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)

Дисертационен труд

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.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ……7

1. ВЪВЕДЕНИЕ……9
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР……...13
2.1. Таксономичен статус на най-честите и клинично значими НФГБ…….....13
2.2. Инфекции, причинени от терапевтично проблемни НФГБ……14
2.2.1. Инфекции, причинени от *P. aeruginosa*……14
2.2.2. Инфекции, причинени от *A. baumannii*……23
2.2.3. Инфекции, причинени от *S. maltophilia*……...28
2.3. Фактори на вирулентност в патогенезата на инфекции, причинени от НФГБ…….33
2.3.1. Фактори на вирулентност на *P. aeruginosa*……..33
2.3.1.1. Външна мембрана: ЛПЗ и протеини……...33
2.3.1.2. Ресни (флагели)…….39
2.3.1.3. Тип IV пили……...40
2.3.1.4. Системи за секреция на протеини……...41
2.3.1.5. Други извънклетъчни фактори на вирулентност……...45
2.3.1.6. Рамнолипиди……48
2.3.1.7. Системи за придобиване на желязо……49
2.3.1.8. Quorum sensing……..49
2.3.2. Фактори на вирулентност на *A. baumanni*……...51
2.3.2.1. Външна мембрана: ЛПЗ и външномембранни протеини……..53
2.3.2.2. Външномембранни везикули……...55
2.3.2.3. Капсулни полизахариди……57
2.3.2.4. Нефлагеларна подвижност……...58
2.3.2.5. Системи за секреция на протеини……...58
2.3.2.6. Извънклетъчни ензими……60
2.3.2.7. Системи за свързване (хелатиране) на метали……...61
2.3.2.8. Пеницилин-свързващ протеин 7/8 и β-лактамаза PER-1……...63
2.3.2.9. Quorum sensing……..64
2.3.3. Фактори на вирулентност на *S. maltophilia*……64
2.3.3.1. Извънклетъчни ензими……64
2.3.3.2. Хемолизин и цитотоксини……...67
2.3.3.3. Системи за усвояване на желязо……..68
2.3.3.4. Външна мембрана: ЛПЗ и външномембранни протеини……..69
2.3.3.5. Външномембранни везикули……...70
2.3.3.6. Пили……...70
2.3.3.7. Непилусни адхезини……72
2.3.3.8. Ресни (флагели)……72
2.3.3.9. Quorum sensing……..73
2.4. Биофилм образуване от НФГБ……..74
2.4.1. Биофилм образуване от *P. aeruginosa*……..75
2.4.2. Биофилм образуване от *A. baumannii*……...76
2.4.2.1. Значение на биофилма в инфекциозната патогенеза……77
2.4.2.2. Фактори, влияещи върху биофилм формирането на *A. baumannii*……...77

2.4.2.3. Детерминанти на вирулентност, асоциирани с биофилм образуване и биофилм-специфична резистентност при *A. baumannii*……..78
2.4.2.4. Биофилм и антимикробна резистентност……...79
2.4.3. Биофилм образуване от *S. maltophilia*……..80
2.4.3.1. Биофилми върху различни повърхности……80
2.4.3.2. Значение на биофилма в инфекциозната патогенеза……81
2.4.3.3. Условия и етапи на биофилм формиране……82
2.4.3.4. Молекулярно-генетични механизми, участващи в образуването на биофилм…...83
2.4.3.5. Биофилм и антимикробна резистентност……...84
2.5. Механизми на резистентност към АМЛС при терапевтично проблемни НФГБ……..85
2.5.1. Механизми на резистентност при *P. aeruginosa*……85
2.5.1.1. Резистентност към β-лактами……..86
2.5.1.1.1. Ензимни механизми на резистентност към β-лактами……86
2.5.1.1.2. Резистентност към β-лактами, дължаща се на променен пермеабилитет на ВМ……94
2.5.1.1.3. Резистентност към β-лактами, медиирана от активен ефлукс……95
2.5.1.1.4. Резистентност към β-лактами, дължаща се на променена мишена……97
2.5.1.2. Резистентност към аминогликозиди……97
2.5.1.3. Резистентност към флуорохинолони……...99
2.5.1.4. Резистентност към полимиксини……99
2.5.2. Механизми на резистентност при *A. baumannii*……101
2.5.2.1. Резистеност към карбапенеми……...105
2.5.2.1.1. Ензимни механизми на резистентност към карбапенеми……..105
2.5.2.1.2. Резистентност към карбапенеми, дължаща се на променен пермеабилитет на ВМ……..109
2.5.2.1.3. Роля на активния ефлукс за развитие на резистентност към карбапенеми и MDR……110
2.5.2.1.4. Резистентност към карбапенеми, дължаща се на променена мишена……..110
2.5.2.2. Резистентност към аминогликозиди……..110
2.5.2.3. Резистентност към тетрациклини……..112
2.5.2.4. Резистентност към флуорохинолони……113
2.5.2.5. Резистентност към диаминопиримидини – сулфонамиди……..114
2.5.2.6. Резистентност към полимиксини……..115
2.5.3. Механизми на резистентност при *S. maltophilia*……...115
2.5.3.1. Резистентност към β-лактами……117
2.5.3.2. Резистентност към аминогликозиди……..117
2.5.3.3. Резистентност към trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)……118
2.5.3.4. Резистентност към флуорохинолони……118
2.6. Глобална популационна структура на терапевтично проблемни НФГБ……..119
2.6.1. Високорискови епидемични клонове на *P. aeruginosa* и тяхната връзка с хоризонтално придобити β-лактамази……...119
2.6.2. Глобална епидемиология на *A. baumannii*……121
2.6.3. Популационна структура на *S. maltophilia*……123
2.7. Нови антибиотици в лечението на инфекции, причинени от терапевтично проблемни НФГБ……...124
2.7.1. Ceftolozane-tazobactam (CTT)……124
2.7.2. Ceftazidime-avibactam (CZA)……..125
2.7.3. Meropenem-vaborbactam (MEV)……..126

2.7.4. Imipenem-cilastatin-relebactam (IMR)……126
2.7.5. Cefiderocol (CFDC)……..127
2.7.6. Eravacycline (ERV)……...128
2.7.7. Sulbactam-durlobactam (SUL-DUR)……129
2.8. Резистомен анализ, базиран на целогеномно секвениране (WGS)……..129
2.8.1. WGS на бактериални геноми – характеристики, видове и приложение……129
2.8.2. WGS-базиран резистомен анализ на MDR НФГБ от България……...132
2.9. Заключение на литературния обзор……...133
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ……135
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ……136
4.1. Бактериални щамове……136
4.1.1. Изследвани бактериални щамове……...136
4.1.2. Референтни бактериални щамове……..139
4.1.3. Предварителна идентификация на изследваните щамове……140
4.2. Изследвани пациенти……140
4.3. Изпитване на чувствителност към АМЛС……142
4.4. Молекулярно-генетични техники……144
4.4.1. Изолиране на ДНК (обща и плазмидна) и РНК от изследваните НФГБ изолати……..144
4.4.2. Полимеразна верижна реакция (PCR) за видова идентификация……...145
4.4.3. PCR за детекция на детерминанти на антимикробна резистентност……..146
4.4.3.1. AMR детерминанти при *P. aeruginosa*……...146
4.4.3.2. AMR детерминанти при *A. baumannii*……...147
4.4.3.3. AMR детерминанти при *S. maltophilia*……..149
4.4.4. PCR за откриване на гени, кодиращи фактори на вирулентност……149
4.4.5. PCR за детекция на гени, кодиращи биофилм-асоциирани гени (БАГ)……152
4.4.6. Обратно-транскрипционна количествена полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR)……..153
4.4.7. Директно секвениране с флуоресцентно белязани дидеоксинуклеотиди……..155
4.5. Целогеномно секвениране (Whole-genome sequencing – WGS)……...156
4.5.1. Приложена технология за NGS……..157
4.5.2. Сглобяване на геномите и биоинформатичен анализ……...157
4.5.3. WGS-базирана видова идентификация на НФГБ изолати……...157
4.5.4. Резистомен анализ……157
4.5.5. Вируломен анализ……158
4.5.6. Откриване на CRISPR-Cas системи……...159
4.6. Методи за доказване на извънклетъчни фактори на вирулентност……..159
4.7. Изследване на биофилм образуване от НФГБ……...160
4.7.1. Определяне на количество образуван биофилм върху абиотична повърхност…..160
4.7.2. Наблюдаване на биофилми чрез сканираща електронна микроскопия……..160
4.8. Епидемиологично типизиране на проучените НФГБ изолати……161
4.8.1. Случайно амплифициране на полиморфна ДНК чрез PCR (Random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction – RAPD-PCR)……...161
4.8.2. Мултиплекс PCR-базиран метод за идентификация на секвенционни групи (клонални линии) на *A. baumannii*……..163
4.8.3. Типизиране чрез мултилокусно секвениране (MLST)……164
4.8.4. Филогеномен анализ……165
4.8.4.1. Филогеномен анализ на CRPA изолати на база корови гени в пангенома…….165

4.8.4.2. Филогеномен анализ на CRAB изолати……167
4.9. Статистически анализ……...169
5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ……..171
5.1. Антимикробна лекарствена резистентност на проучените НФГБ изолати……171
5.1.1. Антибиотична резистентност на проучените изолати *P. aeruginosa*……...171
5.1.2. Антибиотична резистентност на проучените изолати *A. baumannii*……...177
5.1.3. Антибиотична резистентност на проучените изолати *S. maltophilia*……..185
5.1.4. Антимикробна активност на нови антибиотици срещу избрани НФГБ изолати……...191
5.2. Водещи механизми на резистентност сред проучените НФГБ изолати……..201
5.2.1. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху механизмите на резистентност на карбапенем-нечувствителни *P. aeruginosa*……..201
5.2.1.1. Откриване чрез PCR на AMR детерминанти……...201
5.2.1.2. Резистомен анализ, базиран на WGS……205
5.2.2. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху механизмите на резистентност на карбапенем-нечувствителни *A. baumannii*……..221
5.2.2.1. PCR скрининг и секвенционен анализ на детерминанти на резистентност……..221
5.2.2.2. Резистомен анализ, базиран на WGS……232
5.2.3. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху механизмите на резистентност на *S. maltophilia*……...243
5.2.3.1. Молекулярно-генетични проучвания, свързани с резистентността към SXT…...243
5.2.3.2. Резистомен анализ, базиран на WGS……247
5.3. Фактори на вирулентност на проучените НФГБ изолати……253
5.3.1. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху ключови фактори на вирулентност на изолатите *P. aeruginosa*……...253
5.3.1.1. PCR скрининг и секвенционен анализ на гените за T3SS ефекторни протеини……...253
5.3.1.2. Вируломен анализ, базиран на WGS……260
5.3.2. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху ключови фактори на вирулентност на изолатите *A. baumannii*……...264
5.3.2.1. PCR скрининг за детерминанти на вирулентност с участие в образуването на биофилм……264
5.3.2.2. Вируломен анализ, базиран на WGS……270
5.3.3. Фенотипни, молекулярно-генетични и геномни проучвания върху ключови фактори на вирулентност на изолатите *S. maltophilia*……..272
5.3.3.1. PCR скрининг за детерминанти на вирулентност……272
5.3.3.2. Фенотипни характеристики на вирулентност……..275
5.3.3.3. Връзка между генотипове на вирулентност и кореспондираща ензимна активност……..277
5.3.3.4. Геномни характеристики на вирулентност……..281
5.4. Образуване на биофилм от изследваните НФГБ изолати……283
5.4.1. Проучвания върху биофилм-формиращата способност на клинично значими изолати *A. baumannii*……283
5.4.2. Проучвания върху биофилм-формиращата способност на клинично значими изолати *S. maltophilia*……...287
5.4.2.1. PCR скрининг за БАГ……287
5.4.2.2. Способност за образуване на биофилм върху полистиренова повърхност и връзка между генотипните и фенотипните характеристики на биофилма…….292

5.4.2.3. Аминокиселинни замени, открити в БАГ на изолати *S. maltophilia*, подложени на WGS……..296
5.5. Епидемиологично типизиране на проучените терапевтично проблемни НФГБ изолати…….296
5.5.1. Епидемиологично типизиране на карбапенем-резистентни изолати *P. aeruginosa*……..298
5.5.1.1. MLST анализ на CRPA изолати, базиран на WGS……...298
5.5.1.2. Филогеномен анализ на NDM-1-продуциращи CRPA изолати……...302
5.5.1.3. Филогеномен анализ на VEB-9-продуциращи XDR-PA изолати……...304
5.5.2. Епидемиологично типизиране на карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii*……..306
5.5.2.1. Епидемиологично типизиране посредством RAPD-PCR……306
5.5.2.2. Определяне на секвенционни групи/клонални комплекси чрез мултиплекс PCR метод, откриващ алелни варианти в *ompA*, *csuE* и *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$ гени……..317
5.5.2.3. MLST и филогеномен анализ на избрани XDR-AB изолати……..321
5.5.3. Епидемиологично типизиране на проучените изолати *S. maltophilia*……324
5.5.3.1. Епидемиологично типизиране чрез RAPD-PCR…….324
5.5.3.2. MLST анализ на избрани нозокомиални изолати *S. maltophilia*, подложени на WGS……..335
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ……338
7. ИЗВОДИ……340
8. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД……347
9. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД……351
9.1. Научни публикации, свързани с дисертационния труд…….351
9.2. Участия в научни форуми, свързани с дисертационния труд……...355
9.3. Участия в научни проекти, свързани с дисертационния труд……..358
10. БИБЛИОГРАФИЯ……...360

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АМЛС – антимикробни лекарствени средства

БЗТ – бъбречнозаместителна терапия

ИСМО – инфекции, свързани с медицинско обслужване

МВ – муковисцидоза

НФГБ – неферментиращи глюкоза Грам-отрицателни бактерии

СЗО – Световна Здравна Организация

ХОББ – хронична обструктивна белодробна болест

ЦВК – централен венозен катетър

AAC – аминогликозид-ацетилтрансфераза

ABC complex – *A. baumannii–A. calcoaceticus* complex

AMEs – аминогликозид-модифициращи ензими

AMK – amikacin

AMR – антимикробна резистентност

ANT – аминогликозид-аденилтрансфераза

APH – аминогликозид-фосфотрансфераза

BSIs – инфекции на кръвния ток / кръвта

CAP – пневмония, придобита в обществото

CAZ – ceftazidime

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CFDC – cefiderocol

CG – клъстерна група

CHDL – карбапенем-хидролизираща β-лактамаза от клас D

CHL – chloramphenicol

CIP – ciprofloxacin

COL – colistin

COVID-19 – Coronavirus Disease 2019

CRAB – карбапенем-резистентни *A. baumannii*

CRPA – карбапенем-резистентни *P. aeruginosa*

CTT – ceftolozane-tazobactam

CZA – ceftazidime-avibactam

DHFR – дихидрофолат редуктаза

DHPS – дихидроптероат синтаза

DOR – doripenem

EARS-Net – European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

ECDC – European Centre for Disease Control and Prevention

EPS – екзополизахарид

ESAC-Net – European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network

ESBL – широкоспектърна β-лактамаза

ESKAPE – ***E.*** *faecium*, ***S.*** *aureus*, ***K.*** *pneumoniae*, ***A.*** *baumannii*, ***P.*** *aeruginosa*, ***E****nterobacter* spp.

ETA – екзотоксин А

ExoS – екзоензим (екзотоксин) S

ExoT – екзоензим (екзотоксин) T

ExoU – екзоензим (екзотоксин) U

ExoY – екзоензим (екзотоксин) Y

FEP – cefepime

GEN – gentamicin

HAP – болнично придобита пневмония

IC – International Clone (международен клон)

ICU – отделение / клиника за интензивни грижи

IMP – imipenem

IMP MBL – имипенемаза метало-β-лактамаза

IMR – imipenem-cilastatin-relebactam

LVX – levofloxacin

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

NHSN – National Healthcare Safety Network

Omp – външномембранен протеин

OMVs – външномембранни везикули

OXA – оксацилиназа

PBP – пеницилин-свързващ протеин

PCN – пиоцианин

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

PIP – piperacillin

PVD – пиовердин

QRDR – регион, детерминиращ резистентност към хинолони

RL – рамнолипид

ROS – реактивни видове кислород

SSIs – инфекции на хирургичното място

SSTIs – инфекции на кожа и меки тъкани

ST – секвенционен тип

SXT – trimethoprim-sulfamethoxazole

T3SS – тип III секреторна система

T4P – тип IV пили

TLR – Toll-like рецетор

TOB – tobramycin

TZP – piperacillin-tazobactam

UTIs – инфекции на уринарния тракт

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

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Инфекциите с бактерии, притежаващи проблемна антибиотична резистентност, са една от най-честите причини за заболеваемост 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, асоцииращa 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: ***E****nterococcus faecium*, ***S****taphylococcus aureus*, ***K****lebsiella pneumoniae*, ***A.*** *baumannii*, ***P.*** *aeruginosa* и ***E****nterobacter* 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 (Centers for Disease Control and Prevention – 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 (Tacconelli 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; Tacconelli et al. 2018). През последните години в лечението на инфекциите, причинени от тези микроорганизми, се прилагат антимикробни 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-Mb 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* (Lin and Lan 2014). 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 (Ventilator-associated pneumonia – VAP), инфекции на кръвния ток (Bloodstream infections – 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; El Mrimar et al. 2024). 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; Shelenkov 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; Hamidian 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 пациенти с хематологични и онкологични заболявания и хронични бронхопулмонални инфекции при болни, страдащи от МВ (Brooke 2012; Demiraslan et al. 2013; Waters et al. 2013; Chang et al. 2015; Insuwanno et al. 2020; 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 придобита

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).

Клинично значимите НФГБ (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*) се характеризират освен с проблемна антибиотична резистентност, и със способност да образуват биофилм върху различни абиотични повърхности и тъкани, което им осигурява по-висока устойчивост към АМЛС и антисептични разтвори, и противодействие на механизмите на имунна защита (Flores-Treviño et al. 2019; Thi et al. 2020; 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).

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. Таксономичен статус на най-честите и клинично значими НФГБ

В исторически аспект, първоначално Gilardi класифицира НФГБ в седем основни групи на база на техните фенотипни характеристики (Gilardi 1976), а през 1993 г. Palleroni диференцира пет хомоложни рРНК групи, както следва: I. *Pseudomonas*, II. *Burkholderia*, III. *Comamonas*, IV. *Brevimundas* и V. *Stenotrophomonas* (Palleroni 1993).

Понастоящем род *Pseudomonas* обединява над 600 вида, валидирани в List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN), които се характеризират с метаболитно разнообразие и способност за колонизация на широк спектър от екологични ниши (Parte et al. 2020). *Bergey's Manual* за систематика на археи и бактерии определя следния таксономичен статус на рода: Тип Pseudomonadota, Клас Gammaproteobacteria, Разред *Pseudomonadales* и Семейство *Pseudomonadaceae* (Palleroni 2015a). Родът е охарактеризиран за първи път от немския професор Migula през 1894 г., 12 години след изолирането на *P. aeruginosa* от зелена гной от Gessard (Palleroni 2010). Наскоро извършен филогеномен анализ на близо 500 пълни *Pseudomonas* генома идентифицира два добре дефинирани вида (*P. aeruginosa* и *Pseudomonas chlororaphis*) и четири по-широки филогенетични групи (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas syringae* и *Pseudomonas putida*) с достатъчен брой налични протеоми (Nikolaidis et al. 2020). *P. aeruginosa* е най-честата причина за инфекции при хора и топлокръвни животни от всички НФГБ (Behzadi et al. 2021).

Род *Stenotrophomonas* е генетично и фенотипно хетерогенен и понастоящем включва 35 вида, валидирани в LPSN (Parte et al. 2020). Сред тях само *S. maltophilia* и *Stenotrophomonas africana* причиняват инфекции при хора, а всички се приемат за сапрофитни микроорганизми в околната среда. Според Bergey' Manual, *S. maltophilia* принадлежи към Тип Proteobacteria, Клас Gammaproteobacteria, Разред *Xanthomonadales*, Семейство *Xanthomonadaceae* и Род *Stenotrophomonas* (Palleroni 2015b). През годините таксономичният му статус е променян, от *Pseudomonas maltophilia*, през *Xantomonas maltophilia*, до настоящия вид *S. maltophilia*, който е установен след обстойни генетични анализи, базирани на ДНК-рРНК хибридизация и рестрикционно картиране на 16S рРНК гени (Palleroni and Bradbury 1993; Nesme et al. 1995).

Род *Acinetobacter* обединява къси, плеоморфни Грам-отрицателни кокобацили, които са строго аеробни, каталаза-положителни, оксидаза-отрицателни, неферментиращи и неподвижни. Тяхното ДНК G+C съдържание варира от 39% до 47% (Peleg et al. 2008).

Таксономично принадлежат към: Тип Pseudomonadota, Клас Gammaproteobacteria, Разред *Pseudomonadales* и Семейство *Moraxellaceae* (Juni 2015).

След първото си описание в началото на 20-ти век тази хетерогенна група бактерии е преминала през забележителна, сложна, таксономична история. От 80-те години на миналия век и в съответствие с широкото разпознаване на ацинетобактерите като нозокомиални патогени, тази таксономия непрекъснато се актуализира (Moubareck and Halat 2020). Първоначалната класификация се основава на ДНК–ДНК хибридизационни проучвания и разграничава общо 12 ДНК групи или геномни видове, на някои от които са дадени официални имена, в това число *A. baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii* и *Acinetobacter lwoffii* (Bouvet and Grimont 1987). Според преглед, публикуван от Vijayakumar et al. през 2019 г., към род *Acinetobacter* се отнасят 59 вида, включващи 11 с дефинирани имена и 15 с условно описание (Vijayakumar et al. 2019). В актуалния LPSN вече фигурират 116 *Acinetobacter* species (Parte et al. 2020). С особена значимост е комплексът *Acinetobacter baumannii–A. calcoaceticus* (ABC complex), който първоначално включва 4 тясно свързани вида: *A. calcoaceticus* (геномен вид 1, изолиран основно от почва и неописан като причинител на заболявания при хората), *A. baumannii* (геномен вид 2), *Acinetobacter pittii* (предишен геномен вид 3) и *Acinetobacter nosocomialis* (предишен геномен вид 13 TU) (Gerner-Smidt 1992). Наскоро два нови вида, *Acinetobacter seifertii* и *Acinetobacter dijkshoorniae*, също бяха включени в ABC complex (Nemec et al. 2015; Cosgaya et al. 2016). *A. baumannii*, *A. pittii* и *A. nosocomialis*, които са фенотипно неразличими, са отговорни за повечето ИСМО и придобити в обществото инфекции, а с най-голямо клинично значение безспорно е *A. baumannii* (Lin MF and Lan CY 2014).

2.2. Инфекции, причинени от терапевтично проблемни НФГБ

2.2.1. Инфекции, причинени от *P. aeruginosa*

Проучванията върху глобалната епидемиология на клинично значимите НФГБ убедително представят *P. aeruginosa* като най-честа причина за инфекции от тази голяма и хетерогенна група микроорганизми (Behzadi et al. 2021). Въпреки своята типична природа на опортюнистичен агент *P. aeruginosa* се асоциира с широк спектър от инфекции с различна клинична манифестация и локализация, някои от които хронифицират и са трудни за ерадикация (Pressler et al. 2011). Засегнати са предимно имунокомпрометирани пациенти с придружаващи заболявания и по-рядко имунокомпетентни лица. Рисковите фактори за тяхното възникване включват: хоспитализация, механична вентилация, вродени и придобити имунодефицити (неутропения, СПИН, малигнени заболявания), инвазивни

медицински процедури, органна трансплантация, поставени централни венозни катетри (ЦВК) и уринарни катетри, изгаряния, имуносупресивна, антитуморна и лъчетерапия, заболявания на сърдечно-съдовата система, хронични белодробни заболявания (напр. хронична обструктивна белодробна болест – ХОББ), МВ, захарен диабет, лоши социално-битови условия, недохранване и др. (Moradali et al. 2017; Newman et al. 2017; Behzadi et al. 2021). Най-чести са ИСМО, в това число пневмония, инфекции на хирургичната рана, инфекции на уринарния тракт и бактериемии (Reynolds and Kollef 2021).

Доклад на *National Healthcare Safety Network (NHSN)* отрежда шесто място на *P. aeruginosa* в общата етиологична структура на нозокомиалните инфекции в САЩ (7.3%), в периода 2011–2014 г., а при VAP и катетър-свързаните уроинфекции – съответно второ (16.5%) и трето (10.3%) място (Weiner et al. 2016). Годишните доклади на Европейския център за контрол и профилактика на заболяванията (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC), касаещи разпространението на ИСМО в ICUs, посочват, че в периода 2018–2020 г. между 7.8% и 12.7% от пациентите с престой повече от два дни в тези отделения са развили поне една вътреболнична инфекция, а *P. aeruginosa* е най-често изолираният микроорганизъм при ICU-пневмония (21.1% през 2020 г.) и трети, след *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp., при инфекциите на уринарния тракт (14.3%). Също така се отчита 26-28% честота на CRPA, циркулиращи в ICUs на мониторираните държави от Европейския съюз (ЕС) и Европейското икономическо пространство (ЕИП) (European Centre for Disease Prevention and Control 2023a, 2024).

Инфекции на респираторния тракт

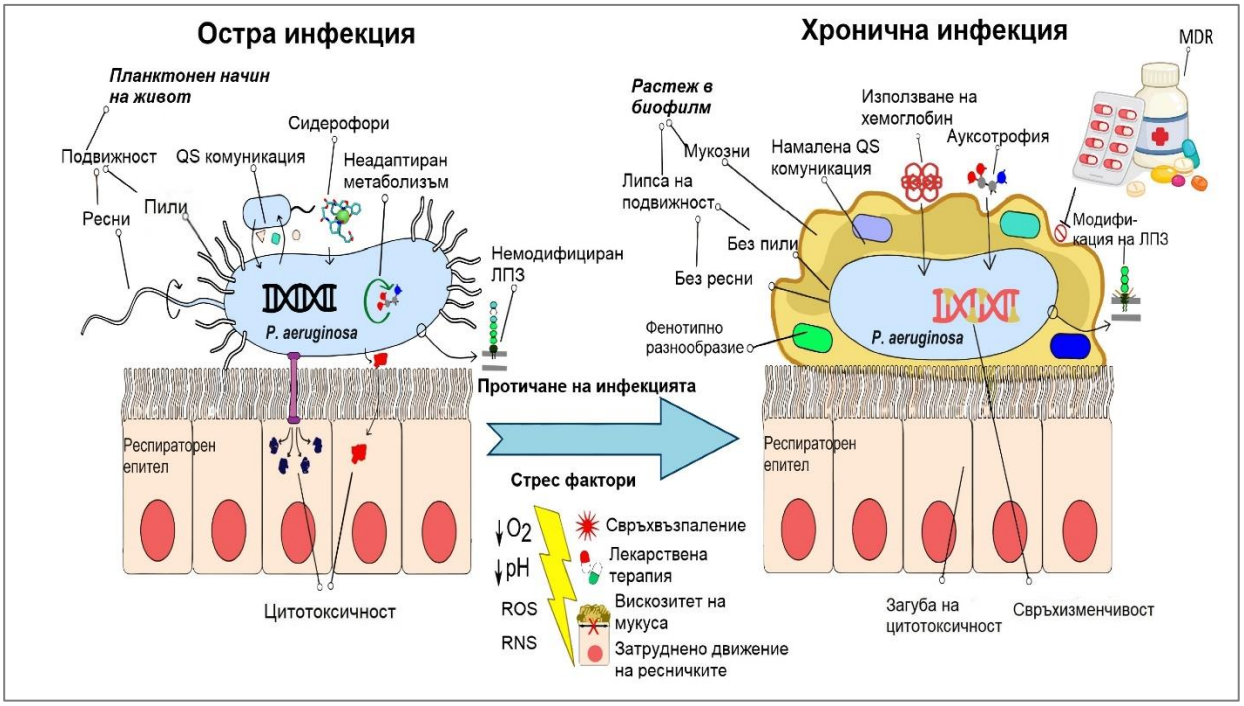
Болнично придобитите пневмонии (Hospital-acquired pneumonia – HAP) са значителен източник на стрес за съвременната здравна система и съставляват около 20% от всички ИСМО (Magill et al. 2014; Kalil et al. 2016). Една от най-тежките прояви на нозокомиалните респираторни инфекции, асоциирани с *P. aeruginosa*, е пневмонията, развиваща се при пациенти, подложени на механична вентилация в ICUs – VAP. Обикновено тя протича остро и агресивно, с подчертано изразена тенденция към генерализиране, развитие на септични усложнения и неблагоприятен изход (Planquette et al. 2013; Божкова 2018). Практически всички проучвания на етиологичния спектър на VAP сочат *P. aeruginosa* като един от основните бактериални патогени. Актуални данни от мониторинга върху ICU-ИСМО, осъществяван ежегодно от ECDC, показват, че 97% от нозокомиалните пневмонии са дефинирани като VAP, като *P. aeruginosa* е най-честият етиологичен агент, доказан при 19.3% от регистрираните случаи (European Centre for Disease Prevention and Control 2023a). Скорошно проспективно проучване, обхванало 28

ICUs в САЩ, отчита, че 11% от всички HAP/VAP се дължат на *P. aeruginosa*, което е второ място след *Staphylococcus aureus* (Bergin et al. 2020). Нивата на смъртност при VAP, причинена от този патоген, са високи и достигат 32-43% (Reynolds and Kollef 2021). В допълнение, при болните в критично състояние, включени на апаратна вентилация, роля на съществен утежняващ фактор играе локалната увреда на респираторния епител заради инсерцията на ендотрахеална тръба и формирането на биофилми на повърхността ѝ, което създава своеобразен резервоар в тази област. Растежът в биофилм е важен механизъм за развитието на адаптивна антибиотична резистентност (Maurice et al. 2018). Значително по-високи са шансовете за терапевтичен успех при ранно начало на насочено антибиотично лечение, във фазата преди образуването на биофилма, в сравнение с отложеното начало, във фазата на „зрелост“ на бактериалните биофилми.

Данните за глобалната тежест и рисковите фактори за възникване на придобита в обществото пневмония (Community-acquired pneumonia – CAP), причинена от *P. aeruginosa*, са ограничени. В мета-анализ Chalmers et al. обобщават данните от 22 проучвания на CAP в единични центрове/региони, в които честотата на *P. aeruginosa* CAP варира от 0% до 23%, но авторите отчитат незадоволителен методологичен статус на повечето проучвания (Chalmers et al. 2014). Скорошно мултицентрово проучване, включващо голям брой пациенти от 54 държави, с потвърдена *P. aeruginosa* CAP, прави анализ на рисковите фактори. Установено е, че честотата на заболяването при пациенти с предшестваща инфекция/колонизация с *P. aeruginosa* и поне едно от трите независимо свързани хронични белодробни заболявания (трахеостомия, бронхиектазии и/или много тежка ХОББ) е 67%. Обратно, процентният дял е само 2% при пациенти без предшестваща инфекция/колонизация с микроорганизма и нито едно от изброените хронични белодробни заболявания (Restrepo et al. 2018).

P. aeruginosa предизвиква силен остър възпалителен отговор на гостоприемника, но въпреки това успява да се задържи в дихателните пътища (Riquelme et al. 2020). Неговата огромна метаболитна гъвкавост му позволява лесно да се адаптира към условията в респираторния тракт, което е широко проучено при пациентите с МВ. При тях хроничната инфекция с *P. aeruginosa* е водещата причина за намаляване на белодробната функция (Schick and Kassen 2018). Освен хронични инфекции, усложненията включват развитие на бронхиектазии, обструкция на дихателните пътища и летален изход. МВ е автозомно рецесивно генетично заболяване, при което е налице мутация в гена, кодиращ регулатора на трансмембранната проводимост (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator – CFTR). Дефицитът на CFTR води до намален транспорт на хлориди и повишен транспорт

на Na^+ през епителните Na^+-канали, в резултат на което се дехидратира течността по повърхността на дихателните пътища и се секретират трудни за изчистване мукопурулентни секрети (Berical et al. 2019). Постепенно се стига до нарушен мукоцилиарен клирънс, ниско pH и увреждане на антимикробните механизми и имунния отговор (**Фигура 1**). Цилиарният епител не успява ефективно да очисти белия дроб от слузта, което усложнява хроничната инфекция с *P. aeruginosa*. Това води до влошаване на белодробната функция, поради което е препоръчителна агресивна ранна терапия (Smyth et al. 2014).



Фигура 1. Представяне на адаптацията на *P. aeruginosa* към белия дроб на пациенти с муковисцидоза (МВ) по време на инфекцията. В ранните етапи изолатите са напълно „въоръжени“ с фактори на вирулентност, които позволяват колонизация на дихателните пътища и увреждане на белите дробове. Стресовата среда на МВ дихателните пътища води до патологични адаптивни промени на *P. aeruginosa*, които позволяват дългосрочна колонизация и установяване на неподатливи инфекции. ЛПЗ, липополизахарид; QS, quorum sensing; ROS, реактивни видове кислород; RNS, реактивни видове азот; MDR, множествена лекарствена резистентност (Jurado-Martín et al. 2021).

Данни от Регистъра на *Cystic Fibrosis Foundation* в САЩ сочат близо 50% разпространение на инфекциите с *P. aeruginosa* в периода 2006–2012 г., като при пациенти над 26 години, 74% от микробните култури са положителни (Salsgiver et al. 2016). От своя страна *European Cystic Fibrosis Society* отчита 29.8% разпространение на *P. aeruginosa* за

2011–2016 г., като повече от половината от пациентите над 40 години имат позитивна култура от храчка (Hatziagorou et al. 2020). Пилотните данни от българския регистър на пациентите с муковисцидоза показват, че към 01.09.2016 г. е събрана информация за общо 139 пациенти, живеещи и лекувани в България, като е установена хронична инфекция с *P. aeruginosa* при 65.4% от тях. Процентният дял при децата под 18 години (64.38%) е един от най-високите в Европа (Петрова и съавт. 2016).

Бронхиектазията се характеризира с разширяване и удебеляване на дихателните пътища, което води до хронична инфекция и възпаление. Заболяването се среща по-често при пациенти без МВ и има различна етиология, като постинфекциозна, първична цилиарна дискинезия, имунна недостатъчност и идиопатична бронхиектазия. *P. aeruginosa* е един от най-често изолираните микроорганизми при пациенти с не-МВ бронхиектазии и се свързва с влошаване на белодробната функция и повишена смъртност (Woo et al. 2018).

Инфекции на кръвта

BSIs са сред най-сериозните заболявания, причинявани от *P. aeruginosa*. Хематогенната дисеминация на бактериите от локално огнище на инфекция налага комплексно приложение на редица спешни мероприятия, сред които от първостепенно значение е назначаването на подходяща антибактериална терапия. Счита се, че *P. aeruginosa* причинява 3-7% от всички BSIs, а нивата на смъртност са високи и варират в диапазона 43.2-58.8% (Kang et al. 2005; Micek et al. 2011; Thaden et al. 2017). Болнично придобитата *P. aeruginosa* бактериемия е най-честа сред всички BSIs, причинени от Грам-отрицателни бактерии, в голям университетски център в САЩ за 13-годишен период (Thaden et al. 2017).

Мониторинг върху етиологичния спектър и антибиотичната чувствителност на бактериите, причиняващи BSIs в ICUs на 16 европейски държави през 2018 г. разкрива, че *P. aeruginosa* заема шеста позиция и се асоциира с 8.3% от отчетените епизоди, като честота на разпространение е много близка до тази на *S. aureus* и *E. coli*. За сравнение, *Acinetobacter* spp. е докладван като отговорен за едва 2.1% от всички епизоди на бактериемия (European Centre for Disease Prevention and Control 2023a). Американската мрежа NHSN към CDC при анализ на ЦВК-свързаните BSIs отчита 4% дял и десета позиция на *P. aeruginosa* в етиологичната структура за 2011–2014 г. (Weiner et al. 2016).

Ролята на инфекциите, причинени от *P. aeruginosa*, при имунокомпрометирани пациенти с неутропения е изключително важна. Той е патоген с критична значимост при болните от онкохематологични заболявания (Reynolds and Kollef 2021). Мултицентрово

проучване в Гърция доказва, че 17% от всички случаи на BSIs сред този контингент пациенти се дължат на *P. aeruginosa*, а като основни рискови фактори са отчетени предшестваща хирургична интервенция, неутропения, кортикостероидна терапия и тежест на основното заболяване (Tofas et al. 2017). Друго скорошно проучване отчита, че 12.1% от Грам-отрицателните BSIs при пациенти с онкохематологични заболявания са свързани с *P. aeruginosa* (Carvalho et al. 2020).

Претърпелите трансплантация пациенти също са изложени на висок риск от инфекции с *P. aeruginosa* и неблагоприятен изход от тях. Предходни оценки на леталитета от BSIs, асоциирани с *P. aeruginosa*, при пациенти с анамнеза за трансплантация на стволови клетки, черен дроб или бял дроб достигат до 50%. Рискът от развитие на такива инфекции е най-висок в първите три месеца след трансплантацията (Johnson et al. 2009).

Инфекции на уринарния тракт

Водещите по честота причинители на уроинфекции, като чревни бактерии (преимуществено *E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp.) и ентерококи, влизат в състава на нормалната микробиота в интестиналния тракт и при подходящи условия могат да причинят асцендентни инфекции с ендогенен характер. За разлика от тях чревното носителство на *P. aeruginosa* не е типична находка и свързаните с него инфекции не са чести. Възможно е селектиране на *P. aeruginosa* в долните отдели на чревния тракт, основно след продължително лечение с АМЛС, към които патогенът е естествено устойчив, и при продължителна хоспитализация (Божкова 2018). Най-често обаче, инфекции на уринарния тракт (Urinary Tract Infections – UTIs), причинени от *P. aeruginosa*, възникват екзогенно и са ИСМО. Рисковите фактори включват трайна катетеризация, предшестващи инвазивни диагностични и/или терапевтични процедури в отделителната система, хирургични интервенции, стриктури и други препятствия в оттичането на урината, водещи до ретенция и др. В ранните етапи от инфекциозната патогенеза ключова роля играят адхезивните фактори на вирулентност – пили, флагели и липополизахад (ЛПЗ). Формирането на биофилми е също с ключова роля и създава предпоставка за трайна колонизация върху повърхността на катетри, ендоскопска апаратура и други медицински изделия, и рекурентни UTIs (Lila et al. 2023).

P. aeruginosa причинява прибилизително 10% от нозокомиалните катетър-свързани UTIs и до 16% от уроинфекциите в ICUs (Mittal et al. 2009; Rosenthal et al. 2016; European Centre for Disease Prevention and Control 2023a). Бактериемията е често усложнение при тези инфекции (Kitagawa et al. 2019). Тежките нозокомиални UTIs, причинени от *P.*

aeruginosa, обикновено се свързват с висок леталитет. Ретроспективно испанско проучване съобщава 17.7% и 33.9% смъртност, съответно на 30-ти и 90-ти ден от началното документиране на заболяването. Авторите доказват, че неадекватната антибактериална терапия е самостоятелен и независим рисков фактор за смъртност, както и терминална бъбречна недостатъчност, напреднало хронично чернодробно заболяване и неконтролиран захарен диабет (Ferreiro et al. 2017). От друга страна, катетър-свързаните UTIs често се причиняват от антибиотично-резистентни щамове. Данни от мащабно проучване на *International Nosocomial Infection Control Consortium* показват, че над 40% от етиологичните агенти в ICUs са устойчиви на флуорохинолони, piperacillin-tazobactam и meropenem, както и най-високи нива на резистентност в тези болнични отделения (Rosenthal et al. 2016).

Раневи инфекции и инфекции при изгаряния

Инфекциите на хирургичното място (Surgical Site Infections – SSTs) са сред основните усложнения на хирургичните интервенции и водят до значителни общомедицински и финансови неблагополучия. Възникването им е зависимо от обема и продължителността на оперативната процедура, както и от наличие/липса на адекватна предоперативна антибиотична профилактика. Множество механизми, като способност за образуване на микроколонии, защитени в биофилми, върху хирургичния инструментариум, инвазивният потенциал и директният цитотоксичен ефект на продуцираните екзотоксини, обуславят способността на *P. aeruginosa* да причинява SSIs (Божкова 2018).

В мониторинга на NHSN към CDC 5.7% от SSIs в САЩ в периода 2011–2014 г. са свързани с *P. aeruginosa* и възникват най-често след гръдна и сърдечна операция (Weiner et al. 2016). Данните на мултицентрово проучване в Англия (2000–2013 г.) показват, че годишно 4.3-6.5% от SSIs се причиняват от *Pseudomonas* spp. (Elgohari et al. 2017). Постхирургичните раневи инфекции, причинени от *P. aeruginosa*, се асоциират с по-неблагоприятен изход и висока смъртност (Massart et al. 2022).

P. aeruginosa е най-честият Грам-отрицателен причинител на инфекции след изгаряния (Gomersall et al. 2023). Въпреки че голяма част от пациентите с термична травма загиват в ICU от VAP, септичните усложнения на раневата инфекция остават сред най-тежките усложнения на заболяването, които могат да доведат до летален изход (Azzopardi et al. 2014; Norbury et al. 2016). Инфекцията на раната от изгаряне включва серия от динамични патофизиологични процеси, включително микробна колонизация, образуване

на биофилм и инвазивна ранева инфекция. Микроорганизмите могат бързо да колонизират раните от изгаряне поради термично разрушаване на кожната бариера. Изгорелият есхар (аваскуларна некротична тъкан) осигурява богата на протеин ниша за бактериална колонизация и пролиферация. В допълнение, есхарът може да повиши риска от инфекция чрез инхибиране на ранното заздравяване посредством пролиферация на ендотелни клетки, индуцирана от основния фибробластен растежен фактор (Monsuur et al. 2017; Evdokiou et al. 2020). Съществуват доказателства, че раневите инфекции сред пациентите с изгаряния могат да се свържат с ръцете на болничния персонал и медицинската апаратура за обработка и хидратиране на изгорените повърхности. В този аспект изключителната адаптивност на *P. aeruginosa*, способността му за оцеляване в болнична среда, както и забележителната му резистентност към антибиотици и дезинфектанти, го превръщат в основен проблем в тази популация от болни в критично състояние (Mayhall 2003).

Проучванията върху инфекциите при изгаряния, причинени от *P. aeruginosa*, демонстрират трайна тенденция за MDR на етиологичния агент и високи нива на смъртност. Мащабно 20-годишно проучване (1989–2009 г.) сред педиатрични ICU пациенти в САЩ установява, че 86% от смъртните случаи се дължат на септични усложнения на раневи инфекции, причинени от MDR патогени, а от изолираните *P. aeruginosa* 64% са притежавали този фенотип (Williams et al. 2009). Преди няколко години *Asadpour* докладва 72.2% MDR *P. aeruginosa* (MDR-PA) при документирани раневи инфекции в Иран, асоциирани с този микроорганизъм, от които 55.5% и 35.6% са идентифицирани съответно като продуценти на широкоспектърни β-лактамази (Extended spectrum β-lactamases – ESBLs) и метало-β-лактамази (MBLs) (Asadpour 2018).

Ecthyma gangrenosum (EG) е добре описана кожна лезия, която класически се свързва със сепсис, причинен от *P. aeruginosa*, при имунокомпрометирани педиатрични пациенти. Обикновено започва като папуловезикуларна лезия, която бързо прогресира до некротична язва с централен черен есхар, заобиколена от еритемна зона. Засяга предимно аксиларните и аногениталните области, но понякога се включват ръцете, краката, торса и лицето. EG възниква след микробна инвазия на подкожната васкуларна тъкан и развитие на хеморагичен оклузивен васкулит. Макар и рядко, наличието на EG е показателно за тежка системна инфекция с лоша прогноза и фатален изход (Weiel et al. 2013; Vaiman et al. 2015). EG, асоциирана с *P. aeruginosa*, е рядкост при деца без имунен дефицит. В докладваните случаи на сепсис при преди това здрави деца, пациентите са преимуществено от мъжки пол и на възраст под 1 година. Треска, диария, пневмония,

кожни лезии (50%) и шок са най-важните свързани симптоми, а смъртността варира от 20% до повече от 50% (Biscaye et al. 2017).

Очни инфекции

P. aeruginosa е най-разпространеният етиологичен агент на разнообразни в клиничното си представяне очни инфекции (Teweldemedhin et al. 2017). Най-често се свързва с **бактериален кератит**, който прогресира с развитие на инфилтрации и корнеални скарификации (Hilliam et al. 2020). Като основен предразполагащ фактор за заболяването се счита използването на контактни лещи. Въпреки че не е единственият причинител на бактериален кератит, свързан с употребата на контактни лещи, *P. aeruginosa* е отговорен за повечето язви на роговицата при тяхното носене (Ting et al. 2021). Голяма част от увреждането на окото по време на микробен кератит се дължи на свръхстимулация на имунната система на гостоприемника от чужди клетки. В роговицата макрофагите и дендритните клетки играят важна роля в инициирането на вродения имунен отговор. Експресията на рецептори за разпознаване на образи (PRRs), като Toll-like (TLRs) и NOD-like рецептори (NLRs), позволява разпознаване от гостоприемника на консервативни патогенни структури, известни като патоген-асоциирани молекулярни модели (PAMPs). Активирането на PRRs води до производство на каскада от възпалителни цитокини, като интерлевкин (IL)-1, IL-6 и IL-8 (Taube et al. 2015). TLR4 и TLR5 върху макрофагите разпознават флагелина и ЛПЗ на *P. aeruginosa* и стимулират проинфламаторния път, медииран от *MYD88* гена (Sun et al. 2010). Стимулирането на имунния възпалителен отговор води до увреждане на роговицата и последващи скарификации и загуба на зрението. По време на инфекциозния процес *P. aeruginosa* използва големия си геном, кодиращ сложни регулаторни мрежи и широк спектър от фактори на вирулентност, включително подвижност и секреция на различни протеази и токсини. Има все повече доказателства, че кератитите се причиняват от филогенетична подгрупа щамове *P. aeruginosa*, носещи гена за мощния цитотоксин ExoU, един от двата взаимно изключващи се екзотоксина, секретирани чрез секреторната система тип III (Hilliam et al. 2020).

Проучване от Индия върху придобити в обществото кератити и дакриоцистити (възпаление на слъзната торбичка) сочещава за доминираща роля на *P. aeruginosa* (66.5%) в етиологичаната структура (Bharathi et al. 2010). В друго проучване, извършено в Етиопия, авторите установяват, че *P. aeruginosa* е отговорен за 20.9% от всички изследвани очни инфекции (второ място след *S. aureus*), от които най-чести са кератитите (около 50%), следвани от блефарити (23.8%), конюнктивити (11.4%) и блефароконюнктивити (16.7%) (Tesfaye et al. 2013).

Срещат се и *P. aeruginosa* кератити, които не са свързани с употреба на контактни лещи. Наскоро Shoji et al. докладват случай на тежък кератит при 72-годишен пациент, причинен от MDR-PA, след употреба на капки „Изкуствени сълзи“. От инфилтрата в роговицата и от капките е изолиран един и същи щам *P. aeruginosa* (Shoji et al. 2023). Обичайно неасоциираният с контактни лещи кератит засяга по-възрастни хора и причинява значителна заболеваемост. По-лошата зрителна острота и придружаващите заболявания в тази възрастова група, както размерът и степента на засягане на роговичната строма, предразполагат към неблагоприятен клиничен изход при този вид кератит (Enzor et al. 2021).

Ендофталмитът е едно от най-редките и най-разрушителните заболявания, което често води до необратима загуба на зрението. Класифицира се на **екзогенен и ендогенен**. Екзогенният ендофталмит често се причинява от вътреочна операция, открити наранявания на окото, вътреочни чужди тела, язви на роговицата и др. Ендогенният се нарича още метастатичен ендофталмит, тъй като патогенът се разпространява чрез кръвта и навлиза в окото през кръвно-очната бариера. Той съставлява 2–41% от всички случаи на ендофталмит (Lin et al. 2022). Сред Грам-отрицателните микроорганизми *P. aeruginosa* е най-честият причинител на ендофталмит (Stevenson et al. 2020).

В литературата има описан случай на **очен некротизиращ фасциит**, причинен от *P. aeruginosa*. Диагнозата е поставена при 53-годишен пациент от Испания с оток на клепачите и гноен секрет от двете очи. Въпреки навременната хирургична намеса и назначената антибиотична терапия заболяването е прогресирало към обширен деструктивен процес, което е свързано с високата вирулентност на причинителя (Rodríguez-González et al. 2013).

2.2.2. Инфекции, причинени от *A. baumannii*

Понастоящем *A. baumannii* е сред водещите етиологични агенти на ИСМО, най-вече в ICUs. От една страна това е свързано с високата честота на инвазивни диагностични и терапевтични процедури в този тип болнични звена, а от друга – с изключителната адаптивност на микроорганизма към болничните екосистеми и неговата устойчивост към дезинфектанти и антибиотици, което му осигурява съществено предимство спрямо конкурентни бактериални патогени (Стоева 2011; Antunes et al. 2014; Божкова 2018). Широко проучени и документирани са рисковите фактори за инфектиране с *A. baumannii*. Като най-значими са признати следните: продължителен престой в ICU, предшестващ болничен и ICU престой, предшестваща антимикробна терапия, механична вентилация,

употреба на медицински устройства (постоянни катетри, ендотрахеална тръба или назогастрална сонда), напреднала възраст, оперативни интервенции с голям обем и сложност, спешни хирургични интервенции, ниско тегло при раждане или недоносеност, бъбречнозаместителна терапия и продължително пълно парентерално хранене (Fukuta et al. 2013; Djordjevic et al. 2016; Lee et al. 2018; Moubareck and Halat 2020).

Инфекции на респираторния тракт

Най-разпространените нозокомиални инфекции, причинени от MDR-AB, са бронхопулмоналните, а най-честата респираторна инфекция е VAP при ICU пациенти (Kanafani et al. 2018). *A. baumannii*-асоциираната VAP обикновено възниква късно след поставяне на пациента на механична вентилация (Čiginskienė et al. 2019). Според American Thoracic Society рисковите фактори за нейното развитие включват: приложение на интравенозни антибиотици през последните 90 дни; септичен шок; предшестващ остър респираторен дистрес синдром (Acute Respiratory Distress Syndrome – ARDS); 5 или повече дни хоспитализация, предшестваща VAP и лечение на остро бъбречно увреждане, предшестващо VAP (Kalil et al. 2016).

От 8% до 14% от VAP в САЩ и Европа се дължат на *A. baumannii*, но заболяването се асоциира с по-високи нива на смъртност (19% до >50%) в Азия, Латинска Америка и някои страни от Близкия изток (Lynch et al. 2017). Наскоро публикувано проучване докладва, че честотата на предаване на MDR-AB при механична вентилация е 315 случая / 1000 пациенто-дни, пролежани в ICU, което води до развитие на VAP с леталитет 52-66% (Huang et al. 2019a). В друго проучване, обхващащо три средиземноморски страни (Гърция, Италия и Испания), е установено доминантна клонална принадлежност на етиологичните агенти на VAP към IC2, както и XDR/PDR фенотип, с близо 100% резистентност към карбапенеми и 50% резистентност към colistin (Nowak et al. 2017). Според мета-анализ, включващ 29 държави, разпространението на MDR фенотип сред *A. baumannii*, причиняващ HAP и VAP преди пандемията от COVID-19, е близо 80%, като най-високи нива на разпространение са отчетени в Централна Америка, Латинска Америка и Карибите, а най-ниски – в Източна Азия (Mohd Sazlly Lim et al. 2019).

Макар и значително по-рядко от случаите на HAP и VAP, *A. baumannii* се свързва и с CAP. Обикновено тя се характеризира с фулминантно протичане, висока честота на бактериемия, ARDS и дисеминирана интраваскуларна коагулация (Disseminated Intravascular Coagulation – DIC), както и с висока смъртност, особено в тропическите региони, където засяга предимно лица с прекомерна консумация на алкохол,

тютюнопушене, страдащи от захарен диабет и хронични белодробни заболявания (Leung et al. 2006; Dexter et al. 2015). CAP, причинена от *A. baumannii*, е разпространена в различни части на Австралия, Океания и Азия, в т.ч. Тайван, Китай и Тайланд (Wong et al. 2017). Скорошно китайско проучване представя случай на CAP, причинена *A. baumannii* от редкия спорадичен ST880, който притежава плазмид-кодиран $bla_{\text{OXA-72}}$, определящ резистентност към карбапенеми (Jia et al. 2019).

Инфекции на кръвта

A. baumannii е един от най-честите Грам-отрицателни причинители на нозокомиални BSIs. Глобалната SENTRY Antimicrobial Surveillance Program му отрежда девето място в етиологичната структура на вътреболничните BSIs в периода 1997–2016 г., с 3.2% относителен дял (Diekema et al. 2019). Основен източник за възникването им са инфекциите на респираторния тракт и инфектираните ЦВК. (Wisplinghoff et al. 2012).

Мащабно 10-годишно проучване (2011–2020 г.) в университетска болница в България отрежда челно място на ABC complex (6.3%) в етиологичния спектър на лабораторно потвърдените случаи на бактериемия, като по показателя 30-дневен леталитет той заема първо място (53.6%). Струва си да се подчертае, че 68.4% от всички изолати са определени като CRAB, а 60% притежават XDR фенотип (Стоева 2023).

Докладвана е висока честота на *A. baumannii* бактериемия с високи нива на леталитет сред болни с малигнени заболявания и неутропения (Freire et al. 2016), пациенти, претърпели неврохирургични интервенции (Tsitsopoulos et al. 2016) и пациенти с тежки изгаряния, приети в ICUs (Gong et al. 2016). Антибиотичната резистентност на етиологичните агенти е традиционно висока, а през последните години се регистрират дори BSIs, причинени от colistin-резистентни *A. baumannii*. Наскоро Papathanakos et al. установяват, че 42% от случаите на *A. baumannii* бактериемия в ICU на университетска болница в съседна Гърция, в периода 2017–2019 г., се причиняват от colistin-резистентни изолати и са свързани с развитие на фулминантен септичен шок и прекомерно висока смъртност (Papathanakos et al. 2020b).

Изобилието от данни за нарастващата антибиотична резистентност на *A. baumannii* при BSIs, особено при критично болните пациенти, изисква специален акцент върху надзора и охарактеризирането на механизмите на резистентност, адекватни промени в антимикробните стратегии и засилване на мерките по контрол на инвазивните инфекции.

Инфекции на кожа и меки тъкани (SSTIs)

A. baumannii е многократно изолиран от кожата и меките тъкани при пациенти с тежки изгаряния, рани или травми, например войници, ранени по време на военни операции, или жертви на природни бедствия. Забележителната статия на Davis et al. докладва за тежка ранева инфекция и остеомиелит, причинени от MDR-AB, по време на военните операции в Ирак през 2003–2005 г. (Davis et al. 2005). В друго ретроспективно проучване, *A. baumannii* е най-често изолираният патоген от отворени тибиални фрактури сред членове на американската армия, ранени в Ирак или Афганистан (Johnson et al. 2007). Инфекциите на рани от изгаряния и остеомиелит, причинени от MDR-AB, са често срещани при военен травматизъм (Schafer and Mangino 2008; Keen et al. 2010).

В литературата са описани случаи на некротизиращи инфекции на хирургична рана, с етиологичен агент *A. baumannii*, и сред цивилни граждани (Guerrero et al. 2010). Обикновено засегнатите пациенти страдат от съпътстващи заболявания, а раневите инфекции, често съпътствани от бактериемия, се нуждаят от хирургически дебридман и завършват летално.

Макар честотата на раневи инфекции, свързани с *A. baumannii*, при пациенти с термична травма да е значимо по-ниска от тази на *P. aeruginosa*-свързаните инфекции, някои автори отчитат тяхното значимо повишаване. В петгодишно ретроспективно проучване на етиологичния спектър на бактериалните инфекции при пациенти с изгаряния Agnihotti et al. докладват такава устойчива тенденция в болница в Индия (Agnihotri et al. 2004). Докладваните раневи инфекции от последните 10 години се дължат на терапевтично проблемни CRAB. Наскоро публикуван мета-анализ отчита сред водещите механизми на резистентност продукция на карбапенемази от клас D (53.2%), следвани от метало-β-лактамази от клас B (30.2%) и *Klebsiella pneumoniae* карбапенемази (KPC) от клас A (Lima et al. 2019). Тези тревожни резултати подчертават нуждата от глобална програма за надзор и контрол върху разпространението на CRAB в отделенията по изгаряния по целия свят.

Инфекции на уринарния тракт

Въпреки че изследванията върху инфекциите, причинени от *A. baumannii*, са фокусирани предимно върху пневмония и BSIs, съвременни микробиологични данни сочат, че един от всеки пет щама *A. baumannii* се изолира от урина (Di Venanzio et al. 2019). UTIs не са сред типичните за вида. Те се регистрират предимно като ИСМО и засягат пациенти с рискови фактори, сред които основните са поставянето на постоянен уринарен катетър и хирургична интервенция на пикочните пътища (Dijkshoorn et al. 2007; Moubareck

and Halat 2020). Надзорната система на ECDC в ежегодните си доклади посочва, че 99% от случаите на нозокомиални UTIs в ICUs възникват при катетеризирани пациенти. Въпреки ниския относителен дял на *Acinetobacter* spp. в етиологичната структура (2.6% през 2016 г.), устойчивостта на изолатите към карбапенеми е много висока (66% CRAB) (European Centre for Disease Prevention and Control 2018). Формирането на биофилм при катетър-свързаните инфекции ги превръща в труднолечими поради високата устойчивост на изолатите към АМЛС (Pour et al. 2011).

Инфекции на централната нервна система

Нозокомиалният менингит, причинен от *A. baumannii*, се превръща в нарастваща заплаха в неврохирургичните ICUs, като свързаната с него смъртност достига 70%, особено при пациенти с постоянни вентрикулостомични тръби или цереброспинални фистули и получаващи следоперативна антимикробна терапия (Moubareck and Halat 2020). Резултати от голяма поредица от случаи на постневрохирургичен менингит, дължащ се на *A. baumannii*, публикувани през 2019 г., разкриват, че 21% от изолатите имат XDR фенотип с чувствителност само към colistin и tigecycline. Освен това възрастта над 40 години, наличието на външен вентрикуларен дренаж, повишеният брой на левкоцитите в цереброспиналната течност и наличието на съпътстващи заболявания (диабет и хипертония) са рискови фактори за смъртност, дължаща се на това заболяване в неврохирургичните ICUs (Sharma et al. 2019). В 4-годишно проучване, проведено от 2013 до 2017 г. в университетска болница в Китай, е констатирана инфекция с MDR-AB или XDR-AB (34%) при възрастни пациенти с постневрохирургична интракраниална инфекция (Pan et al. 2018). Всички изолати са демонстрирали резистентност към карбапенеми, но абсолютна чувствителност към polymyxin B, 60.7% към tigecycline и 49.2% към amikacin. От друга страна ретроспективен преглед на случаите на нозокомиален *A. baumannii* менингит в детска възраст в Китай за периода 2006–2018 г., показва MDR, XDR и дори PDR фенотип на етиологичните агенти, поява след неврохирургична интервенция и висока смъртност (Xiao et al. 2019). Наскоро Fursova et al. подлагат на целогеномно секвениране изолираните при нозокомиален менингит в невро-ICU в Москва *A. baumannii* и установяват хетерогенна генетична популация, с преобладаване на ST2 / IC2, както и разнообразие от детерминанти на антимикробна резистентност и фактори на вирулентност (Fursova et al. 2023).

Инфекции, причинени от A. baumannii, във времето на COVID-19 пандемия

Хоспитализацията на пациенти с COVID-19, особено в ICUs, ги предразполага към тежки последствия като ИСМО и/или вторични инфекции. Например при пациентите с тежки белодробни симптоми често се налага използването на механична вентилация като част от поддържащо лечение, а това може да доведе VAP, причинена от MDR-AB (Rangel et al. 2021; Shinohara et al. 2022).

Zhang et al. установяват, че 55.6% от пациентите с COVID-19 са били коинфектирани с CRAB в ICU в Ухан, Китай (Zhang et al. 2020). Скорошно проучване в ICU с COVID-19 пациенти в Мексико идентифицира и характеризира ESKAPE патогените, откривайки възможното им клонално разпространение върху медицински устройства, инертни повърхности, медицински персонал и пациенти. *A. baumannii* е доказан като най-разпространения представител на група ESKAPE (52%), като всички щамове демонстрират MDR. Освен това анализът на междугенните региони разкрива критично клонално разпределение на *A. baumannii* (AdeABCRS+) в клиниката (Durán-Manuel et al. 2021).

Голям брой кохортни проучвания докладват *A. baumannii* като основен етиологичен агент на коинфекции и вторични бактериални инфекции след SARS-CoV-2 по целия свят (Китай, Франция, Испания, Италия, Иран, САЩ, Бразилия, Египет и др.), чиято клинична манифестация включва VAP, BSIs и инфекции на уринарния тракт (Rangel et al. 2021). Всички те подчертават влиянието на CRAB върху клиничния изход от COVID-19, особено при ICU пациентите в критично състояние.

2.2.3. Инфекции, причинени от *S. maltophilia*

S. maltophilia може да бъде открит и изолиран от влажни места, както естествени, така и болнична среда (Brooke 2012; Gallo et al. 2016). Микроорганизмът показва ограничена инвазивност в имунокомпетентни индивиди, но може да причини сериозни инфекции при имунокомпрометирани пациенти, което е нарастващ проблем в световен мащаб (Adegoke et al. 2017; Anđelković et al. 2019). Добре известни рискови фактори за развитие на инвазивни инфекции, от които най-честите са пневмония и BSIs, са: продължителен болничен престой, който включва инвазивни процедури, лечение в ICU, механична вентилация, поставени постоянни катетри, наскоро проведена терапия с антибиотици, имуносупресори или кортикостероиди, HIV инфекция, съпътстващи злокачествени заболявания и органна трансплантация (Brooke 2012). Разпространението на инфекциите, причинени от *S. maltophilia*, се повишава от 0.8-1.4% в периода 1997–2003 г. до 1.3-1.7% през 2007–2012 г., а инфекциите на дихателните пътища се увеличават от 3.3-3.5% през 1997–2004 г. до 4.4% през 2009–2012 г., като *S. maltophilia* се превърща от осмия

в шестия най-чест етиологичен агент на нозокомиални респираторни инфекции (Chang et al. 2015). Инвазивните инфекции се асоциират с висока смъртност – до 65% при BSIs (Kim et al. 2019a).

Инфекции на респираторния тракт

Респираторният тракт е най-обичайното място, от което се изолира *S. maltophilia* (Brooke 2012; Трифонова 2020). В повечето от случаите се касае за колонизация и наличието му е индикация за имункомпрометиран статус на пациента. Много често е изолиран едновременно с други респираторни патогени и това затруднява клиничната интерпретация (Pathmanathan and Waterer 2005).

Пневмонията, асоциирана със *S. maltophilia*, се характеризира с неспецифична клинична изява и включва треска, продуктивна кашлица и диспнея. Рентгенографското изследване обичайно показва едностранна или двустранна лобарна или лобуларна инфилтрация и рядко плеврални изливи (Vartivarian et al. 2000; Looney et al. 2009). При хистологично изследване на белодробния паренхим се откриват фокални некрози, като при пациенти с онкохематологични заболявания е възможно да се достигне до фатална белодробна хеморагия (Looney et al. 2009; Mori et al. 2014). Пневмонията, причинена от *S. maltophilia*, е нозокомиална инфекция, която при ICU пациенти често се свързава с механична вентилация. Според мащабно проучване, базирано на събрана информация от френската база данни OUTCOMEREA, *S. maltophilia* е отговорен за 6.4% от всички документирани случаи на VAP сред възрастни пациенти, от 1997 г. до 2015 г. (Ibn Saied et al. 2020). Друго проучване отчита, че 60.5% от *S. maltophilia* HAP в онкологичен център в Мексико, в периода 2000–2016 г., са VAP (Velázquez-Acosta et al. 2018). Според данните на INFORM Network *S. maltophilia* е на шесто място сред етиологичните причинители на HAP в ICUs на 75 американски медицински центъра между 2015 и 2017 г. (Sader et al. 2018).

Резултати от скорошно проучане показват, че пациентите с COVID-19, които се нуждаят от апаратна вентилация, са значително по-склонни да развият VAP, в сравнение с критично болните, получаващи механична вентилация по други причини, а честотата на нейното разпространение е 20 на 1000 вентилационни дни спрямо 13 / 1000 (p=0.009) (Maes et al. 2021). VAP при COVID-19 често е с полимикробна етиология и се характеризира с хематогенна дисеминация, развитие на септичен шок и летален изход (Rouyer et al. 2021). По време на първата вълна на пандемията *S. maltophilia* е отчетен като най-честият причинител на бактериални респираторни коинфекции, включително VAP, при ICU пациенти в Китай (20.8% при тежко болните и 45.5% при болните в критично състояние, изпреварвайки *P. aeruginosa* и *A. baumannii* (Yang et al. 2021). Проучване върху рисковите

фактори за развитие на *S. maltophilia* VAP в ICUs отчита като основни предшестващо лечение с meropenem, тромбоцитопения, ендотрахеална интубация, поставени ЦВК и фолиев катетър (Raad et al. 2023).

В световен мащаб *S. maltophilia* е един от водещите причинители на бронхопулмонални инфекции при пациенти с МВ (Vidigal et al. 2014), но в български проучвания е отчетено относително ниско разпространение (3.7%) (Петрова и съавт. 2011; Strateva et al. 2013). Макар да съществуват противоречиви мнения дали развилата се инфекция със *S. maltophilia* се отразява върху прогресията на белодробното заболяване, е доказано, че хроничната инфекция увеличава риска от хоспитализация поради екзацербации, изискващи антибиотично лечение, и води до нарушена белодробна функция (Cogen et al. 2015; Barsky et al. 2017).

Инфекции на кръвта (бактериемии)

S. maltophilia често участва в полимикробни бактериемии, особено при имунокомпрометирани пациенти (Furuichi et al. 2016; Kim et al. 2018a; Osawa et al. 2018). Най-обичайният източник на бактериемия, причинена от *S. maltophilia*, са ЦВК (Hotta et al. 2014; Kuwahara et al. 2022), но също и респираторният тракт (Kim et al. 2018a; Pek et al. 2021), а в някои случаи източникът остава неизвестен (Denton and Kerr 1998).

Според различни проучвания смъртността при бактериемия, предизвикана от *S. maltophilia*, варира от 11% до 65% (Трифонова 2020). Рисковите фактори за смътност включват: престой в ICU (Hotta et al. 2014), механична вентилация (Osawa et al. 2018), основно онкохематологично заболяване (Jeon et al. 2016), неутропения (Araoka et al. 2010), септичен шок (Tokatly Latzer et al. 2019) и неподходяща антимикробна терапия (Sumida et al. 2015). В последните години се описват случаи на *S. maltophilia*-асоциирана бактериемия, възникнала след VAP при критични пациенти с COVID-19, с различен клиничен изход (Pek et al. 2021; Kuwahara et al. 2022).

Инфекции на кожа и меки тъкани

SSTIs съставляват до 15% от всички инфекции, причинени от *S. maltophilia*, като източник за възникването им може да бъде както първична инокулация, така и хематогенна дисеминация (Belzer et al. 2022). Те имат широк спектър от потенциални клинични прояви, включително първичен или метастатичен целулит, абсцес, мултифокална пурпура и язва или EG. Докладвани са също животозастрашаващи дълбоки инфекции, включително фасциит и пиомиозит (Baumrin et al. 2017). *S. maltophilia* може да засегне както здрава, така и наранена кожа, с неоздравяващ изход дори при имунокомпетентни лица (Adegoke et al. 2017; Трифонова 2020). Докладван е случай на некроза на два от пръстите на ръката,

поради придобита в обществото *S. maltophilia* инфекция, довела до ампутация при имунокомпетентен пациент (Trignano et al 2014). Способността на микроорганизма да инфектира интактна кожа разкрива неговия истински патогенен потенциал (Adegoke et al. 2017). При имунокомпрометирани пациенти, кожните и мекотъканните инфекции са сериозни и дори могат да завършат летално (Son et al. 2009; Gao et al. 2016; Stens et al. 2018).

Интраабдоминални инфекции

Мащабното проучване SMART определя *S. maltophilia* като един от четирите най-често асоциирани с интраабдоминални инфекции non-*Enterobacteriaceae* видове в Азиатско-Тихоокеанския регион, в периода 2003–2010 г. (Liu et al. 2012). Изолира се при холангит, сред пациенти с обструкция на жлъчните пътища, вследствие на хепатобилиарни доброкачествени или злокачествени новообразувания (Kaya et al. 2012). Случай на *S. maltophilia* холангит (коинфекция с *P. aeruginosa*), при пациент с постоянен перкутанен трансхепатален дрен, е описан от Pérez et al. Авторите установяват ефект от лечението, единствено след интрабилиарно въвеждане на АМЛС през билиарния катетър (Pérez et al. 2014).

Перитонит, причинен от *S. maltophilia*, се съобщава при пациенти, подложени на перитонеална диализа. В тези случаи инфектирането води до хоспитализация и продължително лечение, но инфекциите се повлияват от антибиотично лечение и понякога не налагат отстраняване на диализния катетър (Azak et al. 2011; Millán-Díaz et al. 2017).

Изолирането на *S. maltophilia* при панкреатит е относително рядко, като при описаните случаи инфекцията е асоциирана с имуносупресия, престой в ICU и предшестваща употреба на широкоспектърни антибиотици. В основата на терапията при инфектирани панкреатични колекции е ендоскопският дренаж (Fujimori et al. 2011). Редки са и докладите за чернодробен абсцес, причинен от *S. maltophilia*. Инфекцията е установявана както при имуносупресирани с HIV и малигнени заболявания, така и при имунокомпетентни пациенти, претърпели хирургични интервенции (Calza et al. 2003; Petri et al. 2003; Inviati et al. 2018). Интраабдоминален абсцес, възникнал след инфекция на хирургичната рана, е много рядка инфекция със *S. maltophilia*, описвана в литературата (Sawai et al. 2017; Lim et al. 2017).

Други инфекции

Рядко *S. maltophilia* може да причини **UTIs.** Повечето са болнично придобити и възникват след инвазивни интервенции, вкл. катетеризация (Denton and Kerr 1998; Umar et al. 2022a). За тежкото протичане допринасят някои от следните рискови фактори: злокачествени заболявания, имунокомпрометирано състояние на пациента, поставен постоянен катетър, продължително антибиотично лечение и продължителен престой в ICU (Calza et al. 2003; Brooke 2012; Umar et al. 2022b). При болни с онкологични заболявания UTIs често са усложнени и могат да бъдат източник на бактериемия (Трифонова 2020). Лечението им е базирано най-вече на trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), признат като средство на първи избор при *S. maltophilia* инфекции, но са докладвани инфекции, чийто агент е SXT-резистентен. Savini et al. представят случай на катетър-свързана UTI при пациент с миелофиброза, причинена от *S. maltophilia*, устойчив на много АМЛС, в т.ч. на SXT, който е показал чувствителност единствено към chloramphenicol и rifampicin (Savini et al. 2010). В подобни случаи образуването на биофилм върху постоянния катетър е в основата както на патогенезата на инфекцията, така и в затрудненото й лечение.

Очните инфекции, причинени от *S. maltophilia*, също са редки и се отличават с разнообразие в клиничните манифестации: ятрогенни, посттравматични или ендогенни ендофталмити (Ji et al. 2015; Agarwal et al. 2019); склерит след травма или хирургична интервенция (Ramos-Esteban and Jeng 2008; Lin et al. 2011b); кератит, предимно при пациенти, използващи локални коритикостероиди или контактни лещи (Palioura et al. 2018; Park et al. 2021); дакриоцистит (Habib et al. 2021); каналикулит (Kiser et al. 2018) и конюнктивит (Falagas et al. 2009).

Инфекциите на кости и стави не са типични за *S. maltophilia*. В литературата са описани случаи на остеомиелит след фрактура и инфекция на хирургична рана (Hagiya et al. 2014; Chesnutis et al. 2018), както и такива, в които точният източник на инфекция остава неопределен (Ilyas et al. 2016). Ставното протезиране и имунокомпрометираният статус са отчетени като рискови фактори за изключително редкия септичен артрит, причинен от *S. maltophilia* (Belzunegui et al. 2000; Moshirabadi et al. 2019).

Инфекциозният ендокардит е рядко усложнение, което *S. maltophilia* може да предизвика, главно при кардиохирургични интервенции, имплантирани сърдечни устройства и наличие на ЦВК (Subhani et al. 2016). Сред докладваните случаи на ранни и късни ендокардити преобладават асоциираните с изкуствени сърдечни клапи, пейсмейкъри и имплантируеми дефибрилатори (Reynaud et al. 2015; Morte et al. 2018; Satish et al. 2019). Отчита се висок процент смъртност (34.8%) сред регистрираните случаи на *S. maltophilia* ендокардит. Независимо от усложненията, водещи до летален изход,

заболеваемостта като цяло е по-висока (70-80%) сред пациенти с мозъчно-съдова болест, застойна сърдечна недостатъчност и миокарден абсцес (Subhani et al. 2016).

Друга инфекция, която *S. maltophilia* може да причини много рядко, е **менингит.** Докладвани са неонатални и менингити в ранна детска възраст, предимно след неврохирургична интервенция, като поставяне на мозъчни шънтове и дренажи (Sood et al. 2013; Correia et al. 2014). В България също има регистриран случай на шънт-асоциирана инфекция при новородено с вътрешна хидроцефалия (Стоева и съавт. 2007). Менингитът при възрастни е предимно нозокомиален и свързан с неврохирургична интервенция (Khanum et al. 2020). Случаите на придобит в обществото *S. maltophilia* менингит при възрастни имунокомпетентни лица са изключителна рядкост (Libanore et al. 2004).

2.3. Фактори на вирулентност в патогенезата на инфекции, причинени от НФГБ

2.3.1. Фактори на вирулентност на *P. aeruginosa*

P. aeruginosa притежава голям „арсенал“ от клетъчно-свързани и извънклетъчни фактори на вирулентност, които участват в патогенезата на инфекциите, контролирани от невероятно сложни, взаимносвързани регулаторни вериги и сигнални системи, придаващи на патогена голяма пластичност (Nadal Jimenez et al. 2012; Balasubramanian et al. 2013). На **Фигура 2.** е направено обобщено представяне на основните фактори на вирулентност, въвлечени в респираторните инфекции, а в **Таблица 1.** е представена ролята в патогенезата на клетъчно-свързаните и извънклетъчните фактори на вирулентност.

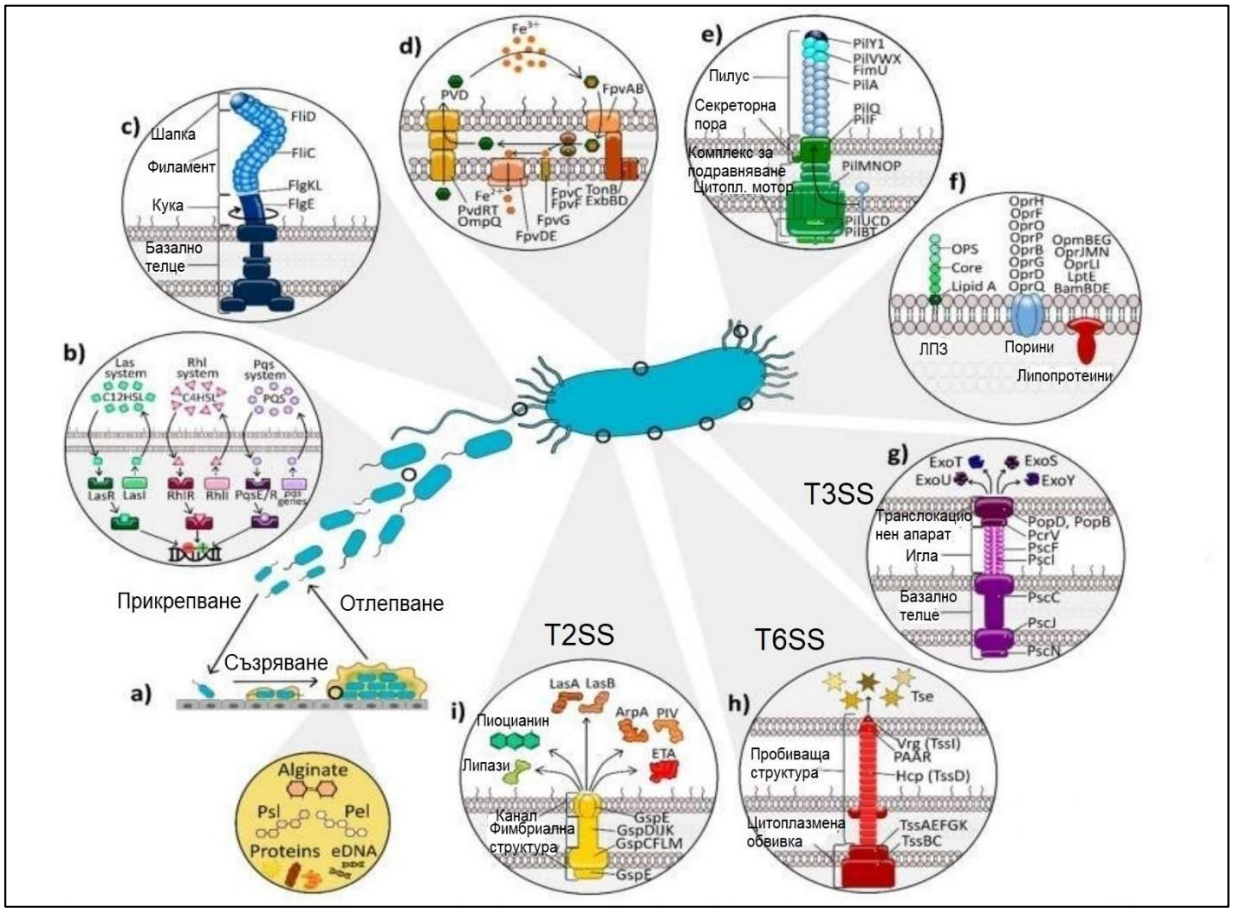
2.3.1.1. Външна мембрана: ЛПЗ и протеини

Външната мембрана (ВМ) има асиметрична двуслойна структура, ограничаваща навлизането на вредни съединения. Нейната вътрешна част е съставена от фосфолипиди, а външната – от ЛПЗ, като в нея са вмъкнати около 300 протеина (outer membrane proteins – OMPs) с различни функции, голяма част от които остават неясни.

Липополизахарид

ЛПЗ се състои от три домена: липид А, сърцевинна (централна) област и О-антиген или О-полизахарид, които имат отношение към вирулентността на *P. aeruginosa* (Huszczynski et al. 2019). Той представлява физична бариера, медиира взаимодействията с рецепторите на гостоприемника и причинява увреждане на тъканите поради своята ендотоксична активност. ЛПЗ стимулира производството на реактивни видове кислород (reactive oxygen species – ROS) и гелобразуващ муцин в епителните клетки на дихателните

пътища, което е свързано със заболеваемостта и смъртността при пациенти с астма, ХОББ и МВ (Yan et al. 2008; Li et al. 2013). Той повишава парацелуларния пермеабилитет на епителa на дихателните пътища и индуцира белодробно възпаление чрез стимулиране на тумор некротизиращ фактор-α (TNF-α), IL-1, IL-6 и интерферон (IFN)-γ (Jurado-Martín et al. 2021). ЛПЗ също допринася за антибиотичната резистентност и влияе върху образуването на външни мембранни везикули (outer membrane vesicles – OMV) и биофилми (Huszczynski et al. 2019).



Фигура 2. Схематично представяне на основните фактори на вирулентност, използвани от *P. aeruginosa* при респираторни инфекции: a) способност за образуване на биофилм и състав на извънклетъчния матрикс на биофилмите (екзополизахариди, протеини и екстрацелуларна ДНК); b) трите основни quorum sensing (QS) системи (Las, Rhl и Pqs); c) флагелините FilC и FilD, инкорпорирани във флагеларната структура; d) пиовердин (PVD), който е сидерофор – система за улавяне на желязо; e) тип 4 пили (T4P); f) липополизахарид (ЛПЗ) и външномембранни протеини (OMPs); g) тип III секреторна система (T3SS) и нейните 4 основни ефекторни протеина (ExoS, ExoU, ExoT и ExoY); h) тип VI секреторна система (T6SS); i) тип II секреторна система (T2SS) и съединенията, които освобождава в извънклетъчната среда: литични ензими (липази, протеази (AprA и PIV) и еластази (LasA и LasB), екзотоксин A (ETA) и пиоцианин (Jurado-Martín et al. 2021).

Таблица 1. Основни фактори на вирулентност на *P. aeruginosa* и тяхната роля в патогенезата.

