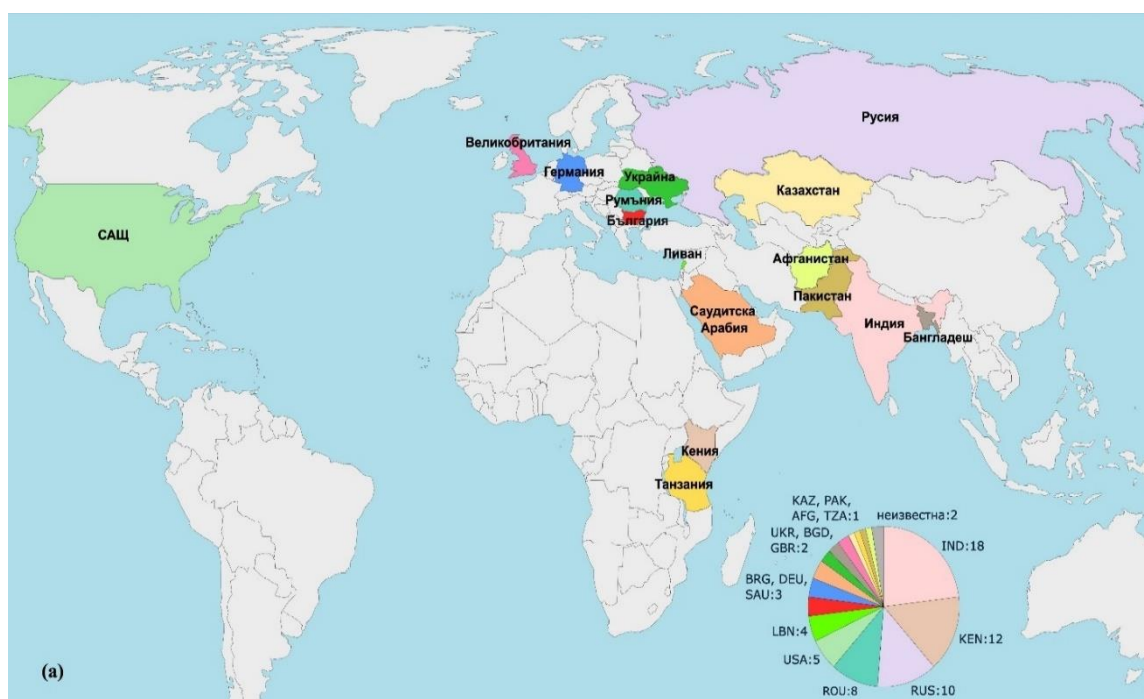
Забележка: В литературния източник не е налична информация за точния географски произход (населено място) на изолати от *Pae NDM1_1* до *Pae NDM1_4* от Сърбия (Kabic et al. 2023).

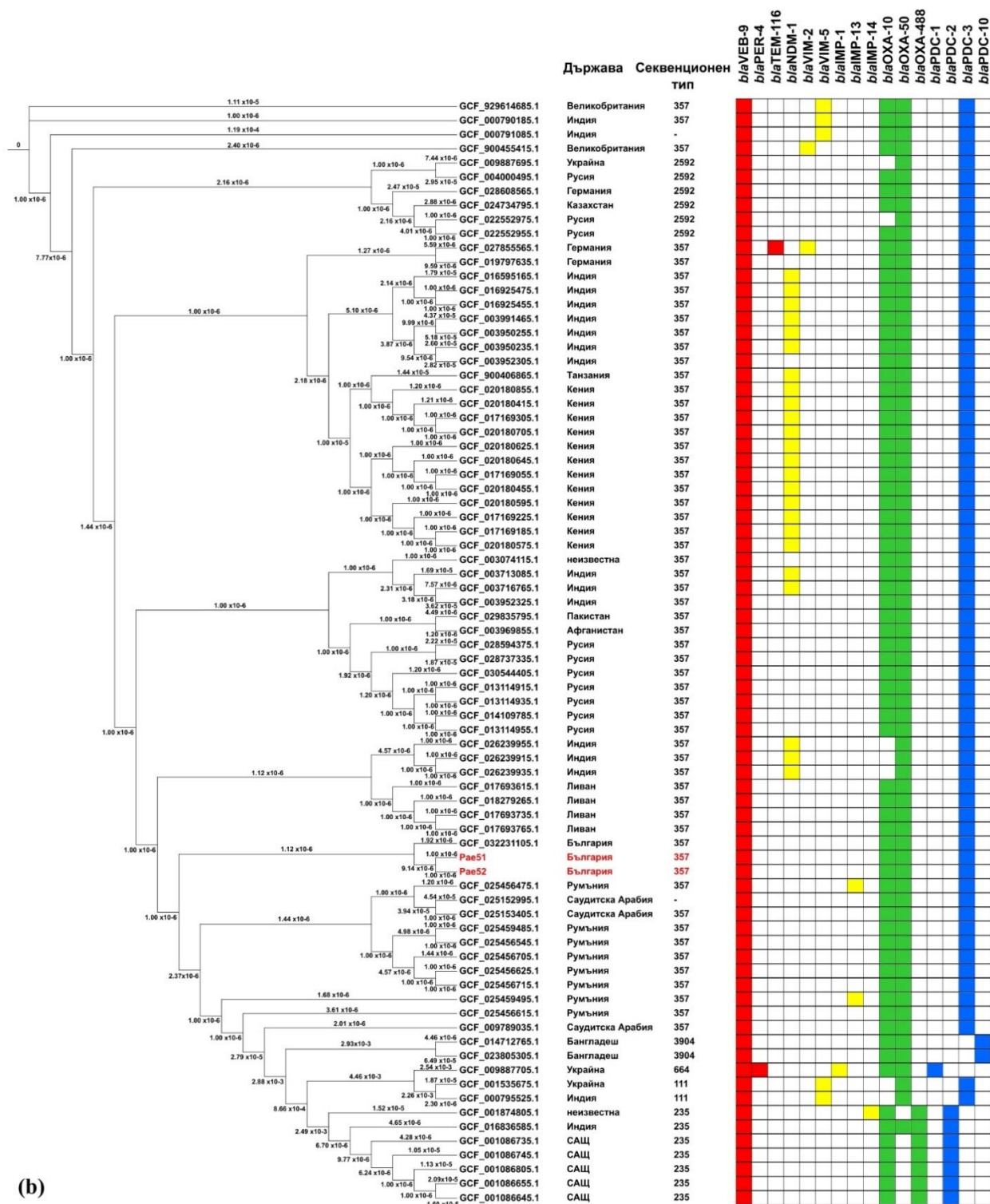
Най-сходни с групата са щамове *P. aeruginosa* ST654 Paе1255 от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ в София (GCA_021378395.1) (Kostyanev et al. 2020) и *P. aeruginosa* ST654 NDM1_1 (GCA_020404785.1) от Сърбия (Kabic et al. 2023). Анализът показва, че коровите геноми на нашите NDM-1 продуценти от ST654 и на двата щама от проучванията на Kostyanev et al. и Kabic et al. се характеризират с едва 31-73 SNPs помежду си. Хронологично най-рано е изолиран Paе1255 (август 2018), а най-късно Paе67 (август 2023).

Взети заедно, гореизложените констатации предполагат, че някои болници в съседните балкански държави България и Сърбия са резервоари на клонално свързани, транспозон-асоциирани *bla*_{NDM-1}-положителни клинични изолати *P. aeruginosa*.

5.1.3. Филогеномен анализ на VEB-9-продуциращи XDR-РА изолати

Филогеномният анализ, базиран на корови гени в пангенома на *P. aeruginosa*, включи откритите два VEB-9-продуциращи CRPA изолатата с XDR профил от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (2020 г.) и всички *bla*_{VEB-9}-положителни изолати *P. aeruginosa* с депозирани пълни геноми в свободнодостъпните бази данни, отговарящи на критериите, изложени в раздел „Материали и методи“. Към дата 01.07.2024 г. техният брой беше 76. По този начин проведеният филогеномен анализ включи общо 78 клинични изолатата *P. aeruginosa* от целия свят. Техният географски произход е показан на **Фигура 32 (а)**. Построеното филогенетично дърво, базирано на секвенционните варианти от подравняване на коровите гени, е изобразено на **Фигура 32 (b)**.





Фигура 32. Филогеномен анализ на *bla*VEB-9-положителни шамове *P. aeruginosa* с налични геноми в NCBI Nucleotide и The Pseudomonas Genome Database. **(a).** Географски произход на включените изолати – държавите, показани на диаграмата, са обозначени със съответните им трибуквени кодове, както е посочено в международния стандарт ISO 3166; **(b).** Филогенетично дърво, конструирано чрез извикване на SNPs от подравняване на коровите гени на 78 *bla*VEB-9-положителни изолата *P. aeruginosa* от Африка, Азия, Европа и Северна Америка. Представена е и матрица за присъствие / отсъствие на гени, кодиращи β-лактамази от молекулярни класове А, В, С и D.

Както е показано на фигурата, 74.4 % (58/78) от съдържащите *bla*_{VEB-9} изолати, подложени на филогеномен анализ, принадлежат към глобалния високорисков клон ST357 и са разпространени повсеместно в Африка, Азия и Европа. Останалите изолати с определен MLST профил бяха причислени към ST111 (2/78), ST235 (6/78), ST664 (1/78), ST2592 (6/78) и ST3904 (2/78). На **Фигура 32 (b)**, са изброени и всички гени, кодиращи β-лактамази от молекулярни класове А, В, С и D, които бяха идентифицирани от нас чрез скрининг на геномите за AMR детерминанти посредством инструмента ABRicate (v1.0.1). Генетичните детерминанти, кодиращи OXA-10, OXA-50 и PDC-3, показаха най-високи нива на съвместно присъствие с *bla*_{VEB-9}, съответно в 91 %, 91 % и 87.2 % от изолатите. Заслужава да се отбележи също, че в 24 от 78-те анализирани изолата (30.8%) бяха открити *bla*_{NDM-1}, кодиращи NDM-1 MBL. Видно е, че всички *bla*_{VEB-9}- и *bla*_{NDM-1}-съдържащи изолати *P. aeruginosa* са част от ST357 (CC357) и произходат от държави с нисък индекс на човешко развитие, като Индия, Кения и Танзания. Комбинацията от VEB-9 ESBL от клас А и NDM-1 MBL от клас В осигурява резистентност към всички β-лактами, включително тези в комбинация с BLIs, което значително ограничава наличните възможности за лечение (Feros et al. 2024).

5.2. Епидемиологично типизиране на карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii*

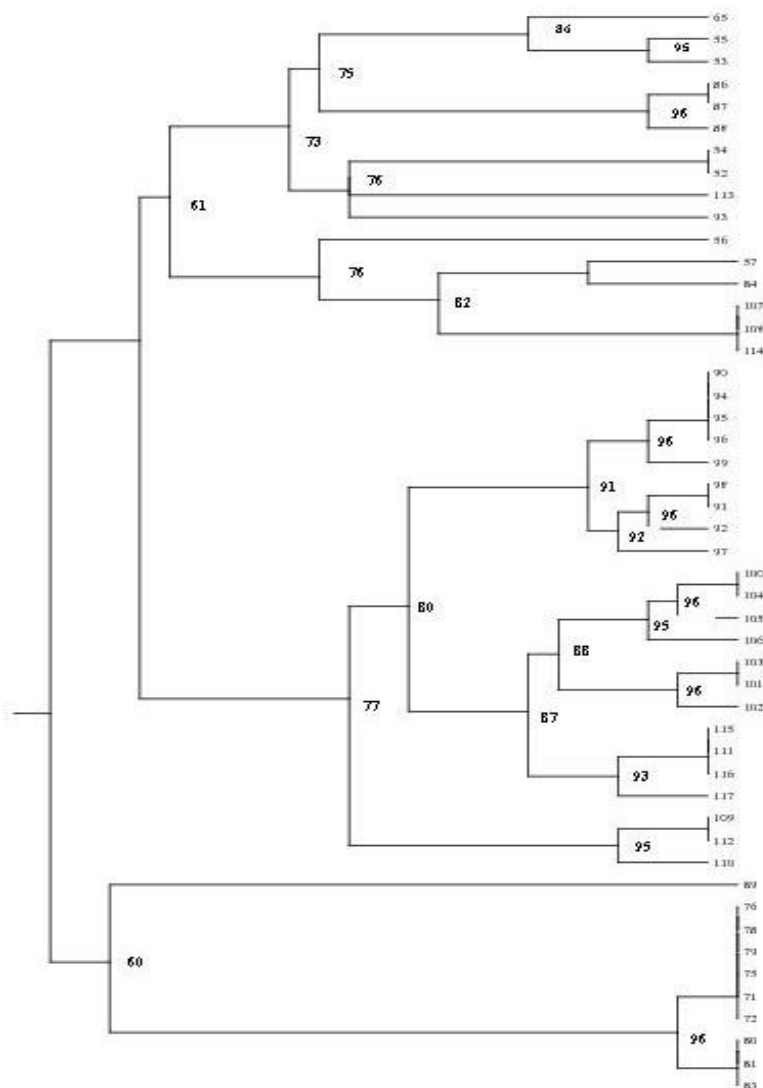
5.2.1. Епидемиологично типизиране посредством RAPD-PCR

Епидемиологично типизиране на MDR-AB изолати от УМБАЛ „Александровска“ от периода 2005–2011 г.