Фактори на вирулентност	Секреторна система	Мишена в гостоприемника	Роля в патогенезата
Алгинат			Извънклетъчен полизахарид. Свръхпродуциран в мукоидни щамове, често изолирани при хронични белодробни инфекции. Участва в производството на биофилми. Доказано е, че лечението с imipenem индуцира експресия на алгинат и води до удебеляване на биофилмите (Bagge et al. 2004). Други полизахариди (PeI и Psl) също могат да допринесат за образуване на биофилм (Maunders and Welch 2017).
Ресни (флагели)		Клетъчна повърхност	Адхезивни структури. Предизвикват силен NFkB-медииран възпалителен отговор през Toll-like рецептор 5 (TLR5) и капсаза-1-медииран отговор чрез Nod-like рецептора Ipaf. Осигуряват на бактериите подвижност чрез „плуване“ в течна среда (Haiko and Westerlund-Wikström 2013).
Тип IV пили (T4P)		Клетъчна повърхност	Основни повърхностни адхезионни молекули, осигуряващи подвижност чрез „трептене“ върху влажни повърхности. Механизмът на сигнална трансдукция изисква прикрепване на T4P към твърда повърхност, ретракция на пилуса и сигнална трансдукция през хемосензорната система Chp (активира продукция на cAMP и транскрипция на стотици гени, включително за ключови фактори на вирулентност) (Persat et al. 2015).
Алкална протеаза (AprA)	Тип I	Протеини на комплемента	50.4-kDa Zn-зависима металопротеаза. Тип I секрецията на ензима е зависима от продуктите на *aprD*, *aprE* и *aprF*. Генът *aprI* е отговорен за вътреклетъчно инхибиране на AprA, за да се избегне вътреклетъчна токсичност (Bardoel et al. 2012).
Еластаза A (LasA)	Тип II	Матриксни протеини	20-kDa металопептидаза, известна също като стафилолизин, която се секретира като проензим, преди да се активира извънклетъчно. LasA действа с ограничена специфичност, предимно при глицин-глицин пептидни връзки, но също така повишава еластинолитичната активност на LasB (Spencer et al. 2010).
Еластаза B (LasB)	Тип II	Матриксни протеини	33-kDa Zn-металопротеаза, получена от *lasB*-кодиран 52-kDa прекурсорен протеин, който претърпява автокаталитично разцепване. 18-kDa пропептид остава свързан със зрялата протеаза, за да предотврати нейна преждевременна протеолитична активност, докато е в периплазмата на клетката (Casilag et al. 2016).
Екзотоксин A (ETA)	Тип II	Клетъчна структура	66-kDa протеин от семейството на AB токсини, образуван от два домена. Домен A осигурява ензимна активност, а домен B действа като клетъчно-свързваща субединица. В цитозола на клетката гостоприемник факторът на елонгация 2 претърпява каталитично ADP-рибозилиране от ETA, което инхибира протеиновия синтез и индуцира апоптоза (Michalska and Wolf 2015).

Таблица 1. Продължение

Фактори на вирулентност	Секреторна система	Мишена в гостоприемника	Роля в патогенезата
Екзоензим S (ExoS)	Тип III	Клетъчна структура	49-kDa бифункционален цитотоксин. Състои се от два домена: N-терминален Rho-GTPаза активиращ протеин (RhoGAP) и C-терминална ADP рибозил трансфераза. ExoS избягва фагоцитозата и индуцира апоптоза (Barbieri and Sun 2004).
Екзоензим T (ExoT)	Тип III	Клетъчна структура	54-kDa бифункционален ензим с GAP и ADP рибозилтрансферазна активност. ExoT рибозилира два адапторни протеина: CT10 регулатора на киназа (Crk)-I и Crk-II (Wood et al. 2015). Инхибира интернализацията от епителни клетки и макрофаги (Qin et al. 2022).
Екзоензим U (ExoU)	Тип III	Клетъчна структура	74-kDa хидрофилен протеин с фосфолипазна активност. Инжектиран в клетката гостоприемник чрез T3SS, ExoU води до бързо увреждане на клетъчната мембрана и органелите с клетъчен лизис (цитотоксин) (Sato et al. 2003). Увеличава трансепителната миграция на неутрофилни левкоцити (Neu), подсилва ключов хемотаксичен сигнал и води до засилен възпалителен отговор (Pazos et al. 2017).
Екзоензим Y (ExoY)	Тип III	Клетъчна структура	Аденилат циклаза. Повишава вътреклетъчната концентрация на cAMP в клетките на гостоприемника, разрушава актиновия цитоскелет и повишава ендотелната пропускливост (Beckert et al. 2014).
Циановодород (HCN)		Митохондрии	HCN се продуцира от глицин, с участие на HCN синтаза, в условия на ниско съдържание на O_2. Ефектите върху клетките на гостоприемника варират в зависимост от типа клетка и оксидативния стрес, и водят до апоптоза или некроза. HCN увеличава генерирането на реактивни видове кислород (Cody et al. 2009).
Нуклеозид дифосфат киназа (NDK)	Тип I	Макрофаги	NDK катализира обмена на фосфатни групи между нуклеозидни дифосфати. Индуцира експресия на IL-1α и IL-1β в комбинация със сигнали, инициирани от бактериален флагелин (Kim et al. 2014).
Хемолитична фосфолипаза C (PLC-H)	Тип II	Клетъчни мембрани	PLC-H причинява съдова пропускливост, терминално органно увреждане и смърт при приложение във високи дози на мишки. Продукцията се индуцира от фосфатен глад. Причинява хемолиза и активация на Neu левкоцити (Terada et al. 1999).
Протеаза IV	Тип II	Протеини на комплемента	26-kDa серин ендопротеаза. Инактивира редица защитни механизми на гостоприемника, в това число фибриноген, плазминоген, имуноглобулин G, както и C1q и C3 фракции на системата на комплемента. Транскрипцията на *piv* гена, който кодира протеаза IV, е силно зависима от quorum sensing (Park et al. 2014).
Малка протеаза на *P. aeruginosa* (PASP)	Тип II	Структурни протеини	18.5-kDa протеин, способен да разцепва колагени тип I и IV. Съществува в неактивна форма в цитоплазмата и периплазмата, но става активен след секреция. PASP индуцира миграция на полиморфонуклеарни левкоцити в стромата на роговицата (Tang et al. 2009).

Таблица 1. Продължение

Фактори на вирулентност	Секреторна система	Мишена в гостоприемника	Роля в патогенезата
Пиоцианин (PCN)	Тип II	Широко разпространена цитотоксичност	Редокс-активният феназин инхибира дишането на клетките на гостоприемника, цилиарната функция и епидермалния растеж; нарушава Ca хомеостаза и индуцира апоптоза в Neu. Производството на PCN се контролира частично от регулатора на реакцията на оксидативен стрес (OxyR) и се счита, че играе защитна роля срещу фагоцитите (Abdelaziz et al. 2023).
Пиовердин (PVD)		Клетъчно желязо	Сидерофор. Малко свободно Fe е налично в средата на гостоприемника, така че PVD медиира отделяне на Fe от депата на гостоприемника. Fe-свързаният PVD действа като сигнализираща молекула и взаимодейства с клетъчния *Pseudomonas* рецептор FpvA, причинявайки свръхрегулация на ETA, ендопротеазата и самия PVD (Nadal Jimenez et al. 2012).
Рамнолипид (RL)			Повърхностно активно вещество (сърфактант). Участва в поддържането на необитаеми канали около съобществата от биофилм, които осигуряват хранителни вещества и O_2 за колониите от бактерии (Davey et al. 2003).
Апарат за транслокация на T3SS		Клетъчна повърхност	Три протеина за транслокация: PopB, PopD и PcrV. И трите са необходими за образуването на пори, но PopB също играе роля в патогенността на *P. aeruginosa* независимо от ефекторните протеини. PcrV се намира в края на T3SS игления комплекс и действа като платформа за PopB и PopD при образуване на порите за транслокация (Galle et al. 2012).

Липид А е хидрофобен гликолипид, който захваща другите две части на ЛПЗ във ВМ и играе роля на ендотоксин. Състои се от скелет на диглюкозамин бифосфат с O- и N-свързани мастни киселини и варира при различните изолати в зависимост от условията на растеж и източниците на изолиране, което има значителни последици за адаптирането в съответната ниша (Lam et al. 2011). Ацилните вериги на липид А се свързват с MD2 рецептора на клетката гостоприемник, активирайки TLR-4 сигналния път (Park and Lee 2013). Ацилните вериги и фосфатите на липид А взаимодействат с хинолоновата молекула от Pqs QS системата, при експортиране към ВМ, предизвиквайки изкривяване на мембраната, което води до образуване на OMV (Florez et al. 2017). Мутантни щамове *P. aeruginosa* с дефект в синтеза на липид А са демонстрирали неспособност за биофилм образуване както върху биотични, така и върху абиотични повърхности и са показали значително намалено прикрепване към епителните клетки на дихателните пътища, което предполага, че ЛПЗ може да играе косвена роля в бактериалната адхезия и образуването на биофилм (Alshalchi and Anderson 2015).

Едновременно се продуцират два О-полизахаридни антигена: i) *общ полизахариден антиген (CPA)* – хомополимер с консервативна структура, състояща се от повтарящи се d-рамноза тризахаридни остатъци; и ii) *О-специфичен антиген (OSA)* – хетерополимер, който варира при отделните щамове *P. aeruginosa*, и определя серотиповата принадлежност (20 серотипа според Международната система за антигенно типизиране (IATS) (Lam et al. 2011). О-полизахаридът (ОПЗ) участва в много взаимодействия гостоприемник – патоген: a) предотвратява бактериалното убиване чрез инхибиране на отлагането на порообразуващ мембранен атакуващ комплекс и фагоцитоза; b) защита от оксидативен стрес и c) вероятно стимулира образуването на неутрофилни извънклетъчни „капани“ (neutrophil extracellular traps – NETs) (Pieterse et al. 2016; Huszczynski et al. 2019). Промени в ОПЗ влияят върху размерите и протеиновото съдържание на OMVs, въпреки че механизмът е все още недостатъчно изяснен. Освен това при мутантни щамове *P. aeruginosa* без CPA е нарушена способността за образуване на здрави биофилми (Murphy et al. 2014). CPA има роля и в прикрепването към бронхиалните епителни клетки (Jurado-Martín et al. 2021).

Външномембранни протеини – порини

P. aeruginosa експресира 26 специфични OMPs за обмен на различни молекули, като повечето от тях са многофункционални. Основният порин (с нелипопротеинова структура) е **OprF**, който принадлежи към OmpA семейството. OprF е от съществено значение както за интегритета на ВМ, така и за вирулентността. Той е отговорен за придобиването на неспецифични йони и захариди, и може да осигури дифузията на толуен, сидерофори, нитрати и нитрити. Също така OprF медиира бактериалната адхезия към човешки алвеоларни епителни клетки и други бактерии, и последващо образуване на микроколонии, вероятно чрез OprF-лектин B комплекс (Chevalier et al. 2017; Cassin and Tseng 2019). При дефицит на OprF намалява способността на мутантните щамове да продуцират други фактори на вирулентност, като пиоцианин (PCN), еластаза B (LasB), лектин PA-1L и екзотоксин A (ETA) (Fito-Boncompte et al. 2011; Bukhari and Aleanizy 2020). OprF играе важна роля при растеж в биофилм в анаеробни условия (McClean 2012), както и в стадия на прикрепване при формирането на биофилм (Song et al. 2018). Също така модулира експресията на T3SS и нейните ефектори, както при ектрацелуларен, така и при интрамакрофагеален начин на живот (Fito-Boncompte et al. 2011; Garai et al. 2019). Не на последно място се предполага, че OprF действа и като сензор на имунната система на гостоприемника, като C3b рецептор и свързващ IFN-γ, модулирайки QS системите да предизвикат вирулентен отговор (McClean 2012; Mishra et al. 2015).

OprH е малък порин от OmpW семейството, който свърза протеин А на сърфактанта и ламинина при инфекции на дихателните пътища (Qadi et al. 2016; Paulsson et al. 2019). Той участва в резистентността към аминогликозиди и полимиксини (Chevalier et al. 2017) и допринася за целостта на ВМ чрез взаимодействие с ЛПЗ (Kucharska et al. 2016). Може да участва в транспортирането на хидрофобни молекули, катиони, желязо (Fe^{2+}) и малки аминокиселини чрез конформационни промени (Chevalier et al. 2017).

OprD (OccD1) е главен външномембранен протеин от OprD суперсемейството, който осигурява навлизане на карбапенемни антибиотици в бактериалната клетка, както и транспортиране на основни аминокиселини, пептиди и вероятно глюконат. Той е свръхпредставен във OMVs от проби от биофилм, притежава протеазна активност и се свързва с ламинина (Chevalier et al. 2017; Paulsson et al. 2019). **OprQ (OccD6)** участва в адхезията към епителни клетки чрез свързване с човешкия фибронектин (Arhin and Boucher 2010).

Липопротеини

Липопротеините са групирани в семейства според фунцията си. **BamBDE** и **LptE** са част от машините за сглобяване на ВМ (Remans et al. 2010). Други липопротеини участват в поддържане целостта на клетката чрез взаимодействие с пептидогликана, напр. **OprL** и **OprI**. OprL също допринася за защитата на клетките срещу оксидативен стрес (Panmanee et al. 2008). И накрая, **OprM, OprN, OprJ, OpmG, OpmB** и **OpmE** участват в ефлукса на вредни молекули, включително антибиотици, като по този начин придават антибиотична резистентност (Auda et al. 2020).

2.3.1.2. Ресни (флагели)

P. aeruginosa притежава единичен полярен флагелум, който се състои от нишка (филамент), изградена от хеликоидално подреден полимеризиран флагелин (FliC); типово-специфичен протеин на шапката (FliD); кука в основата на филамента (FlgE); два филамент-кука свързващи протеина (FlgKL) и базално телце с редица компоненти, пресичащи ВМ и вътрешната мембрана (**Фигура 1c**) (Jurado-Martín et al. 2021). FliC протеинът се състои от три домена – D0, D1 (консервативна и имуногенна структура) и D2 (вариабилна структура), и е разделен на два серотипа – хетерогенен Fli-a и серологично еднороден Fli-b (Song and Yoon 2014).

Въпреки че *P. aeruginosa* също се движи върху твърди повърхности, флагелумът е отговорен основно за подвижността чрез „плуване“ във водна среда или среда с нисък

вискозитет чрез въртене тип „тирбушон“, генерирайки сила, която движи бактерия напред (Sampedro et al. 2015). Хемотаксисът е важен за първоначалното свързване на *P. aeruginosa* с епитела на дихателните пътища на пациенти с МВ, тъй като се използва за насочване на „плуването“ към тези клетки, и в тази връзка флагелумът се счита за важен фактор на вирулентност (Duan et al. 2013; Schwarzer et al. 2016). Освен това FliC е отговорен за свързване с мембранния гликолипид асиало-GM1 върху апикалната повърхност на белодробните епителни клетки, хепаран сулфат протеогликаните по базолатералната повърхност и SP-A сърфактанта (Bucior et al. 2012; Ketko et al. 2013), докато FliD медиира адхезията към човешкия респираторен муцин MUC1. Тези взаимодействия задействат TLR5 пътя и възпалителен отговор (Haiko and Westerlund-Wikström 2013). Освен това способността за флагеларно прикрепване подпомага първоначалното установяване на биофилм, а подвижността позволява разпръскване на клетките в последните стъпки. Необходимо е обаче подходящо време за контрол на подвижността, за да се образуват здрави биофилми през етапа на зреене (Guttenplan and Kearns 2013).

2.3.1.3. Тип IV пили

Тип IV пилите (T4P) са прибиращи се, подобни на косъмчета, нишковидни придатъци с полярна локализация по клетъчната повърхност. Изградени са от хиляди молекули на малък мономерен протеин, известен като *главен пилин (PilA)*, заедно с по-слабо представени *второстепенни пилини*, локализирани на върха на пилуса (FimU-PilVWXY1), които от своя страна биват *сърцевинни второстепенни пилини* (участващи в обаразуването на пили и стабилизирането на техния връх) и *несърцевинни второстепенни пилини* (участващи в агрегацията, адхезията и усвояването на ДНК) (Jacobsen et al. 2020). Тяхната функция се осъществява от мощна машина, организирана в три части: цитоплазмен моторен субкомплекс (PilBTUCD), субкомплекс за подравняване, разположен във вътрешната мембрана (PilMNOP), и секреторен субкомплекс, включващ пори във ВМ (PilQF) – **Фигура 1е. PilA** се формира от три домена: висококонсервативен хидрофобен N-терминален α-спираловиден участък, хипервариабилен централен участък и полуконсервативен С-терминален участък, който включва свързваща част към епителните клетки на гостоприемника чрез дисулфидно свързан бримков участък (Jacobsen et al. 2020). Освен това съществуват пет групи T4P (I, II, III, IV и V), които са свързани с различни модели на производство на биофилм и MDR (Horna et al. 2019b).

Пилите са основни структури за започване на инфекцията чрез медииране на подвижността и адхезията. Те контролират подвижността чрез „трептене“, използвана от бактериите за бърза колонизация на различни повърхности (Burrows 2012). Това включва

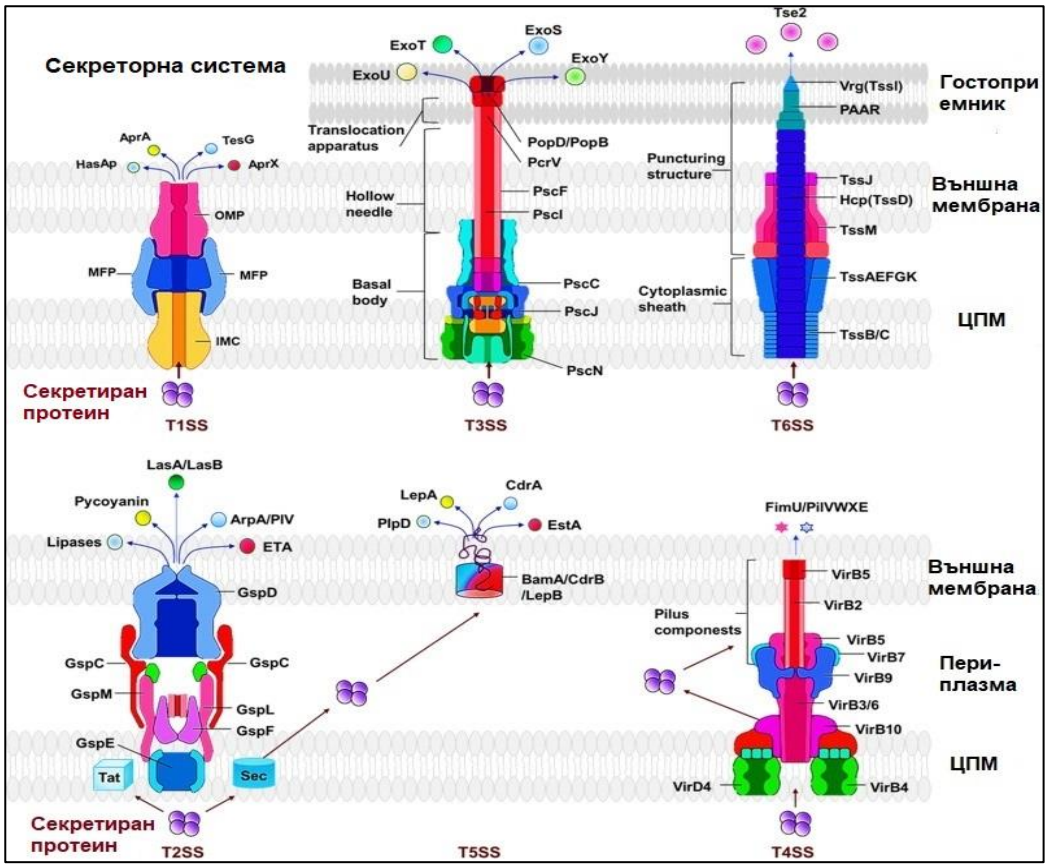
последователни цикли на удължаване, адхезия и прибиране на T4P нишки, които генерират сила за движение на клетката напред (Talà et al. 2019). T4P могат да се свържат с асиало-GM1 и асиало-GM2 мембранните гликолипиди на белодробните епителни клетки, като в процеса участва C-краят на PilA (Craig et al. 2004). Въпреки това експериментални проучвания са установили, че някои клинични изолати *P. aeruginosa* не използват тези ганглиозидни рецептори по време на адхезия (Schroeder et al. 2001). Благодарение на свойствата си за прикрепване и движение, T4P също играят роля в развитието и агрегацията на биофилм и образуването на структури на биофилма, подобни на гъби (Tolker-Nielsen 2014). T4P допринасят също за устойчивост към SP-A-медиираната фагоцитоза в белия дроб (Tan et al. 2014).

2.3.1.4. Системи за секреция на протеини

P. aeruginosa притежава шест секреторни системи, които секретират голямо разнообразие от токсини и хидролитични ензими, за да атакуват гостоприемника (Qin et al. 2022). Въз основа на пътищата на секреция на участващите транспортни протеини секреторните системи се разделят на два основни класа, *едностепенни секреторни системи* (T1SS, T3SS, T4SS и T6SS) и *двустепенни секреторни системи* (T2SS и T5SS). Едностепенните системи за секреция директно секретират протеини от бактериалния цитозол на повърхността, докато двустепенните системи за секреция изискват кратък периплазмен престой на секретираните протеини по пътя на техния износ и след това освобождават протеините във външната среда на бактерия (**Фигура 3**).

T1SS освобождава алкалната протеаза AprA, хемофора HasAp, AprX протеин с неизвестна функция и TesG, който потиска притока на неутрофилни левкоцити (Neu) по време на хронични инфекции (Zhao et al. 2019; de Sousa et al. 2021). Понастоящем данните, свързани с T1SS, са много ограничени и нейната функция в патогенезата, както и значението ѝ за физиологията на *P. aeruginosa* са до голяма степен неизвестни, което изисква допълнителни проучвания.

T5SS на *P. aeruginosa* се състои от пет подтипа (Va до Ve) и изнася протеините през вътрешната мембрана чрез Sec пътя. Секретира разнообразие от протеини, в т.ч. EstA естераза, CdrA извънклетъчен адхезин, LepA и LepB протеази. EstA участва в производството на рамнолипид (RL) и формирането на биофилм (Meuskens et al. 2019).



Фигура 3. Системи за секреция на протеини в *P. aeruginosa*. Секреторните системи са разделени на два основни класа: едностепенни секреторни системи (T1SS, T3SS, T4SS и T6SS) и двустепенни секреторни системи (T2SS и T5SS). Екзопротеините на едностепенните секреторни системи се абсорбират директно в цитоплазмата чрез сроден механизъм на секреция. Обратно, екзопротеините на двустепенните системи за секреция първо се изнасят в периплазмата чрез системата Sec или Tat и след това преминават през външните мембрани чрез специфични механизми на секреция (Qin et al. 2022).

T2SS е най-универсалната система, използвана от *P. aeruginosa*, която освобождава голямо разнообразие от екзопротеини, представени в **т. 2.3.1.5.** Състои се от най-малко 10 протеина, изграждащи следните три части: базално телце във вътрешната мебрана, фимбриална структура в периплазменото пространство и канал, пресичащ ВМ (**Фигура 2i**) (Naskar et al. 2021). T2SS включва два различни пътя: обща секреторна (Sec) система и двойната транспортна система за аргинин (Tat). Секретираните протеини първо преминават през вътрешната мембрана, остават за кратко в периплазмата и след това се секретират в извънклетъчната среда. Функционално T2SS участва в секрецията на гуанилат циклаза, ETA, протеази (еластази) LasA/B и множество други фактори, много от които се очертават като потенциални терапевтични мишени (Swietnicki et al. 2019).

T4SS на *P. aeruginosa* включва изобилие от субединици на главния пилин (PilA) и по-малко субединици на второстепенните пилини (FimU и PilVWXE) (Tammam et al. 2013).

Открита най-скоро, **T6SS** е изградена от Hcp (TssD) тръба с два шипови протеина, които се задвижват в цитоплазмената мембрана. Тя е важна за бактериалната конкуренция, тъй като секретира бактериални токсини (Tse), които унищожават микробиотата на гостоприемника (Sana et al. 2016). Секретираните екзопротеини се „инжектират“ директно в цитоплазмата на клетката мишена, както при T3SS (Qin et al. 2022).

Тип III секреторна система (T3SS)

T3SS на *P. aeruginosa* инжектира токсични ефектори директно в цитозола на клетката гостоприемник. Това е подобна на спринцовка „инжектизома“, състояща се от най-малко 20 протеина, и разделена на две части: (i) *апарат за секреция*, който транспортира ефекторите през бактериалните мембрани и (ii) *апарат за транслокация*, който пренася ефекторите през мембраната на клетката на гостоприемника – **Фигура 2g.** и **Фигура 3.** (Anantharajah et al. 2016). Апаратът за секреция притежава куха игла от спирално полимеризиран протеин (PscF) и базално телце, състоящо се от цитоплазмена АТР-аза (PscN), вътрешномембранен липопротеинов пръстен (PscJ) и олигомеризиран секретинов пръстен във ВМ (PscC). Апаратът за транслокация е изграден от два хидрофобни протеина (PopB и PopD), които взаимодействат с мембраната на клетката гостоприемник, за да образуват порите за транслокация, и хидрофилен протеин PcrV, който е от съществено значение за правилното сглобяване и вмъкване на PopB и PopD в мембраните на клетката гостоприемник. Инжектизомата се експресира на базални нива в състояние на покой. Различни индуциращи сигнали, като ниски концентрации на извънклетъчен Ca^{2+}, серумен албумин/казеин и контакт с клетка гостоприемник чрез пилини или флагели, насърчават нейната експресия. Процесът се контролира от главния регулатор ExsA (Williams McMackin et al. 2019). Въпреки че не е необходима за инфекция, T3SS повишава тежестта на заболяването. Тя позволява на *P. aeruginosa* да причини увреждане на епителa, да се разпространи в кръвообращението и да противодейства на вродения имунитет на гостоприемника (Anantharajah et al. 2016).

Ефекторни цитотоксини, секретирани чрез T3SS

Има четири добре известни ефекторни токсини, инжектирани чрез T3SS, които са променливо експресирани в различните щамове *P. aeruginosa*: екзоензим U (ExoU), екзоензим T (ExoT), екзоензим S (ExoS) и екзоензим Y (ExoY) (**Таблица 1**). В последните години към ефекторите са предложени още два (PemA и PemB) (Burstein et al. 2015). Освен

това чрез T3SS могат да бъдат пренасяни и други протеини, като флагеларни протеини (Ince et al. 2015), PilA (Lindestam Arlehamn and Evans 2011) и ядрена дифосфат киназа (Neeld et al. 2014).

Въпреки че се произвежда от по-малко от половината клинични изолати *P. aeruginosa* (24–42%) (Javanmardi et al. 2019), **ExoU** се счита за основния T3SS цитотоксин, тъй като има най-голямо въздействие върху тежестта на заболяването, причинявайки тежко остро белодробно увреждане, сепсис и летален изход (Shaver and Hauser 2004; Howell et al. 2013; Pea et al. 2015). Той има активност на фосфолипаза A2, която необратимо разрушава мембраната на клетката гостоприемник, и води до бърза клетъчна смърт. Тази убиваща активност може да бъде насочена срещу фагоцитите и епителa, като по този начин улеснява разпространение на патогена и предотвратява неговото изчистване (Hauser 2009). ExoU също се свързва с провъзпалителен отговор чрез увеличаване на производството на ейкозаноид както в епителните клетки, така и в Neu. Той активира NF-κB фактора, стимулира секрецията на IL-8 по време на инфекциозния процес и води до повишена миграция на Neu в инфектирания белодробен епител (de Lima et al. 2012; Pazos et al. 2017).

ExoT е най-разпространеният T3SS ефекторен цитотоксин, произвеждан от почти всички клинични изолати *P. aeruginosa* (92–100%) (Javanmardi et al. 2019), въпреки че самостоятелно не може да осигури персистиране на бактериите в белия дроб (Shaver and Hauser 2004). Той е бифункционален екзотоксин с активност на GTP-аза активиращ протеин (GAP) и аденозин дифосфат рибозил трансфераза (ADPRT), които действат синергично, за да възпрепятстват фагоцитозата и да разрушат епителните бариери (Hauser 2009). GAP доменът инактивира три малки GTP-ази (Rac, Rho и Cdc42), които поддържат организацията на цитоскелета на клетката гостоприемник. Това води до обратимо разрушаване на актиновия цитоскелет, което инхибира клетъчната миграция и предизвиква клетъчно окръгляване. Инактивирането на Rho също включва потискане на цитокинезата. Освен това GAP активността на ExoT, заедно с ExoS, допринася за инхибирането на обратната връзка на ефекторното инжектиране (Armentrout et al. 2021). ExoT специфично рибозилира два адапторни протеина (CT10-регулатор на киназа (Crk)-I и Crk-II), които играят роля във фагоцитозата, фокалната адхезия и клетъчната миграция (Wood et al. 2015). ExoT също така увеличава производството на IFN-γ от NK клетките в белия дроб (Vourc'h et al. 2017).

ExoY е вторият най-разпространен ефекторен цитотоксин, експресиран от >89% от изолатите (Javanmardi et al. 2019; Wagener et al. 2020). Той представлява разтворима аденилат циклаза, която повишава вътреклетъчните нива на различни циклични

нуклеотиди (cAMP, cCMP, cGMP и cUMP), когато се инжектира в клетки на бозайници, поради активиране на протеин кинази (Hauser 2009; Beckert et al. 2014). В белия дроб патологичните ефекти от неговото действие включват: необратимо разглобяване на актиновите микротубули, клетъчна некроза, нарушаване целостта на ендотелната бариера, увреда на белодробната функция и терминална дисфунция (Stevens et al. 2014; Wagener et al. 2020). Доказано е, че ExoY потиска активирането на трансформиращ растежен фактор β-активираната киназа 1 (TAK1), като по този начин инхибира производството на проинфламаторни цитокини както от макрофагите, така и от епителните клетки (He et al. 2017). В допълнение, ExoY регулира възпалителните реакции на гостоприемника чрез забавяне на активирането на NF-κB и каспаза-1 (Jeon et al. 2017).

Според мета-анализ на Javanmardi et al., обобщаващ голям брой проучвания в периода 2001–2018 г., **ExoS**-продуциращи са 58–72% от клиничните изолати *P. aeruginosa* (Javanmardi et al. 2019). Наскоро е установено, че неговата експресия води до хронични инфекции и по-лоши клинични резултати при пациенти с MB (Sarges et al. 2020). ExoS притежава същата бифункционална активност като ExoT (Hauser 2009). Неговата GAP активност е насочена към същите три GTP-ази, но за разлика от ExoT, ADPRT доменът на ExoS е насочен към широк спектър от клетъчни фактори и пътища, като по този начин предизвиква разнородни неблагоприятни ефекти върху клетките гостоприемници, като клетъчна смърт, разрушаване на актиновия цитоскелет, инхибиране на ДНК синтеза, движение на везикули или ендоцитоза (Hauser 2009). В началото на инфекцията ExoS се инжектира главно в Neu, където активността на ADPRT домена е основният фактор за предотвратяване на фагоцитоза (Rangel et al. 2014). По-късно, в хода на инфекцията ExoS се инжектира в пневмоцити тип I, което води до разрушаване на белодробно-съдовата бариера (Rangel et al. 2014). Също така този цитокин рибозилира и инактивира ERM семейството протеини, участващи в подвижността, фагоцитозата, адхезията и поддържането на клетъчната форма (Hauser 2009). Накрая ExoS активира TLR2 и TLR4 пътищата (Epelman et al. 2004).

2.3.1.5. Други извънклетъчни фактори на вирулентност

Екзотоксин А

ETA е най-токсичният фактор на вирулентност на *P. aeruginosa*. Представлява ADP-рибозил трансфераза, секретирана чрез T2SS от повечето клинични изолати (Javanmardi et al. 2019). Поради своята ADP-рибозилираща активност той инхибира синтеза на протеин на гостоприемника чрез инактивиране на еукариотния фактор на елонгация 2 (eEF-2), член

на GTP-аза суперсемейството, което извършва транслокация на иРНК в рибозомните места (Michalska and Wolf 2015). ETA също провокира активирането на две каспази, участващи в процеса на апоптоза (Du et al. 2010), инхибира секрецията на IL-18 и намалява производството на TNF-α, IL-6, IL-8 и IL-10 (Schultz et al. 2000).

Протеолитични ензими

P. aeruginosa секретира широк спектър от извънклетъчни протеази, които са критични за инвазия при остри инфекции: LasA и LasB еластази, алкална протеаза (AprA), протеаза тип IV (PIV), *P. aeruginosa* малка протеаза (PASP), голяма екзопротеаза A (LepA), *P. aeruginosa* аминопептидаза (PAAP) и MucD (Galdino et al. 2017).

LasA и **LasB еластазите** се секретират от T2SS под QS регулаторен контрол (Li and Lee 2019) и разграждат еластина на гостоприемника (Jurado-Martín et al. 2021). LasB еластазата (Zn-зависима металопротеаза) е най-разпространената протеаза и се счита за основния извънклетъчен фактор на вирулентност на *P. aeruginosa* (Galdino et al. 2017). Освен еластинолитична активност, тя притежава способност за разцепване и на други протеини в гостоприемника, напр. протеини на сърфактанта (SP-A и SP-D), цитокини (TNF-αр IFN-γ, IL-6, IL-2), имуноглобулини и компоненти на инфламазомата, като по този начин възпрепятства бактериалния клирънс (Yang et al. 2017; Saint-Criq et al. 2018). LasB също влияе върху образуването на биофилм чрез регулиране на рамнолипида (Yu et al. 2014). LasA (наричана още стафилолизин) е серин протеаза, способна бързо да лизира *S. aureus* чрез разцепване на пентаглициновия мост в пептидогликана (Galdino et al. 2017). Въпреки че нейната еластинолитична активност е ограничена, тя може да засили това действие в други протеази, включително LasB, чрез разцепване на връзките глицин-глицин в еластина. Наскоро е установено, че експресията на LasA е свързана с антибиотичната резистентност на клинични изолати *P. aeruginosa* (Krishnan et al. 2019).

Алкалната протеаза (AprA) е Zn-зависима металоендопептидаза, секретирана през T1SS и кодирана от *aprA* ген. Тя засяга главно фибронектин и ламинин, два компонента на ендотела (Galdino et al. 2017), и разгражда някои протеини на комплемента (C1q, C2 и C3) и цитокини (IFN-c, TNF-a и IL-6), което позволява фагоцитно избягване (Laarman et al. 2012). Също така разцепва свободните флагелинови мономери (Bardoel et al. 2011) и може да намали мукоцилиарния клирънс на бактериите чрез активиране на епителния натриев канал (Butterworth et al. 2012). AprA също допринася за производството на други фактори на вирулентност, като PCN (Iiyama et al. 2017).

Друг протеолитичен ензим, секретиран чрез T2SS, е **протеаза IV (PIV)**. Тя представлява серин ендопротеаза, кодирана от *piv* гена, чиято експресия подлежи на контрол от Las QS системата (Conibear et al. 2012; Galdino et al. 2017). Въпреки че има основна роля като фактор на вирулентност при инфекции на роговицата, PIV може да бъде важен фактор и в патогенезата на бронхопулмоналните *P. aeruginosa* инфекции при МВ чрез разграждане на фибриногена и протеините на белодробния сърфактант (SP-A, SP-D и SP-B), като по този начин допринася за тъканна инвазия и увреда (Smith et al. 2006). Освен това PIV спомага за избягване на имунната защита на гостоприемника посредством разграждане на плазминоген, имуноглобулин G, C1q, C3 и IL-22 (Guillon et al. 2017).

Липолитични ензими

Липазите се секретират чрез T2SS и разцепват липидите, при което се получават свободни мастни киселини и глицерол като крайни продукти. **LipA** е главната липаза, продуцирана от *P. aeruginosa*, която се нуждае от шаперон *lif* (lipase-specific foldase) за активиране (Verma et al. 2020). Липолитичните ензими се експресират в отговор на променливи условия на околната среда и могат да повлияят върху други значими фактори на вирулентност на *P. aeruginosa*. **LipA** и **LipC** влияят върху подвижността, биофилм образуването и производството на RL (Rosenau et al. 2010; Tielen et al. 2010, 2013). Наскоро е идентифицирана нова липаза (A12) (Berdiev et al. 2019).

EstA естераза хидролизира глицероловите естери с късоверижни или дълговерижни мастни киселини и се автотранспортира чрез T5SS, локализирайки се във ВМ (Qin et al. 2022). При респираторни инфекции демонстрира висок афинитет на свързване с ламинин и адхезионна функция (Paulsson et al. 2019). Подобно на LipA и LipC е от решаващо значение за функционирането на други фактори на вирулентност (RL, подвижност и биофилм формиране) (Wilhelm et al. 2007).

Хемолитичната фосфолипаза C (PLC-H) се секретира чрез T2SS. Разгражда фосфолипидите на еукариотната мембрана и сфингомиелина, и притежава хемолитична активност (Jurado-Martín et al. 2021). Нейната продукция компрометира белодробната функция на бозайници, като причинява дисфункция на белодробния сърфактант (Wargo et al. 2011), а при пациенти с МВ модулира производството на IL-8 в бронхиалните епителни клетки (Bezzerri et al. 2011).

Пиоцианин (PCN)

PCN е редокс-активен вторичен метаболит, отговорен за синьо-зеленикавия цвят на колониите на *P. aeruginosa*. Този феназин, секретиран от T2SS, се асоциира с тежестта на заболяването и влошаването на белодробната функция, дължащи се на свободните радикали и неговите провъзпалителни ефекти. PCN може да увеличи вътреклетъчните ROS и H_2O_2, провокира оксидативен стрес и уврежда компонентите на клетъчния цикъл, няколко ензима и ДНК, което води до клетъчен лизис (Abdelaziz et al. 2023). В резултат на това се освобождава извънклетъчна ДНК, което вероятно допринася за образуването на биофилм и помага за персистирането на инфекциите (Zeng et al. 2020). Митохондриалното освобождаване на ROS също се индуцира, което води до апоптоза на Neu (Managò et al. 2015). Освен това PCN забавя цилиарното трептене, причинява разрушаване на ресничестия епител и увеличава секрецията на лигавицата в дихателните пътища, допринасяйки за колонизацията на белите дробове. Също така увеличава производството на IL-8 от алвеоларните макрофаги и миграцията на Neu (Abdelaziz et al. 2023).

2.3.1.6. Рамнолипиди

Рамнолипидите (RLs) са амфипатични, извънклетъчни, вторични метаболити, образувани от моно- или ди-(L)-рамнозна част (хидрофилна група), която се свързва чрез О-гликозидна връзка към димер на опашката на хидрокси мастна киселина (хидрофобна група). Те имат значителна роля в патогенезата на белодробните инфекции, причинени от *P. aeruginosa*, тъй като разграждат белодробния сърфактант, намаляват трансепителното електрическо съпротивление и нарушават плътните връзки в респираторния епител (Halldorsson et al. 2010; Alfiniyah et al. 2019). Продукцията на RLs от колонизиращи респираторния тракт щамове има връзка с развитието на пневмония при пациенти, подложени на апаратна вентилация (Köhler et al. 2010). Докато свръхпроизводството на RLs възпрепятства развитието на биофилм, ниските концентрации повишават освобождаването на ЛПЗ към клетъчната повърхност, увеличавайки хидрофобността и афинитета за първоначално прилепване на бактериите към повърхността (Nickzad and Déziel 2014). Продукцията на подходящо количество RLs допринася за архитектурата на биофилма, като поддържа отворени неколонизираните канали (Davey et al. 2003). RLs също улесняват плъзгащата се подвижност в отсъствието на T4P и ресни (Murray and Kazmierczak 2008) и позволяват придвижване чрез „роене“ чрез понижаване на повърхностното напрежение поради свойствата им на повърхностно активни вещества (Wang et al. 2014b). Освен това те участват в избягването на имунитета и установяване на хронични инфекции чрез некротично убиване на полиморфонуклеарните левкоцити (PMN) (Jensen et al. 2007; Alhede et al. 2009). RLs потискат вродения имунитет на гостоприемника, предотвратявайки

флагелин-индуцирания дефензин 2 отговор чрез насочване на протеин киназа C (Dössel et al. 2012).

2.3.1.7. Системи за придобиване на желязо

Желязото (Fe^{3+}) е съществен нутриент за бактериалния растеж и вирулентност. В стресовата среда на гостоприемника Fe^{3+} не е лесно достъпно поради ниската му разтворимост и активността на Fe-свързващите протеини на макроорганизма (трансферин и лактоферин) (Dauner and Skerra 2020). За да осигури нуждите си от желязо, *P. aeruginosa* използва различни стратегии: (i) производство на нискомолекулни органични съединения, наречени сидерофори (пиовердин и пиохелин); (ii) поемане на ксеносидерофори; (iii) поемане на хем молекула от хемопротеините на гостоприемника чрез две системи (Has и Phu); и (iv) редукция на желязото от феназини чрез системата Feo (Cornelis and Dingemans 2013).

Сидерофори: Пиохелин и пиовердин

Докато **пиохелинът** е базиран на салицилат сидерофор с по-нисък афинитет към желязото, **пиовердинът (PVD)** има пептидна природа и се счита за основния сидерофор (Dauner and Skerra 2020). Тъй като производството на PVD изисква енергия, *P. aeruginosa* произвежда предимно пиохелин и само когато концентрацията на желязо стане твърде ниска, той превключва към продукция на PVD (Cornelis and Dingemans 2013).

PVD едновременно хелатира свободното Fe^{3+} и го извлича от протеините на гостоприемника. Това се постига чрез сложна мрежа от мембранни и периплазмени ефлуксни помпи и транспортери (**Фигура 2d**) (Bonneau et al. 2020). Fe^{3+} катализира реакциите на Fenton, свързани с производство на ROS във високи концентрации, което води до цитотоксичност (Kang and Kirienko 2018). PVD действа също като сигнална молекула за производството на ETA, ендопротеиназа PrpL и самия себе си. От своя страна пиохелинът може да причини оксидативно увреждане и възпаление, особено в присъствието на PCN (Cornelis and Dingemans 2013).

2.3.1.8. Quorum sensing

Единната QS система има критична роля в регулирането на множество гени, което позволява междуклетъчна комуникация и адаптиране към промените в околната среда (Lee and Zhang 2015). *P. aeruginosa* притежава четири QS системи (Las, Rhl, Pqs и Iqs), които са йерархично свързани помежду си: системата Las е на върха на сигналната йерархия, положително контролирайки експресията на другите три системи. По подобен начин

системата Iqs има стимулиращ ефект върху Pqs и върху системата Rhl, докато Rhl регулира отрицателно Pqs (Lee et al. 2013; Lee and Zhang 2015; Alfiniyah et al. 2019). Тази сложна QS мрежа е много адаптивна и способна да реагира на външни стресови фактори, осигурявайки на *P. aeruginosa* изключителна гъвкавост (Lee and Zhang 2015).

Ацил-хомосерин лактон QS системи: Las и Rhl

LasR и Rhl са двете най-доминиращи регулаторни вериги. В **системата Las**, LasI е автоиндукторната (AI) синтаза, която медиира синтеза на N-3-оксододеканоил-L-хомосерин лактон (C12HSL). LasI се свързва с транскрипционния активатор (LasR), създавайки комплекс с мултимерни форми, който специфично регулира транскрипцията на гени за фактори на вирулентност, участващи в остри инфекции и увреждане на клетките на гостоприемника (LasA, LasB, AprA, PVD и ETA) (**Фигура 2b**). Освен това той индуцира производството на AI, създавайки положителна авторегулаторна верига (Kariminik et al. 2017). RsaL инхибиторът е отговорен за репресията на синтеза на LasI и C12HSL (Lee and Zhang 2015). Системата Las също така потиска продукцията на Pel екзополизахарид (Ueda and Wood 2009), засяга образуването на T6SS заедно със системите Rhl и Pqs (Sana et al. 2012; Maura et al. 2016) и индуцира апоптоза в епителните клетки на дихателните пътища и разгражне на техните плътни връзки (Schwarzer et al. 2012, 2014). C12HSL спомага за оцеляването на бактериите, като предизвиква смърт на клетките на имунната система на макроорганизма (Song et al. 2019). Важно е да се отбележи, че C12HSL и PCN увеличават броя на т. нар. „персистерни клетки“ в популацията на *P. aeruginosa*, което има значение за трудната ерадикация на хроничните инфекции (Möker et al. 2010).

В **системата Rhl**, RhlI е AI синтазата, с чието участие се синтезира N-бутирил-L-хомосерин лактон (C4HSL), който образува комплекс с активиращия протеин RhlR (Kariminik et al. 2017). Тази верига основно увеличава продукцията на RLs, но също и на AprA, LasB, цианид, PVD и PCN (Kariminik et al. 2017). Също така регулира производството на LecA лектин, влияейки върху образуването на биофилм (Lin and Cheng 2019), и потиска гените, включени в сглобяването и функционирането на T3SS (Pena et al. 2019).

Хинолонова QS система: Pqs

P. aeruginosa произвежда множество алкил-4(1H)-хинолони (AQ). Те се синтезират от ензими, кодирани в *pqsABCDE*, *phnAB* и *pqsH* генни клъстери, и се разпознават от родствен регулаторен протеин (**Фигура 2b.**) (Lin et al. 2018). Подобно на системата Las, **системата Pqs** създава верига за положителна обратна връзка, свързваща се с промотора

на *pqsABCDE*, което води до производството на PqsE, основният ефектор на вирулентност на тази система (Lin et al. 2018). Този протеин, заедно със системата Rhl, участва в регулирането на синтеза на PCN. Освен това PqsE регулира положително експресията на множество гени, сред които кодиращи ефлукс помпи с участие в антибиотичната резистентност и участващи в биосинтеза на циановодород, RLs, еластаза и извънклетъчна хитиназа (García-Reyes et al. 2020). Освен това системата Pqs медиира освобождаването на екстрацелуларна ДНК, което е от съществено значение за създаването на стабилни и зрели биофилми (Lin and Cheng 2019). Освен като QS сигнализираща молекула, PQS също действа като медиатор в придобиването на желязо, цитотоксичността и биогенезата на OMVs; потиска секрецията на IL-2 и IL-12; и стимулира хемотаксиса на Neu, получаването на ROS и синтеза на TNF-α (Lin et al. 2018).

Нова QS система: Iqs

Тази интегрирана QS система е открита наскоро и използва нов тип сигнална молекула: 2-(2-хидроксифенил)-тиазол-4-карбалдехид (IQS) (Cornelis 2020). В допълнение към мониторирането на бактериалната плътност **системата Iqs** също открива често срещаното по време на инфекция ограничаване на фосфати, за да регулира производството на фактори на вирулентността. Освен това тя може частично да контролира функциите на системата Las и когато е нарушен, производството на PCN, RLs и еластази намалява (Lee et al. 2013). В допълнение IQS инхибира растежа на клетките на гостоприемника и стимулира апоптозата по доза-зависим механизъм, компроментирайки възстановяването на неговата увредена ДНК (Wang et al. 2019).

2.3.2. Фактори на вирулентност на *A. baumannii*

Чрез геномни и фенотипни анализи в *A. baumannii* са идентифицирани сравнително по-малък брой фактори на вирулентност с участие в патогенезата на инфекциите, в сравнение с други Грам-отрицателни микроорганизми: външномембранни порини, ЛПЗ, фосфолипази, протеази, капсулни полизахариди, системи за секреция на протеини, системи за усвояване на желязо и др. (Lee et al. 2017). Известните до момента фактори на вирулентност са представени в **Таблица 2.**

Таблица 2. Фактори на вирулентност, идентифицирани в *A. baumannii*.

Фактор на вирулентност	**Роля в патогенезата**	**Литературен източник**
Порини (OmpA, Omp33-36, Omp22, CarO, OprD-like)	Адхезия и инвазия, индукция на апоптозата, серумна резистентност, образуване на биофилм, микробна устойчивост и издръжливост	(Choi et al. 2008b; Fernández-Cuenca et al. 2011; Smani et al. 2012, 2013; Rumbo et al. 2014; Huang et al. 2016; Nie et al. 2020)
Капсулен полизахарид	Растеж в серума, оцеляване при тъканна инфекция, образуване на биофилм	(Iwashkiw et al. 2012; Lees-Miller et al. 2013)
Липополизахарид (ЛПЗ)	Серумна резистентност, оцеляване при тъканна инфекция, избягване на имунния отговор на гостоприемника	(Luke et al. 2010; Lin et al. 2012; McQueary et al. 2012; McConnell et al. 2013)
Фосфолипази (PLC и PLD)	Серумна резистентност, инвазия, *in vivo* оцеляване	(Stahl et al. 2015; Fiester et al. 2016)
Външномембранни везикули (OMVs)	Пренасяне на фактори на вирулентност, хоризонтален трансфер на гени за антибиотична резистентност	(Jin et al. 2011; Rumbo et al. 2011; Jun et al. 2013; Li et al. 2015b)
Системи за придобиване на желязо (ацинетобактин и NfuA)	*In vivo* оцеляване, микробна устойчивост и издръжливост, убиване на клетки на гостоприемника	(Zimbler et al. 2012; Sheldon and Skaar 2020)
Системи за придобиване на цинк (ZnuABC и ZigA)	*In vivo* оцеляване	(Nairn et al. 2016)
Системи за придобиване на манган (MumC и MumT)	*In vivo* оцеляване	(Juttukonda et al. 2016)
Система за секреция на протеини тип II	*In vivo* оцеляване	(Harding et al. 2016; Elhosseiny et al. 2016)
Система за секреция на протеини тип VI	Убиване на конкурентни бактерии, колонизация на гостоприемника	(Carruthers et al. 2013; Repizo et al. 2015)
Система за секреция на протеини тип V	Образуване на биофилм, адхезия	(Bentancor et al. 2012b)
Пеницилин-свързващ протеин 7/8 и β-лактамаза PER-1	Серумна резистентност, *in vivo* оцеляване, адхезия	(Sechi et al. 2004; Russo et al. 2009)
CipA протеин	Серумна резистентност, инвазия	(Koenigs et al. 2016)
Tuf протеин	Серумна резистентност, инвазия	(Koenigs et al. 2015)
RecA протеин	*In vivo* оцеляване	(Aranda et al. 2011)
SurA1 протеин	Серумна резистентност, *in vivo* оцеляване	(Liu et al. 2016a)
Gig (growth in *Galleria*) ABCD транскрипционен регулатор	*In vivo* оцеляване, убиване на клетки на гостоприемника	(Gebhardt et al. 2015)
Универсален стрес протеин (UspA)	*In vivo* оцеляване, убиване на клетки на гостоприемника	(Elhosseiny et al. 2015; Gebhardt et al. 2015)
GacS и PaaE	Привличане на неутрофилни левкоцити	(Gebhardt et al. 2015; Bhuiyan et al. 2016)
Тип 1 (Csu) и тип 4 пили	Адхезия, образуване на биофилм	(Tomaras et al. 2008; Harding et al. 2013; Ahmad et al. 2023)
OmpR/EnvZ двукомпонентна система	Убиване на клетки на гостоприемника	(Tipton and Rather 2017)
FhaBC секреторна система	Адхезия, убиване на клетки на гостоприемника	(Pérez et al. 2017)
AbeD мембранен транспортер	Убиване на клетки на гостоприемника	(Srinivasan et al. 2015b)

2.3.2.1. Външна мембрана: ЛПЗ и външномембранни протеини

Липополизахарид

ЛПЗ е имунореактивна молекула, която индуцира освобождаването на TNF-α и IL-8 от макрофагите посредством TLR4-зависим начин (Erridge et al. 2007). Има обичайната структура от три домена: липид А (ендотоксин), сърцевинен олигозахарид и О-специфичен полизахарид (О-антиген). ЛПЗ има важна роля във вирулентността и оцеляването на *A. baumannii* (Luke et al. 2010; Lin et al. 2012; McQueary et al. 2012). Установено е, че мутантни щамове без LpsB гликозил-трансфераза имат силно скъсен ЛПЗ, съдържащ само два карбохидратни остатъка, свързани с липид А, което води до намалена резистентност към човешки серум и по-ниска преживяемост при модел на мекотъканна инфекция на плъх (Luke et al. 2010; McConnell et al. 2013). Инхибиране на LpxC (ензим, участващ в биосинтеза на липид А) не потиска растежа на *A. baumannii*, но потиска ЛПЗ-медиираната активация на TLR4. В миши модел инхибирането на LpxC повишава клирънса (очистването) на *A. baumannii* чрез усилване на опсонизиращото фагоцитно убиване, намаляване на серумната концентрация на ЛПЗ и възпалението, което напълно предпазва мишката от летална инфекция (Luke et al. 2010). Тези резултати показват, че блокирането на синтеза на ЛПЗ е перспективна стратегия в разработването на нови антибиотици. Модификацията на ЛПЗ допринася за развитие на резистентност към АМЛС. Много проучвания доказват, че подобни изменения в ЛПЗ намаляват чувствителността на *A. baumannii* към клинично важни антибиотици, като напр. colistin (Pelletier et al. 2013; Chin et al. 2015). О-антигенът на ЛПЗ, заедно с пилите, може да медиира адхезията към клетките на гостоприемника като първа стъпка на колонизация (Moubareck and Halat 2020).

Външномембранни протеини – порини

Порините са OMPs, свързани с модулиране на клетъчния пермеабилитет. **OmpA** е 38-kDa β-барел протеин, който е един от най-разпространените порини във ВМ. В *A. baumannii* OmpA е много добре охарактеризиран фактор на вирулентност с разнообразни биологични свойства, идентифицирани в *in vitro* моделни системи (Smith et al. 2007b; McConnell et al. 2013). В проучвания е доказано, че пречистеният OmpA се свързва с човешки епителни клетки, насочва се към митохондриите и индуцира апоптоза чрез освобождаване на проапоптозни молекули, като цитохром С и апоптоза-индуциращ фактор (Choi et al. 2005; Lee et al. 2010). Според резултати от друго изследване, OmpA се насочва към ядрото след получаване на специфичен сигнал за ядрена локализация, което води до клетъчна смърт (Choi et al. 2008a). OmpA също така играе важна роля в адхезията и

инвазията на епителни клетки чрез взаимодействие с фибронектина (Choi et al. 2008b; Smani et al. 2012) и се свързва с фактор H в човешкия серум (Kim et al. 2009), което позволява на *A. baumannii* да избегне убиването, медиирано от системата на комплемента. Установено е, че *ompA* генът е необходим за продължителното запазване на *A. baumannii* в бял дроб на мишка (Wang et al. 2014a).

OmpA допринася и за развитие на антимикробна резистентност на *A. baumannii* (Smani et al. 2014). Установено е, че разрушаване на *ompA* гена води до намаляване на минималните потискащи концентрации (МПК) на някои антибиотици, което предполага участие на порина в изнасяне на антибиотиците от периплазменото пространство през ВМ и съвместното му действие с вътрешномембранни ефлукс системи (Smani et al. 2014). OmpA повишава оцеляването и устойчивостта на *A. baumannii* чрез улеснена подвижност и образуване на биофилм (Gaddy et al. 2009; Clemmer et al. 2011; McConnell et al. 2013). Освен това регулира биогенезата на OMVs, които също имат участие в патогенезата и антимикробната резистентност (Moon et al. 2012). Всички тези резултати превръщат OmpA протеина в привлекателна мишена за действие на антибиотици, продукт на бъдещ химичен синтез, както и в развитието на нови стратегии за контрол и профилактика на инфекциите, причинени от *A. baumannii* (Lee et al. 2017). Има публикувани доклади по имунопротеомика, представящи OmpA като потенциален кандидат за ваксина срещу *A. baumannii* (Fajardo Bonin et al. 2014; Chen 2015; Hassan et al. 2016; Nie et al. 2020). В миши модел на инфекция с MDR-AB мишките, имунизирани с OmpA, са показали значително по-висока преживяемост от контролната група (Zhang et al. 2016b).

Външномембранен протеин с молекулна маса от 33- до 36-kDa (**Omp33-36**), който функционира като канал за преминаване на вода, е друг тип порин, свързан с цитотоксичността на *A. baumannii* (Smani et al. 2013; Rumbo et al. 2014). В мутантен щам с делеция в *omp33-36* гена е доказана значително по-слаба адхезия и инвазия в човешки белодробни епителни клетки, както и по-ниска цитотоксичност спрямо тях. В миши модел на сепсис е установено, че делецията се асоциира с понижаване на леталитета и намаляване на микробната концентрация в слезката и белите дробове (Smani et al. 2013). Проучване на Rumbo et al. демонстрира, че пречистеният Omp33-36 индуцира апоптоза на няколко различни типа клетки, включващи клетки на имунната система и съединителната тъкан, чрез активиране на ензими каспази и модулиране на автофагия (Rumbo et al. 2014). Omp33-36 също е въвлечен в антибиотичната резистентност. Щамът *A. baumannii* JC10/01, резистентен към карбапенемите imipenem и meropenem, се характеризира със загуба на

Omp33-36, а епизомната експресия на протеина в този щам води до намаляване на МПК на двата карбапенемни антибиотика (Tomás et al. 2005).

Omp22 е идентифициран като безопасен антиген за разработване на ефективни ваксини за контрол на инфекциите (Huang et al. 2016), въпреки че приносът на този протеин към патогенността на *A. baumannii* не е определен. Активни и пасивни имунизации на мишки с Omp22 увеличават тяхната преживяемост, потискат бактериалната популация в органите и периферната кръв и намаляват серумните нива на инфламаторни цитокини и хемокини (Huang et al. 2016).

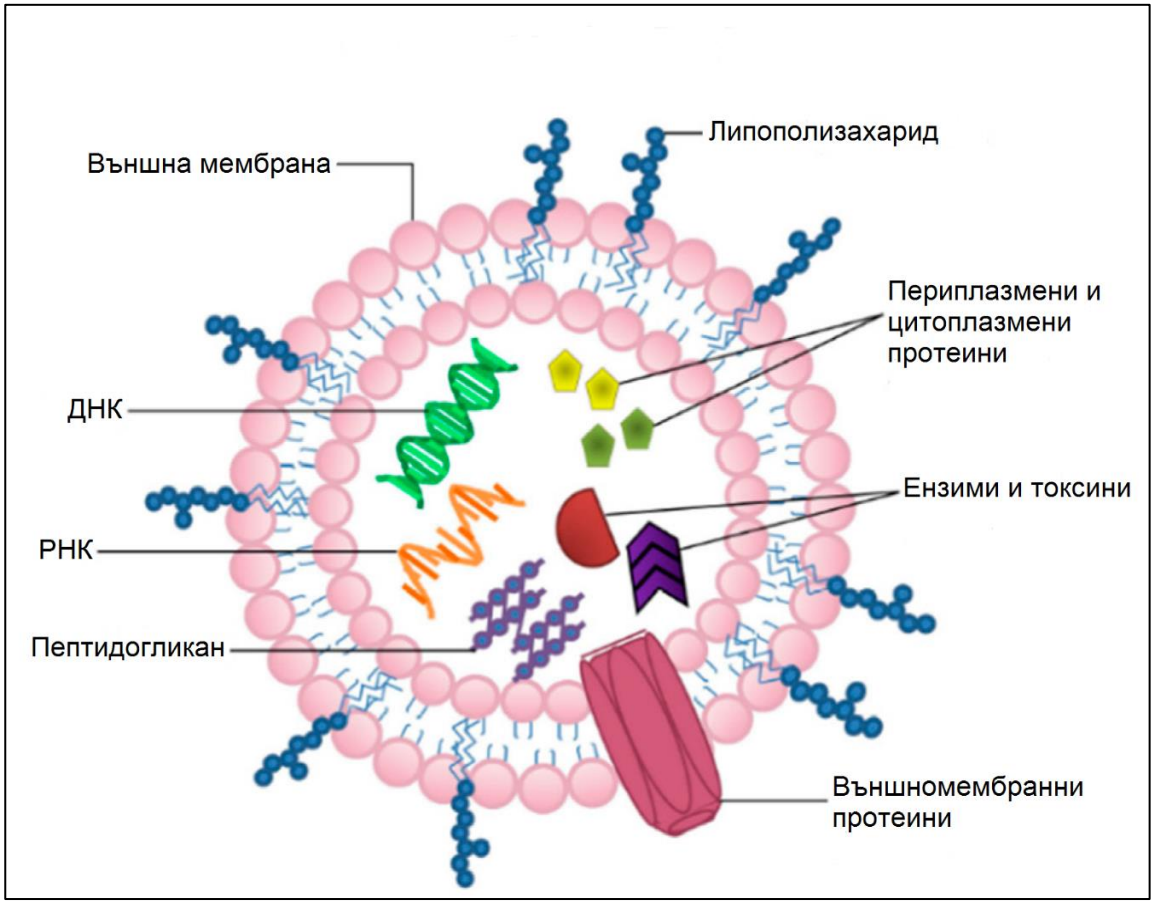
Други порини, карбапенем-асоциираният външномембранен протеин **CarO** и **OprD-like**, се разглеждат като фактори, водещи до отслабена вирулентност в миши модел на инфекция с *A. baumannii*, в случай на понижена експресия на кодиращите гени (Fernández-Cuenca et al. 2011). От друга страна повишената експресия на CarO забавя инфилтрацията на белодробни Neu чрез отслабване на провъзпалителните реакции в трахеята и белите дробове, което позволява бактериална пролиферация и води до тежка пневмония (Sato et al. 2017).

2.3.2.2. Външномембранни везикули

OMVs са сферични везикули с диаметър 20–200 nm, секретирани от ВМ на различни Грам-отрицателни патогенни бактерии – *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Helicobacter pylori*, *Vibrio* spp., *A. baumannii* и др. (Avila-Calderón et al. 2021). Те съдържат ЛПЗ, фосфолипиди, пептидогликан, протеини (външномембранни, периплазмени, цитоплазмени), нуклеинови киселини (ДНК и РНК), йонни метаболити и ефекторни сигнални молекули, насочени към клетки на гостоприемника (**Фигура 4**). OMVs доставят различни фактори на вирулентност във вътрешността на еукариотните клетки и позволяват на бактериите да взаимодействат с клетките на макроорганизма без близък контакт (Jan 2017).

Много щамове *A. baumannii* секретират OMVs, съдържащи различни фактори на вирулентност, като OmpA, протеази и фосфолипази (Jin et al. 2011; Moon et al. 2012; Lee et al. 2017). Установено е, че пречистени OMVs на *A. baumannii* ATCC 19606 индуцират експресия на гени за проинфламаторни цитокини в епителни клетки по доза-зависим механизъм (Jun et al. 2013). От друга страна OMVs, третирани с протеиназа, не водят до значително нарастване на експресията на гени за проинфламаторни цитокини, което предполага, че техни мембранни протеини са отговорни за предизвикване на мощен вроден имунен отговор (Jun et al. 2013). Li et al. доказват, че щам *A. baumannii* с изобилие от OMVs,

съдържащи повече фактори на вирулентност, предизвиква по-силен вроден имунен отговор и е с по-висока цитотоксичност, в сравнение с друг щам, продуциращ по-малко OMVs (Li et al. 2015b).



Фигура 4. Структура на външномембранни везикули при Грам-отрицателните бактерии.

Според съвременни проучвания OMVs могат да се използват за разработване на безклетъчна ваксина за повишаване на защитния имунитет на организма срещу инфекции, причинени от *A. baumannii* (McConnell et al. 2011; Huang et al. 2014a). В експериментален модел на сепсис в мишка ваксинацията с OMVs от щам *A. baumannii* ATCC 19606 защитава мишката от хомоложни бактериални щамове и осигурява защита и спрямо други клинични изолати (McConnell et al. 2011). Подобни резултати са получени и в модел на пневмония при мишка. Бактериалната тежест, възпалителната клетъчна инфилтрация и натрупването на инфламаторни цитокини значително се потискат, както при провеждане на активна, така и при пасивна имунизация (Huang et al. 2014a). Интересно е, че OMVs на *A. baumannii* са свързани също и с разпространението на антибиотична резистентност, напр. индуцират

хоризонталния трансфер на плазмиден ген, кодиращ OXA-24 карбапенемаза, към карбапенем-чувствителни изолати (Rumbo et al. 2011).

2.3.2.3. Капсулни полизахариди

Капсулните полизахариди са сред най-важните фактори на вирулентност на *A. baumannii*, локализирани в клетъчната обвивка (Lee et al. 2017). По-специално, много клинични изолати *A. baumannii* експресират повърхностни капсулни полизахариди и съдържат консервативен генен клъстер, наречен K локус, който определя тяхната продукция (Kenyon and Hall 2013; Hu et al. 2013; Geisinger and Isberg 2015). Случайно при проучване на транспозони, носещи гени, необходими за растежа на *A. baumannii* във възпалителен ексудат, са идентифицирани два гена – *ptk* и *epsA*, за които се предполага, че участват в полимеризацията и сглобяването на капсулите (Russo et al. 2010). Мутантните *ptk* и *epsA* щамове *A. baumannii* се характеризират с намалена продукция на капсула и растежен дефект в човешкия серум, което води до значително понижено оцеляване на бактерия в места с инфекции на меките тъкани (Russo et al. 2010). Мутации в *pglC* и *pglL* гените, отговорни за синтеза на O-пентазахарида на гликопротеините и капсулните полизахариди, водят до понижаване на леталитета при миши модел на септикемия, а също и до образуване на биофилм с анормална структура (Iwashkiw et al. 2012; Lees-Miller et al. 2013). По тази причина капсулните полизахариди се разглеждат като мишена за защитни антитяло-базирани интервенции (провеждане на пасивна имунизация) (Russo et al. 2013).

Установено е, че капсулните полизахариди участват и в резистентността към АМЛС на *A. baumannii* (Geisinger and Isberg 2015). Geisinger и Isberg установяват, че мутантни щамове с дефицит на капсулни полизахариди имат по-ниска вродена резистентност към пептидни антибиотици. В допълнение присъствието на тези антибиотици индуцира хиперпродукция на капсулни полизахариди. Антибиотично-индуцираната продукция на капсулни полизахариди увеличава устойчивостта на *A. baumannii* към убиването от системата на комплемента на гостоприемника, а също така повишава вирулентността в миши модел на системна инфекция. Освен това авторите отчитат, че увеличената капсулна продукция при антибиотична експозиция е зависима от транскрипционно увеличаване на експресията на гените в K локуса, а самата експресия се регулира от двукомпонентната *bfmRS* регулаторна система (Geisinger and Isberg 2015). Наскоро Russo et al. докладват BfmR-медиирана резистентност към бактерицидната активност на комплемента и към антибиотиците meropenem и colistin, но също така, че ефектите на BfmR не зависят от продукцията на капсула (Russo et al. 2016). Ето защо връзката между BfmRS регулаторната система и капсулните полизахариди трябва да бъде детайлно изследвана в бъдеще.

2.3.2.4. Нефлагеларна подвижност

Бактериалната подвижност допринася за инфекциозната способност и повишената вирулентност на някои бактерии. *A. baumannii* няма флагели и отдавна е етикетиран като неподвижен (Skiebe et al. 2012; Vijayakumar et al. 2016). Проучванията обаче показват, че този организъм може да оцелее по време на инфекция и може да се разпространи по повърхности по време на болничното оцеляване посредством **подвижност чрез „трептене“** (Harding et al. 2013). Тази подвижност се състои от движения на удължаване и прибиране с цел изтласкване на клетките във влажна среда посредством T4P (Wilharm et al. 2013). В допълнение към подвижността T4P са отговорни и за образуването на биофилм и генния трансфер (Burrows 2012). Изследвания, сравняващи изолати *A. baumannii* от кръв с изолати от храчки, са установили, че първите са по-подвижни, което вероятно е индикация за по-високо предимство за оцеляване в кръвта (Pérez-Varela et al. 2017).

Освен посредством подвижност чрез „трептене“ някои изолати *A. baumannii* се движат по живи и неживи повърхности без да разчитат на флагели, а по друг начин, наречен **повърхностно-свързана подвижност** (Ahmad et al. 2020). Този тип подвижност също изисква T4P, QS, производство на липо-олигозахарид и 1,3-диаминопропан, който медиира сигнализирането, необходимо за повлияване на повърхностно-свързаната подвижност чрез QS (Skiebe et al. 2012).

2.3.2.5. Системи за секреция на протеини

Биологичните процеси, използвани от *A. baumannii* за причиняване на заболяване, не са добре дефинирани, но най-новите изследвания показват, че секретираните протеини могат да играят основна роля в патогенезата на инфекциите. Доказано е, че различни механизми допринасят за секрецията на протеини от *A. baumannii* и други патогенни видове *Acinetobacter*, в т.ч. секреторни системи от тип II (T2SS) и тип VI (T6SS), автотранспортер (Ata) и OMVs. Секрецията на протеини от клетъчните повърхностни структури позволява взаимодействието на патогена с околната среда и гостоприемника и следователно представлява привлекателни мишена за лечение (Weber et al. 2017).

Тип V секреторна система

Автотранспортерът Ata, представляващ секреторна система от тип Vc, е първата секреторна система, идентифицирана в *A. baumannii* (Bentancor et al. 2012a). Той е тримерен мембранен протеин, който медиира образуване и поддържане на биофилми, адхезия към компоненти на извънклетъчния матрикс, като колаген I, III и IV, и

вирулентност в миши модел на системна инфекция, причинена от *A. baumannii* (Bentancor et al. 2012a). В експериментални модели на пневмония в имунокомпетентни и имуносупресирани мишки е доказано, че в сравнение с нормалните заешки серуми, антисерумите към Ata значително намаляват нивата на *A. baumannii* ATCC 17978 и изследваните MDR-AB щамове в белите дробове на заразените мишки (Bentancor et al. 2012b). Способността на Ata да индуцира синтез на анти-адхезивни, бактерицидни, опосонофагоцитни и защитни антитела го превръща в потенциален кандидат за създаване на ваксина, която може да се използва като имунотерапевтична алтернатива при инфекции, причинени от MDR-AB (Bentancor et al. 2012b).

Тип II секреторна система

T2SS е най-новата система за секреция на протеини, идентифицирана в *A. baumannii* (Johnson et al. 2015). T2SS е мултипротеинов комплекс, който структурно е много сходен със системата за T4P, често срещани в Грам-отрицателните бактерии (Korotkov et al. 2012). Тя пренася широк диапазон от ефекторни протеини от периплазмената зона към извънклетъчната среда отвън клетъчната повърхност, съответно ВМ. Изградена е от 12-15 протеина, състоящи се от четири части: псевдопилус, цитоплазмена секреторна АТР-аза, вътрешномембранна платформа за сглобяване и външномембранен додекамерен комплекс (Korotkov et al. 2012; Harding et al. 2016). Секрецията чрез T2SS е двустепенен процес. Таргетните протеини първоначално се пренасят до периплазмата чрез обща секреторна (Sec) система или чрез двойната транспортна система за аргинин (Tat), след което оттам те се секретират извън клетката посредством T2SS (Korotkov et al. 2012). Делеции в гените за някои от компонентите на T2SS, напр. *gspD* или *gspE*, водят до загуба на секреция на LipA, което показва, че LipA е субстрат на T2SS (Johnson et al. 2015). Тъй като LipA е липаза, която разгражда дълговерижни мастни киселини, *lipA*, *gspD* и *gspE* мутантните щамове са неспособни да растат при наличие на дълговерижни мастни киселини като единствен източник на въглерод и имат дефектен растеж *in vivo* в неутропеничен миши модел на бактериемия (Johnson et al. 2015). Ролята на функционалната T2SS за пълната вирулентност на *A. baumannii* е показана в *Galleria mellonella* и миши модели на белодробни инфекции (Harding et al. 2016). Липази (LipA, LipH и LipAN) и металопептидазата CpaA са идентифицирани като субстрати на T2SS (Harding et al. 2016; Elhosseiny et al. 2016). Секрецията на LipA и CpaA изисква специфични шаперони. Шапероните се кодират от гени, разположени по съседство с гена за съответната ефекторна молекула, и тяхното инактивиране премахва секрецията на LipA и CpaA (Harding et al. 2016). Секретираните липази са от съществено значение за използване на екзогенните

липиди, докато CpaA е метало-ендопептидаза, която разгражда фибриногена и фактор V по Zn-зависим механизъм, влияейки отрицателно върху пътищата на кръвосъсирване (Tilley et al. 2014).

Тип VI секреторна система

Подобно на много Грам-отрицателни бактерии *A. baumannii* кодира многокомпонентната **T6SS**, способна да „инжектира“ протеинови токсини в други бактерии по контактно-зависим начин, което я прави важна при полимикробни инфекции (Weber et al. 2017). T6SS е изградена от много консервативни структурни протеини и допълнителни фактори и носи контрактилен елемент, сходен с обвивката на бактериофагите, който образува структура като игла или острие за проникване в таргетната клетка (Shneider et al. 2013).

Вероятно T6SS играе роля във вирулентността на *A. baumannii* по щамово-специфичен начин. Repizo et al. проучват функционалността на T6SS при различни щамове *A. baumannii* – ATCC 17978, клинични MDR-AB изолати, свързани с вътреболнични взривове, и един неклиничен изолат, при което установяват, че въпреки присъствието на T6SS геномен локус при всички щамове, само неклиничният притежава напълно активна T6SS, която медиира убиване на *E. coli*. В допълнение е доказано, че при този щам е необходима T6SS в процеса на колонизация в модел на *G. mellonella* (Repizo et al. 2015). Резултати от сравнителни геномни анализи на клинични MDR-AB са показали липса на T6SS геномен локус при някои щамове (Wright et al. 2014; Jones et al. 2015), което подсказва необходимостта от разширени проучвания за изясняване ролята на тази секреторна система във вирулентността на *A. baumannii*. Също така са докладвани MDR-AB, притежаващи голям, самостоятелно преносим плазмид, който детерминира отрицателни регулатори на T6SS. Функцията на T6SS е потисната в плазмид-съдържащите, резистентни на антибиотици щамове, докато при загубилите плазмиди, T6SS е активна. Макар че загубилите плазмиди щамове са способни да извършват T6SS-медиирано убиване на конкурентни бактерии, те стават чувствителни на антибиотици (Weber et al. 2015). Тези резултати показват молекулярно превключване между T6SS и антибиотичната резистентност. Друго проучване установява, че клинични изолати *A. baumannii* с активна T6SS се изолират по-често от имунокомпрометирани пациенти, което предполага конкурентно предимство спрямо съпътстващи патогени (Repizo 2017).

2.3.2.6. Извънклетъчни ензими

Фосфолипазата е липолитичен ензим, необходим за фосфолипидния метаболизъм, който се явява фактор на вирулентност в много видове бактерии, като *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* и *Clostridium perfringens* (Flores-Díaz et al. 2016). Дефинирани са три класа **фосфолипази** въз основа на мястото на разцепване: фосфолипаза A (PLA), фосфолипаза C (PLC) и фосфолипаза D (PLD). PLA хидролизира мастните киселини в скелета на глицерола, докато PLC разцепва фосфорилираната главна група от фосфолипида. PLD е трансфосфатидилаза, която само отцепва главната група. Разграждането на фосфолипидите засяга стабилността на мембраните на гостоприемниковите клетки, а отцепената главна група може да пречи на клетъчното сигнализиране, което води до промени в имунния отговор (Flores-Díaz et al. 2016).

PLC и **PLD** са идентифицирани като фактори на вирулентност в *A. baumannii* (Jacobs et al. 2010; Stahl et al. 2015; Fiester et al. 2016). *A. baumannii* ATCC 17978 има две PLCs (A1S_0043 и A1S_2055) и инактивирането на гена за A1S_0043 води до умерено намаляване на цитотоксичния ефект на *A. baumannii* спрямо епителните клетки, в сравнение с родителския щам (Camarena et al. 2010; Fiester et al. 2016). При щам *A. baumannii* 98-37-09 е установено, че разрушаването на един от двата гена за PLD води до намалена резистентност към човешки серум, понижен капацитет за инвазия на епителни клетки и по-ниска вирулентност в експериментален модел на пневмония при мишка (Jacobs et al. 2010). В референтния щам *A. baumannii* ATCC 19606 са идентифицирани три гена за PLD и е установено, че всички фосфолипази играят важна роля във вирулентността и инвазията на клетки на гостоприемника по съгласуван начин (Stahl et al. 2015). Резултатите от направените проучвания показват, че тези фосфолипазни ензими са важни фактори на вирулентност в патогенезата на инфекциите, причинени от *A. baumannii*.

Наскоро е идентифициран нов ензим, продуциран от *A. baumannii*. **CpaA** е **гликан-специфична адамализин-подобна протеаза**, която е определена като фактор на вирулентност, инхибиращ коагулацията на кръвта чрез инактивиране на фактор XII. CpaA намалява образуването на тромби в интраваскуларните пространства, насърчавайки капацитета за дисеминация на *A. baumannii* (Waack et al. 2018).

2.3.2.7. Системи за свързване (хелатиране) на метали

Въпреки широкото си разпространение в околоната среда Fe^{3+} е сравнително труднодостъпно за бактериите поради неговата слаба разтворимост (10^{-17} M) при аеробни условия и неутрално pH, както и поради неговото хелатиране (свързване) в макроорганизма с нискомолекулни съединения (хемин) или високоафинитетни желязосвързващи

съединения, като лактоферин и трансферин. За преодоляване на това ограничение за желязо повечето аеробни бактерии, вкл. *A. baumannii*, продуцират високоафинитетни железни хелатори, известни като сидерофори. Сидерофорите са класифицирани в три групи – катехолати, хидроксимати и смесен тип, на базата на частта, която отдава кислородни лиганди за координиране на Fe^{3+} (Saha et al. 2013). В допълнение *A. baumannii* притежава транспортери и рецептори за директно усвояване на желязо като FecA и FecI, които позволяват използването на хема (Morris et al. 2019). Увреждане на транспортерите води до намаляване вирулентността чрез понижаване производството на биофилм и устойчивостта към оксидативен стрес (Ajiboye et al. 2018).

Ацинетобактинът е най-добре проученият сидерофор на *A. baumannii*. Той е от смесен тип и притежава оксазолинов пръстен, произхождащ от треонина (Lee et al. 2017). Счита се, че има характеристики на фактор на вирулентност (Gaddy et al. 2012; Penwell et al. 2012). Доказано е, че нарушения в неговите биосинтез и транспортни функции значително намаляват способността на *A. baumannii* ATCC 19606 да персистира в животински епителни клетки и да причинява клетъчно увреждане и смърт (Gaddy et al. 2012). Мутация в *entA* гена, който е необходим за биосинтеза на прекурсора на ацинетобактина (2,3-дихидроксибензоена киселина), също значително понижава капацитета на *A. baumannii* ATCC 19606 да съществува в човешки алвеоларни епителни клетки и намалява способността му да инфектира и убива ларвите на *G. mellonella* (Penwell et al. 2012). Според изследване на Ali et al. продукция на ацинетобактин се среща значително по-често при клинично значими MDR-AB в сравнение с авирулентни изолати (Ali et al. 2017).

NfuA Fe-S протеинът на *A. baumannii*, който участва в образуването на Fe-S клъстери и играе роля в клетъчните отговори към свързване на желязо и оксидативен стрес, също е идентифициран като фактор на вирулентност (Zimbler et al. 2012). Мутантен *nfuA* щам е определен като по-чувствителен към ROS и показва сигнификантно по-слаб растеж в човешки епителни клетки. В допълнение към това, инфекция на *G. mellonella* модел показва, че повече от 50% от инжектираните ларви загиват до шест дни след инфекция с родителския щам, докато по-малко от 30% от ларвите загиват, в случаите на инфектиране с мутантния *nfuA* щам (Zimbler et al. 2012). Други автори откриват, че железният „глад“ води до увеличена продукция на PLCs, които увеличават хемолитичната активност на *A. baumannii* (Fiester et al. 2016).

За да се справи с ограниченото количество цинк, *A. baumannii* използва **система за придобиване на цинк (ZnuABC)**, която е подложена на свръх-регулация в условия на

недоимък на метала (Nairn et al. 2016). ZnuB участва в патогенезата на белодробните инфекции, причинени от *A. baumannii*. Забележително е, че ограничаването на цинка води до намаляване на МПК на imipenem спрямо MDR-AB под клиничната граница за резистентност към този антибиотик, вероятно защото много карбапенемази са металоензими, които изискват Zn^{2+} за своята хидролизираща активност (Hood et al. 2012). В *A. baumannii* е идентифициран и **ZigA метало-шаперон**. Той силно взаимодейства с Zn, което е необходимо за бактериален растеж в условията на Zn „глад“ и при развитието на дисеминирана инфекция в мишки (Nairn et al. 2016).

Определен е и механизмът, използван от *A. baumannii*, за преодоляване на недостига на манган. Калпротектинът индуцира Mn „глад“ в *A. baumannii*, при което се увеличава транскрипцията на NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins) транспортер на Mn и карбоксилаза на уреята, за да може патогенът да устои на антимикробната активност на калпротектина (Juttukonda et al. 2016). Урея карбоксилиращ ензим (**MumC**) е необходим за растежа на *A. baumannii* в присъствието на калпротектин, а NRAMP транспортерът (**MumT**) допринася за приспособеността на микроорганизма в миши модел на пневмония, което показва, че двата протеина са фактори на вирулентност.

2.3.2.8. Пеницилин-свързващ протеин 7/8 и β-лактамаза PER-1

Въпреки че пеницилин-свързващите протеини (penicillin-binding proteins – PBPs) участват в резистентността към β-лактамни антибиотици, **PBP7/8**, кодиран от гена *pbpG*, е фактор на вирулентност в *A. baumannii*. Мутантен *pbpG* щам расте сходно с дивия тип *A. baumannii* в Luria-Bertrani среда, но показва по-слаб растеж в човешки серум и значително по-трудно оцелява в експериментални модели на инфекции на меки тъкани и пневмония при плъхове. При проучване на бактериалната морфология чрез електронна микроскопия е установено, че загубата на PBP7/8 може да повлияе върху структурата на пептидогликана, което от своя страна може да промени чувствителността на мутантния щам към защитните фактори на гостоприемника (Russo et al. 2009).

Интересно е, че **широкоспектърната β-лактамаза PER-1** също се счита за фактор на вирулентност в *A. baumannii*, свързан с адхезията. Докладвано е, че PER-1-продуциращи щамове *A. baumannii* се прикрепват към клетъчни линии Caco2, докато непродуциращите ензима щамове са негативни за клетъчна адхезия (Sechi et al. 2004). Доказано е, че много β-лактамази се свързват с вирулентността на различни патогенни бактерии, като *E. coli*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, но не са открити общи детерминиращи механизми (Beceiro et al. 2013; Lee et al. 2017).

2.3.2.9. Quorum sensing

QS е начин на комуникация между бактериите за поддържане на плътността на популацията чрез производство на сигнални молекули, известни като автоиндуктори (Whiteley et al. 2017). Те са подобни на хормони съединения, в т.ч. ацил-хомосерин лактони (AHLs), които са отговорни за регулиране на подвижността, образуването на биофилм и други характеристики на вирулентността. QS цикълът в *A. baumannii* включва AbaI индуктор, както и неговия родствен рецептор AbaR. AbaI, кодиран от гена *abaI*, е сензорен протеин, който функционира като автоиндукторна синтаза, произвеждаща сигнални AHL молекули, докато AbaR функционира като рецепторен протеин, който при свързване с AHL индуцира каскада от реакции. Това свързване задейства производството на повече AHLs по начин на положителна обратна връзка, което води до регулиране на образуването на биофилм (Saipriya et al. 2020).

2.3.3. Фактори на вирулентност на *S. maltophilia*

S. maltophilia е определян като микроорганизъм с ограничена патогенност, при който трудно се разграничат случаите на колонизация от случаите на инфекция. Факторите на вирулентност, както и други клетъчни и молекулярни механизми, за които е известно, че участват в инфекциозната патогенеза, все още не са напълно изяснени, въпреки че са обект на интензивни изследвания през последните години (Trifonova and Strateva 2019). **Извънклетъчни фактори на вирулентност**, срещащи се при *S. maltophilia*, са екстрацелуларните ензими (протеази, естерази, липази, фосфолипази, нуклеази, хиалуронидаза), хемолизините, цитотоксините и сидерофорите. Към **клетъчно-свързаните фактори на вирулентност** спадат: ЛПЗ, пили (фимбрии), непилусни адхезини и ресни (флагели) (Trifonova and Strateva 2019; Bhaumik et al. 2023).

2.3.3.1. Извънклетъчни ензими

Протеази

Способността на *S. maltophilia* да произвежда протеолитични ензими (протеази) му осигурява предимство за оцеляване, растеж и разпространение в неблагоприятни условия на околната среда. Проучване на Huang et al. е демонстрирало, че щамове *S. maltophilia*, изолирани от почва, притежават серин-протеазна активност срещу нематоди (Huang et al. 2009). В тази връзка може да се предположи, че нозокомиалните щамове са придобили гените за тези ензими от околна среда извън болничната. Екстрацелуларните серин

протеази са доказани при нозокомиални изолати *S. maltophilia* и се счита, че допринасят за способността на микроорганизма да разрушава съединителна тъкан (колаген и фибронектин) (Windhorst et al. 2002; Brooke 2012). При имунокомпрометирани пациенти протеолитичната активност на тези бактериални щамове може да причини фулминантна хеморагична пневмония, дори и с летален изход (Gutierrez et al. 2016). Също така се предполага, че освобождаването на протеолитични ензими допринася за увреждането на белодробния паренхим на болни от МВ, инфектирани със *S. maltophilia* (Nicoletti et al. 2011).

Голямата извънклетъчна протеаза StmPr1 (алкална серин протеаза), кодирана от гена *stmPr1*, функционира като фактор на вирулентност и освен съединителна тъкан може да разрушава *in vitro* и някои човешки серумни протеини, а също и да инактивира компоненти на имунната защита (Windhorst et al. 2002). В генома на *S. maltophilia* е установен и структурен ген, кодиращ **малка извънклетъчна протеаза** – *stmPr2*. Серин протеазите StmPr1 и StmPr2 са субстрати на Xps тип II секреторната система (T2SS). Двата ензима се свързват с Xps-медиираната серин-протеазна, желатиназна и казеинолитична активност на културелни супернатанти на *S. maltophilia* (DuMont et al. 2015). Двете серин протеази допринасят и за Xps-медиираната деградация на протеините на екстрацелуларния матрикс (колаген, фибриноген и фибронектин) и на цитокина IL-8, но също така е предположено, че в този процес участват и допълнителни протеази (DuMont et al. 2015). Така е открита третата серин протеаза – **StmPr3**. Тя също се секретира по Xps-зависим начин и допринася към гореописаните ефекти на другите две протеази (DuMont and Cianciotto 2017). Освен това е идентифицирана и четвърта серин протеаза (**StmPr4**), но при малък брой щамове (доказана чрез Basic Local Alignment Search Tool Program – BLASTP анализи). StmPr4 се проучва по отношение потенциалната употреба на ензима като детергент (Ribitsch et al. 2012; DuMont and Cianciotto 2017). Въпреки това StmPr1 има доминираща роля в Xps-медиираната протеолитична активност при *S. maltophilia* (вероятно поради голямото си количество), следвана от StmPr2 и StmPr3 в този ред (DuMont and Cianciotto 2017).

Производството на **желатиназа** от *S. maltophilia* е важна биохимична характеристика на вида – над 85% от щамовете са продуценти (Трифонова 2020). При други микроорганизми е известно участието на ензима във формиране на биофилм, разграждане на тъкани на макроорганизма и избягване на имунния отговор чрез инактивиране на системата на комплемента (Di Rosa et al. 2006), но данните за него като фактор на вирулентност при *S. maltophilia* са оскъдни (Denton and Kerr 1998; Brooke 2012).

В литературата е докладван случай на кожна EG вследствие на бактериемия, предизвикана от *S. maltophilia*, при пациент с левкемия. Изследването на екзоензимния профил на изолата е отчело желатиназна и еластазна активност. **Еластазата** води до разграждане на еластичната стена на кръвоносните съдове, което улеснява освобождаването на бактериалните клетки в подкожната тъкан (Bottone et al. 1986). В *in vitro* експерименти е доказана температурна зависимост на еластазната активност при *S. maltophilia* (хидролиза на еластин са демонстрирали всички клинични изолати след 72 h инкубиране при 30 ºC) (Garcia et al. 2002).

Друг протеолитичен ензим, продуциран от *S. maltophilia*, е **фибринолизин (наричан също стрептокиназа)** (Denton and Kerr 1998). Неговата роля като фактор на разпространението е изяснена при някои Грам-положителни бактерии, но данните за *S. maltophilia* са недостатъчни. Според малкото публикувани изследвания фибринолизинът разгражда фибриновите съсиреци около лезиите и по този начин улеснява разпространяването на бактериалните клетки (Uckan et al. 2007; Beri et al. 2017).

Естерази, липази и фосфолипази

Естеразите са група хидролитични емзими, които в някои случаи се асоциират с вирулентността. Тази хипотеза е подкрепена от проучването на Nicoletti et al., според което експресия на естеразната активност се доказва при повечето изолати *S. maltophilia* от пациенти с МВ. В генома на щам *S. maltophilia* K279a, предполагаемата външномембранна естераза е кодирана в т. нар. Smlt3773 локус (Nicoletti et al. 2011). По-късно Park et al. докладват нова EstPE естераза, показала 99% идентичност с външномембранната естераза на *S. maltophilia* K279a (Park et al. 2011b).

Извънклетъчните **липази** подпомагат преживяването на бактериите в бедна на въглехидрати среда, където липидите са единствен източник на въглерод, а също така участват в прикрепването към тъканите на гостоприемника (Thomas et al. 2014). Различни изследвания на клинични изолати *S. maltophilia* доказват, че всички те продуцират липаза във високи количества и това предполага важната роля на тези ензими в инфекциозната патогенеза (Travassos et al. 2004; Thomas et al. 2014). В допълнение може да се отбележи, че при пациенти, страдащи от МВ, са доказани IgG антитела срещу липаза и фосфолипаза C (Stehr et al. 2003).

В генома на *S. maltophilia* са открити гени, кодиращи **нехемолитична фосфолипаза C (PLC-N)** и **фосфолипази от клас D (PLD)** (Crossman et al. 2008). Фосфолипазите осигуряват възможност на микроорганизмите да навлязат в тъканите и клетките на

макроорганизма и да засегнат нормалното клетъчно функциониране. Като фактори на вирулентност те участват в разрушаването на защитни макромолекули на гостоприемника, като мукус, липопротеинови мембрани и имуноглобулини (Figueirêdo et al. 2006).

Нуклеази

Продукцията на извънклетъчни нуклеази (ДНК-аза и РНК-аза) е доказана при всички изследвани щамове *S. maltophilia* още в ранните проучвания върху ензимната активност на този микроорганизъм (O'Brien and Davis 1982). Подобни са и резултатите от проучвания върху извънклетъчната енизимна продукция на *S. maltophilia* от последното десетилетие (Thomas et al. 2014). За ДНК-азата понастоящем е известно, че допринася за избягване на вродения имунен отговор на гостоприемника чрез разрушаване на NETs. Освен че препятстват разпространението на микроорганизмите, NETs осигуряват високи локални концентрации на антимикробни молекули, противодействащи на бактериалните фактори на вирулентност (Thomas et al. 2014; Monteith et al. 2021).

Хиалуронидаза

За хиалуронидазата, като фактор на вирулентност при *S. maltophilia*, има малко данни, но е добре известно, че улеснява тъканната инвазия. В свое проучване Thomas et al. установяват липса на хиалуронидазна активност при изолатите от локални инфекции на уринарния тракт (Thomas R. et al., 2014). Ролята на хиалуронидазите да осигуряват нутриенти за бактериалните клетки се счита за тяхна главна функция при Грам-отрицателните микроорганизми (Trifonova and Strateva 2019).

2.3.3.2. Хемолизин и цитотоксини

Производството на **хемолизин** е от ключово значение за вирулентността на НФГБ (Travassos et al. 2004). При изследване на ензимния профил на клинични изолати *S. maltophilia* с различен произход е доказана продукцията на хемолизин от всички тях (Thomas et al. 2014). В друго проучване, хемолитична активност спрямо овнешки еритроцити е отчетена при половината от изследваните щамове, като те са демонстрирали и продукция на липазни, протеазни и лецитиназни ензими, разрушаващи клетъчните мембрани. В тази връзка авторите предполагат възможна корелация между ензимна и хемолитична активност (Figueirêdo et al. 2006). Освен това е отчетен температурно зависим ефект, изразяващ се в проява на хемолизата само след като културелни супернатанти и овнешки еритроцити са инкубирани за 1 час на 37 °C, последвано от поддържане на 4 °C

до следващия ден. Това води до заключението, че *S. maltophilia* произвежда хемолизин, сходен с по-рано описаните “hot-cold” хемолизини (Figueirêdo et al. 2006).

Гореспоменатото изследване на Figueirêdo et al. демонстрира, че **цитотоксичните ефекти**, предизвикани от клинични изолати *S. maltophilia*, се различават от действието на повечето описани до момента токсини. Филтрати от културелни супернатанти на щамове *S. maltophilia* предизвикват окръгляне, загуба на междуклетъчни връзки и мембранни изменения, като образуване на мехурчета, последвано от смърт на HEp-2 клетъчни линии след 24 часа. При Vero и HeLa клетки цитотоксичните ефекти се проявяват първоначално чрез окръгляне, засилена ендоцитоза и клетъчна агрегация в рамките на 30-минутна инкубация и напълно разрушаване и клетъчна смърт след 72 часа. Също така е установено, че при загряване на супернататнтите на 56 °C се загубва цитотоксичната им активност и не се наблюдават морфологични промени след 48 часа инкубация на животински клетки (Figueirêdo et al. 2006).

2.3.3.3. Системи за усвояване на желязо

Докладвано е, че *S. maltophilia* произвежда катехолатни сидерофори за извличане на желязо от външната среда (Garcia et al. 2012; Nas and Cianciotto 2017; Kalidasan et al. 2018a; Azman et al. 2019). Желязото е важно за образуването на биофилми, реакцията на оксидативен стрес и вирулентността (García et al. 2015). García et al. установяват, че в условия с ограничение на Fe, в сравнение с родителския щам *S. maltophilia* K279a, изогенен *fur* мутант образува по-тънки биофилми с по-голяма активност на супероксид дисмутаза и демонстрира по-висока вирулентност в ларви на *G. mellonella* (García et al. 2015). Участието на сидерофорите в патогенезата включва също промотиране на инфекция чрез повишаване експресията на проинфламаторни цитокини в гостоприемника, възпрепятстване на неутрофилната миелопероксидаза и убиване на клетките на макроорганизма (Nas and Cianciotto 2017).

S. maltophila използва различни източници на желязо, в т. ч. Fe^{3+}, хемоглобин, лактоферин и трансферин, за своя растеж (Kalidasan et al. 2018b). Значението на придобиването на желязо за вирулентността се подчертава от скорошно проучване, в което клиничен щам *S. maltophilia* (CS17) показва значително по-висока секреция на сидерофори и убива по-голям брой нематоди при условия с ограничение на желязото, отколкото щам LMB959 от околна среда. Също така CS17 демонстрира по-висока експресия на протеини за придобиване на желязо, отколкото LMB959 (Azman et al. 2019).

При *S. maltophilia*, гените *ampI* и *ampR* участват в транспорта на желязо (Huang et al. 2019b; Liao et al. 2020). Генът *ampI* кодира експортер на желязо, чието функциониране облекчава медиирания от β-лактами стрес от ROS. Експресията на *ampI* се увеличава значително при експозиция на β-лактами (Huang et al. 2019b). От друга страна е доказано, че AmpR протеинът регулира синтеза на сидерофора стенобактин в условия на ограничено желязо и експозиция на β-лактами (Liao et al. 2020).

2.3.3.4. Външна мембрана: ЛПЗ и външномембранни протеини

Липополизахарид

Както всички Грам-отрицателни бактерии *S. maltophilia* притежава външномембранен **ЛПЗ**, който е съставен от три домена: липид А, сърцевинен олигозахарид и О-специфичен полизахарид (О-антиген) (Zhang et al. 2013). ЛПЗ е фактор на вирулентност, който участва в колонизацията и резистентността към комплемент-зависимата клетъчна цитотоксичност (McKay et al. 2003; Looney et al. 2009).

Доказано е, че мутации, водещи до недостатъчна дължина на ЛПЗ, значително редуцират вирулентността на *S. maltophilia* при модел на белодробна инфекция в плъхове. Ефектът се изразява в неспособност на мутантен щам с неактивен *spgM* ген (кодираният от него ензим участва в сглобяването на О-полизахаридната верига) да колонизира бели дробове на плъхове, за разлика от дивия тип родителски щам. Белодробните тъкани, инокулирани с мутантния щам, не са показали хистопатологични промени, а такива са наблюдавани при инфектираните с дивия тип щам. В допълнение, същото изследване демонстрира, че мутантният щам е чувствителен на комплемент-зависимата клетъчна цитотоксичност, а дивият тип – не. Всички тези наблюдения подчертават значението на ЛПЗ като фактор на вирулентност при инфекциите със *S. maltophilia* (McKay et al. 2003; Brooke 2012, 2021).

Липид А доменът на ЛПЗ се включва в патогенезата при инфекции на дихателните пътища, като стимулира мононуклеарните клетки от периферна кръв и алвеоларните макрофаги да продуцират TNF-α. Той от своя страна индуцира активирането на Neu и макрофаги, чието натрупване и продукти нарушават нормалното функциониране на белите дробове. Чрез мас-спектрометричен анализ на липид А на клинични изолати *S. maltophilia* е установена висока степен на хетерогенност сред тях. Тези вариации между щамовете могат да бъдат свързани с различните нива на тяхната вирулентност (Waters et al. 2007; Looney et al. 2009).

Външномембранни протеини

OMPs допринасят за адхезията и чувствителността на клетките към стрес (Brooke 2021) и са потенциални кандидати за разработване на ваксини, предпазващи макроорганизма от инфекции, причинени от *S. maltophilia* (Chen et al. 2015; Xu et al. 2018; Li et al. 2019c). При MopB OMP е доказана роля в прикрепването към стъклени повърхности, вирулентност спрямо L929 фибробласти и защита срещу серум-медиираното убиване на гостоприемника (Chen et al. 2015). Докладвано е, че интраназална имунизация с рекомбинантен OMP Smlt4123 защитава BALB/c мишки срещу ранно развитие на бактериемия след интраперитонеално заразяване със *S. maltophilia* (Li et al. 2019c). Също така имунизацията с рекомбинантен OmpA (rOmpA) предпазва C57BL/6 мишки срещу инфекция със *S. maltophilia*. Имунизираните мишки показват значително по-високи серумни нива на IgG, IgA, IgG1 и IgG2a, което демонстрира развитие на системен хуморален имунен отговор и по-високи нива на IFN-γ, IL-2 и IL-17A, корелиращи с клетъчен имунен отговор. При имунизираните мишки са отчетени също редуциран бактериален товар и значимо по-ниски нива на TNF-α и IL-6 в бронхоалвеаларния лаваж. Резултатите от тези проучвания подчертават потенциала на OMPs на *S. maltophilia* като възможни кандидати за създаване на специфични ваксини.

2.3.3.5. Външномембранни везикули

OMVs на *S. maltophilia* участват в антибиотичната резистентност (Devos et al. 2016) и образуването на биофилми (Devos et al. 2015) и стимулират защитни механизми (възпалителен отговор) на гостоприемника (Kim et al. 2016). Секрецията на OMVs се стимулира от imipenem и дифузионен сигнален фактор (DSF) на *S. maltophilia*, и в по-малка степен от *Burkholderia cenocepacia* DSF и ciprofloxacin (Devos et al. 2015, 2017). Чрез протеомен анализ е установено, че OMVs на *S. maltophilia* съдържат два Ax21 протеина (Smlt0387 and Smlt0184), които са асоциирани с биофилм формирането (Devos et al. 2015).

OMVs на *S. maltophilia* генерират възпалителен отговор на макроорганизма *in vitro* и *in vivo* (Kim et al. 2016). Наблюдавани са цитотоксични ефекти за епителни клетки A549, когато са изложени на OMVs на *S. maltophilia*. OMVs индуцират видимо възпаление и повишена експресия на IL-1-b, IL-6, IL-8, моноцит хемоатрактант протеин 1 (MCP-1) и TNFa в BALB/c миши белодробни тъкани (Kim et al. 2016).

2.3.3.6. Пили

Пилите (фимбрии) участват в процеса на адхезия към епителни клетки на гостоприемника и във формирането на биофилм (Azimi et al. 2020; Kalidasan and Neela 2020). При много бактериални видове, вкл. *S. maltophilia*, мутантите щамове с дефект в продукцията на фимбрии са по-слабо вирулентни отколкото родителските щамове и вероятно това се дължи на неефективното взаимодействие между бактериите и епителните клетки. Наличието на антитела срещу фимбриите при оздравели пациенти е маркер за инфекция и продукция на тези антигени *in vivo* (de Oliveira-Garcia et al. 2003).

В изследване на de Oliveira-Garcia et al. са идентифицирани и охарактеризирани фимбриални структури, наречени SMF-1 (*S. maltophilia* fimbrae 1) (de Oliveira-Garcia et al. 2003). Авторите представят убедителни доказателства за участието на SMF-1 в хемаглутинацията, адхезията към клетки и образуването на биофилм. В проучването са използвани антитела срещу SMF-1 фимбриите, които са оказали инхибиращ ефект върху аглутинацията на животински еритроцити (миши и кокоши), адхезията към HEp-2 клетки и формирането на биофилм от щамове *S. maltophilia*. Предполага се, че SMF-1 фимбриите са обичайна антигенна детерминанта за този вид. Чрез електронна микроскопия с висока резолюция е показано още, че фимбриите действат като мостове между бактериите, прикрепени към инертни повърхности или към клетъчни култури от епителни клетки. Възможно е по този начин бактериалните клетки да се свързват директно с клетките на гостоприемника или с повърхностите, както и да се увеличава и поддържа стабилността на биофилма (de Oliveira-Garcia et al. 2003; Kalidasan and Neela 2020).

Освен *smf-1* фимбриален оперон, в генома на *S. maltophilia* присъстват още два отделни локуса, които съдържат допълнителни гени, кодиращи предполагаеми фимбрии, но те още не са проучени и охарактеризирани. Локализирани са още генен клъстер, кодиращ TadE-подобни пили/фимбрии (съществени за адхезията и формирането на биофилм), и клъстер, който притежава значително сходство с локуса за т.нар. “giant cable pilus” на *Burkholderia cenocepacia*, допринасящ за патогенността на този микроорганизъм при пациенти с МВ (Urban et al. 2005; Tomich et al. 2007; Crossman et al. 2008). Идентифицирани са още и разпръснати в генома на *S. maltophilia* гени, които кодират субединиците и свързаните с тях апарати, специфични за T4P (Crossman et al. 2008). Адхезия към клетки на гостоприемника и подвижност чрез „трептене“ са основните функции на T4P (Pelicic 2019). Към настоящия момент ролята им като фактор на вирулентност при *S. maltophilia* все още не е проучена в детайли. При изолати от болни от МВ е установено, че макар да не участват в първоначалното прикрепяне на *S. maltophilia*, T4P играят съществена роля във формирането на биофилм. Това предполага наличието на

специфичен механизъм, участващ в контрола на образуването на биофилм в белите дробове на такива пациенти (Pompilio et al. 2011).

2.3.3.7. Непилусни адхезини

Непилусните адхезини представляват къси мономерни или тримерни структури, прикачени директно към външната клетъчна мембрана на бактериалната клетка. Поради относително късия си размер, обикновено медиират близкия контакт между бактериите и субстрата. Също така участват във взаимодействията между клетките и тяхната агрегация, включват се в прикрепването на бактериите към абиотични повърхности и/или към клетки на макроорганизма, както и във формирането на биофилм. Освен това взаимодействат с различни компоненти на екстрацелуларния матрикс на биофилма, свързвайки го с бактериалните клетки и поддържайки неговата структура (Berne et al. 2015).

В генома на *S. maltophilia* K279a (изолат от кръв на болен с онкологично заболяване) е открит участък, кодиращ потенциален непилусен адхезин (Crossman et al. 2008). Това е първото съобщение за наличието на подобен фактор на вирулентност при *S. maltophilia*, който все още не е проучен и охарактеризиран в детайли.

2.3.3.8. Ресни (флагели)

Ресните (флагелите), които са силно имуногенни структури, освен че осигуряват подвижността на бактериалните клетки, могат да играят и роля на адхезини – участват в прикрепването на бактериите към лигавици на гостоприемника, а също и към абиотични повърхности. Чрез електронна микрография при *S. maltophilia* са установени вариации в броя на флагеларните структури – от една до няколко, които са полярно разположени. Основен структурен компонент на ресните е белтъкът флагелин (Brooke 2021).

Проучване на клинични изолати *S. maltophilia* показва, че флагелите участват пряко в адхезията към трахеална лигавица от мишки, а флагелинът играе роля на адхезин. В това изследване се съобщава, че свързването към мукуса чрез флагели възпрепятства свободното движение на бактериалните клетки в респираторния тракт и по този начин косвено влияе върху установяването на микроорганизмите. Също се изказва предположение, че чрез флагелите формираните биофилми се прикрепват към мукуса на лигавиците и така бактериите са защитени от имунния отговор на макроорганизма (Zgair and Chhibber 2011b). При *in vitro* изследвания е установено, че прикрепването на пречистен флагелин върху полистиренова повърхност протича с висок афинитет и се потиска от анти-флагелинов антисерум по начин, зависим от дозата (Zgair and Chhibber 2011a). Тези

открития показват, че флагелите са важни за ранните етапи на адхезия на *S. maltophilia* към повърхностите.

Флагелинът на *S. maltophilia* е различен от флагелина на *P. aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*. Той индуцира специфичен имунен отговор на гостоприемника (Zgair and Chhibber 2012a). BALB/c мишки, инстилирани с флагелин на *S. maltophilia* и след това изложени на патогена 4 часа след инстилирането, показват значително повишени нива на провъзпалителни цитокини (IL-1b и TNF-a) и IL-10. Инстилирането на флагелин води до повишен брой Neu, лимфоцити и моноцити в бронхоалвеоларния лаваж и осигурява неспецифична защита за мишките срещу заразяване със *S. maltophilia* и *S. aureus* (Zgair and Chhibber 2012b). В друго проучване е установено, че доставянето на див тип *S. maltophilia* SM111 и изогенен *ΔfliI* мутант чрез аерозол в DBA/2N мишки води до значително по-високо ниво на TNF-α в белите дробове в ранните етапи след експозицията на дивия тип, отколкото при приложение на мутантиня щам (Pompilio et al. 2018). Тези проучвания демонстрират имуногенността на флагелина в гостоприемника и предполагат потенциална употреба на флагелин за защита срещу инфекция, причинена от *S. maltophilia*.

Флагелите на *S. maltophilia* участват в ранните етапи на бактериална адхезия към повърхности. Подобно на наблюденията, касаещи ресните на *P. aeruginosa* по време на прогресиране на хроничната белодробна инфекция при пациенти с МВ, намалена подвижност на *S. maltophilia* е наблюдавана и в хода на прогресирането на хроничната МВ белодробна инфекция с този патоген (Winstanley et al. 2016). Тъй като флагелите са имуногенни, тяхната загуба може да е от полза за *S. maltophilia* поради намаляване на излагането му на имунната защита на гостоприемника. Проучване на Pompilio et al., сравняващо изолати *S. maltophilia* от болни от МВ с такива от не-МВ пациенти, е отчело, че флагеларната подвижност само при първите е от съществено значение за развитието на биофилм, въпреки че не е задължителна за неговата инициация. На базата на тези резултати авторите правят заключението, че адаптирайки се към средата в белите дробове на болни от МВ (по-екстремна в сравнение с други условия и изискваща в по-голяма степен клетъчни ресурси), при щамовете *S. maltophilia* се осъществява селекция на т. нар. „CF (cystic fibrosis) фенотип“ (Pompilio et al. 2011).

2.3.3.9. Quorum sensing

Молекулите на DSF, чийто синтез е зависим от биофилм-асоциирания ген *rpfF*, участват в междуклетъчната сигнализация, т. нар. QS. Те медиират процесите на комуникация между бактериалните клетки, като позволяват на популациите да

синхронизират своята генна експресия при достигането на критична клетъчна плътност. DSF сигнализацията при *S. maltophilia* играе роля и при регулацията на множество функции, които допринасят за нарастване на антибиотичната резистентност и вирулентността на микроорганизма (Huedo et al. 2015).

Системата QS е жизненоважен регулаторен механизъм, който действа чрез продукция, детекция и отговор на извънклетъчните сигнални молекули, наречени автоиндуктори (в случая DSF). DSF се натрупва в средата, когато нараства бактериалната плътност на популациите. При достигане на висока локална концентрация на автоиндуктора, клетките отчитат информацията за промяна в техния брой и популацията отговаря чрез координирана експресия на специфични таргетни гени (AboZahra 2013). Под финия контрол на тази регулаторна система се намират характеристики на вирулентността на *S. maltophilia*, като продукция на извънклетъчни ензими, подвижност и образуване на биофилм (Trifonova and Strateva 2019; Alcaraz et al. 2019). QS медиира също и междувидова сигнализация, доказана между *S. maltophilia* и *P. aeruginosa*, и *Candida albicans* (Ryan et al. 2008; de Rossi et al. 2014).

2.4. Биофилм образуване от НФГБ

Без съмнение една от най-важните детерминанти на вирулентността в патогенезата на инфекциите с НФГБ е производството на биофилм. Биофилмът позволява прилепването на тези патогени върху различни повърхности, осигурява защита от сурови условия на околната среда и от имунната система на макроорганизма (напр. NK клетки, фагоцити, комплемент, ROS-медиирано увреждане) (Jamal et al. 2018; Maurice et al. 2018). Биофилмите имат хетерогенен състав, включващ агрегати от прикрепени бактериални съобщества (въз основа на техния състав това може да бъде едновидов или смесен биофилм), екзополизахариди (EPS; напр. алгинат, целулоза, декстран, RLs), външна ДНК (еДНК), въглехидрати, протеини, повърхностноактивни вещества, липиди, различни йони и вода (Behzadi et al. 2020; Tuon et al. 2022). Начинът на растеж в биофилм е описан за първи път през 30-те години на миналия век, докато истинското значение на вградените в биофилм бактерии в инфекциозните процеси е разбрано едва през последните десетилетия (Mulcahy et al. 2014). Бактериалните клетки обикновено се прикрепят към хидрофобни и/или груби повърхности с помощта на техните клетъчно-свързани детерминанти на вирулентност (напр. пили и повърхностни антигени), което е последвано от производството на защитния EPS и други компоненти (Behzadi et al. 2021).

2.4.1. Биофилм образуване от *P. aeruginosa*

Два различни начина на живот, планктонни и прикрепени клетки, могат да бъдат възприети от *P. aeruginosa*. Планктонното състояние се среща в суспензия от течна култура, докато върху естествени или синтетични повърхности *P. aeruginosa* може да образува лепкави клъстери в състояние на постоянно пренареждане, характеризиращи се със секреция на адхезивен и защитен матрикс. Дефинирана като „биофилм“, тази бактериална общност, прилепнала към повърхността, се явява адаптивен отговор към среда, повече или по-малко неподходяща за растеж в планктонна форма (Tuon et al. 2022).

Биофилмите позволяват на *P. aeruginosa* да персистира във външната среда (във водопроводни тръби и резервоари, мивки, върху различни обекти от болничната среда, върху медицинско оборудване, като апарати за механична вентилация и дихателни тръби, овлажнители, оборудване за диализа и катетри, ендоскопи и имплантируеми медицински устройства, в медицински препарати, като иригационни разтвори, диализна течност, течност за съхранение на контактни лещи, антисептични разтвори и кремове) и *in vivo* (Maurice et al. 2018; Chen et al. 2018b; Ciofu and Tolker-Nielsen 2019).

P. aeruginosa се характеризира с развитие на здрави биофилми, силно устойчиви на антибиотици, дезинфектанти и защитни механизми на гостоприемника (Yan and Wu 2019), които нарушават бактериалния клирънс и водят до установяване на упорити хронични инфекции (Jurado-Martín et al. 2021). Над 50% от извънклетъчния матрикс на биофилма на *P. aeruginosa* се формира от три EPSs (капсулен полизахарид, алгинат и агрегатни полизахариди – Psl и Pel), но също съдържа еДНК и протеини (**Фигура 2а**) (Mann and Wozniak 2012). Зрелите биофилми имат подобна на гъба структура и съдържат сложна мрежа от канали, които разпределят хранителните вещества и кислорода, и отстраняват отпадъчните продукти (Mann and Wozniak 2012; Yan and Wu 2019).

Развитието на биофилма е многофакторно. Инициирането настъпва с увеличаване на c-di-GMP, който индуцира адхезини и биосинтеза на EPS, както и физиологични промени, необходими за преминаване от подвижен планктонен растеж към начин на живот, свързан с прикрепен биофилм (Wei and Ma 2013). Секрецията на различни QS-контролирани извънклетъчни ензими (естерази, липази и еластази) засяга състава на EPS, свойствата на извънклетъчния матрикс и клетъчната подвижност, като по този начин влияе върху образуването и архитектурата на мукоидните биофилми на *P. aeruginosa* (Wilhelm et al. 2007; Rosenau et al. 2010; Tielen et al. 2010, 2013). Наскоро е изказана хипотеза, че QS може също да контролира етапа на разпръскване на биофилма, а също, че индуцираното от

хинолони образуване на OMVs може да улесни клетъчното разпръскване (Yan and Wu 2019; Cooke et al. 2020). Освен това малките РНК също регулират образуването на биофилм (Miller et al. 2016). Съществуват няколко пътя за развитие на *P. aeruginosa* биофилми и експресията на гени, регулиращи реакциите на стрес адаптацията към среди, бедни на кислород и желязо, е жизненоважна за този процес (Thöming et al. 2020).

Алгинат

Алгинатът, наричан още мукоиден екзополизахарид (MEP), е най-изследваният EPS и основният компонент на мукоидните биофилми на *P. aeruginosa*. Това е произволен полимер с високо молекулно тегло, съдържащ D-мануронова и L-гулуронова киселини в променливи съотношения, които са 1-4 свързани и частично O-ацетилирани. Оперонът *algD* кодира ензимите, необходими за синтеза на алгинат, а неговата експресия се регулира от AlgT σ-фактор (Mann and Wozniak 2012). Алгинатът е свръхпродуциран от мукоидните щамове *P. aeruginosa* и въпреки че наличието му не е строго изискване за биофилм образуване, той помага за неговото съзряване, архитектура и стабилност (Ghafoor et al. 2011; Orgad et al. 2011). MEP се прикрепя към трахеобронхиалния муцин и действа като алтернативен адхезин (Jurado-Martín et al. 2021). Ацетиловите групи допринасят за неговия висок вискозитет, което позволява задържането на вода и хранителни вещества (Mann and Wozniak 2012). Важно е, че алгинатът допринася за устойчивостта на *P. aeruginosa* чрез защита срещу фагоцитоза на гостоприемника в белите дробове и изчистване на ROS, освободени от активирани макрофаги и Neu (Leid et al. 2005; Mann and Wozniak 2012). В допълнение алгинатът и Psl предизвикват силен отговор на PMN, водещ до значително освобождаване на ROS, което допринася за възпаление на белите дробове (Rybtke et al. 2021). Накрая, той може да свърже аминогликозидни антибиотици, като инхалаторно прилагания при MB tobramycin, нарушавайки тяхното проникване в биофилма и повишавайки антибиотичната толерантност на патогена (Goltermann and Tolker-Nielsen 2017).

2.4.2. Биофилм образуване от *A. baumannii*

Образуването на биофилм играе важна роля във взаимодействията на *A. baumannii* с гостоприемника и допринася за възникване на инфекции, свързани с медицински устройства. *A. baumannii* демонстрира повишена толерантност към извънклетъчните стресови фактори, когато е част от биофилм (Harding et al. 2018). Редица физикохимични и микробни фактори (повърхностни придатъци, адхезини, капсулни полизахариди,

детерминанти на вирулентност и резистентност) допринасят за образуването и поддържането на биофилми на *A. baumannii* (Eze et al. 2018).

2.4.2.1. Значение на биофилма в инфекциозната патогенеза

Способността на *A. baumannii* да оцелява при неблагоприятни условия на средата; латентното състояние на бактериалните клетки, разположени дълбоко в биофилм; множеството механизми на резистентност към АМЛС; персистирането върху абиотични повърхности и устойчивостта на стресови фактори от околната среда играят роля за възникване и установяване на широк спектър от подостри или хронични биофилм-асоциирани инфекции, които са много трудни за изкореняване (Greene et al. 2016).

Способността за образуване на биофилм е важен фактор, който влошава болестния процес при инфекции с *A. baumannii* (Gedefie et al. 2021). След първоначалното прикрепване към абиотичните повърхности, сглобяването на пили и синтезът на Bap (biofilm-associated protein) повърхностно-адхезионен протеин играят ключова роля в инициирането и узряването на биофилма (Gaddy and Actis 2009). Биофилмът увеличава адхезията и дългосрочното оцеляване на *A. baumannii* както върху биотични, така и на абиотични повърхности. Също така външномембранният протеин OmpA допринася за образуване на биофилм върху човешки епителни клетки, медиира прикрепването на бактериите към белодробните епителни клетки чрез взаимодействие с фибронектина и може да индуцира апоптоза в тях (Gaddy et al. 2009; Sato et al. 2017).

2.4.2.2. Фактори, влияещи върху биофилм формирането на *A. baumannii*

A. baumannii образува най-малко три пъти повече биофилм на границата твърда-течна фаза в сравнение с другите видове *Acinetobacter*. Клиничните щамове са по-силни продуценти на биофилми от щамовете в околната среда, а развитието на биофилм върху медицински важни повърхности влияе върху способността им да устояват на стреса, изсушаването и антимикробната терапия (Elkheloui et al. 2020). Образуването на биофилми е сложен процес, който се влияе от различни свойства на клетките. Клетъчната повърхност, хидрофобността, повърхностният заряд, адхезионните протеини и извънклетъчните полимерни съединения оказват влияние върху производството на биофилми от *A. baumannii* (Elkheloui et al. 2020; Gedefie et al. 2021).

Налице е положителна корелация между образуването на биофилм на *A. baumannii* върху абиотични повърхности и MDR, както и експресията на някои фактори на вирулентност (OmpA, извънклетъчен полизахарид поли-β-1,6-N-ацетил глюкозамин

(PNAG), пили тип I, Rec A протеин, Bap протеин и външномембранен протеин CarO). Върху тъкани *A. baumannii* се нуждае от т. нар. “chaperone-usher” пили за производство на биофилм (Amala Reena et al. 2017).

Редица фактори на околната среда влияят върху растежа на биофилма. Температура, осмоларност, концентрация на Fe^{2+}, наличие на хранителни вещества, качество на материалите, където се образуват биофилми, светлина и киселинност на средата са най-важните елементи, които влияят върху биофилм образуването (Toyofuku et al. 2016). Глюкоза, съдържание на кислород и хидрофобност на повърхностите са други ключови фактори, оказващи влияние в процеса на биофилм формиране от *A. baumannii* (Eze et al. 2018).

2.4.2.3. Детерминанти на вирулентност, асоциирани с биофилм образуване и биофилм-специфична резистентност при *A. baumannii*

Микробните функции като клетъчна комуникация, повърхностно регулирани прикрепвания и секреция на макромолекули са основни фактори за образуването на биофилм (Gaddy et al. 2009; Harding et al. 2013). *A. baumannii* експресира множество гени на вирулентност, които го превръщат в успешно адаптиран патоген при хора и животни (Harding et al. 2018). Също така той притежава репертоар от биофилм-асоциирани гени на вирулентност и кодирани от тях протеини, които допринасят за способността му за адхезия и биофилм образуване върху абиотични повърхности и тъкани (Liu et al. 2016b). Наличието на тези гени осигурява на *A. baumannii* жизнеспособност в различни среди и огромна сила срещу антимикробни агенти и клетки на имунната система на гостоприемника. Тези множество генетични елементи се контролират и регулират от сложни регулаторни мрежи, включително такива, базирани на наличието на гени за антибиотична резистентност, условия на околната среда или клетъчна плътност (Eze et al. 2018). Основните детерминанти на вирулентност, които са свързани с биофилм образуване и биофилм-специфична резистентност при *A. baumannii* са обобщени в **Таблица 3.**

Bap протеин

Bap протеинът има ключова роля за изграждане на триизмерната структура на биофилма и формиране на водните канали в него (Brossard and Campagnari 2012; Upmanyu et al. 2022). Той е повърхностен клетъчен протеин, идентичен със *Staphylococcus* Bap, който в *A. baumannii* е идентифициран за първи път от Loehfelm et al. (Loehfelm et al. 2008). Секретиран чрез тип I секреторна система, Bap медиира формиране и узряване на биофилма на *A. baumannii* (Harding et al. 2018). Участва в междуклетъчната бактериална

адхезия и е необходим за развитието на биофилми върху медицински значими материали, като полистирен и титан (Eze et al. 2018).

Въпреки че повечето секвенирани геноми на *A. baumannii* носят *bap* ген, в много от тях са открити нарушени или съкратени *bap* последователности, вероятно поради рекомбинация или грешки в подравняването на последователностите, които са общи за силно повтарящите се елементи на *bap* гена (Sharon Goh et al. 2013). Доказано е, че *bap* кодира силно вариабилен протеин, класифициран в няколко типа (Upmanyu et al. 2024).

Таблица 3. Основни генни детерминанти на вирулентност и антимикробна резистентност, асоциирани с образуване на биофилм от *A. baumannii*.

Ген / оперон	**Продукт**	**Функция**	**Литературен източник**
bap	Bap (биофилм-свързан протеин)	Отговорен за изграждане на триизмерната структура на биофилма и формиране на водните канали в него	(Loehfelm et al. 2008; Brossard and Campagnari 2012; Badmasti et al. 2015; Upmanyu et al. 2022)
csuABCDE	Csu тип I пили	Биогенеза на Csu пили и формиране на биофилм	(Tomaras et al. 2003; Pakharukova et al. 2018)
pgaABCD	Поли-β-1,6-N-ацетил глюкозамин	Субстрат-специфичен трансмембранен транспортер с участие в биофилм формирането	(Choi et al. 2009)
adeABC	AdeABC ефлукс система от RND (resistance-nodulation-division) тип	Множествена лекарствена резистентност (MDR), включително към карбапенеми, и участие в биофилм формирането	(Yoon et al. 2015; Richmond et al. 2016)
adeFGH	AdeFGH ефлукс система от RND тип	MDR; роля в синтеза и транспорта на автоиндукторни молекули по време на биофилм образуването	(He et al. 2015)
abaIR	AbaIR – регулаторна quorum sensing система	Регулира биофилм образуването и нефлагеларната подвижност.	(Li and Tian 2012)
ompA	OmpA външномембранен протеин	Поддържа целостта на клетъчната мембрана; адхезивна функция; участие в биофилм формирането и антибиотичната резистентност; модулира биогенезата на външномембранните везикули.	(Gaddy et al. 2009; Badmasti et al. 2015)

2.4.2.4. Биофилм и антимикробна резистентност

Според някои автори съществува положителна корелация между продукция на биофилм и MDR (Badave and Dhananjay 2015; Elkheloui et al. 2020). Badave и Dhananjay установяват, че биофилм-образуващите щамове *A. baumannii* демонстрират повишена резистентност към ampicillin-sulbactam, amikacin, ciprofloxacin и ceftazidime, както и

статистически значима връзка между MDR и биофилм формиране (Badave and Dhananjay 2015). В по-старо проучване, включващо imipenem-резистентни клинични изолати *A. baumannii*, също е открита корелация между образуване на биофилм и MDR. Продуцентите са показали по-висока резистентност към АМЛС в сравнение с непродуциращите биофилм изолати (Rao et al. 2008). Публикувани са и проучвания с противоположни резултати. Например *Krzyściak et al.* откриват, че нозокомиални ceftazidime-чувствителни изолати *A. baumannii* образуват по-малко количество биофилм от резистентните на антибиотика изолати, за разлика от чувствителните на tobramycin и amikacin *A. baumannii*, които продуцират по-голямо количество биофилм от резистентните (Krzyściak et al. 2017). В друго проучване е докладвано, че meropenem-резистентни изолати *A. baumannii* имат по-ниска способност за формиране на биофилм (Rodrigues Perez 2015).

Като цяло щамовете *Acinetobacter* с MDR и производство на биофилм представляват сериозна опасност в болничните отделения, тъй като те бързо придобиват резистентност към рутинно използвани антибиотици, а способността им да произвеждат биофилм е статистически асоциирана с резистентност към imipenem (Sunu Kumari et al. 2013).

2.4.3. Биофилм образуване от *S. maltophilia*

2.4.3.1. Биофилми върху различни повърхности

Установено е, че биофилмите се асоциират с 65% от придобитите в болнични условия инфекции, а в такава среда *S. maltophilia* е доказан контаминант на множество медицински консумативи и оборудване (Brooke 2012). *S. maltophilia* има положителен повърхностен заряд при физиологично pH, което благоприятства прикрепването му към отрицателно заредени материали като тефлон и стъкло. Известно е също, че хидрофобността на бактериалните клетки е свързана с адхезията и образуването на биофилм върху полистиренови повърхности и тази способност е силно изразена при *S. maltophilia* (Pompilio et al. 2008).

Поради способността си да прилепва здраво към различни видове пластмаси, главно в болнична среда, процесът на инфекция/колонизация често се асоциира със замърсяване на хирургическия материал, както и с техники за катетеризация, интубация и трахеотомия, в т.ч. интраваскуларни канюли и ендотрахеални тръби (García et al. 2022). Изолирането на *S. maltophilia* при болнично-придобити инфекции, свързани с медицински устройства, корелира със способността му да формира здраво прикрепени биофилми върху тях (Alcaraz et al. 2018). В тази връзка стои проблемът с конструирането на материали за импланти,

които да препятстват бактериалната адхезия, тъй като протезните устройства биват покривани със субстанции на гостоприемника, включително протеини и въглехидрати, които от своя страна улесняват прикрепването на микроорганизма (Brooke 2012).

От критична важност е предотвратяване формирането на биофилми в болнични условия, което определя и проучванията в тази насока. Установено е, че ефективно отстраняване и инхибиране на бактериалния биофилм може да се постигне чрез използването на дезинфектанти, съдържащи няколко активни антимикробни агента, като от съществено значение е пълното изсъхване на обработената повърхност или оборудване (напр. ендоскоп) след дезинфекцията преди тяхното следващо използване (Kovaleva et al. 2010; Brooke 2012).

Биофилмите, образувани от *S. maltophilia*, са проучвани и върху биотични повърхности – монослоеве от клетки (клетъчни култури HEp-2, IB3-1) (de Oliveira-Garcia et al. 2003; Pompilio et al. 2010) и тъкани (Zgair and Chhibber 2011b). В резулат от проведените изследвания се налага схващането, че формирането на биофилм върху абиотични повърхности се осъществява по начин, различен от този, наблюдаван върху биотични повърхности – клетъчни монослоеве, животински модели или пациенти (Brooke 2012).

2.4.3.2. Значение на биофилма в инфекциозната патогенеза

Клиничната значимост на биофилм образуването все още не е напълно изяснена. Нивата на продукция на биофилм варират сред клиничните изолати *S. maltophilia* (Zhuo et al. 2014), но като цяло това е силно консервативна характеристика на вида. Установено е, че способността за образуване на биофилми е по-голяма при щамовете, които циркулират и причиняват инфекции в болнична среда. Ето защо биофилм формирането е важна част от вирулентния потенциал и има неоспорима роля в установяването на инфекциите със *S. maltophilia* (Pompilio et al. 2020a).

При имунокомпрометирани пациенти проявите на инфекции, причинени от опортюнистични, образуващи биофилм патогени, могат да бъдат сериозни и да доведат до особено тежки симптоми, а в много от случаите и до летален изход (Kostakioti et al. 2013). При болните от МВ колонизиране на белодробните тъкани със *S. maltophilia* настъпва приблизително в една трета от случаите, макар че мненията относно значимостта на колонизацията за клиничния изход се различават (Goss et al. 2004; Pompilio et al. 2010). Въпреки че патогенните механизми, позволяващи на бактериите да причинят инфекция и колонизация на респираторния тракт при такива пациенти са слабо изяснени, счита се, че

образуването на биофилм допринася за прогресиране на белодробното заболяване, а също и при пациенти с други болести на дихателните пътища, асоциирани с развитие на хронични инфекции (определено е, че биофилмите са в основата на 80% от тях) (Pompilio et al. 2010; Комитова 2018).

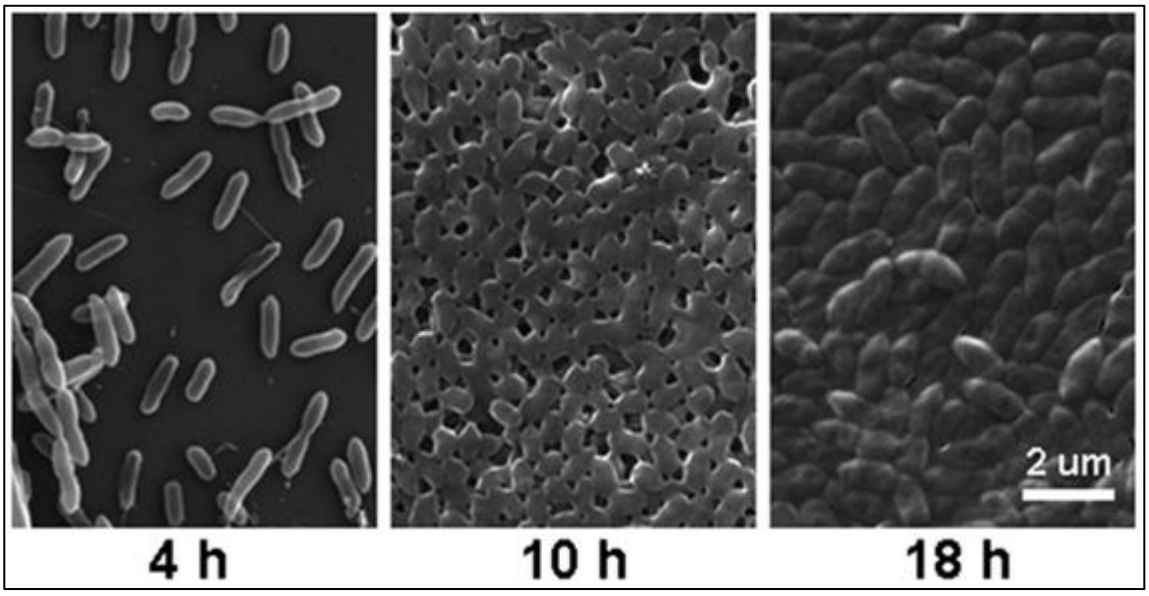
Проучване, извършено с прилагането на конфокална лазерно-сканираща микроскопия, е показало, че изолираните в ранните етапи на хронична инфекция щамове *S. maltophilia* имат способността да формират по-структуриран и многослоен биофилм в сравнение с тези от късните фази, които от своя страна са със значително понижена адхезивност и не могат да образуват зрял биофилм. Авторите на изследването приемат, че тази особеност е следствие от адаптирането на *S. maltophilia* към „стресова" среда, каквато са белите дробове на болни от МВ или ХОББ (Zhuo et al. 2014).

2.4.3.3. Условия и етапи на биофилм формиране

В лабораторни експерименти с клинични изолати *S. maltophilia* е установено, че по-голямо количество биофилм се образува при температура на култивиране от 32 °C отколкото на 37 °C и 18 °C; също при аеробни условия и в атмосфера с 6% CO_2 спрямо анаеробно култивиране. Също така изолатите произвеждат сходни количества биофилм при pH 8.5 и pH 7.5, но по-големи от тези, произвеждани при pH 5.5 (Brooke 2012).

Формирането и растежът на биофилма зависят от редица физични, химични и биологични процеси. Разграничават се няколко последователни етапа. Първият от тях е първоначалното обратимо прикрепване на свободните клетки посредством физични сили или бактериални структури, като адхезията може да се повлияе в голяма степен от вида на повърхността, температурата, pH и налягането. Следващият етап на формиране на биофилм е необратимото прикрепване на клетките към повърхността и размножаването им до формиране на микроколонии, около които се натрупва полимерният матрикс (Kostakioti et al. 2013). И в двете ранни фази е подчертана ролята на пилите и флагелите (de Oliveira-Garcia et al. 2003; Pompilio et al. 2008; Zgair and Chhibber 2011b). Следва етап на зреене, който се характеризира с промени в генната експресия, водещи до синтез на екстрацелуларни полимерни субстанции (EPS), необходими за стабилизиране на биофилма, а също и осъществяване на динамични процеси на междуклетъчна комуникация. Увеличава се броят на слоевете и съответно дебелината на биофилма. В рамките на зрелия биофилм, общността от клетки активно обменя и споделя продукти, които поддържат неговата архитектура и осигуряват благоприятна среда за включените бактерии (Kostakioti et al. 2013). Динамиката на биофилм формирането от *S. maltophilia*

върху полистиренова повърхност може да се наблюдава чрез сканираща електронна микроскопия (СЕМ). След 4-часово култивиране бактериалните клетки са прикрепени към повърхността и заемат приблизително 30% от нея. След 10 часа почти цялата повърхност е покрита с клетки, с малки пространства между тях, като започва секрецията на EPS. На 18-ия час полистиреновата повърхност е покрита изцяло със зрял биофилм (**Фигура 5**) (Wang et al. 2016). Последна е фазата на дисперсия (разпръсване), която може да настъпи поради много и различни причини, като недостиг на нутриенти, натрупване на токсични продукти, интензивна конкуренция, изчерпване на популацията и др. Различни ензими дестабилизират структурата на биофилма и подпомагат откъсването на бактериалните клетки от матрикса. Дисперсията може да възникне в целия биофилм или в част от него, а свободните бактерии са способни да инициират процеса на образуване на нов биофилм, попадайки в подходяща среда (Kostakioti et al. 2013; Rabin et al. 2015).



Фигура 5. Динамика в образуването на биофилм от щам *S. maltophilia* от бронхиално дърво след 4- (ляво), 10- (средата) и 18-часово (дясно) култивиране върху полистиренови плаки – сканираща електронна микроскопия (Wang et al. 2016).

2.4.3.4. Молекулярно-генетични механизми, участващи в образуването на биофилм

Таргетните продукти на няколко гена (*spgM*, *rmlA*, *rpfF*, *bsmR* и *ax21*) имат тясна връзка с формирането на биофилм при *S. maltophilia* (**Таблица 4**) (Zhuo et al. 2014; Liu et al. 2017; An and Tang 2018a). Гените *spgM* и *rmlA* не повлияват неговото количество, тъй

като сигнификантни мутации в тях са открити и при силно, и при слабо продуциращите биофилм щамове, но самото образуване на биофилма корелира в значителна степен с наличието на трите гена – *spgM*, *rmlA* и *rpfF*, при изследваните клинични изолати. Ролята им все още търпи изясняване относно това, кои мутации в ключови аминокиселини определят функционални промени в протеините и като цяло изменения във формирането на биофилм (Zhuo et al. 2014).

Таблица 4. Гени, асоциирани с образуването на биофилми при *S. maltophilia*.

Ген	**Продукт**	**Функция**	**Влияние върху вирулентността**	**Литературен източник**
spgM	Бифункционален ензим с фосфоглюкомутазна и фосфоманомутазна активност	Участие в синтеза на ЛПЗ, сглобяване на полизахаридната верига на О-антигена	Повлиява колонизацията и резистентността към защитата на макроорганизма (комплемент-зависима клетъчна цитотоксичност).	(McKay et al. 2003)
rmlA	Глюкозо-1-фосфат тимидилтрансфераза	Участие в ЛПЗ/ЕПЗ-свързания биосинтетичен път (заедно с *rmlC* и *xanB*)	Подвижност чрез „трептене“, адхезия, формиране на биофилм	(Huang et al. 2006)
rpfF	DSF синтаза	Участие в синтеза на DSF (медиатор на междуклетъчната сигнализация)	Регулация на експресията на фактори на вирулентност (екстрацелуларни протеази, липази и ДНК-аза, сидерофори, ЛПЗ, подвижност) и формиране на биофилм	(Huedo et al. 2015; An and Tang 2018b; Alcaraz et al. 2019)
bsmR	BsmR протеин (регулатор на биофилм формирането и подвижността)	Фосфодиестеразна активност, разграждане на c-di-GMP	Позитивна регулация на подвижността и негативна регулация на биофилм формирането	(Liu et al. 2017)
ax21	Ax21 външен мембранен протеин	Дифузионна сигнална молекула, участваща в междувидовата комуникация	Повлиява подвижността, формирането на биофилм и вирулентността.	(An and Tang 2018a)

ЛПЗ – липополизахарид, ЕПЗ – екзополизахарид, DSF – дифузионен сигнализиращ фактор, c-di-GMP – цикличен дигуанозин монофосфат.

2.4.3.5. Биофилм и антимикробна резистентност

Антимикробната резистентност на клетките, растящи в биофилм, обикновено е по-голяма от тази на планктонните клетки. Щамовете *S. maltophilia* обикновено са резистентни към широк спектър от АМЛС и добавеното образуване на биофилм увеличава предизвикателството за лечение на инфекциите (Sun et al. 2016a; Brooke 2021). В скорошно проучване Pompilio et al. докладват, че образуването на биофилм от *S. maltophilia* може да осигури механизъм за планктонните клетки да устоят на антимикробни средства, които иначе биха били вредни. Това проучване внушава идеята, че диагностичното тестване на клиничните щамове трябва да включва оценка на тяхната способност за образуване на биофилми и подчертава необходимостта от разработване на протокол за стандартизирано тестване на антимикробната чувствителност на биофилмите, образувани от *S. maltophilia* (Pompilio et al. 2020b).

Доказано е, че активността на хоризонталния трансфер на плазмидно-кодирани гени за антимикробна резистентност е по-голяма в биофилмите, отколкото сред планктонните клетки (Madsen et al. 2012). Установено е например, че *P. aeruginosa* в биофилм е способен на естествена трансформация на хромозомна и плазмидна ДНК, подпомагана от T4P (Nolan et al. 2020). В тази връзка може да се предполага сходен генен трансфер и мобилизация на детерминанти на антимикробна резистентност и при биофилм-формиращите *S. maltophilia* (Brooke 2021).

2.5. Механизми на резистентност към АМЛС при терапевтично проблемни НФГБ

2.5.1. Механизми на резистентност при *P. aeruginosa*

P. aeruginosa е истински феномен, който съчетава вродена и придобита резистентност към голям брой групи АМЛС, в т.ч. β-лактами, аминогликозиди и флуорохинолони. При него могат да се открият в различни комбинации всички известни механизми на антимикробна резистентност: дерепресия на хромозомната AmpC цефалоспориназа; продукция на плазмид- или интегрон-медиирани β-лактамази от различни молекулярни класове; пермеабилитетни промени (загуба на OprD външномембранни протеини); свръхекспресия на активни ефлукс системи с широка субстратна специфичност; синтез на аминогликозид-модифициращи ензими (AMEs) и структурни промени в топоизомерази II и IV (Strateva and Yordanov 2009). Резистентността към АМЛС се класифицира в три категории: i) ***адаптивна*** (свързана с образуване на биофилм); ii) ***вродена***; и iii) ***придобита*** (възникваща чрез мутации или придобиване на

плазмиди, интегрони и транспозони чрез хоризонтален генен трансфер, което води до богат и разнороден резистом (López-Causapé et al. 2018).

P. aeruginosa притежава вродена (първична) устойчивост към много АМЛС, принадлежащи към различни неродствени групи. Комплексни механизми са въвлечени в този тип резистентност: нисък пермеабилитет на ВМ (приблизително 100-кратно по-нисък от този на *E. coli*); конститутивна експресия на различни ефлукс помпи с широка субстратна специфичност и естествено съдържаща се хромозомна AmpC β-лактамаза (цефалоспориназа), която определя вродената устойчивост към много от представителите на клас „β-лактами“ (Strateva and Yordanov 2009). *P. aeruginosa* демонстрира първична резистентност към следните АМЛС: аминопеницилини, вкл. комбинирани препарати с β-лактамазни инхибитори, цефалоспорини от първа и втора генерация, повечето третогенерационни цефалоспорини (с изключение на ceftazidime), гликопептиди, оксазолидинони, daptomycin, макролиди, линкозамиди, стрептограмини, тетрациклини, rifampicin и SXT (Behzadi et al. 2021).

Наред с вродените механизми на устойчивост, изключителната способност на *P. aeruginosa* да придобива нови механизми на резистентност, бързата му адаптация към променящите се условия на околната среда, включително и в хода на насочена антибиотична терапия, превръща в сериозно предизвикателство избора на подходящ антимикробен агент за лечение на инфекциите, причинени от този патоген.

2.5.1.1. Резистентност към β-лактами

2.5.1.1.1. Ензимни механизми на резистентност към β-лактами

Продукцията на ензими е главният механизъм на придобита резистентност към β-лактамни антибиотици в *P. aeruginosa*. Пеницилоил серин трансферазите, наричани в практиката β-лактамази, разкъсват амидната връзка на β-лактамния пръстен, в резултат на което се получават продукти, лишени от антибактериална активност (Tooke et al. 2019). В *P. aeruginosa* са открити значителен брой β-лактамази от четирите молекулярни класове (Bush et al. 1995), в това число ESBLs и карбапенемази от класове A, B и D.

AmpC β-лактамаза

P. aeruginosa, по подобие на други Грам-отрицателни видове (*Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Citrobacter* и *Enterobacter* spp., или група “SPACE”), продуцира индуцибелна, хромозомно-кодирана AmpC β-лактамаза (цефалоспориназа), която принадлежи към молекулярен клас C по Ambler и функционална група 1 по Bush

(Bush et al. 1995). При нормални обстоятелства ензимът се експресира в ниски нива и води до устойчивост към аминопеницилини и цефалоспорини от първа и втора генерация (Juan et al. 2017b). Приложението на някои антибиотици-индуктори (ceftazidime, imipenem, ticarcillin-clavulanate) може да доведе до индуциране и стабилна дерепресия на ензима, което детерминира високо ниво на резистентност към антипсевдомонадните цефалоспорини, но не засяга карбапенемите (Bagge et al. 2002).

Няколко гена участват в регулиране на *ampC* експресията: *ampR, ampG*, *ampD* и *ampE* (Torrens et al. 2019). Генът *ampR* кодира положителен транскрипционен регулатор, който е необходим за индукцията на AmpC β-лактамазата. Вторият ген, *ampG*, кодира трансмембранен протеин, който действа като пермеаза за 1,6-анхидромурапептиди, които се считат за сигналните молекули, участващи в индукцията на *ampC*. Генът *ampD* е отговорен за синтеза на цитозолна N-ацетил-анхидромурамил-L-аланин амидаза, която хидролизира 1,6-анхидромурапептидите, действайки като репресор на експресията на *ampC*. От своя страна *ampE* кодира протеин в цитоплазмената мембрана, който действа като сензорен преобразувател, необходим за индукцията на AmpC. Мутациите със загуба на функция в *ampD* гена водят до хиперпродукция на хромозомната цефалоспориназа на *P. aeruginosa* (Torrens et al. 2019). Активността на AmpC не се инхибира от използваните в клиничната практика β-лактамазни инхибитори: clavulanic acid, sulbactam и tazobactam (Strateva and Yordanov 2009).

Бета-лактамази от клас А

Carbenicillin-хидролизиращи β-лактамази

В *P. aeruginosa* са идентифицирани няколко carbenicillin-хидролизиращи β-лактамази от т. нар. *Pseudomonas* specific enzyme (PSE) тип: **PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 и CARB-4** (Bert et al. 2002). Техният субстратен профил включва карбоксипеницилини, уреидопеницилини и cefsulodine. Отнасят се към β-лактамазите от молекулярен клас А и функционална група 2c (Bush et al. 1995). PSE-1, PSE-4 и CARB-3 са тясно свързани (различават се само с 1 или 2 аминокиселини), но са само 86.3% хомоложни с CARB-4. Счита се, че $bla_{\text{CARB-4}}$ е придобит от други бактериални видове, тъй като G+C mol% в този ген е 39.1%, за разлика от G+C mol% на типичните за *P. aeruginosa* гени (около 67%) (Sanschagrin et al. 1998). Продуцентите на карбеницилинази демонстрират вариабилна чувствителност към cefepime, cefpirome и aztreonam, и абсолютна чувствителност към ceftazidime и карбапенеми (Strateva and Yordanov 2009).

Широкоспектърни и карбапенем-хидролизиращи β-лактамази

За разлика от PSE ензимите, серин-съдържащите ESBLs от молекулярен клас A и функционална група 2b' (Bush et al. 1995) водят до развитие на резистентност не само към карбоксипеницилини и уреидопеницилини, но и към широкоспектърни цефалоспорини (ceftazidime, cefepime, cefpirome) и aztreonam. Те не проявяват афинитет към карбапенеми, а активността им се потиска от clavulanic acid и tazobactam (Philippon et al. 2016). Откритията на ESBLs в *P. aeruginosa* започват през 90-те години на миналия век, когато са идентифицирани различни варианти на типичните за *Enterobacterales* SHV (Sulfhydryl reagent variable) и TEM (Temoniera) ензими от функционална група 2b (Bush et al. 1995; Bush and Jacoby 2010) с хромозомна или плазмидна локализация на кодиращите гени (Strateva and Yordanov 2009). Най-широко разпространение сред клиничните изолати *P. aeruginosa* показват ESBLs от клас A и функционална група 2be (Bush and Jacoby 2010), както следва: PER (*Pseudomonas* extended resistant), VEB (Vietnamese extended-spectrum β-lactamase), GES (Guiana extended spectrum) и BEL (Belgium extended-spectrum β-lactamase) тип ензими (Strateva and Yordanov 2009; Philippon et al. 2016).

PER-1 е първата идентифицирана и напълно охарактеризирана ESBL в *P. aeruginosa*. Открита е през 1991 г. във Франция в клиничен изолат от урокултура на турски гражданин (Nordmann and Naas 1994). Доказаният ензим е хромозомно-кодиран, а по-късно са докладвани и плазмид-медиирани PER-1 ESBLs (Nordmann and Guibert 1998). Следват съобщения, отчитащи широко разпространение на $bla_{\text{PER-1}}$ сред нозокомиалните изолати *P. aeruginosa* в Турция (Vahaboglu et al. 2001; Kolayli et al. 2005). Клинични изолати *P. aeruginosa* – продуценти на PER-1, са идентифицирани също в Италия, Белгия, Полша, Испания, Унгария, Сърбия, България, Тунис, Иран, Япония, Китай и др. (Claeys et al. 2000; Pagani et al. 2004; Empel et al. 2007; Libisch et al. 2008; Akhi et al. 2012; Potron et al. 2015; Stoikov et al. 2023). Субстратният профил на PER-1 е типичният за класическите ESBLs. Потиска се умерено от β-лактамазни инхибитори и imipenem (Weldhagen et al. 2003).

Първото идентифициране на **VEB-1** ESBL е през 1998 г. във Франция (Naas et al. 1999). Кодиращият ген на ензима е локализиран в In*50* интегрон от клас 1. По-късно Girlich et al. откриват висока честота на разпространение на $bla_{\text{VEB-like}}$ гени (93%) в ceftazidime-резистентни клинични изолати *P. aeruginosa* в Университетска болница в Тайланд (Girlich et al. 2002). В хода на това проучване е идентифициран нов $bla_{\text{VEB-2}}$ ген, детерминиращ продукцията на **VEB-2**, който се отличава от VEB-1 само по един аминокиселинен остатък извън активния център на ензима. В България е докладвано широко разпространение на VEB-1-продуциращи нозокомиални изолати *P. aeruginosa* в периода 2001–2006 г. (Strateva et al. 2007a, b). **VEB-3** вариант е открит при MDR-PA, изолирани през 2004 г. в Китай (Jiang

et al. 2006). В последната декада са идентифицирани **VEB-9** (старо название **VEB-1a**) продуценти в Тайланд, Полша и Катар (Lahiri and Alm 2016; Laudy et al. 2017; Sid Ahmed et al. 2020, 2022); **VEB-13** и **VEB-14** в Индия; и **VEB-16** (старо название **VEB-1b**) в Тайланд (Lahiri and Alm 2016).

GES ензимите са други ESBLs от клас A и функционална група 2be, открити в клинични изолати *P. aeruginosa* по целия свят (Potron et al. 2015). Първите идентифицирани варианти, **GES-1** и **GES-2**, са докладвани във Франция, Бразилия и Южна Африка (Dubois et al. 2002; Poirel et al. 2002; Castanheira et al. 2004a). GES-1 има необичайно ниско ниво на каталитична активност, нисък афинитет към повечето субстрати и необичаен профил на инхибиране, който включва clavulanic acid и imipenem. За разлика от повечето ESBLs GES-1 демонстрира силен афинитет към второгенерационния cefoxitin (Strateva and Yordanov 2009). GES-2 се отличава по една точкова мутация от GES-1 и за разлика от нея проявява и карбапенемазна активност (100 пъти по-висока каталитична активност спрямо imipenem) (Weldhagen and Prinsloo 2004). Последователно са открити различни варианти на GES ESBLs от клас A, предимно с плазмидна локализация на кодиращите гени (Strateva and Yordanov 2009; Potron et al. 2015), като някои от тях **(GES-4, GES-5, GES-6, GES-16, GES-18** и **GES-24)** притежават карбапенемазна активност (Potron et al. 2015; Hong et al. 2020). GES-5 е най-често откриваната карбапенемаза от клас A, продуцирана едновременно с MBLs от клас B, сред съвременните CRPA на Балканите (в Турция, България и Сърбия) (Malkoçoğlu et al. 2017; Kostyanev et al. 2020; Kabic et al. 2023).

BEL-1 ESBL е открита в белгийски изолат *P. aeruginosa* от пациент с дисекираща аневризма на реналната артерия, усложнена впоследствие с бъбречна недостатъчност (Poirel et al. 2005a). Нейният хидролитичен профил засяга широкоспектърните цефалоспорини и aztreonam, а активността й се потиска от clavulanic acid, tazobactam, cefoxitin, moxalactam и imipenem. BEL-1 β-лактамазата е слабо свързана с останалите типове ESBLs от молекулярен клас A – напр. показва съответно 5% и 43% аминокиселинна идентичност с плазмидно-медиираните GES-1 и CTX-M-8. Авторите установяват, че *bla*$_{\text{BEL-1}}$ е част от генна касета в In*120* интегрон от клас 1, локализиран в хромозомен транспозон, който съдържа три други генни касети. **BEL-2** и **BEL-3** ензими (с увеличена хидролитична активност спрямо широкоспектърните цефалоспорини) са идентифицирани по-късно в клинични изолати *P. aeruginosa*, съответно в Белгия и Испания (Potron et al. 2015).

През 2008 г. в Пенсилвания, САЩ е открит клиничен изолат *P. aeuginosa*, продуциращ нова ESBL от клас A, означена като **PME-1** (*Pseudomonas aeruginosa* ESBL 1)

(Tian et al. 2011). Ензимът притежава едва 43% аминокиселинна идентичност с най-близката ESBL – CTX-M-9. PME-1 осигурява високо ниво на резистентност към пеницилини, ceftazidime и aztreonam и в по-малка степен към cefotaxime, но не хидролизира cefepime и карбапенеми. Доказана е плазмидна локализация на *bla*$_{PME-1}$ (9-kb плазмид), двустранно ограден от две идентични копия IS*CR24*.

Макар и по-рядко от MBLs от клас B, участие в резистентността към карбапенеми имат и KPC карбапенемазите от клас A и функционална група 2be (Bush and Jacoby 2010). Първите документирани случаи са плазмид-медиирани **KPC-2** ензими, продуцирани от клинични изолати *P. aeruginosa* с високо ниво на устойчивост към карбапенеми (≥256 mg/L) от Колумбия през 2006 г. (Villegas et al. 2007). Следват открития както на плазмид-кодирани, така и на хромозомно-кодирани KPC-продуциращи изолати *P. aeruginosa* в Пуерто Рико (KPC-2 и **KPC-5**), Тринидад и Тобаго, САЩ, Китай (KPC-2 и **KPC-90**), Аржентина и Бразилия (Potron et al. 2015; Tu et al. 2022). Обикновено *bla*$_{KPC-2}$ се носят от плазмиди с различен размер, които са част от Tn*4401b* или Tn*4401* транспозони (Rada et al. 2021; Halat and Moubareck 2022).

Метало-β-лактамази от клас B

Металоензимите, съдържащи Zn^{2+} в активния си център, са най-разпространените карбапенемази сред клиничните изолати *P. aeruginosa* в глобален мащаб. Те могат да хидролизират всички β-лактами, освен монобактамите (aztreonam). Активността на MBLs от клас B не се потиска от clavulanic acid и tazobactam, но се инхибира от хелатори на двувалентни йони, като етилен диамин тетраоцетна киселина (EDTA) (Boyd et al. 2020). В *P. aeruginosa* са идентифицирани различни типове MBLs: IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), NDM (New Delhi MBL), SPM (São Paulo MBL), GIM (German Imipenemase), FIM (Florence Imipenemase) и SIM (Seoul Imipenemase) (Potron et al. 2015).

Първата MBL е идентифицирана в imipenem-резистентен щам *P. aeruginosa*, изолиран през 1988 г. в Япония. Означена е като **IMP-1** и е определена плазмидна локализация на кодиращия ген (Watanabe et al. 1991). Днес са известни около 100 варианта IMP ензими, като този тип MBLs заемат второ място по разпространение сред карбапенемазите в *P. aeruginosa* (Yoon and Jeong 2021). Наскоро IMP-положителни *P. aeruginosa* са установени и в България (**IMP-13** и **IMP-84**, чиито кодиращи гени са част от In*320* интегрон с хромозомна локализация; както и новата **IMP-100** MBL, чийто структурен ген е част от нов In*4886* интегрон с плазмидна локализация) (Stoikov et al. 2023).

Въпреки че VIM MBLs притежават <40% аминокиселинна идентичност с IMP-типа, те имат същия хидролитичен спектър (Potron et al. 2015). **VIM-1** е открита първоначално (1997 г.) в изолат *P. aeruginosa* във Верона, Италия (Lauretti et al. 1999). **VIM-2** е идентифицирана в изолат *P. aeruginosa* от хемокултура на пациент, лекуван с imipenem в Марсилия, Франция (Poirel et al. 2000). Кодиращите гени и на двата ензима са открити като части от генни касети в променливите региони на интегрони от клас 1. Има множество доклади за детекция на VIM-продуциращи изолати *P. aeruginosa* на Балканите (Peykov and Strateva 2023), което ги очертава като сериозна заплаха пред общественото здраве в този регион. В **Таблица 5.** са представени голяма част от MBLs, идентифицирани до момента в карбапенем-резистентни клинични изолати *P. aeruginosa* в световен мащаб.

Бета-лактамази от клас D

Бета-лактамазите от молекулярен клас D и функционална група 2d (Bush et al. 1995), наричани още оксацилинази (OXA), са хетерогенен клас ензими по отношение на структурните или биохимичните си свойства (Poirel et al. 2010). Хидролитичният спектър на всички OXA ензими включва amoxicillin и cephalothin, а тяхната активност не се потиска значимо от clavulanic acid. Някои от тях хидролизират широкоспектърни цефалоспорини и се означават като ES-OXA (extended-spectrum oxacillinases). ES-OXA са точкови мутанти, произхождащи от тясноспектърните β-лактамази. Освен това, карбапенемазна активност е присъща на много OXA ензими, съдържащи карбоксилиран лизинов остатък, които се означават като карбапенем-хидролизиращи β-лактамази от клас D (CHDLs) (Poirel et al. 2010).

Продуцираните от *P. aeruginosa* OXAs с тесен спектър (OXA-1, OXA-2 и OXA-10) определят резистентност към карбокси- и уреидопеницилини, но не и към ceftazidime (Strateva and Yordanov 2009). Идентифицирани са десетки ES-OXAs, които се отнасят към три групи: производни на OXA-1 (OXA-31), OXA-2 деривати (OXA-15, -32, -34, -36, -141 и -161) и OXA-10 деривати (OXA-11, -13, -14, -16, -17, -19, -28, -129, -142, -145, -147 и -183) (Potron et al. 2015). Други ES-OXAs имат ниска аминокиселинна идентичност с изброените ензими и активността им се инхибира от clavulanic acid (OXA-18 и OXA-45) (Potron et al. 2015). Само три придобити CHDLs (OXA-40, OXA-48 и OXA-198) са идентифицирани в карбапенем-резистентни *P. aeruginosa,* но те са с второстепенна роля в устойчивостта към тези антибиотици (Yoon and Jeong 2021). Наскоро в Турция са открити CRPA изолати от високорисковия ST235, резистентни и на colistin, които продуцират едновременно NDM-1 и OXA-48 (Vatansever et al. 2020).

Таблица 5. Метало-β-лактамази от клас B, идентифицирани в *P. aeruginosa*.

Ензим	**Локализация на кодиращия ген**	**Първоначално изолиране**		**Други географски региони**	**Литературен източник**
		Година	**Държава**		
IMP-тип	Интегрони в плазмид или хромозома				
IMP-1		1988	Япония	Южна Корея, Бразилия, Китай, Сингапур, Турция, Тайланд, Иран	(Watanabe et al. 1991)
IMP-4		2004	Австралия	Малайзия	(Peleg et al. 2004)
IMP-5		2001-2003	Португалия		(Brízio et al. 2006)
IMP-6		2004	Южна Корея	Китай	(Ryoo et al. 2009)
IMP-7		2000	Сингапур	Малайзия, Япония, Словакия, Чехия, Дания, Канада	(Koh et al. 2004)
IMP-9		2000	Китай		(Xiong et al. 2006)
IMP-10		Неизвестна	Япония	Китай	(Iyobe et al. 2002; Feng et al. 2022)
IMP-13		2001	Италия	Австрия, Франция, Белгия, Румъния, България, Аржентина	(Toleman et al. 2003; Santella et al. 2010; Stoikov et al. 2023)
IMP-14		2009	Тайланд		(Piyakul et al. 2012)
IMP-15		2004-2005	Мексико	Германия, Испания	(Quinones-Falconi et al. 2010)
IMP-16		2002	Бразилия		(Mendes et al. 2004)
IMP-18		Неизвестна	САЩ	Мексико, Пуерто Рико	(Hanson et al. 2006)
IMP-22		2007	Австрия	Италия	(Duljasz et al. 2009)
IMP-26		2008	Сингапур	Малайзия, Непал	(Koh et al. 2010; Takahashi et al. 2021)
IMP-29		2010	Франция	Испания	(Jeannot et al. 2012)
IMP-33		2009	Италия		(Deshpande et al. 2013)
IMP-43, IMP-44		2011	Япония		(Tada et al. 2013b)
IMP-48		2012-2014	Тайланд		(Kazmierczak et al. 2016)
IMP-100		2022	България		(Stoikov et al. 2023)

Таблица 5. Продължение

Ензим	Локализация на кодиращия ген	Първоначално изолиране		Други географски региони	Литературен източник
		Година	Държава		
VIM-тип	Интегрони в плазмид или хромозома				
VIM-1		1997	Италия	Франция, Гърция, Германия, Турция	(Lauretti et al. 1999; Malkoçoğlu et al. 2017)
VIM-2		1996	Франция	Италия, Гърция, Турция, Испания, Белгия, Германия, Унгария, Тунис, Полша, Нидерландия, Тайланд, Малайзия, Индия, САЩ, Мексико, Венецуела, Аржентина, Кения, Мароко и др.	(Poirel et al. 2000; Pappa et al. 2020; Pirzadian et al. 2021; Daaboul et al. 2024)
VIM-3		1999-2000	Тайван		(Yan et al. 2001)
VIM-4		2001	Гърция	Унгария, Полша, Швеция, Франция, България	(Pournaras et al. 2002; Stoikov et al. 2023)
VIM-5		2003	Турция	Индия	(Bahar et al. 2004)
VIM-6		2006	Индия	Индонезия, Филипини, Южна Корея	(Castanheira et al. 2009)
VIM-7		2001	САЩ	Бразилия	(Toleman et al. 2004; Balero de Paula et al. 2017)
VIM-8		1999-2003	Колумбия		(Crespo et al. 2004)
VIM-10		2004	Велико-британия		(Woodford et al. 2008)
VIM-11		2002	Аржентина	Италия, Индия	(Pasteran et al. 2005)
VIM-13		2004-2005	Испания		(Juan et al. 2008)
VIM-14		Неизвестна	Италия	Испания	(Mazzariol et al. 2011)
VIM-15		2006	България		(Schneider et al. 2008)
VIM-16		2005	Германия		(Schneider et al. 2008)
VIM-17		2004	Гърция		(Siarkou et al. 2009)
VIM-18		2006	Индия		(Castanheira et al. 2009)

Таблица 5. Продължение

Ензим	Локализация на кодиращия ген	Първоначално изолиране		Други географски региони	Литературен източник
		Година	Държава		
VIM-20		2008-2009	Испания		(Riera et al. 2011)
VIM-28		2009-2010	Египет		(El-Mahdy 2014)
VIM-36		2011	Белгия		(Castanheira et al. 2014)
VIM-37		2011	Полша		(Castanheira et al. 2014)
VIM-38		2013	Турция		(Iraz et al. 2014)
VIM-53		2018-2020	Швейцария		(Catho et al. 2021)
VIM-84, VIM-85		2018	Китай		(Wang et al. 2023a)
NDM-1	Хромозома, плазмиди, интегрони	2010	Сърбия	Индия, Франция, Египет, Словакия, Италия, Турция, България, Албания, Гърция, Испания, Мароко	(Jovcic et al. 2011; Vatansever et al. 2020; Tafaj et al. 2020; Kostyanev et al. 2020; Tsilipounidaki et al. 2023; Hernández-García et al. 2024; Daaboul et al. 2024)
SPM-1	Плазмид, ограден с два IS*CR4* елемента	1997	Бразилия	Швейцария	(Toleman et al. 2002)
GIM-1	Плазмиди, интегрони	2002	Германия		(Castanheira et al. 2004b)
FIM-1	Хромозома, асоцииран с IS*CR19*-like елементи	2007	Италия		(Pollini et al. 2013)
SIM-тип	Плазмиди				
SIM-1		2013-2014	Египет	САЩ	(Hashem et al. 2017; Prussing et al. 2021)
SIM-2		2012	Китай		(Sun et al. 2016b)

Забележка. Част от литературните източници, касаещи вторично доказани MBLs, са достъпни в обзорните статии: (Strateva and Yordanov 2009; Potron et al. 2015).