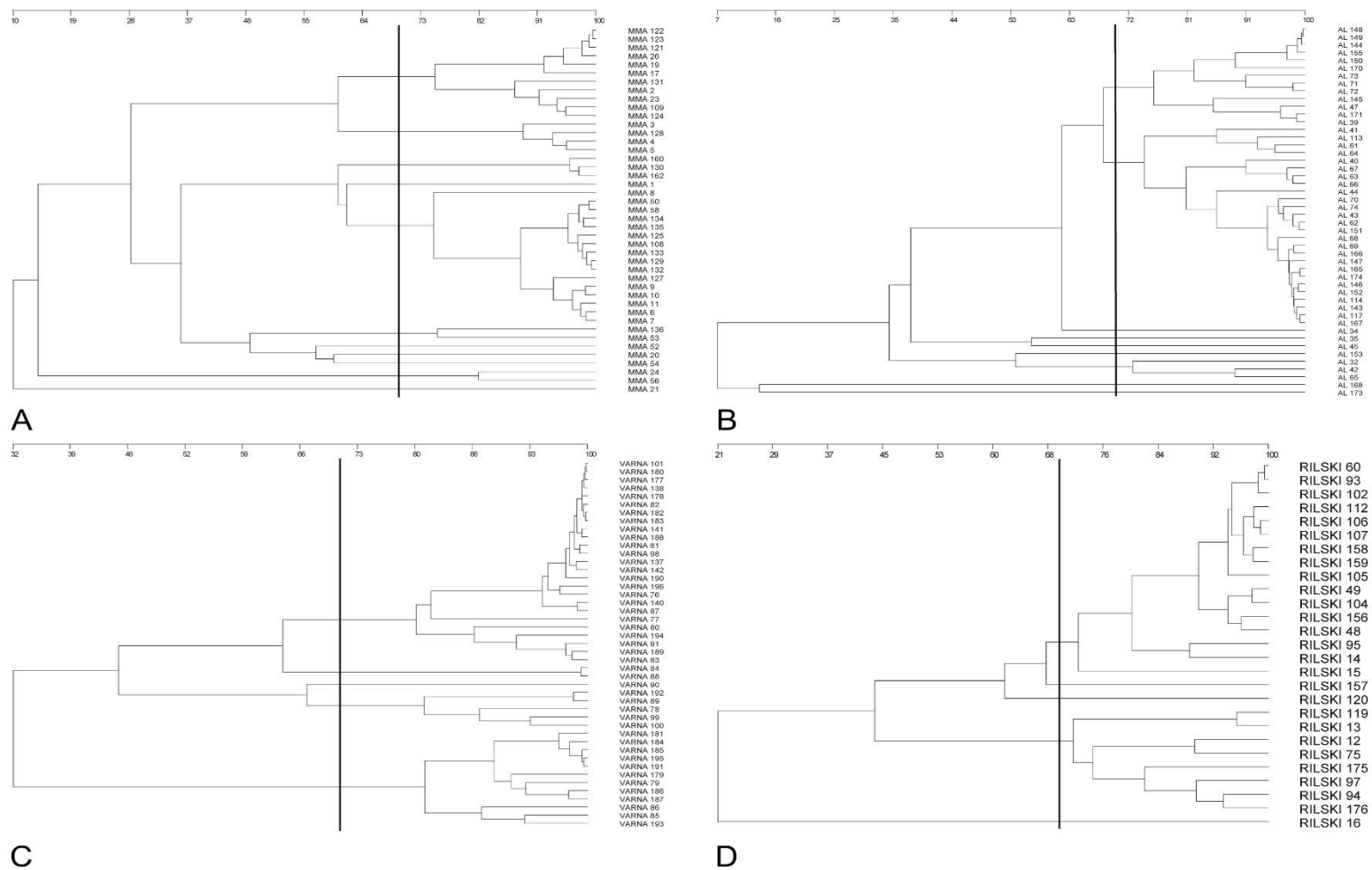
Терапевтично проблемните изолати *A. baumannii*, в които бяха идентифицирани *bla*_{OXA-23} ($n = 49$) и *armA* гени ($n = 23$) бяха подложени на епидемиологично типизиране посредством RAPD-PCR с използване на праймера RAPD-4 (5'-AAGAGCCCGT-3'). Дендрограмите, илюстриращи връзката между проучените продуценти на OXA-23 карбапенемаза и ArmA 16S рРНК метилаза, циркулиращи в клиниките за интензивни грижи на УМБАЛ „Александровска“ през 2005–2011 г., са показани на **Фигури 33** и **34**.

Сред продуцентите на OXA-23 CHDL, за проследения 7-годишен период бяха открити клонално свързани CRAB, показващи принадлежност към четири основни клъстерни групи (CGs) със сходство между отделните изолати както следва: 73% ($n = 10$), 76% ($n = 6$), 77% ($n = 23$) и 96% ($n = 9$). Между CG-I и CG-II (общо 16 CRAB изолата) степента на сходство беше 61%. Резултатите бяха

индикация да приемем циркулиране на три ендемични клона в болницата, включващи ОХА-23 продуциращи *A. baumannii*, в периода 2005–2011 г. Само един от изследваните изолати генерира уникален RAPD-профил и липса на клъстерна принадлежност. Беше доказана висока степен на клонално сходство (72%) между всички ArmA-продуциращи изолати ($n = 23$), които обособиха две основни CGs. Първата включи 11 изолата (80% сходство), а втората останалите 12 (85%), както е видно от **Фигура 34**.



Фигура 33. Дендрограма, илюстрираща връзката между ОХА-23-продуциращи карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* от клиници за интензивни грижи на УМБАЛ „Александровска“ (2005–2011), базирана на коефициент на сходство (Dice) между получените RAPD-профили (представен като процент).



Фигура 35. Дендрограми, илюстриращи връзката между нозокомиални карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* от университетски болници в България (2014–2016 г.), базирана на коефициента на Dice: **A.** Военномедицинска академия ($n = 43$); **B.** УМБАЛ „Александровска“ ($n = 48$); **C.** УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна ($n = 45$); **D.** УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ($n = 27$).

Клъстерният анализ показва групиране на преобладаващата част CRAB изолати в малък брой CGs и единични изолати, които генерираха уникални RAPD-профили и не попаднаха в образуваните групи. Повечето CGs в четирите мониториращи болници включваха CRAB изолати от различни години (2014, 2015 и 2016), както и продуценти на двата основни типа CHDLs при *A. baumannii* – OXA-23-like и OXA-24/40-like.

Във ВМА беше установена циркулация на клонално свързани CRAB щамове за проучения 3-годишен период, които образуваха 6 CGs, както следва: CG-I (75% сходство между щамове), включваща 11 изолата, CG-II (88%) – 4, CG-III (95%) – 3, CG-IV (75%) – 16, CG-V (75%) – 2, и CG-VI (80%) – 2 изолата. Пет щамове бяха без клъстерна принадлежност.

В УМБАЛ „Александровска“ бяха доказани две големи и една малка CGs: CG-I (76%) – 13 изолата, CG-II (74%) – 26, и CG-III (72%) – 3 изолата, както и 6 негрупируеми изолата. Между изолатите от CG-I и CG-II степента на сходство е много висока (68%) и близка до критичния праг от 70%, което ни даде основание да приемем персистирание на ендемичен клон в болницата, включващ 39 от общо 48-те проучени нозокомиални изолата, за периода 2014–2016 г. Както беше докладвано по-горе, в по-ранния период (2005–2011 г.), беше идентифициран по-голям брой ендемични клонове (3), което може да се обясни с по-дългата продължителност на проследяване.

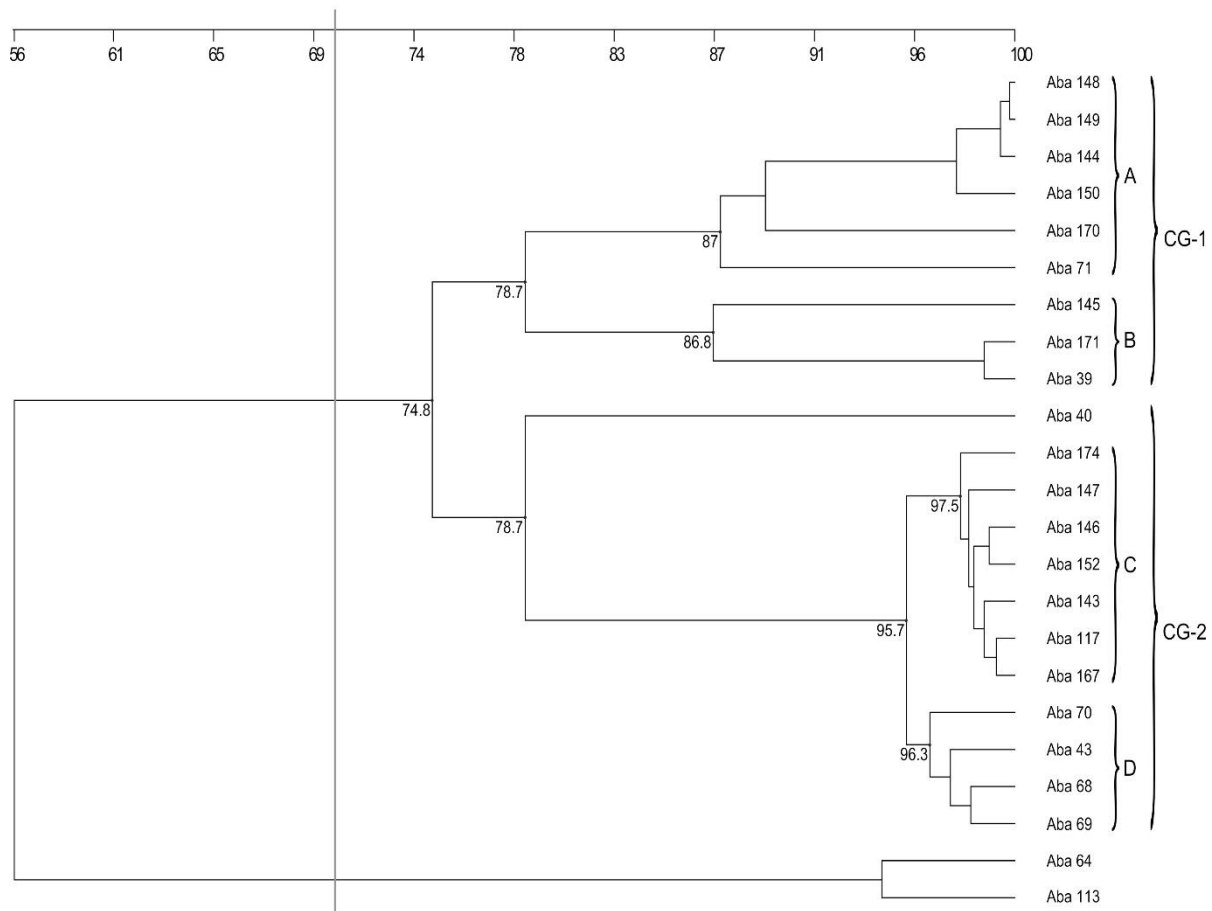
В Университетската болница във Варна, подобно на ВМА, циркулираха клонално свързани щамове, отнасящи се към 4 клъстера, както следва: CG-I (80%) – 25 изолата, CG-II (98%) – 2, CG-III (81%) – 5, CG-IV (80%) – 12. Само един изолат остана извън откритите CGs.

Резултатите от клъстерния анализ в УМБАЛ „Св. Ив. Рилски“ показаха 3 изолата без клъстерна принадлежност и само 2 CGs – CG-I (72% сходство) и CG-II (71.5% сходство), представени съответно от 16 и 8 CRAB изолати.

Епидемиологично типизиране на MDR/XDR-AB изолати от критично болни пациенти, провели бърбечнозаместителна терапия (БЗТ) в КАИЛ на УМБАЛ „Александровска“ в периода 2016–2018 г.

В периода октомври 2016 – септември 2018 г. бяха събрани 23 CRAB с MDR ($n = 6$) или XDR ($n = 17$), изолирани от общо 21 критично болни пациенти, провели БЗТ в КАИЛ, със следния произход: кръв ($n = 11$), трахеобронхиален аспират от пациенти с VAP ($n = 10$) и връх на диализен катетър (ДК) ($n = 2$). Изолатите бяха генотипизирани чрез RAPD-PCR при използване на праймер

M13 (Grundmann et al. 1997). Дендрограмата, илюстрираща клоналната връзка между отделните щамове, е представена на **Фигура 36**.



Фигура 36. Дендрограма, илюстрираща връзката между 23 XDR/MDR-AB изолата от пациенти на бъбречнозаместителна терапия в КАИЛ, УМБАЛ „Александровска“, базирана на коефициент на Dice (представен като процент).