2.5.1.1.2. Резистентност към β-лактами, дължаща се на променен пермеабилитет на ВМ

Всякакви промени в структурата на ВМ на клетъчната стена, която има ниска пропускливост при *P. aeruginosa*, неизбежно влияят върху неговата чувствителност към

антибиотици (Hassuna et al. 2020; Behzadi et al. 2021). Пориите на *P. aeruginosa* (β-барел нагъващи се протеини във ВМ) се класифицират на неспецифични (OprF), специфични (OprB, OprD или D2 порин, OprE, OprO, OprP), затворени (OprC, OprH) и ефлукс (OprM, OprN, OprJ) порини (Chevalier et al. 2017). Бета-лактамите и флуорохинолоните навлизат в бактериалните клетки през гореспоменатите поринови канали, аминогликозидите се поемат чрез двуетапен процес, включващ наличието на кислород- или азот-зависими електронни транспортни вериги, докато colistin улеснява собственото си усвояване чрез взаимодействие с ЛПЗ (Chevalier et al. 2017; Hassuna et al. 2020; Mirzaei et al. 2020).

Много от imipenem-резистентните клинични изолати *P. aeruginosa* се характеризират с дефицит или липса на 54-kDa OprD порин (Fang et al. 2014; Nazari et al. 2023). Загубата или понижената експресия на OprD във ВМ е най-често срещаният механизъм на резистентност към imipenem, който също е отговорен за ниската степен на резистентност към meropenem (Pai et al. 2001). Появата на OprD-мутантни щамове *P. aeruginosa* е резултат от точкови мутации, делеции или инсерции в *oprD* гена (Al-Bayssari et al. 2015). Загубата на OprD определя резистентност към карбапенеми само в случаи на експресирана хромозомна AmpC β-лактамаза, което подчертава тясното сътрудничество между тези два механизма (Livermore 1992).

2.5.1.1.3. Резистентност към β-лактами, медиирана от активен ефлукс

Активният ефлукс е важен неензимен механизъм на резистентност към β-лактами при *P. aeruginosa*. Обикновено ефлуксът допринася за развитието на MDR към всички стратегически антипсевдомонадни антибиотици и се медиира от четири генетично различни трикомпонентни ефлуксни системи, които принадлежат към RND (resistance-nodulation-division) семейството: MexA–MexB–OprM, MexC–MexD–OprJ, MexE–MexF–OprN и MexX–MexY–OprM (Sun et al. 2014; Glen and Lamont 2021). Структурата и субстратната специфичност на тези трикомпонентни ефлукс системи са представени в **Таблица 6.**

MexA-MexB-OprM и MexX-MexY-OprM ефлукс системите участват едновременно във вродената и придобита резистентност на *P. aeruginosa* към АМЛС, докато MexC-MexD-OprJ и MexE-MexF-OprN имат отношение само към придобитата устойчивост (Llanes et al. 2004; Strateva and Yordanov 2009).

Таблица 6. Структура и субстратна специфичност на трикомпонентните активни ефлукс системи в *P. aeruginosa*.

Помпа в ЦПМ	Свързващ периплазмен липопротеин	Канал във ВМ	Субстрати
MexB	MexA	OprM	Хинолони, макролиди, тетрациклини, lincomycin, chloramphenicol, novobiocin, β-лактами (с изключение на imipenem)
MexD	MexC	OprJ	Хинолони, макролиди, тетрациклини, lincomycin, chloramphenicol, novobiocin, пеницилини (с изключение на carbenicillin и sulbenicillin), cefepime, cefpirome, meropenem
MexF	MexE	OprN	Флуорохинолони, imipenem
MexY	MexX	OprM	Хинолони, макролиди, тетрациклини, lincomycin, chloramphenicol, аминогликозиди, пеницилини (с изключение на carbenicillin и sulbenicillin), cefepime, cefpirome, ceftobiprole, meropenem

ВМ – външна мембрана, ЦПМ – цитоплазмена мембрана.

Свръхекспресия на MexA-MexB-OprM се наблюдава често в клиничните изолати *P. aeruginosa* и най-често се дължи на повишена транскрипция на *mexA-mexB-oprM* оперона поради *nalB* мутации в хромозомния ген, който кодира репресорния протеин MexR, т. е. мутации в *mexR* локуса (Tian et al. 2016; Moosavi et al. 2020). За *nalB* мутантите е характерно увеличаване на МПК и съответно наличие на клинична резистентност спрямо повечето β-лактами (пеницилини, цефалоспорини, монобактами, в известна степен meropenem, но не imipenem), хинолони, тетрациклини, chloramphenicol и trimethoprim. Те могат да се селекционират *in vitro* или по време на лечение с флуорохинолони, пеницилини или цефалоспорини (Strateva and Yordanov 2009). Съществуват и други мутанти, наречени *nalC*, които притежават интактни *mexR* гени (Llanes et al. 2004; Sadeghifard et al. 2012). Мутантните *nalC* щамове произхождат от wild-типа *P. aeruginosa* PAO1 и се характеризират с мутация в *PA3721* гена (Cao et al. 2004). Кодираният от този ген протеин е репресор на двугенен оперон (*PA3720* и *PA3719*) с неизяснена функция, но неговата свръхекспресия в *nalC* мутантите води до свръхекспресия и на MexA-MexB-OprM ефлукс системата. Открити са и *nalD* мутанти, при които е налице мутация в *PA3574* гена, също водеща до повишена експресия на MexA-MexB-OprM (Sobel et al. 2005).

Оперонът *mexC-mexD-oprJ* не се експресира конститутивно, но се свръхекспресира в *P. aeruginosa* мутанти, за които са характерни мутации в *nfxB* гена, кодиращ транскрипционния репресор на MexC-MexD-OprJ (Poole et al. 1996). Тази ефлукс система

извършва преимуществено изнасяне от бактериалната клетка на широкоспектърни цефеми (cefepime и cefpirome), а също така и на хинолони, макролиди, tetracycline и chloramphenicol (Li et al. 2000).

Оперонът *mexE-mexF-oprN*, който детерминира резистентност към хинолони, chloramphenicol и trimethoprim, е свръхекспресиран в т. нар. *nfxC* мутанти *P. aeruginosa* (с мутация в *mexT* локуса) (Köhler et al. 1999). *NfxC* мутантите проявяват и кръстосана резистентност спрямо карбапенемите (предимно imipenem), тъй като в тях е налице намалена експресия на OprD външномембранни протеини. За разлика от останалите ефлукс оперони *mexE-mexF-oprN* подлежи на положителна регулация от MexT протеина, който се отнася към LysR семейството на транскрипционните активатори (Köhler et al. 1999; Li et al. 2000).

Masuda et al. откриват, че MexX-MexY протеините изнасят от бактериалната клетка аминогликозиди, tetracycline и erythromycin при тясно взаимодействие със спонтанно експресираните OprM външномембранни протеини и по този начин участват във вродената резистентност на *P. aeruginosa* спрямо АМЛС (Masuda et al. 2000). По подобие на MexAB-OprM, MexXY протеините могат да бъдат конститутивно свръхпродуцирани поради възникващи мутации в репресорен ген *mexZ*, разположен в близост и независимо транскрибиран от *mexXY* оперона (Llanes et al. 2004). Мутантите на *P. aeruginosa* PAO1 с тази характеристика обикновено са 2- до 8-пъти по-устойчиви към аминоглигозиди и флуорохинолони от wild-типа (Guénard et al. 2014).

2.5.1.1.4. Резистентност към β-лактами, дължаща се на променена мишена

Специфичните модификации в PBPs могат да доведат до намалена чувствителност към β-лактами, въпреки че този механизъм е по-рядко срещан в сравнение с Грам-положителните бактерии. Промените в PBP1 обикновено засягат цефалоспорините, PBP2 е важен както за цефалоспорините, така и за карбапенемите, промените в PBP3 влияят на афинитета на свързване на imipenem, докато PBP4 е от значение за свързването на imipenem и meropenem (Behzadi et al. 2021). Съобщава се за променени PBP4 с нисък афинитет след лечение с imipenem, както и след прилагане на високи дози piperacillin при пациенти, страдащи от МВ (Strateva and Yordanov 2009).

2.5.1.2. Резистентност към аминогликозиди

Резистентността към аминогликозиди в *P. aeruginosa* е резултат от три различни механизма: продукция на аминогликозид-модифициращи ензими (AMEs), които отслабват

капацитета на свързване на аминогликозидите, промяна на мишената от 16S рРНК метилтрансферази и ограничено поглъщане на аминогликозиди поради загуба на външномембранна пропускливост или свръхактивност на ефлуксните помпи (Strateva and Yordanov 2009).

AMEs катализират модификация при -OH или -NH_2 групите, съдържащи се в 2-дезоксистрептамина или захарните части на антибиотичната молекула, и биват три класа: ацетилтрансферази (AACs), нуклеотидилтрансферази (ANTs), известни още и като аденилилтрансферази (AADs), и фосфотрансферази (APHs). Добавяйки ацетилов, аденилов или фосфатен радикал, те намаляват афинитета на свързване на модифицираните антибиотици към мишената в бактериалната клетка (Ramirez and Tolmasky 2010). Най-често *P. aeruginosa* експресира следните плазмид-кодирани AMEs: AAC(6')-II (определя резистентност към gentamicin, tobramycin и netilmicin), AAC(3)-I (gentamicin), AAC(3)-II (gentamicin, tobramycin и netilmicin), AAC(6')-I (tobramycin, netilmicin и amikacin) и ANT(2')-I (gentamicin и tobramycin) (Strateva and Yordanov 2009).

Метилирането на 16S рРНК е друг значим механизъм на резистентност към аминогликозиди, широко разпространен сред *Enterobacterales* и НФГБ, включително *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. (Doi and Arakawa 2007). Метилазите всъщност се намесват в свързването на антибиотиците към тяхното място на действие и осигуряват високо ниво на резистентност към трите клинично прилагани аминогликозида – amikacin, gentamicin и tobramycin. Първата 16S rRNA метилаза в *P. aeruginosa*, RmtA, е идентифицирана през 2003 г. в клиничен изолат от Япония (Yokoyama et al. 2003). Генът *rmtA* е разположен върху мобилни генетични елементи, като Tn*5041* транспозон (Yamane et al. 2004). RmtD метилаза е докладвана за първи път през 2007 г. в PDR клиничен изолат от Бразилия, копродуциращ и SPM-1 MBL (Doi et al. 2007). RmtD споделя 40% аминокиселинна идентичност с RmtA и генетичните структури, заобикалящи техните кодиращи гени, имат сходни характеристики. ArmA ензимът е идентифициран за първи път в клинични изолати *P. aeruginosa* от Южна Корея, част от които са продуцирали и карбапенемаза от клас B (IMP-1) (Gurung et al. 2010).

Активен ефлукс е сравнително рядък механизъм на умерена резистентност към аминогликозиди, асоцииран с MexXY протеините, които оперират съвместно с OprM (Vogne et al. 2004) и с някои други външномембранни протеини – OpmB, OpmG, OpmI (Jo et al. 2003), и образуват трикомпонентни ефлукс системи с широка субстратна специфичност (**Таблица 6**).

Ниският пермеабилитет на ВМ е описан като важен механизъм в резистентността към аминогликозиди при изолати от пациенти с МВ (MacLeod et al. 2000).

2.5.1.3. Резистентност към флуорохинолони

Основният механизъм на резистентност към флуорохинолони включва структурни промени в първичните и вторични таргетни ензими – съответно ДНК гираза (или топоизомераза II) и топоизомераза IV (Strateva and Yordanov 2009). При *P. aeruginosa* и *A. baumannii* една единствена мутация в QRDR (quinolone-resistant-determinative region) участъка на *gyrA*, кодиращ ДНК гираза, е достатъчна, за да предизвика високо ниво на резистентност към тези антибиотици. Това се дължи на факта, че тези видове естествено притежават намалена чувствителност към тях поради ниската външномембранна пропускливост и конститутивната експресия на ефлуксните помпи (Potron et al. 2015).

Регулацията на активните ефлукс системи в посока нагоре или надолу (според типа на регулатора – положителен или отрицателен) влияе върху активността на флуорохинолоните. При *P. aeruginosa* е доказано участието на MexAB–OprM RND-тип система, чиято експресия е конститутивна. Тя се асоциира с намалена чувствителност също към chloramphenicol, тетрациклини и β-лактами. По същия начин оперонът *mexCD–oprJ* придава способност за изнасяне на хинолони, пеницилини и тетрациклини. Това въздействие се наблюдава само когато отрицателният регулаторен протеин NfxB е променен, което показва, че конститутивната експресия на тази ефлуксна система не допринася за устойчивост към флуорохинолони. MexEF–OprN системата също не участва в намалената чувствителност, освен ако не е свръхекспресирана (Potron et al. 2015).

2.5.1.4. Резистентност към полимиксини

Colistin е последно средство на избор, животоспасяващ антибиотик за лечение на инфекции, причинени от XDR Грам-отрицателни бактерии, чиято употреба нарастна значително в последните години въпреки неговите странични ефекти и трудно дозиране (Olaitan et al. 2014). ЛПЗ във ВМ на Грам-отрицателните бактерии съдържа отрицателно зареден хидрофобен липид А, който може да взаимодейства с катионните липопептидни молекули на polymyxin B и polymyxin E (известен като colistin). Това взаимодействие води до дестабилизиране на ВМ, поглъщане на полимиксините в периплазмата и повишена пропускливост чрез нарушаване на целостта както на външната, така и на вътрешната мембрана. Хидрофобната опашка на полимиксините е от решаващо значение за индуциране на увреждане на ВМ, което предполага механизъм на действие, подобен на детергент (Moffatt et al. 2019).

В *P. aeruginosa* мутации в хромозомните гени *lpxC* и *lpxO2* водят до инактивиране на биосинтеза на липид А, загуба на ЛПЗ във ВМ и съответно загуба на мишената за действие на полимиксините (El-Sayed Ahmed et al. 2020). Резистентността към тези антибиотици се медиира от добавяне на 4-амино-4-деокси-L-арабиноза (L-Ara4N) към фосфатните групи в липид А на ЛПЗ чрез *arn* (*pmr*) оперона, който се свръхрегулира от PmrA/PmrB и PhoP/PhoQ двукомпонентни системи (two-component systems – TCSs) (Miller et al. 2011). Три други TCSs са замесени в резистентността към colistin при *P. aeruginosa*, а именно: ColR/ColS, ParR/ParS и CprRS (El-Sayed Ahmed et al. 2020). ColR/ColD TCS се свръхрегулира при излишък на извънклетъчен Zn^{2+}, което води до добавяне на фосфоетаноламин (PEA) към липид А с последваща резистентност към colistin (Kaye et al. 2016).

Различни проучвания съобщават, че мутациите в PmrB, PhoQ, ParR и ParS протеини в клинични изолати *P. aeruginosa* причиняват конститутивната свръхекспресия на модифицирания ЛПЗ оперон *pmrHFIJKLM* чрез активирането на един от компонентите на TCSs (PmrB, ParS, ParR) или инактивирането на сензорната киназа PhoQ, която действа като репресор на активността на PhoP, като по този начин позволява на PhoP да стимулира експресията на *pmrHFIJKLM* оперона, което води до добавяне на L-Ara4N към ЛПЗ и съответно различни степени на резистентност към colistin (Miller et al. 2011; El-Sayed Ahmed et al. 2020).

Освен описаните механизми, при намалени нива на Mg^{2+} външномембранният протеин OprH се свръхекспресира и свързва с отрицателно заредените фосфатни групи в ЛПЗ, като по този начин възпрепятства свързането на полимиксините (Mlynarcik and Kolar 2019; El-Sayed Ahmed et al. 2020). Също така дефицит на OprD може да повлияе върху резистентността към полимиксини на *P. aeruginosa* (Mlynarcik and Kolar 2019).

До 2010 г. като механизми на резистентност към colistin при *P. aeruginosa* са съобщавани единствено мутации в хромозомни гени (напр. *pmrAB* и *phoPQ*) с вертикален трансфер (Lin et al. 2019). През 2012 г. в САЩ е изолиран colistin-нечувствителен *P. aeruginosa* от ранев секрет, в който е идентифициран *mcr-5* ген. Доказана е локализацията му в хромозомен Tn*3*-like транспозон (Snesrud et al. 2018). Авторите подчертават, че транспозонът проявява тенденция да претърпява резолваза-медиирана рекомбинация с други Tn*3*-like транспозони, което осигурява по-голяма мобилност на *mcr-5*. През 2015 г. са открити colistin-резистентни щамове *P. aeruginosa* от ICU пациенти в Египет, в които са идентифицирани плазмид-медиирани, преносими детерминанти за устойчивост – *mcr-1* (mobile colistin resistance) (Abd El-Baky et al. 2020).

2.5.2. Механизми на резистентност при *A. baumannii*

Високата антибиотична резистентност на *A. baumannii* и появата на щамове, устойчиви на почти всички налични АМЛС, е доста тревожна (Lin and Lan 2014). Подобно на *P. aeruginosa*, *A. baumannii* притежава истински „арсенал“ от механизми на антибиотична резистентност, сред които водещите са: продукция на β-лактамази с карбапенемазна активност от различни молекулярни класове и AMEs, свръхекспресия на ефлукс помпи, пермеабилитетни дефекти и модификация на таргетните места. Натрупването на няколко механизма води до драстично намаляване броя на наличните антибиотични класове за лечение на инфекциите, причинени от *A. baumannii*, в клиничната практика.

Известните механизми на резистентност към АМЛС в *A. baumannii* са обобщени в **Таблица 7.**

2.5.2.1.Резистеност към карбапенеми

За чувствителни организми терапията от първа линия се състои от карбапенем, imipenem-cilastatin, meropenem или doripenem, като imipenem исторически се счита за „златен стандарт“ в лечението на VAP, причинена от *A. baumannii* (Garnacho-Montero et al. 2003; Asif et al. 2018). Независимо от това нивата на резистентност към карбапенеми за *A. baumannii* се покачват драстично в световен мащаб, което прави арсеналът от антибиотици по-ограничен и изборът се измества към алтернативни агенти (Wong et al. 2017).

Резистентността към карбапенеми не е резултат само от един механизъм, а от комбинация на различни механизми, класифицирани като ензимни и неензимни, най-важните от които включват хидролиза на антибиотиците от ензими, наречени карбапенемази.

2.5.2.1.1. Ензимни механизми на резистентност към карбапенеми

В *A. baumannii* са открити значителен брой β-лактамази (пеницилоил серин трансферази) от четирите молекулярни класове по класификацията на *Bush et al.* (Bush et al. 1995), в това число и карбапенем-хидролизиращи ензими (карбапенемази).

Таблица 7. Механизми на антибиотична резистентност в *A. baumannii* (Lee et al. 2017; Moubareck and Halat 2020).

Механизъм	**Клас/група**	**Протеин**	**Характеристика**
Бета-лактамази	**Клас А**	TEM-1	NSBL
		TEM-92	ESBL
		GES-5	GES-тип карбапенемаза
		GES-11	GES-тип карбапенемаза
		GES-12	GES-тип карбапенемаза
		GES-14	GES-тип карбапенемаза
		PER-1	ESBL
		PER-2	ESBL
		PER-7	ESBL
		CTX-M-2	ESBL
		CTX-M-15	ESBL
		SCO-1	NSBL
		VEB-1	ESBL
		KPC-2	Карбапенемаза
		KPC-3	Карбапенемаза
		KPC-4	Карбапенемаза
		KPC-10	Карбапенемаза
		CARB-4	NSBL
		CARB-10 (RTG-4)	ESBL
	Клас В (MBLs)	IMP-1	Карбапенемаза
		IMP-2	Карбапенемаза
		IMP-4	Карбапенемаза
		IMP-5	Карбапенемаза
		IMP-6	Карбапенемаза
		IMP-8	Карбапенемаза
		IMP-11	Карбапенемаза
		IMP-19	Карбапенемаза
		IMP-24	Карбапенемаза
		IMP-55	Карбапенемаза
		VIM-1	Карбапенемаза
		VIM-2	Карбапенемаза
		VIM-3	Карбапенемаза
		VIM-4	Карбапенемаза
		VIM-11	Карбапенемаза
		NDM-1	Карбапенемаза
		NDM-2	Карбапенемаза
		NDM-3	Карбапенемаза
		GIM-like	Карбапенемаза
		SIM-1	Карбапенемаза
		SPM-1	Карбапенемаза
	Клас С	AmpC: AmpC-69, AmpC-70, AmpC-71, десетки ADC варианти: 11, 25, 26, 30, 33, 52, 56, 73, 74, 76, 79 и др.	Вродена цефалоспориназа; високо ниво на резистентност към CAZ при наличие на IS*Aba1*-like

Таблица 7. Продължение

Механизъм	Клас/група	Протеин	Характеристика
Бета-лактамази	**Клас D**		
	OXA-2 група	OXA-21	OXA-тип ESBL
	OXA-10 група	OXA-128	OXA-тип ESBL
	OXA-20 група	OXA-37	OXA-тип ESBL
	OXA-23 група	OXA-23	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-27	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-49	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-133	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-239	OXA-тип карбапенемаза
	OXA-24/40 група	OXA-24	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-25, -26	OXA-тип карбапенемази
		OXA-40	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-72	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-143	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-182	OXA-тип карбапенемаза
	OXA-51 група	OXA-51	Хромозомни ензими (**OXA-51 и деривати**), естествено съдържащи се във всички щамове; карбапенемазна активност при вмъкване на IS*Aba1* в началото на промоторната област
		OXA: 64, 65, 66, 68, 70, 71	
		OXA: 69, 75, 76, 77	
		OXA: 79, 80, 104, 106, 112	
		OXA: 82, 83, 84	
		OXA: 86, 87	
		OXA: 88, 91, 93, 94, 95, 96	
		OXA-92	
		OXA-113	
	OXA-58 група	OXA-58	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-96	OXA-тип карбапенемаза
		OXA-97	OXA-тип карбапенемаза
	OXA-143 група	OXA: 143, 231, 253	OXA-тип карбапенемази
	OXA-235 група	OXA: 235, 236, 237	OXA-тип карбапенемази
Ефлукс помпи	RND суперсемейство	AdeABC	Резистентност (R) към аминогликозиди и намалена чувствителност към tigecycline
		AdeFGH	R към tigecycline
		AdeIJK	R към tigecycline
	MFS суперсемейство	TetA	R към TET
		TetB	R към TET и minocycline
		CmlA	R към CHL
		CraA	R към CHL
		AmvA	R към erythromycin, дезинфектанти, детергенти и бои
		AbaF	R към fosfomycin
	MATE семейство	AbeM	R към IMP и FQu
	SMR семейство	AbeS	R към CHL
	Други ефлукс помпи	EmrAB-TolC	R към NET, TOB, CAZ, IMP
		A1S_1535, ABAYE_0913	R към GEN, KAN, CHL R към CHL и fusidic acid

Таблица 7. Продължение

Механизъм	Клас/група	Протеин	Характеристика
Пермеабилитет-ни дефекти	Порини	OmpA CarO	Фактор на вирулентност, MDR R към карбапенеми
		Omp22-33	R към карбапенеми
		Omp33-36	R към карбапенеми
		Omp37	R към карбапенеми
		Omp43	R към карбапенеми
		Omp44	R към карбапенеми
		Omp47	R към карбапенеми
Аминогликозид-модифициращи ензими	Аминогликозид ацетилтрансферази	AAC(3)	R към аминогликозиди (GEN)
		AAC(6′)	R към аминогликозиди (TOB, NET)
	Аминогликозид нуклеотидил-трансферази	ANT(2″)-Ia	R към аминогликозиди (GEN, TOB, KAN и др.)
		ANT(3″)-I	R към аминогликозиди (STR, SPE)
	Аминогликозид фосфотрансферази	APH(3′)-VI	R към аминогликозиди (AMK)
		APH(3″)-Ib	R към аминогликозиди (STR)
Модификация на таргетното място	Промяна на PBPs	PBP2	R към IMP
	Метилиране на 16S рРНК	ArmA, RmtA–E	Високо ниво на резистентност към аминогликозиди
	Рибозомна протекция	TetM	R към TET
	Промяна на ДНК гираза и топоизомераза IV	GyrA/ParC	Мутации в *gyrA*/*parC*; R към флуорохинолони
	Дихидрофолат редуктаза	DHFR	R към trimethoprim
		FolA	R към trimethoprim
	Модификация на ЛПЗ чрез PetN трансфераза	PmrC, MCR-1, MCR-4	R към colistin
	Липса на биосинтез на липид А	LpxA, LpxC, LpxD	R към colistin
	Намалена стабилност на ВМ	LpsB, LptD и VacJ	R към colistin
	Намален синтез на биотин	LpsB	R към colistin

ВМ – външна мембрана, ЛПЗ – липополизахарид, R – резистентност, NSBL – тясноспектърна β-лактамаза, ESBL – широкоспектърна β-лактамаза, RND – Resistance-nodulation-division, MFS – Major facilitator superfamily, MATE – Multidrug and toxic compound extrusion, SMR – Small multidrug resistance, TET – tetracycline, IMP – imipenem,, NET – netilmicin, TOB – tobramycin, GEN – gentamicin, AMK – amikacin, ISP – isepamicin, KAN – kanamycin, STR- streptomycin, SPE – spectinomycin, CHL – chloramphenicol, MDR – множествена лекарствена резистентност, PBPs – пеницилин-свързващи протеини.

Карбапенемази от молекулярен клас A

Карбапенемазите от клас A (SME, NMC, IMI, KPC и GES-типове), съдържащи серин в активния център и инхибиращи се от клавуланова киселина, са широко разпространени сред представителите на разред *Enterobacterales*, но варианти на KPC-like и GES-like ензимите са установени и сред карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii*.

KPC-2, KPC-3, KPC-4 и KPC-10 варианти на KPC-like карбапенемаза са първоначално идентифицирани в клинични изолати *A. baumannii*, събрани през 2009 г. от различни болници в Пуерто Рико (Robledo et al. 2010). По-късно KPC-продуциращи *A. baumannii* са изолирани в Бразилия и Португалия (Ribeiro et al. 2016; Caneiras et al. 2018).

През 2011 г. Bonnin et al. докладват щам *A. baumannii* от бронхиален лаваж на пациент, хоспитализиран в Париж, Франция. Изолатът е резистентен на всички β-лактами, вкл. aztreonam и карбапенеми, и е доказан като продуцент на GES-14 ESBL (Bonnin et al. 2011a). Този ензим се отличава от GES-1 по две замени (Gly170Ser и Gly243Ala). Карбапенемазната активност на GES-14 е потвърдена с кинетични проучвания. Доказана е и локализацията на кодиращия ген ($bla_{\text{GES-14}}$) – върху интегрон от клас 1, който е част от 95-kb плазмид. Следват открития на различни варианти GES карбапенемази в изолати *A. baumannii* в Белгия, Турция, Кувейт и Либия (Lin and Lan 2014; Hammoudi et al. 2015).

Карбапенемази от молекулярен клас B

Въпреки че MBLs не са най-разпространените карбапенемази сред *A. baumannii*, е доказана продукция на някои от основните типове: VIM, IMP, SIM (Seoul Imipenemase), NDM и SPM. Както и при други Грам-отрицателни бактерии, MBLs водят до високо ниво на резистентност към карбапенеми на *A. baumannii*. Първият VIM ензим (VIM-2) е описан от Yum et al. през 2002 г. (Yum et al. 2002). Следват открития и на други VIM варианти, като VIM-1 и VIM-4 в Гърция, VIM-2 в Иран, VIM-3 и VIM-11 в Тайван (Papa et al. 2009; Lin and Lan 2014). Досега са идентифицирани десет варианта IMP MBLs в клинични изолати *A. baumannii* от целия свят: IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8, IMP-11, IMP-19, IMP-24 (Lin and Lan 2014) и IMP-55 (Shakibaie et al. 2017). SIM-продуциращи изолати *A. baumannii* са открити в Южна Корея и Иран. В Иран са идентифицирани и единични SPM-положителни изолати (Lee et al. 2005; Gholami et al. 2018). Докладвани са следните NDM-тип MBLs: NDM-1 сред изолати *A. baumannii* в Китай, Германия, Швейцария, Словения, Франция и Тунис (Chen et al. 2011b; Pfeifer et al. 2011; Bonnin et al. 2012; Raddaoui et al. 2024b), NDM-2 – в Израел (Espinal et al. 2011), и NDM-3 – в Индия (Kumar 2016). В един от клиничните изолати, от Германия, генът $bla_{\text{NDM-1}}$ е интегриран в хромозомата и е част от

нова транспозонна структура, съдържаща две копия на инсерционната последователност IS*Aba125* (Pfeifer et al. 2011). Тази вариабилност на генетичното обкръжение на bla_{NDM-1} е предпоставка за неговото лесно и бързо разпространение. Наскоро са докладвани и GIM-like металоензими при CRAB, изолирани от пациенти с тежки инфекции на уринарния тракт в Индия (Girija et al. 2018).

Карбапенемази от молекулярен клас D

Досега са идентифицирани над 400 оксацилинази (OXA ензими) в различни бактерии и много от тях притежават карбапенем-хидролизираща активност (Walther-Rasmussen and Høiby 2006; Lee et al. 2017). Кодиращите bla_{OXA} гени могат да бъдат разположени върху хромозомата, върху плазмид, а понякога са част от интегрони. Карбапенем-хидролизиращите β-лактамази от клас D (CHDLs), известни още като OXA-тип карбапенемази (OTCs), са основната причина за резистентност към карбапенеми при *A. baumannii* и придобиването на съответните им гени често се медиира от фланкиращи IS елементи (Nguyen and Joshi 2021). Тези ензими притежават между 243 и 260 аминокиселинни остатъка, молекулна маса от 23 до 35.5 kDa и изоелектрични точки (pI) от 5.1 до 9.0 (Walther-Rasmussen and Høiby 2006).

Първата CHDL, установена в *A. baumannii*, е открита в щам, изолиран през 1985 г. в шотландска болница, и е наименована ARI-1 (***A**cinetobacter* **R**esistant to **I**mipenem) (Paton et al. 1993). По-късно е означена като OXA-23 (Donald et al. 2000).

Най-голямата група е тази на **OXA-51/69-like ензимите**. Тези β-лактамази са вродени хромозомни ензими в *A. baumannii*, притежаващи свойства и на карбапенемази (Poirel et al. 2010). Гените, кодиращи тези естествено съдържащи се във всички щамове *A. baumannii* оксацилинази ($bla_{OXA-51-like}$), са локализирани в хромозомата, а тяхната експресия се регулира от IS*Aba1*. Вмъкването на IS*Aba1* в началото на промоторната област, непосредствено пред структурните гени, води до карбапенемазна активност на ензима, която е най-силно проявена спрямо imipenem (Turton et al. 2006; Wong et al. 2019). OXA-51/69 ензимите притежават слаба идентичност с другите известни оксацилинази. Идентифицирани са десетки варианта на OXA-51 в изолати с различен географски произход, различаващи се помежду си с по 1 до 15 аминокиселини (Lin MF and Lan CY 2014; Kyriakidis et al. 2021).

Група OXA-23-like е представена от следните варианти OTCs: OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-133 и OXA-239 (Gonzalez-Villoria et al. 2016; Lee et al. 2017; Kyriakidis et al. 2021). Генът bla_{OXA-23} е локализиран плазмидно или хромозомно и е широко разпространен

сред изолатите *A. baumannii* по целия свят (Mugnier et al. 2010). Свръхекспресията на OXA-23, медиирана от IS*Aba1*, разположена в промоторния регион, непосредствено преди структурния ген, е водеща причина за резистентност към карбапенеми при клиничните изолати *A. baumannii* (Wong et al. 2019). Държавите, от които са докладвани *A. baumannii*, продуциращи OXA-23 карбапенемаза, са: Франция (Naas et al. 2005), Германия (Kohlenberg et al. 2009), България (Stoeva et al. 2009), Румъния (Bonnin et al. 2011b), САЩ (Adams et al. 2008), Бразилия (Chagas et al. 2014), Австралия (Valenzuela et al. 2007), Тайван (Lin et al. 2011c), Китай (Li et al. 2015a), Корея (Lee et al. 2011), Италия (Principe et al. 2014), Испания (Mosqueda et al. 2013) и др. OXA-27 е идентифицирана първоначално в изолат *A. baumannii* от Сингапур и се различава от OXA-23 по две замени (Thr95Ala и Asn247Lys) (Afzal-Shah et al. 2001), а OXA-49, открита в изолат от Китай – по една замяна (Lys178Glu) и добавянето на остатък Ala в 222. позиция (Yu et al. 2004). Понастоящем OXA-23-like CHDLs са най-разпространените карбапенемази сред CRAB изолати в световен мащаб (Kostyanev et al. 2021; Müller et al. 2023).

Група OXA-24/40-like включва следните OTCs: OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 (първоначално определена като OXA-24) и OXA-72 (Poirel et al. 2010). Тези ензими се различават помежду си само по няколко замени на аминокиселини. OXA-24 първоначално е идентифицирана като хромозомно-кодирана β-лактамаза в CRAB изолат от Испания (Bou et al. 2000). OXA-25, OXA-26 и OXA-27 са открити и охарактеризирани по-късно в клинични изолати от Испания, Белгия и Сингапур (Afzal-Shah et al. 2001), но OXA-27 е отнесена към филогенетичната група OXA-23-like. Гени $bla_{\text{OXA-24/40}}$ са установени сред клинични CRAB изолати от Испания (Héritier et al. 2003), Португалия (Quinteira et al. 2007), САЩ (Lolans et al. 2006), Румъния (Yusuf et al. 2022) и др. Плазмид-медиирани OXA-24-продуциращи изолати са открити при вътреболничен взрив в Испания (Merino et al. 2010). OXA-72 OTCs са докладвани в Тайван, Китай, Бразилия, САЩ, Франция, Хърватия, Сърбия, България и др. (Lin MF and Lan CY 2014; Dortet et al. 2016; Strateva et al. 2019).

Карбапенемазата **OXA-58** е идентифицирана за първи път през 2003 г. в MDR-AB изолат във Франция (Poirel et al. 2005b). Установена е плазмидна локализация на кодиращия ген. В следващото десетилетие много OXA-58-продуциращи изолати *A. baumannii* са докладвани по целия свят – в Европа (Marqué et al. 2005), Аржентина, Кувейт (Coelho et al. 2006), Тайван (Chen et al. 2008), САЩ (Castanheira et al. 2008), Китай (Fu et al. 2014), Бразилия (Matos et al. 2019) и др. Също така са отчетени и много вътреболнични взривове, причинени от OXA-58-продуциращи *A. baumannii*, напр. в Италия (Bertini et al. 2006; Giordano et al. 2007), Белгия (Bogaerts et al. 2006), Франция (Héritier et al. 2005a),

Гърция (Pournaras et al. 2006), Турция (Kulah et al. 2010), Испания (Cabrera Alvargonzalez et al. 2014) и др. OXA-58 ОТС може да доведе до "high-level" резистентност към карбапенеми посредством IS*1008*, вмъкната непосредствено преди $bla_{\text{OXA-58}}$ (Chen et al. 2008) или при наличието на IS*Aba825*-IS*Aba3-like* хибриден промотор (Ravasi et al. 2011). **OXA-97** е точково мутационен вариант на OXA-58 със същия хидролитичен спектър, който е доказан в CRAB изолати от Тунис (Poirel et al. 2008). Друг точково мутационен дериват на OXA-58 е **OXA-96**, открит в изолат *A. baumannii* от Сингапур (Lee et al. 2017).

През 2009 г. е докладвана нова ОТС, **OXA-143**, която е установена в CRAB изолат от Бразилия. OXA-143 показва 88% аминокиселинна идентичност с OXA-40, 63% с OXA-23 и 52% с OXA-58 (Higgins et al. 2009). В периода 2010–2014 г., също в Бразилия, са изолирани CRAB, които продуцират нов ензим – **OXA-253**, идентифициран като вариант на OXA-143 CHDL. Авторите доказват плазмидна локализация на $bla_{\text{OXA-253}}$ (De Sá Cavalcanti et al. 2017).

OXA-235 и нейните деривати (**OXA-236** и **OXA-237**) са последните идентифицирани ОТСs при CRAB от САЩ и Мексико (Higgins et al. 2013). Тези карбапенемази притежават 85% аминокиселинна идентичност с OXA-134, 54-57% идентичност с придобитите OXA-23, OXA-24, OXA-58 и OXA-143, и 56% идентичност с вродената OXA-51. По тази причина OXA-235, OXA-236 и OXA-237 са обособени в нов подклас ОТСs. Експресията на OXA-235 в *A. baumannii* намалява чувствителността към карбапенеми, докато МПК на широкоспектърните цефалоспорини остават незасегнати.

2.5.2.1.2. Резистентност към карбапенеми, дължаща се на променен пермеабилитет на ВМ

A. baumanni притежава няколко OMPs (порини), които играят роля в развитието на резистентност към карбапенеми (Vila et al. 2007). През 2002 г. Limansky et al. идентифицират imipenem-резистентни клинични изолати *A. baumannii*, при които не се доказва продукция на карбапенемази от нито един молекулярен клас, но е установен дефицит на един 29-kDa OMP (Limansky et al. 2002). По-късно Mussi et al. също откриват MDR-AB изолати, чиято устойчивост към imipenem се дължи на загуба на OMP с големина 29 kDa, който е означен като **CarO** (Mussi et al. 2005). При клониране и охарактеризиране на хромозомния локус, съдържащ *carO* гена, в клинични изолати *A. baumannii* е установено само едно копие на гена в една транскрипционална единица от генома. Ген *carO* кодира полипептид, изграден от 247 аминокиселинни остатъка, с типична N-терминална сигнална последователност и предсказуема трансмембранна топология на β-барели. Изследванията

върху щамове с високи МПК на imipenem (над 16 mg/L) идентифицират разцепвания на *carO* поради вмъкване на различни инсерционни елементи, което довежда до загуба на експресията на протеина (Mussi et al. 2005, 2007). Променената експресия на CarO OMP намалява проникването на imipenem в клетката и води до резистентност към антибиотика. Устойчивостта към meropenem не се свързва с CarO, което се доказва с липсата на meropenem-свързващо място в молекулата на протеина (Catel-Ferreira et al. 2011). Sen и Joshi доказват съвместно участие на дефицита на CarO OMP заедно с продукцията на вродените OXA-51-like и придобити оксацилинази от подгрупи OXA-23-like и OXA-24/40-like в развитието на резистентност към карбапенеми сред клинични изолати *A. baumannii* от САЩ (Sen and Joshi 2016).

Описаният в т. 2.3.2.1. **Omp33-36** също има значение в развитието на резистентност към карбапенеми (Tomás et al. 2005). Dupont et al. откриват в щамове *A. baumannii* 43-kDa протеин, хомоложен на OprD порина на *P. aeruginosa*, който има важна роля в развитието на резистентност към карбапенеми в този микроорганизъм (Dupont et al. 2005). Те установяват, че карбапенем-чувствителните *A. baumannii* естествено експресират **OprD-like** протеин и чувствителността им може да бъде променена при добавяне на основни аминокиселини. По-нови проучвания отхвърлят вероятната роля на OprD-like протеина в карбапенемната резистентност на *A. baumannii* и внушават идеята, че той действа като OprQ-like протеин, който е специфично свързващо място за Fe^{2+} и Mg^{2+} и помага на микроорганизма в условията на стрес (Catel-Ferreira et al. 2012). Srinivasan et al. изследват физиологичните функции на друг OMP, **AbuO**, и ролята му в MDR. AbuO участва в активния ефлукс на множество антибиотици, включително ceftriaxone и meropenem (Srinivasan et al. 2015a).

2.5.2.1.3. Роля на активния ефлукс за развитие на резистентност към карбапенеми и MDR

Активният ефлукс е друг неензимен механизъм на резистентност към β-лактами, който освен това допринася и за развитие на резистентност спрямо други АМЛС, стратегически за лечение на *A. baumannii* инфекции, и съответно за селекция на MDR изолати. В *A. baumannii* са открити и охарактеризирани три активни ефлукс системи с широка субстратна специфичност от **RND (resistance-nodulation-division) семейството**, отговорни за MDR: **AdeABC, AdeIJK** и **AdeFGH** (Coyne et al. 2011). Свръхекспресията на трикомпонентната AdeABC система се асоциира с резистентност към цефалоспорини и карбапенеми (Huang et al. 2008; Hawkey et al. 2018). Експресията ѝ се регулира от двукомпонентната регулаторна AdeRS система. Точкови мутации в *adeRS* оперона могат да

причинят свръхекспресия и съответно антибиотична резистентност (Marchand et al. 2004). Установено е участието и на други регулаторни гени, които при липса на мутации в *adeRS* могат да доведат до свърхекспресия на AdeABC и съответно да повлияят върху чувствителността на изолатите към карбапенеми (Hornsey et al. 2010). AdeIJK ефлукс системата също може да допринасе за резистентността към цефалоспорини и imipenem (Hou et al. 2012; Yoon et al. 2015).

AbeM е член на т. нар. **MATE** (**M**ultidrug **a**nd **T**oxic compound **E**xtrusion) семейство и детерминира устойчивост на клиничните изолати *A. baumannii* към imipenem и флуорохинолони (Su et al. 2005).

2.5.2.1.4. Резистентност към карбапенеми, дължаща се на променена мишена

Промяната на PBPs като възможен механизъм за възникване на резистентност към карбапенеми в *A. baumannii* е по-слабо проучена. През 90-те години Gehrlein et al. изследват карбапенем-чувствителен изолат *A. baumannii* и *in vitro* получен резистентен мутант (Gehrlein et al. 1991). Те установяват, че резистентният мутант се характеризира с хиперпродукция на един 24-kDa PBP и слаба продукция на други шест PBPs. Авторите на по-ново проучване охарактеризират дванадесет PBPs в колекция от изолати *A. baumannii* с вариабилни профили на резистентност към β-лактами. В изолатите с МПК на imipenem >4 mg/L те доказват намалена експресия на 73-kDa PBP2 и приемат, че промяната в мишената се свързва и с намалена чувствителност към карбапенеми (Fernández-Cuenca et al. 2003). PBP3 мутантни щамове *A. baumannii* са свързани с резистентност към meropenem, sulbactam и новия цефалоспорин cefiderocol (Hawkey et al. 2018).

2.5.2.2. Резистентност към аминогликозиди

Резистентността към аминогликозиди в *A. baumannii* се медиира от същите ензимни и неензимни механизми, описани при *P. aeruginosa*. Най-честият от тях включва модификация на амино или хидроксилна група чрез AMEs (Asif et al. 2018). При *A. baumannii* са идентифицирани AMEs от трите типа: AACs, ANTs и APHs. Генетичните детерминанти за резистентност към аминогликозиди се разполагат предимно върху мобилни генетични елементи (плазмиди, транспозони, интегрони) и могат да се разпространяват чрез хоризонтален трансфер (конюгация, естествена трансформация или трансдукция) във възприемчиви бактериални популации, включително и междувидово (Garneau-Tsodikova and Labby 2016). По-рядко гените за AMEs са локализирани хромозомно (*aac(2')-Ib* и *aph(3'')-Ib*) или в хромозомни геномни острови (*aph(6)-Id*) (Ramirez and Tolmasky 2010).

Подобно на *P. aeruginosa*, и при *A. baumannii* се установява продукция на повече от един АМЕ, което рефлектира във високостепенна резистентност към няколко (а в някои случаи и към всички) клинично приложими антибиотици от този клас (Nie et al. 2014). Резистентността към amikacin се асоциира с APH(3')-VI (Gallego and Towner 2001). Докладвана е също ролята на *aac(6')-Iad* в развитието на резистентност към amikacin сред клинични изолати *Acinetobacter* spp. от Япония (Doi et al. 2004). Интегрони от клас 1, съдържащи генните касети *aacA4-catB8-aadA1, dhfrXII-orfF-aadA2* или *aacC1-orfP-orfP-orfQ-aadA1*, се асоциират с хоризонталния трансфер на разнообразни гени за резистентност към аминогликозиди сред клиничните изолати *A. baumannii* (Lin et al. 2010).

ArmA е най-честата 16S рРНК метилаза, откривана в *A. baumannii*. Тя детерминира високо ниво на резистентност към трите основни аминогликозида – amikacin, gentamicin и tobramycin (МПК >256 mg/L) и обикновено се доказва едновременно с OXA-тип карбапенемази, предимно OXA-23 (Nafplioti et al. 2020; Camargo et al. 2022; Findlay et al. 2023; Jun et al. 2023). Обичайно *armA* се носи от плазмид и се намира в транспозон Tn*1548* (Sheikhalizadeh et al. 2017). RmtA–E 16S рРНК метилази също са идентифицирани в клинични изолати *A. baumannii* с високо ниво на устойчивост към аминогликозиди (Tada et al. 2013a; Taylor et al. 2022).

Аминогликозидите са субстрати на някои ефлукс системи. Например gentamicin подлежи на активен ефлукс от AdeABC и AbeD, докато тези помпи са по-слабо ефективни в изнасянето от клетката на по-хидрофилните amikacin и kanamycin (Xu et al. 2019).

2.5.2.3. Резистентност към тетрациклини

Резистентността към тетрациклини се дължи на три основни механизма: (i) ATP-зависим ефлукс; (ii) инактивиране от ензими; и (iii) действие на рибозомни протективни протеини (RPPs) (Warburton et al. 2016). Два типа ефлуксни помпи, които изискват енергия, са отговорни за резистентността към тетрациклин при *A. baumannii*. RND помпите, предимно AdeABC, могат ефективно да елиминират тетрациклините, като същевременно медиират значително повишаване на МПК за tigecycline (глицилциклин), minocycline и tetracycline (Xu et al. 2019). RND помпа AdeIJK има второстепенна роля в резистентността към tetracycline, но може да действа синергично с други свръхекспресирани ефлуксни помпи (като AdeABC и AcrAB-TolC) и да доведе до резистентност към tigecycline (Yuhan et al. 2016). Втората категория ефлукс помпи със значение за резистентността към тетрациклини са от суперсемейството MFS (Major Facilitator Superfamily): TetA и TetB

(Huys et al. 2005). TetA обезпечава транспорта на tigecycline в периплазмата, а впоследствие RND помпите го изнасят през външната мембрана (Foong et al. 2020).

Няколко RPPs (TetM, TetW, TetO и TetS) премахват инхибиторния ефект на тетрациклините върху протеиновия синтез посредством нековалентна модификация на рибозомите (Dönhöfer et al. 2012). Макар и рядко резистентността към minocycline при *A. baumannii* се асоциира с рибозомната протекция и *tet(M)* гена. Неговият продукт медиира освобождаването на антибиотика от неговото рибозомно свързващо място чрез GTP-зависим механизъм, което позволява продължаване на транслацията въпреки наличието му в средата (Ribera et al. 2003).

Скорошни транскриптомни проучвания показват, че *A. baumannii* може бързо да придобие резистентност към tigecycline (Li et al. 2020b). Появата на плазмидно-медиирани *tet(X)* генни варианти допринася за бързото разпространение на tigecycline-резистентни клинични изолати *A. baumannii* в болничните отделения. Tet(X3), Tet(X4) и Tet(X5) са монооксигенази, които могат да инактивират всички тетрациклини, дори tigecycline и наскоро разрешените за клинична употреба eravacycline и omadacycline (He et al. 2019; Wang et al. 2020b).

2.5.2.4. Резистентност към флуорохинолони

Резистентността към хинолони възниква чрез три различни механизма: (i) хромозомни мутации, водещи до промяна в мишените (ДНК гираза и топоизомераза IV), които отслабват взаимодействията хинолон-ензим; (ii) плазмид-кодирана резистентност, медиирана от Qnr протеини и AMEs (AAC(6')-Ib-cr и AAC(6')-Ib-cr5); и (iii) хромозомно-медиирана резистентност, резултат от ниска експресия на порини или свръхекспресия на ефлуксни помпи (Kyriakidis et al. 2021).

Най-честият механизъм на резистентност към хинолони, както и при *P. aeruginosa*, се свързва в мутации в QRDR региона, водещи до промяна в GyrA субединицата на ДНК гиразата и ParC субединицата на топоизомераза IV (Zaki et al. 2018). Във флуорохинолон-резистентните изолати *A. baumannii* най-често докладваните точкови мутации са: Ser83Leu, Gly81Asp, Ser81Leu (в *gyrA*) и Ser80Leu, Glu84Lys, Gly78Cys, Ser84Leu (в *parC*). Обикновено единични точкови мутации в *gyrA* водят до резистентност към levofloxacin, единични мутации в *parC* – до устойчивост към ciprofloxacin, а няколко мутации в QRDR на *gyrA* и *parC* – до високо-ниво на резистентност към всички клинично прилагани флуорохинолони (Ardebili et al. 2015). Мутации в *gyrB* и *parE* имат незначително влияние върху чувствителността на *A. baumannii* към хинолони (Zaki et al. 2018).

Плазмид-медиираната резистентност (plasmid-mediated quinolone resistance – PMQR) като цяло води до ниско ниво на устойчивост към флуорохинолони (Aldred et al. 2014). Qnr гените *qnrAI* (първият идентифициран PMQR ген), *qnrB*, *qnrB19* и *qnrS* кодират членове на семейство протеини с пентапептидни повторения (хомоложни на McbG и MfpA протеини), които инхибират действието на гиразата чрез конкуренция с ДНК за свързване, водещо до намаляване на свързването на ДНК с топоизомераза и по този начин защита на комплексите ензим-ДНК от действието на хинолоните (Robicsek et al. 2006a; Xiong et al. 2011). Плазмид-кодираните AMEs AAC(6')-Ib-cr и AAC(6')-Ib-cr5 са мутантни варианти на AAC(6')-Ib (възникнали чрез W102R и D179Y мутации), които ацетилират C7 незаместения азот в пиперазиновия пръстен на norfloxacin и ciprofloxacin (Robicsek et al. 2006b).

Намалено вътреклетъчно акумулиране, дължащо се на намален инфлукс поради редуцирана експресия на съответните OMPs или на активен ефлукс при увеличена експресия на ефлукс помпи, изнасящи хинолони от бактериалната клетка, е също възможен механизъм на резистентност към този клас при *A. baumannii* (Ling et al. 2016; Lari et al. 2018).

2.5.2.5. Резистентност към диаминопиримидини – сулфонамиди

Антифолатните агенти упражняват своето действие чрез инхибиране на пуриновия метаболизъм и по този начин синтеза на ДНК и РНК. Trimethoprim е инхибитор на дихидрофолат редуктазата (DHFR) (блокира образуването на тетрахидрофолиева киселина от дихидрофолиева киселина, съществена стъпка от биосинтезата на фолат, който от своя страна участва в генерирането на много нуклеотиди и аминокиселини), докато сулфонамидите са инхибитори на дихидроптероат синтазата (DHPS) (блокират превръщането на пара-аминобензоат или PABA в дихидроптероат). Най-често прилаганата синергична комбинация е между trimethoprim и sulfamethoxazole. Резистентността към диаминопиримидини при *A. baumannii* се осигурява главно от устойчиви на trimethoprim DHFRs: DfrA1, DfrA5, DfrA7, DfrA10, DfrA12, DfrA14, DfrA16, DfrA17, DfrA19, DfrA20, DfrA27 и DfrB1. Кодиращите *dfrA* гени са типична част от касети, носени от интегрони от клас 1 (Huang et al. 2015a). MexAB-OprM ефлукс помпата се свързва с липсата на чувствителност към много антибиотици, в т.ч. trimethoprim и дори colistin, когато е експресирана във високи нива (Paul et al. 2020). Също така помпите AdeIJK и LmrS допринасят за резистентност към trimethoprim (Damier-Piolle et al. 2008). Плазмид-кодираната RND помпа OqxAB има отношение към устойчивостта към trimethoprim, хинолони, тетрациклини, глицилциклини и нитрофурани (Hong et al. 2009).

Два механизма са въвлечени в резистентността на *A. baumannii* към сулфонамиди: (i) сулфонамид-устойчиви DHPSs, кодирани от *sul1* и *sul2*; и (ii) RND ефлукс помпа MexAB-OprM със или без MexR мутации (Girija et al. 2019).

2.5.2.6. Резистентност към полимиксини

Множество механизми са въвлечени в резистентността на *A. baumannii* към полимиксини: (i) промяна в мишената за тяхното действие чрез модификация на липид А, възникваща поради мутации в *pmrCAB* оперона и *mcr* гените; (ii) мутации в *lpxA*, *lpxC* и *lpxD* гените, кодиращи ацилтрансферази, участващи в биосинтеза на липид А и свързани с неговия дефицит; (iii) експресия на *lpsB*, *lptD* и *vacJ*, свързана с пермеабилитетни дефекти и осмотично съпротивление на ВМ, което впоследствие води до значително повишени МПК за полимиксини; (iv) недостатъчна концентрация на кофактори, необходими за образуването на ЛПЗ, като биотин, които са от съществено значение за чувствителността към полимиксини; и (v) ефлуксни помпи (Moffatt et al. 2019; Novović and Jovčić 2023; El Mrimar et al. 2024).

Оперонът *pmrCAB* включва *pmrC* ген, кодиращ фосфоетаноламин (PEA) трансфераза, заедно с *pmrA* и *pmrB*, които кодират PmrA/PmrB TCS. Мутации в гените за TCS, особено в *pmrA*, индуцират свръхекспресия на *pmrC*. Добавянето на PEA остатък към 4'-фосфатната група на хепта-ацилираната форма на липид А е най-често докладваната модификация при *A. baumannii* изолати, резистентни на полимиксини. При нея се премахват отрицателните заряди и намалява афинитетът на ЛПЗ към този клас антибиотици. Добавянето на 4-амино-L-арабиноза и/или галактозамин към фосфатните групи на липид А и към остатъците в сърцевинния олигозахарид действа по подобен начин. Също така PmrA/PmrB TCS може да доведе до резистентност към полимиксини чрез регулиране на транскрипцията на NaxD деацетилаза и съответно модификация на липид А с помощта на деацетилиран галактозамин. В допълнение мутациите в гена *miaA* (кодиращ посттранскрипционния регулатор tRNA диметилалил-дифосфат-трансфераза) изглежда действат синергично с мутациите в *pmrA* и водят до селекция на полимиксин-резистентен фенотип (Chin et al. 2015; Sun et al. 2020). В същия контекст мутации в *eptA-1* и *eptA-2* (паралози на *pmrC* гена) се асоциират с резистентност към colistin (Moffatt et al. 2019; Gerson et al. 2019). Други PEA трансферази, които медиират резистентност към полимиксини, са кодирани от *mcr-1*, *mcr-4* и *mcr-4.3* гени с плазмидна локализация (Hameed et al. 2019; Gelbíčová et al. 2019; Martins-Sorenson et al. 2020).

Биотинът, който по същество участва в синтеза на мастни киселини, допринася по дозозависим начин за синтеза на ЛПЗ. Установено е, че делеции в *lpsB* гена, кодиращ гликозилтрансфераза с участие в синтеза на биотин, водят до резистентност към colistin (Hood et al. 2013).

Експерименти, базирани на целогеномно секвениране, върху colistin-резистентни изолати *A. baumannii* откриват връзка със следните гени: *vacJ*, *zndP*, *pldA*, *ttg2C* и *pheS*. Така например външномембранният липопротеин VacJ е част от транспортната система Vps-VacJ ABC, която отговаря за запазването на ЛПЗ и фосфолипидите съответно във външния и вътрешния слой на външната мембрана. Ttg2C е друг ABC транспортер, който при експозиция на фенол (с еквивалентно действие на полимиксините) е свръхрегулиран. Вероятно и мутациите във *pheS*, който кодира фенилаланин-тРНК лигазната субединица алфа, играят роля в резистентността към colistin (Nhu et al. 2016). Свръхекспресията на RND ефлукс помпата MexAB-OprM също корелира с резистентност към colistin при *A. baumannii* (Paul et al. 2020).

2.5.3. Механизми на резистентност при *S. maltophilia*

S. maltophilia притежава вродена устойчивост към голям брой АМЛС (β-лактами, вкл. карбапенеми; аминогликозиди; trimethoprim; tetracycline и др.), дължаща се на индуцибелни хромозомно-кодирани β-лактамази, експресия на ефлукс-помпи, антибиотик-модифициращи ензими и ниска пропускливост на ВМ. От друга страна видът може да придобива резистентност в резултат от пренос на гени, локализирани в интегрони, транспозони и плазмиди (Sánchez 2015; Трифонова 2020; Brooke 2021). Основните механизми на антимикробната лекарствена резистентност на *S. maltophilia* са обобщени в **Таблица 7.**

Таблица 7. Механизми на антибиотична резистентност в *S. maltophilia*.

Механизъм	Генетични детерминанти	Резистентност	Литературен източник
β-лактамази			
L1 и L2 (хромозомно-кодирани)	bla_{L1} и bla_{L2} *ampR*, *ampN-ampG* оперон, $ampD_I$, *mrcA*, *mltD1* с влияние върху експресията	β-лактами	(Okazaki and Avison 2008; Lin et al. 2009, 2011a; Huang et al. 2015c)
TEM-2	bla_{TEM-2} (част от Tn*1*-like транспозон)		(Avison et al. 2000)
Интегрони и ISCR елементи	*sul1, sul2, sul3, dfrA*	SXT	(Hu et al. 2011; Özkaya et al. 2014; Chung et al. 2015)
Ефлукс помпи			
RND семейство:			
SmeABC	*smeABC*	аминогликозиди, β-лактами, флуорохинолони (CIP)	(Cho et al. 2012)
SmeDEF	*smeDEF*	хинолони, тетрациклини, макролиди, CHL, novobiocin, meropenem, SXT	(Sánchez and Martínez 2015; Chong et al. 2017)
SmeGH	*smeGH*	флуорохинолони, макролиди, CHL, TET	(Li et al. 2019a)
SmeIJK	*smeIJK*	аминогликозиди, флуорохинолони, TET, MIN	(Crossman et al. 2008; Huang et al. 2014b)
SmeOP	*smeOP-tolCsm*	аминогликозиди, макролиди, β-лактами, някои хинолони, doxycline, SXT, CHL, nalidixic acid	(Lin et al. 2014a)
SmeVWX	*smeVWX*	хинолони, тетрациклини, CHL	(Chen et al. 2011a; Wu et al. 2019)
SmeYZ	*smeYZ*	аминогликозиди, SXT	(Lin et al. 2015; Calvopika et al. 2020)
ABC семейство:			
SmrA	*smrA*	флуорохинолони, TET	(Al-Hamad et al. 2011)
MacABCsm	*macABCsm*	аминогликозиди, макролиди, полимиксини	(Lin et al. 2014b)
MFS семейство:			
EmrCABsm	*emrRCABsm*	erythromycin, nalidixic acid	(Huang et al. 2013a)
MfsA	*mfsA*	аминогликозиди, флуорохинолони, CHL, TET	(Dulyayangkul et al. 2016)
FuaABC	*fuaR-fuaABC*	fusaric acid	(Hu et al. 2012)

Таблица 7. Продължение

Механизъм	Генетични детерминанти	Резистентност	Литературен източник
Qnr протеини	хромозомни Sm*qnr*	хинолони, тетрациклини	(Kanamori et al. 2015; Wu et al. 2019)
Аминогликозид-модифициращи ензими	*aph(3')-IIc*, *aac(6')-Iz*, *aac(6')-Iak*	аминогликозиди	(Tada et al. 2014; Sánchez 2015)
SpgM фосфоглюкомутаза; ЛПЗ синтез	*spgM*	ceftazidime, gentamicin, TZP, полимиксини, vancomycin, TTC, nalidixic acid	(Liaw et al. 2010)
Намален пермеабилитет на ВМ		ceftazidime, cefepime, TZP, TTC	(Chang et al. 2015; Sánchez 2015)

ABC – ATP-binding cassette, ВМ – външна мембрана, ЛПЗ – липополизахарид, ISCR – insertion sequence common region, MFS – Major Facilitator Superfamily, RND – Resistance-Nodulation-Division, CIP – ciprofloxacin, CHL – chloramphenicol, MIN – minocycline, SXT – trimethoprim-sulfamethoxazole, TET – tetracycline, TTC – ticarcillin-clavulanic acid, TZP – piperacillin-tazobactam.

2.5.3.1.Резистентност към β-лактами

S. maltophilia притежава две хромозомно-кодирани индуцибелни β-лактамази, L1 и L2. L1 β-лактамаза е Zn^{2+}-зависима MBL от молекулярен клас B, а L2 е клавуланат-чувствителна серин-съдържаща цефалоспориназа от клас A. Има сложни и компенсаторни механизми, използвани от *S. maltophilia* за експресията и активността на двата ензима, в това число NagZ (β-N-ацетилглюкозаминидаза)-зависими и NagZ-независими (Huang et al. 2012). В тези механизми участват *mrcA* (кодиращ PBP-1α) и регулаторните протеини AmpR (транскрипционен регулатор) и AmpN-AmpG (пермеазна система), които влияят на базалната β-лактамазна активност (Lin et al. 2011a). Инактивирането на *mltD1* (литична трансгликозилаза D1) води до повишена неиндуцирана β-лактамазна активност и повишена експресия на bla_{L1} и bla_{L2} (Huang et al. 2015c). Функцията на AmpN/AmpG пермеаза и AmpR е от съществено значение за *mltD1* мутантния фенотип и разрушаването на *nagZ* причинява частично намаляване на неиндуцираната β-лактамазна активност. Разрушаването на *mltD1* също води до *creBC*- и *ampNG*-зависима повишена експресия на *mltB1* и *mltD2* (други литични трансгликозилази) (Huang et al. 2015c). Разрушаването на *mrcA*, *ampD1* (кодира ензима, използван при рециклирането на пептидогликан) и поне още един ген води до хиперпродукция на β-лактамази от *S. maltophilia* (Talfan et al. 2013).

2.5.3.2. Резистентност към аминогликозиди

S. maltophilia демонстрира резистентност към аминогликозиди чрез активността на няколко AMEs (APH(3')-IIc, AAC(6')-Iz и AAC(6')-Iak) и ефлуксни помпи, представени в

Таблица 7. (Sánchez 2015). В неговия геном са идентифицирани и други гени, които кодират AMEs (2′N-ацетилтрансфераза, streptomycin 3″фосфотрансфераза/киназа, spectinomycin фосфотрансфераза и chloramphenicol ацетилтрансфераза) (Crossman et al. 2008), но са необходими бъдещи изследвания за потвърждаване на тяхната функция. Установено е също, че протеазите ClpA и HtpX допринасят за вродената резистентност към аминогликозиди на *S. maltophilia* (Huang et al. 2018).

2.5.3.3. Резистентност към trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)

SXT продължава да бъде средство на избор за лечение на инфекциите, причинени от *S. maltophilia*, въпреки възникването и разпространението на резистентни изолати в световен мащаб (Chang et al. 2015; Brooke 2021). Установено е, че интегроните от клас 1 могат да медиират резистентност към kanamycin, tobramycin и SXT в клиничните изолати *S. maltophilia* (Huang et al. 2015b). Например Zhao et al. идентифицират щам, съдържащ клас 1 интегрон, който носи *sul1* ген в 3'-консервативния сегмент и *aadA2* (детерминиращ резистентност към аминогликозиди) в генната касета, разположена в неговия вариабилен регион (Zhao et al. 2015). Плазмид-медиирани интегрони от клас 1 осигуряват лесно разпространение на *sul* и *dfrA* гени, отговорни за резистентност към SXT (Hu et al. 2011). Хоризонтален генен трансфер и рекомбинация са молекулярните механизми, използвани от *S. maltophilia*. Освен *sul1*, *sul2* и *sul3*, свързани с ISCR елементи и носени от клас 2 и клас 3 интегрони, съответно, също са отговорни за SXT резистентност при клиничните изолати *S. maltophilia* (Toleman et al. 2007; Özkaya et al. 2014; Adegoke et al. 2017). Освен това, ефлуксните помпи SmeDEF, TolCsm и SmeYZ също са свързани с резистентността към SXT (Huang et al. 2013b; Lin et al. 2015; Sánchez and Martínez 2015).

2.5.3.4. Резистентност към флуорохинолони

Два механизма са свързани с резистентността на *S. maltophilia* към хинолони: ефлуксни помпи и хромозомно кодиран *qnr* ген (Sm*qnr*), чийто продукт (Qnr протеин) предпазва както гиразата, така и топоизомераза IV от действието на тези антимикробни агенти (Sánchez 2015). За разлика от други бактерии, клиничните изолати *S. maltophilia*, демонстриращи резистентност към флуорохинолони, не показват значими мутации в гените за ДНК гираза и топоизомераза IV (*gyrA* и *parC*) (Valdezate et al. 2005; Jia et al. 2015; Cha et al. 2016). Понастоящем характеризираните генетични детерминанти, асоциирани с резистентност към хинолони, са *smeDEF*, *smeIJK*, *smeABC*, *smeVWX* и Sm*qnr*, сред които *smeDEF* и Sm*qnr* са най-добре описани (Chang et al. 2015; Adegoke et al. 2017). Sm*qnr* придава ниско-ниво на резистентност и допринася за вродената устойчивост към хинолони

при *S. maltophilia* (Sánchez and Martínez 2010). García-León et al. допълнително изясняват взаимодействието между вродената и придобитата резистентност към хинолони. Те установяват, че способността за развитие на антибиотична резистентност, предизвикана от мутация, е силно зависима от вродения резистом. Според проучването, основният механизъм за придобита резистентност към хинолони при *S. maltophilia* включва свръхпродукция на MDR ефлукс помпи, сред които най-важна роля има SmeDEF (García-León et al. 2014). В допълнение García-León и колектив доказват, че свръхекспресия на *smeVWX* води до високо ниво на резистентност към хинолони сред клинични изолати *S. maltophilia* (García-León et al. 2015).

Доказано е също, че инактивирането на РНКаза G, която е важна за стабилността на иРНК и регулирането на генната експресия (Bernardini and Martínez 2017), намалява чувствителността на *S. maltophilia* към хинолони (Bernardini et al. 2015). Когато РНКаза G е инактивирана, се наблюдава и свръхекспресия на гените за реакция на топлинен шок.

2.6. Глобална популационна структура на терапевтично проблемни НФГБ

2.6.1. Високорискови епидемични клонове на *P. aeruginosa* и тяхната връзка с хоризонтално придобити β-лактамази

Понастоящем се използват разнообразни методи (с различна цена, трудоемкост и дискриминационна способност) за оценка на генетичното сходство между изолатите *P. aeruginosa*, които имат ключова роля в контрола на инфекциите и епидемиите в локален и глобален мащаб. Те включват: серотипизиране, фагово типизиране, пиоцин типизиране, гел електрофореза на ДНК в пулсово поле (PFGE), гел електрофореза с инверсия на полето (FIGE), случайно амплифициране на полиморфна ДНК чрез полимеразна верижна реакция (RAPD-PCR), олигонуклеотидни микрочипове, мултилокусно секвенционно типизиране (MLST) и секвениране на целия геном (WGS) (Ballarini et al. 2012; Waters et al. 2012; MacCannell 2013; Magalhães et al. 2020). Последните три метода са подходящи са идентифициране на т. нар. „международни успешни клонове“ или болнично-адаптирани високорискови клонове, включващи MDR/XDR *P. aeruginosa*, а останалите намират приложение при оценка на локални огнища и вътреболнични взривове.

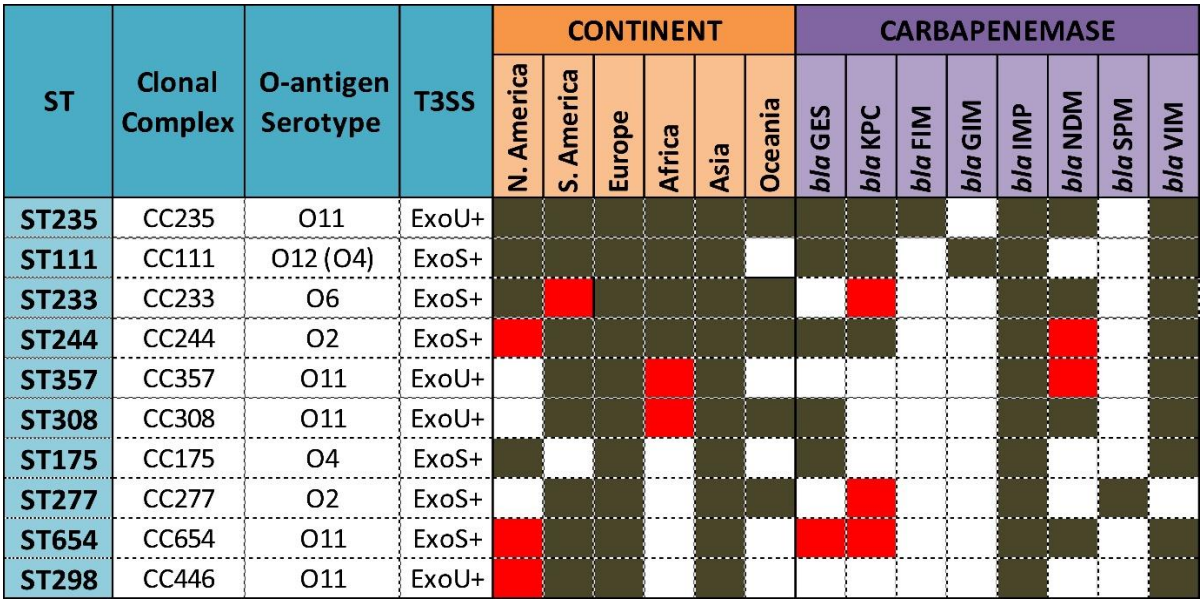
„Златният“ стандарт за дефинирането на епидемични високорискови клонове на *P. aeruginosa* все още е схемата за MLST, разработена от Curran et al. преди 20 години (Curran et al. 2004), включваща над 5000 секвенционни типа (STs) (https://pubmlst.org/paeruginosa/), въпреки по-детайлните характеристики, които предоставя WGS при изследване на

клоналното разпространение (вътреболнично, междуболнично и глобално) на *P. aeruginosa* изолати. Десетте най-високорискови епидемични STs в световен мащаб, дефинирани в съответствие с тяхната честота на откриване, глобално разпространение, връзка с MDR/XDR профил, продукция на ESBLs и карбапенемази, са следните: ST235, ST111, ST233, ST244, ST357, ST308, ST175, ST277, ST654 и ST298 (del Barrio-Tofiño et al. 2020).

ST111 (характеризиран със серотип O12) и ST235 (серотип O11) са описани на почти всички континенти, докато ST175 (серотип O4) е разпространен предимно в Европа (Oliver et al. 2015). Генът $bla_{\text{VIM-2}}$ е най-честият карбапенемаза-кодиращ ген сред ST235, ST111 и ST233 *P. aeruginosa* изолати (Oliver et al. 2015; Turton et al. 2015). **ST235** е най-адаптираният ("successful") високорисков клон, показващ глобално разпространие, което е асоциирано с продукцията на десетки варианти на придобити β-лактамази, включително множество карбапенемази от класове A и B. Освен това ST235 включва щамове със силно вирулентен фенотип, свързан с висока смъртност, вероятно поради производството на цитотоксин ExoU (Treepong et al. 2018). Сред ST235 изолатите са идентифицирани близо 100 детерминанти на антибиотична резистентност (ARDs), придобити чрез хоризонтален генен трансфер (HGT) (Chowdhury et al. 2016, 2017). Генът *dprA* (кодиращ протеин A за обработка на ДНК) е идентифициран от Treepong et al. като специфичен маркер на тази генетична линия (Treepong et al. 2018). Поради докладвания принос на DprA в хомоложната рекомбинация и придобиването на чужда ДНК, присъствието му в линията ST235 обяснява повишената способност за придобиване на ARDs.

Карбапенемазите от клас A и B често се свързват с изолати *P. aeruginosa*, принадлежащи към **ST111** (Castanheira et al. 2014; Oliver et al. 2015; Turton et al. 2015). **ST244** е много разпространена генетична линия, която не винаги включва MDR/XDR изолати. **ST357, ST308 и ST298** обикновено са *exoU*-експресиращи и потенциално свързани с по-висока вирулентност (del Barrio-Tofiño et al. 2020). Европейският **ST175** обединява изолати с MDR/XDR фенотип, детерминиран главно от хромозомни мутации в *oprD*, *ampR*, *mexZ*, *gyrA* и *parC* гените, които се характеризират с по-слаба вирулентност (Cabot et al. 2016; López-Causapé et al. 2018). **ST277** е ендемичен клон в Бразилия, който е специфично асоцииран със SPM-1-продуциращи изолати *P. aeruginosa* (Dos Santos et al. 2023). **Фигура 6.** обобщава актуалната информация за десетте най-високорискови епидемични линии на *P. aeruginosa*, вкл. техния профил на вирулентност (наличие на ген, кодиращ екзотоксините на T3SS), глобално разпространение и асоцииране с придобити карбапенемази. Особено забележително е разширяването на KPC ензимите в няколко

линии (ST233, ST277 и ST654 в допълнение към предишното откриване в ST235, ST111 и ST244), последвано от NDM (ST244 и ST357 в допълнение към ST235, ST233, ST308 и ST654). Освен това, съвместното производство на различни карбапенемази не е рядко сред високорисковите клонове *P. aeruginosa* (Torrens et al. 2022).



Фигура 6. Основни характеристики на високорисковите клонове *P. aeruginosa*. В червено са представени допълненията на ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group от 2024 г. (Oliver et al. 2024) спрямо 2020 г. (del Barrio-Tofiño et al. 2020).

Освен десетте високорискови генетични линии на *P. aeruginosa*, през последните години се утвърждават още три международни клона: глобално разпространяващият се **ST309**, свързан с производството на VIM-2 MBL; **ST773**, асоцииран с NDM-1, и **ST463**, продуциращ KPC-2 карбапенемаза (Hu et al. 2021; Fonseca et al. 2022; Choi et al. 2023).

2.6.2. Глобална епидемиология на *A. baumannii*

Епидемиологичното типизиране на *A. baumannii* е базирано на богат репертоар от генотипни методи: AFLP (amplified fragment length polymorphism) анализ, PFGE, MLVA (multiple-locus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis), rep-PCR (Repetitive extragenic palindromic PCR), генотипизиране на единичен локус, трилокусно секвенционно типизиране, Oxford MLST, Pasteur MLST, типизиране според плазмиден профил и острови на патогенност и новогенерационно WGS (Zarrilli et al. 2013). Двете налични схеми за MLST са основният инструмент за детайлно изучаване на популационната структура на *A. baumannii* (Bartual et al. 2005; Diancourt et al. 2010).

Първоначалното молекулярно типизиране (2010 г.) установява циркулиране на три генетични линии *A. baumannii* в Европа, които са означени като европейски клонове I, II и III (Diancourt et al. 2010). Допълнителни проучвания показват експанзия на тези линии в глобален мащаб, поради което са преименувани в международни клонални (IC) линии I, II и III (Higgins et al. 2010a; Zarrilli et al. 2013). Към днешна дата са признати единадесет международни клона (ICs): **IC1–11** (Al-Hassan et al. 2021; Castanheira et al. 2023; Shelenkov et al. 2023; Xu et al. 2024). Двете MLST схеми (Oxfofd и Pasteur) класифицират щамовете *A. baumannii* в STs и клонални комплекси (CCs) (Higgins et al. 2017; Gaiarsa et al. 2019). Корелацията на утвърдените 9 международни клона *A. baumannii* при приложение на Oxford и Pasteur MLST схеми е следната: *A. baumannii* IC1 ($CC109^{OXF}/CC1^{Past}$), IC2 ($CC92^{OXF}/CC2^{Past}$), IC3 ($CC929^{OXF}/CC124^{Past}$), IC4 ($CC103^{OXF}/CC15^{Past}$), IC5 ($CC227^{OXF}/CC79^{Past}$), IC6 ($CC944^{OXF}/CC78^{Past}$), IC7 ($CC110^{OXF}/CC25^{Past}$), IC8 ($CC447^{OXF}/CC10^{Past}$) и IC9 ($CC1078^{OXF}/CC464^{Past}$) (Tomaschek et al. 2016). Изолатите *A. baumannii*, отнасящи се към **IC1** и **IC2**, обикновено са CRAB и съдържат придобитата OXA-23 карбапенемаза (Wohlfarth et al. 2022). Тези ICs са най-успешно разпространените клонове в световен мащаб (Hamidian and Nigro 2019; Castanheira et al. 2023). Съществуват обаче регионални различия в молекулярните характеристики на изолатите. **IC5** и **IC7** се срещат предимно в Централна и Южна Америка, докато **IC9** е преобладаващ в Африка и Близкия изток (Higgins et al. 2010a; Al-Hassan et al. 2021). Докладвана е силна корелация между нуклеотидните последователности на $bla_{\text{OXA-51-like}}$ и *A. baumannii* ICs 1–8, което предполага, че секвенирането на $bla_{\text{OXA-51}}$ може да се прилага като леснодостъпен тест за идентифициране на *A. baumannii* ICs (Zander et al. 2012).

Интензивните научни изследвания показват, че клоналната структура на *A. baumannii* не може да бъде фиксирана веднъж завинаги и че този бактериален вид еволюира под въздействието на антибиотици и други фактори на околната среда. Някои клонове могат постепенно да загубят значението си, каквато тенденция се наблюдава за IC3, както и да възникнат нови ICs. Наскоро Shelenkov et al. извършват анализ на всички геноми на *A. baumannii*, налични в GenBank, и детайлно проучват техните STs, като използват алгоритъма eBURST. Въз основа на получените данни авторите предлагат нов кандидат за IC, **IC10,** който **преди** това е бил наричан **CC33** (Shelenkov et al. 2023). Резултатите от eBURST, касаещи Pasteur MLST схемата, са показали централно положение на ST33. Те анализират геномите на изолатите от STs, попадащи в един клъстер със ST33, за наличието на общи OXA-51-like карбапенемази и установяват, че изолатите от ST33, ST132, ST151, ST193, ST213, ST235, ST424, ST448, ST456, ST459, ST911 и ST2034,

притежават един и същ *bla*$_{\text{OXA-120}}$ ген. Всички изолати от съответните секвенционни типове са подложени и на core genome (cg) MLST анализ. Освен това всички изолати, с изключение на един, съдържат един и същ вариант на вродения ген *bla*$_{\text{ADC-25}}$, а именно *bla*$_{\text{ADC-156}}$. Според данните от PubMLST (Jolley et al. 2018) клинични изолати *A. baumannii* от CC33 са открити в Китай, Япония, Саудитска Арабия, Полша, Русия, Бразилия и САЩ през периода 2005-2021 г. Преди това членове на CC33 са докладвани и в Бангладеш (ST459) (Rahman et al. 2022), Бразилия (ST151) (Chagas et al. 2014) и Ливан (ST284) (Rafei et al. 2014). Това недвусмислено показва, че **CC33** вече се е разпространил на всички континенти, включително Европа, Азия, Северна и Южна Америка.

През 2023 в Дания г. е отрит най-новият международен клон, **IC11**. Той включва CRAB изолати с характеристики ST164$^{\text{Past}}$/OXA-91, които продуцират придобити CHDLs, OXA-23 и OXA-58 (Hansen et al. 2023). IC11 е открит по-късно в хода на мултицентрово ретроспективно геномно проучване, включило карбапенемаза-продуциращи клинични изолати *A. baumannii* от провинция Джянси в Китай от периода 2021–2022 г. (Xu et al. 2024). От 100 изследвани изолата, 8 са били отнесени към новия IC11 (ST164$^{\text{Past}}$/ST1418$^{\text{OXF}}$). Всички изолати притежават Tn*2006*, носещ *bla*$_{\text{OXA-23}}$, а 7 от тези CRAB са носители на *bla*$_{\text{NDM-1}}$, локализиран върху нов Tn*6924*-like транспозон.

WGS е сравнително евтина техника, която навлиза все повече при изследване, както на глобалната молекулярна епидемиология на *A. baumannii*, така и на вътреболничните взривове. WGS притежава по-висока резолюция от масово прилаганото MLST (Castillo-Ramírez and Graña-Miraglia 2019; Doughty et al. 2023). Типизирането на единичен нуклеотиден полиморфизъм (SNP) се характеризира с най-висока резолюция, но MLST на основния геном (cgMLST) осигурява по-стабилна номенклатура и резултати, които са по-лесни за интерпретация в сравнителни анализи (Li et al. 2022).

2.6.3. Популационна структура на *S. maltophilia*

За сравняване на клинични и екологични щамове *S. maltophilia* се използват различни методи, в т.ч. rep-PCR, генно секвениране, WGS, PFGE и MLST (Brooke 2021). В световен мащаб, независимо от техния произход, щамовете *S. maltophilia* демонстрират висока генетична хетерогенност, с отворен пангеном и споделен сърцевинен геном. Наскоро проведени филогенетични анализи на 375 генома на *S. maltophilia* complex, от които 104 на щамове от животински произход, 226 от човешки, 30 от околната среда и 15 с неизвестен произход, идентифицират най-малко 20 геногрупи. MLST анализът показва, че по-голямата част от щамовете в геногрупи 1, 3, 6 и C са от човешки произход, а в геногрупи

2-b и 5 са от животински произход (Mercier-Darty et al. 2020). В друго MLST изследване, включващо само клинични изолати *S. maltophilia* от френски болници, е доказано преобладаване на геногрупи 6 и 2 (Corlouer et al. 2017). При изучаване на популационната структура на 130 клинични изолата *S. maltophilia* в САЩ за 10-годишен период са идентифицирани 90 STs, от които 63 са открити за първи път. Преобладаващата част от идентифицираните STs се причисляват към три геномни групи: 6 (45.4%), 1 (14%) и C (13%) (Mojica et al. 2019).

Преди няколко години Gröschel. et al. провеждат мащабен WGS-базиран филогенетичен и клъстерен анализ, включващ международна колекция от над 1000 клинични и екологични щама *S. maltophilia*, произхождащи от 22 държави от целия свят. Авторите групират щамовете в 23 филогеномни линии и доказват, че някои от тях са асоциирани с болничните отделения и причиняват инфекции при хора. Линия Sm6 показва най-силна способност да колонизира или инфектира хора, както и да причинява болнично-придобити инфекции (Gröschel et al. 2020).

2.7. Нови антибиотици в лечението на инфекции, причинени от терапевтично проблемни НФГБ

Както беше подчертано, CRPA и CRAB попадат в списъка на СЗО от 2017 г. като микроорганизми с „критичен приоритет“ за проучване и създаване на нови, ефективни антибиотици (Tacconelli et al. 2018). От своя страна *S. maltophilia* продуцира две хромозомно-кодирани индуцибелни β-лактамази, L1 (MBL от клас B) и L2 (серин-съдържаща цефалоспориназа от клас A), които кумулативно придават експанзивна резистентност към β-лактами и карбапенеми (Brooke 2021). Тези характеристики правят инфекциите, причинени от *S. maltophilia*, особено предизвикателство с остра нужда от допълнителни възможности за лечение. По-долу са представени някои от одобрените за клинична употреба от U.S. Food and Drug Administration (FDA) и European Medicines Agency (EMA) нови антибиотици, които намират приложение в терапията на инфекции, причинени от MDR Грам-отрицателни патогени, вкл. *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*.

2.7.1. Ceftolozane-tazobactam (CTT)

CTT принадлежи към първата вълна от нови комбинирани антибиотици, съдържащи β-лактам и β-лактамазен инхибитор (BL/BLI), които са въведени за противодействие на

резистентни Грам-отрицателни бактерии (Gentile et al. 2016). Препаратът получава одобрение за клинична употреба от FDA (2014 г.) и EMA (2015 г.) въз основа на резултатите от клиничните проучвания ASPECT-cIAI и ASPECT-cUTI (Solomkin et al. 2015; Wagenlehner et al. 2015). Първоначалните клинични показания за приложението му включват усложнени интраабдоминални инфекции (cIAIs) и усложнени инфекции на пикочните пътища (cUTIs), вкл. пиелонефрит, при възрастни пациенти в доза от 1.5 g на всеки 8 часа. През 2019 г. индикациите са разширени с нозокомиална пневмония, с удвоена доза на приложение (Kollef et al. 2019). CTT е терапевтична опция спрямо CRPA, непродуциращи карбапенемази от молекулярни класове A, B и D, и демонстрира много ограничена активност срещу *Acinetobacter* spp. и *S. maltophilia* (Yahav et al. 2020).

Резистентността към CTT, често кръстосана с устойчивост към ceftazidime-avibactam, се дължи основно на аминокиселинни заместания, инсерции или делеции в хромозомно-кодираната цефалоспориназа от клас C на *P. aeruginosa* (AmpC) (Haidar et al. 2017). Авторите на скорошно проучване предполагат, че развитието на резистентност в хода на лечение на CRPA инфекции с CTT се влияе от приложението на интермитентна вместо продължителна 3-часова инфузия (Tamma et al. 2021).

2.7.2. Ceftazidime-avibactam (CZA)

CZA е BL/BLI комбинация, одобрена от FDA и EMA за лечение на cIAIs, cUTIs, HAP и VAP, причинени от чувствителни *Enterobacterales* и *P. aeuginosa* (U.S. Food and Drug Administration 2018a; European Medicines Agency 2020a). Avibactam (AVI) е не-β-лактамен BLI, който използва реактивна урея, за да инхибира ESBLs и KPC карбапенемази от клас A, както и някои β-лактамази от клас C и клас D (Ehmann et al. 2013). От друга страна AVI няма активност спрямо MBLs, продуцирани от Грам-отрицателните бактерии, вкл. *P. aeruginosa*. Трябва също да се подчертае, че нито AVI, нито комбинацията му с ceftazidime показват *in vitro* активност срещу *A. baumannii* (Coppola et al. 2022). Според резултатите от наскоро проведено проучване, CZA демонстрира значимо по-висока *in vitro* активност от ceftazidime спрямо клинични *S. maltophilia* (съотв. 66.7% vs. 38.9% чувствителни изолати, $p < 0.01$) (Moriceau et al. 2020).

Механизмите на резистентност към CZA в изолати *P. aeruginosa* включват модификации на порини или участие на ефлуксни помпи (Winkler et al. 2015; Gomis-Font et al. 2021). AmpC мутациите, появяващи се след лечение на MDR *P. aeruginosa* с CTT и отговорни за резистентността към него, участват в кръстосаната резистентност към CZA

(Rubio et al. 2021). Съобщава се, че придобити мутации в OXA-2 и OXA-10 също могат да са отговорни за *in vivo* резистентност към CZA и CTT (Arca-Suárez et al. 2021).

2.7.3. Meropenem-vaborbactam (MEV)

MEV е комбинация от широко използвания карбапенем meropenem (MEM) с ново поколение BLI, vaborbactam (VAB). Първоначално е одобрен от FDA (2017 г.) за лечение на cUTIs, вкл. пиелонефрит, при възрастни в доза от 2 g (1 g MEM + 1 g VAB) i.v. на всеки 8 часа (U.S. Food and Drug Administration 2017). През 2018 г. MEV получава одобрение за клинично приложение и от EMA, като индикациите за употреба са разширени с cIAIs, HAP и VAP, в същата доза (European Medicines Agency 2018).

VAB е не-β-лактамен серин-съдържащ BLI, базиран на фармакофор на циклична боронова киселина с мощна активност, особено срещу KPC карбапенемази, продуцирани от *Enterobacterales* и *P. aeruginosa* (Hecker et al. 2015). Цикличната боронова киселина притежава афинитет към серин-съдържащите активни места на β-лактамазите, в резултат на което се образува ковалентен комплекс, който предотвратява хидролизата на MEM от сериновите карбапенемази. MEV е активен спрямо β-лактамазите от клас A (предимно KPC) и клас C (включително хромозомната *Pseudomonas*-derived cephalosporinase – PDC), но не проявява активност по отношение на MBLs и CHDLs (определящи резистентността към карбапенеми при *A. baumannii*) (Noval et al. 2020; Coppola et al. 2022). В повечето проучвания се отчита сходна активност на MEV с тази на MEM спрямо клиничните изолати *P. aeruginosa*, което не е изненадващо, с оглед на факта, че резистентността към MEM при вида е резултат предимно на модификации на външномембранни порини и свръхекспресия на ефлукс помпи, които не са антагонизирани от VAB (Novelli et al. 2020).

2.7.4. Imipenem-cilastatin-relebactam (IMR)

Препаратът IMR свързва заедно карбапенема imipenem (IMP), инхибитора на бъбречната дехидропептидаза-I cilastatin (няма антимикробна активност, но намалява бъбречния метаболизъм на IMP) и новия BLI relebactam (REL) (Heo 2021). REL може да предпази IMP от разграждане от Ambler клас A и клас C β-лактамази (включително PDC на *P. aeruginosa*), но не е активен срещу MBLs и CHDLs (Noval et al. 2020; Coppola et al. 2022). Добавянето на REL не повишава активността на IMP срещу *A. baumannii* и *S. maltophilia*, поради което IMR намира приложение единствено в терапията на инфекции, причинени от MDR *P. aeruginosa*, непродуциращи MBLs от клас B (Principe et al. 2022). IMR е одобрен в САЩ (2019 г.) и ЕС (2020 г.), като индикациите за приложение са сходни с тези при MEV (Heo 2021).

Основните механизми за резистентност към IMP при *P. aeruginosa* включват загуба на външномембранните OprD порини и високо ниво на експресия на хромозомно кодирания AmpC ензим. IMR е активен срещу карбапенем-резистентни щамове *P. aeruginosa* с пермеабилитетен механизъм на резистентност, тъй като нито IMP, нито REL са субстрат на най-разпространените MDR ефлуксни помпи (MexA-MexB-OprM) (Losito et al. 2022). От друга страна инхибирането на хромозомната AmpC β-лактамаза от REL възстановява чувствителността на много MDR изолати *P. aeruginosa* към карбапенема чрез способността му да потиска ниско ниво на хидролиза на IMP от AmpC и съответно да не индуцира производството на AmpC ензима (Livermore et al. 2017). В CRPA изолати с OprD дефицит IMR е активен с поне четирикратно намалена МПК на IMP (от 16–64 mg/L до 1–4 mg/L) (Losito et al. 2022).

2.7.5. Cefiderocol (CFDC)

CFDC е първият в класа катехол-заместени сидерофорни цефалоспорини, който има мощна активност срещу широк спектър от аеробни Грам-отрицателни патогени, в т.ч. карбапенем-резистентни *Enterobacterales* и НФГБ, като *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia* (Choi and McCarthy 2018; Canton et al. 2022; Bassetti et al. 2022; Mojica et al. 2023). Той представлява синтетичен конюгат, при който част от катехол 2-хлоро-3,4-дихидрокси-бензоена киселина на 3-та позиция в R2 страничната верига се свързва с извънклетъчното желязо. Това улеснява поглъщането на CFDC в бактериалното периплазмено пространство посредством каналите за транспортиране на желязо във ВМ – т. нар. подход „Троянски кон“ (Rayner et al. 2023). Веднъж попаднал в периплазменото пространство, антибиотикът се дисоциира от Fe и цефалоспориновата част се свързва предимно с PBP3, за да инхибира синтеза на бактериалната клетъчна стена.

CFDC е одобрен от FDA в края на 2019 г. за лечение на cUTIs, вкл. пиелонефрит, причинени от чувствителни Грам-отрицателни микроорганизми при възрастни пациенти, които имат ограничени или липсващи алтернативни възможности за терапия, както и за HAP и VAP, причинени от чувствителни Грам-отрицателни микроорганизми (U.S. Food and Drug Administration 2019). По-късно, през 2020 г., антибиотикът е одобрен и от EMA за усложнени Грам-отрицателни инфекции при възрастни с ограничени възможности за лечение (European Medicines Agency 2020b).

Този нов активно транспортиращ се в бактериалните клетки антибиотик изглежда обещаващ, тъй като може да преодолее повечето от механизмите на резистентност към β-лактами, като различни β-лактамази, вкл. карбапенем-хидролизиращи ензими,

принадлежащи към класове A, B и D; мутации във външномембранни порини и ефлуксни помпи, водещи до тяхната свръхекспресия. CFDC е единственото ново съединение с добра активност срещу CRAB (Ito-Horiyama et al. 2016; Poirel et al. 2018; Bassetti et al. 2022).

Според най-съвременните данни CFDC осигурява високата степен на микробиологична ерадикация и клинично излекуване на инфекциите, причинени от терапевтично проблемни *P. aeruginosa*, поради което се явява важна опция в лечението на инфекции, асоциирани с XDR и CRPA щамове, вкл. продуценти на MBLs, а също и при тежко клинично протичане (Canton et al. 2022; Losito et al. 2022). Докладвани са CFDC-резистентни изолати *P. aeruginosa* (Stoikov et al. 2023), някои от които придобиват устойчивост към антибиотика по време на продължително лечение (Teran et al. 2023).

Към днешна дата само няколко антибиотика са активни срещу CRAB инфекции и CFDC се утвърждава като важна терапевтична алтернатива на colistin (COL) (Shields et al. 2023b). Освен това настоящите препоръки за лечение на PDR-AB инфекции също включват CFDC, ако е наличен за клинична употреба, в допълнение към дълго използваната тройна комбинация от COL, висока доза MEM и висока доза ampicillin-sulbactam за тези инфекции (Piperaki et al. 2019). Въпреки това е докладвана резистентност към CFDC в някои кохортни проучвания, включващи CRAB изолати (Iregui et al. 2020; Mushtaq et al. 2020).

При изолатите *S. maltophilia* МПК на CFDC може да показва широк диапазон, но $МПК_{90}$ обикновено кореспондират с чувствителност (Delgado-Valverde et al. 2020; Biagi et al. 2020b). Следва да се подчертае и неговата *in vitro* активност спрямо изолати, резистентни на SXT, levofloxacin и COL (Biagi et al. 2020b). Все още клиничният опит в лечението на инфекции, причинени от *S. maltophilia*, е ограничен.

2.7.6. Eravacycline (ERV)

ERV е нов, напълно синтетичен флуороциклин, аналог на tetracycline, който е одобрен от FDA (2018 г.) за лечение на cIAIs, причинени от чувствителни микроорганизми, при възрастни пациенти над 18 години (U.S. Food and Drug Administration 2018b). Той проявява стабилност срещу ефлуксните помпи и рибозомните защитни протеини, които обикновено придават резистентност към други членове на клас „Тетрациклини“ (Zhanel et al. 2016).

In vitro ERV демонстрира по-ниски МПК срещу CRAB отколкото tigecycline и запазва активността си срещу изолати, съдържащи гени на тетрациклинова ефлуксна помпа. Също така притежава надеждна активност спрямо продуценти на OXA-тип

карбапенемази и COL-резистентни изолати *A. baumannii* (Seifert et al. 2018, 2020; Morrissey et al. 2020). Към момента няма установени критерии за интерпретация на чувствителността на *Acinetobacter* spp. към ERV.

Въпреки включването на ERV в лечението на усложнени инфекции, причинени от MDR Грам-отрицателни патогени, все още данните за употребата му при *S. maltophilia* инфекции са оскъдни (Alosaimy et al. 2020). В скорошно проучване се съобщават до 4 пъти по-ниски МПК на ERV, сравнени с тези на tigecycline, както и $МПК_{90}$=2 μg/ml спрямо тестваните клинични изолати *S. maltophilia* (Morrissey et al. 2020).

2.7.7. Sulbactam-durlobactam (SUL-DUR)

SUL-DUR (XACDURO®) е нов комбиниран антибактериален препарат, разработен специално за лечение на инфекции, причинени от ABC complex, вкл. терапевтично проблемни CRAB (Keam 2023). DUR е диазабициклооктанон β-лактамазен инхибитор с мощна активност срещу широк спектър от серин-съдържащи β-лактамази, който приложен в комбинация със SUL (утвърден инхибитор на β-лактамази от клас A с присъща активност срещу *A. baumannii* поради афинитет към PBP1 и PBP3), предотвратява разграждането на SUL от произведени от ABC изолати β-лактамази от молекулярни класове A, C и D.

През май 2023 г. SUL-DUR е одобрен в САЩ за клинична употреба при пациенти на 18 и повече години за лечение на HAP и VAP, причинена от чувствителни изолати ABC complex (U.S. Food and Drug Administration 2023). Одобрението от FDA е базирано на приключила фаза 3 на клинично проучване ATTACK, което сравнява SUL-DUR с COL, и двата препарата в комбинация с IMP, за лечение CRAB-асоциирани HAP, VAP и бактериемия (Kaye et al. 2023). Резултатите показат, че SUL-DUR не е по-слабо ефективен от COL за CRAB инфекции, като същевременно притежава много по-благоприятен профил на безопасност. При силно ограничените възможности за лечение на тежки CRAB инфекции, SUL-DUR е обещаващо терапевтично средство.

2.8. Резистомен анализ, базиран на целогеномно секвениране (WGS)

2.8.1. WGS на бактериални геноми – характеристики, видове и приложение.

WGS е приет в световен мащаб като метод на избор за изследвания на резистоми на клинично значими микроорганизми (Beg and Khan 2019). Първият секвениран геном на свободно живеещ микроорганизъм е този на *Haemophilus influenzae Rd.* Идентифицирани са няколко генетични детерминанти, участващи в антибиотичната резистентност

(Fleischmann et al. 1995). През следващите години са секвенирани геноми на голям брой бактериални щамове, вкл. НФГБ, като *P. aerugiosa* PAO1, *A. baumannii* AYE (епидемичен MDR-AB щам във Франция) и *S. maltophilia* K279a (клиничен изолат от кръв) (Stover et al. 2000; Fournier et al. 2006; Crossman et al. 2008). Дори в ранните етапи на своето развитие WGS се налага като ценна техника, предоставяща важни геномни характеристики: гени с участие в бактериалната регулация, катаболизъм, транспорт, ефлукс и хемотаксис, също и асоциирани с адаптивните механизми и лекарствената резистентност (Peykov and Strateva 2023). Трябва да се отбележи, че тогава методът не намира широко приложение поради високата си цена, дължаща се на използваните подходи на секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидеоксинуклеотиди. Разработването на нови технологии за секвениране, обединени под общия термин „секвениране от следващо поколение“ (Next Generation Sequencing – NGS), революционизира изследването на бактериалните геноми поради значително намалената им цена и подобрената времева ефективност (Behjati and Tarpey 2013). Геномът на *A. baumannii* ATCC 17978 е сред първите, получени чрез NGS подхода, известен като пиросеквениране с висока плътност (Smith et al. 2007a). Генерирани са 22 скафолди, чиято дължина варира от 6199 базови двойки (bp) до 1 257 593 bp. Всички „дупки“ впоследствие са запълнени чрез PCR-базирани подходи. Те добавят общо 30 304 bp, което показва, че пиросеквенирането ефективно определя 99.24% от общата хромозомна последователност.

Усъвършенстването на WGS през годините го превръща в предпочитана техника не само за научноизследователски цели, но и в клиничната микробиология, напр. за идентифициране на изолати, определяне на профилите на антимикробна резистентност (AMR) и изследване на епидемии. Добър пример за такова приложение е програмата за надзор на инфекции, пренасяни с храни, предоставена от глобалната лабораторна мрежа PulseNet. Участващите лаборатории избират WGS пред PFGE като основен инструмент за мониторинг поради демонстрираната превъзходна чувствителност, специфичност и по-навременно откриване на епидемични взривове (Nadon et al. 2017).

Методите от второ поколение, базирани на секвениране чрез синтез (SBS), са най-предпочитаният избор главно поради тяхната най-висока ефективност на разходите за анализ сред всички съществуващи NGS технологии. Тези подходи произвеждат милиони до милиарди кратки прочити (англ. reads) с присъщи по-високи нива на грешка в сравнение със Sanger секвенирането (Fuller et al. 2009). Сглобяването на генома от тези прочити може да бъде извършено *de novo* или чрез картографирането им към референтен щам (Su et al. 2019). По-ниската точност на SBS диктува, че всеки секвениран бактериален геном трябва

да бъде генериран като набор от консенсусни нуклеотидни последователности, които са съставени от много припокриващи се секвенционни прочити. Късата дължина на отделните секвенционни прочити влияе върху нивото на сглобяване на *de novo* секвенираните геноми, което води до производството на драфт (англ. draft) версии, съставени от десетки до стотици неподредени части, наречени контиги (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/help/). Линейният ред на такива сегменти не може да бъде определен от асемблерите на ДНК, но може да бъде оценен след това чрез сравнение с един пълен референтен геном посредством самостоятелни софтуерни инструменти или чрез множество референтно-базирани скафолди, които използват набор от референтни геноми (Kolmogorov et al. 2014, 2018; Liu et al. 2022c).

Един от недостатъците на *de novo* сглобените бактериални геноми от къси секвенционни прочити засяга способността ни да локализираме идентифицираните AMR детерминанти. В такива драфт нуклеотидни последователности прекъсванията на контига обикновено се причиняват от наличието на повтарящи IS елементи, транспозони, клъстерирани редовно разпределени къси палиндромни повторения (CRISPR), рРНК гени и др. Някои от най-обезпокоителните механизми на резистентност в НБГБ включват производството на VIM- и IMP-тип MBLs в *P. aeruginosa* и придобиването на *sul* гени, които са част от 3' консервативни краища на интегрони от клас 1 в *S. maltophilia*, така че това ограничение не е незначително. От друга страна референтно-базираното геномно сглобяване няма проблеми с подреждането на контиги, но се изисква наличието на висококачествен референтен геном. Откриването на SNPs става по-малко точно, когато изследваният изолат и референтният щам не са високо идентични. Това може да повлияе на правилното откриване на хромозомни мутации със значителен принос към AMR в НФГБ, като тези, открити в QRDR регионите на *gyrA* и *parC* или асоциираните с резистентност към полимиксини в различни гени (Peykov and Strateva 2023).

За секвениране на геноми на клинично значими патогени, в т.ч. на терапевтично проблемни НФГБ, се използват основно два вида NGS методологии, базирани на SBS. Това са технологията Illumina, разработена за първи път от *Solexa and Lynx Therapeutics* и DNA nanoball подходът, комерсиализиран от *BGI Group* (Drmanac et al. 2010; Buermans and den Dunnen 2014). Сравнителните анализи показват, че платформите, основани на тяхното приложение, произвеждат данни със сравними величини на грешки и могат да се използват взаимозаменяемо за секвениране на генома (Korostin et al. 2020).

В наши дни NGS може да се осъществи и чрез използване на дълги секвенционни прочити, генерирани от платформата Oxford Nanopore Technologies (ONT). Методологията

за секвениране на ДНК чрез преминаване на дълги ДНК молекули през пори с малък диаметър и измерване на токовете при преминаване на всеки нуклеотид може да се счита за технология от „четвърто поколение“ (Slatko et al. 2018). Характеризира се с производството на много дълги прочити (от стотици килобази до мегабази), които могат да обхванат повтарящите се региони в бактериалните геноми, но имат значително по-висок процент грешки в сравнение с тези, генерирани от SBS методите. Дългите прочити могат да се използват за генериране на висококачествени пълни циркулярни бактериални геноми (вкл. плазмидите като отделни нуклеотидни последователности). Основните ограничения на ONT платформите все още са по-високата цена и допусканите грешки в секвенциите. Най-ефективният подход за преодоляване на ограниченията на двете технологии е да се използва хибридна стратегия за сглобяване, която използва ONT и SBS секвенционни прочити заедно (Chen et al. 2020).

2.8.2. WGS-базиран резистомен анализ на MDR НФГБ от България

В първото българско проучване Kostyanev et al. извършват WGS на пет клинични щама CRPA, получени от различни пациенти в две болници в София (Kostyanev et al. 2020). Използвана е комбинация от секвениране с къса рамка на четене, проведено в Illumina MiSeq платформа в режим на прочити с 2 x 250-bp свързани краища, и ONT MinION секвениране с дълга рамка на четене. Установено е, че петте изолата са клонално свързани, всички принадлежат към високорисковия епидемичен ST654 и всички притежават *bla*$_{\text{NDM-1}}$ гени. Комбинацията от приложени технологии за секвениране е позволила хибридното сглобяване на един геном на ниво хромозома (GCF_021378395.1). Това е първият пълен геном на *P. aeruginosa*, описан в изследване от Балканите. Неговият анализ разкрива нов клас 1 интегрон In*1884*, съдържащ 5' CS–*bla*$_{\text{GES-5}}$/*aadB*–3' CS генна касета.

В наскоро проведено проучване *Stoikov* и колектив извършват детайлен WGS-базиран резистомен анализ на три епидемиологично несвързани клинични MDR-PA изолата, получени от различни източници (гърлен секрет, урина и кръв) на трима пациенти от София в периода 2018–2022 г. (Stoikov et al. 2023). NGS е извършено на платформи с къса рамка на четене от второ поколение на Illumina, следвайки стандартната за целта процедура. Изолираната геномна ДНК впоследствие е използвана и за секвениране с дълга рамка на четене чрез устройство MinION (ONT, UK), като преди зареждане подготвената секвенционна библиотека е била пречистена чрез магнитни зърна, за да се изключат фрагменти по-къси от 1.5 kb. Авторите откриват за първи път в България IMP-тип MBL-продуциращи *P. aeruginosa*. В единия изолат е идентифициран нов плазмидно-кодиран *bla*$_{\text{IMP-100}}$ алел, разположен в нов In*4886* интегрон, който е вмъкнат в предполагаем Tn*7700*

транспозон. Той притежава още един кодиращ ген за MBL (*bla*$_{VIM-4}$) и се отнася към международния високорисков клон ST233 (del Barrio-Tofiño et al. 2020). В другите два изолата, принадлежащи към асоциирания с IMP носителство ST621 клон (Giani et al. 2018), са установени тясно свързани хромозомни IMP варианти, съотв. IMP-13 и IMP-84. Кодиращите гени за тези MBLs са разположени в In*320* интегрон, вмъкнат в Tn*5051*-like транспозон. Резистомният анализ открива разнообразие от AMR детерминанти, определящи резистентност към различни класове антибиотици: β-лактами, аминогликозиди, хинолони, сулфонамиди и фениколи.

В периода 2019–2024 г. са извършени и публикувани няколко наши проучвания, в които са представени резултатите от резистомен и вируломен анализ на XDR-PA, XDR-AB и *S. maltophilia*, изолирани от различни университетски болници в България.

2.9. Заключение на литературния обзор

P. aeruginosa и *A. baumannii* от група „НФГБ“ имат основно участие в глобалната епидемия от трудни за лечение инфекции, причинени от бактерии с MDR. Те са определени съответно като „сериозна“ и „спешна“ заплаха за общественото здраве от CDC, а CRPA и CRAB попадат в списъка на СЗО с критично приоритетни патогени за разработване на нови антибиотици (Tacconelli et al. 2018). Ролята на *S. maltophilia* като терапевтично проблемен етиологичен агент на ИСМО в ICUs, животозастрашаващи инфекции при имунокомпрометирани пациенти и тежки белодробни инфекции при МВ и COVID-19 също е безспорна. BSIs се асоциират с висок леталитет (до 69%), особено при при пациенти с онкохематологични заболявания, предишна химиотерапия, хипоалбуминемия, пневмония, септичен шок, неподходяща емпирична антимикробна терапия и резистентност на изолатите към флуорохинолони (Brooke 2021).

Надзорът на AMR и изследването на вътреболничните взривове са задължителни за ограничаване на нозокомиалните инфекции, причинени от НФГБ, особено в ICUs. Анализът на AMR в европейския регион на СЗО през 2019 г. показва драстични разлики в пропорциите на НФГБ с резистентност към ключови антибиотици в различните държави от ЕС и ЕИП (Mestrovic et al. 2022). Забелязва се трайна тенденция за увеличаване на MDR изолати по осите „запад–изток” и „север–юг”, което подчертава Балканите, в частност България, като регион с висок приоритет. Според надзорния доклад на ECDC данните за 2020 г. на Балканите са особено тревожни. Честотата на инвазивните карбапенем-резистентни *Acinetobacter* spp. и *P. aeruginosa* надвишава съответно 80% и 30%, а на MDR

Acinetobacter spp. е над 70% във всички държави от региона (European Centre for Disease Prevention and Control 2022).

Нарастващата заплаха от разпространение на терапевтично проблемни НФГБ е резултат от изключителния им капацитет да развиват AMR чрез хромозомни мутации, нарастващото разпространение на преносими AMR детерминанти (като карбапенемази и ESBLs) и глобалното разширяване на епидемичните линии. Това налага нуждата от проследяване на актуалните механизмите на резистентност, особено при международните високорискови клонове, и проучвания върху ефективността на одобрените в последните няколко години антибиотици в борбата с инфекциите, причинени от XDR НФГБ. От друга страна за разработването на нови терапевтични подходи е нужно познаване на взаимодействията между бактериалните клетки и макроорганизма, което включва фактори на вирулентност, формиране и динамика на биофилми, заедно с генетичните механизми, които ги определят.

В съвременната наука и лабораторна практика нараства приложението на NGS на терапевтично проблемни микроорганизми, в частност НФГБ, поради широките му възможности за видова идентификация, резистомен и вируломен анализ, както и за изучаване на тяхната глобална популационна структура. Към настоящия момент са публикувани резултати само от NGS проучвания, включващи единични CRPA изолати от България, и липсват такива върху *A. baumannii* и *S. maltophilia*.

Настоящият дисертационен труд включва микробиологични, епидемиологични и геномни проучвания върху основните НФГБ патогени, проведени за 20-годишен период (2004–2023). Представени са хронологичните тенденции в антибиотичната резистентност и свързаните с нея механизми сред нозокомиални MDR изолати *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia* от няколко университетски болници в България. Друг акцент в работата е изследването на непроучени механизми, въвлечени в патогенезата на инфекциите (фактори на вирулентност и образуване на биофилм). За реализиране на поставените задачи са използвани разнообразни микробиологични, молекулярно-генетични и геномни техники. Липсата на достатъчно опит с NGS в страната ни мотивира да започнем да го прилагаме като комплексен подход за идентификация, типизиране, резистомен и вируломен анализ на терапевтично проблемни НФГБ изолати, циркулиращи в българските болници.

3. 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 антимикробни 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 антимикробни 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 високорезолюционно 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.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. Бактериални щамове

4.1.1. 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 периодично от няколко колабориращи лаборатории 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. / 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*.

Разпределение на щамовете по място на изолиране

Проучените НФГБ щамове бяха изолирани предимно от хоспитализирани пациенти, лекувани в общо 11 университетски болници в България. На **Таблици 8.–10.** е представено разпределение на щамовете по място и периоди на изолиране.

Таблица 8. Разпределение на изследваните щамове *P. aeruginosa* по място на изолиране.

Лечебно заведение	Период на изолиране	Брой изолати
УМБАЛ "Св. Иван Рилски" – София	2004–2009 2015–2016 2019–2020 2022	55 2 5 2
УМБАЛ "Александровска" – София	2005–2009	62
СБАЛББ "Св. София" – София	2004	38
ВМА – 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 9. Разпределение на изследваните щамове *A. baumannii* по място на изолиране.

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

Забележка: В настоящото проучване беше охарактеризиран и един щам *A. nosocomialis* от ABC complex, изолиран през 2014 г. във ВМА – София.

Таблица 10. Разпределение на изследваните щамове *S. maltophilia* по място на изолиране.

Лечебно заведение	Период на изолиране	Брой изолати
ВМА – София	2011–2016	151
УМБАЛ "Лозенец" – София	2021–2023	44
УМБАЛ "Св. Иван Рилски" – София	2015 2018–2022	1 19
УМБАЛ "Св. Марина" – Варна	2020–2023	14
УУМБАЛ „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**

Разпределение на щамовете по материали

Проучените щамове *P. aeruginosa* бяха изолирани предимно от материали от долни дихателни пътища (ДДП) (34.3%), урина (33.5%) и хирургични рани / абсцеси (15.7%). Тяхното разпределение е показано в **Таблица 11.**

Таблица 11. Разпределение на изследваните изолати *P. aeruginosa* по 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).

При *A. baumannii* преобладаваха изолатите от ДДП на критично болни пациенти (53.4%) и тези от хирургични рани или абсцеси (19.4%) (**Таблица 12).** Общо 20.5% (15 от 73) от CRAB изолатите от ICUs през 2017–2022 г. бяха от пациенти с COVID-19 (2021 г.).

Таблица 12. Разпределение на изследваните изолати *A. baumannii* по материали.

Материал	**Брой**	**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).

Въпреки разнообразния произход на изолатите *S. maltophilia* (клинични източници и болнична среда), преобладаващата част също бяха от респираторен тракт, съотв. 38.8% от ДДП и 13.2% от горни дихателни пътища (ГДП), следвани от тези от хирургични рани или абсцеси (12%) (**Таблица 13**). Следва да се отбележи, че 20% от всички щамове в настоящото проучване (50/250) бяха изолирани от респираторни секрети на пациенти с COVID-19 в критично състояние, лекувани в интензивните клиники на УМБАЛ „Лозенец“ (*n* = 40), УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (*n* = 7) и УМБАЛ „Св. Марина“ (*n* = 3) в разгара на пандемията (октомври 2021 – февруари 2022).

Таблица 13. 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).

4.1.2. Референтни бактериални щамове

Като контролни щамове при извършването на видова идентификация чрез биохимични и молекулярно-генетични методи, както и при изпитване чувствителността на изолатите към АМЛС, бяха използвани следните референти щамове: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 19606, *A. nosocomialis* (genomic species 13 TU) ATCC 17903 и *S. maltophilia* ATCC 13637 (Microbiologics, USA). *A. baumannii* ATCC 19606 беше използван като контролен щам при анализите на QRDR региона (резистентност към флуорохинолони) и гените, асоциирани с транспорт на Fe (резистентност към cefiderocol), на проучените в настоящата работа клинични изолати *A. baumannii*. WGS-базираният вируломен анализ на тестваните изолати *S. maltophilia* беше проведен спрямо генома на референтния щам *S. maltophilia* K279a (Crossman et al. 2008).

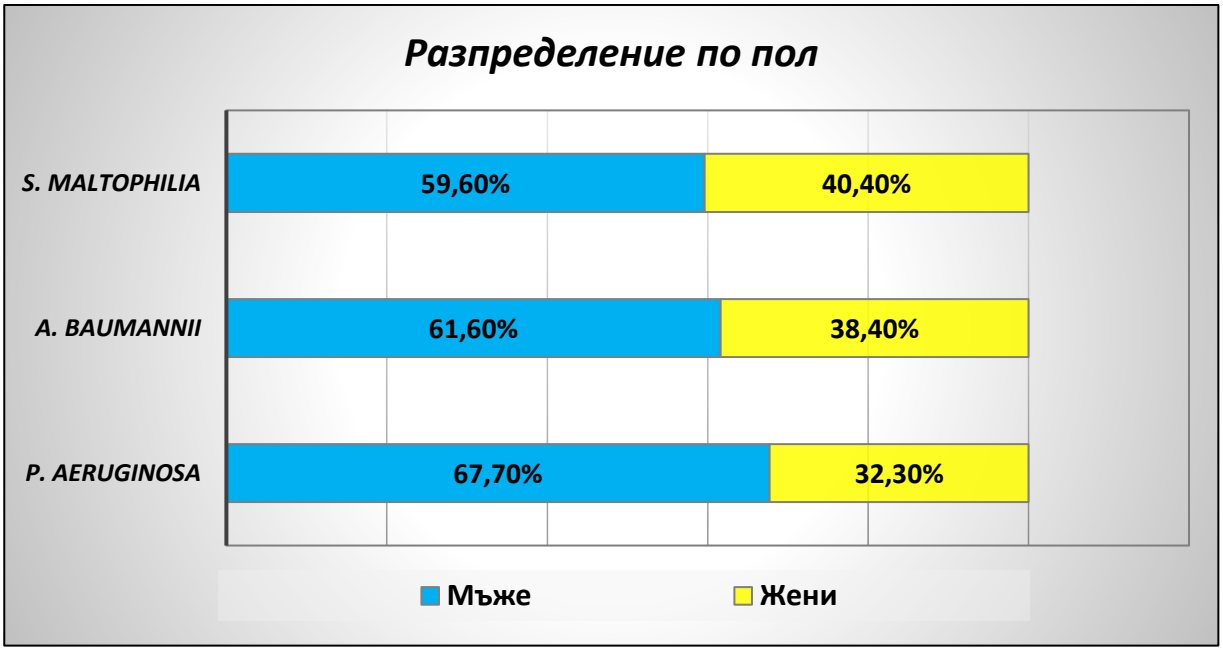
Всички НФГБ щамове бяха съхранявани в Skim milk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) при температура -70 º C. Щамовете бяха култивирани на MacConkey agar (Liofilchem, Roseti degli Abruzzi, Italy), като при съживяване беше извършвано предварително култивиране в Tryptic Soy Broth (Liofilchem).

4.1.3. Предварителна идентификация на изследваните щамове

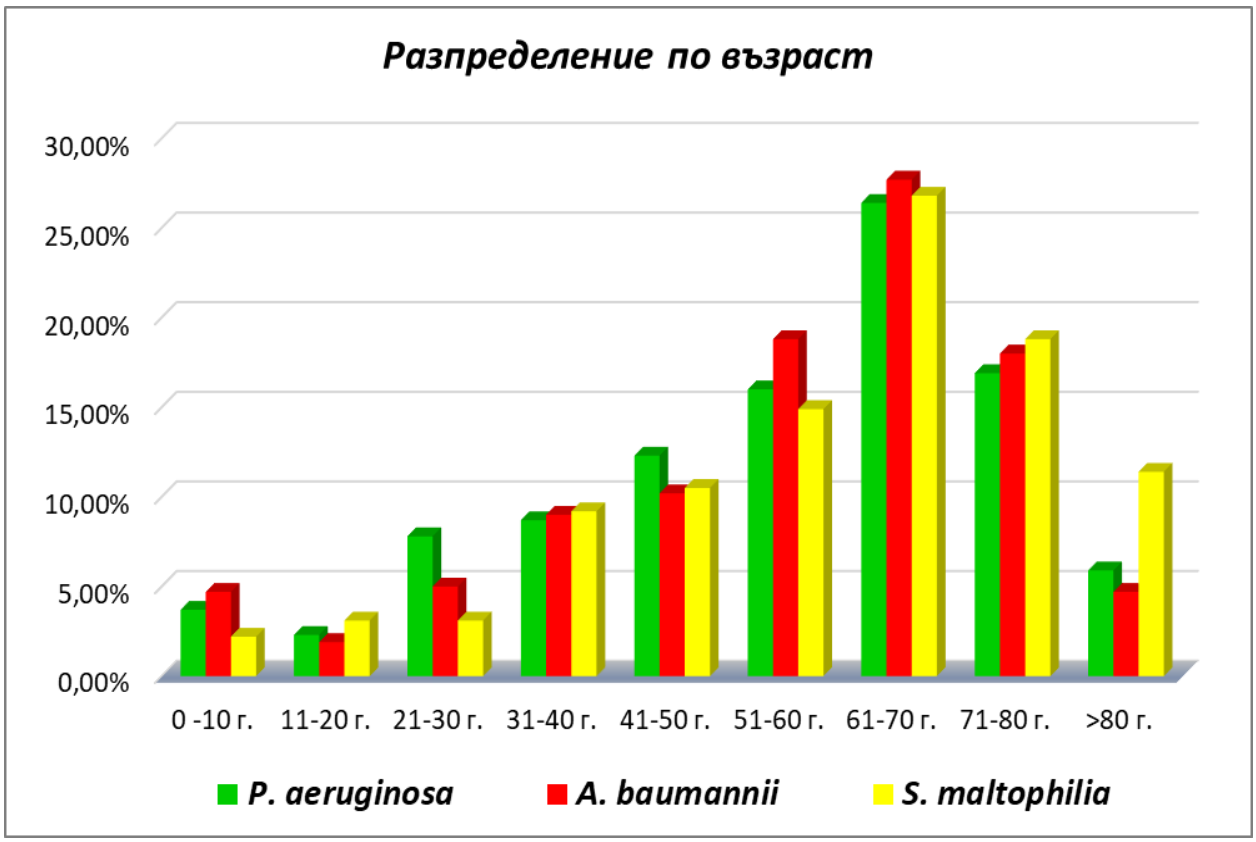
За видова идентификация на бактериалните изолати бяха използвани набор от мануални биохимични тестове (Трифонова 2020), полуавтоматизиран кит BBL Crystal Enteric/Nonfermenter (E/NF) ID (BD, Franklin Lakes, NJ USA), автоматизирани системи VITEK 2 (bioMérieux, Marcy-l'Ėtoile, France), BD Phoenix M50 (BD) и Bruker Microflex LT MALDI-TOF System (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Изпълнението на процедурите беше според изискванията на фирмата производител.

4.2. Изследвани пациенти

На **Фигура 7.** е представено разпределението по пол на изследваните пациенти с установена инфекция, причинена от трите проучени НФГБ, а на **Фигура 8.** – 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 7. Процентно разпределение по пол на изследваните пациенти (n = 914) с установена инфекция, причинена от *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*.



Фигура 8. Възрастово разпределение на изследваните пациенти (*n* = 914) с установена инфекция, причинена от *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*.

Всички клинични изолати *A. baumannii* от УМБАЛ „Александровска“ в периода октомври 2016 г. – септември 2018 г. (*n* = 23) бяха получени от 21 пациенти в критично състояние, провеждали бъбречнозаместителна терапия (БЗТ) в КАИЛ по повод на остро бъбречно увреждане (*n* = 16) или обострено терминално хронично бъбречно заболяване (*n* = 5). При преобладаващата част от пациентите беше проведено интермитентно хемодиализно лечение със средна продължителност 4 астрономически часа на курс. При 6 пациенти беше приложена продължителна вено-венозна хемодиафилтрация, като при 1 от тях тя беше редувана с бавна продължителна ултрафилтрация.

Освен демографски характеристики, за всички пациенти, засегнати от *S. maltophilia*-асоциирани ИСМО (*n* = 244) от 2011 до 2023 г., беше събрана информация за основното заболяване, което е довело до хоспитализация. Разпределението на пациентите според първичната диагноза е извършено според *Единадесета ревизия на Международната статистическа класификация на болестите и проблемите, свързани със здравето (МКБ-11)*, и е показано в **Таблица 14.** (World Health Organization 2018). Най-често инфекциите, причинени от *S. maltophilia*, засягаха пациенти със заболяване на дихателната система, в т.ч. бронхиектатична болест, ХОББ и пневмония (27.9%; *n* = 68), следвани от пациенти с

инфекциозни заболявания (22.1%; *n* = 54, от които 50 с COVID-19). Голям беше относителният дял на пациентите с малигнени заболявания (солидни тумори и онкохематологични), развили нозокомиална инфекция със *S. maltophilia* (съответно нозологични класове 2. и 3. в приложената класификация).

Таблица 14. Първична диагноза на пациентите, страдащи от инфекции със *S. mltophilia*, според МКБ-11.

Нозологичен клас по МКБ	**Брой (%)**
1. Инфекциозни или паразитни заболявания	**54 (22.1)**
2. Новообразувания	30 (12.3)
3. Заболявания на кръвта или кръвотворните органи	15 (6.1)
5. Ендокринни, хранителни или метаболитни заболявания	7 (2.9)
11. Заболявания на кръвоносната система	33 (13.5)
12. Заболявания на дихателната система	**68 (27.9)**
13. Заболявания на храносмилателната система	18 (7.4)
15. Заболявания на опорно-двигателния апарат или съединителната тъкан	5 (2.0)
16. Заболявания на пикочно-половата система	8 (3.3)
22. Нараняване, отравяне и някои други последици от въздействието на външни причини	6 (2.5)
ОБЩО	**244 (100)**

4.3. Изпитване на чувствителност към АМЛС

Чувствителността на всички НФГБ изолати беше изпитана чрез ***дисково-дифузионния метод (ДДМ)*** върху средата Cation-Adjusted Mueller-Hinton (CAMH) Agar (Liofilchem) с търговски антибиотични дискове според микробния вид: piperacillin (30 µg), piperacillin-tazobactam (30-6 µg), ceftazidime (10 µg), ceftazidime-avibactam (10-4 µg), cefepime (30 µg), cefiderocol (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), doripenem (10 µg), aztreonam (30 µg), amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), tobramycin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), levofloxacin (5 µg), ampicillin-sulbatam (10-10 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25-23.75 µg) и minocycline (30 µg).

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^{TM} 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. – напр. чувствителност на *A. baumannii* към ampicillin-sulbactam (SAM) и на *S. maltophilia* към LVX, MIN, CAZ, TCC и CHL. Граничните стойности на МПК в документите на EUCAST, представени за *Enterobacterales*, бяха приложени за тълкуване на чувствителността на *A. baumannii* към TGC (МПК ≤0.5 mg/L съответстват на чувствителност и >0.5 mg/L означават резистентност).

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

Категоризирането на терапевтично проблемните *P. aeruginosa* се основава на следните групи АМЛС: аминогликозиди (AMK, GEN, TOB), карбапенеми (IMP, MEM, DOR), антипсевдомонадни цефалоспорини (CAZ, FEP), антипсевдомонадни флуорохинолони (ciprofloxacin (CIP), LVX), антипсевдомонадни пеницилини + β-лактамазни инхибитори (piperacillin-tazobactam (TZP), TTC), монобактами (aztreonam – ATM), фосфонови киселини (fosfomycin) и полимиксини (COL, polymyxin B). При *Acinetobacter* spp. не се разглеждат монобактами и фосфонови киселини, но в съображение влизат три допълнителни групи: пеницилини + β-лактамазни инхибитори (SAM), инхибитори на фолатния път (SXT) и тетрациклини (Magiorakos et al. 2012).

Според въведените от Magiorakos et al. критерии, като MDR *P. aeruginosa* (**MDR-PA**) и *A. baumannii* (**MDR-AB**) бяха определени изолатите с придобита нечувствителност към поне 1 препарат в 3 или повече от изброените групи (категории) АМЛС; **XDR-PA** и **XDR-AB** – нечувствителните към поне 1 препарат във всички, с изключение на 2 или 1 от

изброените групи (категории) АМЛС; и **PDR-PA** и **PDR-AB** – нечувствителните към всички изброени 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).

4.4. Молекулярно-генетични техники

4.4.1. 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. Първоначално щамовете се култивираха върху MacConkey агар за 18–24 часа, след което 2-3 морфологично еднакви колонии се суспендираха в Tris-EDTA (TE) буфер (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH ~8.0-8.3). Получените суспензии бяха центрофугирани на 10 000 rpm за 2 min. Следващите стъпки включваха: отпипетиране на супернатантата, ресуспендиране на утайката в TE буфер и термична обработка на пробите на 100 °C за 10 min (Стратева 2008). Получените термоекстракти бяха съхранявани във фризер на -70 °C до използването им.

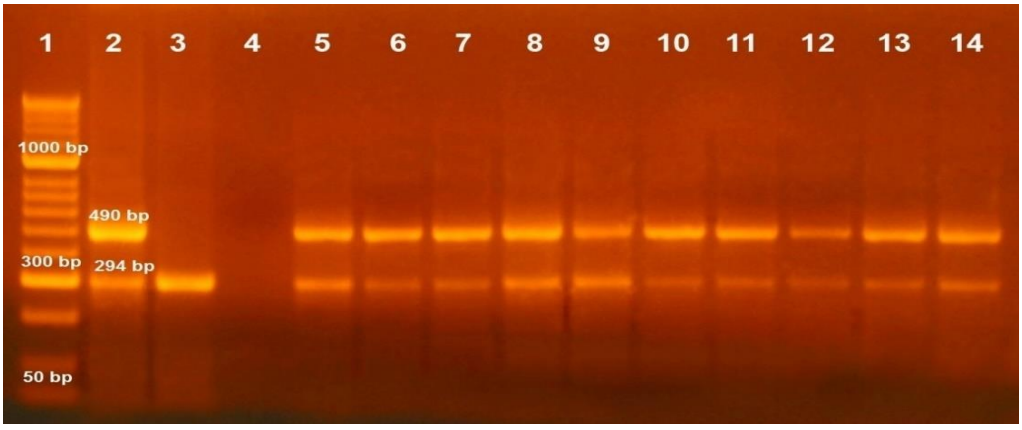
Изолиране на обща ДНК от изолатите *A. baumannii* и *S. maltophilia* беше извършено чрез DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilgen, Germany) според инструкциите на производителя от 3-mL 24-часова течна култура в Brain Heart Infusion (Liofilchem), получена от единична колония. От CRAB изолати, показали присъствие едновременно на $bla_{\text{OXA-23}}$ и *armA*, беше изолирана плазмидна ДНК чрез FlexiPrep Kit (GE Healthcare, Chicago, IL USA), която беше разделяна в 0.8% агарозен гел с включен етидиев бромид.

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 x 10^8 бактериални клетки и следвайки предоставения протокол за бактерии. Незадължителният етап на разграждане чрез ДНК-аза в колона също беше извършен, за да се елиминира останалата ДНК в препаратите. Добивът и чистотата на получените нуклеинови киселини бяха оценени чрез спектрофотометър BioDrop DUO+ (Biochrom, Cambridge, UK).

4.4.2. Полимеразна верижна реакция (PCR) за видова идентификация

***A. baumannii*:** Беше приложена PCR за детекция на *gyrB* (ген, кодиращ субединица B на ензима гираза), която позволява успешно разграничаване на биохимично неразличимите видове от група ABC complex (Higgins et al. 2007). Използвани бяха три праймера, два от които универсални за видовете *A. baumannii* и *A. nosocomialis* (преди *Acinetobacter* genomic species 13 TU): sp4F (5'-CACGCCGTAAGAGTGCATTA-3') и sp4R (5'-AACGGAGCTTGTCAGGGTTA-3'), а третият sp2F (5'-GTTCCTGATCCGAAATTCTCG-3'), различаващ се в 3' края си при *A. nosocomialis*. И двата вида с посочените три праймера амплифицират продукт с големина 294 bp, но само *A. baumannii* амплифицира и втори продукт с големина 490 bp (**Фигура 9**). Щамове, отнасящи се към други видове от род *Acinetobacter*, не амплифицират PCR-продукт в тази реакция.

Реакциите на амплификация бяха извършвани в Gene Pro Thermal Cycler (Bioer), в обем 25.0 μL, като крайната концентрация на микса за всяка проба съдържаше: 2 μL ДНК, 0.1 μM от всеки праймер, 12.5 μL MyTaq PCR mix (Bioline, UK) и 8.5 μL ултрачиста 18.2 MΩ PCR H_2O (Bioline). След начална денатурация за 5 min на 95 °C следваха 30 цикъла, всеки от които включваше по три стъпки от 45 s (денатурация на 95 °C, прикачване на праймерите на 60 °C и удължаване на веригата на 72 °C). Реакцията приключваше с крайна елонгация на веригата за 7 min на 72 °C. Отчитането на PCR-продуктите беше осъществено посредством стандартна агарозна електрофореза в 1.5 % гел, с предварително включен в него етидиев бромид (0.5 μg/mL), и наблюдавано с UV-трансилюминатор (BIO RAD Gel Doc 2000) при λ=312 nm.



Фигура 9. Видова идентификация чрез *gyrB* PCR (агарозна гел-електрофореза). Линия 1 – HyperLadder 50 bp, линия 2 – *A. baumannii* ATCC 19606, линия 3 – *A. nosocomialis* (genomic species 13 TU) ATCC 17903, линия 4 – отрицателна контрола, линии 5-14 – клинични щамове *A. baumannii*.

***S. maltophilia*:** Беше приложена PCR за откриване на 278-bp фрагмент от 23S рРНК гена, с използване на специфични праймери и условия на амплификация, описани по-рано (Gallo et al. 2013) и представени в **Таблица 15.**

Таблица 15. PCR 23S рРНК метод за идентификация на *S. maltophilia*.

Праймерна двойка, нуклеотидна последователност (5′ – 3′): Pr F: GCTGGATTGGTTCTAGGAAAACGC Pr R: ACGCAGTCACTCCTTGCG			
Протокол за амплификация:			
1		94 °C	5 min
2	30 цикъла	94 °C 68 °C 72 °C	45 sec 45 sec 45 sec
3		72 °C	10 min
Продукт: 278 bp			

4.4.3. PCR за детекция на детерминанти на антимикробна резистентност

PCR за детекция на ключови AMR детерминанти при трите вида НФГБ беше провеждана в обем 25.0 µL, като крайната концентрация на микса за всяка проба съдържаше: 2 µL ДНК, 0.1 µM от всеки праймер, 12.5 µL MyTaq PCR mix (Bioline) и 8.5 µL ултрачиста 18.2 MΩ PCR H_2O (Bioline).

Амплификацията беше извършена при еднакви условия за денатурация (5 min на 95 °C) и завършване на реакцията (7 min на 72 °C) и 30 цикъла с различни температура на прикачване на праймерите и време за удължаване на веригата, според последователността на конкретните използвани праймери и дължината на очаквания продукт. PCR продуктите бяха разделяни в 1.5% агарозен гел с включен етидиев бромид (0.5 µg/mL) или SimplySafe (0.05 µL/mL) (EURx, Gdansk, Poland), чрез стандартна електрофореза за 60–90 min на 110 V, след което наблюдавани с UV-трансилюминатор при λ=312 nm.

Олигонуклеотидите, използвани като праймери за амплификация, бяха синтезирани от Metabion (Germany) и проверени за специфичност с публикувани нуклеотидни последователности в сайта http://www.ncbi.nlm.nih.gov, с помощта на програмата BLAST.

4.4.3.1. AMR детерминанти при *P. aeruginosa*

Проучените изолати *P. aeruginosa* бяха подложени на скрининг за наличие на гени, кодиращи основни ESBLs (VEB и PER-тип), карбапенемази от молекулярни класове A и B,

и ArmA 16S рРНК метилаза, асоциирана с високо ниво на устойчивост към аминогликозиди. Олигонуклеотидите, използвани като праймери за амплификация, температурите на прикачване (хибридизация) и размерът на очакваните продукти са представени в **Таблица 16.**

Таблица 16. Олигонуклеотиди, използвани като праймери за амплификация на гени, кодиращи β-лактамази и 16S рРНК метилази в *P. aeruginosa*.

Праймерна двойка	Таргет	Нуклеотидна последователност (5' – 3') [a]	Размер на продукта (bp)	Ta (°C)	Литературен източник
VEB-F	VEB-тип ESBL	CGACTTCCATTTCCCGATGC	643	58	(Naas et al. 2006)
VEB-R		GGACTCTGCAACAAATACGC			
PER-F	PER-тип ESBL	ATGAATGTCATTATAAAAGC	926	50	(Claeys et al. 2000)
PER-R		AATTTG GGCTTAGGGCAGAA			
KPC-F	KPC-тип клас A карбапенемази	CTGTCTTGTCTCTCATGGCC	796	60	(Lixandru et al. 2015)
KPC-R		CCTCGCTGTRCTTGTCATCC			
VIM-F	VIM-тип MBLs	AGTGGTGAGTATCCGACAG	212	56	(Lixandru et al. 2015)
VIM-R		TCAATCTCCGCGAGAAG			
NDM-F	NDM-тип MBLs	TGGCAGCACACTTCCTATC	488	57	(Lixandru et al. 2015)
NDM-R		AGATTGCCGAGCGACTTG			
IMP-F	IMP-тип MBLs	GAAGGYGTTTATGTTCATAC	587	56	(Poirel and Nordmann 2002)
IMP-R		GTAMGTTTCAAGAGTGATGC			
ArmA-F	ArmA 16S рРНК метилаза	ATTCTGCCTATCCTAATTGG	315	56	(Doi and Arakawa 2007)
ArmA-R		ACCTATACTTTATCGTCGTC			

Ta, температура на хибридизация на праймерите (annealing); F, прав праймер; R, обратен праймер; ESBL, широкоспектърна β-лактамаза; MBL, метало-β-лактамаза. [a] R= G или A, Y = C или T, M = A или T.

4.4.3.2. AMR детерминанти при *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 CHDLs, карбапенемази от клас A, MBLs от клас B, ESBLs (PER и VEB), 16S рРНК метилази (ArmA) и дихидроптероат синтази (тип I). PCR амплификация и PCR картиращи експерименти бяха използвани за определяне на следните инсерционни последователности (ISs), асоциирани с CHDL структурни гени: IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* и

IS*Aba3*-like (Héritier et al. 2006). Списък на всички праймери, с изключение на общите с *P. aeruginosa* (за VEB-тип, PER-тип, KPC и ArmA ензими), е изложен в **Таблица 17.**

Таблица 17. Олигонуклеотиди, използвани като праймери за амплификация на гени за антимикробна резистентност в *A. baumannii*.

Праймерна двойка	Таргет	Нуклеотидна последователност (5' – 3') [a]	Размер на продукта (bp)	Ta (°C)	Литературен източник
OXA23L-F [b]	OXA-23-like CHDLs	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	58.3	(Woodford et al. 2006)
OXA23L-R [b]		ATTTCTGACCGCATTTCCAT			
OXA24L-F [b]	OXA-24/40-like CHDLs	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246	58.3	(Woodford et al. 2006)
OXA24L-R [b]		AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
OXA51L-F [b]	OXA-51-like CHDLs	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	58.3	(Woodford et al. 2006)
OXA51L-R [b]		TGGATTGCACTTCATCTTGG			
OXA58L-F [b]	OXA-58-like CHDLs	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	58.3	(Woodford et al. 2006)
OXA58L-R [b]		CCCCTCTGCGCTCTACATAC			
OXA143L-F	OXA-143-like CHDLs	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149	60	(Higgins et al. 2010b)
OXA143L-R		TAATCTTGAGGGGGCCAACC			
OXA235L-F	OXA-235-like CHDLs	TTGTTGCCTTTACTTAGTTGC	768	56	(Higgins et al. 2013)
OXA235L-R		CAAAATTTTAAGACGGATCG			
IS*Aba1*-F	IS*Aba1*	GTGCTTTGCGCTCATCATGC	435	60	(Poirel and Nordmann 2006)
IS*Aba1*-R		CATGTAAACCAATGCTCACC			
IS*Aba2*-F	IS*Aba2*	AATCCGAGATAGAGCGGTTC	1100	59	(Poirel and Nordmann 2006)
IS*Aba2*-R		TGACACATAACCTAGTGCAC			
IS*Aba3*-A	IS*Aba3*	CAATCAAATGTCCAACCTGC	403	58	(Poirel and Nordmann 2006)
IS*Aba3*-B	IS*Aba3*-like елемент	CGTTTACCCCAAACATAAGC	200	58.3	
IS*Aba3*-C		AGCAATATCTCGTATACCGC			
IMP-F [c]	IMP-тип MBLs	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232	58.5	(Poirel et al. 2011)
IMP-R [c]		GGTTTAAYAAAACAACCACC			
VIM-F [c]	VIM-тип MBLs	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390	58.5	(Poirel et al. 2011)
VIM-R [c]		CGAATGCGCAGCACCAG			
NDM-F [c]	NDM-тип MBLs	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621	58.5	(Poirel et al. 2011)
NDM-R [c]		CGGAATGGCTCATCACGATC			
Sul1-F	Дихидроптероат синтаза тип I	ACGGTGTTCGGCATTCT	581	53	(Barbolla et al. 2004)
Sul1-R		TTTGAAGGTTCGACAGC			

Ta, температура на хибридизация на праймерите (annealing); F, прав праймер; R, обратен праймер; CHDLs, карбапенем-хидролизиращи β-лактамази от клас D; IS, инсерционна последователност; MBLs, метало-β-лактамази. [a] Y = C или T; [b] Праймерни двойки, използвани в мултиплекс PCR за CHDL-кодиращи гени; [c] Праймерни двойки, използвани в мултиплекс PCR за MBL-кодиращи гени.

4.4.3.3. AMR детерминанти при *S. maltophilia*

Праймерните двойки, използвани за детекция на гени за дихидроптероат синтази, дихидрофолат редуктази и интегрази от клас 1–3, които медиират резистентност към SXT, са представени в **Таблица 18.**

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

Всички изолати *P. aeruginosa* бяха проучени за наличие на структурни гени за ефекторните протеини (цитотоксини), транспортирани и „инжектирани“ в клетките на гостоприемника чрез тип III секреторната система (T3SS): ExoS (екзоензим S), ExoT (екзоензим T), ExoU (екзоензим U) и ExoY (екзоензим Y). Изборът беше направен поради тяхната ключова роля в патогенезата на инфекциите, причинени от *P. aeruginosa*, и мониторирането им като маркери на вирулентност при охарактеризиране на глобалните високорискови клонове (del Barrio-Tofiño et al. 2020; Oliver et al. 2024).

За PCR скрининг при *A. baumannii* бяха избрани няколко гена, кодиращи фактори на вирулентност с разнородни функции, сред които основните са участие в бактериалната адхезия и биофилм образуването: *ompA* (кодиращ външномембранния протеин OmpA), *epsA* (капсулен екзополизахарид A / външномембранен протеин за износ на полизахариди), *csuE* (субединица E на тип 1 пилусна система Csu) и *bap* (биофилм-асоцииран Bap протеин, отговорен за вътреклетъчната адхезия в зрелия биофилм) (Da silva et al. 2021; Gedefie et al. 2021; Upmanyu et al. 2022).

Изолатите *S. maltophilia* бяха скринирани 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).

Амплификационните реакции бяха проведени с използване на следния протокол: начална денатурация на веригата при t=95 ºC за 5 min; последвана от 28–30 цикъла, включващи денатурация на 95 ºC за 35–45 s, прикачване на праймерите на 54–68.5 ºC за 45–50 s и удължаване на веригата на 72 ºC за 45 s до 90 s; и единично крайно удължаване на веригата на 72 ºC за 7 min. Олигонуклеотидите, използвани като праймери за амплификация (Metabion), температурите на прикачване (хибридизация) и размерът на очакваните продукти са представени в **Таблици 19.–21.**

Таблица 18. Олигонуклеотиди, използвани като праймери за доказване на гени, отговорни за резистентността към trimethoprim-sulfamethoxazole при *S. maltophilia*.

Праймерна двойка	Нуклеотидна последователност (5′– 3′)	Таргетен ген	Размер на продукт (bp)	Температура на хибридизация (°C)	Литературен източник
sul1-F sul1-R	ACGGTGTTCGGCATTCT TTTGAAGGTTCGACAGC	*sul1*	581	53	(Barbolla et al. 2004)
sul2-F sul2-R	GCAGGCGCGTAAGCTGA GGCTCGTGTGTGCGGATG	*sul2*	657	58	
sul3-F sul3-R	CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTTCG CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	*sul3*	991	69	(Chung et al. 2015)
dfrA1-F dfrA1-R	TTGTGAAACTATCACTAATGGTAG CTTGTTAACCCTTTTGCCAGA	*dfrA1*	480	62	(Hu et al. 2011)
dfrA5-F dfrA5-R	TCCACACATACCCTGGTCCG ATCGTCGATATATGGAGCGTA	*dfrA5*	300	62	
dfrA12-F dfrA12-R	ATGAACTCGGAATCAGTACGC ATCGTCGATATATGGAGCGTA	*dfrA12*	498	61	
dfrA17-F dfrA17-R	TTGAAAATATTATTGATTTCTGCAGTG GTTAGCCTTTTTTCCAAATCTGGTATG	*dfrA17*	475	68	
dfrA27-F dfrA27-R	AAGAGTCTGATCGCCCATGCCG TAAAGCAATAACTTACAATC	*dfrA27*	236	58	(Hu et al. 2016)
Int1-F Int1-R	CAGTGGACATAAGCCTGTTC CCCGAGGCATAGACTGTA	*intI1*	160	58	(Kaur et al. 2015)
Int2-F Int2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG CACGGATATGCGACAAAAAGGT	*intI2*	788	64	
Int3-F Int3-R	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG ACGGATCTGCCAAACCTGACT	*intI3*	979	66	

F – прав праймер; R – обратен праймер; *sul1*, *2*, *3* – гени, кодиращи дихидроптероат синтази тип 1, 2 и 3; *dfrA1*, *5*, *12*, *17*, *27* – гени, кодираши дихидрофолат редуктази; *intI1*, *intI2* и *intI3* – гени, кодиращ клас 1, 2 и 3 интеграза.

Таблица 19. Олигонуклеотиди, използвани като праймери за амплификация на гени, кодиращи T3SS ефекторните протеини на *P. aeruginosa*.

Праймерна двойка	Таргетен ген	Нуклеотидна последователност (5' – 3')	Размер на продукта (bp)	Ta (°C)	Литературен източник
exoS-F	*exoS*	CTTGAAGGGACTCGACAAGG	504	60	(Lanotte et al. 2004)
exoS-R		TTCAGG TCCGCGTAGTGAAT			
exoT-F	*exoT*	CAATCATCTCAGCAGAACCC	1159	58	(Finnan et al. 2004)
exoT-R		TGTCGTAGAGGATCTCCTG			
exoY-F	*exoY*	TATCGACGGTCATCGTCAGGT	1035	64	(Finnan et al. 2004)
exoY-R		TTGATGCACTCGACCAGCAAG			
exoU-F	*exoU*	GGGAATACTTTCCGGGAAGTT	428	60	(Allewelt et al. 2000)
exoU-R		CGATCTCGCTGCTAATGTGTT			

T3SS, тип III секреторна система; Ta, температура на хибридизация на праймерите (annealing); F, прав праймер; R, обратен праймер.

Забележка: Позициите на *exoS*, *exoT* и *exoY* в хромозомата на референтния щам *P. aeruginosa* PAO1 са в следните локуси: съотв. PA3841, PA0044 и PA2191. Генът *exoU* кореспондира с PS14 в остров на патогенност PAPI-2 на референтния *P. aeruginosa* PA14.

Таблица 20. Олигонуклеотиди, използвани като праймери за амплификация на гени, кодиращи фактори на вирулентност с участие в образуването на биофилм при *A. baumannii*.

Праймерна двойка	Таргетен ген	Нуклеотидна последователност (5' – 3')	Размер на продукта (bp)	Ta (°C)	Литературен източник
ompA-F	*ompA*	CGCTTCTGCTGGTGCTGAAT	531	62	(Tayabali et al. 2012)
ompA-R		CGTGCAGTAGCGTTAGGGTA			
epsA-F	*epsA*	AGCAAGTGGTTATCCAATCG	451	59	(Tayabali et al. 2012)
epsA-R		ACCAGACTCACCCATTACAT			
csuE-F	*csuE*	AGACATGAGTAGCTTTACG	515	54	(Turton et al. 2007)
csu-R		CTTCCCCATCGGTCATTC			
bap-F	*bap*	ATGCCTGAGATACAAATTAT	1449	55	(Badmasti et al. 2015)
bap-R		GTCAATCGTAAAGGTAACG			

Ta, температура на хибридизация на праймерите (annealing); F, прав праймер; R, обратен праймер.

Забележка: *epsA* и *csuE* са части от генни клъстери.

Таблица 21. Олигонуклеотиди, използвани като праймери за амплификация на гени на вирулентност, в проучените изолати *S. maltophilia*.

Праймерна двойка	Таргетен ген	Нуклеотидна последователност (5' – 3')	Размер на продукта (bp)	Ta (°C)	Източник
Pr1L[a]	*stmPr1* (къс алел)	CGAGAACGACAACGAGTGCTACA	868	67	(Nicoletti et al. 2011)
Pr1R		CACGGCGGTCTTGTTGGTCA			
Pr1aL[b]	*stmPr1* (дълъг алел)	GCCGCAGTGTTGTTCGATCCA	1621	68	(Nicoletti et al. 2011)
Pr1aR		CAGTTCTCGGTGCACGGCTCTT			
Pr2L	*stmPr2*	GCCGATTCCGGCATTCACACC	1764	68.5	(Nicoletti et al. 2011)
Pr2R		GGTCAGGCCCGAGAAGGTGCT			
Lp1L	Smlt3773 локус	CGGTGCCGAACTCGTAACCGG	1342	68.5	(Nicoletti et al. 2011)
Lp2R		CTTCCGGCCATGGCAGGCGAA			
Plc1L[c]	*plcN1*	GGCGATGATGAAGCTGACCT	174	59	Настоящо проучване
Plc1R		GACAACTTCACCGACAACCC			
Fm3L	*smf-1*	GGAAGGTATGTCCGAGTCCG	674	64	(Nicoletti et al. 2011)
Fm2R		GCGGGTACGGCTACGATCAGTT			

Ta, температура на хибридизация на праймерите (annealing)

[a] Дизайнът на праймерите е базиран на нуклеотидната последователност на *stmPr1* в генома на *S. maltophilia* AJ291488, депозиран GenBank NCBI.

[b] Дизайнът на праймерите е базиран на съответната нуклеотидна последователност в генома на *S. maltophilia* K279a (AM743169).

[c] Дизайнът на праймерите е направен с Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), на база на съответната нуклеотидна последователност в генома на *S. maltophilia* K279a (AM743169).

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

Избраните БАГ за PCR скрининг сред изолатите *A. baumannii* са изброени в т. 4.4.4., а специфичните праймери са изложени в **Таблица 20.**

Генетичните механизми, детерминиращи биофилм формиране от *S. maltophilia*, включват участие на няколко БАГ, от които 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), оперирщ като медиатор на междуклетъчната сигнализация) (Trifonova and Strateva 2019). Амплификацията беше извършена при еднакви условия за

денатурация (5 min на 95°C) и завършване на реакцията (7 min на 72°C) и 30 цикъла с различни температура на прикачване (хибридизация) на праймерите и време за удължаване на веригата. Праймерните двойки, температурата на хибридизация и размерът на очакваните продукти са представени в **Таблица 22**. Трите праймерни двойки са с оригинален дизайн и са синтезирани от Metabion (Germany).

Таблица 22. Олигонуклеотиди, използвани като праймери за доказване на биофилм-асоциирани гени, при проучените изолати *S. maltophilia*.

Праймерна двойка	Таргетен ген	Нуклеотидна последователност (5′ – 3′)	Размер на продукта (bp)	Температура на хибридизация (°C)
spgM-F	*spgM*	AAGGCAGGATCATCTATGC	648	64
spgM-R		TCAGAACCCCAGCGGGGTG		
rmlA-F	*rmlA*	CGGAAAAGCAGAACATCG	799	54.5
rmlA-R		GCAACTTGGTTTCAATCAC		
rpfF-F	*rpfF*	ATGTCTGCAGTACGCCCCA	835	62
rpfF-R		CGTACCAGCCGATCCATGG		

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

RT-qPCR беше използвана за определяне на експресията на *oprD* гена, кодиращ външномембранния порин OprD при *P. aeruginosa*. Нивата на матрична рибонуклеинова киселина (мРНК) на *oprD* на карбапенем-резистентни и XDR-PA изолати, в които не са идентифицирани придобити карбапенемази, бяха измерени чрез двуетапна RT-qPCR, чийто протокол е подробно представен в предходно проучване (Nazari et al. 2023). IMP-чувствителният референтен щам *P. aeruginosa* PAO1 беше използван като калибратор за етапа на оценка. Накратко, обработената с ДНК-аза тотална РНК, изолирана от култури в логаритмична фаза, беше подложена на обратна транскрипция с помощта на SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) със случайни хексамери. Едновременно с това беше извършена контролна реакция на обратна транскрипция без ензим, за да се изключи възможността за замърсяване с геномна ДНК. Получената комплементарна ДНК (кДНК) беше разреждана по подходящ начин и 2 µL от всяко разреждане беше комбинирано с 8 µL смес от праймери (Nazari et al. 2023) и 10 µL iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), за да се подготвят

qPCR реакциите. Самите реакции бяха извършени в Rotor-Gene Q real-time PCR System (QIAGEN). Експресията на мРНК на *oprD* гена беше изчислена по метода $2^{\wedge(-\triangle\triangle ct)}$ (Schmittgen and Livak 2008). Степента на експресия от ≤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, в изолат Aba52 беше извършено чрез двустъпална RT-qPCR. При анализа нивата на съответните мРНК бяха нормализирани спрямо това на 16S рРНК гените. В ролята на контрола беше използван друг клиничен изолат *A. baumannii*, чувствителен на cefiderocol (МПК=0.064 mg/L). Третирана с ДНК-аза тотална РНК, изолирана от култури от двата сравнявани щама (Aba52 и контролен) в експоненциална фаза на растеж, беше подложена на обратна транскрипция чрез кит Super-Script™ III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) и случайни хексамери в ролята на праймери. Бяха приготвени и контролни реакции без прибавена обратна транскриптаза, за да се изключи възможността от замърсяване с геномна ДНК. Накрая получената кДНК беше подходящо разредена и използвана като матрица за qPCR реакции, както е описано по-горе. Експресионните нива на гените във всеки изследван изолат бяха анализирани в по две независими култури, като qPCR беше извършена с три повторения за всяка кДНК проба. Дизайнът на използваните праймери е оригинален (**Таблица 23**) и беше създаден чрез Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

Таблица 23. Праймери, използвани за RT-qPCR анализ на TonB-зависимите сидерофорни рецептори на *A. baumannii*.

Праймерна двойка	Таргет	Нуклеотидна последователност (5′ – 3′)	Размер на продукта (bp)	Tm (°C)
pirA-F pirA-R	*pirA*	GTGAAGCAATCGCTCGGTGT ACGCTGCCCAGTAGCACTAT	135	63.1 63.2
piuA-F piuA-R	*piuA*	ATGCTGCCACCAACTGAACC ATGTTTGCGGTCGAGCAAGT	80	63 62.7
16Sr-F 16Sr-R	16S рРНК	AGAATGCCGCGGTGAATACG CGTGGTAACCGCCCTCTTTG	111	62.9 63.1

RT-qPCR, обратно-транскрипционна количествена полимеразна верижна реакция в реално време; Tm, температура на топене (melting) на праймера; F, прав праймер; R, обратен праймер.

За провеждане на qPCR реакции беше използван Rotor-Gene Q real-time PCR System (QIAGEN), а тяхната количествена оценка беше извършена по метода $2^{\wedge(-\triangle\triangle ct)}$ (Schmittgen and Livak 2008).

4.4.7. 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 PCR продукти (ампликони) бяха сравнявани с еталонни секвенции от GenBank.

Избрани *exoS* и *exoU*, идентифицирани в клинични щамове *P. aeruginosa*, и $bla_{\text{PER-like}}$ гени в *A. baumannii* бяха секвенирани с използване на BigDyeTerminator v.3.1. kit (Applera, USA) и секвениращи праймери в автоматичен секвенатор ABI 310 Sequence Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) (Стратева 2008). Най-общо, цялостната процедура включваше следните етапи: намножаване на желания ДНК фрагмент чрез PCR, ензимно пречистване на намножения продукт чрез ExoSAP-IT реагент (Amersham Biosciences, USA), провеждане на секвенционна реакция, преутаяване на секвенционния продукт, разтваряне на секвенционния продукт, разделяне на фрагментите на принципа на капилярната гел-електрофореза и визуализиране на резултатите във вид на електрофореграма.

Режимът на секвенционната реакция включваше: денатурация на 95 ºC за 20 s, хибридизиране на праймера – 50 ºC за 15 s, и синтез на веригата – 60 ºC за 3 min. Този цикъл се повтаряше 25 пъти. Беше използван PCR апарат с нагряващ капак, за да се предотврати изпаряването на пробата. За провеждане на реакциите при гените за T3SS ефекторните протеини на *P. aeruginosa* бяха използвени оригинални праймери за секвениране, цитирани за първи път в предходно наше проучване (Стратева 2008).

Секвенционните продукти се преципитираха с етанол с цел отстраняване на несвързаните нуклеотиди. Получената суха утайка се съхраняваше на тъмно на стайна температура за няколко дни.

Към сухите утайки бяха добавяни по 14 μL TSR (Template Suppressor Reagent) – готов реагент за разтваряне на пробите (Applied Biosystems). Така приготвената проба беше готова за анализ и се подаваше на секвенатора за електрофоретично разделяне. Секвенционните данни се обработваха автоматично в секвенатора и се получаваха в готов вид под формата на електрофореграма.

При карбапенем-резистентните изолати ABC complex (*A. baumannii* и един *A. nosocomialis*) от периода 2014–2016 г., на Sanger секвениране бяха подложени избрани PCR продукти на гените, кодиращи придобити CHDLs ($bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$ и $bla_{\text{OXA-58-like}}$). Те бяха пречистени с Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline) и изпратени в Macrogen Inc. (South Korea). За филогенетичен анализ бяха използвани депозирани секвенции на съответните гени в NCBI GenBank. За множествени подравнявания на секвенциите беше приложен методът MUSCLE (Edgar 2004).

За потвърждаване на откривания ген при видовоспецифичната PCR реакция за идентификация на *S. maltophilia* също беше проведено директно секвениране с флуоресцентно белязани дидеоксинуклеотиди. Избрани PCR продукти (n = 40) бяха пречистени с помощта на E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (Omega Bio-tek, USA). Секвенционните реакции бяха извършвани чрез използване на праймерите, представени в **Таблица 15.**, и GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit (Beckman Coulter, USA) в автоматичен секвенатор GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter), както беше подробно описано в предходно проучване (Трифонова 2020). Като контролни бяха използвани нуклеотидните последователности на 23S рРНК гена на три щама *S. maltophilia*, депозирани в NCBI GenBank (CP008838, AM743169 и AF273255).

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

От началото на 2020 г. към молекулярно-генетичните проучвания върху механизмите на резистентност и факторите на вирулентност (PCR техники и нуклеотидно секвениране по Sanger) бяха добавени резистомни и вируломни анализи на избрани изолати CRPA, CRAB и терапевтично проблемни *S. maltophilia*, базирани на WGS от следващо поколение (Next Generation Sequencing – NGS). Изолатите 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.

4.5.1. Приложена технология за NGS

За NGS беше приложена DNA nanoball секвенираща технология, описана в наскоро проведени български проучвания (Hubenova et al. 2022; Peykov et al. 2022). Накратко, геномната ДНК беше произволно фрагментирана с помощта на устройство Covaris g-TUBE и размерът беше избран чрез магнитни перли до средна дължина на фрагмент 200-400 bp. Получените фрагменти бяха поправени в краищата, 3'-аденилирани, лигирани към адаптери и PCR-амплифицирани, за да се генерират библиотеки за секвениране от всяка проба. 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.

4.5.2. 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).

4.5.3. WGS-базирана видова идентификация на НФГБ изолати

Предварителната видова идентификация на проучените НФГБ изолати, извършена чрез полуавтоматизирани китове или автоматизирани системи, беше потвърдена чрез анализ на сглобените „драфт“ геномни последователности посредством уеб сървъра *Microbial Genomes Atlas* (MiGA) (Rodriguez-R et al. 2018). Беше използвана *NCBI Genome Database*, секция *Prokaryotes*, с настройки по подразбиране.

4.5.4. 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), при използване на следните настройки: NCBI Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database, минимална ДНК идентичност (70%) и минимално ДНК покритие (60%).

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). Всички идентифицирани неконсервативни аминокиселинни замени бяха подложени на честотен анализ чрез инструмента Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) за откриване на първите 100 секвенции на съответните протеини на *A. baumannii* със сходство над 95%, налични в базата данни на NCBI. Впоследствие тези секвенции бяха подравнени с помощта на инструмента Constraint-based Multiple Alignment Tool (COBALT). Също така QRDR регионите на целогеномно секвенираните изолати *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 замени в *gyrA* и *parC* гените, отговорни за клинично значима резистентност към флуорохинолони.

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).

4.5.5. Вируломен анализ

За характеризиране на патогенния потенциал на целогеномно секвенираните изолати *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* аминокиселинните замени в идентифицираните чрез PCR гени на вирулентност (къс и дълъг алелен вариант на *stmPr1*, *stmPr2*, локус Smlt3773, *plcN1* и *smf-1*) 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.

4.5.6. 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.

4.6. Методи за доказване на извънклетъчни фактори на вирулентност

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

Протеаза

Протеазната активност беше определена чрез казеинова хидролиза на Mueller–Hinton агар, съдържащ 3% (w/v) Skim milk (Thermo Fisher Scientific). Наличието на прозрачна зона около инокулираното бактериално петно след инкубация на 37 °C за 24 h беше отчитано като положителна реакция (Figueirêdo et al. 2006).

Естераза

За оценка на естеразната активност беше използвана среда Tributyrin Agar с добавена Tributyrin-Arabic gum (HiMedia, India) до крайна концентрация от 1%. Наличието на ясен ореол (хало) около бактериалното петно след инкубация на 37 °C за 24 h се считаше за белег на естеразна продукция (Nicoletti et al. 2011).

Лецитиназа

Нехемолитичната фосфолипаза C, чийто кодиращ ген беше определен при генотипното проучване на вирулентността на изолатите *S. maltophilia*, хидролизира

фосфатидилхолина (Ostroff et al. 1990), който от своя страна е основният компонент на яйчния лецитин (Zhao et al. 2023a). Лецитиназна активност на изолатите беше доказвана на Egg Yolk Agar с добавена 10% Egg Yolk emulsion (HiMedia). Наличието на бял преципитат около инокулираното петно след инкубация на 37 °C за 72 h беше отчитано като положителен резултат (Edberg et al. 1996).