Клъстерният анализ разпредели проучените XDR/MDR-AB изолати в две главни CGs, с клонална връзка между тях 74.8%. CG-1 обедини 9 щамове *A. baumannii* с проблемна антибиотична резистентност (78.7% клонално сходство между тях), а CG-2 включи 12 клонално свързани щамове (също със 78.7% сходство). Два изолата (Aba 64 и Aba 113) не показаха принадлежност към двете главни CGs. От своя страна CG-1 беше подразделена на два подкълъстера: А (6 щамове с 87% клонална връзка помежду им) и В (3 щамове; 86.8%). CG-2 беше съставена от подкълъстер С (7; 97.5%), подкълъстер D (4; 96.3%) и щам Aba 40. Бяха открити два чифта изолати, Aba 148/Aba 149 (подкълъстер А, 100% клонална връзка) и Aba 146/Aba 152 (подкълъстер С, 99%), включващи съответно изолат от хемокултура и от връх на ДК, като всеки чифт

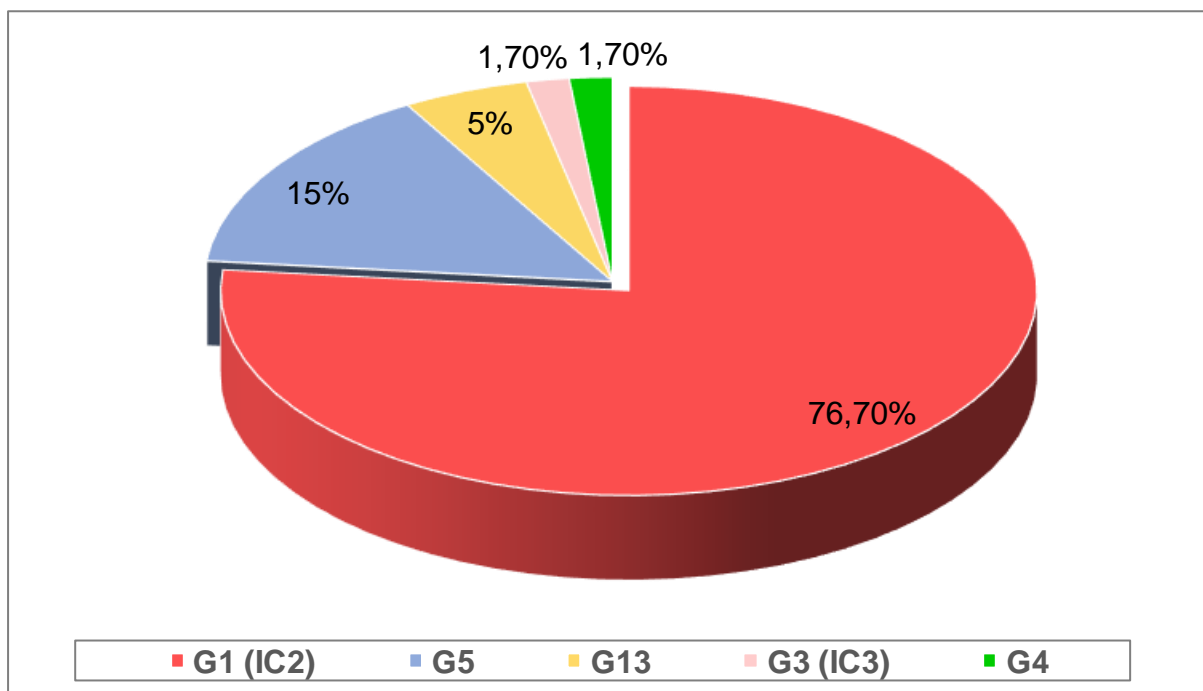
произхождаше от един и същ пациент. Тези находки бяха интерпретирани като ДК-свързани инфекции на кръвта, причинени от карбапенем-резистентни *A. baumannii*, при пациенти на продължителна БЗТ. В обобщение, при 21 от всички 23 генотипизирани изолата (91.3%) беше установен висок коефициент на сходство (74.8%), което е индикатор за разпространение на ендемичен клон от XDR/MDR-AB в мониторираната интензивна клиника за продължителен период (2016–2018).

5.2.2. Определяне на секвенционни групи/клонални комплекси чрез мултиплекс PCR метод, откриващ алелни варианти в *ompA*, *csuE* и *bla*_{OXA-51-like} гени

На типизиране чрез определяне на секвенционни групи и клонални комплекси (международни клонове – ICs) посредством откриване на алелни варианти в гореизброените гени под селективен натиск (Turton et al. 2007) бяха подложени 60 избрани CRAB изолата от периода 2017–2022 г. Колекцията включи изолати от ВМА ($n = 5$), всички от 2017 г. и от четири различни клиники на болницата, както и 55 CRAB от клиники на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, изолирани през 2017–2022 г. В проследения период доминираше IC2 (76.7% от изследваните изолати), следван от G5 (15%). Останалите секвенционни групи (G13, G3/IC3 и G4) бяха представени от единични CRAB изолати (**Фигура 37**).

Броят на проучените изолати от ВМА е много малък и не могат да се правят изводи относно разпространението на секвенционни групи и международни клонове. Видно е обаче, че 5 CRAB от 5 различни клиники показваха принадлежност към 4 секвенционни групи. В периода 2017–2022 г. в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ беше установен превес на IC2 (81.8%), следван от G5 (12.7%) и G13 (5.5%). Редките секвенционни групи бяха открити предимно сред изолатите от интензивното отделение за лечение на пациенти с COVID-19 (5 от общо 7 CRAB, принадлежащи към G5 и 2 от общо 3 CRAB, отнасящи се към G13).

Членовете на трите основни „европейски“ линии (международни клонове IC1, IC2 и IC3) се свързват с по-голямата част от болничните взривове, причинени от *A. baumannii* в световен мащаб, и с по-висока резистентност към много АМЛС (Borges Duarte and Gonçalves Rodrigues 2022; Rahman et al. 2022; Thoma et al. 2022; Pustijanac et al. 2023). Изолатите от IC2 често показват по-високи нива на резистентност към всички антибиотици в сравнение с другите генотипове (Nowak et al. 2017). Основна тревога буди устойчивостта към карбапенеми, която основно се дължи на продукцията на придобити CHDLs от групите OXA-23, OXA-24/40 и OXA-58 (Moubareck and Halat 2020).

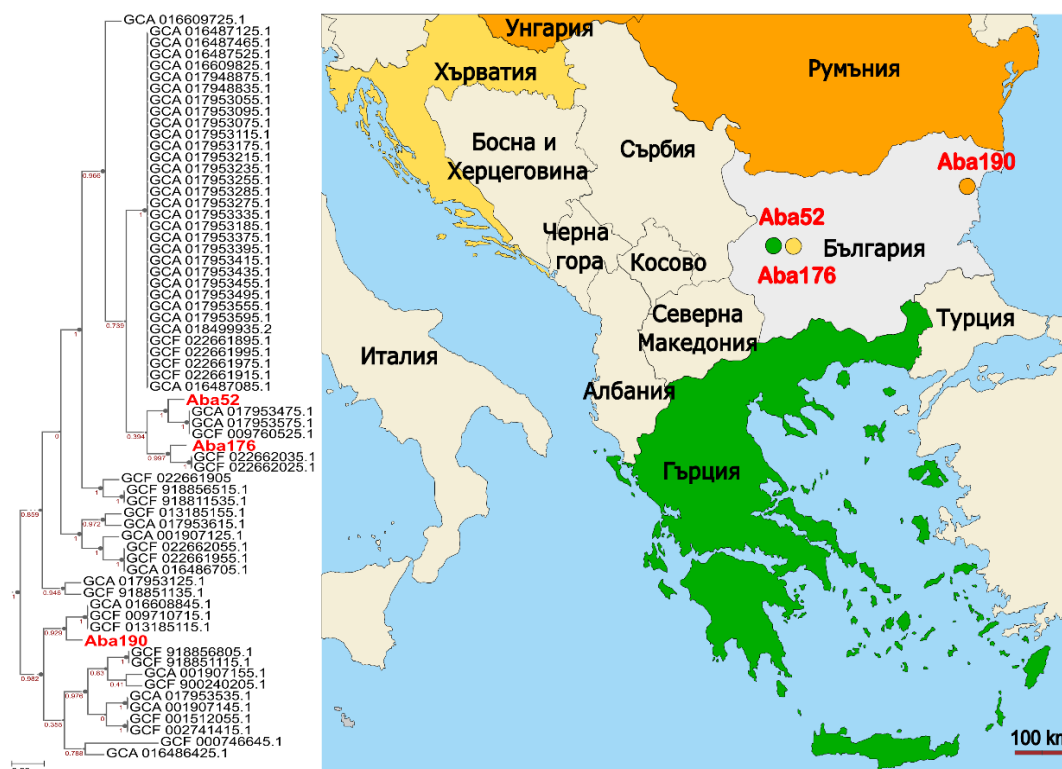


Фигура 37. Разпространение на секвенционни групи (клонални комплекси) сред избрани карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ и ВМА в периода 2017–2022 г.

5.2.3. MLST и филогеномен анализ на избрани XDR-AB изолати

Секвенционните типове и алелните варианти на седемте housekeeping гени на подложените на WGS три XDR-AB изолата, чувствителни на COL, са изложени в **Таблица 16.** от т. 2.2.2. Изолатите Aba52 и Aba176 от ОАИЛ на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ в София принадлежаха към глобално разпространения ST2 (CC2 или IC2, приложение на Pasteur MLST схема). От детерминантите за придобити CHDLs в тях бяха открити *bla*_{OXA-23}. Проведеният MLST анализ определи изолат Aba190, получен от ICU пациент в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, като част от ST636, който представлява троен локусен вариант на ST2. В Aba190 бяха идентифицирани *bla*_{OXA-23} и *bla*_{OXA-72} (ген за OXA-72 карбапенемаза от група OXA-24/40).

С цел изследване на молекулярната епидемиология на нашите XDR-AB изолати беше проведен филогеномен анализ, основан на откриване SNPs в 49 универсални гени. В анализа участваха общо 66 генома на COL-чувствителни клинични изолати *A. baumannii* от Югоизточна Европа. Конструираното филогенетично дърво е показано на **Фигура 38.**



Фигура 38. Филогенетично дърво, построено чрез множествоно подравняване на нуклеотидните последователности на 49 универсални корови гена на български XDR-AB (Aba52, Aba176 и Aba190) и colistin-чувствителни клинични изолати *A. baumannii* от съседни страни от Югоизточна Европа. Страните на произход за най-близките съвпадения на нашите три изолата са обозначени с цвят.

Изолатът *A. baumannii* Aba52 (София, 2018 г.) е тясно свързан с група от три клинични изолата от Гърция, получени през периода 2013–2016 г. *A. baumannii* Aba176 (София, 2019 г.) беше позициониран в група с два хърватски изолата, получени през 2020 г. Третият XDR-AB изолат от настоящото проучване, *A. baumannii* Aba190 от Варна (2019 г.), демонстрира най-силно клонално сходство с щамове от Унгария (един, 2017 г.) и Румъния (два, изолирани в периода 2017–2018).

ST2 е линия на CRAB, за която е характерно разпространение в различни части на света. Това е най-често срещаният високорисков клон в Европа (Śloczyńska et al. 2021; Kostyanev et al. 2021; Frenk et al. 2022; Valcek et al. 2022). Така например ST2 е доминиращият ST сред CRAB изолати от 10 балкански и средиземноморски държави (2016–2018 г.), включени в многоцентровото проучване EURECA (67.7%) (Kostyanev et al. 2021). Освен това, широкомащабно проучване, базирано на WGS, определя ST2 като най-разпространения ST сред CRAB (2013–2017 г.) от три средиземноморски

принадлежаха към ST570. Изолатите са от 2020–2021 г. и произхождат от проби от ДДП. Изолатът G3, класифициран в ST600, е получен от кръв (неизвестна дата на изолиране). Двата секвенционни типа, ST570 и ST600, са еднолокусни варианти на ST2, към който се отнася Aba52. Интересно в случая е, че всички египетски изолати *A. baumannii* с резистентност към CFDC са продуценти на NDM-1 MBL.

5.3. Епидемиологично типизиране на проучените изолати *S. maltophilia*

5.3.1. Епидемиологично типизиране чрез RAPD-PCR

Всички нозокомиални изолати *S. maltophilia* от 2011 до 2016 г. ($n = 168$) бяха разпределени в два хронологични периода: първи (2011–2013) и втори (2014–2016). Те бяха генотипизирани чрез RAPD-PCR с праймер и условия, описани по-рано (Krzewinski et al. 2001).

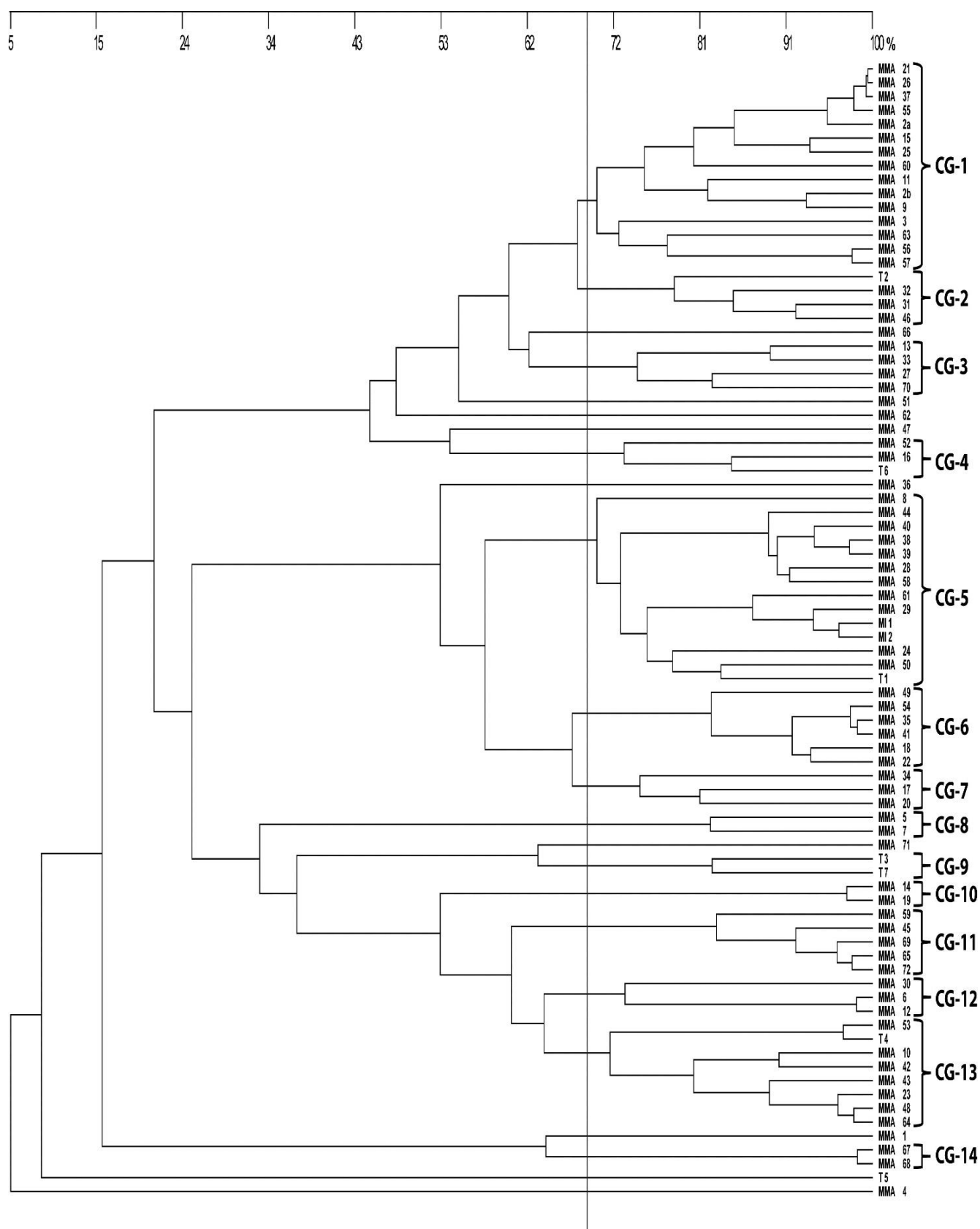
Клъстерният анализ демонстрира хетерогенна популация, включваща голям брой CGs при прилагане на общоприетия праг за клонално сходство (70%), в двата хронологични периода. Нозокомиалните изолати от първия хронологичен период бяха групирани в 14 CGs, обединяващи клонално свързани щамове, както следва: CG-1 беше представена от 15 щамове *S. maltophilia* (със 71% клонално сходство между тях), CG-2 (4 щамове; 79% клонално сходство), CG-3 (4 щамове; 75%), CG-4 (3 щамове; 73.5%), CG-5 (14 щамове; 71%), CG-6 (6 щамове; 83%), CG-7 (3 щамове; 75%), CG-8 (2 щамове; 83%), CG-9 (2 щамове; 83%), CG-10 (2 щамове; 97%), CG-11 (5 щамове; 83%), CG-12 (3 щамове; 73%), CG-13 (8 щамове; 80.5%) и CG-14 (2 щамове; 99%). Девет от всички 82 изолата генерираха уникални RAPD-профили и не попаднаха в нито една от обособените CGs. Получената дендрограма в резултат от приложения UPGMA анализ, която илюстрира клоналната връзка между генотипизираните изолати *S. maltophilia* от този период, е представена на **Фигура 40**.

Сред по-късните изолати, получени в периода 2014–2016 г., също бяха идентифицирани 14 CGs, съответно: CG-1 (11 щамове; 75.5% клонално сходство), CG-2 (5 щамове; 86%), CG-3 (11 щамове; 79%), CG-4 (6 щамове; 71%), CG-5 (2 щамове; 80.5%), CG-6 (3 щамове; 77%), CG-7 (7 щамове; 81.5%), CG-8 (2 щамове; 77%), CG-9 (10 щамове; 75.5% клонална свързаност), CG-10 (5 щамове; 76%), CG-11 (2 щамове; 75.7%), CG-12 (10 щамове; 78%), CG-13 (3 щамове; 72.5%) и CG-14 (5 щамове; 74%). Без клъстерна принадлежност бяха само 4 изолата *S. maltophilia* (**Фигура 41**).

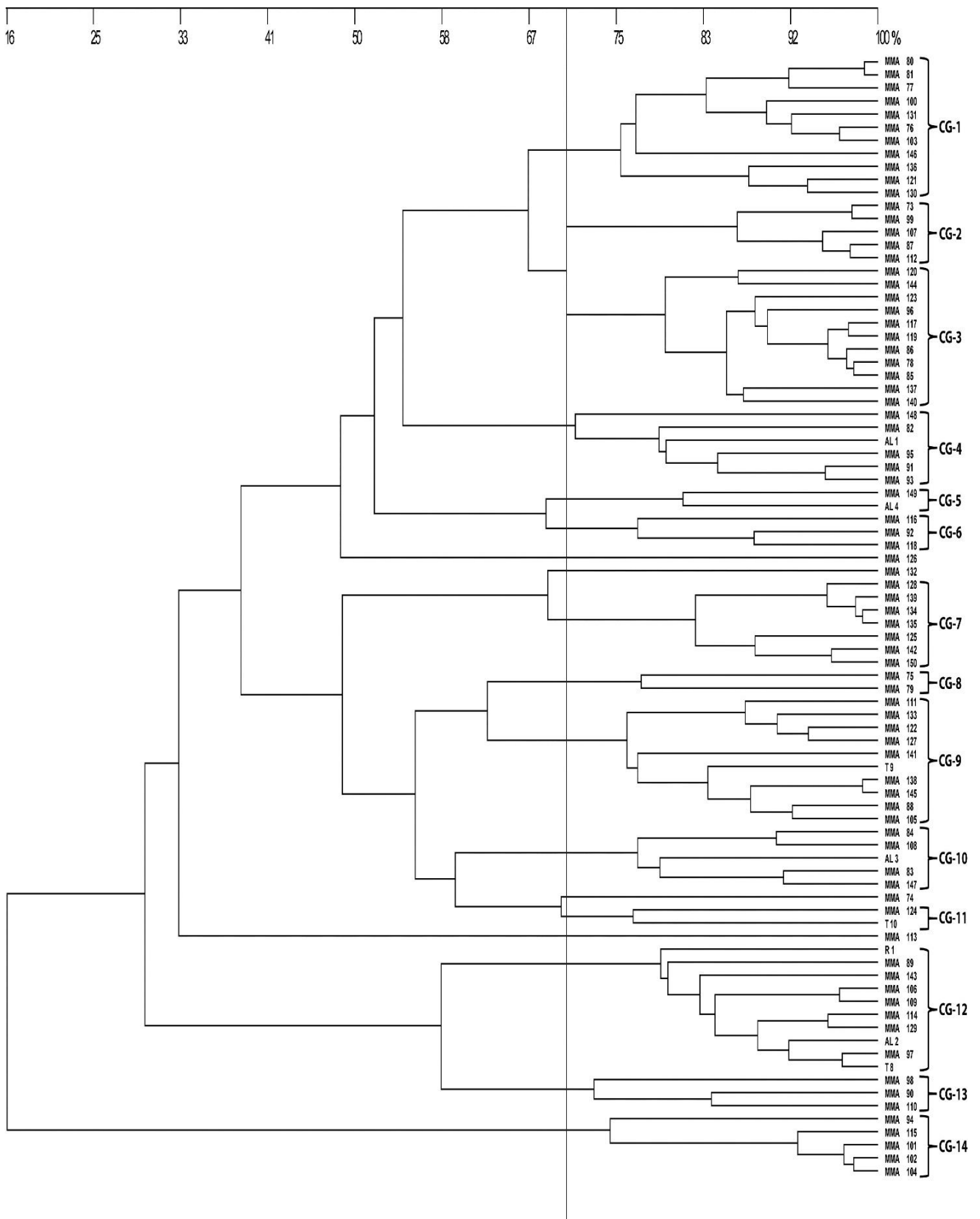
Въпреки демонстрираната хетерогенност на популацията в настоящата работа, е налице образуване на големи и малки CGs от клонално свързани щамове (89% от изолатите в I период и 95.3% във II период). Предходно българско епидемиологично проучване разкрива високо генетично разнообразие сред изолати от УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, където повечето от изследваните щамове (76.5%) демонстрират уникални RAPD-профили, а останалите (23.5%) формират 10 малки клъстера от по 2 или 3 изолата (Божкова 2016). Много други изследвания, използващи различни методи за генотипизиране на клинични изолати *S. maltophilia*, също представят високо генетично и фенотипно разнообразие (Valdezate et al. 2004; Gülmez and Haşcelik 2005; Flores-Treviño et al. 2014; Madi et al. 2016; Alcaraz et al. 2018). Въпреки че изолатите могат да произхождат от една болница и независимо от сроковете за събирането им в същата клинична обстановка, тяхното генетично многообразие се свързва с широкото екологично разпространение на този бактериален вид и възможността да бъде придобит от различни източници в околната среда (Трифенова 2020).

Във II период в CG-12 попаднаха изолати от четири болници в София – ВМА (7 изолата), УМБАЛ „Токуда“ (Т 8), УМБАЛ „Александровска“ (АЛ 2) и УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (R 1). Други по-малки клъстери от I период (CG-2, CG-4, CG-13) и II период (CG-4, CG-5, CG-9, CG-10, CG-11) обединиха щамове от пациенти на две различни болници. Това разпределение подсказва възможно междуболнично разпространение на клонално свързани щамове. Такова явление е регистрирано при други бактериални видове (напр. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. и *P. aeruginosa*) (Kirtikliene et al. 2019), но доколкото ни е известно, към момента няма подобни данни за *S. maltophilia* в световен мащаб.

Нозокомиалните щамове *S. maltophilia* с уникални RAPD-профили са малък брой и съставляват 11% от изолатите в I период и едва 4.7% сред изследваната популация във II период. Съпътстващата епидемиологична информация показва произход от различни клиници. Сред тях се срещат и изолати от няколко ICUs, като в тези случаи е по-вероятно независимо инфектиране, а не последствие от кръстосана трансмисия.



Фигура 40. Епидемиологично типизиране – I период (2011–2013). Дендрограма, илюстрираща връзката между 82 нозокомиални изолата *S. maltophilia*, базирана коефициент на Dice (представен в процент). CG, клъстерна група; MMA, Военномедицинска академия; T, УМБАЛ „Токуда“; MI, Медицински институт на МВР.



Фигура 41. Епидемиологично типизиране – II период (2014–2016). Дендрограма, илюстрираща връзката между 86 нозокомиални изолата *S. maltophilia*, базирана на коефициент на Dice (представен в процент). CG, клъстерна група; MMA, Военномедицинска академия; Т, УМБАЛ „Токуда“; AL, УМБАЛ „Александровска“; R, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“.

5.3.2. MLST анализ на избрани нозокомиални изолати *S. maltophilia*, подложени на WGS

Девет от нозокомиалните изолати *S. maltophilia* от ВМА – София, събрани в по-ранния период на нашето проучване (2011–2016 г.), бяха подложени на WGS. В подбора беше приложен комплексен подход, като критериите за включване бяха подробно изложени в т. 2.3.2. Бяха взети под внимание и генните профили от проведеното епидемиологично типизиране чрез RAPD-PCR. В тази връзка четири от избраните изолати са от I период (2011–2013) и пет са от II период (2014–2016), които са демонстрирали различна кълстерна принадлежност. Получените резултати от MLST анализа на сглобените 9 „драфт“ генома, извършен чрез интегрирания за целта инструмент в платформата Galaxy, са представени в Таблица 32.

Таблица 32. Епидемиологични характеристики и мутилокусно секвенционно типизиране на избрани нозокомиални изолати *S. maltophilia* от Военномедицинска академия – София.