4.7. Изследване на биофилм образуване от НФГБ

4.7.1. Определяне на количество образуван биофилм върху абиотична повърхност

Количеството на продуцирания биофилм от избрани щамове *A. baumannii* и *S. maltophilia* беше изследвано чрез метода „Кристал виолет“ (Soto et al. 2006). Протоколът включваше следните основни етапи: приготвяне на 18-часови течни култури в Tryptic Soy Broth (TSB) (Liofilchem); получаване на разредени (1:100) бульонни култури; накапване на получените разреждания в 96-ямкови облодънни полистиренови плаки с 6 повторения за щам и последващо култивиране за 24 h на 37 °C; отчитане на оптичната плътност в ямките на 24-ия час чрез ELISA ридер за плаки (LP 400) при дължина на вълната 550 nm (OD_{550}) при *S. maltophilia* и 570 nm (OD_{570}) при *A. baumannii*; отпипетиране на бактериалната суспензия от ямките и последващо промиване с фосфат-буфериран физиологичен разтвор; добавяне на 0.1% воден разтвор на кристал виолет за 15 min; многократно промиване с физиологичен разтвор след отстраняване на багрилото до обезцветяване на разтвора; солюбилизиране със 70% етанол при разклащане на клатачка за 10 min на 5000 оборота и крайно отчитане на растежа в биофилм чрез ELISA ридера при дължина на вълната 550-570 nm. Интерпретацията на получените резултати е представена в **т. 4.9. Статистически анализ.**

4.7.2. Наблюдаване на биофилми чрез сканираща електронна микроскопия

За провеждане на сканираща електронна микроскопия (СЕМ) бяха използвани 18-часови течни култури в TSB на избрани щамове *S. maltophilia*, продуциращи различно количество биофилм. Изследването беше осъществено в следните етапи: накапване на 100 µL суспензия върху UV-стерилизирани кръгли покривни стъкла с диаметър 0.8 cm, покрити с полиметилметакрилат и поставени в 24-ямкова плака; престояване на стъклата за 2 h на 37°C, за постигане на адхезия; отстраняване на неадхезиралите бактериални

клетки и трикратно промиване на ямката със стерилен физиологичен разтвор; добавяне на 500 μL TSB и инкубация за 24 h на 37°C; изтегляне на бульонната среда и трикратно промиване на ямките с физиологичен разтвор, и еднократно с какодилатен буфер; фиксация с 4% глутаралдехид, разтворен в 0.1 M натриев какодилат, pH 7.2 за 2 h при 0-4°C; постфиксация с 1% осмиев тетраокис, разтворен в 0.1 M натриев какодилат, за 1 h при 0-4°C; обезводняване на пробите с етанол във възходяща редица, като се стартираше от 30% (15 min), 50% (15 min), 70% (24 h или съхранение), 80% (10 min), 96% (10 min) и 100% (10 min).

Стъклата с биофилм бяха прикрепвани върху държатели за СЕМ със сребърно проводимо лепило (Emerton) и след изсушаване бяха покривани със злато във вакуумен изпарител (Edwards). Пробите бяха наблюдавани на LyraTescan сканиращ електронен микроскоп.

4.8. Епидемиологично типизиране на проучените НФГБ изолати

4.8.1. Случайно амплифициране на полиморфна ДНК чрез PCR (Random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction – RAPD-PCR)

Този PCR-базиран метод позволява откриване на генен полиморфизъм без предварителни познания върху нуклеотидната последователност. Извършва се амплифициране на геномната ДНК чрез единични произволни праймери.

RAPD-PCR реакциите бяха извършени в обем от 25 μL, като крайната концентрация на микса за всяка проба съдържаше: 12.5 μL MyTaq PCR mix (Bioline), 4 μL праймер (концентрация 10 pmol/ μL), 7.5 μL ултрачиста 18.2 MΩ PCR H_2O (Bioline) и 2 μL ДНК. За типизиране на нозокомиалните изолати *A. baumannii* бяха използвани праймери RAPD-4 (5'–AAGAGCCCGT–3') и M13 (5'–GAGGGTGGCGGTTCT–3'), съответно в периодите 2005–2011 г. и 2014–2018 г., а при *S. maltophilia* – праймер 270 (5'–TGCGCGCGGG–3') (Grundmann et al. 1997; Krzewinski et al. 2001).

Протоколи за амплификация

***A. baumannii*:**

За типизиране на по-ранните нозокомиални изолати *A. baumannii* беше приложена следната програма: 1 цикъл от 5 min на 95 °C беше последван от 45 цикъла на денатурация за 1 min на 95 °C, свързване с праймера за 1 min на 36 °C и елонгация на веригата за 2 min на 72 °C (Стратева 2008).

По-късните CRAB изолати бяха типизирани чрез RAPD-PCR, проведен по следния протокол: Първоначална стъпка на денатурация за 2 min при 94 ºC, последвана от 35 цикъла на денатурация при 94 ºC за 20 s, хибридизация на праймера при 50 ºC за 1 min и синтез на веригата при 72 ºC за 20 s. Последната стъпка на реакцията включваше финално удължаване на веригата при 72 ºC за 5 min (Grundmann et al. 1997).

***S. maltophilia*:**

Приложеният протокол (Krzewinski et al. 2001) е представен в **Таблица 24.** В амплификационните реакции беше използван праймер 270 (5'–TGCGCGCGGG–3'). По 7 μL от получените продукти бяха нанасяни на 2% агарозен гел, с включен етидиев бромид. След приключване на електрофорезата, геловете бяха фотографирани под UV светлина.

Таблица 24. Протокол за провеждане на RAPD-PCR за епидемиологично типизиране на нозокомиални изолати *S. maltophilia*.

Протокол за амплификация:			
1.		95 °C	15 min
2.	4 цикъла	94 °C 36 °C 72 °C	5 min 5 min 5 min
3.	30 цикъла	94 °C 36 °C 72 °C	1 min 1 min 1 min
4.		72 °C	10 min

За определяне на филогенетичното родство между проучените нозокомиални НФГБ изолати, резултатите от проведените RAPD-PCR реакции бяха анализирани чрез метода UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), с помощта на софтуер GeneTools 4.01 (Syngene, Cambridge, UK). При този метод щамовете биват групирани чрез пресмятане на т. нар. матрица на сходство и намиране на двойката от оперативни таксономични единици (operational taxonomic units, OTUs) с най-голямо сходство. След това те биват разглеждани като една нова OTU. Процесът се повтаря до подреждането на всички OTUs и по този начин се получава т. нар. вкоренено дърво. Като критерий за клонална свързаност на щамовете беше приеман коефициент на сходство (известен и като *Dice* коефициент) над 70% (Grundmann et al. 1997).

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

Епидемиологично типизиране на избрани CRAB изолати (*n* = 60) от две университетски болници в София (2017–2022 г.) беше извършено по метода на Turton et al., основаващ се две мултиплексни PCR за откриване на алелни вариации в три гена под селективен натиск: *ompA* (кодиращ външномембранен протеин A), *csuE* (част от Csu пилусната система, участващ в образуване на биофилм) и $bla_{\text{OXA-51-like}}$ (вродена карбапенемаза от клас D) (Turton et al. 2007). Праймерните двойки, използвани за амплификация в двете групови мултиплексни реакции, са представени в **Таблица 25.**, а за тяхното провеждане беше приложен следният протокол: начална денатурация на 94 °C за 3 min; последвана от 30 цикъла на денатурация за 45 s на 94 °C, хибридизация на праймерите за 45 s на 57 °C и елонгация на веригата за 1 min на 72 °C; и терминална елонгация на веригата при 72 °C за 5 min (Turton et al. 2007).

Таблица 25. Олигонуклеотиди, използвани като праймери за амплификация в мултиплексните полимеразни верижни реакции (multiplex PCR) за идентификация на секвенционни групи (клонални комплекси) на *A. baumannii*.

Праймерна двойка	Нуклеотидна последователност (5' – 3')	Размер на продукта (bp)
Група 1 multiplex PCR		
Group1ompAF306 Group1/2ompAR660	GATGGCGTAAATCGTGGTA CAACTTTAGCGATTTCTGG	355
Group1csuEF Group1csuER	CTTTAGCAAACATGACCTACC TACACCCGGGTTAATCGT	702
Gp1OXA66F89 Gp1OXA66R647	GCGCTTCAAAATCTGATGTA GCGTATATTTTGTTTCCATTC	559
Група 2 multiplex PCR		
Group2ompAF378 Group1/2ompAR660	GACCTTTCTTATCACAACGA CAACTTTAGCGATTTCTGG	343
Group2csuEF Group2csuER	GGCGAACATGACCTATTT CTTCATGGCTCGTTGGTT	580
Gp2OXA69F169 Gp2OXA69R330	CATCAAGGTCAAACTCAA TAGCCTTTTTTCCCCATC	162

За определянето на секвенционните групи (клонални комплекси) беше използвана схемата на Karah et al. (Karah et al. 2012), която е показана в **Таблица 26.**

Таблица 26. PCR-базирани секвенционни групи на *A. baumannii* според комбинациите от ампликони в две multiplex PCRs, насочени към гените *ompA*, *csuE* и *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$.

Група (G)	Група 1 multiplex PCR			Група 2 multiplex PCR		
	csuE (702 bp)	*bla*$_{\text{OXA-51-like}}$ (559 bp)	*ompA* (355 bp)	*csuE* (580 bp)	*ompA* (343 bp)	*bla*$_{\text{OXA-51-like}}$ (162 bp)
G1 (IC II)	+	+	+	–	–	–
G2 (IC I)	–	–	–	+	+	+
G3 (IC III)	+	+	–	–	+	–
G4	–	+	+	–	–	–
G5	–	–	+	–	–	–
G6	+	–	–	–	+	+
G7	–	–	+	+	–	–
G8	–	+	+	+	–	–
G9	–	–	+	+	–	+
G10	–	+	–	+	+	–
G11	–	–	–	–	+	+
G12	–	+	–	–	–	–
G13	+	–	+	–	–	–
G14	+	+	–	–	–	–

multiplex PCR, мултиплексна полимеразна верижна реакция; IC, международен клон.

4.8.3. Типизиране чрез мултилокусно секвениране (MLST)

MLST е широко използван молекулярно-генетичен метод за епидемиологично типизиране и намиране на клонално сходство между бактериални щамове, който се основава на секвениране на 7 постоянно присъстващи в генома на вида гени (англ. *housekeeping* genes). След идентифициране на алелните варианти на седемте локуса и алелния профил (комбинация от тях) се определя принадлежността на щамовете към съответен секвенционен тип (ST).

В настоящата работа 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 на целогеномно секвенираните изолати *P. aeruginosa* в STs беше направена в съответствие с MLST схемата за вида (https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa), която включва идентификация на консервативните региони на следните 7 *housekeeping* гени: *acsA* (ацетил коензим А синтетаза), *aroE* (Shikimate дехидрогеназа), *guaA* (GMP синтаза), *mutL* (протеин за

възстановяване на ДНК несъответствие), *nuoD* (NADH дехидрогеназа I верига C, D), *ppsA* (фосфоенолпируват синтаза) и *trpE* (антралит синтаза компонент I) (Curran et al. 2004).

Секвенционните типове на изолатите *A. baumannii* бяха определяни по MLST (Pasteur) схемата (https://pubmlst.org/organisms/acinetobacter-baumannii), базирана на идентификация на вътрешните региони на следните *housekeeping* гени: *cpn60* (60-kDa шаперонин), *fusA* (фактор на елонгация EF-G), *gltA* (цитрат синтаза), *pyrG* (CTP синтаза), *recA* (фактор на хомоложна рекомбинация), *rplB* (50S рибозомален протеин L2) и *rpoB* (РНК полимераза, субединица B) (Diancourt et al. 2010).

Принадлежността към ST на изследваните изолати *S. maltophilia* беше определена чрез MLST схемата за вида (https://pubmlst.org/organisms/stenotrophomonas-maltophilia), която включва следните *housekeeping* гени: *atpD* (H(+)-транспортираща двусекреторна АТФ-аза), *gapA* (NAD-зависима глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа), *guaA* (GMP синтаза [глутамин-хидролизираща]), *mutM* (ДНК-формамидопиримидин гликозилаза), *nuoD* (NADH дехидрогеназа), *ppsA* (Пируват, водна дикиназа) и *recA* (RecA протеин) (Kaiser et al. 2009).

4.8.4. Филогеномен анализ

Филогеномният анализ е WGS-базирано високорезолюционно субтипизиране на щамове, което се провежда с цел изследване на еволюционно-епидемиологичните им връзки.

4.8.4.1. 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“ (n = 8) и всички публикувани $bla_{\text{NDM-1}}$-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), България (n = 3), Гърция (n = 2) и Сърбия (n = 4) – **Таблица 27.** Всички геномни последователности бяха качени в онлайн платформата Galaxy (Afgan et al. 2022), 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) (Stamatakis 2015). За неговата визуализация беше използван онлайн инструментът Interactive Tree Of Life (iTOL) (Letunic and Bork 2007).

Таблица 27. Геноми на клинични CRPA изолати с NDM-1 метало-β-лактамаза от балкански държави, използвани за конструиране на филогенетично дърво с участие на 8 NDM-1-положителни изолата от настоящото проучване.

NCBI №	Място на изолиране	Година	Литературен източник
SRR8569395 *	Албания	2018	(Tafaj et al. 2020)
SRR8569396 *	Албания	2018	(Tafaj et al. 2020)
GCA_013413775.1	България	2018	(Kostyanev et al. 2020)
GCA_013413795.1	България	2018	(Kostyanev et al. 2020)
GCA_021378395.1	България	2018	(Kostyanev et al. 2020)
GCF_030504675.1	Гърция	2023	(Tsilipounidaki et al. 2023)
GCF_030504695.1	Гърция	2023	(Tsilipounidaki et al. 2023)
GCA_020404715.1	Сърбия	2018-2021	(Kabic et al. 2023)
GCA_020404785.1	Сърбия	2018-2021	(Kabic et al. 2023)
GCA_020404825.1	Сърбия	2018-2021	(Kabic et al. 2023)
GCA_022559565.1	Сърбия	2018-2021	(Kabic et al. 2023)

CRPA, карбапенем-резистентни *P. aeruginosa*.

* Маркираните геноми бяха сглобени от секвенционните прочити в BioProject PRJNA522042.

Втората група изолати, които бяха подложени на филогеномен анализ в настоящото проучване, обедини два *bla*$_{\text{VEB-9}}$-положителни XDR-PA от ICU на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ и всички *bla*$_{\text{VEB-9}}$-съдържащи щамове *P. aeruginosa*, без ограничения в географския произход, с депозирани геноми в NCBI Nucleotide database (n = 20) и The Pseudomonas Genome Database (n = 116) към 01.07.2024 г. Бяха използвани две ключови думи за търсене: “*Pseudomonas aeruginosa*” и “VEB-9”. Всички геномни последователности от двата източника бяха подложени на оценка на качеството посредством инструмента Quast v5.2.0 и „драфт“ геноми с общ брой контиги (>1000) над 200 и/или стойност на L50 над 25 бяха изключени от последващия анализ. Останалите недублирани геноми (n = 76) бяха подложени на MLST анализ чрез гореспоменатия MLST инструмент и скрининг за AMR гени чрез ABRicate v1.0.1. След потвърждаване на наличието на *bla*$_{\text{VEB-9}}$ 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).

4.8.4.2. Филогеномен анализ на CRAB изолати

Проведеният филогеномен анализ включи CRAB изолати от настоящото проучване и изолати със сходни профили и механизми на антибиотична резистентност от различни части на света. Първоначално набор от 66 генома на colistin-чувствителни CRAB изолати от югоизточни европейски държави с близко географско положение на България (**Таблица 28.**) 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. Пълен списък на използваните геноми е представен в **Таблица 29.**, а литературните източници са както следва: геноми A1–A52 (He et al. 2022), геном B1 (Gaillot et al. 2023), C2–C4 (Vannatta et al. 2023), D1–D8 (Valcek et al. 2021), E1 (Liu et al. 2022d), F1 (Sánchez-Urtaza et al. 2023a) и G1–G8 (Sánchez-Urtaza et al. 2023b).

Таблица 28. Геноми на colistin-чувствителни изолати *A. baumannii* от Югоизточна Европа (n = 66), използвани за конструиране на филогенетично дърво с участие на три colistin-чувствителни, карбапенем-резистентни изолата от настоящото проучване.

NCBI №	Място	Година	NCBI №	Място	Година
GCA_001512055.1	Гърция	2002	GCA_017953285.1	Гърция	2015
GCA_001907125.1	Хърватия	2009	GCA_017953315.1	Гърция	2016
GCA_001907145.1	Хърватия	2003	GCA_017953335.1	Гърция	2015
GCA_001907155.1	Хърватия	2013	GCA_017953355.1	Гърция	2015
GCA_002741415.1	Гърция	2002	GCA_017953375.1	Гърция	2015
GCA_009710715.1	**Румъния**	**2018**	GCA_017953395.1	Гърция	2015
GCA_009760525.1	**Гърция**	**2016**	GCA_017953415.1	Гърция	2015
GCA_013185115.1	**Румъния**	**2017**	GCA_017953435.1	Гърция	2015
GCA_013185135.1	Румъния	2017	GCA_017953455.1	Гърция	2015
GCA_013185155.1	Румъния	2017	**GCA_017953475.1**	**Гърция**	**2014**
GCA_016486425.1	Гърция	2016	GCA_017953495.1	Гърция	2014
GCA_016486705.1	Унгария	2012	GCA_017953515.1	Гърция	2014
GCA_016487085.1	Хърватия	2014	GCA_017953535.1	Гърция	2014
GCA_016487125.1	Хърватия	2014	GCA_017953555.1	Гърция	2014
GCA_016487465.1	Гърция	2014	**GCA_017953575.1**	**Гърция**	**2013**
GCA_016487525.1	Гърция	2014	GCA_017953595.1	Гърция	2014
GCA_016608845.1	**Унгария**	**2017**	GCA_017953615.1	Гърция	2013
GCA_016609725.1	Румъния	2011	GCA_018499935.2	Унгария	2018
GCA_016609825.1	Гърция	2014	GCA_022661895.1	Хърватия	2020
GCA_017948835.1	Гърция	2015	GCA_022661905.1	Хърватия	2020
GCA_017948875.1	Гърция	2015	GCA_022661915.1	Хърватия	2020
GCA_017953055.1	Гърция	2016	GCA_022661955.1	Хърватия	2020
GCA_017953075.1	Гърция	2016	GCA_022661975.1	Хърватия	2020
GCA_017953095.1	Гърция	2016	GCA_022661995.1	Хърватия	2020
GCA_017953115.1	Гърция	2016	**GCA_022662025.1**	**Хърватия**	**2020**
GCA_017953125.1	Гърция	2015	**GCA_022662035.1**	**Хърватия**	**2020**
GCA_017953155.1	Гърция	2015	GCA_022662055.1	Хърватия	2020
GCA_017953175.1	Гърция	2015	GCA_900240205.1	Босна и Херцеговина	2011
GCA_017953185.1	Гърция	2014	GCA_918811535.1	Румъния	2018
GCA_017953215.1	Гърция	2014	GCA_918851115.1	Румъния	2018
GCA_017953235.1	Гърция	2016	GCA_918851135.1	Румъния	2018
GCA_017953255.1	Гърция	2016	GCA_918856515.1	Румъния	2018
GCA_017953275.1	Гърция	2016	GCA_918856805.1	Румъния	2018

NCBI, National Center for Biotechnology Information.

Забележка: Най-близкородствените геноми с тези на *A. baumannii* Aba52 (София), Aba176 (София) и Aba190 (Варна) са цветно маркирани.

Таблица 29. Геноми на cefiderocol-резистентни изолати *A. baumannii* (*n* = 69), използвани за конструиране на филогенетично дърво с участие на cefiderocol-резистентен, XDR *A. baumannii* изолат (Aba52) от България.

Геном	NCBI №	Геном	NCBI №
A1	PRJNA848261	A39	PRJNA848261
A2	PRJNA848261	A40	PRJNA848261
A3	PRJNA848261	A41	PRJNA848261
A4	PRJNA848261	A43	PRJNA848261
A6	PRJNA848261	A44	PRJNA848261
A7	PRJNA848261	A45	PRJNA848261
A8	PRJNA848261	A46	PRJNA848261
A10	PRJNA848261	A47	PRJNA848261
A11	PRJNA848261	A49	PRJNA848261
A12	PRJNA848261	A50	PRJNA848261
A13	PRJNA848261	A51	PRJNA848261
A14	PRJNA848261	A52	PRJNA848261
A16	PRJNA848261	B1	CP043953.1
A17	PRJNA848261	C2	JAUEPW000000000.1
A18	PRJNA848261	C3	JAUEPX000000000.1
A19	PRJNA848261	C4	JAUEPY000000000.1
A20	PRJNA848261	D1	NZ_JAHKEG000000000.1
A21	PRJNA848261	D2	NZ_JAHKDA000000000.1
A22	PRJNA848261	D3	NZ_JAHKDZ000000000.1
A23	PRJNA848261	D4	NZ_JAHKDK000000000.1
A24	PRJNA848261	D5	NZ_JAHKDH000000000.1
A25	PRJNA848261	D6	NZ_JAHKDP000000000.1
A26	PRJNA848261	D7	NZ_JAHKDI000000000.1
A27	PRJNA848261	D8	NZ_JAHKDN000000000.1
A28	PRJNA848261	E1	CP096892.1
A29	PRJNA848261	F1	JANBZS000000000.2
A30	PRJNA848261	G1	JANBZS000000000.2
A31	PRJNA848261	**G2**	**JARNKV000000000.1**
A32	PRJNA848261	**G3**	**JARNKY000000000.1**
A33	PRJNA848261	**G4**	**JARNLM000000000.1**
A34	PRJNA848261	G5	JARNLP000000000.1
A35	PRJNA848261	G6	JARNLQ000000000.1
A36	PRJNA848261	**G7**	**JARNLT000000000.1**
A37	PRJNA848261	G8	JARNLX000000000.1
A38	PRJNA848261		

Забележка: Най-близкородствените геноми с този на *A. baumannii* Aba52 (България) са в **удебелен шрифт (bold).** Геноми A1–A52 бяха сглобени от наличните секвенционни прочити в BioProject PRJNA848261.

4.9. Статистически анализ

Нивата на антимикробна резистентност на изследваните НФГБ изолати от различните хронологични периоди и мониторирани болници бяха сравнявани помежду си,

както и с резултати от други аналогични проучвания, чрез *t*-тест на Student. При обикновени сравнения стойност $p \leq 0.05$ беше считана за статистически значима. За разрешаване на проблема при множествените сравнения, където бяха извършени, приложихме корекционен коефициент на Bonferroni. При сравняване на групи, съставени от малък брой изолати, беше приложен точният тест на Fisher, напр. при оценка на сравнителната антимикробна чувствителност към CZA, IMR и MEV на MBL-продуциращи и non-MBL-продуциращи *P. aeruginosa*. За статистически значими бяха приети стойности на *p* под 0.05 (https://www.graphpad.com/quickcals/contingency1).

Честотата на разпространение на гените, кодиращи фактори на вирулентност и участващи във формирането на биофилм, както и съответните генни профили на терапевтично проблемните НФГБ изолати от настоящото проучване, бяха сравнявани с актуални резултати от други научни изследвания също чрез *t*-теста на Student. За статистически значими бяха приемани стойности на $p \leq 0.05$.

Резултатите, получени от ридер LP 400 при проследяване на биофилм образуването, бяха обработвани с помощта на програма Excel (Microsoft Office 365), с извеждане на средна стойност и стандартно отклонение (standard deviation – SD). За класифициране на щамовете в категориите силно, умерено, слабо продуциращи и непродуциращи биофилм резултатите бяха изразени числено. За целта беше определяна гранична стойност на оптичната плътност (ODc), представена като 3 x SD над средната OD на контролните ямки (Stepanović et al. 2007). ODc беше калкулирана за всяка плака поотделно, като при получаване на отрицателна стойност, тя се приемаше за нула, а всяка положителна стойност беше индикация за продукция на биофилм. На тази база класифицирането на щамовете включва следните категории: **OD≤ODc** – непродуциращи биофилм; **ODc<OD≤2 x ODc** – слабо продуциращи биофилм; **2 x ODc<OD≤4 x ODc** – умерено продуциращи биофилм; и **4 x ODc<OD** – силно продуциращи биофилм.

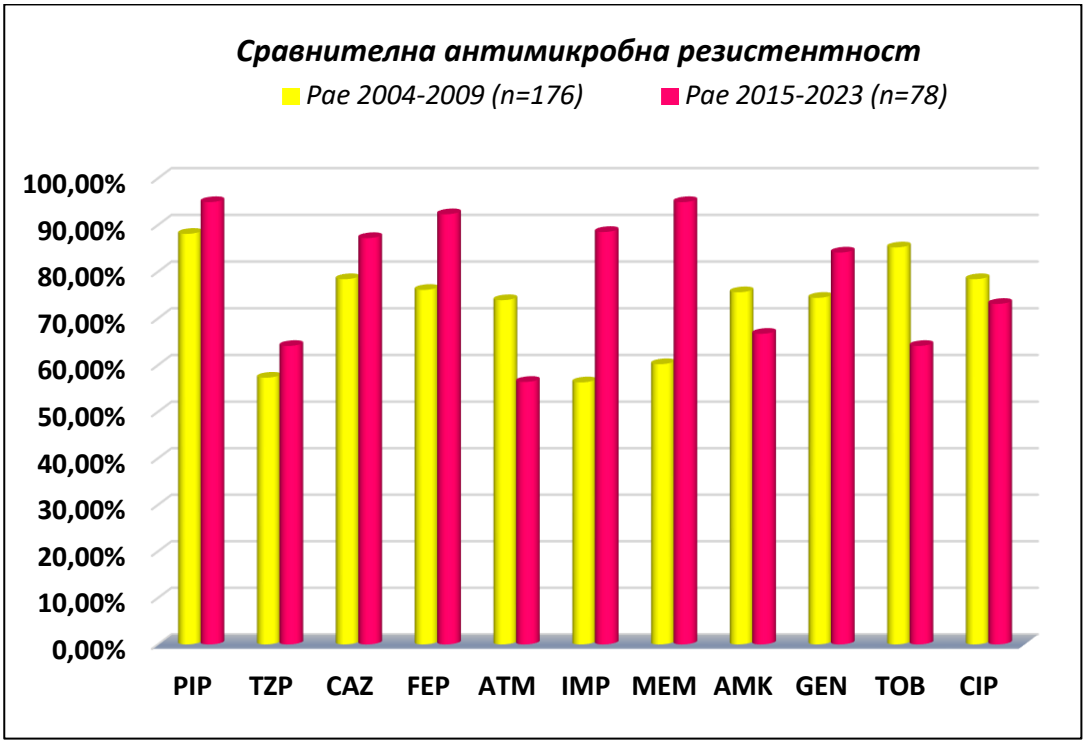
Зависимостта между фенотипни (количество продуциран биофилм, изразено като средна $OD_{550\ /\ 570} \pm$ SD) и генотипни (комбинация между биофилм-асоцииираните гени) характеристики на образуването на биофилм от нозокомиалните изолати *A. baumannii* и *S. maltophilia* беше оценена чрез корелационен коефициент на Spearman, изчисляван с помощта на R 4.2.2. Стойности на $p \leq 0.05$ са статистически значими.

5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Антимикробна лекарствена резистентност на проучените НФГБ изолати

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

Както беше описано в раздел „Материали и методи“, 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 10.** е представена сравнителната антимикробна резистентност на изолатите, разделени в две групи – *стари* (2004–2009 г.) и *нови* (2015–2023 г.) изолати.



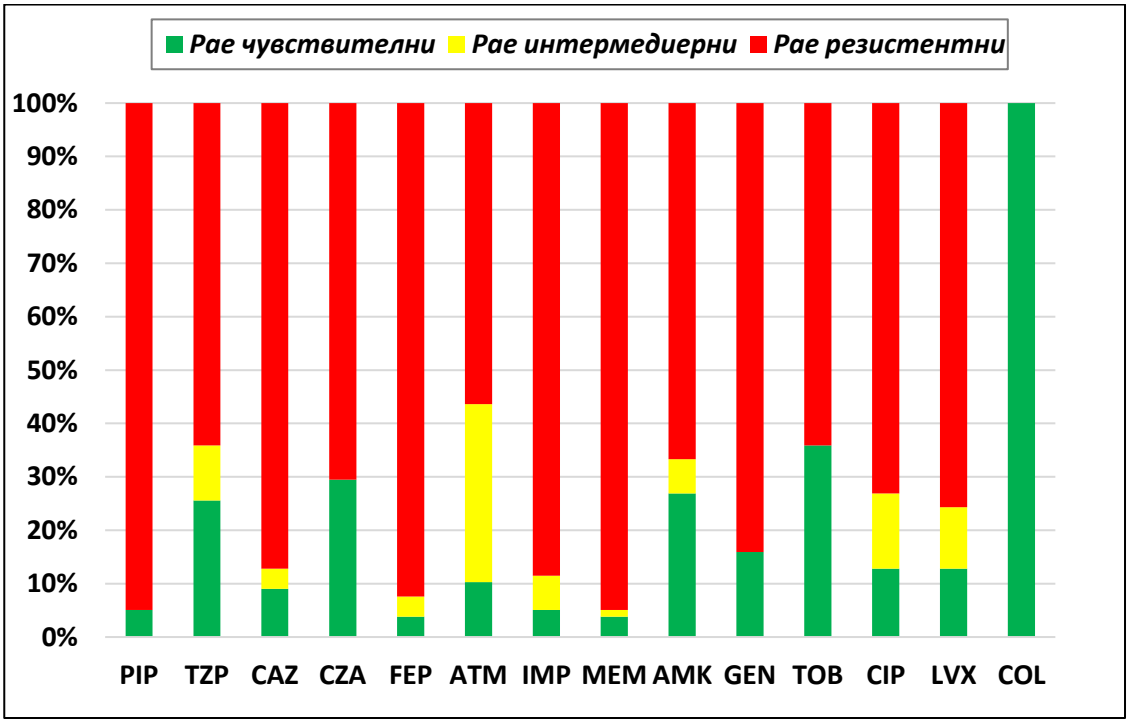
Фигура 10. Сравнителна антимикробна резистентност, изразена в %, на проучените терапевтично проблемни щамове *P. aeruginosa*, изолирани през 2004–2009 и 2015–2023 г.

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 ATM беше установен спад в резистентността (73.9% спрямо 56.4%; $p < 0.01$). Подобна тенденция беше констатирана и при TOB (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 11.** 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), ATM (56.4% R изолати), TZP = TOB (64.1% R) и AMK (66.7%). Резистентността към останалите антибиотици вариране в диапазона от 70.5% (CZA) до 94.9% (MEM и PIP).

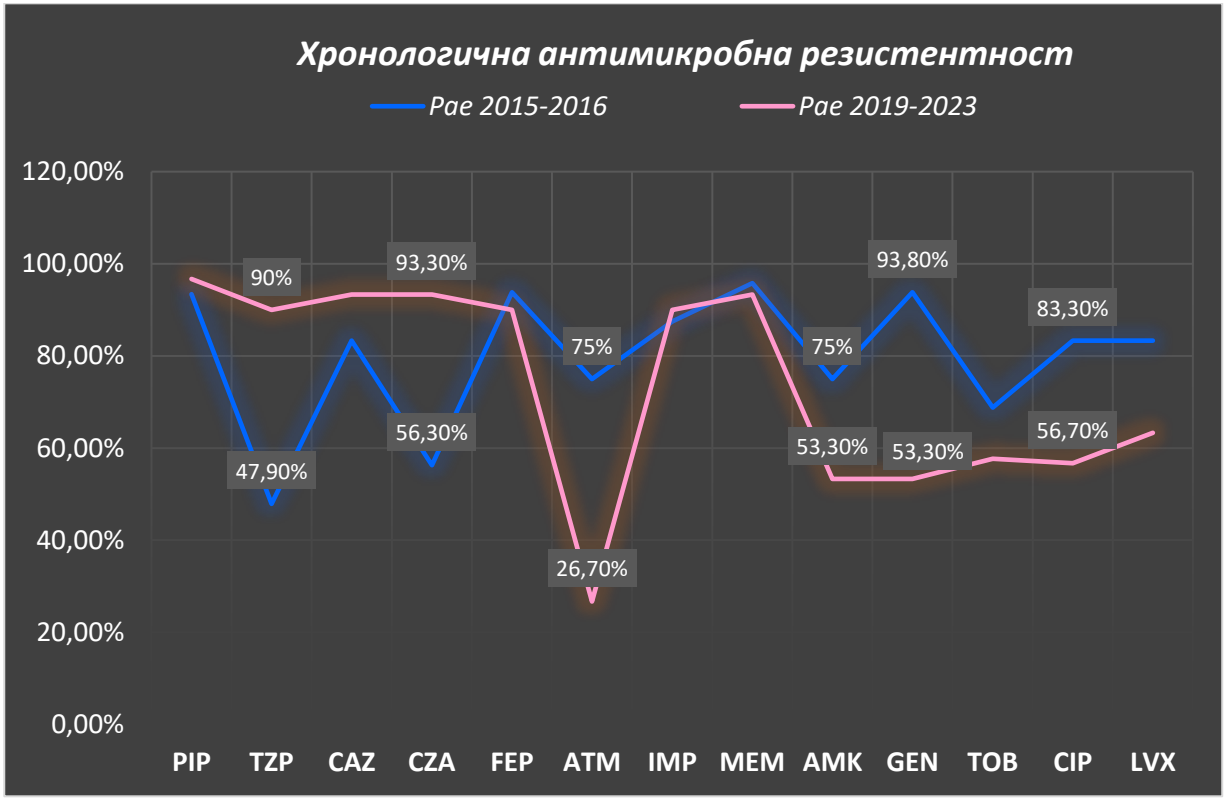


Фигура 11. Обща антимикробна чувствителност на изследваните 78 изолата *P. aeruginosa*, събрани в периода 2015–2023 г.

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 12**). 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.; $p < 0.05$).



Фигура 12. Хронологична антимикробна резистентност, изразена в %, на проучените карбапенем-нечувствителни изолати *P. aeruginosa*.

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.

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%).

Въпреки по-ниските нива на резистентност към карбапенеми сред изследваните MDR-PA изолати от 2004–2009 г. (56.3% към IMP и 60.2% към MEM), следва да се отбележи тяхното значимо нарастване спрямо предходно наше проучване, обхващо нозокомиални MDR-PA, изолирани в университетски болници в София от 2001 до 2006 г., при което бяха установени 42.3% ($p < 0.05$) и 45.5% ($p < 0.01$) устойчивост, съответно към IMP и MEM (Strateva et al. 2007b).

Някои от констатираните в проучването разлики в хронологичната резистентност на изолатите *P. aeruginosa* от по-късния мониториран период (2015–2023) са отражение на тревожната статистически значима тенденция за нарастване на общото потребление на антибактериални препарати за системна употреба в страната през последната декада (2013–2022). Данните фигурират в годишния доклад на ECDC за антибиотична консумация в държавите от ЕС и ЕИП – Надзорна мрежа ESAC-Net, според който единствено в България и Кипър се установява такава трайна тенденция (European Centre for Disease Prevention and Control 2023b). Освен това страната ни е на първо място в ЕС с отчетен негативен тренд в използване на карбапенеми (АТС група J01DH) в болничния сектор за

10-годишния период (19.6% годишен растеж). Статистически значимото нарастване на резистентността към TZP през последните години (2019–2023) спрямо определеното ниво през 2015–2016 г. може да се асоциира с повишената антибиотична консумация на група J01CR (комбинирани препарати, включващи пеницилини + β-лактамазни инхибитори) – през 2015 г. се оценява като DDD=2.2951, а през 2022 г. достига до DDD=3.2435 (European Centre for Disease Prevention and Control 2023b). Откритата в настоящото проучване значимо по-ниска резистентност на нозокомиалните карбапенем-нечувствителни изолати *P. aeruginosa* към AMK и GEN в последните четири години, сравнено с нивата през 2015–2016 г., вероятно се дължи на по-ограничена употреба на аминогликозиди в болничния сектор. Данните на ESAC-Net сочат брой DDD=0.1078 на 1000 жители за 1 ден през 2015 срещу DDD=0.0918 през 2022 г. (https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/). Възможно е изключването на GEN според препоръките на EUCAST за тестване на антимикробната чувствителност на *Pseudomonas* spp. след 2019 г. да е оказало влияние за допълнително редуциране на неговата употреба в българските болници, понижаване на селективния натиск и съответно по-ниска резистентност. Прави впечатление и значимо по-ниската резистентност към монобактама ATM ($p < 0.001$) при изолатите от 2019–2023 г. (26.7%) в сравнение с проучените щамове от 2015–2016 г. (75%). Вероятното обяснение за тази тенденция е промяната в доминиращите механизми на устойчивост към карбапенеми и по-специално появата на продуценти на MBLs сред най-новите изолати, което е представено в т. 5.2.1. на дисертационния труд. Както е известно, металоензимите могат да хидролизират всички β-лактами, освен монобактамите, и обикновено изолатите са със съхранена чувствителност към ATM. От друга страна, резистентността към новия препарат CZA хронологично нараства до 93.3%, което е пряко свързано с появата на MBL-продуциращи щамове *P. aeruginosa* и липсата на активност на avibactam (нуклеофилен инхибитор на серин-съдържащите β-лактамази с диазабициклооктаново ядро) срещу тях (Abboud et al. 2016; Boyd et al. 2020).

Резистентността към основните антипсевдомонадни антибиотици в настоящото проучване за периода 2015–2023 г. беше значимо по-висока ($p < 0.001$) от обобщената средна резистентост 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 AMK и 73.1% / 22.7% към CIP (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 11.**, такива щамове не бяха идентифицирани в настоящата работа.

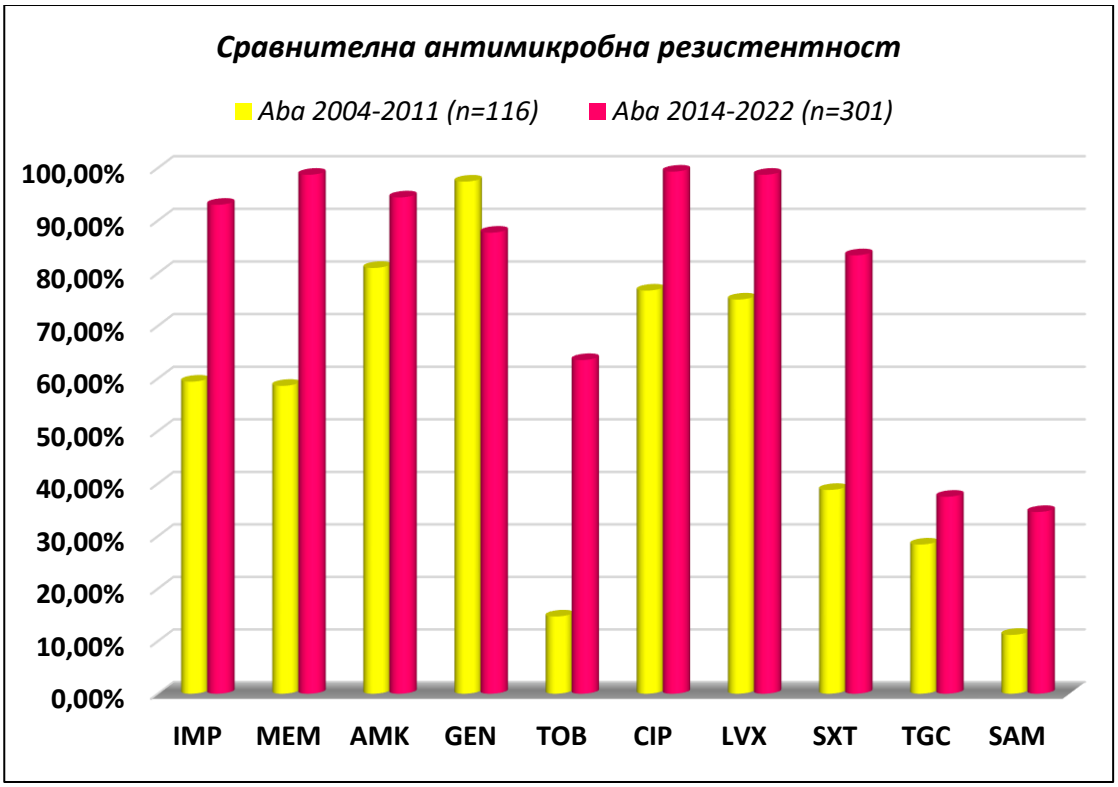
Селективните критерии за включване на изолати в настоящата работа (MDR-PA с намалена чувствителност към IMP/MEM) определят техните по-високи нива на резистентност към TZP, CAZ, карбапенеми, аминогликозиди, флуорохинолони и комбинирана резистентност спрямо инвазивните *P. aeruginosa* от България, включени в анализите на Надзорната система на ECDC, EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network). В последния годишен доклад са представени следните стойности за българските инвазивни изолати през 2022 г.: 48.7% (резистентност към TZP), 56.6% (CAZ), 40.8% (карбапенеми), 36.4% (аминогликозиди), 39.5% (флуорохинолони), както и 45.5% MDR-PA изолати (European Centre for Disease Prevention and Control 2023c). За България е установена тенденция за значимо хронологично нарастване на резистентността към β-лактами (TZP, CAZ и карбапенеми) през последните пет години, което корелира и с резултатите от настоящото проучване. Освен това, анализите на ECDC относно антибиотичната резистентност на инвазивните изолати *P. aeruginosa* показват две значими тенденции за ЕС/ЕИП в периода 2018–2022 г., а именно нарастване на резистентността към TZP и спад при флуорохинолоните (European Centre for Disease Prevention and Control 2023c). Подобни закономерности бяха открити и сред нашите изолати.

Прави впечатление, че Балканите традиционно се свързват както с високо разпространение на CRPA, така и на MDR-PA изолати. Например през 2020 г. честотата на инвазивните CRPA в региона надвишава 30% (при средна за ЕС/ЕИП 17.8%), като най-високите стойности са отчетени в Черна гора (72.7%) и Сърбия (69.5%), а най-ниските – в Хърватия (30.3%), Гърция (35.7%) и Турция (36.2%). Честотата на MDR-PA (комбинирана резистентност към 3 антимикробни групи, в т.ч. TZP, CAZ, карбапенеми, флуорохинолони и аминогликозиди) варира в широки граници – от 11.6 % (Хърватия) до 61.4 % (Сърбия), при средна стойност за ЕС/ЕИП от 12.1% (WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control 2022). Доклад на глобалната програма за надзор на антимикробната резистентност SENTRY, базиран на данни от над 400 медицински центрове в Европа, Северна Америка, Латинска Америка, Азиатско-Тихоокеанския регион за 20-годишен период (1997–2016), отчита 23.9% нечувствителни на MEM изолати *P.*

aeruginosa (от 17.9% в Северна Америка до 37.3% в Латинска Америка), 24.9% MDR-PA и 17.6% XDR-PA в световен мащаб (Shortridge et al. 2019).

5.1.2. 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 13.** е представена сравнителната антимикробна 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 13. Сравнителна антимикробна 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 (IMP и MEM) при първичното тестване в колабориращите лаборатории, които впоследствие бяха подложени на молекулярно-генетични и геномни изследвания за определяне на механизмите на резистентност. В **Таблица 30.** 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 30. 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)
Trimethoprim-sulfamethoxazole (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)

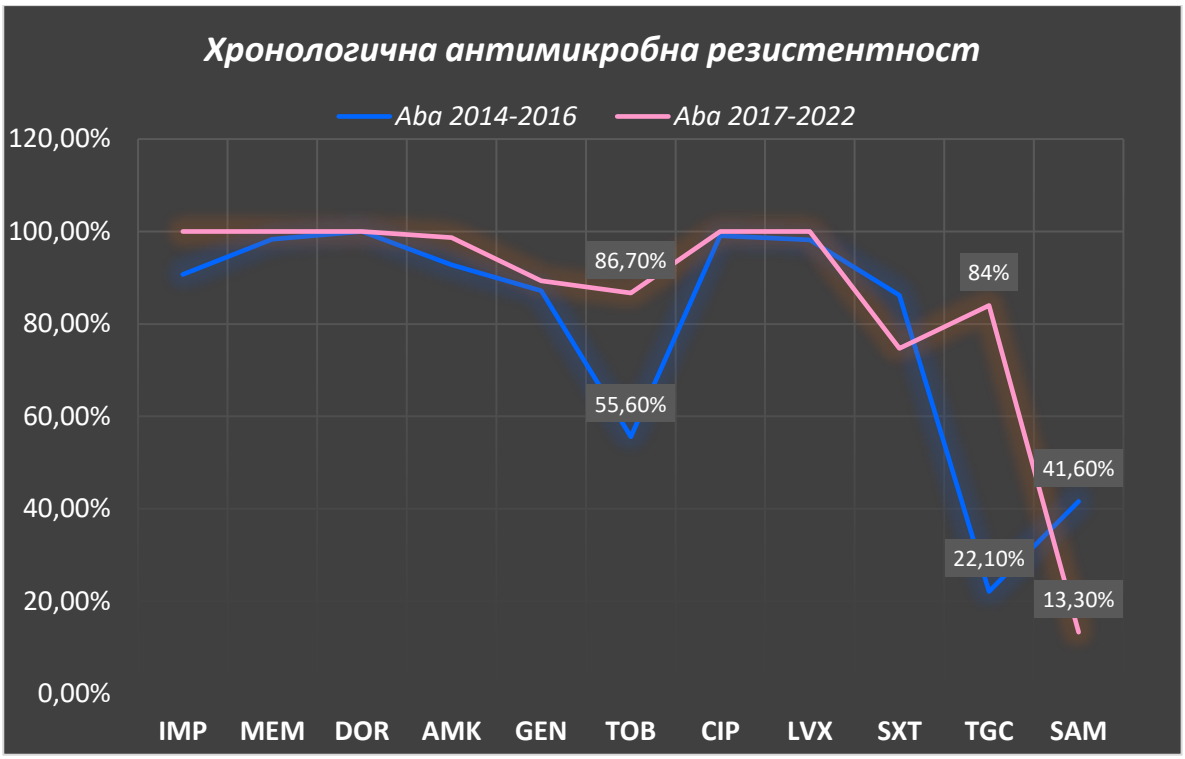
S, чувствителни; I, чувствителни при повишена експозиция (интермедиерни); R, резистентни; МПК, минимална потискаща концентрация; N/A, неприложимо

[a] $МПК_{50}$ и $МПК_{90}$ – 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 14.** 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.).

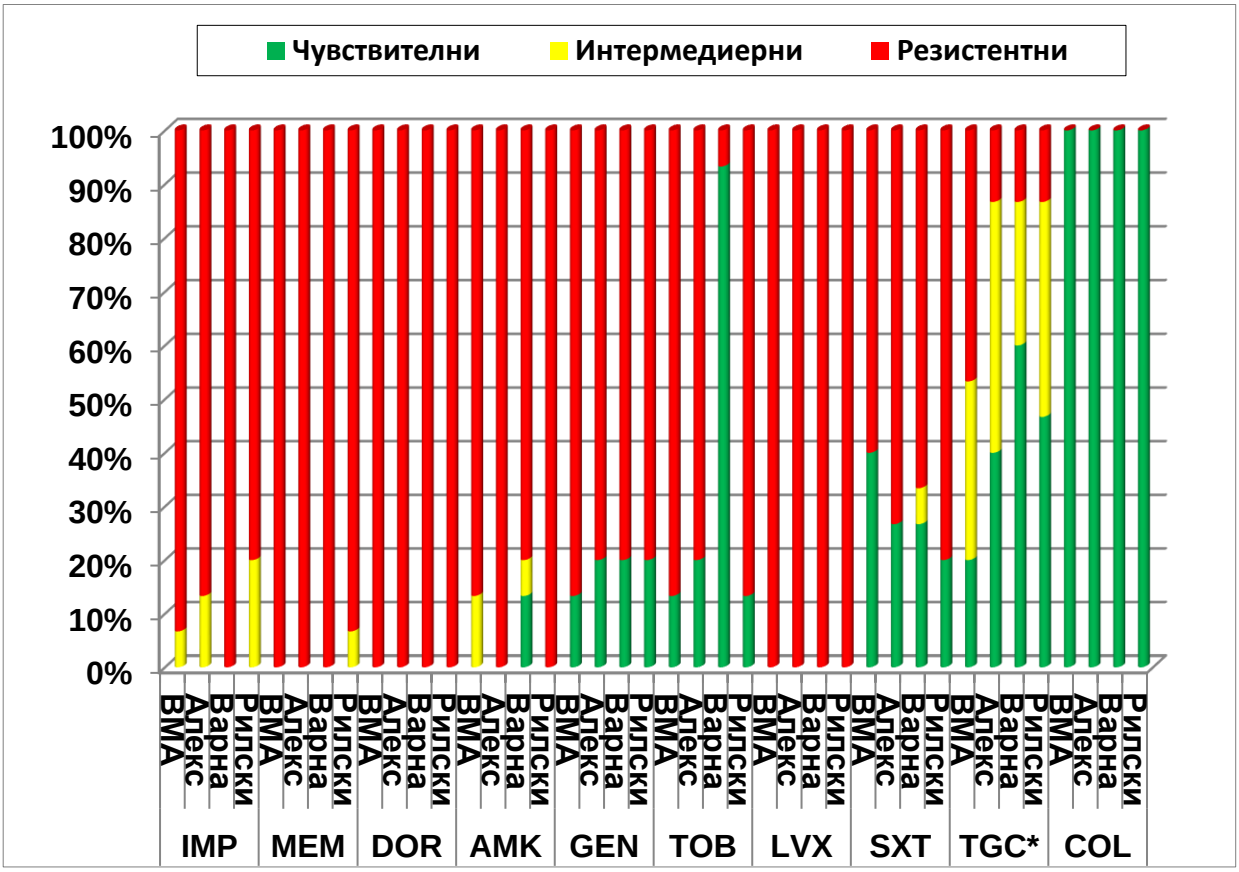


Фигура 14. Хронологична антимикробна резистентност, изразена в %, на проучените карбапенем-нечувствителни изолати *A. baumannii* в периода 2014–2022 г.

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 15**). Изолатите от Университетската болница във Варна показаха значимо по-висока чувствителност ($p < 0.001$) към TOB (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 TGC в сравнение с тези от ВМА (60% спрямо 20%, $p < 0.001$).



Фигура 15. 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 *Enterobacterales*); 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). Отчетената през 2014–2016 г. резистентност сред MDR-AB от четирите университетски болници в София и Варна (90.7% към IMP и 98.3% към MEM) беше по-висока от наблюдаваната сред нозокомиални MDR-AB, изолирани в УМБАЛ "Св. Георги" – Пловдив, през периода 2010–2014 г. (84% R), както и сред по-стари MDR-AB (2005–2012 г.), изолирани от пациенти в две болници във Варна (28% R, $p < 0.001$) (Stoeva et al. 2014; Petrova et al. 2017). Също така сред карбапенем-нечувствителните *A. baumannii* от ВМА, изолирани през 2014–2016 г., резистентността към аминогликозиди беше значимо по-висока (86.7% и към трите антибиотика) от определените нива в болницата през 2008 г. (AMK 25%, GEN 11.7% и TOB 2.9%) – $p < 0.001$ (Савов et al. 2014).

Според данни на Националната програма BulSTAR, 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.). Мащабно проучване върху разпространението на нозокомиални MDR-AB, проведено в голям университетски клиничен център в съседна Сърбия, доказва много висока честота на тези проблемни патогени за периода 2012–2015 г., вариращa от 79.5% в нехирургичните отделения до 93.7% в хирургичните (Zivanovic et al. 2017).

Общо 12.4% от изследваните изолати *A. baumannii* през 2014–2016 г. показаха XDR резистотип с устойчивост към всички тествани АМЛС, с изключение на COL. Честотата на XDR-AB в проучването беше по-ниска ($p < 0.01$) от докладваната в друга Балканска държава, Босна и Херцеговина, където през 2011–2012 г. са идентифицирани 23% XDR-AB изолати в Университетски клиничен център в Сараево (Dedeić-Ljubović et al. 2015).

Обикновено XDR-AB запазват чувствителността си към полимиксини, в т. ч. COL. През 2016 г. в Европа са докладвани 2% COL-резистентни инвазивни изолати *Acinetobacter* spp., от които 70.7% от Гърция и Италия (European Centre for Disease Prevention and Control 2017). През 2015–2016 г. BulSTAR докладва единични COL-резистентни изолати *A. baumannii* и в нашата страна (Българска Асоциация на Микробиолозите: https://bam-bg.net).

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).

В периода 2017–2022 г. нашите проучвания бяха фокусирани върху CRAB изолати от ICU пациенти. Тестването на тяхната антимикробна чувствителност показа запазена активност само на два антибиотика (**Фигура 14.**): COL (0% резистентност) и SAM (13.3%). Абсолютната чувствителност към COL отразява ниското ниво на разпространение на COL-резистентни изолати в страната (около 0.5% от анализираните *A. baumannii* от BulSTAR, общо за периода 2018–2021). От друга страна CRAB изолатите от мониторираните университетски болници, получени основно от интензивното отделение на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, бяха значимо по-чувствителни към SAM от изолатите *A. baumannii* в национален мащаб (13.3% R срещу 67.1% R, $p < 0.001$) (Българска Асоциация на Микробиолозите: https://bam-bg.net). Ниската резистентност към препарата в последните години на нашето проучване контрастира с високата устойчивост към sulbactam на съвременните CRAB изолати, продуциращи OXA-23 CHDL (Yang et al. 2019b). Като причина за възстановяване на активността му спрямо 2014–2016 г. (41.6% R изолати) може да се посочи вероятна редуцирана употреба и по-нисък селективен натиск след преминаване към интерпретация на антимикробната чувствителност по EUCAST (2016 г.), в чиийто списък с препоръчани АМЛС за *Acinetobacter* spp. липсва SAM. В съответствие със световните тенденции за лечение на тежки инфекции с CRAB при ICU пациенти (HAP, VAP, BSI с тежък сепсис/септичен шок), приложението на комбинирана терапия с два *in vitro* активни антибиотика е основен подход, при който в съображение влизат COL за парентерална или инхалаторна употреба, висока доза SAM, аминогликозид и висока доза TGC (Piperaki et al. 2019; Coppola et al. 2022).

Резистентността към карбапенеми, аминогликозиди и флуорохинолони сред нашите CRAB изолати (2017–2022) беше сходна с отчетените нива в проучването EURECA, включващо инвазивни CRAB от 10 европейски държави (Албания, Хърватия, Гърция, Италия, Косово, Черна гора, Румъния, Сърбия, Испания и Турция) в периода от май 2016 г. до ноември 2018 г., както следва: IMP, 99.6% R изолати; MEM, 99,6%; AMK, 95,6%; GEN, 92,9%; TOB, 80,9%; и CIP, 100%. Авторите докладват 9.3% резистентни на COL изолати, каквито не бяха открити в настоящата работа (Kostyanev et al. 2021). Други скорошни проучвания също идентифицират COL-резистентни CRAB изолати на Балканите през

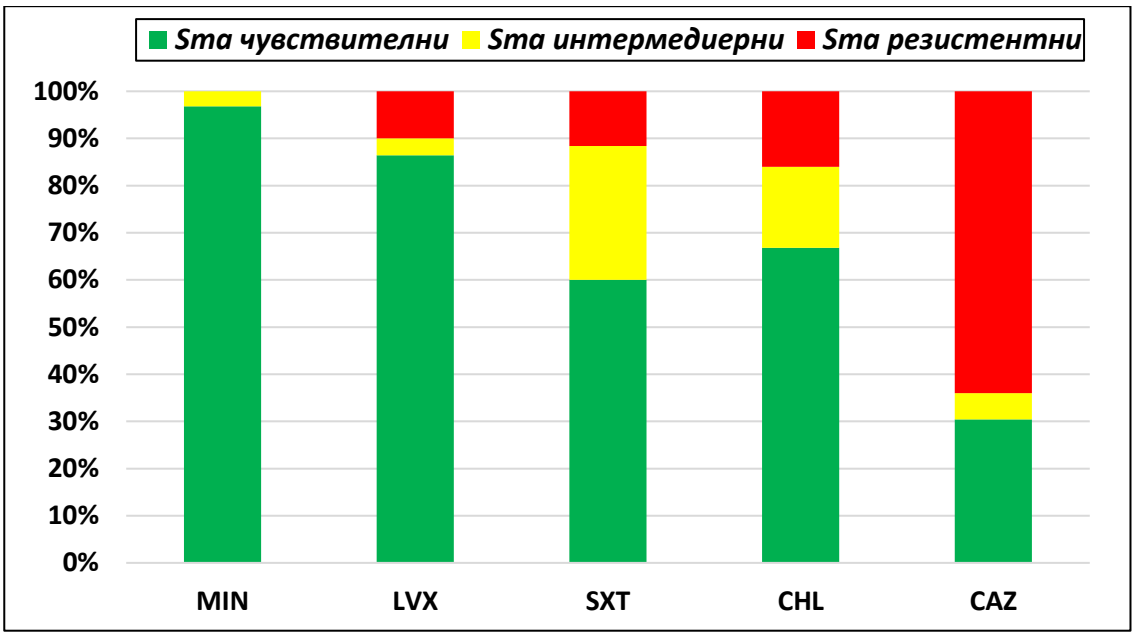
последната декада – в Хърватия (2013–2018) (D'Onofrio et al. 2020), Гърция (2015–2017) (Palmieri et al. 2020) и Сърбия (2018–2021) (Kabic et al. 2022).

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).

Данните на ECDC за ICU-ИСМО в ЕС/ЕИП през 2019 г. показват, че 82.3% от *A. baumannii*-асоциираните инфекции се дължат на CRAB, както и най-интензивна употреба на карбапенеми точно в интензивните звена (European Centre for Disease Prevention and Control 2023d). Наскоро Liu et al. докладват 77% честота на разпространение на CRAB сред клиничните изолати *Acinetobacter* spp. от пациенти на 77 ICUs в Китай през 2020 г. (Liu et al. 2022b). Отчетените нива на антибиотична резистентност сред китайските CRAB са близки до установените от нас, касаещи изолатите от ICUs в периода 2019–2022 г., а именно: IMP (93.4% резистентни изолати в Китай срещу 100% в настоящото проучване), MEM (100% и в двете проучвания), GEN (86.1% / 89%), CIP (94.2% / 100%), SXT (75.9% / 75%) и COL (0.4% / 0%). TGC е демонстрирал отлична *in vitro* активност (само 2.5% R CRAB изолати), сравнена с активността му срещу CRAB от последния мониториран период в настоящата работа (84% R, $p < 0.001$). Друго азиатско проучване върху чувствителността на инвазивни CRAB изолати с MDR фенотип от университетска болница в Корея (2015–2021 г.) представя сходни с нашите обобщени резултати за периода 2014–2022 г. по отношение на резистентността към GEN (90% R изолати в Корея / 88% R сред нашите) и CIP (100% / 99%), но значимо по-високо ниво на устойчивост към SAM (97.6% vs.35%, $p < 0.001$) (Park et al. 2023).

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

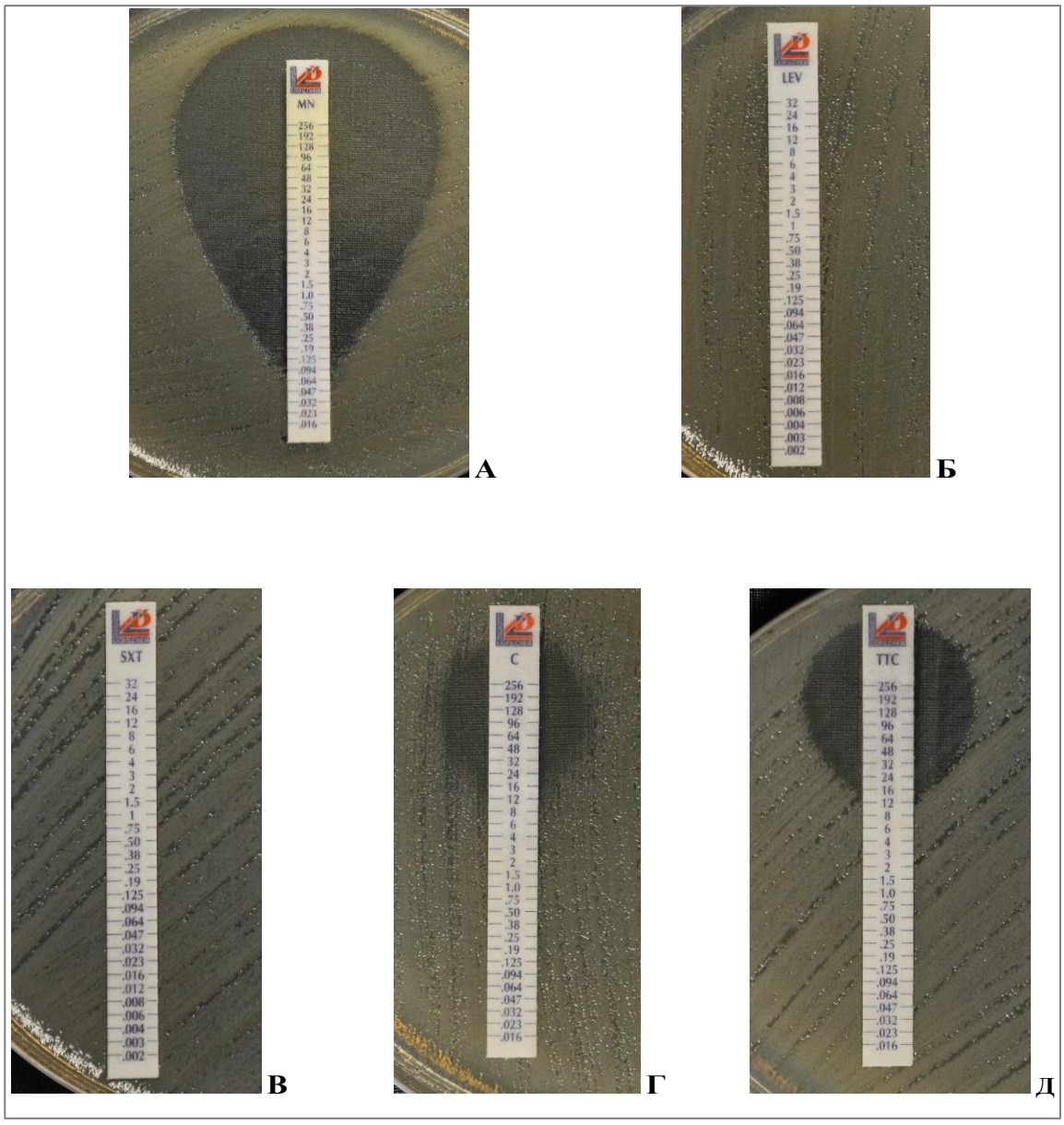
Антимикробната чувствителност на изолатите *S. maltophilia* беше тествана спрямо SXT и няколко други антибиотика (MIN, LVX, CAZ, CHL и TCC), които се включват в терапевтичните режими и за които са налични критерии за категоризиране на щамовете в документите на CLSI. Интерпретацията за SXT от началото 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 16.**, 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 16. 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 антимикробна чувствителност на изолатите (**Фигура 17**), разделени в две хронологични групи (2011–2016 и 2018–2023), е представена в **Таблици 31.** и **32.** Както е видно от тях, 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 $МПК_{50}$ и $МПК_{90}$ спрямо по-късните нозокомиални изолати *S. maltophilia*.



Фигура 17. Определяне на минимални потискащи концентрации (МПК) на 5 антибиотика чрез градиентен метод (MIC Test Strip, Liofilchem): **А.** minocycline (MIN), МПК=0.064 mg/L – чувствителен (S) изолат; **Б.** levofloxacin (LEV), МПК > 32 mg/L – резистентен (R) изолат; **В.** trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), МПК > 32 mg/L – R изолат; **Г.** chloramphenicol (C), МПК=16 mg/L – изолат с намалена чувствителност (интермедиерен); **Д.** ticarcillin-clavulanic acid (TTC), МПК=12 mg/L – S изолат.

Таблица 31. Антимикробна чувствителност на проучените изолати *S. maltophilia* от периода 2011–2016 г. (*n* = 168).

Антимикробни 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] $МПК_{50}$ и $МПК_{90}$ – 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 32. Антимикробна чувствителност на проучените изолати *S. maltophilia* от периода 2018–2023 г. (*n* = 82).

Антимикробни 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] $МПК_{50}$ и $МПК_{90}$ – 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.).

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 срещу 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 мониторирани 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%, $p < 0.01–0.001$).

Редица проучвания от различни части на света (Аржентина, САЩ, Китай) докладват MIN като най-активен антимикробен агент срещу *S. maltophilia*, като чувствителността варира в малки граници (95–100%) (Wei et al. 2016; Alcaraz et al. 2018; Sader et al. 2018; Flamm et al. 2019). Глобалната SENTRY програма за надзор на антимикробната резистентност докладва 99.1% чувствителност към MIN на тестваните клинични изолати *S. maltophilia* ($n = 464$) през 2013 г. (Flamm et al. 2016). Почти абсолютна (99.5%) е и чувствителността към антибиотика за 11-годишен проследен период (2005–2016) при изследвани 3868 изолата от целия свят (Gales et al. 2019). И при двете мащабни проучвания стойностите както на глобалната, така и на регионалната чувствителност са в съответствие с отчетения в настоящата работа процент. Трябва да бъде акцентирано върху съхранената чувствителност към MIN на SXT-резистентните изолати *S. maltophilia*. Така например SENTRY проучване в САЩ (2014–2018 г.) отчита 92.8% чувствителност сред SXT-резистентните клинични изолати (Flamm et al. 2019). Подобни резултати са получени при тестване на антимикробната активност на MIN срещу клинични изолати *S. maltophilia* от целия свят (2008–2018 г.), които са избрани по фенотипна нечувствителност към SXT и/или LVX. Общо 92.7% от тях са демонстрирали *in vitro* чувствителност (Biagi et al. 2020a).

По отношение чувствителността на *S. maltophilia* към LVX, в гореспоменатото българско проучване се съобщават 88.5% чувствителни клинични изолати (Божкова 2016), което е почти идентично с установената чувствителност в дисертационния труд (86.4%). Според различни доклади, нивата на чувствителност на клиничните изолати *S. maltophilia* към LVX варират от 56.3% (Flamm et al. 2016) до 99.4% (Bostanghadiri et al. 2019). Глобалната чувствителност, отчетена в мащабното 20-годишно SENTRY проучване (1997–2016), е 81.5% (Gales et al. 2019). По данни на същото проучване процентният дял на LVX-чувствителните клинични изолати *S. maltophilia* в Европа (23 държави, без участие на България) е 83.6%, който е много близък до определения от нас. От 2010 г. надзорната програма SENTRY отчита възникване на клинични изолати *S. maltophilia* с тревожна

антимикробна резистентност към препаратите от първа линия – едновременно към SXT и LVX, предимно в САЩ и Латинска Америка (Gales et al. 2019). Определената в дисертационния труд обща резистентност към антибиотика за целия проследен период (10%) е близка до констатираната в цитираното по-горе проучване в Унгария, в което авторите докладват около 9% резистентни изолати от респираторен тракт (Gajdács and Urbán 2019). В годините на пандемия от COVID-19 зачестява доказването на LVX-резистентни изолати *S. maltophilia* в световен мащаб (Wang et al. 2020a; Li et al. 2020a). Като рискови фактори за селектирането им се посочват предшестваща употреба на флуорохинолони, продължителен престой в ICU, както и предходна експозиция на други класове антибиотици (Wang et al. 2020a).

Установената чувствителност към CHL в настоящото проучване (66.8%) е сигнификантно по-висока от докладваната при тестването на по-ранни нозокомиални изолати *S. maltophilia* от Варна и Плевен (44.8%, $p < 0.001$) (Божкова 2016). Според нашите резултати и данни на други колективи, делът на щамове с интермедиерна чувствителност е сравнително висок и достига до 45% (Chung et al. 2013; Herrera-Heredia et al. 2017). От друга страна резистентността на *S. maltophilia* към CHL варира в широк диапазон (от 0% до 49%) в различни проучвания, което определя противоречивите мнения относно активността на препарата (Chung et al. 2013; Wei et al. 2016; Gallo et al. 2016). По-ранни проучвания, проведени в Мексико (Herrera-Heredia et al. 2017) и Турция (Çıkman et al. 2016), докладват съответно 14.3% и 18.2% CHL-резистентни изолати, които са много близки стойности до нашия резултат (16%).

Продукцията на хромозомно-медиираните L1 и L2 β-лактамази от всички изолати *S. maltophilia* определя тяхната широкоспектърна резистентност към β-лактами, вкл. карбапенеми. Цефалоспоринът от трета генерация ceftazidime е слаб индуктор на серин-съдържащата L2 цефалоспориназа и в документите на CLSI присъстват МПК-базирани гранични стойности за интерпретация на чувствителността на изолатите (Gibb and Wong 2021). Резистентността към CAZ на проучените нозокомиални изолати *S. maltophilia* (64% R) е малко по-висока от докладвана от Божкова (56.3% R) при тестване на клинични щамове в периода 2007–2015 г. (Божкова 2016). Също така процентният дял на CAZ-резистентни нозокомиални изолати *S. maltophilia* в настоящия труд е значимо по-висок от съответния дял в SENTRY проучване, което анализира глобалната антимикробна чувствителност на клиничните щамове *S. maltophilia* през 2013 г. (64% vs. 51.5%, $p < 0.01$) (Flamm et al. 2016). Високи нива на устойчивост към CAZ са регистрирани в по-ранно проучване в съседна Турция (72%), в което аналогично на нашето изследване

цефалоспоринът е показал най-ниска активност (Çıkman et al. 2016). При тестване на проблемни изолати *S. maltophilia* (нечувствителни към SXT и/или LVX) с различен географски произход (2008–2018) е установено, че само 17.1% са *in vitro* чувствителни на CAZ (Biagi et al. 2020a). Въпреки това, в литературата се срещат доклади за клиничен успех при монотерапия с CAZ при инфекции, причинени от SXT-резистентни *S. maltophilia* (Falagas et al. 2008; Gibb and Wong 2021).

Някои проучвания посочват TTC като алтернатива на SXT при лечението на инфекции, асоциирани със *S. maltophilia,* до голяма степен заради включената в него клавуланова киселина, която потиска активността на L2 β-лактамазата от клас A (Gibb and Wong 2021). Нивата на *in vitro* чувствителност на клиничните изолати *S. maltophilia* варират в много широк диапазон – от 18% до 91% (Krueger et al. 2001; Wu et al. 2012). Според нашите резултати този антимикробен агент показва сравнително добра активност (60.7% S и 18.5% R изолати от периода 2011–2016 г.), докато данните от изследването на Божкова демонстрират значително по-ниска *in vitro* активност (38.5% S и 61.5% R щамове; $p < 0.001$) (Божкова 2016). Wei et al. при тестване на китайски SXT-чувствителни изолати *S. maltophilia* установяват по-близки до отчетените от нас стойности (76.3% S и 12.5% R), като при чувствителността разликата е статистически значима ($p = 0.0108$ или $p < 0.05$) (Wei et al. 2016).

5.1.4. 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 МДТ, подробно описани в **т. 4.3.** Антимикробната чувствителност на избрани 135 изолата е представена в **Таблица 33.** 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.

CFCD 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 комбинираните нови препарати, съдържащи BL и 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 (отскоро са налични, но само за *Enterobacterales*), резултатите от тестването на аминогликозида PLZ са представени само като МПК диапазон, $МПК_{50}$ и $МПК_{90}$. Бяха отчетени еднакви $МПК_{50}$ за двата вида (8 mg/L) и по-висока $МПК_{90}$ срещу CRAB изолатите (>256 mg/L).

Таблица 33. 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 *P. aeruginosa* (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 *A. baumannii* (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
***S. maltophilia* (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] $МПК_{50}$ и $МПК_{90}$ – 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. 5.2.1.**), е изложена в **Таблица 34.** Продуцентите на MBLs демонстрираха абсолютна резистентност към всички комбинирани BL/BLI препарати. От друга страна, непродуциращите MBLs изолати показаха значимо по-висока чувствителност ($p < 0.05$), вариращa 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 малкия брой на изолатите, особено в MBL-групата.

Таблица 34. Сравнителна антимикробна чувствителност на MBL-продуциращи и MBL-непродуциращи изолати *P. aeruginosa* към нови β-лактамни антибиотици.

Антибиотици	**MBL продуценти (*n* = 11)**		**non-MBL продуценти (*n* = 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.

Карбапенем-резистентните Грам-отрицателни бактерии (CRPA, CRAB и представителите на разред *Enterobacterales*) представляват глобална заплаха за общественото здраве (Bedos et al. 2021). В последните години са определени от СЗО като патогени с „критичен приоритет“, за които съществува спешна нужда от откриване и въвеждане в клинична употреба на нови антибиотици (Tacconelli et al. 2018). Производството на карбапенемази от различини молекулярни класове е един най-важните проблеми в съвременната медицинска практика. В плазмидите, носещи ген за карбапенемаза, често са локализирани и допълнителни гени, които придават резистентност към други групи АМЛС, в резултат на което се селектират MDR, XDR и дори PDR щамове (Nordmann and Poirel 2019). В тази връзка обект на интензивни проучвания в дисертационния труд бяха терапевтично проблемни *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, които освен към карбапенеми, демонстрираха и кръстосана резистентност към други антипсевдомонадни агенти. През последната декада при двата патогена беше отчетен значим ръст в устойчивостта към карбапенеми и аминогликозида TOB, а при CRAB и към

всички останали антибиотици, с изключение на TGC. Освен това, бяха установени тревожни нива на разпространение на XDR изолати в мониторираните болници – близо 85% и 30%, съответно сред карбапенем-нечувствителните *P. aeruginosa* и CRAB. Общо 60.3% бяха идентифицираните DTR-PA в периода 2015–2023 г., при това процентният им дял беше значимо по-висок сред по-новите нозокомиални изолати (76.7% vs. 50%, $p < 0.05$).

Понастоящем терапията на инфекциите, причинени от проблемни, карбапенем-резистентни НФГБ, се базира на ограничен брой антибиотици, като COL, аминогликозиди, TGC (CRAB) и SAM (CRAB), и най-вече на комбинации между тях или с карбапенеми (Piperaki et al. 2019; Coppola et al. 2022). За съжаление използването на някои от тези АМЛС е съпроводено със странични ефекти като токсичност или поява на резистентност. Антимикробните агенти, въведени наскоро в клиничната практика, като BL/BLI, в т.ч. CZA, IMR и MEV, аминогликозидът PLZ и сидерофорният цефалоспорин CFDC, са обещаващи терапевтични възможности срещу карбапенем-резистентните ентеробактерии, но някои от тях могат да се използват и в борбата с инфекциите, причинени от проблемни CRPA, CRAB и *S. maltophilia* (Coppola et al. 2022; Karvouniaris et al. 2023; Markovska et al. 2024). По тази причина беше тествана *in vitro* чувствителността на избрани НФГБ изолати от настоящото проучване ($n = 135$) към петте антибиотика.

Механизмът на действие на CZA включва от една страна свързване на цефалоспорина от трета генерация CAZ с PBPs в клетъчната стена на Грам-отрицателните бактерии, вкл. MDR/XDR *P. aeruginosa*, и от друга способността на BLI avibactam да инхибира β-лактамази от клас A (ESBLs и KPC-тип карбапенемази), клас C (AmpC цефалоспоринази) и частично карбапенемази от клас D (OXA-48 при *K. pneumoniae,* но не и CHDLs при *A. baumannii*). Препаратът е неактивен срещу MBLs (Daikos et al. 2021; Losito et al. 2022; Coppola et al. 2022). Това отговаря на резултатите от изпитване на *in vitro* активността на CZA срещу CRAB и MBL-продуциращите CRPA, които показаха абсолютна резистентност (**Таблици 33 и 34**).

Последните гайдлайни на *Американското дружество по инфекциозни болести* (IDSA) за лечение на инфекции с MDR Грам-отрицателни патогени предлагат CZA при повечето DTR-PA инфекции, при които са ограничени останалите терапевтични възможности (Tamma et al. 2022). От друга страна в гайдлайните на *Европейското дружество по клинична микробиология и инфекциозни болести* (ESCMID) липсват доказателства за ефективност от приложение на препарата при CRPA инфекции (Paul et al. 2022). При тестване чрез ДДМ 70.5% от всички карбапенем-нечувствителни изолати *P. aeruginosa* (2015–2023 г.) от настоящия труд бяха определени като CZA-устойчиви. Беше

установен значим хронологичен ръст в резистентността (56.3% R изолати през 2015–2016 и 93.3% R изолати през 2019–2023; $p < 0.001$). Процентният дял на CZA-резистентни *P. aeruginosa* от по-ранния период е много близък с публикувани наскоро резултати относно чувствителността към CZA (49.3% R) на нозокомиални MDR *P. aeruginosa*, изолирани през 2014–2017 г. в болница в Катар (Sid Ahmed et al. 2022). Включените в това кохортно проучване щамове имат много сходен профил на антибиотична резистентност като нашите изолати от периода 2015–2016 г., а именно: 90.7% резистентност към MEM (95.8% при изследваните от нас) и 50% DTR (идентична стойност с нашата).

Мащабно изследване на антимикробната чувствителност на клинични щамове *P. aeruginosa*, събрани в периода 2012–2014 г. в четири географски региона (Европа, Азия/Южен Тихоокеански регион, Латинска Америка и Близкия изток/Африка), част от глобалното INFORM проучване, отчита, че преобладаващата част от изолатите във всички региони са чувствителни (88.7-93.2%) към CZA (стойности на MIC_{90} от 8-16 mg/L). Те са демонстрирали по-ниска *in vitro* чувствителност към сравнителните β-лактами CAZ, MEM и TZP (Nichols et al. 2016). От резистентните на CZA изолати, 51.7% са идентифицирани като продуценти на MBLs (предимно VIM-тип) със или без ESBLs. Общо 27.3% от изолатите от глобалната колекция са били MEM-нечувствителни. От тях 72.4% са показали чувствителност към CZA ($МПК_{90}$ = 64 mg/L), като този процентен дял е значимо по-висок ($p < 0.001$) от установения сред нашите карбапенем-нечувствителни *P. aeruginosa* (2015–2023), тествани с градиентен МПК метод (22.5% S изолати и $МПК_{90}$ >256 mg/L).

В голямо проучване в САЩ върху антимикробната чувствителност на нозокомиални изолати *P. aeruginosa* от пациенти с пневмония, включително VAP, CZA също е показал добра *in vitro* активност ($МПК_{50}$/$МПК_{90}$, 2 и 4 mg/L; 96.6% чувствителност), включително и срещу MEM-нечувствителните изолати (86.3%) (Sader et al. 2017). Нивата на чувствителност са значимо по-високи ($p < 0.001$) от определените в настоящата работа (29.5% при цялата колекция от 2015 до 2023 г. и 22.5% при извадката, тествана чрез МПК-базиран градиентен метод), но следва да се акцентира, че американските изолати са събирани в по-ранен хронологичен период (2011–2015).

Не-β-лактамните инхибитори REL (бицикличен диазабициклооктан, структурно близък до avibactam) и VAB (цикличен BLI, базиран на боронова киселина), които влизат в състава на комбинираните препарати, съответно с IMP и MEM, предотвратяват разграждането на карбапенемите от някои β-лактамази. В редица проучвания те са демонстрирали синергизъм при потенциране на ефекта на карбапенемите срещу β-лактамази от класове A и C, особено KPC-тип карбапенемази и AmpC цефалоспоринази,

но няма достатъчно доказателства за инхибиране на металоензимите от клас B и β-лактамазите от клас D с карбапенемазна активност (Zhanel et al. 2018). По тази причина MBL-продуциращите CRPA и CHDL-продуциращите CRAB изолати от нашето проучване останаха резистентни на IMR и MEV ($МПК_{90}$ >32 mg/L). Добавянето на REL значително потенцира активността на IMP срещу IMP-нечувствителни *P. aeruginosa*, характеризиращи се с продукция на AmpC цефалоспориназа и загуба на OprD порини. В изолати с тези механизми на резистентност е отчетена до 16 пъти редукция в МПК на IMR спрямо МПК на IMP (Lapuebla et al. 2015; Zhanel et al. 2018). Доказано е, че добавянето на REL към IMP не възстановява активността на карбапенема срещу OXA-23-продуциращите CRAB (Lapuebla et al. 2015), което беше доказано и в нашето изследване ($МПК_{50}$ и $МПК_{90}$ на IMP и комбинацията IMR бяха идентични и много високи, >32 mg/L, което е видно от **Таблици 30.** и **34.**).

Добавянето на VAB към MEM почти не оказва влияние върху активността на карбапенема спрямо CRPA и CRAB (Zhanel et al. 2018; Paul et al. 2022), което беше потвърдено и чрез високите $МПК_{90}$ (>32 mg/L), надвишаващи 4-кратно граничните стойности на EUCAST за дефиниране на чувствителност. В мащабно международно проучване, при което е тествана *in vitro* активността на препарата спрямо *P. aeruginosa*, изолирани от хоспитализирани пациенти с HAP/VAP в Европа, са отчетени близки до нашите $МПК_{50}$ и $МПК_{90}$ (съответно 16 и >32 mg/L) в групата на MDR-PA (Shortridge et al. 2021). Сред тези терапевтично проблемни изолати авторите докладват 59% резистентност към MEV общо за Европа, със значима разлика ($p < 0.0001$) в Източна Европа (68.5%) и Западна Европа (47%).

В настоящото проучване CFDC демонстрира най-висока *in vitro* активност от новите антибиотици срещу трите НФГБ патогена, вариращa от 83.6% до 100%, съответно спрямо CRAB и *S. maltophilia*. Данните отразяват способността на сидерофорния антибиотик да противодейства на карбапенемази от A, B и D молекулярни класове и да проявява висока стабилност срещу AmpC цефалоспоринази, мутации в OMPs и ефлукс помпи, комплексно въвлечени 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 CTT- 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 CTT, 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 CTT (съответно 91.6% и 88.3%), както и при комбинирана резистентност към трите нови антимикробни препарата (100 %), което е видно и от нашите резултати. Систематичен преглед на литературата и мета-анализ, извършени от Karakonstantis et al. на база 78 проучвания, 87% от които публикувани в периода 2020–2023 г., показват отлична *in vitro* активност на CFDC срещу клиничните изолати *P. aeruginosa*. Според представените резултати общата честота на CFDC-нечувствителните изолати е 1.4% [95% CI 0.5–4.0%], а в групата на CRPA тя е 3.5% [95% CI 1.6–7.8%] (Karakonstantis et al. 2024). Докладвани са клинични изолати *P. aeruginosa*, които демонстрират кръстосана резистентност към CFDC и CTT (Shields et al. 2023a).

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). Това налага продължителен надзор на чувствителността на CRPA и в нашата страна, с оглед откриването на първите NDM-1-продуциращи клинични изолати *P. aeruginosa* от високорисковия клон ST654 преди няколко години (Kostyanev et al. 2020). Въпреки включването на 8 NDM-1-положителни и 3 VIM-положителни изолати (подробно описани в **т. 5.2.1.**) в *in vitro* изследванията на активността на CFDC в настоящия труд, демонстрираната чувствителност беше 97.5% и значимо по-висока от докладваната при CRPA, част от които с MBLs, в наскоро проведено проучване в Чехия (77.5%, $p < 0.01$) (Malisova et al. 2023). В докладваните CFDC-резистентни изолати ($n = 9$) са идентифицирани bla_{IMP} ($n = 8$) и bla_{VIM} ($n = 1$) гени. Два от трите докладвани през 2023 г. български IMP-продуциращи изолати *P. aeruginosa*, от кръв и урина, също са показали устойчивост към CFDC, с МПК 4 mg/L и 8 mg/L (Stoikov et al. 2023). Единственият CFDC-резистентен и карбапенем-резистентен щам *P. aeruginosa* от нашето проучване беше изолиран от урина на хоспитализиран пациент в клиника по Съдова хирургия през 2015 г. и също показа МПК = 4 mg/L. Въпреки своя XDR и DTR профил, в него не бяха открити гени за MBLs. Общото в резистома на един от изолатите от

работата на Stoikov et al. (IMP-84-положителен) и нашия изолат е *bla*$_{PER-1}$. Продукция на PER-1 ESBL е един от ключовите механизми в развитието на резистентност към CFDC при Грам-отрицателните бактерии, в т.ч. *P. aeruginosa* (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).

Въпреки демонстрираната мощна *in vitro* активност на CFDC срещу CRAB, както беше отбелязано по-горе, има докладвани CFDC-резистентни CRAB щамове в различни части на света, някои от които са изолирани още преди въвеждането на антибиотика в клиничната практика, какъвто е случаят и с нашите 9 изолата. Seifert et al. установяват отлична активност на CFDC срещу глобална колекция от CRAB щамове от периода 2012–2016 г., изолирани от хоспитализирани пациенти в 114 болници в 47 държави, от пет световни региона, в т.ч. Африка, Азия и Близкия изток, Европа, Латинска Америка и Северна Америка (стойности на МПК$_{50/90}$ съответно 0.5 и 4 mg/L) (Seifert et al. 2023). Авторите класифицират 18.2 % от изследваните изолати като резистентни при използване на неспецифичните PK-PD гранични стойности на EUCAST (чувствителни ≤2; резистентни >2 mg/L) (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2023). Този процентен дял е много близък до установения в настоящото изследване (16.4%).

В по-ново SENTRY проучване на MEM-резистентни изолати *A. baumannii*, събрани през 2020 г. в САЩ и Европа, Shortridge et al. съобщават за стойности на CFDC МПК$_{50/90}$ съответно от 0.25 и 2 mg/L и честота на резистентност от 2.9 % (Shortridge et al. 2022), която е значимо по-ниска ($p < 0.01$) от установената в настоящия труд. В друго международно мултицентрово проучване 113 изолата *A. baumannii* са показали много по-висока стойност

на CFDC МПК$_{90}$ (>64 mg/L) и по-високо ниво на резистентност по критериите на CLSI (20.35%, $p < 0.001$) спрямо резултатите на Shortridge et al. (Ballesté-Delpierre et al. 2022). Тези констатации могат да се обяснят с по-слабо балансираната колекция от щамове, включваща голям брой изолати от Азербайджан (20 % от всички изследвани), част от които са демонстрирали високо ниво на резистентност към CFDC (МПК ≥32 mg/L). Подобно разпространение (21%) на инвазивни CRAB, резистентни към CFDC, е установено и в Тайван, като всички щамове са изолирани преди клиничното одобрение на антибиотика през 2019 г. (Yamano et al. 2022). Наскоро в съседна Турция е докладвана значимо по-висока честота на разпространение на CFDC-резистентни CRAB изолати (2021 г.) в сравнение с отчетения в нашето проучване относителен дял (39.3% срещу 16.4%; $p < 0.001$) (Uskudar-Guclu et al. 2024).

Струва си да се отбележи, че всички CFDC-резистентни CRAB изолати в настоящото проучване бяха PCR-положителни за *bla*$_{PER-1}$ (т. 5.2.2.1.), 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) и правят заключение, че високото ниво на резистентност към антибиотика при CRAB се асоциира с производство на ензима и понижена регулация на системата за транспорт на желязо (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). *In vitro* активността на CFDC срещу нашите SXT-резистентните изолати (МПК диапазон: 0.032–0.125 mg/L) не се различава от демонстрираната спрямо SXT-чувствителните. Единственият SXT-резистентен респираторен изолат *S. maltophilia*, използван в модел на белодробна инфекция в проучването на Nakamura et al., също е бил чувствителен на CFDC (МПК = 0.125 mg/L). При създадения модел на белодробна *S. maltophilia* инфекция в неутропенична мишка, CFDC, приложен в доза 30 mg/kg и 100 mg/kg телесно тегло, демонстрира значително, дозозависимо намаляване на броя на жизнеспособните бактериални клетки в сравнение с нетретираните контроли, което представя експериментално доказателство за ефективността на CFDC в терапията на пневмония, асоциирана с патогена (Nakamura et al.

2021). В друго проучване, извършено в голяма университетска болница в Тайланд, също е открита 100% чувствителност към CFDC при тестване на *S. maltophilia* изолати от кръв, а установената $МПК_{90}$ (0.25 mg/L) е идентична с определената от нас (Hsueh et al. 2019).

Сидерофорният цефалоспорин демонстрира мощна активност и 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 Méndez-Sotelo et al. представят резултати от тестване на антимикробната чувствителност на 101 клинични изолата *S. maltophilia* (2012–2022) в Лабораторията по клинична микробиология към Националния институт по рехабилитация в Мексико Сити (Méndez-Sotelo et al. 2024). Авторите отчитат 5 изолата с МПК ≥2 mg/L (4.95% от цялата проучена колекция), които докладват като „резистентни" според критериите на CLSI-2023. По действащите PK-PD критерии на EUCAST само 3 изолата *S. maltophilia* могат да се разглеждат като „резистентни" (МПК = 4 mg/L). Проучването потвърждава високата *in vitro* активност на CFDC спрямо *S. maltophilia* ($МПК_{50/90}$ съответно 0.25 mg/L и 1 mg/L).

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% CFDC-NS, 95% CI 0.2-0.7%), което съвпада с нашите находки.

Plazomicin (ZEMDRI) е одобрен за клинична употреба, като индикациите за приложението му включват cUTIs при възрастни пациенти, вкл. пиелонефрит, причинени от чувствителни микроорганизми (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *E. cloacae*)

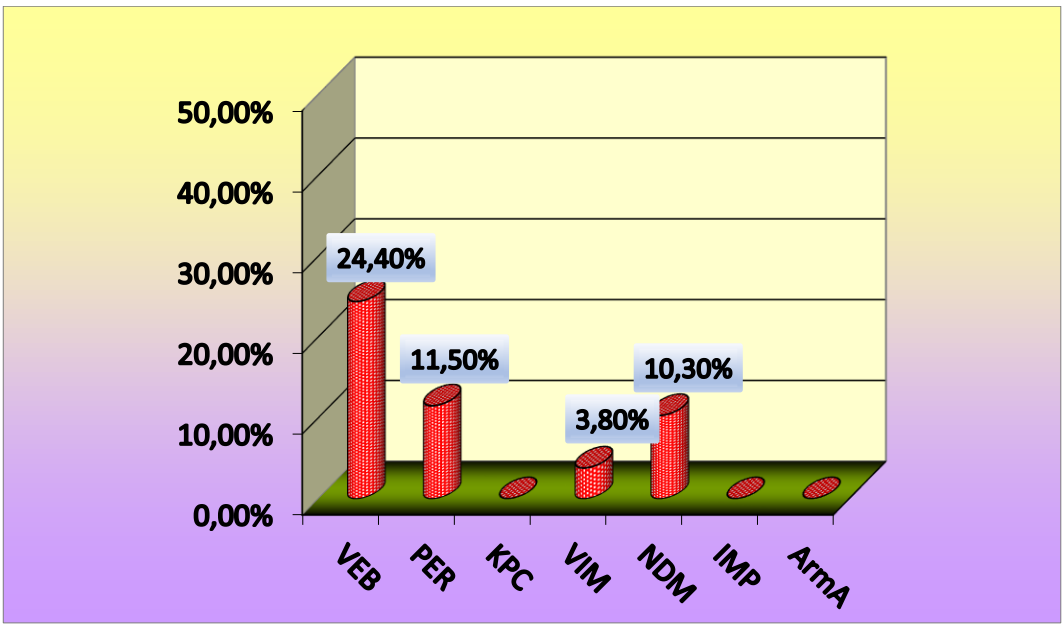
(https://zemdri.com). По тази причина в последните години се провеждат интензивни проучвания за чувствителността към препарата на *Enterobacterales* патогени, а неговата *in vitro* активност срещу *P. aeruginosa* и *A. baumannii* се докладва само като МПК диапазон и $МПК_{50/90}$. В мащабно проучване, оценяващо активността на plazomicin срещу Грам-отрицателни и Грам-положителни клинични изолати от Канада в периода 2013–2017 г., се посочват $МПК_{50}$ = 4 mg/L и $МПК_{90}$ = 16 mg/L в групата на *P. aeruginosa*, които са много близки до отчетените в нашето изследване (Walkty et al. 2019). При изолатите *A. baumannii* (MEM-чувствителни) са установени 8-кратно по-ниска $МПК_{50}$ (1 mg/L) и >32 пъти по-ниска $МПК_{90}$ (8 mg/L) спрямо определените МПК стойности срещу CRAB изолатите в настоящия труд. В друго проучване, част от глобалната надзорна програма ALERT, Castanheira et al. докладват ограничена активност на plazomicin срещу тестваните *Acinetobacter* spp. от 26 държави в Европа (2014–2015 г.), като стойностите $МПК_{50/90}$ (8 mg/L / >128 mg/L) съвпадат с нашите резултати (Castanheira et al. 2018). От друга страна, аминогликозидът е демонстрирал добра *in vitro* активност срещу клиничните изолати *P. aeruginosa* ($МПК_{50/90}$ = 4 mg/L / 8 mg/L), сходна с тази на AMK.

5.2. Водещи механизми на резистентност сред проучените НФГБ изолати

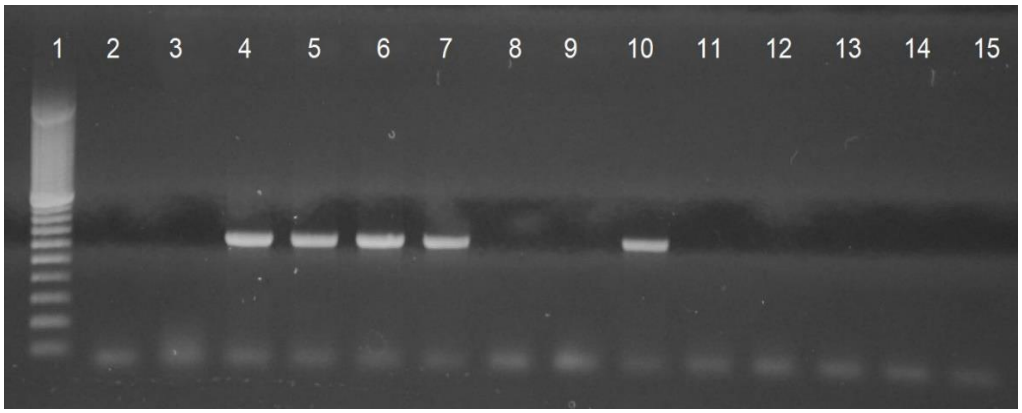
5.2.1. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху механизмите на резистентност на карбапенем-нечувствителни *P. aeruginosa*

5.2.1.1. 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 18.** Най-широко рапространение (24.4%) сред проучените терапевтично проблемни изолати *P. aeruginosa* от четири университетски болници, 3 в София и 1 във Варна, показа генът $bla_{VEB\text{-}like}$ (**Фигура 19**). Общо 11 от изолатите бяха идентифицирани като продуценти на металоензими от клас B / подклас B1, от тях 8 на NDM-тип MBLs и 3 на VIM-тип MBLs. Не бяха открити гени за KPC-тип карбапенемази от клас A, IMP-тип MBLs от клас B и ArmA 16S рРНК метилаза.



Фигура 18. Честота на разпространение на гени, кодиращи β-лактамази от класове A и B, и ArmA 16S рРНК метилаза, в нозокомиални изолати *P. aeruginosa* (*n* = 78).



Фигура 19. Агарозна гел-електрофореза на **643-bp** PCR продукти на ***bla*VEB-like** ген, идентифициран в клинични изолати *P. aeruginosa*. Линия 1 – **Ladder 100 bp**; 2 – отрицателна контрола; 4-7 и 10 – PCR-положителни клинични изолати; 3, 8-9 и 11-15 – PCR-отрицателни изолати.

Широката употреба на β-лактами и адаптивният капацитет на генома на *P. aeruginosa* водят до неудържимо нарастване на антимикробната резистентност на патогена в последната декада. Придобитата устойчивост към тях се асоциира както с ензимни, така и с неензимни механизми. Ензимните включват производството на различни типове ESBLs, карбапенем-хидролизиращи ензими предимно от клас B и по-рядко от клас A, както

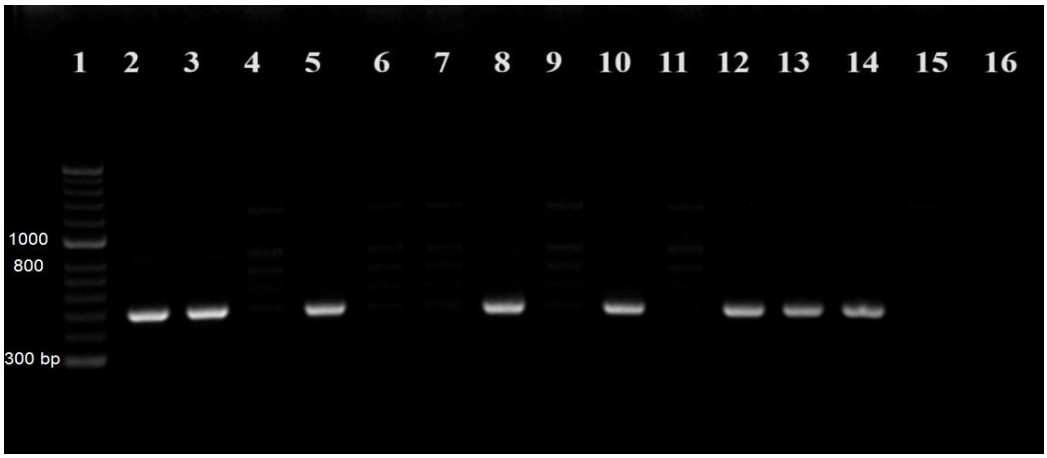
и свръхпродукция на хромозомните AmpC ензими от клас C (Torrens et al. 2019; Glen and Lamont 2021).

VEB- и PER-тип ESBLs, попадащи в клас A2 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 $bla_{\text{VEB-1}}$ се увеличава под влияние на IS*1999* 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 $bla_{\text{PER-like}}$ 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.

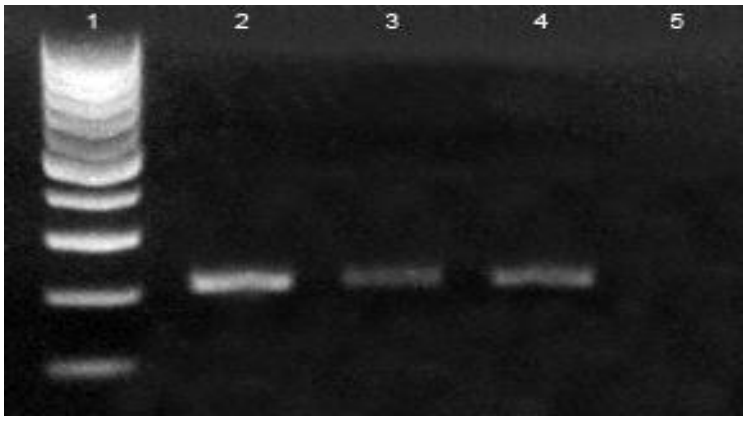
През последното десетилетие разпространението на VEB- и PER-продуциращи *P. aeruginosa* е силно вариабилно както в световен мащаб, така и в отделните държави. Така например проучвания сред нозокомиални изолати от университетски болници в Иран сочат както ниско ниво на разпространение (13.3% и 0%, съответно за VEB-1 и PER-1 ESBLs, през 2014–2015 г.), така и високо (съответно 40% и 35% през 2018–2019) (Amirkamali et al. 2017; Haghighi and Goli 2022). Честотата на доказване на VEB и PER в по-новото проучване на Haghighi и Goli е значимо по-висока от установената в настоящата работа (съотв. $p < 0.05$ и $p < 0.01$). Срещат се и доклади, в които продукцията на ESBLs от клас A е сравнително рядък механизъм на резистентност към β-лактами при *P. aeruginosa*. Croughs et al. обобщават резултатите от 14-годишно надзорно проучване (1998–2011) в 14 големи

болници с различно географско положение в Нидерландия. При изследвани 1528 изолата *P. aeruginosa*, 113 са демонстрирали резистентност към CAZ и само 4 от тях (5.3%) са доказани като ESBL продуценти, в т.ч. 2 с $bla_{\text{VEB-2}}$ (Croughs et al. 2018).

Най-значимата находка от проведения PCR скрининг е откриването на $bla_{\text{NDM-like}}$ (10.3%) и $bla_{\text{VIM-like}}$ (3.8%) гени, кодиращи MBLs (**Фигури 20. и 21.**).



Фигура 20. Агарозна гел-електрофореза, представяща идентифицирането на $bla_{\text{NDM-like}}$ гени (**488-bp фрагмент**) в клинични изолати *P. aeruginosa*. Линия 1 – **HyperLadder 50 bp** (Bioline); 2-3, 5, 8, 10, 12-14 –PCR-положителни изолати; 4, 6-7, 9, 11, 15 – PCR-отрицателни изолати; 16 – отрицателна контрола.



Фигура 21. Агарозна гел-електрофореза, представяща идентифицирането на $bla_{\text{VIM-like}}$ гени (**212-bp фрагмент**) в клинични изолати *P. aeruginosa*. Линия 1 – **Ladder 100 bp**; 2-4 – PCR-положителни изолати; 5 – отрицателна контрола.

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 (Kostyanev et al. 2020; Stoikov et al. 2023).

В настоящото проучване не бяха открити $bla_{\text{KPC-like}}$ гени. За разлика от глобално разпространените MBLs, KPC карбапенемазите от клас A и функционална група 2be се срещат предимно в Латинска Америка. Наскоро в Колумбия е идентифициран изолат, който едновременно продуцира KPC-2 и VIM-2 MBL (Rada et al. 2021).

Въпреки че кръстосаната резистентност към карбапенеми и аминогликозиди е широко разпространена сред MBL-продуциращите изолати *P. aeruginosa*, тя много рядко се свързва с участие на ArmA 16S рРНК 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 щама, а от тях половината са идентифицирани като едновременни носители на *armA* и $bla_{\text{IMP-1}}$ (Gurung et al. 2010). В по-късно индийско проучване върху детерминантите на аминогликозидна резистентност сред клинични изолати *P. aeruginosa* (2014–2015 г.) е установено, че 20.6% от тях са носители на гени за 16S рРНК метилази (*rmtB*, *rmtC*, *rmtF* и *armA*), но само един е *armA*-положителен (Mohanam and Menon 2017). Наскоро в Бразилия е идентифициран и *rmtD1* в изолати с bla_{KPC} и/или $bla_{\text{VIM-2}}$, които са показали пълна антимикробна резистентност (Costa-Júnior et al. 2021).

5.2.1.2. Резистомен анализ, базиран на WGS

Шестнадесет карбапенем-резистентни изолата *P. aeruginosa*, от които 15 нозокомиални XDR + DTR и 1 MDR от амбулаторен пациент с MB, бяха подложени на резистомен анализ. В подбора бяха включени 11 положителни за VIM/NDM-тип MBLs и 5 MBL-отрицателни изолата. Техните общи WGS харастеристики са представени в **Таблица 35.**

Таблица 35. 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*
Pae41	3796	04.04.2016	ВМА	КАРИЛ	ТБА	7.06	66.03	416 573	49	233 / O11
Pae48	2204	02.07.2019	Амбулаторен, МВ		Храчка	6.5	66.15	522 447	54	480 / O6
Pae49	3006	25.09.2019	УМБАЛ "Св. Анна"	Коремна хирургия	Гърлен секрет	7.15	65.75	251 876	77	111 / O12
Pae50	3007	25.09.2019	УМБАЛ "Св. Анна"	Коремна хирургия	Урина	7.16	65.75	231 855	78	111 / O12
Pae51	448	08.02.2020	УМБАЛ "Св. Иван Рилски"	ОАИЛ	ТБА	6.72	66.04	425 538	41	357 / O11
Pae52	1030	30.04.2020	УМБАЛ "Св. Иван Рилски"	ОАИЛ	ТБА	6.72	66.03	395 429	47	357 / O11
Pae53	799	02.08.2022	УМБАЛ "Св. Иван Рилски"	ОАИЛ	ТБА	6.74	66.04	398 956	45	235 / O11
Pae55	954	12.11.2021	УМБАЛ "Лозенец"	COVID-19	Урина	6.77	66.03	394 690	49	654 / O4
Pae57	323	04.03.2022	УМБАЛ "Лозенец"	COVID-19	Кръв	6.64	66.13	365 794	131	611 / O5
Pae58	464	06.07.2022	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	БАЛ	6.77	66.03	394 690	49	654 / O4
Pae59	655	04.07.2022	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	Кръв	6.77	66.03	395 137	47	654 / O4
Pae60	657	04.07.2022	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	Кръв	6.77	66.02	394 690	50	654 / O4

Таблица 35. Продължение

Геном №	Лаб. №	Дата на изолиране	Болница	Клиника	Материал	Дължина на генома (Mb)	GC %	N50 (bp)	Брой контиги (>1000 bp)	ST / O серотип*
Pae61	529	25.07.2022	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	Урина	6.86	66	539 571	47	654 / O4
Pae62	502	07.11.2022	УМБАЛ "Лозенец"	Урология	Урина	6.90	65.98	286 072	60	654 / O4
Pae67	527	21.08.2023	УМБАЛ "Лозенец"	КАИЛ	Кръв	6.80	66.02	285 832	73	654 / O4
Pae68	1170	10.11.2022	УМБАЛ "Св. Иван Рилски"	Гастроентерология	Урина	6.79	66.08	268 384	62	235 / O11

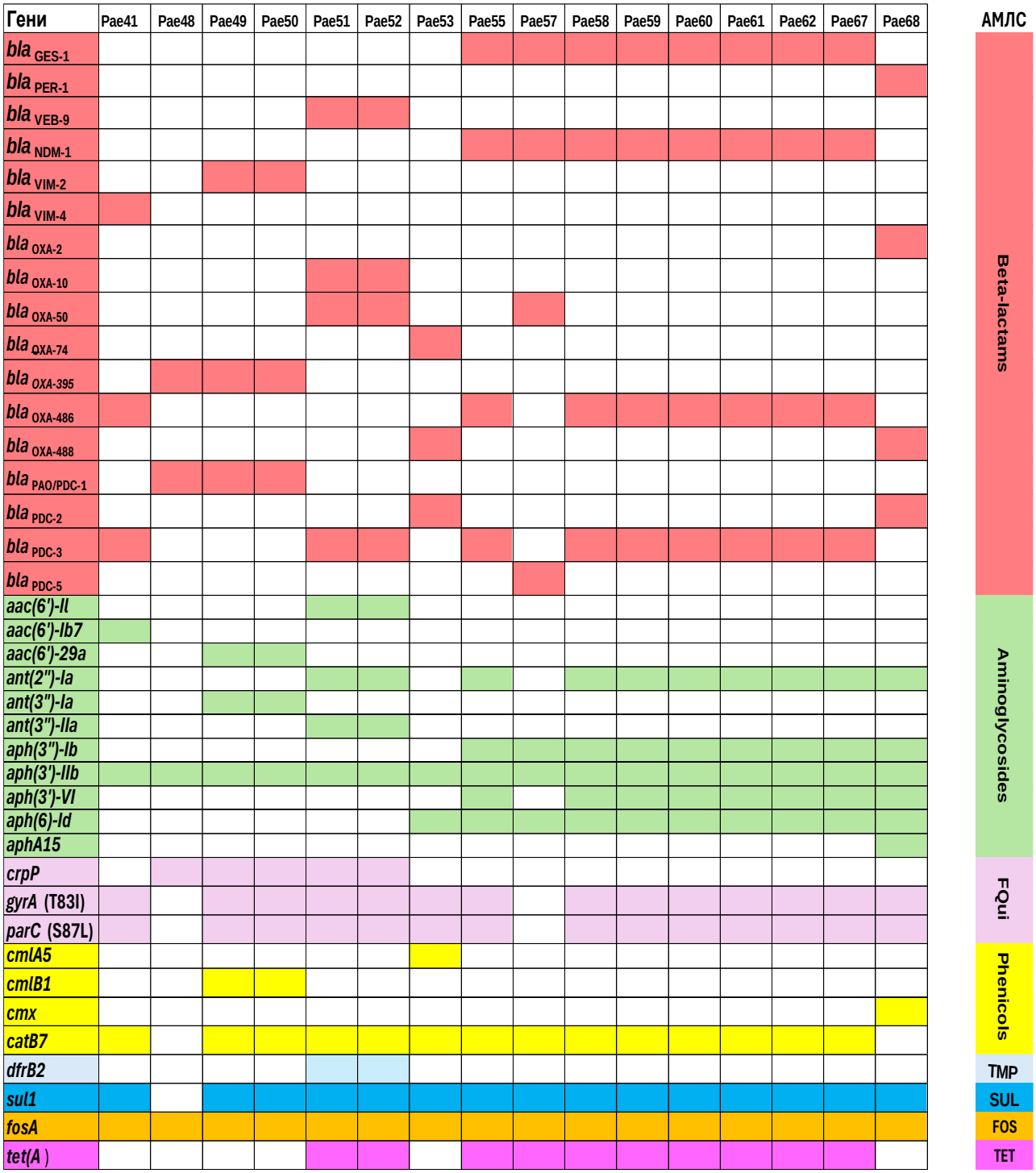
ST, секвенционен тип; МВ, муковисцидоза; ОАИЛ/КАИЛ, отделение/клиника по анестезиология и интензивно лечение; ТБА, трахеобронхиален аспират; БАЛ, бронхоалвеоларен лаваж.

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

Както е описано в раздел „Материали и методи“, първоначално обработените секвенционни прочити бяха използвани за сглобяване на геномната последователност на изследваните CRPA изолати чрез инструмента SPAdes, приложен в средата на онлайн платформата Galaxy. Асемблерът се отличава с висока популярност сред научната общност при *de novo* сглобяване на бактериални геноми (Prjibelski et al. 2020; Hubenova et al. 2022). Сглобените геноми на проучените изолати *P. aeruginosa* демонстрираха обща дължина от 6.5 до 7.16 Mb и GC% в диапазона 65.75% – 66.15%. Направената проверка в геномната база данни на NCBI показва, че секвенираните пълни геноми на щамове *P. aeruginosa* имат размери в границите 6.05–7.76 Mb и GC% = 65.08% – 66.84%. Показателите на сглобените в настоящия труд геноми попадат в тези граници, което е индикация за адекватно протекъл процес на асемблиране.

Една от основните задачи на проведеното WGS беше да се извърши пълен резистомен анализ на проучените изолати. Резултатите от откриване на AMR генетични детерминанти, свързани с резистентността към различни класове антибиотици, са илюстрирани на **Фигура 22.** Както е видно от фигурата, 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 kanamycin и neomycin) и *fosA* (Mn^{2+} и K^{+}-зависима глутатион S-трансфераза, асоциирана с резистентност към fosfomycin). 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 храчка на болен с MB), бяха положителни за *sul1*, което предполага носителство на интегрони от клас 1. Генът за дихидроптероат синтаза тип-1 е обичайно локализиран в 3' консервативния край на тези интегрони, които носят различни генни касети във вариабилния си регион и са отговорни за селекция на MDR фенотип (Fonseca et al. 2005; Abd-Elmonsef and Maxwell 2022).

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/nuccore/JAGFBD000000000).



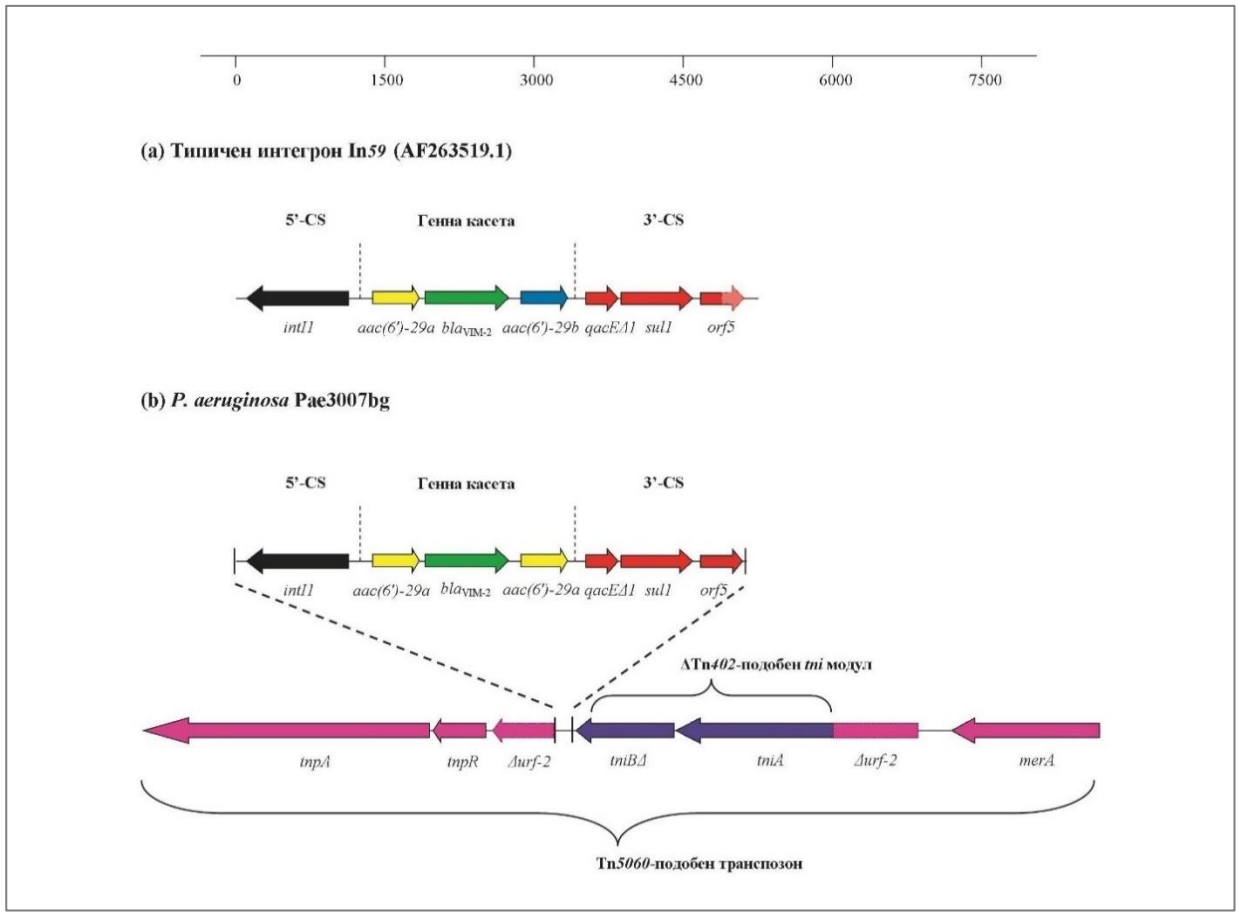
Фигура 22. Детерминанти на антимикробна резистентност (AMR), идентифицирани в 16 клинични изолата *P. aeruginosa* чрез ABRicate (Galaxy version 1.0.1). Колоните съответстват на отделните щамове, а редовете – на AMR детерминанти. Цветната схема представя засегнатия клас антибиотици (дясно) и връзката със съответните гени (ляво).

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

***Забележка*:** В сектор „Флуорохинолони“ са отбелязани и мутациите в QRDR (quinolone-resistance-determining regions) региона на *gyrA* и *parC* гените, които са отговорни за наблюдаваната резистентност към флуорохинолони (levofloxacin и ciprofloxacin).

VIM-2-положителният изолат Pae3007bg (означен като Pae50 в **Таблица 34.**) беше докладван като първият в страната *P. aeruginosa* продуцент на тази MBL (Strateva et al. 2021). Той показа най-висока идентичност (99.9% ANI) с щам PaeAG1 (Accession No CP045739) при MiGA търсения в наличните бази данни. PaeAG1 е изолиран от храчка 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*$_{\text{VIM-2}}$ и *bla*$_{\text{IMP-18}}$ (Molina-Mora et al. 2020).

В изолата Pae3007bg беше идентифициран In*59*-подобен интегрон от клас 1, съдържащ няколко AMR детерминанти, включително гена за VIM-2 MBL. Неговата структура е показана на **Фигура 23.**



Фигура 23. (а) Линейна карта на типичен *bla*$_{\text{VIM-2}}$-съдържащ In*59* 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).

(b) Линейна карта на генетичното обкръжение на In*59*-подобен интегрон от клас 1, идентифициран в *P. aeruginosa* Pae3007bg. Генната касета във вариабилния регион съдържа гена *bla*$_{\text{VIM-2}}$ (подклас B1 метало-β-лактамаза VIM-2, означен в зелено), заобиколен от две копия на ген *aac(6')-29a* (аминогликозид ацетилтрансфераза, означени в жълто). In*59*-подобният интегрон е вмъкнат в *urf-2* гена на Tn*5060*-подобен транспозон (транспозонните елементи са означени в розово). В непосредствена близост до мястото на инсерция присъства и дефектен Tn*402*-подобен *tni* модул (ΔTn*402*-подобен модул, представен в лилаво), състоящ се от *tniBΔ4* и *tniA*, разположени след 3' края на *orf5*.

Както е видно от **Фигура 23 (b)**, 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 ефлуксния SMR транспортер на четвъртично амониево съединение), който се припокрива с гена *sul1* (дихидроптероат синтаза тип-1), последван от частично запазен *orf5* (неизвестна функция). Целият интегрон е вмъкнат в *urf-2* гена на Tn*5060*-подобен транспозон. Освен това, дефектен Tn4*02*-подобен *tni* модул е разположен след *orf5* и в съседство с *merA* гена на Tn*5060*. Липсва останалата част от *mer* оперона (*merC*, *merP*, *merT* и *merR* гени).

На **Фигура 23 (b).** е показано, че клиничният изолат Pae3007bg притежава генна касета, вградена във вариабилния участък на In*59*-подобния интегрон от клас 1. Нейната дължина е 2373 bp и включва следните гени: *aac(6')-29a* (кодиращ аминогликозид ацетилтрансфераза AAC(6')-29a), *bla*$_{\text{VIM-2}}$ (подклас B1 VIM-2 метало-β-лактамаза) и второ копие на *aac(6')-29a*. При извършените BLAST проверки в базите данни на NCBI беше открит карбапенемаза-продуциращ изолат *P. aeruginosa* от 2015 г. от Бърно, Чехия (KY860571.1), който е носител на идентична *bla*$_{\text{VIM-2}}$-съдържаща генна касета, локализирана във вариабилата област на клас 1 интегрон (Papagiannitsis et al. 2017). Подобно на Pae3007bg, чешкият VIM-2 изолат има принадлежност към високорисковия ST111. Това откритие илюстрира разпространение между отделни държави на CRPA с *bla*$_{\text{VIM-2}}$ гени, които имат еднакво генетично обкръжение.

WGS позволи не само детайлно охарактеризиране на структурата на открития в Pae3007bg In*59*-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*$_{\text{VIM-2}}$ в CRPA изолати, които са генетично родствени с изследвания от нас щам (Papagiannitsis et al. 2017; Molina-Mora et al. 2020). Първият

български изолат *P. aeruginosa* с доказана MBL (2006 г.) е бил продуцент на VIM-15, който е VIM-2 вариант с една аминокиселинна замяна (Tyr216Phe). Авторите също установяват хромозомна локализация на *bla*$_{\text{VIM-15}}$, който е част от генна касета във вариабилния участък на интегрон от клас 1 (Schneider et al. 2008). Генът *bla*$_{\text{VIM-2}}$ е откриван като част от различни типове интегрони от клас 1 (Halat and Moubareck 2022). Например Bocharova 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*$_{\text{VIM-2}}$-положителните изолати: In*56*, In*559*, In*59*-подобен, In*59* и In*249* (Bocharova et al. 2020). Всички изолати с In*59*-подобен интегрон (17.2% от носителите на *bla*$_{\text{VIM-2}}$) са били определени като част от високорисковия ST111 клон, какъвто е и нашият Pae3007bg. 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 Pae3007bg бяха идентифицирани още няколко AMR детерминанти (**Фигура 22.**), както следва: *bla*$_{\text{PAO}}$ (кодираща вродена цефалоспориназа), *aph(3')-IIb* (вродена аминогликозид фосфотрансфераза APH(3')-IIb), *bla*$_{\text{OXA-395}}$ (OXA-395 β-лактамаза от клас D, принадлежаща към група OXA-50), *catB7* и *cmlB1* (chloramphenicol ацетилтрансферази), *fosA* (FosA глутатион трансфераза), *ant(3'')-Ia* (аминогликозид нуклеотидилтрансфераза ANT(3'')-Ia) и *crpP* (CrpP ензим, способен да фосфорилира ciprofloxacin). Освен това бяха открити мутации в QRDR регионите на *gyrA* (T83I) и *parC* (S87L) гените, отговорни за резистентността към LVX и CIP (МПК >32 mg/L). Откритият *bla*$_{\text{OXA-395}}$ ген е честа находка при WGS анализи на клинични изолати *P. aeruginosa*. Наскоро е докладван като най-разпространената AMR детерминанта сред MDR-PA от Либия, включително съдържащи *bla*$_{\text{VIM-2}}$ от ST111, какъвто е охарактеризираният в това проучване изолат Pae3007bg (Bitar et al. 2022).

В Pae41 изолата от трахеобронхиален аспират на ICU пациент на ВМА – София (2016 г.), който показа наличие на *bla*$_{\text{VIM-like}}$ ген при PCR скрининга, беше идентифициран *bla*$_{\text{VIM-4}}$. 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 Pae41, 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. (Pae: 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62 и 67), които бяха *bla*$_{\text{NDM-like}}$-положителни при PCR скрининга, бяха идентифицирани *bla*$_{\text{NDM-1}}$ гени (**Фигура 22**). Всички, с изключение на Pae57, принадлежаха към високорисковия ST654 и притежаваха напълно идентичен

резистом. Инвазивният изолат Pae57 се характеризираше с различен вариант на вродената AmpC цефалоспориназа (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 аминогликозид фосфотрансферази. С изключение на Pae57 от ST611 и серотип O5, който показа 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). Както е видно от **Фигура 22.**, тези мутации бяха открити и при VIM-2-положителните изолати Pae49 и Pae50.

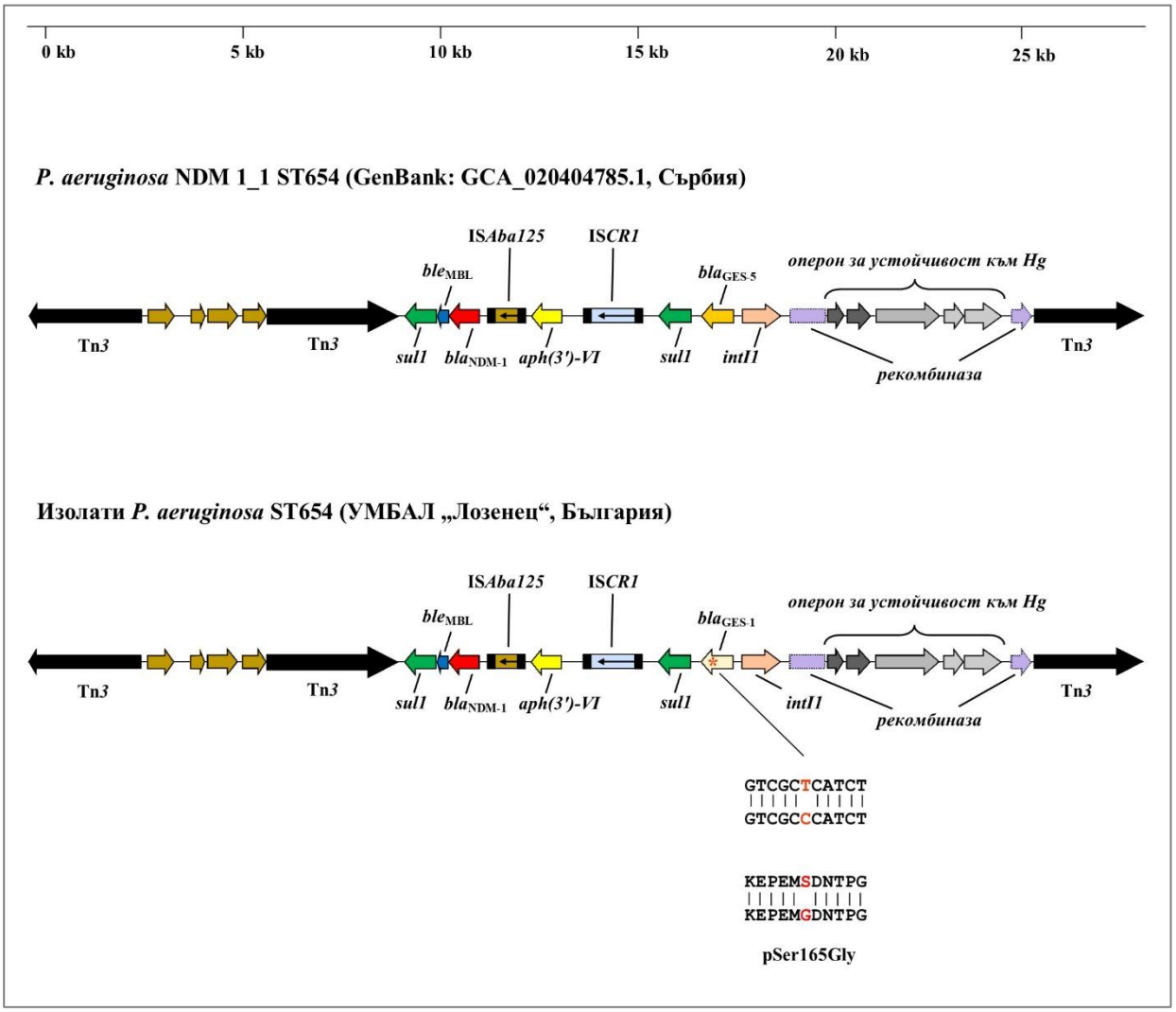
Генетично обкръжение на идентифицираните *bla*$_{\text{NDM-1}}$ гени в CRPA изолати от УМБАЛ „Лозенец“

В седемте секвенирани генома на CRPA изолати от ST654 / серотип O4 *bla*$_{\text{NDM-1}}$ 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 Tn*21*, включващ, *ble*$_{\text{MBL}}$–*bla*$_{\text{NDM-1}}$–IS*Aba125*, открит по-рано в генома на *P. aeruginosa* ST654 NDM1_1 от Сърбия (GenBank No: GCA_020404785.1) (**Фигура 24**). Структурата на Tn*21* транспозона в нашите *bla*$_{\text{NDM-1}}$-съдържащи CRPA изолати е локализирана върху 5 контига с еднакво секвенционно покритие, с изключение на този с гените *sul1*. 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*$_{\text{GES-1}}$ гена, която води до аминокиселинна замяна (pSer165Gly).

Големите размери и липсата на увеличение в секвенционното покритие на граничните контиги, включващи нуклеотидната последователност на Tn*21* транспозона, недвусмислено сочат към хромозомна локализация на цялата структура и съответно на *bla*$_{\text{NDM-1}}$ гена в генома на седемте CRPA изолата от високорисковия ST654 от УМБАЛ „Лозенец“.

Пълният генетичен контекст на *bla*$_{\text{NDM-1}}$ в генома на *P. aeruginosa* Pae57 (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 Pae57 бяха открити 60% от пълната последователност на гена *bla*$_{GES-1}$.



Фигура 24. 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.

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 продукция 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 $bla_{\text{NDM-1}}$ и $bla_{\text{GES-1}}$, както в нашето изследване, а в останалите три от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – $bla_{\text{NDM-1}}$ и $bla_{\text{GES-5}}$ (карбапенемаза от клас A), включени в нов интегрон от клас 1, In*1884*, 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 (Kostyanev et al. 2020).

Глобалната популационна структура на *P. aeruginosa* показва, че носителството на $bla_{\text{NDM-1}}$ е асоциирано с няколко епидемични клонални линии, както следва: ST235/CC235, ST233/CC233, ST244/CC244, ST308/CC308, ST357/CC357 и ST654/CC654 (Oliver et al. 2024). Балканите са „гореща точка“ на картата на света, като в региона през последните пет години са открити NDM-1-продуциращи клинични изолати *P. aeruginosa*, отнасящи се към три глобални високорискови клона, ST235 (в Албания и Сърбия), ST654 (Сърбия и България) и ST308 (Гърция), и потенциалния високорисков клон ST773 (Гърция) (Tafaj et al. 2020; Kostyanev et al. 2020; Kabic et al. 2023; Tsilipounidaki et al. 2023; Pappa et al. 2024).

Голям интерес в нашето проучване предизвика карбапенем-резистентният изолат Pae57 от COVID-19 отделението на УМБАЛ „Лозенец“, носещ $bla_{\text{NDM-1}}$ и $bla_{\text{GES-1.}}$ Тези интегрон-асоциирани AMR детерминанти бяха открити и в останалите 7 CRPA изолата от различни клиники на болницата. За разлика от тях, а и от описаните по-рано от Kostyanev et al. от други болници в София (Kostyanev et al. 2020), Pae57 не показа 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 $bla_{\text{OXA-50}}$ и $bla_{\text{PDC-5}}$, кодиращи съответно OXA-50 оксацилиназа (клас D) и PDC-5 цефалоспориназа (клас C), които бяха идентифицирани и в Pae57. PDC-5 вариантът на AmpC ензима не беше идентифициран в нито един от останалите CRPA, подложени на WGS анализ, в настоящата работа (**Фигура 22**). 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 показа, 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 $bla_{\text{NDM-1}}$, 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.

Както е видно от изложените резултати, в УМБАЛ „Лозенец“ циркулират клонално свързани NDM-1-положителни изолати *P. aeruginosa* от епидемичния ST654. Конкретно в COVID-19 отделението има засечен такъв изолат (Pae55 от 12.11.2021 г.) 4 месеца преди идентифицирането на Pae57/ST611 (**Таблица 35**). Локализацията и описаното вече генетично обкръжение на $bla_{\text{NDM-1}}$ 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 $bla_{\text{NDM-1}}$-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, и подчертава необходимостта от надзор върху тяхното бъдещо разпространение.

Резистомният анализ показа наличие на гени за OXA-50 или нейните производни (OXA-395, OXA-486, OXA-488) от клас D във всички WGS-охарактеризирани клинични

CRPA изолати от настоящия труд. Съществуват диаметрално противоположни становища за природата на тези ензими. Някои автори ги представят като естествено съдържащи се във всички щамове *P. aeruginosa* (Girlich et al. 2004; Naas et al. 2017), а други ги отнасят към придобитите оксацилинази с карбапенемазна активност (Petrova et al. 2019). През 2019 г. Petrova et al. докладват три OXA-50-продуциращи CRPA изолата от УМБАЛ „Св. Георги“ в Пловдив, в които липсват AMR детерминанти за карбапенемази от класове B и A, но демонстрират слаба карбапенемазна активност при изпълнение на модифицирания Hodge тест (Lee et al. 2001; Pasteran et al. 2011). Авторите отхвърлят становището, че продукцията на OXA-50 е вродена при *P. aeruginosa*. Те обобщават, че ензимът играе второстепенна роля в резистентността към карбапенеми, а като основни механизми са определени свръхекспресия на ефлукс помпата MexXY-OprM, съчетана с дефицит на OprD и/или свръхекспресия на MexAB-OprM помпа (Petrova et al. 2019).

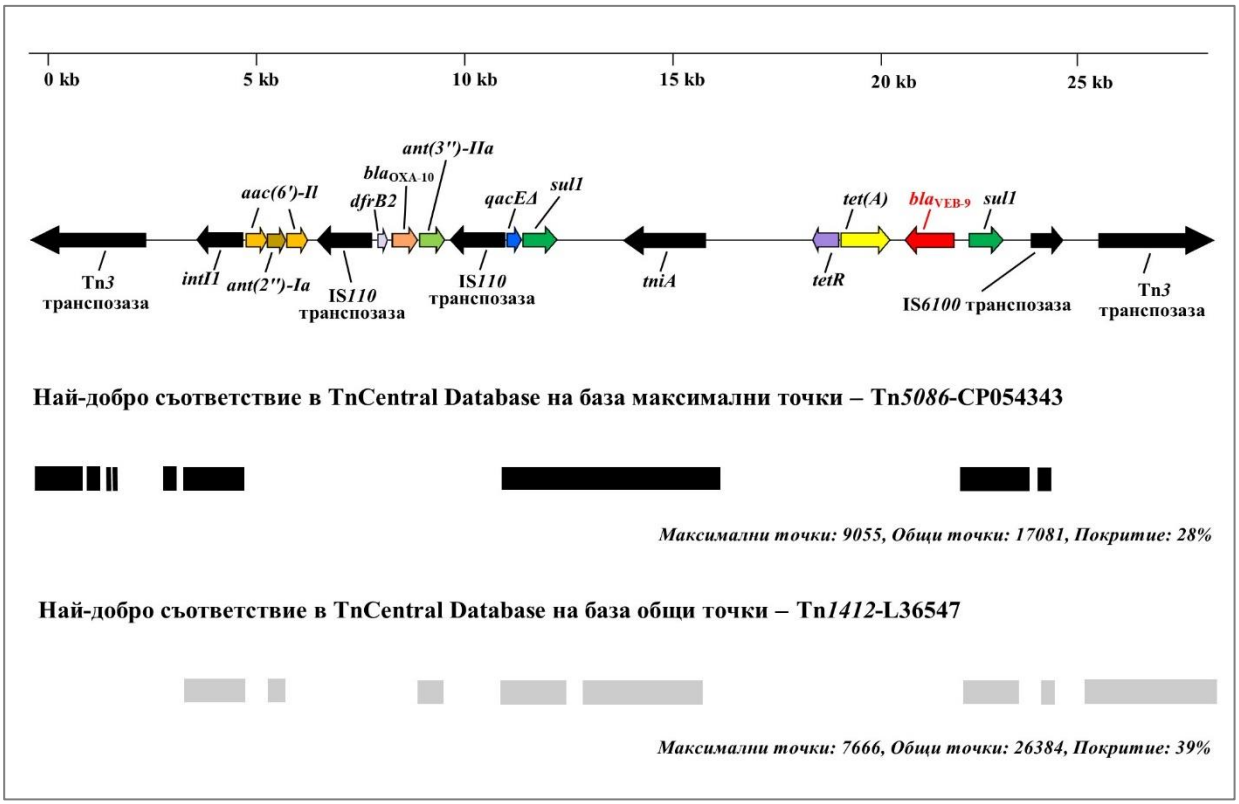
В проучването на Stoikov et al., в което са идентифицирани първите за България IMP-продуциращи клинични изолати *P. aeruginosa*, подобно на нашите находки, във всички щамове са идентифицирани гени за OXA-50-like ензими – $bla_{\text{OXA-486}}$ и $bla_{\text{OXA-914}}$ Освен това в резистома на единия от изолат (IMP-84 продуцент) е доказан $bla_{\text{PER-1}}$ (Stoikov et al. 2023). В WGS-базирания анализ в настоящия труд беше включен CRPA изолат, положителен при PCR за $bla_{\text{PER-like}}$ (**Pae68** – **Таблица 34., Фигура 22.**). Резултатите показват наличие на $bla_{\text{PER-1}}$. Двата изолата, от проучването на Stoikov et al. и Pae68 са от урини.

WGS позволи определяне на точния вариант на VEB-like ESBLs при два от общо деветнадесетте $bla_{\text{VEB-like}}$-положителни изолата *P. aeruginosa* (**Pae51** и **Pae52** – **Таблица 35., Фигура 22.**). Двата щама бяха изолирани от трахеобронхиални аспирати на ICU пациенти с VAP, лекувани в ОАИЛ на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Струва си да се отбележи, че 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 $bla_{\text{VEB-9}}$-положителни *P. aeruginosa* (7.7%) сред CAZ и/или FEP-резистентни клинични изолати от четири болници

във Варшава, Полша в периода 2000–2014 г. Доказана е клонална свързаност при PFGE типизиране. Всички VEB-9 продуценти са отнесени към един пулсотип и два подтипа, съответно PT M и PT Ma/Mb (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-PA 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 25.**



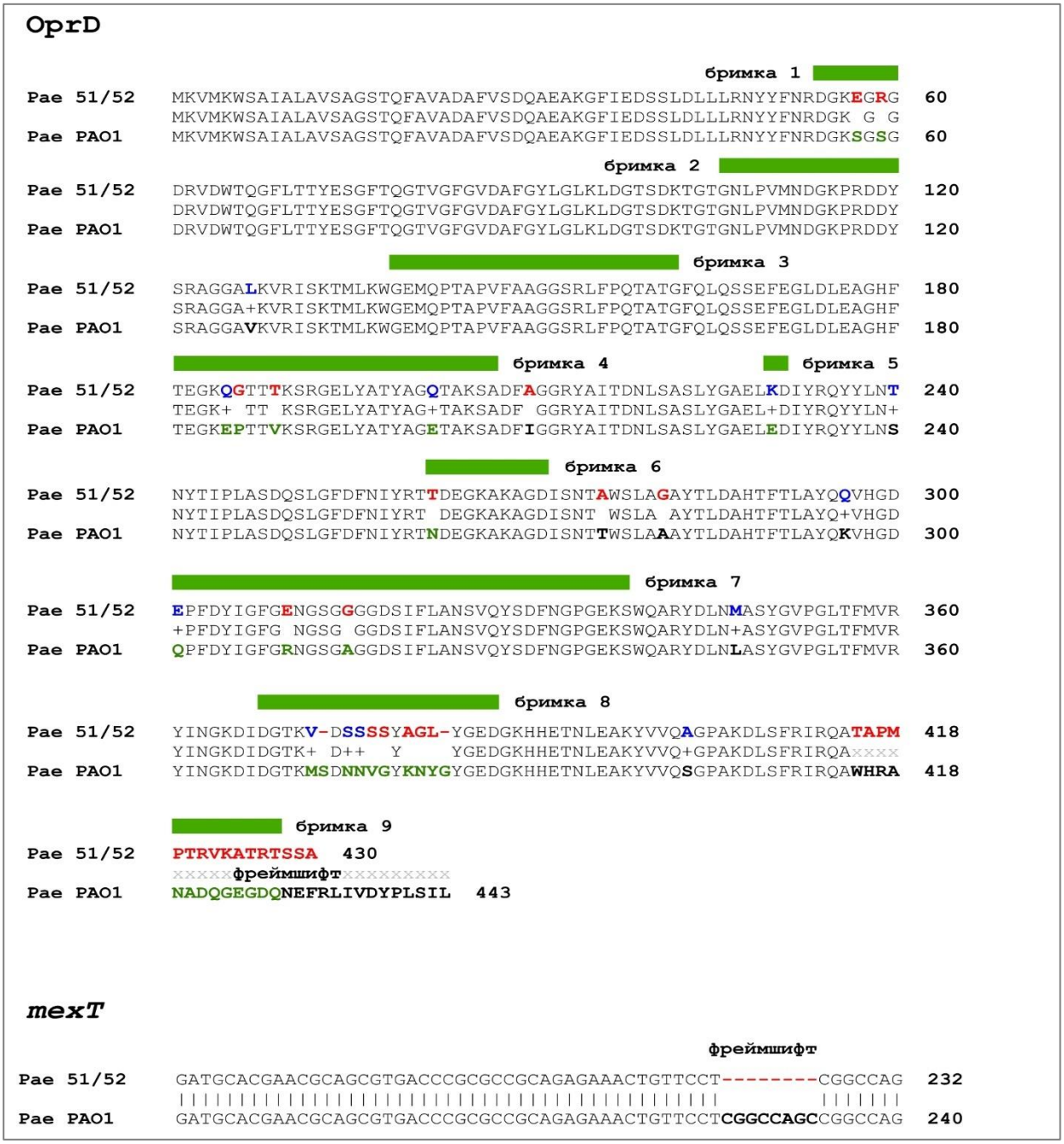
Фигура 25. Схематично представяне на генетичното обкръжение на *bla*$_{VEB-9}$ в изолатите *P. aeruginosa* Pae51 и Pae52, принадлежащи към глобалния високорисков клон ST357. Фигурата показва също наличието на гени, свързани с мобилни генетични елементи, и най-добрите съвпадения за VEB-9 региона в базата данни TnCentral.

Както е видно от **Фигура 25.**, гените *bla*$_{\text{VEB-9}}$ и *tet(A)*, определящ резистентност към tetracycline, са разположени в близост до 3' края на интегрона, което се доказва от наличието в съседство на *sul1*. Различни гени, свързани с мобилни генетични елементи, присъстват пред и след *bla*$_{\text{VEB-9}}$ (отбелязани в черно). Сравнителният BLASTN анализ на цялата секвенция в базата данни TnCentral (Ross et al. 2021) откри различни съвпадения, като Tn*5086*-CP054343 и Tn*1412*-L36547 показаха съответно най-високо максимално и най-високо общо съвпадение.

Размерът и секвенционното покритие на съответните контиги предполагат, че гените *bla*$_{\text{VEB-9}}$, съдържащи се в изолатите *P. aeruginosa* Pae51 и Pae52, 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*$_{\text{VEB-9}}$ към други Грам-отрицателни бактериални изолати. Обширното сравнение с анотираните прокариотни транспозони показа компоненти на два транспозона от семейство Tn*3*, Tn*5086*-CP054343 (открит в щама *E. coli* SCU-164) и Tn*1412*-L36547 (описан в щама *P. aeruginosa* 2293E). Тези открития предполагат сложни генетични транспозиции и пренареждания в региона на структурния ген за VEB-9. BLASTN търсенето, използващо *bla*$_{\text{VEB-9}}$ гена и околните му региони от нашите изолати спрямо базата данни Nucleotide collection (nr/nt), разкри 14 попадения в пълни геноми на *P. aeruginosa*, всяко от които с покритие на заявката от 98% или повече. Това дава основание да се счита, че организацията на контекста на *bla*$_{\text{VEB-9}}$ в изолатите Pae51 и Pae52 е обща за вида.

Резистомният анализ на двата VEB-9-положителни XDR-PA изолата включи и скрининг на кодиращата нуклеотидна последователност на гена *oprD* за мутации, който показа, че Pae51 и Pae52 притежават идентични секвенционни варианти. Всички идентифицирани missense и indel варианти, сравнени със съответния регион в *P. aeruginosa* PAO1, са показани на **Фигура 26.** Освен това OprD поринът, произведен от Pae51 и Pae52, 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 Pae51 и Pae52 (**Фигура 22**).

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 26**).



Фигура 26. Аминокиселинни (АК) последователности на външномембранния протеин OprD при изолатите *P. aeruginosa* Pae51 и Pae52, подравнени с тази на щама *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).

Направеният RT-qPCR анализ показа, че нивата на експресия на *oprD* гените в Pae51 и Pae52 са намалени в сравнение с карбапенем-чувствителния щам *P. aeruginosa* PAO1, използван като калибратор. Относителната експресия беше съответно 0.21 и 0.28.

В обобщение, извършеният в настоящото проучване анализ на кодиращата последователност на *oprD* разкри многобройни missense мутации и една frameshift мутация в регулаторния *mexT*, повечето от които засягат бримковите области на кодирания 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 Pae51 и Pae52 (Glen and Lamont 2021). Както беше посочено по-горе, тя е придружена от 8-bp делеция в гена *mexT*, 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).

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

5.2.2.1. PCR скрининг и секвенционен анализ на детерминанти на резистентност

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 $bla_{\text{OXA-51-like}}$ гени. Чрез multiplex PCR (Woodford et al. 2006) в карбапенем-нечувствителните изолати бяха идентифицирани $bla_{\text{OXA-23-like}}$ и IS*Aba1* (100%). Не бяха открити кодиращи гени за OXA-24/40-like и OXA-58-like придобити CHDLs. Скринингът в този хронологичен период не включваше $bla_{\text{OXA-143-like}}$ и $bla_{\text{OXA-235-like}}$ поради по-късното откриване на тези групи OTCs при *A. baumannii* (Higgins et al. 2010b, 2013). Също така не бяха установени $bla_{\text{VIM-like}}$ и $bla_{\text{IMP-like}}$ гени за MBLs. Дванадесет CRAB изолата, по три от всяка мониторирана ICU, бяха избрани за секвениране по Sanger на доказания чрез PCR $bla_{\text{OXA-23-like}}$ ген. Анализът потвърди наличието на $bla_{\text{OXA-23}}$ ген и показа 100% хомоложност с нуклеотидната последователност

на съответния ген в щам *A. baumannii* DR25547/96, депозирана в GenBank (AY795964). Sanger секвенирането и PCR картиращите експерименти (IS*Aba1*/OXA-23) определиха и локализацията на IS*Aba1* – вмъкната непосредствено пред структурния *bla*$_{\text{OXA-23}}$ 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%, $p < 0.001$). От друга страна общата честота на OXA-23-продуциращи MDR-AB в ранния мониториран период в настоящия труд (2005–2011 г.) беше значимо по-висока от установената в проучване, обхванало 200 клинични MDR-AB изолата от четири болници във Варна, Плевен и София (1999–2006 г.) (70% vs. 18.5%, $p < 0.0001$). Подобно на нашите резултати в тези болници не са идентифицирани CRAB, съдържащи *bla*$_{\text{OXA-24/40-like}}$ гени, но са докладвани единични изолати от ВМА – София и УМБАЛ „Света Анна“ – София (2.5% от общия проучен брой) с *bla*$_{\text{OXA-58}}$. Авторът също докладва IS*Aba1*, асоциирана с *bla*$_{\text{OXA-23}}$, както и детекция на тази инсерционна последователност пред *bla*$_{\text{AmpC}}$ на CAZ-резистентните щамове с МПК >64 mg/L (Стоева 2009).

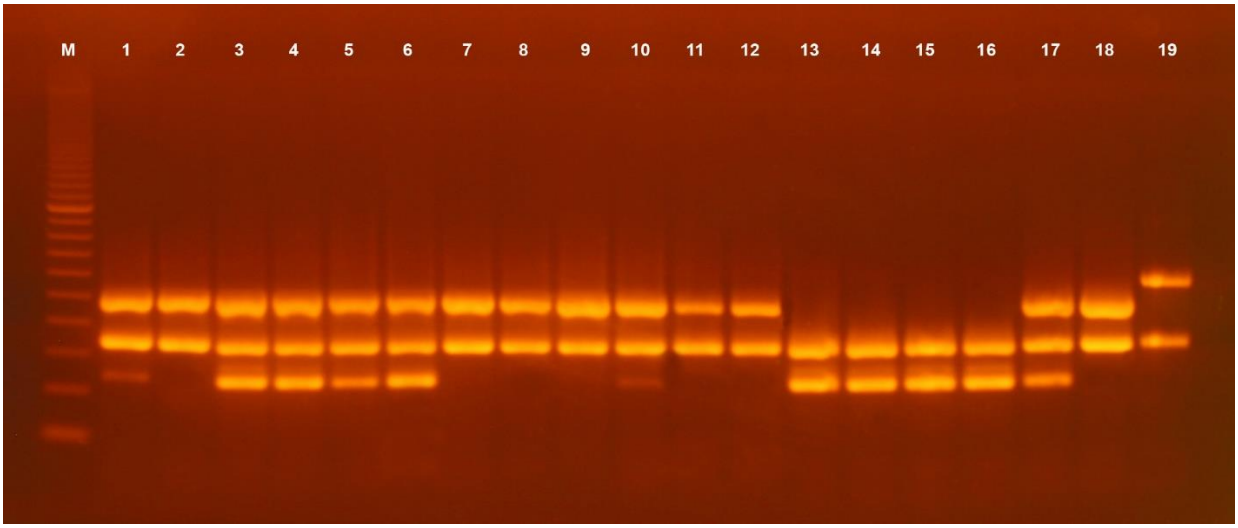
Интензивните молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност към β-лактами, с основен акцент карбапенеми, продължиха във втория главен хронологичен период на настоящото проучване (2014–2022 г.). За целта беше събрана колекция от 301 нозокомиални CRAB изолата от три университетски 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 36.** На **Фигура 27.** е показано дигитално изображение на резултат от мултиплекс PCR за определяне на генетичните детерминанти на тези ензими.

Във всички изолати *A. baumannii* бяха доказани *bla*$_{\text{OXA-51-like}}$ гени. Честотата на разпространение на придобитите CHDLs беше близка (**Таблица 36**). 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 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.

Таблица 36. 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)
Придобити	OXA-23	129 (42.9)
	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		**Брой (%)**
	IS*Aba1*	257 (85.4)

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

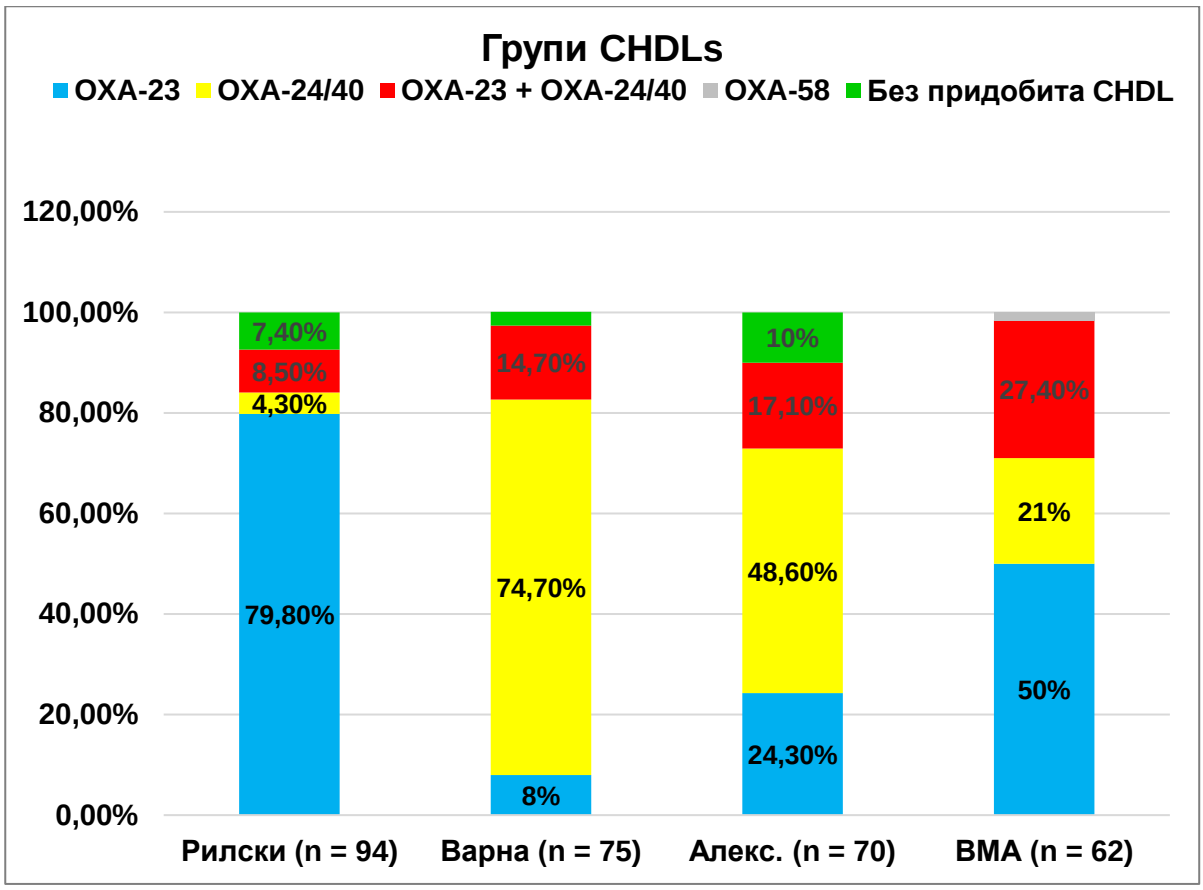


Фигура 27. Мултиплексна полимеразна верижна реакция, илюстрираща детекция на гени за 4 групи CHDLs в изследваните карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* (агарозна гел-електрофореза): OXA-24/40-like (246 bp), OXA-51-like (353 bp), OXA-23-like (501 bp) и OXA-58-like (599 bp). Линия M – **100-bp 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.

Глобалната SENTRY Antimicrobial Surveillance Program през 2020–2021 г. проучва общо 788 карбапенем-нечувствителни клинични изолата *Acinetobacter* spp. от Европа, включително Турция и Израел (*n* = 583), и САЩ (*n* =205) чрез *in silico* скрининг и секвениране на гени, кодиращи β-лактамази (Castanheira et al. 2023). Отчетените резултати показват, че 99.7% от европейските изолати носят детерминанти за придобити OTCs, докато 13.2% от американските нямат такива гени. Общо за цялата колекция, най-

разпространената CHDL е OXA-23 (75.3%), подобно на нашето проучване (58.8%). Констатирано е обаче доминиране на монопродукция на ензима (73.1% от всички изследвани изолати), което е значимо по-висока честота ($p < 0.0001$) от установената в настоящата работа (42.9%). От друга страна, в нашето изследване бяха идентифицирани 35.5% карбапенем-нечувствителни изолати *A. baumannii*, положителни само за $bla_{\text{OXA-24/40}}$ гени, което представлява значимо по-висок процентен дял спрямо установения в международната колекция (19.9% са асоциирани единствено с група OXA-24/40; $p < 0.0001$). Подобно на нашите резултати авторите докладват само един продуцент на OXA-58, изолиран в САЩ. Честотата на MBL-продуциращи *Acinetobacter* spp. в Европа е много ниска. Само в 7 от изследваните 583 изолата са открити $bla_{\text{NDM-1}}$ гени, при това в комбинация с $bla_{\text{OXA-23}}$, както следва: Белгия (1 брой), Германия (1 брой), Израел (4 броя) и Турция (1 брой).

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 28.** 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 $bla_{\text{OXA-23-like}}$). Във ВМА също беше установен висок дял на CRAB изолати с $bla_{\text{OXA-23-like}}$ 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 $bla_{\text{OXA-58-like}}$ 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“.



Фигура 28. 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 редица проучвания е доказано, че гените за естествено съдържащите се във всички щамове *A. baumannii* OXA-51-like ензими са локализирани в хромозомата, а тяхната експресия се регулира от IS*Aba1* (Héritier et al. 2005b). Нейното вмъкване в началото на промоторната област, непосредствено преди структурните гени, води до карбапенемазна активност на ензима, която е най-силно проявена към IMP. Wong et al. извършват WGS на 12 клинични CRAB изолата от Китай (2000–2013), при което установяват, че 4 от тях (33.3%) са носители единствено на $bla_{\text{OXA-51-like}}$ гени за вродени OXA-79, OXA-82 и OXA-83, а пред тях е вмъкнат елементът IS*Aba1* (Wong et al. 2019). Това е вероятният механизъм, обуславящ устойчивост към карбапенеми в 5.3% от нашите изолати, при които не бяха установени гени за придобити OTCs от други филогенетични групи.

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*Aba1* (**Таблица 37**).

Таблица 37. Механизми на резистентност към карбапенеми в избрани изолати *A. baumannii*, установени чрез секвениране по Sanger и PCR картиращи експерименти.

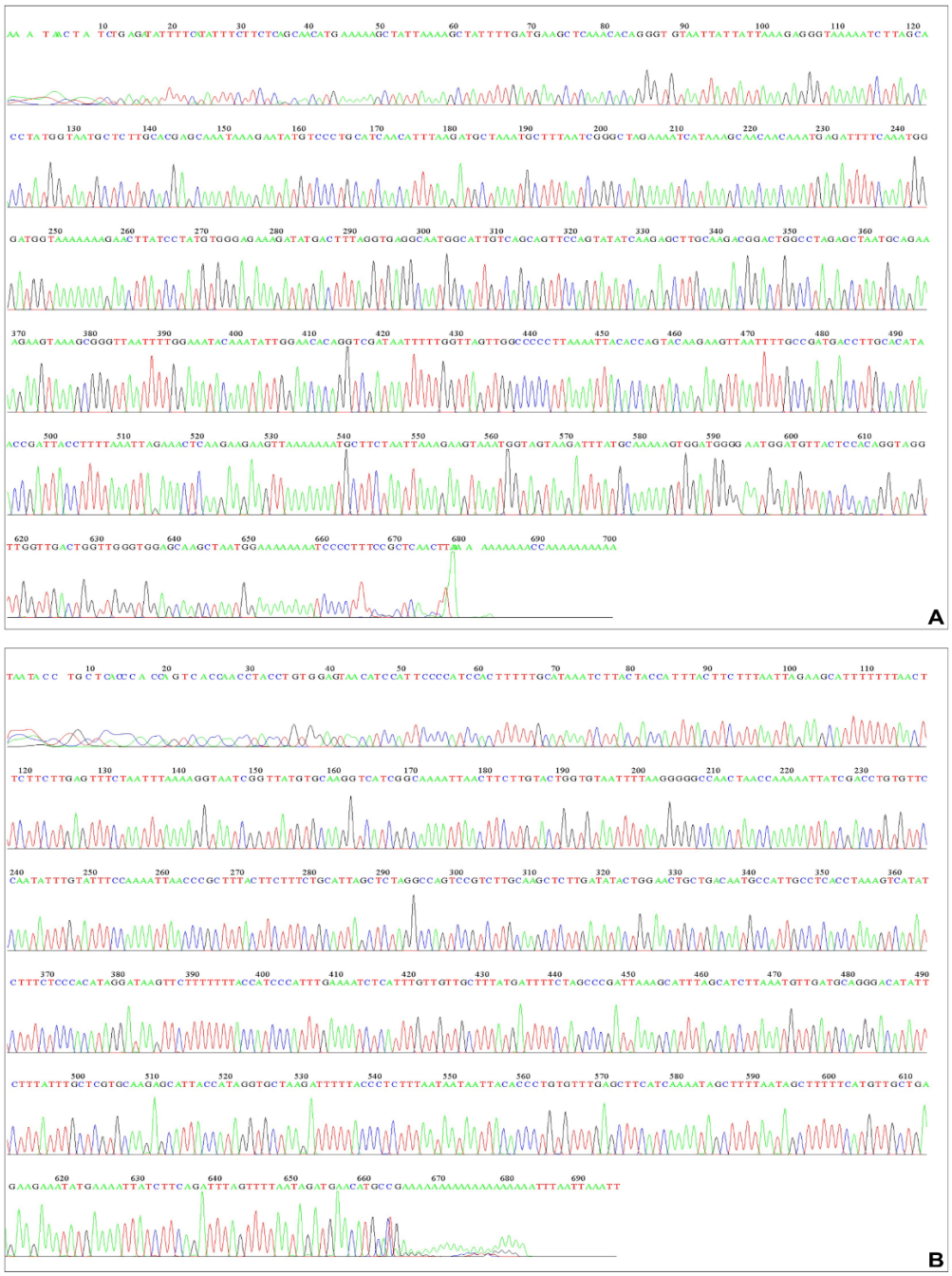
***bla*$_{\text{OXA-23-like}}$ (*n* = 5)**
Вариант: OXA-23 (*n* = 5) 100% идентичност: **Accession no AJ132105** (GenBank, NCBI) IS*Aba1* е разположена пред структурния *bla*$_{\text{OXA-23}}$ ген при всички (+) за този ген изолати, генерирайки продукт 1.3-kb.
***bla*$_{\text{OXA-24/40-like}}$ (*n* = 5)**
Вариант: OXA-72 (*n* = 5) 100% идентичност: **Accession no: NG_049813, KU870994, JX968505, HQ219688**
***bla*$_{\text{OXA-58-like}}$ (*n* = 1)**
Вариант: OXA-58 100% идентичност: **Accession no: NG_049798, KY202456, KF740448**

На **Фигури 29** и **30.** са показани части от *bla*$_{\text{OXA-72}}$ (кодиращ OXA-72 от филогенетична група OXA-24/40) и *bla*$_{\text{OXA-58}}$ гени, идентифицирани съответно в CRAB изолати от университетската болница във Варна (2016 г.) и ВМА (2014 г.).

За разлика от интензивните проучвания върху AMR детерминанти, отговорни за резистентност към карбапенеми, броят на докладите, отчитащи гени за тясноспектърни β-лактамази и ESBLs при *A. baumannii* е ограничен. В последните години се появиха повече резултати за тяхното разпространение, най-вече поради WGS-базираните анализи и приложението на *in silico* скрининг за β-лактамази. Най-общо разпространението на *bla*$_{\text{PER-like}}$ сред клиничните изолати *A. baumannii* е по-широко от това на детерминанти за други типове ESBLs, като *bla*$_{\text{VEB-like}}$ и *bla*$_{\text{GES-like}}$ (Castanheira et al. 2023).