Изолат	Клиника	Година	CG, период	ST	Алелни варианти						
					<i>atpD</i>	<i>gapA</i>	<i>guaA</i>	<i>mutM</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>recA</i>
SM8	КПулмо	2011	CG-5, I период	820	154	104	7	235	7	108	1
SM49	КУро	2013	CG-6, I период	172	5	94	122	79	70	105	85
SM62	КОТ	2013	Без CG, I период	826	81	236	494	70	190	201	135
SM64	КЧПХТ	2013	CG-13, I период	27	3	1	1	3	6	4	1
SM79	КГЕ	2014	CG-8, II период	820	154	104	7	235	7	108	1
SM105	КЧПХТ	2014	CG-9, II период	139	3	4	110	46	6	38	58
SM130	КАИЛ	2015	CG-1, II период	119	4	76	92	5	70	84	9
SM135	КПулмо	2015	CG-7, II период	172	5	94	122	79	70	105	85
SM148	КАИЛ	2016	CG-4, II период	819	116	165	124	176	4	163	201

CG, кълстерна група от RAPD/UPGMA анализ; ST, секвенционен тип; КПулмо, Клиника по пулмология; КУро, Клиника по урология; КОТ, Клиника по ортопедия и травматология; КЧПХТ, Клиника по чернодробно-панкреатична хирургия и трансплантология; КГЕ, Клиника по гастроентерология; КАИЛ, Клиника по анестезиология и интензивно лечение.

Забележка: Подчертаните секвенционни типове и алелни варианти на housekeeping гени са идентифицирани за първи път в света.

Беше установено разнообразие от STs, кореспондиращо на откритата преди това посредством RAPD-PCR генетична хетерогенност на изследваната извадка от 168 изолати *S. maltophilia* от два хронологични периода. При деветте изолати бяха идентифицирани общо 7 STs, както следва: ST27, ST119, ST139, ST132, ST819, ST820 и ST826. Следва да се отбележи, че три STs (ST819, ST820

и ST826) бяха открити за първи път в света в рамките на настоящото проучване. Геномите на изолатите, принадлежащи към новите STs (SM8, SM62, SM79 и SM148), бяха депозирани в базата данни PubMLST (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_smaltophilia_seqdef&page=query&scheme_id=1).

Два от новите STs (ST820 и ST826) съдържат общо четири нови алела, докато ST819 представлява нова комбинация от известни към момента на анализа алели на седемте housekeeping гени на *S. maltophilia*. Прави впечатление, че само два от идентифицираните STs бяха представени от по два различни изолата. Към новия ST820 принадлежаха SM8 (2011 г.) и SM79 (2014 г.), а ST172 включи SM49 (2013 г.) и SM135 (2015 г.) от различни клиници. От тази находка може да се предположи персистиране на някои STs в болницата в продължение на 2-3 години. Единият изолат от ST820 попада в CG-5 от I период, а другият в CG-8 от II период. За изолатите от ST172 беше определена кълстерна принадлежност към CG-6 (I период) и CG-7 (II период). Така съответните изолати бяха част от различни UPGMA анализи, което не позволява да определим степента на клонално сходство помежду им.

В обобщение, WGS-MLST анализът върху малка група от 9 нозокомиални щамове *S. maltophilia*, изолирани в клиниките на ВМА от 2011 до 2016 г., показва, че всички идентифицирани STs (7 на брой) са представени от 1 или 2 щамове. Това е свидетелство за генетично разнообразие в мониторираната болница. Находките потвърждават резултатите от предходни проучвания от различни части на света, в които изследваните *S. maltophilia* също са демонстрирали висока генетична хетерогенност (Kim et al. 2019b; Cruz-Córdova et al. 2020; Pompilio et al. 2020a). Изключителната генетична хетерогенност на вида *S. maltophilia* е доказана в мащабно американско проучване, в което са включени 130 клинични изолата от медицински центрове в няколко щата. За 10-годишния период (2006–2016) авторите откриват общо 90 STs, като 63 от тях са били нови за света към датата на извършване на изследването (Mojica et al. 2019). Най-разпространен от тях е ST5, който е идентифициран преди това като преобладаващ ST във Франция (Corlouer et al. 2017), и за който се съобщава в Германия, Австрия и Корея (Kaiser et al. 2009; Kim et al. 2018b).

V. ИЗВОДИ

На базата на получените резултати от комплексните микробиологични, молекулярно-генетични и геномни проучвания върху антибиотичната резистентност, факторите на вирулентност и молекулярната епидемиология на терапевтично проблемни НФГБ изолати (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*), циркулиращи в български университетски болници в периода 2004–2023 г., могат да се направят следните по-важни изводи:

1. При *P. aeruginosa* е налице хронологично нарастване на резистентността към β -лактами, с изключение на aztreonam, което е статистически значимо при ceferime (76.1% резистентни (R) изолати в периода 2004–2009 г. спрямо 92.3% през 2015–2023 г.; $p < 0.001$), imipenem (56.3% / 88.5%; $p < 0.001$) и meropenem (60.2% / 94.9%; $p < 0.001$). Противоположно на това се открива спад в резистентността към aztreonam (73.9% срещу 56.4%; $p < 0.01$) и аминогликозида tobramycin (85.2% / 64.1%; $p < 0.001$). Сред карбапенем-нечувствителните изолати от втория хронологичен период (2015–2023) са отчетени най-ниски нива на резистентност към colistin (0%), piperacillin-tazobactam (64.1%), tobramycin (64.1%) и amikacin (66.7%), а към останалите антибиотици между 70.5% и 94.9%. Общо 15.4% от тези изолати *P. aeruginosa* са с множествена лекарствена резистентност (MDR-PA), 84.6% с разширена (XDR-PA), а 60.3% с трудна за лечение резистентност (DRT-PA), което усложнява терапията на нозокомиалните *P. aeruginosa* инфекции през последното десетилетие.
2. При изолатите *A. baumannii*, разделени в два главни периода (2004–2011 и 2014–2022 г.), се забелязва хронологично нарастване на резистентността към всички тествани антимикробни лекарствени средства (АМЛС), с изключение на gentamicin. Ръстът е статистически значим ($p < 0.0001$), с изключение на отчетения при tigecycline, като той е най-висок при imipenem (59.4% R изолати през 2004–2011 г. срещу 93% през 2014–2022 г.), meropenem (58.6% / 98.7%) и tobramycin (14.7% / 63.5%). В периода 2014–2022 г., включващ MDR *A. baumannii* (MDR-AB) и XDR *A. baumannii* (XDR-AB) с резистентност към карбапенеми (CRAB), най-висока активност демонстрират colistin (0% R изолати), ampicillin-sulbactam (34.6% R) и tigecycline (37.5% R). Сравнителните проучвания сред CRAB изолати в последната декада показват значимо нарастване на устойчивостта към две от АМЛС с най-висока активност ($p < 0.001$), tobramycin (55.6% през 2014–2016 срещу 86.7% през 2017–2022) и tigecycline (22.1% / 84%), и реципрочна находка спрямо ampicillin-sulbactam (41.6% / 13.3%). Също така се отчита

значим ръст в процентния дял на XDR-AB (от 12.4% до 78.7%; $p < 0.0001$), които са сериозно терапевтично предизвикателство в българските болници.

3. За проследения 12-годишен период (2011–2023), при *S. maltophilia* най-висока е чувствителността към minocycline (липса на R изолати), следван от levofloxacin (10% R), trimethoprim-sulfamethoxazole (12% R) и chloramphenicol (16% R). Профилът на антимикробна чувствителност на *S. maltophilia* в мониторираните болници демонстрира относителна хронологична стабилност, с изключение на по-високата резистентност към ceftazidime в периода от 2018 до 2023 г. (81.7% срещу 55.3% през 2011–2016 г.; $p < 0.0001$). При АМЛС от първа линия са установени реципрочни находки – понижаване на резистентността към trimethoprim-sulfamethoxazole в по-късния период (от 13.7% до 7.3%) и увеличаване към levofloxacin (8.3% срещу 13.4%), които не са статистически значими.
4. От одобрените нови антибиотици, сидерофорният цефалоспорин cefiderocol се отличава с най-висока *in vitro* активност срещу трите НФГБ патогена, както следва: *S. maltophilia*, 100%; *P. aeruginosa*, 97.5% и *A. baumannii*, 83.6%. Само 22.5-25% от тестваните изолати *P. aeruginosa* показват чувствителност към комбинираните АМЛС, съдържащи β -лактамази и β -лактамазен инхибитор, а продуцентите на метало- β -лактамази (MBLs) демонстрират абсолютна резистентност към тях. От своя страна карбапенем-резистентните изолати *P. aeruginosa* (CRPA) без MBLs показват по-висока чувствителност ($p < 0.05$), варираща от 31% (при ceftazidime-avibactam и imipenem-relebactam) до 34.5% (meropenem-vaborbactam).
5. Сред проучените CRPA изолати от периода 2015–2023 г. са открити следните гени за широкоспектърни β -лактамази (ESBLs) и MBLs: *bla*_{VEB-like}, включително *bla*_{VEB-9} (24.4%), *bla*_{PER-1} (11.5%), *bla*_{NDM-1} (10.3%), *bla*_{VIM-2} (2.6%) и *bla*_{VIM-4} (1.3%). Резистомният анализ при избрани CRPA показва наличие на множество детерминанти за антимикробна резистентност (AMR), предимно към β -лактами и аминогликозиди. Геномите притежават *sull*, което предполага носителство на интегрони от клас 1. Идентифицирани и детайлно охарактеризирани са следните хромозомно-локализираните мобилни структури: In59-подобен интегрон (във VIM-2-положителен изолат), Tn21 транспозон, включващ *ble*_{MBL}-*bla*_{NDM-1}-*ISAbal25*) и сложно устроен *bla*_{VEB-9}-носец интегрон, показващ най-добри съответствия в TnCentral Database на база максимални точки и общи точки, съответно с Tn5086-CP054343 (*E. coli*) и Tn1412-L36547 (*P. aeruginosa*).

Резистентността към флуорохинолони се дължи на точкови мутации в QRDR (quinolone-resistance-determining regions) на *gyrA* (T83I) и *parC* (S87L) гените и/или CrpP ензим, който фосфорилира ciprofloxacin.

6. Резистентността към карбапенеми на проучените изолати *A. baumannii* се дължи основно на AMR детерминанти за придобити карбапенем-хидролизиращи β -лактамази от клас D (CHDLs) от групи OXA-23-like, OXA-24/40-like и OXA-58-like в асоциация с мобилни генетични елементи, като *ISAbal* се открива в 88% от тях. В периода 2005–2011 г. всички CRAB изолати са носители на *bla*_{OXA-23} и *ISAbal*, разположена пред него. При CRAB изолатите от 2014–2022 г. честотата на вродени и придобити CHDLs е както следва: *bla*_{OXA-51-like} (100%), *bla*_{OXA-23-like} (42.9%), *bla*_{OXA-24/40-like} (35.5%), *bla*_{OXA-23-like} + *bla*_{OXA-24/40-like} (15.9%) и *bla*_{OXA-58-like} (0.3%). Секвенционните техники, включващи и целогеномно секвениране (WGS), откриват OXA-23, OXA-72, OXA-58 и OXA-66. Установени са още *bla*_{PER-1} (10.6%) и *armA*, определящ високо ниво на резистентност към всички аминокликозиди (32.9% през 2005–2011 и 45.5% през 2014–2022). QRDR мутациите S83L в *gyrA* и S80I в *parC* са причина за резистентността към флуорохинолони.
7. Резистентността към карбапенеми в изолирания през 2014 г. щам *A. nosocomialis*, част от ABC complex, се дължи на *bla*_{OXA-58} с разположени *ISAbal3-like* и *ISAbal3* мобилни елементи, съответно пред и след структурния ген.
8. Генетичните механизми на резистентност към cefiderocol, изследвани в първия XDR-AB изолат с *in vitro* резистентност към антибиотика, са комплексни и включват: продукцията на PER-1 ESBL, променена експресия на гените за TonB-зависимите сидерофорни рецептори (*pirA* и *piuA*) и две нови мутации с аминокиселинна (АК) замяна в *bauA*. Допълнителен принос имат мутация в *ftsI*, кодиращ РВРЗ, и вероятна свръхекспресия на хромозомния *bla*_{ADC-73} ген.
9. Резистентността към trimethoprim-sulfamethoxazole при *S. maltophilia* се свързва с гена *sulI* (дихидроптероат синтаза тип-1) във всички R изолати, а при 75.9% от тях е доказано и носителство на *intI1*. Резистомът на изолатите, подложени на WGS, включва AMR детерминанти на вродена резистентност към β -лактами, вкл. карбапенеми (*bla*_{L1} и *bla*_{L2}), аминокликозиди (*aph(3')-Ic* и *aac(6')-Iz*) и tetracycline (*tetA* и *tetB*), а в 1/3 от тях се откриват и придобити AMR генни детерминанти. В два щамса са идентифицирани интегрони от

клас 1, носещи *sull* ген в 3' консервативния си край. Изолат *S. maltophilia* SM130 демонстрира екстензивна резистентност. Неговият интегрон носи касета от гени, кодиращи устойчивост към цефалоспорини, карбапенеми, аминогликозиди, флуорохинолони и chloramphenicol (*bla*_{ОХА-74}-*aac*(6')-*Ib-cr-cmlA7*), докладвана по-рано само в унгарски изолати *P. aeruginosa*.

10. WGS-базираният вируломен анализ при избрани CRPA изолати открива множество детерминанти за фактори на вирулентност, в това число свързани с *адхезия и подвижност; антимикробна активност; антифагоцитно действие* (биосинтез и регулиране на алгинат); *биосърфактант; извънклетъчни ензими* (фосфолипази и протеази); *усвояване на желязо* (пиохелин и пиовердин); *кворум сенсинг; регулиране на двукомпонентни системи; системи за секреция*, вкл. тип III секреторна система (Т3SS) и Т3SS ефекторни протеини; и *токсини*, предполагащи висок патогенен потенциал на изследваните изолати.

11. Най-голям е процентният дял на изолатите *P. aeruginosa* с Т3SS генен профил *exoS*⁺/*exoU*⁺/*exoT*⁺/*exoY*⁺ (41.3%). Генотип *exoS*⁻/*exoU*⁺/*exoT*⁺/*exoY*⁺ е открит в 17.3% от тях, а 7.1% имат характеристики на хипервирулентни (*exoS*⁺/*exoU*⁺/*exoT*⁺/*exoY*⁺). Частта на съдържащите само *exoS* или *exoU* (77.1%) значително надвишава ($p < 0.0001$) групата на *exoS*⁺/*exoU*⁺-положителни изолати (12.2%).

12. Честотата на разпространение на детерминанти за фактори на вирулентност с различни функции, включващи и участие в образуването на биофилм (биофилм-асоциирани гени – БАГ), сред нозокомиалните изолати *A. baumannii* е следната: *ompA* (външномембранен протеин OmpA), 72.7%; *epsA* (капсулен екзополисахарид А), 63.5%; *csuE* (субединица Е на тип I пилусна система), 90.6%; и *bar* (биофилм-асоцииран протеин Bar), 21.6%. Налице е значима разлика ($p < 0.0001$) между относителните дялове на *bar*-положителни изолати от двата главни хронологични периода (63.8% през 2004–2011 г. и едва 5.3% през 2014–2022 г.). Също така *bar* се установява по-често ($p < 0.05$ – 0.01) сред изолатите от ликвор (54.5%) и медицински устройства (40%) в сравнение с тези от ДДП (19.3%), рани (14.8%) и ГДП (5.9%).

13. Биофилм-формираща способност върху полистиренова повърхност демонстрират 95.5% от изследваните MDR-AB изолати, а разпределението според количеството на образувания биофилм е както следва: силни

продуценти – 72.7%, умерени – 18.2%, слаби – 4.5%, и непродуциращи – 4.5%. Преобладаващата част от изолатите (47.7%) притежават четирите БАГ (*bar-ompA-epsA-csuE*), като групата включва силни и умерени продуценти на биофилм (средна $OD_{570}=0.192 \pm 0.042$). Липсата на четирите БАГ (6.8%) се свързва с незначително количество до пълна липса на биофилм (средна $OD_{570}=0.022 \pm 0.005$). Всички *bar*-положителни изолати ($n = 78$) са продуценти на биофилм (62 силни и 16 умерени). При повечето *bar*-отрицателни щамове (8 от 10) е установена слаба или липсваща биофилм-формираща способност, което потвърждава откритата в предходни проучвания корелация между наличие на *bar* и образуване на биофилм при *A. baumannii*.

14. Сред нозокомиалните изолати *S. maltophilia* (2011–2022 г.) се установява висока честота (87.3-99.1%) на следните генетични детерминанти на вирулентност: *stmPr1* ген с два алелни варианта, кодиращ голяма извънклетъчна протеаза StmPr1; *stmPr2* за малка извънклетъчна протеаза StmPr2; Smlt3773 локус, свързан с външномембранна естераза; *plcN1* за нехемолитична фосфолипаза С и *smf-1* за SMF тип 1 фимбрии. Дългият алелен вариант (1621-bp) на *stmPr1* е най-разпространен сред проучените изолати (61.1%), следван от комбинираният 868-bp+1621-bp вариант (17.6%) и *stmPr1*-отрицателният генотип (12.7%). Късият вариант (868-bp) е доказан в малък брой изолати (8.6%).

15. Фенотипните тестове показват протеазна, естеразна и лецитиназна активност съответно при 95%, 98.2% и 17.2% от изолатите *S. maltophilia*. Най-честият генотип сред изолатите с протеазна активност е “*stmPr1* (1621-bp)+*stmPr2*”, докато доминиращият брой от непродуцентите на ензима притежават само *stmPr2*. При естеразата се установява пълно съответствие между генотип и фенотип. Генът *plcN1* се открива в 99.1% от изследваните изолати *S. maltophilia*, независимо от фенотипната експресия на лецитиназна активност.

16. WGS позволява групиране на *S. maltophilia* според алелните варианти на *stmPr1*. Изолатите с дълъг алелен вариант се характеризират с най-малък брой мутации в гените за извънклетъчни протеази и SMF-1 фимбрии, и показват най-силна способност за образуване на биофилм. За разлика от тях, в притежаващите къс алел щамове се идентифицират голям брой мутации в съответните гени и по-слаб биофилм-формиращ капацитет.

17. В нозокомиалните изолати *S. maltophilia* се откриват БАГ с висока честота: *spgM* (бифункционален ензим с фосфоглюкомутазна и фосфоманомутазна активност), 98.6%; *rmlA* (глюкозо-1-фосфат тимидилтрансфераза), 86%; и *rpfF* (DSF синтаза), 66.5%. Най-разпространеният генен профил е *spgM⁺/rmlA⁺/rpfF⁺* (56.1%), който значимо преобладава при изолатите от ДДП, спрямо тези от инфекции с друга локализация ($p < 0.001$).
18. Всички изолати *S. maltophilia*, тествани за биофилм образуване върху полистиренова повърхност ($n = 92$), с изключение на един (умерен продуцент), са определени като силни продуценти, а OD_{550} е в широк диапазон (от 0.177 ± 0.024 до 2.065 ± 0.023). Не са установени значими разлики в количество на образувания биофилм сред изолатите с три (*spgM⁺/rmlA⁺/rpfF⁺*) и два БАГ (*spgM⁺/rmlA⁻/rpfF⁺* и *spgM⁺/rmlA⁺/rpfF⁻*) ($p = 0.214$), както и зависимост между количество биофилм и произход на инфекциозните щамове.
19. Анализът на кодиращите последователности на *rmlA* разкрива 2.5 пъти повече консервативни и над 4 пъти повече неконсервативни АК замени в сравнение с другите два БАГ. Диспропорционалното натрупване на голям брой секвенционни варианти при *rmlA* предполага, че пълната интактност на неговия продукт не е от критична важност за процеса на биофилм образуване от клиничните изолати *S. maltophilia*.
20. При CRPA изолати от три болници в София, подложени на WGS ($n = 16$, от които 11 MBL-положителни), се установява разнообразие от секвенционни типове (STs): ST111 (12.5%), ST233 (6.3%), ST235 (12.5%), ST357 (12.5%), ST480 (6.3%), ST611 (6.3%) и ST654 (43.8%). С изключение на ST480 и ST611, останалите принадлежат към глобални високорискови *P. aeruginosa* клонове. Доминиращият ST654 (от клонален комплекс (CC) 654) включва продуценти на NDM-1, ST111 (CC111) – VIM-2 продуценти, а ST357 (CC357) – *bla_{VEB-9}*-положителни изолати. Доказани са вътреболнична циркулация на *bla_{NDM-1}*-съдържащи щамове *P. aeruginosa* с много висока степен на клонална свързаност (разлика от 7-44 SNPs) в УМБАЛ „Лозенец“, ендемични VEB-9-продуциращи XDR-PA в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (4 SNPs), както и тяхното клонално сходство и принадлежност към общи STs с клинични изолати с близък резистом от България и други балкански държави.

21. Проспективните RAPD-базирани проучвания върху молекулярната епидемиология на нозокомиалните инфекции, причинени от *A. baumannii* в четири университетски болници в страната, показват вътреболнична дисеминация и трайно присъствие на CHDL-продуциращи MDR/XDR-AB кълстерни групи (CGs) с характер на ендемични клонове, чието разнообразие е най-голямо във Военномедицинска академия в периода 2014–2016 г. Епидемиологичното типизиране на CRAB изолати от 2017–2022 г. разкрива явно доминиране на IC2 (76.7%). WGS-базираният MLST анализ на CRAB/XDR-AB изолати от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (Aba52 и Aba176) и УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна (Aba190) ги класифицира съответно в ST2 и ST636, които са част от CC2 или IC2. Филогеномният анализ открива клонална връзка на нашите изолати с XDR-AB от Югоизточна Европа, в това число Гърция, Хърватия, Унгария и Румъния. Също така cefiderocol-резистентният Aba52 / ST2 (2018 г.) е най-тясно свързан с четири cefiderocol-резистентни нозокомиални изолата *A. baumannii* от Египет (2020–2021 г.), отнасящи се към ST570 и ST600 (единични локусни варианти на ST2).

22. Епидемиологичното типизиране на изолати *S. maltophilia* от пет болници в София, разделени в два хронологични периода (2011–2013 и 2014–2016 г.), демонстрира генетична хетерогенност на проучената популация (по 14 CGs във всеки период и общо 13 щамове без кълстерна принадлежност), вътреболнично и междуболнично разпространение на клонално свързани щамове. WGS-базираният MLST анализ потвърждава тези находки. Деветте щамове *S. maltophilia* (4 от първи и 5 от втори период) се асоциират с общо 7 STs, три от които се откриват за първи път в света (ST819, ST820 и ST826), при това в двата периода изолатите от различни CGs показват принадлежност към различни STs.

VI. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

Научни приноси с оригинален характер

1. За първи път в България е проведено мащабно, комплексно проучване, насочено към хронологични тенденции в антибиотичната резистентност, генетични механизми на резистентност към различни АМЛС, фактори на вирулентност, образуване на биофилм и молекулярната епидемиология на терапевтично проблемни НФГБ изолати (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*) в единадесет български болници за 20-годишен период (2004–2023).
2. Докладвани са първите за страната клинични изолати *P. aeruginosa*, които продуцират VIM-2 метало- β -лактамаза (MBL) и демонстрират разширена (екстензивна) лекарствена резистентност. Посредством целогеномно секвениране (WGS) са определени локализация и генетично обкръжение на кодиращия *bla*_{VIM-2} ген, принадлежност към глобалния високорисков клон ST111 и серотип O12, пълен резистом и вирулом.
3. За първи път в България е извършен филогеномен анализ, включващ нозокомиални изолати *P. aeruginosa* от настоящото проучване и различни части на света, носещи *bla*_{NDM-1} и *bla*_{VEB-9}, който представя епидемиологични връзки, клонална принадлежност и детерминанти на антимикробна резистентност на щамовете. За първи път в света е открит *bla*_{NDM-1}-положителен изолат *P. aeruginosa*, отнасящ се към редкия ST611 (Pae57 от кръв на пациент с COVID-19, лекуван в УМБАЛ „Лозенец“).
4. За първи път в България и в страните от Източна Европа е установено клонално разпространение на продуценти на плазмид-медирана ArmA 16S рРНК метилаза, отговорна за високо ниво на резистентност към всички аминогликозиди, сред нозокомиалните изолати *A. baumannii* от УМБАЛ „Александровска“ в периода 2005–2011 г. Освен това е доказана копродукция на ArmA и OXA-23 карбапенемаза. Установена е висока честота на *armA*-положителни MDR/XDR-AB изолати във всички мониториращи болници и през последната декада.
5. За първи път на Балканите и в Европа е идентифициран карбапенем-резистентен изолат *A. nosocomialis*, продуцент на OXA-58 карбапенемаза, при който е определено генетичното обкръжение на кодиращия ген.
6. За първи път в България се докладват cefiderocol-резистентни PER-1-продуциращи изолати *A. baumannii*. Посредством WGS са изследвани комплексните механизми на устойчивост към сидерофорния цефалоспорин и други АМЛС на един от щамовете, който е подложен и на филогеномен анализ заедно с всички cefiderocol-резистентни изолати *A. baumannii* от света с депозиращи геноми в свободностъпните бази данни.
7. В хода на настоящото проучване е изолиран щам *S. maltophilia* SM130 с екстензивна лекарствена резистентност (trimethoprim-sulfamethoxazole, levofloxacin, ceftazidime и chloramphenicol), който е силен продуцент на биофилм. За първи път в света в изолат *S. maltophilia* е идентифицирана интегрон-

асоциирана генна касета *bla*_{OXA-74}-*aac*(6')-*Ib-cr-cmlA7*, откривана преди това единствено в чуждестранни изолати *P. aeruginosa*.

8. Изследванията върху факторите на вирулентност на *A. baumannii* и *S. maltophilia*, проведени чрез генетични амплификационни техники, WGS, фенотипни методи за определяне на ензимна активност и количество на биофилм върху полистиренова повърхност, са първи по рода си в България и разширяват фундаменталните знания за инфекциозната патогенеза.
9. Високата честота и сходното разпространение на детерминанти на вирулентността, кодиращи извънклетъчни протеази, естераза, нехемолитична фосфолипаза С и тип 1 фимбрии, сред изолатите *S. maltophilia* от различни източници не позволява диференцирането им по вирулентен потенциал. За първи път е установено, че WGS може да осигури групиране на изолатите, базирано на алелите на гена за голямата извънклетъчна протеаза StmPr1.
10. За първи път в света са идентифицирани три нови секвенционни типа на *S. maltophilia*, ST819, ST820 и ST826, които са включени в PubMLST схемата за типизиране на вида (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_smaltophilia_seqdef).
11. При епидемиологично генотипизиране с RAPD-PCR е установено междуболнично разпространение на клонално свързани щамове *S. maltophilia*, неопишвано към момента в литературата.

Научни приноси с потвърдителен характер

1. В университетска болница в София са открити карбапенем-резистентни изолати *P. aeruginosa* с разширена и трудна за лечение лекарствена резистентност (XDR-PA и DTR-PA) от високорисков клон ST654, които са носители на гени за NDM-1 MBL. В изолатите е идентифициран Tn21 транспозон, който носи *ble*_{MBL}-*bla*_{NDM-1}-*ISAbal25*, чиято структура е докладвана по-рано в NDM-1 *P. aeruginosa* продуцент от съседна Сърбия.
2. Потвърдено е широкото разпространение на гени за придобити карбапенем-хидролизиращи ензими от молекулярен клас D и асоциирани с тях мобилни генетични елементи сред карбапенем-резистентните изолати *A. baumannii* (CRAB) в български университетски болници в проследените хронологични периоди (2005–2011 и 2014–2022).
3. Доказана е вътреболнична дисеминация на клонално свързани CRAB с множествена и разширена лекарствена резистентност, персистирането на ендемични клонове в мониторираните болници и асоциацията им с високорискови секвенционни типове и международни клонове.
4. Потвърдени са установената от други автори висока честота на разпространение на гените за тип III ефекторни протеини в клинични изолати *P. aeruginosa*, вариабилното разпространение на T3SS генотипове според локализацията на инфекцията, обичайното взаимно изключване на *exoS* и *exoU* в генома на един и

същи щам и връзката на *exoS*⁺ и *exoU*⁺ генотипове с определени високорискови клонове.

5. Потвърдена е по-високата мутационна изменчивост на *rmlA* спрямо другите биофилм-асоциирани гени, предполагащо, че пълната интактност на неговия продукт не е от критична значимост за процеса на биофилм образуване от клиничните изолати *S. maltophilia*.

Научни приноси с приложен характер

1. Създаден е дизайн на редица праймери за фактори на вирулентност при трите изследвани НФГБ патогена, които са успешно приложени за първи път в стандартен PCR, RT-qPCR и секвениращи техники, в това число: секвениращи праймери за *exoS* и *exoU* при *P. aeruginosa*, праймери за детекция на *plcN1* и биофилм-асоциираните гени *spgM*, *rmlA* и *rpfF* при *S. maltophilia*, праймери за анализ на експресията на *pirA* и *piuA* гени за TonB-зависими сидерофорни рецептори при *A. baumannii*.
2. За първи път в България е проведено целогеномно секвениране на клинични изолати *A. baumannii* и *S. maltophilia*. Секвенирани и разчетени цели геноми са депозирани и налични в GenBank, NCBI със следните номера: JARNMV000000000 (*A. baumannii* Aba52, XDR и cefiderocol-резистентен), JARNMW000000000 (*A. baumannii* Aba176, XDR), JARNMX000000000 (*A. baumannii* Aba190, XDR), JABVAZ000000000 (*S. maltophilia* SM130, XDR и силен продуцент на биофилм). Геномите на 4 нозокомиални изолата *S. maltophilia* от нови секвенционни типове са депозирани в базата данни на PubMLST и са налични със следните номера: id 1082 (SM148, SXT-резистентен, ST819), id 1083 (SM8, ST820), id 1090 (SM79, SXT-чувствителен, ST820) и id 1089 (SM62, SXT-чувствителен, ST826).
3. В GenBank, NCBI са депозирани и налични геномите на 10 карбапенем-резистентни, XDR изолата *P. aeruginosa* от глобални високорискови клонове, съдържащи гени за MBLs и ESBLs: JAGFBD000000000 (Pae3007bg, *bla*_{VIM-2}-положителен, ST111), BioProject accession No PRJNA1096960 (включващ геномите на 8 *bla*_{NDM-1}-положителни изолата, ST654 и ST611) и BioProject accession number PRJNA1138419 (2 *bla*_{VEB-9}-положителни изолата, ST357).

VII. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

Научни публикации, свързани с дисертационния труд

Публикации в издания с импакт фактор

1. **Strateva T.**, Stratev A., Peykov S. Genomic insights into Vietnamese extended-spectrum β -lactamase-9-producing extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates belonging to the high-risk clone ST357 obtained from Bulgarian Intensive Care Unit patients. *Pathogens*. 2024; 13 (9): 719. <https://doi.org/10.3390/pathogens13090719> (IF₂₀₂₃ 3.3)
2. **Strateva T.**, Keuleyan E., Peykov S. Genomic insights into NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Current status in a Bulgarian tertiary hospital and on the Balkans. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2024; 71 (2): 99-109. (IF₂₀₂₃ 1.3)
3. **Strateva T.**, Peykov S. First detection of a cefiderocol-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Bulgaria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2024; 71 (1): 25-36. (IF₂₀₂₃ 1.3)
4. **Strateva T.**, Trifonova A., Stratev A., Peykov S. Genotypic and phenotypic insights into virulence factors of nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* isolates collected in Bulgaria (2011–2022). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2023; 70 (3): 220-230. (IF₂₀₂₃ 1.3)
5. **Strateva T. V.**, Sirakov I., Stoeva T. J., Stratev A., Peykov S. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Bulgarian Intensive Care Unit patients. *Microorganisms*. 2023; 11 (4): 875. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040875> (IF₂₀₂₃ 4.1)
6. Peykov S., **Strateva T.** Whole-genome sequencing-based resistome analysis of nosocomial multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative pathogens from the Balkans. *Microorganisms*. 2023; 11 (3): 651. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030651> (IF₂₀₂₃ 4.1)
7. **Strateva T.**, Trifonova A., Sirakov I., Borisova D., Stancheva K., Keuleyan E., Setchanova L., Peykov S. Analysis of biofilm formation in nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* isolates collected in Bulgaria: An 11-year study (2011–2022). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2023; 70 (1): 11-21. (IF₂₀₂₃ 1.3)
8. **Strateva T.**, Setchanova L., Peykov S. Characterization of a Bulgarian VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate belonging to the high-risk sequence type 111. *Infect. Dis. (Lond)*. 2021; 53 (11): 883-887. (IF₂₀₂₁ 5.838)
9. **Strateva T.**, Trifonova A., Savov E., Mitov I., Peykov S. Characterization of an extensively drug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolate with strong biofilm formation ability from Bulgaria. *Infect. Dis. (Lond)*. 2020; 52 (11): 841-845. (IF₂₀₂₀ 3.404)
10. Stratev A., Tanova R., Dimov S., Mitov I., **Strateva T.** Clonal spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates among Bulgarian critically ill patients undergoing renal replacement therapy (2016–2018). *Infect. Dis. (Lond)*. 2020; 52 (6): 430-433. (IF₂₀₂₀ 3.404)
11. **Strateva T.**, Sirakov I., Savov E., Mitov I. First report of an OXA-58 carbapenemase-producing *Acinetobacter nosocomialis* clinical isolate in the Balkan States. *Comptes Rendus de l'Academie bulgare des Sciences (CR ACAD BULG SCI)*. 2019; 72 (11): 1557-1564. (IF₂₀₁₉ 0.343)
12. Savov E., Trifonova A., Kovachka K., Kjosseva E., **Strateva T.** Antimicrobial *in vitro* activities of ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam and plazomicin against

- multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* – a pilot Bulgarian study. *Infect. Dis. (Lond)*. 2019; 51 (11-12): 870-873. (IF₂₀₁₉ 2.494)
13. **Strateva T.**, Trifonova A., Savov E., Dimov S., Mitov I. An update on the antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* in Bulgaria: a 5-year study (2011–2016). *Infect. Dis. (Lond)*. 2019; 51 (5): 387-391. (IF₂₀₁₉ 2.494)
 14. **Strateva T.**, Sirakov I., Stoeva T., Stratev A., Dimov S., Savov E., Mitov I. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014-2016). *J. Glob. Antimicrob. Res.* 2019; 16: 266-273. (IF₂₀₁₉ 2.706)
 15. Trifonova A., **Strateva T.** *Stenotrophomonas maltophilia* – a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Infect. Dis. (Lond)*. 2019; 51 (3): 168-178. (IF₂₀₁₉ 2.494)
 16. **Strateva T.**, Sirakov I., Savov E., Mitov I. First detection of an OXA-58 carbapenemase-producing *Acinetobacter nosocomialis* clinical isolate in the Balkan States. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2018; 13: 123-124. (IF₂₀₁₈ 2.469)
 17. **Strateva T.**, Markova B., Marteva-Proevska Y., Ivanova D., Mitov I. Widespread dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase and ArmA 16S ribosomal RNA methylase in a Bulgarian university hospital. *Braz. J. Infect. Dis.* 2012; 16 (3): 307-310. (IF₂₀₁₂ 1.036)
 18. **Strateva T.**, Markova B., Markovska R., Marteva-Proevska Y., Ivanova D., Mitov I. Emergence of 16S rRNA methylase-producing nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates in a University hospital in Bulgaria. *J. Chemother.* 2011; 23 (6): 374-375. (IF₂₀₁₁ 1.084)
 19. **Strateva T.**, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann. Microbiol.* 2011; 61 (4): 717-732. (IF₂₀₁₁ 0.689)
 20. **Strateva T.**, Markova B., Ivanova D., Mitov I. Distribution of the type III effector proteins-encoding genes among nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria. *Ann. Microbiol.* 2010; 60 (3): 503-509. (IF₂₀₁₀ 0.350)
 21. Mitov I., **Strateva T.**, Markova B. Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz. J. Microbiol.* 2010; 41 (3): 588-595. (IF₂₀₁₀ 0.632)
 22. **Strateva T.**, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58 (9): 1133-1148. (IF₂₀₁₀ 2.272)
 23. **Strateva T.**, Todorova A., Ouzounova-Raykova V., Mitov I. Emergence of a PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Bulgaria. *J. Chemother.* 2008; 20 (3): 391-392. (IF₂₀₀₈ 0.843)

Публикации в издания без импакт фактор, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация

24. **Стратева Т.**, А. Стратев, Р. Гергова. Клиничен спектър и глобално разпространение на инфекциите, причинени от терапевтично проблемни *Pseudomonas aeruginosa*. *Медицински преглед*. 2024; 60 (5): 16-24. **Web of Science**
25. **Стратева Т.**, А. Трифонова, А. Стратев, С. Пейков, Д. Ниязи, Т. Стоева, Е. Кьоляян. Хронологична антимикробна чувствителност на нозокомиални изолати *Stenotrophomonas maltophilia* от университетски болници в България (2011–2023 г.). *Медицински преглед*. 2024; 60 (4): 42-49. **Web of Science**

26. **Стратева Т.**, А. Трифонова, А. Стратев, С. Пейков. Молекулярногенетични проучвания върху факторите на вирулентност на нозокомиални изолати *Stenotrophomonas maltophilia*. Медицински преглед. 2022; 58 (1): 21-28. **Web of Science**
27. **Стратева Т.**, А. Стратев. Инфекции, причинени от карбапенем-резистентни *Acinetobacter baumannii* – терапевтичен подход при критично болни пациенти с бъбречна дисфункция. Медицински преглед. 2021; 57 (2): 24-32. **Web of Science**
28. Стратев А., П. Кенаров, Р. Танова, **Т. Стратева**. Микробиологични аспекти на инфекции, свързани с диализен катетър, при критично болни пациенти на бъбречнозаместителна терапия. Медицински преглед. 2020; 56 (4): 31-38. **Web of Science**
29. **Стратева Т.**, А. Трифонова, Д. Борисова, С. Пейков, С. Стоицова, И. Митов. Образуване на биофилм от клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia* – фенотипни и генотипни характеристики. Медицински преглед. 2020; 56 (3): 43-50. **Web of Science**
30. **Стратева Т.**, А. Трифонова, И. Сираков, С. Пейков, И. Митов. Молекулярногенетични проучвания върху биофилм-свързаните гени на *Stenotrophomonas maltophilia*. Медицински преглед. 2020; 56 (2): 36-42. **Web of Science**
31. Трифонова А., Е. Савов, **Т. Стратева**. Молекулярногенетични проучвания върху основни механизми на резистентност към trimethoprim-sulfamethoxazole на клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia*. Медицински преглед. 2020; 56 (1): 43-48. **Web of Science**
32. Savov E., Kovachka K., Trifonova A., Kioseva E., **Strateva T.** Treatment Options for Infections Caused by Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. Acta Microbiologica Bulgarica. 2019; 35 (1): 3-8. **Scopus**
33. Трифонова А., Е. Савов, Е. Къосева, **Т. Стратева**. Клинико-лабораторни аспекти на инфекции, причинени от *Stenotrophomonas maltophilia*. Медицински преглед. 2019; 55 (4): 29-37. **Web of Science**
34. Трифонова А., Е. Савов, **Т. Стратева**. Приложение на молекулярно-генетични методи в лабораторната диагностика на инфекциите, причинени от *Stenotrophomonas maltophilia*. Български медицински журнал. 2019; 13 (1): 15-19. **Web of Science**
35. **Стратева Т.** Фактори на вирулентност в патогенезата на инфекциите, причинени от *Acinetobacter baumannii*. Медицински преглед. 2018; 54 (4): 9-21. **Web of Science**
36. **Стратева Т.**, Т. Стоева, Е. Савов, Ю. Мартева-Проевска, А. Трифонова, А. Стратев, Ц. Велинов, И. Митов. Карбапенем-нечувствителни нозокомиални изолати *Acinetobacter baumannii* с множествена лекарствена резистентност (2014-2016 г.): надзор на антимикробната устойчивост и препоръки за лечение. Медицински преглед. 2017; 53 (6): 27-36. **Web of Science**
37. Stoyanova G. P., **Strateva T. V.**, Atanasova S. T., Miteva D. S., Papochieva V. E., Perenovska P. I. Pulmonary exacerbation due to colistin-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in a Bulgarian cystic fibrosis patient. Folia Med. (Plovdiv). 2016; 58 (2): 136-140. **Scopus, SJR₂₀₁₆ 0.213; Web of Science**
38. **Strateva T.**, Marteva-Proevska Y., Markova B., Petrova G., Mitov I. Prevalence of the type III effector proteins-encoding genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Probl. Inf. Parasit. Dis. 2009; 37 (2): 21-24. **Scopus, SJR₂₀₀₉ 0.1**

Публикации в издания с научно рецензиране

39. **Стратева Т.** *Acinetobacter baumannii*: механизми на резистентност към антимикробни лекарствени средства. Съвременна медицина. 2019; 63 (2): 56-69.
40. Трифонова А., Е. Савов, **Т. Стратева**. Нарастваща резистентност на клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia* към trimethoprim-sulfamethoxazole и терапевтични възможности при инфекциите. Съвременна медицина. 2019; 63 (2): 3-10.
41. Трифонова А., Е. Савов, **Т. Стратева**. Биопилм образуване от *Stenotrophomonas maltophilia*: етапи, участие в патогенезата на инфекциите и възможни терапевтични подходи. Детски и инфекциозни болести. 2018; 10 (2): 42-51.

Участия в научни форуми, свързани с дисертационния труд

1. **Стратева Т.**, Е. Кьолян, Д. Хамидов, С. Пейков. NDM-1-продуциращи *Pseudomonas aeruginosa*: Настоящо състояние на проблема в българска университетска болница и на Балканите. XXII Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите. София, 13.09. – 15.09.2024 г. Парк Хотел Москва. Сборник научни трудове: 21-22. (Доклад)
2. **Стратева Т.**, А. Стратев, П. Переновска, Г. Петрова. Диализен катетър-свързани инфекции при критично болни пациенти, провеждащи бъбречнозаместителна терапия. Национална Конференция за педиатри и ОПЛ с международно участие: „Децата на България“, 22-25 май 2021 г. Книжка с резюмета: стр. 48. (Електронен постер)
3. Peykov S., Kirov B., Stancheva M., **Strateva T.**, Miteva D. Characterization of a trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolate from Bulgaria. Scientific conference “Klement’s days”. 5th November 2020, Sofia, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”. Abstracts: 85. (Постер)
4. Miteva D., Stancheva M., Gamizova T., Karadakova P., Strateva T., Peykov S. Whole-genome sequencing-based characterization of a metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Bulgaria. Scientific conference “Klement’s days”. 5th November 2020, Sofia, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”. Abstracts: 92. (Постер)
5. **Стратева Т.**, А. Трифонова, С. Пейков, Е. Савов, И. Митов. Чувствителност към антимикробни лекарствени средства на клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia*: механизми на резистентност към trimethoprim-sulfamethoxazole и терапевтичен подход. XVIII Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите. София, 30.09.–02.10.2020, Парк-Хотел “Москва”. Сборник научни трудове: 22-23. (Доклад)
6. **Стратева Т.**, А. Трифонова, Е. Савов, Г. Петрова, П. Переновска, И. Митов. Клинико-лабораторни аспекти на инфекции, причинени от *Stenotrophomonas maltophilia*. Юбилейна Национална Конференция за ОПЛ и педиатри „115 години Първа Детска клиника УМБАЛ „Александровска” Онлайн. Постерна сесия: 12 септември 2020 (събота), 12.45 ч. – 13.45 ч. Книжка с резюмета: стр. 48-49. (Електронен постер)
7. **Стратева Т.**, А. Трифонова, Е. Савов, И. Митов. Биопилм образуване от *Stenotrophomonas maltophilia* – преглед на литературата и предварителни резултати. Сесия VIII – Инфекции, свързани с медицинското обслужване и при имунодефицитни състояния. XVII Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите. София, 9–11 май 2019 г, Парк-хотел “Москва”. Сборник научни трудове: стр. 39-40. (Доклад)

8. Савов Е., А. Трифонова, Кр. Ковачка, Е. Кьосева, **Т. Стратева**. Проучване *in vitro* активността на антимикробните комбинации ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam и plazomicin върху множествено-резистентни клинични щамове *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. Сесия II – Микробна лекарствена резистентност. XVII Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите. София, 9–11 май 2019 г, Парк-хотел “Москва”. Сборник научни трудове: стр. 14. (Доклад)
9. Savov E., Kovachka K., Trifonova A., Kioseva E., **Strateva T.** New drugs for treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation. Hotel Augusta / Hisarya, Bulgaria, October 10th – 13th, 2018. Session Two “Medical Microbiology”, Oral Reports: MM5 (11:30 – 11:40). Program and Abstracts: 63. (Доклад)
10. Stratev A., Marinova R., **Strateva T.**, Sirakov I., Temelkov A., Mitov I. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections in ICU hemodialysis patients. Second Young Scientists Seminar on Genetics with International Participation – SGIP 2018, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Sofia, 03.10.2018 – 05.10.2018. Book of Abstracts: 41. (Постер)
11. Trifonova A., Savov E., **Strateva T.** Application of a highly specific PCR method for identification of *Stenotrophomonas maltophilia*. Second Young Scientists Seminar on Genetics with International Participation – SGIP 2018, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Sofia, 03.10.2018 – 05.10.2018. Book of Abstracts: 43. (Постер)
12. **Стратева Т.**, А. Трифонова, Д. Борисова, С. Стоицова, Е. Савов, Г. Петрова, П. Переновска, И. Митов. Образуване на биофилм от клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia*. XIX-та Национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие. Слънчев бряг, 18–20 май 2018 г.: стр. 38. (Постер)
13. Савов Е., А. Трифонова, Е. Кьосева, Св. Димов, И. Митов, **Т. Стратева**. *Stenotrophomonas maltophilia*: антимикробна чувствителност и епидемиологично типизиране на нозокомиални изолати за 5-годишен период (2011 – 2016 г.). 16 Национален Конгрес по Клинична Микробиология и Инфекции, София, 10–12 май 2018 г, Парк-хотел “Москва”. Сесия II: Микробна лекарствена резистентност. Сборник научни трудове: стр. 15. (Доклад)
14. **Strateva T.**, Trifonova A., Borisova D., Stoitsova D., Mitov I., Savov E. O0510. Assessment of biofilm formation by nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Bulgaria. (2018-04-22, 14:30-14:35). European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 21 – 24 April 2018, Madrid, Spain; OE098 – Translational aspects of Gram-negative bacterial pathogenesis, Section category: 09 Microbial pathogenesis & biofilm, Mini Oral ePoster sessions. (Електронен постер с устно представяне)
15. **Strateva T.**, Sirakov I., Savov E., Mitov I. First report of an OXA-58-producing *Acinetobacter nosocomialis* clinical isolate in the Balkan States. 10th Balkan Congress of Microbiology “Microbiologia Balkanica’2017”. November 16-18, 2017, Sofia; Poster Session Two, Nosocomial infections, Poster Nos-32; Abstracts: p. 121. (Постер)
16. Savov E., Trifonova T., **Strateva T.**, Kioseva E., Pfeifer Y. *Acinetobacter* – an increasing problem for hospital infectious pathology. 10th Balkan Congress of Microbiology “Microbiologia Balkanica’2017”. November 16-18, 2017, Sofia; Session Four B, Nosocomial infections, Oral report Nos-7; Abstracts: p. 96. (Доклад)

17. **Стратева Т.**, Т. Стоева, Е. Савов, Ю. Мартева-Проевска, А. Трифонова, И. Сираков, И. Митов. Нозокомиални изолати *Acinetobacter baumannii* с множествена лекарствена резистентност (2014-2016) – механизми на устойчивост и епидемиологично типизиране. 15 Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите. София, 17-19 май 2017 г., Парк-хотел “Москва”. Сборник научни трудове: стр. 13-14. (Доклад)
18. **Стратева Т.**, Б. Маркова, Ю. Мартева-Проевска, Д. Иванова, И. Митов. Разпространение на ендемичен клон от нозокомиални щамове *Acinetobacter baumannii* с множествена лекарствена резистентност, продуциращи ArmA 16S рРНК метилаза и OXA-23 карбапенемаза, в Университетска болница в София. 10 Национален Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите. Хотел Новотел Пловдив, Пловдив, 26–28 април 2012 г.: стр. 38-39. (Доклад)
19. Mitov I., Gergova R., **Strateva T.** Antibiotic resistance and virulence factors in opportunistic Gram-negative bacteria. 1st Southeast European Conference of Chemotherapy and Infection incorporating 20th Jubilee Annual Assembly of IMAV. 6-10 May 2010, Varna, Bulgaria. SY-19 “Current trends in investigations on bacterial resistance and pathogenicity”. Journal of IMAV – Annual Proceeding; Volume 16, Book 1-C, 2010, Part C “Infections – clinical and microbiological aspects”: pp. 12-13. (Доклад)
20. **Strateva T.**, Markova B., Mitov I., Ouzounova-Raykova V., Petrova G. P1304: Prevalence of virulence genes among nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Bulgaria. Clin. Microbiol. Infect. 2008; volume 14, 18th ECCMID, Barcelona, Spain, 19-22 April 2008: S368. (Постер)

Участия в научни проекти, свързани с дисертационния труд

1. **Водещ изследовател** на изследователски проект по Договор № 27/2005 г. от конкурс „Грант-2005“ (Медицински университет – София) на тема: „Механизми на устойчивост към бета-лактами, аминогликозиди и флуорохинолони на полирезистентни клинични изолати *Pseudomonas aeruginosa*“.
2. **Водещ изследовател** на изследователски проект по Договор № 33/2007 г. от конкурс „Грант-2007“ (Медицински университет – София) на тема: „Молекулярно-генетични проучвания върху факторите на вирулентност на клинично-значими щамове *Pseudomonas aeruginosa*“.
3. **Водещ изследовател** на изследователски проект по Договор № 20/2009 г. от конкурс „Грант-2009“ (Медицински университет – София) на тема: „Молекулярно-генетични и биохимични проучвания върху неураминидазата и тип III ефекторните протеини, продуцирани от клинично значими щамове *Pseudomonas aeruginosa*“.
4. **Водещ изследовател** на изследователски проект по Договор № 4/2016 г. от конкурс „Грант-2016“ (Медицински университет – София) на тема: „Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност към карбапенеми на проблемни клинични изолати *Acinetobacter baumannii* от четири университетски болници в България“.
5. **Водещ изследовател** на изследователски проект по Договор № Д-63/23.04.2019 г. от конкурс „Грант-2019“ (Медицински университет – София) на тема: „Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху образуването на биофилм от клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia*“.

6. **Водещ изследовател** на изследователски проект по Договор № Д-134/14.06.2022 г. от конкурс „Грант-2022“ (Медицински университет – София) на тема: „Основни генотипни и фенотипни характеристики на вирулентността на клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia* от български университетски болници (2011–2021 г.)“.
7. **Участник** в изследователски екип по Договор № 1-С/2008 г. от конкурс „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения-2008“ (Медицински университет – София) на тема: „Молекулярно-генетични проучвания върху антимикробната резистентност: механизми и разпространение при медицински значими бактерии през последните пет години в България“.
8. **Участник** в изследователски екип по Договор № 54/2012 г. от конкурс „Грант-2012“ (Медицински университет – София) на тема: „Молекулярно-генетични проучвания и епидемиологично типизиране на клинично-значими щамове *Stenotrophomonas maltophilia*“.
9. **Научен ръководител** на докторант магистър по генетика Славил Звезделинов Пейков, изпълнител на Договор № Д-100/29.05.2024 г. от конкурса „Млад изследовател-2024“ (Медицински университет – София) на тема: „Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху механизмите на резистентност към карбапенеми на терапевтично проблемни изолати *Pseudomonas aeruginosa*“.