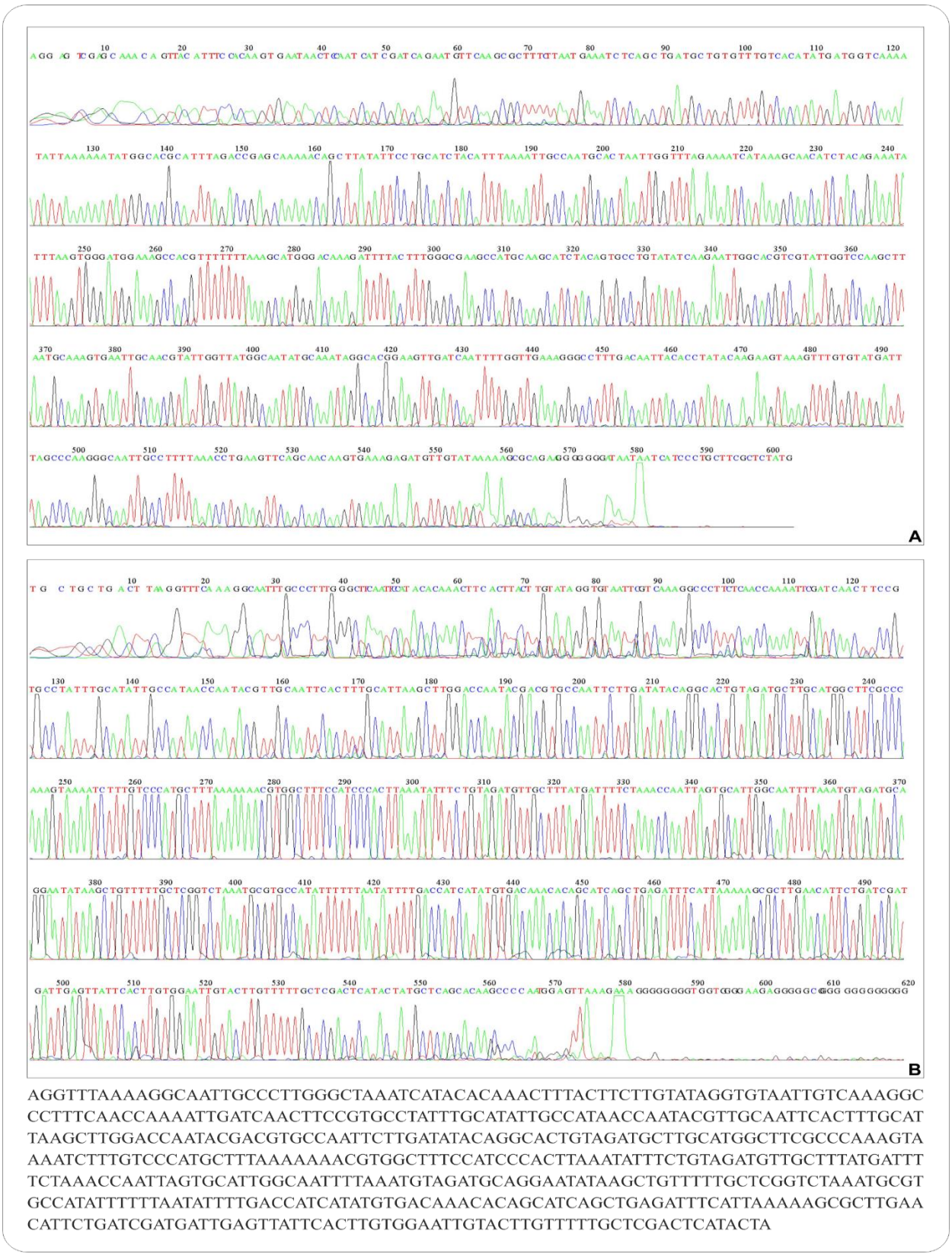
Общо 10.6% (*n* = 32) от изследваните CRAB изолати в периода 2014–2022 г. (*n* = 301) притежаваха *bla*$_{\text{PER-like}}$ гени (**Фигура 31**). Като контролен щам при PCR реакциите беше използван първият PER-1-продуциращ изолат, докладван в България (Aba 255-00 от 2000 г.) (Strateva et al. 2008). PER продуценти бяха идентифицирани във всички мониторирани болници, но най-голямо беше разпространението им във ВМА (18 от всички 32 изолата с налична *bla*$_{\text{PER-like}}$ детерминанта) и УМБАЛ „Александровска“ (10 от 32). PCR-продукти на *bla*$_{\text{PER-like}}$ гени, съдържащи се в избрани CRAB изолати от различни клиники на ВМА (*n* = 5), УМБАЛ „Александровска“ (*n* = 5), УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (*n* = 3) и в единствения *bla*$_{\text{PER-like}}$-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*$_{\text{PER-1}}$, идентифициран

първоначално в клиничен изолат *P. aeruginosa* от урина на хоспитализиран пациент от Франция (GenBank No. Z21957) (Nordmann and Naas 1994).

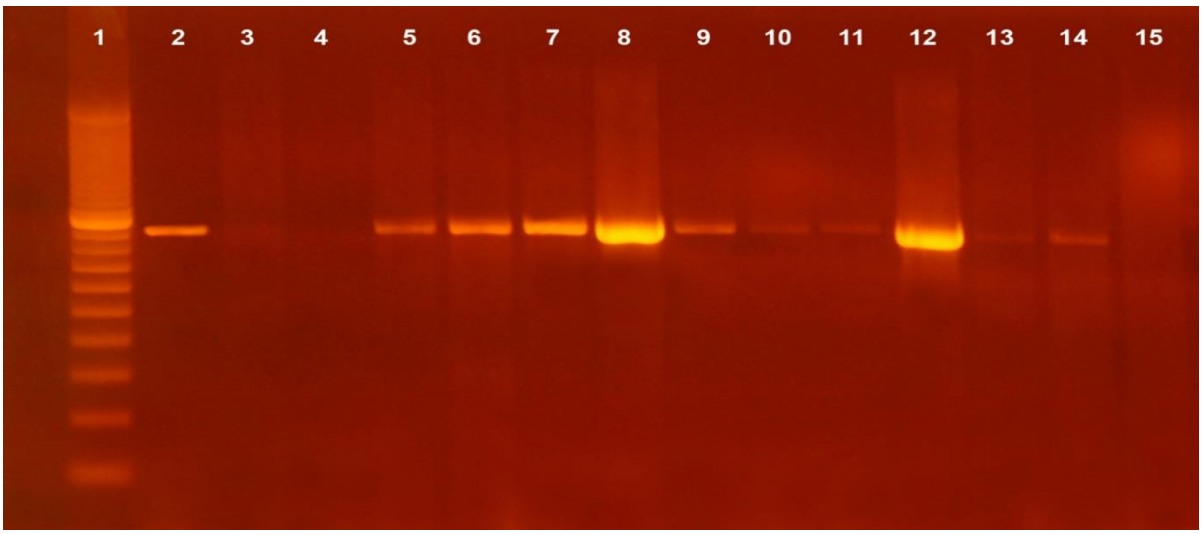


ATGTTCATCTATTAAAACTAAATCTGAAGATAATTTTCATATTTCTTCTCAGCAACATGAAAAAGCTATTAAAAGCTA
TTTTGATGAAGCTCAAACACAGGGTGTAATTATTATTAAAGAGGGTAAAAATCTTAGCACCTATGGTAATGCTCTT
GCACGAGCAAATAAAGAATATGTCCCTGCATCAACATTTAAGATGCTAAATGCTTTAATCGGGCTAGAAAATCATA
AAGCAACAACAAATGAGATTTTCAAATGGGATGGTAAAAAAAGAACTTATCCTATGTGGGAGAAAGATATGACTT
TAGGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCAGTTCCAGTATATCAAGAGCTTGCAAGACGGACTGGCCTAGAGCTAATGC
AGAAAGAAGTAAAGCGGGTTAATTTTGGAAATACAAATATTGGAACACAGGTCGATAATTTTTGGTTAGTTGGCC
CCCTTAAAATTACACCAGTACAAGAAGTTAATTTTGCCGATGACCTTGCACATAACCGATTACCTTTTAAATTAGAA
ACTCAAGAAGAAGTTAAAAAAATGCTTCTAATTAAAGAAGTAAATGGTAGTAAGATTTATGCAAAAAGTGGATGG
GGAATGGATGTTACTCCACAGGTAGGTTGGTTGACTGGTTGGGTGGAGCAAGCTAATGGAAAAAAAATCCCC

Фигура 29. Сглобена последователност на *bla*$_{\text{OXA-72}}$ от права (A) и обратна (B) секвенционни реакции.



Фигура 30. Сглобена последователност на *bla*$_{\text{OXA-58}}$ от права (A) и обратна (B) секвенционни реакции.



Фигура 31. Агарозна гел-електрофореза, представяща идентифицирането на *bla*$_{\text{PER-like}}$ гени (**925-bp фрагмент**) в клинични изолати *A. baumannii*. Линия 1 – **Ladder 100 bp**; линия 2 – контролен щам Aba 255-00 (положителна контрола); линии 3-4 – PCR-отрицателни изолати; линии 5-14 – PCR-положителни изолати; линия 15 – отрицателна контрола.

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*$_{\text{PER-1}}$ сред клонално свързани CRAB щамове, изолирани при вътреболничен взрив в ICU за лечение на изгаряния (Mabrouk et al. 2020).

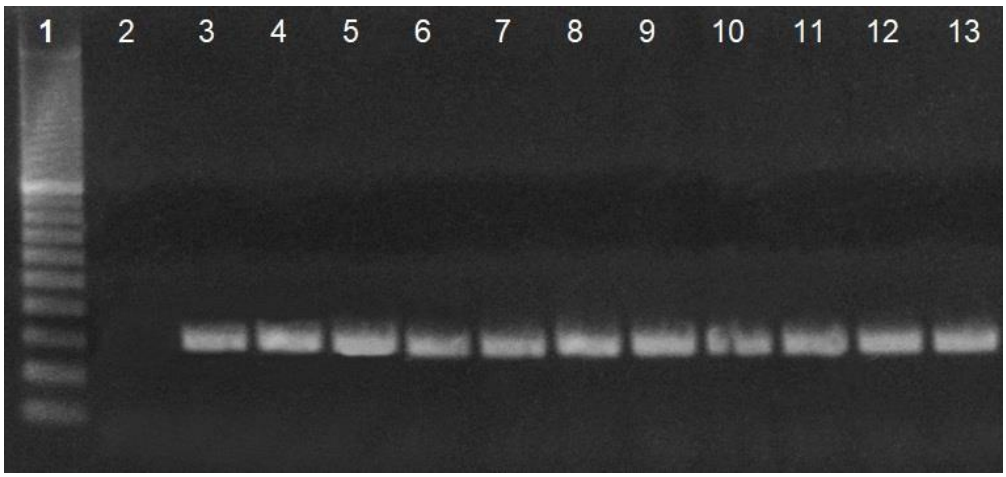
В хода на разработване на настоящия труд, чрез *gyrB* PCR-базирания метод (Higgins et al. 2007) беше идентифициран клиничен карбапенем-резистентен щам *A. nosocomialis* (AN10691), изолиран през октомври 2014 г. от урина на 53-годишна жена, хоспитализирана в Клиниката по урология на ВМА в София. Изолатът показа резистентност към всички клинично използвани карбапенеми (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*$_{\text{OXA-58-like}}$ ген, който чрез секвениране беше определен като *bla*$_{\text{OXA-58}}$ (100% идентичен с депозирани в GenBank секвенции на този ген: KF700121/*A. baumannii*, KF740448/*A. baumannii*, KF208466/*A. pittii*, GU064937/*Acinetobacter* genomospecies 13TU). Генетичното обкръжение на *bla*$_{\text{OXA-58}}$ беше дефинирано като IS*Aba3*-

like и IS*Aba3*, локализирани съответно пред и след структурния ген. Подобно генетично обкръжение на установеното от нас е първоначално открито в карбапенем-резистентен изолат *A. nosocomiailis* от Тайван с високо ниво на транскрипция на *bla*$_{\text{OXA-58}}$. Авторите докладват генетичната структура IS*1006*–ΔIS*Aba3*-like–*bla*$_{\text{OXA-58}}$–IS*Aba3* и доказват, че вмъкването на IS*1006* в инсерционната последователност IS*Aba-3*-like генерира хибриден промотор, който увеличава транскрипцията на структурния ген и медиира хоморезистентност към карбапенеми (Chen et al. 2010).

Към настоящия момент OXA-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). Наскоро в Малайзия е идентифициран карбапенем-резистентен клиничен изолат *A. nosocomialis*, носещ едновременно bla$_{\text{NDM-1}}$ и *bla*$_{\text{OXA-58}}$ (Alattraqchi et al. 2021). Авторите установяват, че двата гена за карбапенемази са локализирани върху голям конюгативен 170-kb плазмид, носещ също гени за резистентност към аминогликозиди, сулфонамиди и макролиди. Генетичното обкръжение включва частичен IS*Aba3* елемент, част от p*dif* модул за рекомбинация (XerCD), непосредствено пред *bla*$_{\text{OXA-58}}$, а след него IS*Aba11* и IS*Aba3*.

Според направения литературен преглед, идентифицираният в настоящото проучване OXA-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*$_{\text{OXA-58}}$ между различни видове ABC complex.

Още в ранния период (2005–2011 г.) на молекулярно-генететични 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 продукция на 16S рРНК метилаза ArmA (**Фигура 32**). Освен това във всички тях беше доказан тандемът *bla*$_{\text{OXA-23}}$ и *armA*. 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*$_{\text{OXA-23-like}}$ и *armA*, при който беше получен само един специфичен продукт (315-bp), което предполага вероятна плазмидна локализация на *armA*, но хромозомна локализация на *bla*$_{\text{OXA-23}}$.



Фигура 32. 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.

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 копродуценти на OXA-23 карбапенемаза и ArmA 16S рРНК метилаза в четирите мониторирани университетски болници. От 2017 до 2022 г. при всички CRAB с високо ниво на резистентност към аминогликозиди (65 от общо 75) беше открита комбинация $bla_{\text{OXA-23}}$ + *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 копродуценти 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 Girija et al. установяват, че 52% от изолатите *A. baumannii* от урина на пациенти с тежки UTIs са носители на *sul1*, 45.2% на *sul2*, като преобладават изолатите с едновременно присъствие на двата гена (37%) (Girija et al. 2019). Установена е тяхната плазмидна локализация. Авторите докладват също SXT-резистентни изолати (32.8%), в които не са идентифицирани *sul1*, *sul2*, *dfr-A1* и *dfr-A5*.

5.2.2.2. 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 аминогликозиди, оценено въз основа на определените преди това МПК; различни AMR детерминанти, доказани при предшестващия PCR скрининг; PCR-отрицателни за IS*Aba1*. Фенотипните и генотипните характеристики на избраните XDR-AB изолати са обобщени в **Таблица 38.**

Дължината на сглобените „драфт“ геноми варираще от 3.96 до 4.14 Mb, а тяхното GC съдържание беше 38.9%. Общите WGS-базирани характеристики на трите XDR-AB изолата са представени в **Таблица 39.**

Таблица 38. 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)	*bla*$_{\text{OXA-51-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-23-like}}$, *bla*$_{\text{PER-like}}$, *armA*, *sul1*
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)	*bla*$_{\text{OXA-51-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-23-like}}$, *armA*, *sul1*
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)	*bla*$_{\text{OXA-51-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-23-like}}$, *bla*$_{\text{OXA-24/40-like}}$, *sul1*

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 39. 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						
						cnp60	***fusA***	***gltA***	***pyrC***	***recA***	***rplB***	***rpoB***
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 40.**

Таблица 40. Резистомен анализ на клиничните изолати *A. baumannii*, подложени на WGS.

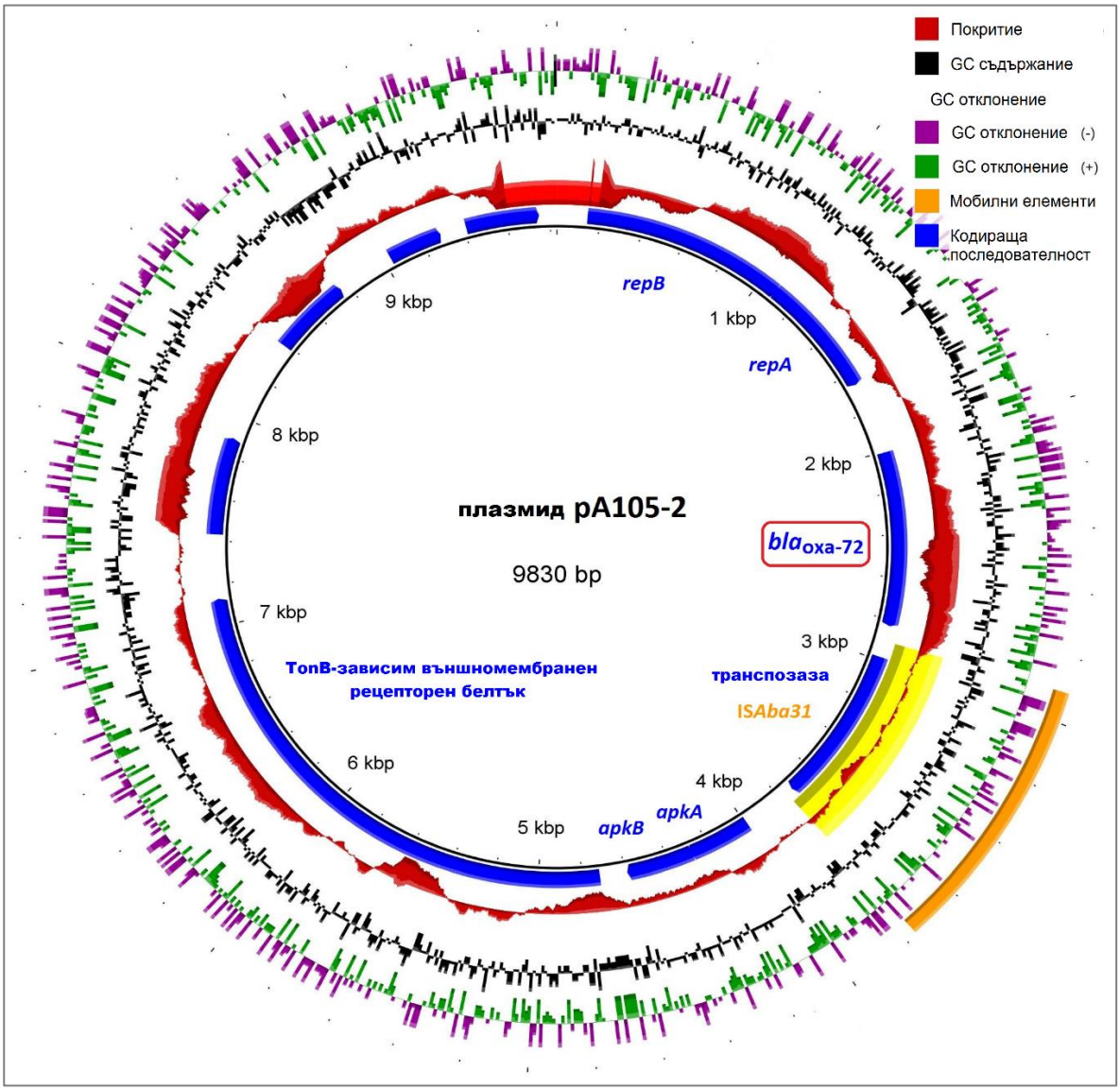
AMR гени/MGEs	**Aba52**	**Aba176**	**Aba190**
MGEs	IS*Aba24*, IS*Aba125*, IS*Vsa3*, IS*6100*	IS*Aba24*, IS*Aba125*, IS*Vsa3*, IS*6100*	Tn*6018*, IS*Aba31*, IS*17*
Резистентност към β-лактами	$bla_{\text{ADC-73}}$, $bla_{\text{OXA-23}}$, $bla_{\text{OXA-66}}$, $bla_{\text{PER-1}}$	$bla_{\text{ADC-73}}$,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

Както е видно от таблицата, бяха идентифицирани разнообразни ISs, а в изолата от Варна (Aba190) и един транспозон (Tn*6018*).

В трите CRAB, XDR-AB изолата беше установено, че 5'-краищата на $bla_{\text{ADC-73/74}}$ (кодиращи широкоспектърните β-лактамази от клас C) и $bla_{\text{OXA-23}}$ 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 $bla_{\text{OXA-72}}$ 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 $bla_{\text{OXA-66}}$ (вариант на $bla_{\text{OXA-51-like}}$), който е вродена AMR детерминанта в генома на *A. baumannii* с хромозомна локализация. Подобно различие в покритието предполага, че $bla_{\text{OXA-72}}$ 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 $bla_{\text{OXA-72}}$, 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 показа, че Aba190 притежава и останалите плазмидни елементи, както е показано на **Фигура 33.**



Фигура 33. 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 аминогликозиди – МПК >256 mg/L (**Таблица 38**).

Всички WGS-проучени изолати бяха положителни за *sul1*, *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).

Обобщено обсъждане на резултатите от PCR скрининга, нуклеотидното секвениране на AMR детерминанти и резистомния анализ, проведени при 301 карбапенем-нечувствителни изолата *A. baumannii* (2014–2022 г.)

В настоящото проучване честотата на гените, кодиращи вродени оксацилинази от група OXA-51-like, беше абсолютна. Предишни проучвания показват, че гените за естествените OXA-51-like ензими на *A. baumannii* са локализирани върху хромозомата и експресията им се регулира от елемента IS*Aba1* (Poirel et al. 2010), открит в 85.4% от нашите изолати. Както беше описано по-горе, неговото вмъкване в промоторната област, непосредствено преди $bla_{\text{OXA-51-like}}$, води до карбапенемазна активност на вродените OXAs от молекулярен клас D (Słoczyńska et al. 2021). В допълнение 285 от всички 301 CRAB (94.7%) притежаваха и гени за придобите CHDLs. Общо за цялата колекция от нозокомиални изолати *A. baumannii*, в проследения 9-годишен период честотата на $bla_{\text{OXA-23-like}}$ и $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$ беше близка и надвишаваща 50% (съответно 58.8% и 51.5%).

Нуклеотидното секвениране по Sanger и геномният анализ определиха точните варианти на CHDLs, продуцирани от проучените CRAB изолати. Бяха идентифицирани следните AMR детерминанти: $bla_{\text{OXA-23}}$ (OXA-23-like CHDLs), $bla_{\text{OXA-66}}$ (OXA-51-like CHDLs) и $bla_{\text{OXA-72}}$ (OXA-24/40-like CHDLs).

За първи път в България Stoeva et al. докладват клонално разпространение на OXA-23-продуциращи CRAB изолати (n = 29) от хоспитализирани пациенти в УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ в гр. Плевен през 1999–2006 г. (Stoeva et al. 2008). Като генетично обкръжение е докадана IS*Aba1*, разположена непосредствено пред структурния $bla_{\text{OXA-23}}$ ген. В следващите 10-15 години е отчетена висока честота на циркулиращи клонално свързани OXA-23-продуциращи CRAB изолати и в други големи болници страната (Stoeva

et al. 2009, 2014; Pfeifer et al. 2017; Strateva et al. 2019). *bla*$_{\text{OXA-23}}$ е преобладаващият карбапенемаза-кодиращ ген, присъстващ в две трети от CRAB изолатите в световен мащаб (Lin and Lan 2014; Kostyanev et al. 2021). Освен това се съобщава, че този ген е най-разпространената AMR детерминанта сред CRAB изолатите в няколко проучвания в Балканския регион, включително Хърватия (D'Onofrio et al. 2020), Гърция (Palmieri et al. 2020), Румъния (Bonnin et al. 2011b) и Турция (Zeka et al. 2014), както и в проучването EURECA (67.7%), проведено върху инвазивни CRAB изолати от 10 европейски страни, повечето от тях отново от Балканите (Kostyanev et al. 2021). Генът *bla*$_{\text{OXA-23}}$ се намира или върху хромозомата, или върху плазмиди и е свързан с различни генетични структури (Mugnier et al. 2010; Gheorghe et al. 2015; Valcek et al. 2022).

Въпреки високия процентен дял на *bla*$_{\text{OXA-24/40-like}}$-положителни CRAB изолати в настоящото проучване (51.5%), следва да се отбележи, че те циркулират предимно в УМБАЛ „Св. Марина" (89.4%, от които 74.7% самостоятелно и 14.7% в комбинация с *bla*$_{\text{OXA-23-like}}$) от 2014 до 2019 г. (в колекцията ни липсват варненски изолати в последните години на надзор). Първите български *bla*$_{\text{OXA-24-like}}$-носещи CRAB изолати са идентифицирани през 2012 г. (Todorova et al. 2014). Чрез техники за нуклеотидно секвениране, по-късно в страната е открита OXA-72 придобита CHDL (вариант на OXA-24/40 CHDLs) (Pfeifer et al. 2017; Strateva et al. 2019). В настоящото проучване общо 6 CRAB изолата, които при PCR скрининга бяха определени като *bla*$_{\text{OXA-24/40-like}}$-положителни, вследствие чрез Sanger секвениране или WGS (Aba190) бяха охарактеризирани като OXA-72-продуциращи. За първи път в Балканския регион OXA-72 карбапенемаза е докладвана през 2016 г. в Сърбия (Dortet et al. 2016). Освен това, 30% от CRAB изолатите в международното проучване EURECA, предимно от Сърбия, притежават *bla*$_{\text{OXA-72}}$ гени (Kostyanev et al. 2021). В четири нозокомиални изолата *A. baumannii* ST492 от Сърбия е доказано едновременно присъствие на *bla*$_{\text{OXA-72}}$ и *bla*$_{\text{NDM-1}}$. Подобно на OXA-23, OXA-72 CHDLs (хромозомно или плазмидно кодирани) са повсеместно разпространени и идентифицирани сред CRAB изолатите от всички части на света, в това число Тайван, Китай, Бразилия, Колумбия, САЩ, Франция, Полша, Италия, Белгия, Литва, Швеция и Хърватия (Lin and Lan 2014; Valcek et al. 2022).

WGS на трите избрани изолата *A. baumannii* разкри, че резистентността към карбапенеми се медиира главно от наличието на CHDLs (OXA-23, OXA-66 и OXA-72). Освен това, Aba52 и Aba176 също съдържат инсерционните последователности IS*Aba24* и IS*Aba125*, които са позиционирани в промоторните области на гените *bla*$_{\text{ADC-73}}$ и *bla*$_{\text{OXA-23}}$, и вероятно допринасят за тяхната транскрипционна регулация. Предишни проучвания

подчертават ролята на IS*Aba125* като особено ефективен елемент в това отношение поради неговата по-добра промоторна последователност в сравнение с IS*Aba1* (Lopes and Amyes 2012). От друга страна, изолатът *A. baumannii* Aba190 компенсира липсата на тези елементи с наличието на $bla_{\text{OXA-72}}$ ген, разположен върху малък плазмид. Това откритие поражда тревожност, тъй като детерминантата може лесно да се предава чрез хоризонтален генен трансфер поради неговата локализация. Нещо повече, плазмидът също съдържа IS*Aba31* елемент, който създава допълнителна възможност за генен трансфер чрез рекомбинационни събития между инсерционните последователности.

Аминогликозидите традиционно се включват в терапевтичните режими при инфекции, причинени от CRAB (Piperaki et al. 2019; Jiang et al. 2022). CRAB изолатите, демонстриращи високо ниво на резистентност към трите аминогликозида (AMK, GEN и TOB), съставляват 45.5% от всички изследвани в периода 2014–2022 г. Както беше описано по-горе, при тях се открива *armA* ген, кодиращ 16S рРНК метилаза. Метилирането на 16S рРНК в 30S рибозомната субединица се признава за най-разпространения молекулярен механизъм, осигуряващ високо ниво на резистентност към повечето клинично прилагани аминогликозиди (Moubareck and Halat 2020; Kyriakidis et al. 2021), а копродукцията на ArmA метилаза и OXA-23 карбапенемаза е най-честият механизъм, който води до селекция на MDR-AB изолати (Palmieri et al. 2020).

Подобно на други патогенни бактерии, интегрони от клас 1, 2 и 3, които съдържат *sul* гени, отговорни за резистентност към сулфонамиди, са открити в нозокомиални MDR-AB изолати (Goudarzi and Azimi 2017). Както е описано по-горе, всички SXT-резистентни CRAB в настоящото проучване са *sul1*-положителни, а трите изолата, подложени на WGS, са потвърдени носители на интегрони от клас 1.

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 38**). Изследванията бяха насочени към детайлно определяне на молекулярната основа на неговата резистентност към CFDC.

Пълният списък на AMR детерминанти, мобилни генетични елементи (ISs) и мутации, идентифицирани в QRDR на *gyrA* и *parC*, е представен в **Таблица 40.** 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*), PBPs (*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 аминокиселинни (АК) замени, са показани в **Таблица 41.**

Табица 41. 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	*exbD1* (429 bp)	99.3	100
p.Asp11Glu	*exbD3* (423 bp)	99.3	100
p.Ser61Pro, p.Ile63Val, p.Lys97Gln	*exbD4* (414 bp)	97.8	99.3
p.Leu161Val	*exbB2* (621 bp)	99.5	100
p.Thr226Ser	*tonB1* (756 bp)	99.6	100
p.Ala268Val	*tonB2* (885 bp)	99.7	99.7
p.Val33Ile, **p.Thr61Ala**	*bauA* (2274 bp)	99.7	99.9
p.Ser429Pro, **p.Thr595Ala**	*feoB* (1854 bp)	99.7	99.7
p.Thr77Ser, p.Asn233Asp, p.Glu236Lys, p.Met238Leu, p.Tyr248Phe	*carO* (750 bp)	98	100
p.Ala515Val	*ftsI* (1833 bp)	99.8	99.8
p.Gly216Val, p.Asn489Asp, p.Lys658Arg	*piuA* (2232 bp)	99.6	99.9
p.Arg230Gln, p.Ser437Thr	*baeS* (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).

Седем от идентифицираните мутации са неконсервативни, а *feoB* е единственият ген, който съдържа повече от един вариант от този тип. Анализът на честотата показа, 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 показа, че експресията на *pirA* гена на Aba52 е намалена в сравнение с чувствителния към CFDC изолат *A. baumannii*, 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 продукция на различни β-лактамази от OXA тип (особено OXA-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).

Както беше описано по-горе, WGS-базираният резистомен анализ на Aba52 установи наличието на няколко гена, кодиращи β-лактамази: $bla_{\text{PER-1}}$, $bla_{\text{ADC-73}}$, $bla_{\text{OXA-66}}$ и $bla_{\text{OXA-23}}$. 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.

Наскоро е извършено тестване на антимикробната чувствителност към CFDC на 131 клинични изолата *A. baumannii* от Китай (Liu et al. 2022d). Авторите идентифицират три CFDC-резистентни изолата (МПК от 16 mg/L до >32 mg/L), принадлежащи към високорисковия ST2 и носители на $bla_{\text{PER-1}}$ детерминанта, както нашия Aba52. За потвърждаване ролята на PER-1 ESBL в резистентността към CFDC, те експресират $bla_{\text{PER-1}}$ в щамовете *A. baumannii* ATCC 17978 и *E. coli* DH5α, използвайки плазмида pYMAb2-Hyg^{r}-PER-1. МПК на CFDC за PER-1-продуциращите *A. baumannii* ATCC 17978 и *E. coli* DH5α се увеличават >32 пъти, подобно на резултатите от проучването на Poirel et al., в което PER-like β-лактамази са били експресирани в *E. coli* TOP10 и *A. baumannii* CIP70.10 (Poirel et al. 2021). При манипулация върху $bla_{\text{PER-1}}$ в генома на един от CFDC-резистентните клинични изолати *A. baumannii* (XH740) чрез алелна замяна е получен

мутантен щам XH740ΔPER-1, при който МПК на CFDC спада от 16 mg/L до 0.25 mg/L, което съответства на чувствителност. Въвеждането на pYMAb2-Hyg^{r}-PER-1 в този мутантен щам възстановява фенотипната устойчивост към CFDC (МПК >32 mg/L). С тази поредица от експерименти Liu et al. недвусмислено доказват ключовата роля на експресията на *bla*$_{PER-1}$ за развитие на резистентност към CFDC при клиничните изолати *A. baumannii*. Освен това чрез *in silico* изследвания те доказват, че avibactam и durlobactam могат да инхибират хидролизата на CFDC от PER-1 β-лактамазата, което потвърждават чрез определените МПК на CFDC в комбинация с двата β-лактамазни инхибитора.

При проучване върху *in vitro* активността на CFDC срещу клинични CRAB изолати от Турция също е установена корелация ($p < 0.0001$) между наличието на *bla*$_{PER-1}$ и резистентността към сидерофорния цефалоспорин. В групата на *bla*$_{PER-1}$-положителните изолати (33.7% от цялата колекция) авторите отчитат МПК$_{50}$/МПК$_{90}$ стойности, равняващи се на >128 mg/l / >128 mg/L, а в *bla*$_{PER-1}$-отрицателната група – съответно 0.25 mg/L и 128 mg/L (Uskudar-Guclu et al. 2024). Също така всички *bla*$_{PER-1}$-положителни и *bla*$_{OXA-23}$-отрицателни изолати са демонстрирали резистентност към CFDC, докато сред *bla*$_{PER-1}$-отрицателни и *bla*$_{OXA-23}$-положителните CRAB е отчетена 15.4% устойчивост към антибиотика. В тази връзка е направено заключение, че присъствието на *bla*$_{OXA-23}$ е значимо за резистентността към CFDC само при наличие и на *bla*$_{PER-1}$ ($p < 0.0001$).

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. baumanni* 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 (цефалоспориназа 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). Както беше описано в т. 5.2.2.2. непосредствено преди кодиращия ген *bla*$_{ADC-73}$ беше идентифицирана инсерционна

последователност. 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 кодирания PBP3. 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).

Тъй като CFDC използва пътя на сидерофорно-железния комплекс, за да проникне през външната мембрана на Грам-отрицателните бактерии, следващият ни фокус при скрининга на мутации бяха гените, кодиращи преносители на желязо и протеини, свързани с преноса на желязо. При тези микроорганизми активното усвояване на ферисидерофори зависи от запазения комплекс TonB-ExbB-ExbD. Той служи като проводник, превръщайки протонната движеща сила на цитоплазмената мембрана в енергия, необходима за високоафинитетния активен транспорт на натоварените с Fe^{3+} носители през външномембранните транспортери (Runci et al. 2019). Три неконсервативни АК замени бяха идентифицирани в кодиращите последователности на гените *exbD4*, *tonB2* и *piuA* (**Таблица 41**). Въпреки това анализът на честотата показа, 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).

Генът *feoB* в Aba52 е единственият, за който при скрининга беше установено, че съдържа две неконсервативни АК замени (**Таблица 43**). Въпреки това множественото подравняване на нуклеотидните последователности разкри, че двата варианта често се срещат съвместно в голям брой геноми на *A. baumannii*. Това е малко вероятен сценарий за

мутации, участващи в резистентността към CFDC. Освен това системата Feo участва в активното усвояване на желязо, а не на ферисидерофори (Runci et al. 2019).

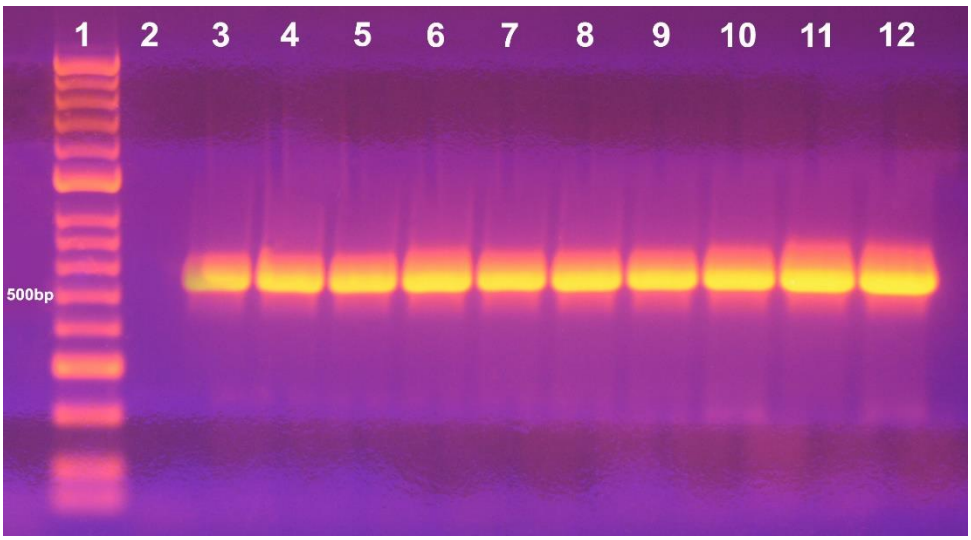
Извършеният RT-qPCR анализ показа намалена експресия на *pirA* и липсваща експресия на *piuA*. Подобни резултати са докладвани и в по-стари роучвания на CFDC-резистентни изолати *A. baumannii*, принадлежащи към ST2 и други STs (Malik et al. 2020). Като се вземат предвид тези констатации, силно намалените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

В обобщение, изследваният чрез WGS изолат *A. baumannii* Aba52 проявява XDR, включително и към новия сидерофорен антибиотик CFDC. Генетичните механизми, участващи в резистентността към CFDC са комплексни и включват: продукция на PER-1, променена генна експресия на TonB-зависимите сидерофорни рецептори (*pirA* и *piuA*) и две нови мутации с аминокиселинна замяна в *bauA*. Допълнителен принос към фенотипа имат мутацията в *ftsI* и вероятна свръхекспресия на $bla_{\text{ADC-73}}$.

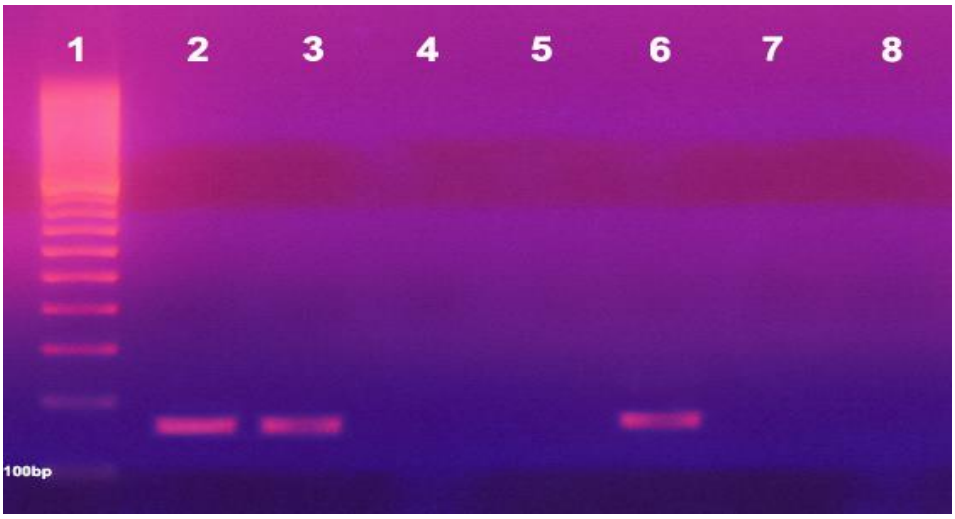
5.2.3. Молекулярно-генетични и геномни проучвания върху механизмите на резистентност на *S. maltophilia*

5.2.3.1. 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 *sul1* ген. Дигитално изображение от проведения PCR скрининг е представено на **Фигура 34.** Гените *sul2*, *sul3* и *dfrA* не бяха идентифицирани. При 75.9% (*n* = 22) от *sul1*-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 35**). Не бяха открити генетичните детерминанти на интегрази, асоциирани с интегрони от класове 2 и 3.



Фигура 34. Агарозна гел-електрофореза, представяща идентифициране на *sul1* гени (**581-bp фрагмент**) в клинични изолати *S. maltophilia*. Линия 1 – **HypperLadder 50 bp**; линия 2 – отрицателна контрола; линии 3-12 – PCR-положителни изолати.



Фигура 35. 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-медиирани (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 *sul1* 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 *sul1*-положителните щамове *S. maltophilia* (Toleman et al. 2007; Hu et al. 2011; Божкова 2016). Съобщават се 100% наличие на *sul1* сред високорезистентните на SXT изолати (МПК 64-128 mg/L), а при тези с по-ниски нива на резистентност (МПК 4-8 mg/L) *sul1* 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 *sul1*, 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). Възможно е по-ниският процентен дял (32.5% – 62.5%) за наличие на *sul1* сред SXT-резистентни изолати в някои проучвания, при които обаче не се конкретизират МПК на всеки от изследваните щамове, да се дължи именно на липсата на гена при резистентните изолати с по-ниски МПК стойности (Zhao et al. 2016, 2017).

Различните автори докладват разнообразни резултати, касаещи локализацията на *sul1* 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 *sul1* 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 *sul1* 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 *sul1* гени, но при тях не са идентифицирани интегрони от клас 1, каквито са 24.1% от *sul1*-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 интеграза (*intI1*), но липсва *sul1*. Предполага се, че интегроните от клас 1 могат да загубят региона, носещ този ген, както и че *sul1* може да присъства в други генетични елементи, което пък допълва гореспоменатата теория за наличие на *sul1* при отсъствие на интегрони от клас 1 (Kaur et al. 2015).

Липсата на интегрони от класове 2 и 3 сред SXT-резистентните изолати *S. maltophilia* в настоящата работа кореспондира с данните от други проучвания, които също не откриват такива (Hu et al. 2011, 2016; Kaur et al. 2015). Zhao et al. идентифицират *intI3* гени при 2 от общо 40 резистентни на SXT изолата от Китай (5%), в които не са открити *intI2* гени (Zhao et al. 2017).

Сходни на нашите резултати за липса на *sul2* се срещат в проучване сред SXT-резистентни клинични изолати *S. maltophilia* от 10 университетски болници в Корея (Chung et al. 2015). Други изследвания откриват *sul2* гени във вариращ процент при резистентни на SXT щамове – 15% (Li et al. 2019b), 20% (Bostanghadiri et al. 2019), 36% (Toleman et al. 2007), 41.9% (Hu et al. 2011), 47.4% (Gallo et al. 2016) и 50.9% (Hu et al. 2016). Като цяло разпространението му е по-ниско спрямо това на *sul1*, но в Индия е докладвана малко по-висока честота на *sul2*-позитивни SXT-резистентни изолати спрямо тези със *sul1* гени (58.3% срещу 50%, съответно) (Kaur et al. 2015). Генът *sul2* обикновено е локализиран на средно големи или големи плазмиди, но в някои случаи може да е хромозомно-кодиран (Toleman et al. 2007). Плазмидната локализация осигурява неговото хоризонтално разпространение в бактериалните популации (Hu et al. 2011). Hu et al. разкриват, че при голяма част от SXT-резистентните изолати, *sul2* се намира в асоциация с гена, кодиращ транспозаза. Транспозоните също са предпоставка за лесно разпространение на тази генетична детерминанта сред нозокомиалните изолати *S. maltophilia* (Hu et al. 2016).

Първоначалното откриване на *sul3* при *S. maltophilia* е при SXT-резистентни изолати от околна среда (ризосфера) в Южна Африка (Adegoke and Okoh 2014). По-късно *sul3* са доказани сред SXT-резистентни клинични изолати от Китай (Li et al. 2019b).

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. В проучвания от Китай се съобщава, че те се срещат по-често при SXT-резистентните щамове (49.1%), отколкото при SXT-чувствителните (10.3%) (Hu et al. 2011, 2016). Със значимо по-висока честота са субтиповете *dfrA12*, *dfrA17* и *dfrA27*, докато при *dfrA1* и *dfrA5* не е открита статистически значима разлика между SXT-резистентните и SXT-чувствителните изолати. По-новата научна разработка на Hu et al. доказва локализацията на субтипове *dfrA12*, *dfrA17* и *dfrA27* върху интегрон от клас 1, което е предпоставка за тяхното бързо и широко разпространение сред изолатите *S. maltophilia* в Китай (Hu et al. 2016).

5.2.3.2. Резистомен анализ, базиран на WGS

Девет от проучените изолати *S. maltophilia* от BMA, събрани в първия хронологичен период (2011–2016 г.), бяха избрани за WGS. Подборът беше направен след комплексна оценка на преди това получените резултати от тестване на антимикробна лекарствена 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. Най-общо **селективните критерии** включваха: различни години на изолиране, клиники 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 42.** Сглобените „драфт“ геноми варираха по размер между 4.38 и 4.99 Mbs, и показаха очаквано за вида *S. maltophilia* GC% съдържание между 65.80% и 66.78%.

Таблица 42. 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	**820**
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	**826**
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	**820**
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	**819**

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 депозирани в PubMLST database.

Идентифицираните AMR детерминанти в подложените на WGS изолати *S. maltophilia* са показани в **Таблица 43.** Всички геноми притежаваха типичните детерминанти, отговорни за вродената резистентност към β-лактами, в това число карбапенеми, аминогликозиди и tetracycline.

Таблица 43. Детерминанти на антимикробна 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	*bla*$_{L1}$, *bla*$_{L2}$	β-лактами, вкл. карбапенеми		
	aph(3')-IIc, *aac(6')-Iz*	Аминогликозиди		
	tetA, *tetB*	Tetracycline		
SM49	*bla*$_{L1}$, *bla*$_{L2}$	β-лактами, вкл. карбапенеми		
	aph(3')-IIc, *aac(6')-Iz*	Аминогликозиди		
	tetA, *tetB*	Tetracycline		
SM62	*bla*$_{L1}$, *bla*$_{L2}$	β-лактами, вкл. карбапенеми		
	aph(3')-IIc	Аминогликозиди		
	tetA, *tetB*	Tetracycline		
SM64	*bla*$_{L1}$, *bla*$_{L2}$	β-лактами, вкл. карбапенеми		
	aph(3')-IIc	Аминогликозиди		
	tetA	Tetracycline		
SM79	*bla*$_{L1}$, *bla*$_{L2}$	β-лактами, вкл. карбапенеми	*aph(3')-IIb, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id*	Аминогликозиди
	aph(3')-IIc, *aac(6')-Iz*	Аминогликозиди		
	tetA, *tetB*	Tetracycline		
SM105	*bla*$_{L1}$, *bla*$_{L2}$	β-лактами, вкл. карбапенеми		
	aph(3')-IIc, *aac(6')-Iz*	Аминогликозиди		
	tetA, *tetB*	Tetracycline		
SM130	*bla*$_{L1}$, *bla*$_{L2}$	β-лактами, вкл. карбапенеми	*sul1* [a]	Сулфонамиди
	aph(3')-IIc, *aac(6')-Iz*	Аминогликозиди	*bla*$_{OXA-74}$ [b]	Цефалоспорини и карбапенеми
	tetA, *tetB*	Tetracycline	*aac(6')-Ib-cr5* [b]	Флуорохинолони и аминогликозиди
			cmlA7 [b]	Chloramphenicol
			Sm*qnr11*	Хинолони
SM135	*bla*$_{L1}$, *bla*$_{L2}$	β-лактами, вкл. карбапенеми		
	aph(3')-IIc, *aac(6')-Iz*	Аминогликозиди		
	tetA	Tetracycline		
SM148	*bla*$_{L1}$, *bla*$_{L2}$	β-лактами, вкл. карбапенеми	*sul1* [a]	Сулфонамиди
	aph(3')-IIc	Аминогликозиди	*qnrE1* [c]	Хинолони
	tetA, *tetB*	Tetracycline		

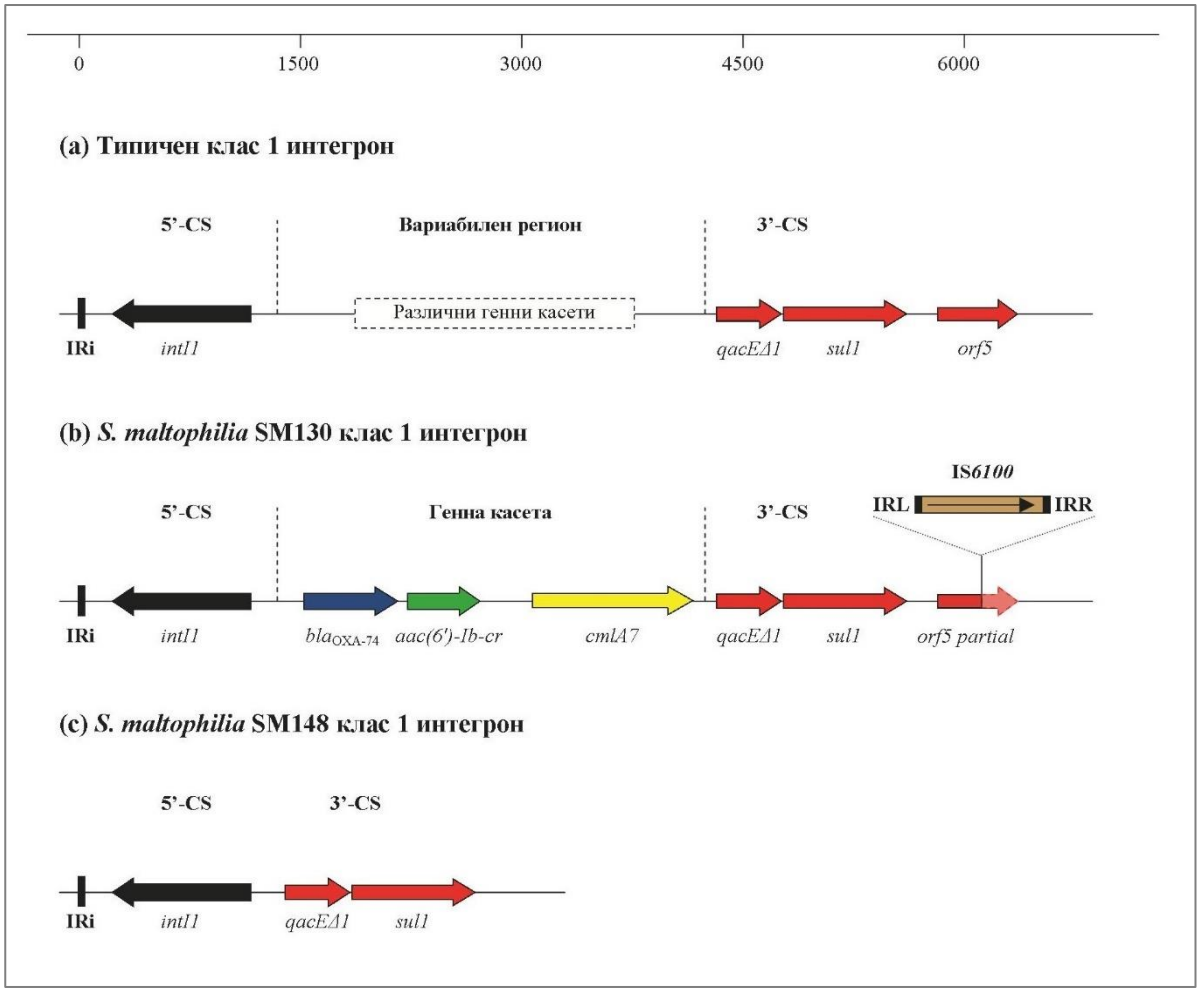
АМРД, детерминанти на антимикробна резистентност.

[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 *sul1* ген в 3' консервативните си краища (**Фигура 36**). 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 36.** Както е видно от фигурата, интегронът на SM130 съдържа генна касета в своя вариабилен участък, докато в SM148 беше открит „празен“ интегрон без генна касета, чиято дължина е само 2.6 kb.



Фигура 36. 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.

При клиничния изолат *S. maltophilia* SM130 инструментът SPAdes генерира сглобен 4.47-Mb геном, състоящ се от 68 контига над 1000 bp (размерът на най-големия от тях беше 360 296 bp), с N50 стойност 204 544 bp и средно GC съдържание 66.67%.

Идентифицираният интегрон от клас 1 съдържа генетични детерминанти на резистентност към множество АМЛС. Неговият ляв край включва типичния 5' консервативен сегмент (5'-CS), състоящ се от *intI1* ген (кодиращ интеграза от клас 1) и консервативна некодираща последователност откъм края на *intI1*, която завършва в 25-bp обърната последователност (IRi) (**Фигура 36**). За разлика от левия, десният край се характеризира с няколко модификации на типичния 3'-CS. Неговото начало съответства на първите 348 bp от кодиращата последователност на *qacE* гена (детерминанта за SMR ефлукс транспортер на четвъртично амониево съединение). Скъсеният *qacEΔ1* ген се припокрива със *sul1* (кодиращ дихидроптероат синтаза тип-1), следван от частичен *orf5* (ген с неизвестна функция). Секвенцията на *orf5* е прекъсната от вмъкнат IS*6100* елемент. Липсват *orf6* и/или *tni* гени. Установено е, че гените *qacEΔ1-sul1* и *intI1* се срещат съответно в 59.7% и 72.7% сред клинични изолати *S. maltophilia* от Китай, събирани в периода 2004–2015 г., както и хронологично нарастване на честотата им на разпространение в процеса на развитие на резистентност към SXT (Hu et al. 2016).

Вариабилният регион на интегрона на SM130 носи тандемна генна касета, детерминираща полирезистентност към АМЛС. Нейната дължина е прибилизително 3.2 kb и включва следните гени: $bla_{\text{OXA-74}}$ (кодиращ OXA-74 β-лактамаза от семейство OXA-10, клас D), *aac(6')-Ib-cr* (флуорохинолон-ацетилираща аминогликозид ацетилтрансфераза) и *cmlA7* (MFS ефлукс транспортер на chloramphenicol) – **Фигура 36.** 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 $bla_{\text{OXA-74}}$–*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*.

WGS подходът позволи да изследваме не само структурата на описания интегрон от клас 1, но и неговата локализация. Той беше открит в края на контиг с размер приблизително 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). Също така *in vitro* конюгационните експерименти, извършени с гореспоменатия клиничен изолат *P. aeruginosa* от Будапеща (EU161636.1), не доказват мобилен трансфер на интегрона от клас 1, съдържащ идентичната генна касета, което е доказателство за неговата хромозомна локализация (Libisch et al. 2008).

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 Sm*qnr11* (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 *smeVWX* води до виско ниво на резистентност към хинолони (Chang et al. 2015; Brooke 2021). Sm*qnr* детерминанти са доказани с висока честота сред клинични изолати *S. maltophilia* в Япония (57.5%), като доминиращ сред популацията е Sm*qnr6,* следван от Sm*qnr8* и Sm*qnr11*, открит и в нашия изолат. Единственият плазмидно-медииран ген за резистентност към хинолони, идентифициран в цитираното проучване, е *aac(6')-Ib-cr* (5%) (Kanamori et al. 2015).

Както е докладвано по-рано, MDR ефлукс помпите SmeDEF и MacABCsm участват също и във формирането на биофилм от изолатите *S. maltophilia* (Flores-Treviño et al. 2019). Посредством продукция на биофилми те лесно се прикрепват към повърхности в болничната среда и колонизират голямо разнообразие от ниши в гостоприемника. Биофилмът може също да причини антибиотична толерантност, което прави някои от терапевтичните възможности неефективни (Flores-Treviño et al. 2019; García et al. 2022). Проведените проучвания върху биофилм-формиращата способност на XDR *S. maltophilia* SM130 го определиха като силен продуцент, а резултатите са представени т. 5.4.2.

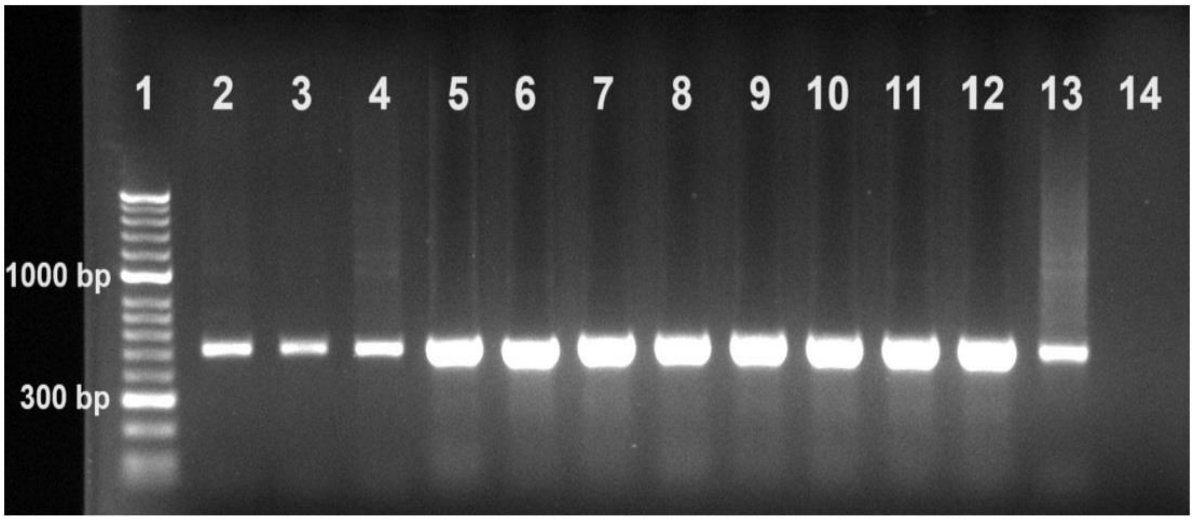
5.3. Фактори на вирулентност на проучените НФГБ изолати

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

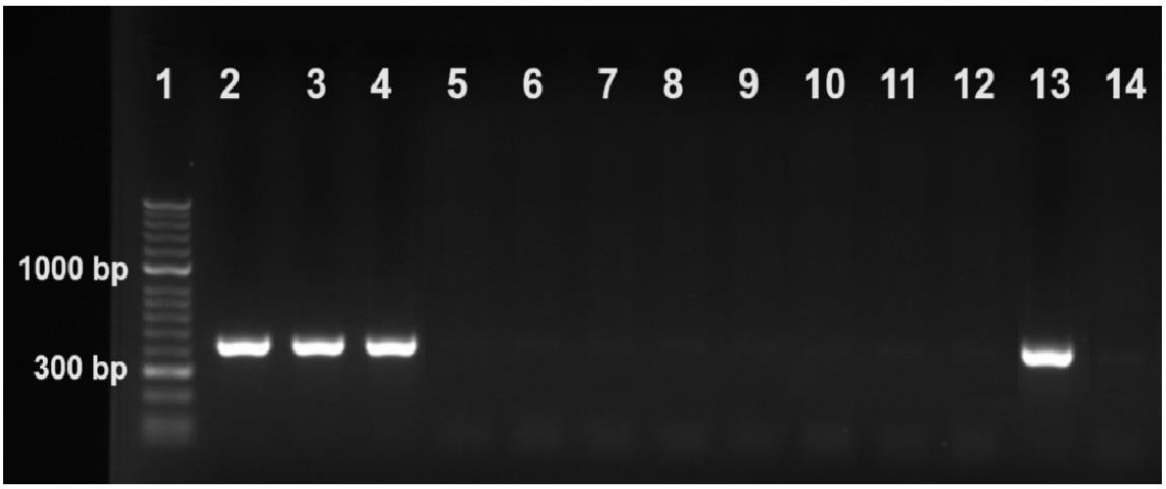
5.3.1.1. PCR скрининг и секвенционен анализ на гените за T3SS ефекторни протеини

Всички нозокомиални изолати *P. aeruginosa* от настоящото проучване (n = 254) бяха изследвани чрез PCR за наличие на гени, кодиращи T3SS 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 заболеваемост 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 T3SS ефекторни протеини ($ExoS^+$ и $ExoU^+$) като маркер за тяхната вирулентност (Oliver et al. 2024).

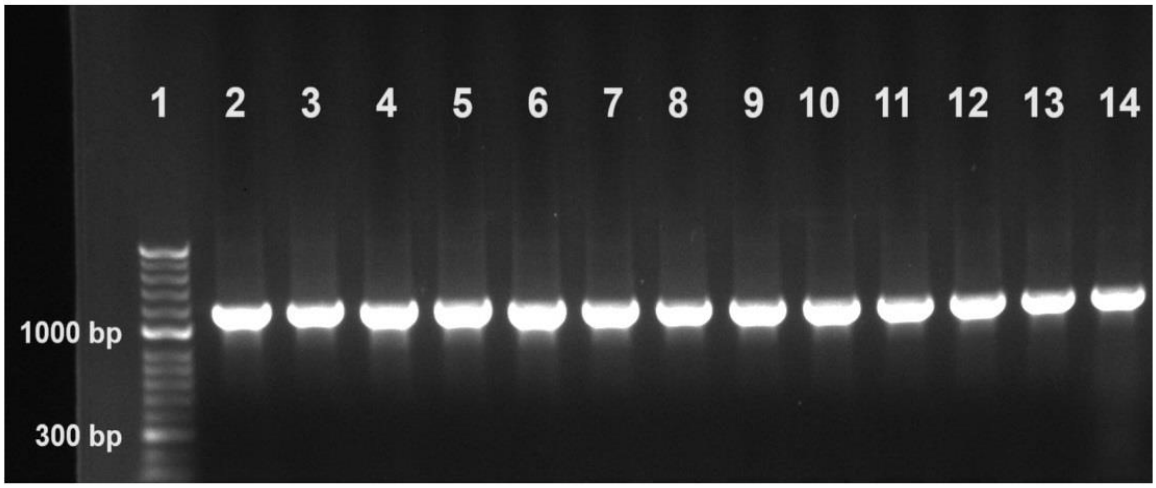
Установената обща честота на разпространение на *exo* гени сред изследваните клинични изолати *P. aeruginosa* беше както следва: *exoS* – 62.3%, *exoU* – 39%, *exoT* – 88.6%, и *exoY* – 78.7%. На **Фигури 37.** – **40.** са показани дигитални изображения на PCR-продукти съответно на *exoS*, *exoU*, *exoT* и *exoY*.



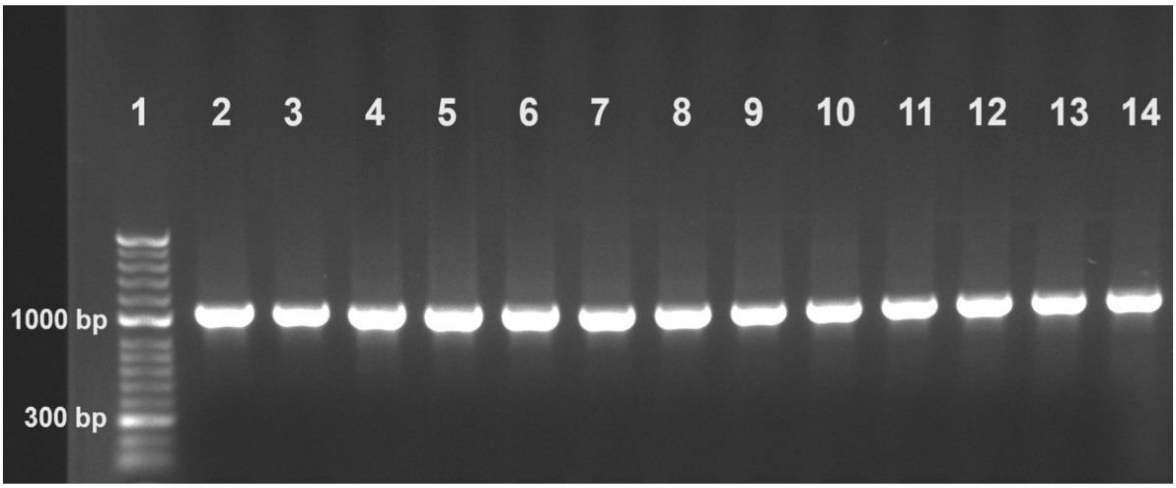
Фигура 37. Агарозна гел-електрофореза на **504-bp** PCR продукти на ***exoS*** ген, открит в клинични изолати *P. aeruginosa*. Линия 1 – **HyperLadder 50 bp**; линии 2-13 – PCR-положителни изолати; линия 14 – отрицателна контрола.



Фигура 38. Агарозна гел-електрофореза на **428-bp** PCR продукти на ***exoU*** ген, открит в клинични изолати *P. aeruginosa*. Линия 1 – **HyperLadder 50 bp**; линии 2-4 и 13 – PCR-положителни изолати; линии 5-12 – PCR-отрицателни изолати; линия 14 – отрицателна контрола.

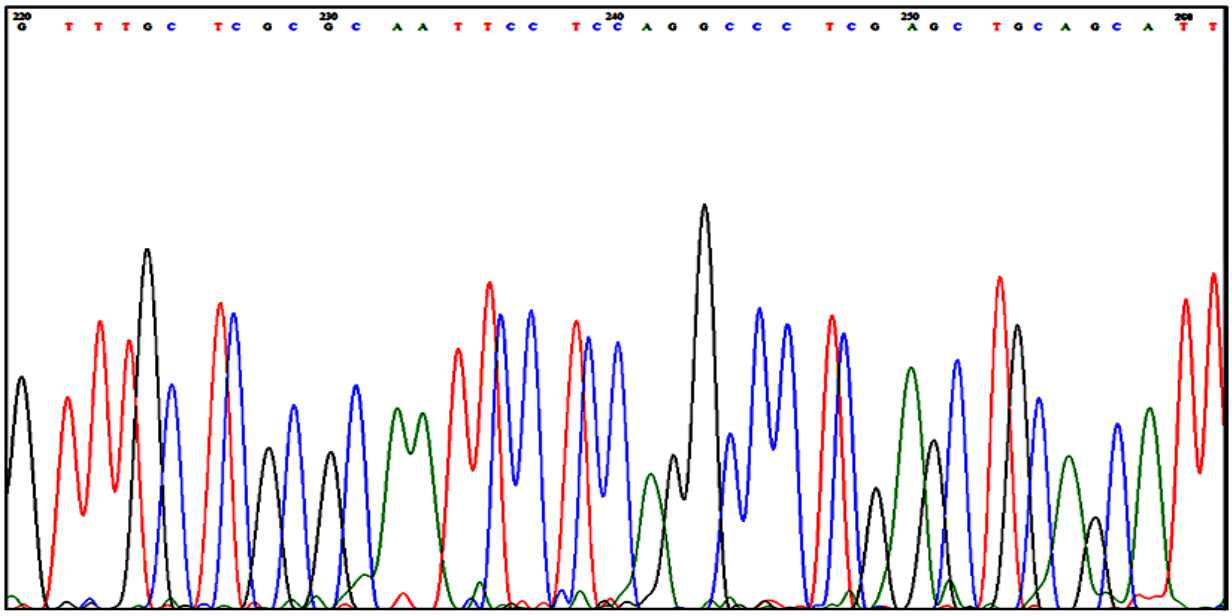


Фигура 39. Агарозна гел-електрофореза на **1159-bp** PCR продукти на ***exoT*** ген, открит в клинични изолати *P. aeruginosa*. Линия 1 – **HyperLadder 50 bp**; линии 2-14 – PCR-положителни изолати.



Фигура 40. Агарозна гел-електрофореза на **1035-bp** PCR продукти на ***exoY*** ген, открит в клинични изолати *P. aeruginosa*. Линия 1 – **HyperLadder 50 bp**; линии 2-14 – PCR-положителни изолати.

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**). На **Фигура 41.** е показана част от нуклеотидната последователност на *exoU*.



Фигура 41. Част от нуклеотидната последователност на *exoU*, получена с exoU-R-seq2 праймер (5'–CGAGAGAAGCGAAGGTATGA–3'). Фрагментът е 100% идентичен с частта от 2190. до 2231. база на *exoU* ген, депозиран в GenBank (U97065).

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 T3SS 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 но *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 университетски болници в страната от 2004 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 уроинфеции в Полша през 2015 г. (Pobiega et al. 2016). Сред полските изолати обаче са доказани значимо по-високи нива на разпространение на *exoS* (88.5% vs. 62.3%, $p < 0.01$) и *exoY* (96.2% vs.78.7%, $p < 0.05$).

В **Таблица 44.** 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%).

Таблица 44. Разпределение на *exo* генни профили сред проучените клинични изолати *P. aeruginosa* (*n* = 254).

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

ExoS и ExoU имат съществена роля в инфекциозната патогенеза. ExoS води до забавена апоптотична клетъчна смърт, докато ExoU се свързва със силно цитотоксичен фенотип на *P. aeruginosa* и предизвиква бързо лизиране на клетките на гостоприемника (Jurado-Martín et al. 2021). Счита се за значим фактор, определящ тежестта на инфекциите и независим рисков фактор за ранна смъртност при BSIs (Pea et al. 2015; Juan et al. 2017a). Освен това Howell et al. доказват, че *exoU* се индуцира рано по време на остра пневмония, причинена от *P. aeruginosa* (Howell et al. 2013). 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).

При изследване на 189 клинични изолата *P. aeruginosa* от две големи болници в Перу Horna et al. откриват само два генни профила на T3SS ефекторните протеини: *exoS*$^{+}$/*exoU*$^{-}$/*exoT*$^{+}$/*exoY*$^{+}$(77.2%) и *exoS*$^{+}$/*exoU*$^{+}$/*exoT*$^{+}$/*exoY*$^{+}$(22.8%) (Horna et al. 2019a).

Честотата на генотипа с комбинация от 4 гена в това проучване е значимо по-висока ($p < 0.0001$) спрямо разпространението на този генен профил в настоящата работа (7.1%). Авторите установяват корелация между *exoU*$^{+}$/*exoS*$^{+}$ генотип и MDR, XDR и високо ниво на резистентност към флуорохинолони, както и принадлежност на *exoU*$^{+}$/*exoS*$^{+}$-положителните изолати предимно към високорисковите ST235 и ST357. Четири от петнадесетте изолата *P. aeruginosa*, подложени на MLST при WGS анализа, спадат към ST235 (Pae53 и Pae68) и ST357 (Pae51 и Pae52) (**Таблица 35**). PCR скринингът и търсенето чрез инструмента VFanalyzer потвърдиха наличие на всички генни детерминанти за T3SS екзотоксини (*exoS*, *exoU*, *exoT* и *exoY*).

Генният профил *exoS*$^{+}$/*exoU*$^{+}$/*exoT*$^{+}$/*exoY*$^{+}$ е рядък, дори не се докладва от някои автори. Например Wang et al. не го откриват при изследване на тип III секреторната система и антибиотичната чувствителност на клинични изолати *P. aeruginosa* от различни източници в Китай (Wang et al. 2018). Противоположно на гореспоменатото проучване в Перу, техните резултати показват липсата на връзка между T3SS екзотоксини и нива на антибиотична резистентност.

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 45.** Статистическият анализ (точен тест на Fisher) откри няколко закономерности:

- Честотата на *exoS* варира от 58.6% при изолатите от 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 HAP (Schulert et al. 2003).

Таблица 45. Честота на разпространение на гените, кодиращи тип III ефекторни 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)**
exoS	51 (58.6)	51 (60)	24 (60)	13 (72.2)	12 (85.7)	4 (66.7)	3 (100)	1 (100)	159 (62.3)
exoU	39 (44.8)	25 (29.4)	22 (55)	6 (33.3)	3 (21.4)	4 (66.7)	0 (0)	0 (0)	99 (39)
exoT	75 (86.2)	76 (89.4)	34 (85)	18 (100)	13 (92.9)	5 (83.3)	3 (100)	1 (100)	225 (88.6)
exoY	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.

5.3.1.2. 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, наличен в базата данни за фактори на вирулентност (http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm). В **Таблица 46.** са обощени резултатите от проведения скрининг при VIM-2-продуциращия изолат *P. aeruginosa* Pae3007bg (означен като Pae50 в **Таблица 35**). Както е видно от таблицата, в генома бяха открити множество генни детерминанти за разнообразни фактори на вирулентност, групирани в **10 класа**, в т.ч. фактори на вирулентност, свързани с *адхезия и подвижност* (флагели, биосинтез на тип IV пили и протеини, свързани с функционирането на тип IV пили); *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 ефекторни протеини, секретирани чрез тип III система) и *токсини* (екзотоксин A и циановодород).

В генома на изолата Pae3007bg (ST111) бяха идентифицирани три от гените, коидиращи ефекторни протеини (цитотоксини) от тип III: *exoS*, *exoT* и *exoY*. Гените *exoT* и *exoY* са открити в почти всички CRPA изолати с продукция на карбапенемази (IMP-тип MBLs, VIM-2 MBL и GES-5), включени в мултицентрово WGS-базирано проучване върху тяхното разпространение в Чехия (Papagiannitsis et al. 2017). В редица проучвания е доказано, че CRPA и MDR-PA от високорисковия ST111, какъвто е нашият VIM-2 продуцент, се асоциират с установената и в настоящото проучване комбинация *exoS* + *exoT* + *exoY* (Papagiannitsis et al. 2017; Molina-Mora et al. 2020). Липсата на четвъртия ген, кодиращ ефекторен протеин от тип III (*exoU*), може да се обясни с произхода на Pae3007bg (изолиран от урина). Известно е, че експресията на *exoU* е по-честа при изолати *P. aeruginosa*, свързани с инфекции на ДДП, и води до остро увреждане на белия дроб (Howell et al. 2013; Jurado-Martín et al. 2021). Освен това нашите резултати потвърждават, че гените *exoS* и *exoU* в повечето случаи са взаимно изключващи се (Hauser 2009; Bradbury et al. 2010; Juan et al. 2017a).

В генома на проучения изолат беше установено разнообразие от гени и оперони (*exsA, exsCEB, exsD-pscBCDFGHIJKL, popN-pcr1-2-3-4-DRGVH-popBD, pscN, pscUTSRQPON*), които показват наличие на функционален механизъм на T3SS, способен да доставя ефекторни молекули в клетките на гостоприемника.

Таблица 46. Вирулом на *bla*$_{VIM-2}$-положителния изолат *P. aeruginosa* Pae3007bg от ST111.

Клас	Фактори на вирулентност	Идентифицирани гени / оперони
Адхезия и подвижност	Ресни	*flaG-fliC, fleN-fliA, fleQ, fleSR, flgA, flgBCDE, flgFGHIJK, flgL, flgMN, flhAF, fliD, fliEFGHIJ, fliK, fliLMNOPQR-flhB, fliST, motAB, motCD, motY*
	Биосинтез на тип IV пили	*fimT, fimU-pilVWXY1Y2E, fimV, pilA, pilB, pilCD, pilF, pilMNOPQ, pilSR, pilT, pilU, pilZ*
	Протеини, свързани с тип IV пили	*chpE, pilGHI, pilJK-chpABCD*
Антимикробна активност	Биосинтез на феназини	*phzA1, phzA2, phzB1C1D1E1F1G1, phzH, phzB2, phzM, phzS*
Антифагоцитно действие	Биосинтез на алгинат	*algD-8-44-KEGXL, algA, algC, algF, algIJ*
	Регулиране на алгинатната продукция	*algQ, algR, algW, algZ, algU-mucABCD, mucE, mucP*
Биосърфактант	Биосинтез на рамнолипид	*rhlA, rhlB, rhlC*
Екстрацелуларни ензими	Фосфолипази	*plcH, plcN, plcB, pldA*
	Протеази	*aprA, lasA, lasB, prpL*
Усвояване на желязо	Пиохелин	*pchDCBA, pchGFEHI, pchR, fptA*
	Пиовердин	*pvdA, pvdE, pvdF, pvdLG, pvdH, pvdMNO, pvdP, pvdQ, pvdS, pvdY, fpvA*
Кворум сенсинг (QS)	Ацилхомосерин лактон синтаза	*hdtS*
	N-(3-окси-додеканоил)-L-хомосерин лактон QS система	*lasI, lasR*
	N-(бутаноил)-L-хомосерин лактон QS система	*rhlI, rhlR*
Регулиране	GacS/GacA двукомпонентна система	*gacA, gacS*
Секреторни системи	Секреторна система тип VI, кодирана от Hcp секреторен остров-1	*clpV1-vgrG1, fha1, hcp1, ppkA-pppA-icmF1*
	P. aeruginosa тип III ефекторни протеини	***exoS, exoT, exoY***
	P. aeruginosa тип III секреторна система	*exsA, exsCEB, exsD-pscBCDFGHIJKL, popN-pcr1-2-3-4-DRGVH-popBD, pscN, pscUTSRQPON*
Токсини	Екзотоксин A	*toxA*
	Продукция на циановодород	*hcnABC*

* Структурата на представените оперони е в съответствие с Pseudomonas Genome DB (https://www.pseudomonas.com).

Голям брой гени, отговарящи за биосинтеза на алгинат, както и регулаторни, свързани с неговата продукция, също бяха идентифицирани в генома на Pae3007bg от ST111. Алгинатът има важна функция в устойчивостта на изолатите срещу сурови условия на околната среда и имунния отговор на макроорганизма, а *algD* се доказва с най-голяма честота от биофилм-асоциираните гени при клиничните *P. aeruginosa* (Rajabi et al. 2022).

В групата от гени за фактори на вирулентност с антимикробна активност липсват *phzC2*, *phzD2*, *phzE2*, *phzF2* и *phzG2*, които са идентифицирани в генома на референтния щам *P. aeruginosa* PAO1, изолиран от пациент с ранева инфекция. Подобно откритие е направено наскоро от друг български колектив при извършване на вируломен анализ на първите в страната клинични изолати *P. aeruginosa*, продуциращи IMP-тип MBLs (Stoikov et al. 2023).

По отношение на сидерофорите бяха идентифицирани пълни оперони, участващи в биосинтеза на пиохелин, и липса на някои от гените, свързани с биосинтез на пиовердин, което е индикация за нарушен биосинтез.

Пълен вируломен анализ беше извършен и при първите геномно охарактеризирани $bla_{\text{VEB-9}}$-положителни XDR-PA изолати в България, Pae51 и Pae52, чиито резистоми са подробно описани в **т. 5.2.1.2.** Подобно на $bla_{\text{VIM-2}}$-положителния изолат *P. aeruginosa* Pae3007bg, в Pae51 и Pae52 бяха открити голям брой генни детерминанти за разнообразни фактори на вирулентност, които бяха отнесени към представените в **Таблица 46.** десет класа. Техният пълен списък е представен на **Фигура 42.** Групирането на гените, свързани с вирулентността, беше осъществено просредством 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).

Отново беше установена липса на някои детерминанти на вирулентност в сравнение с референтния щам *P. aeruginosa* PAO1, в т.ч. свързани с T4P (*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 Pae51 и Pae52 е наличието на *pilE* в генома на първия изолат, както е показано на **Фигура 42.** Геномите на Pae51 и Pae52 съдържат гени, кодиращи T3SS ефекторните протеини ExoT и ExoY. Освен това те са носители и на *exoU*, за разлика от щама *P. aeruginosa* PAO1 и описания по-горе изолат *P. aeruginosa* Pae3007bg, които притежават генотип $exoS^{+}/exoU^{-}$. Бяха открити и много T3SS гени, което свидетелства за функционален механизъм на секреция.



Фигура 42. Вируломен анализ на *bla*$_{\text{VEB-9}}$-положителните респираторни изолати *P. aeruginosa* Pae51 и Pae52, получени от критично болни пациенти на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София.

В съответствие с предишни проучвания, показващи връзката на ST357 с генотипа *exoU*$^{+}$/*exoS*$^{-}$ (del Barrio-Tofiño et al. 2020; Oliver et al. 2024), нашият вироломен анализ показа, че Pae51 и Pae52 от високорисковия клон ST357 също притежават този специфичен генотип. Считаният за основен T3SS цитотоксин ExoU, който има най-силно въздействие върху тежестта на инфекциите, е маркер за силно вирулентни щамове *P. aeruginosa*, получени от пациенти с HAP (Schulert et al. 2003), каквито са и изследваните в настоящото проучване изолати Pae51 и Pae52.

In silico серотипизирането определи принадлежност на Pae51 и Pae52 към серотип O11 (**Таблица 35**). По литературни данни съществува силна корелация между серотип O11

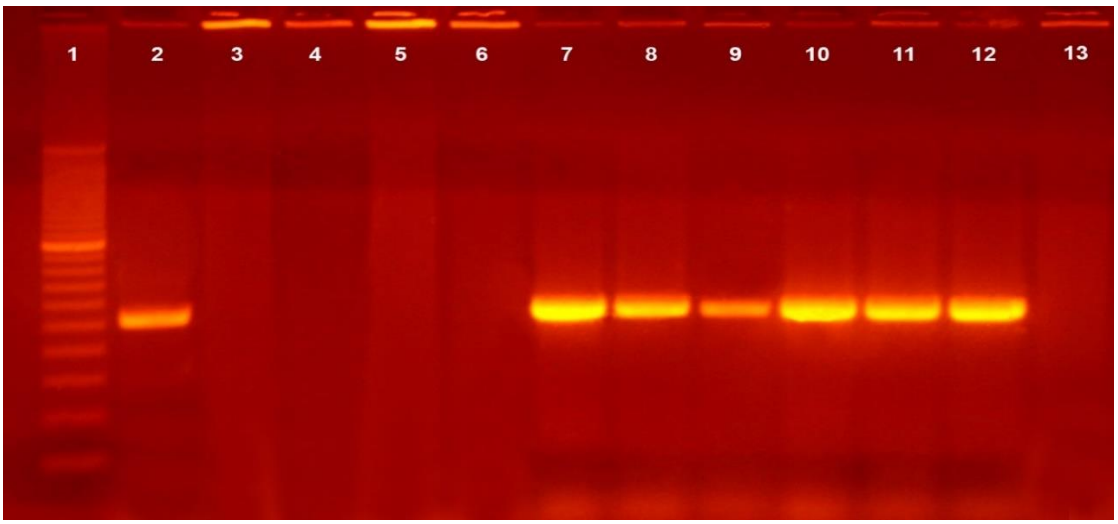
и MDR фенотип на клиничните изолати *P. aeruginosa* (Recio et al. 2020), което се потвърждава и от нашите резултати. Както беше вече изтъкнато, *exoU*-положителнитият T3SS генотип обичайно се асоциира с високорисковия клон ST357, но също така и със серотипа O11 (Oliver et al. 2024). Двете зависимости бяха доказани и в настоящото проучване. Струва си да се добави, че серотип O11 на *P. aeruginosa* е свързан с по-лоша прогноза за клиничния изход на HAP/VAP и BSIs при критично болни пациенти (Lu et al. 2014; Recio et al. 2020).

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

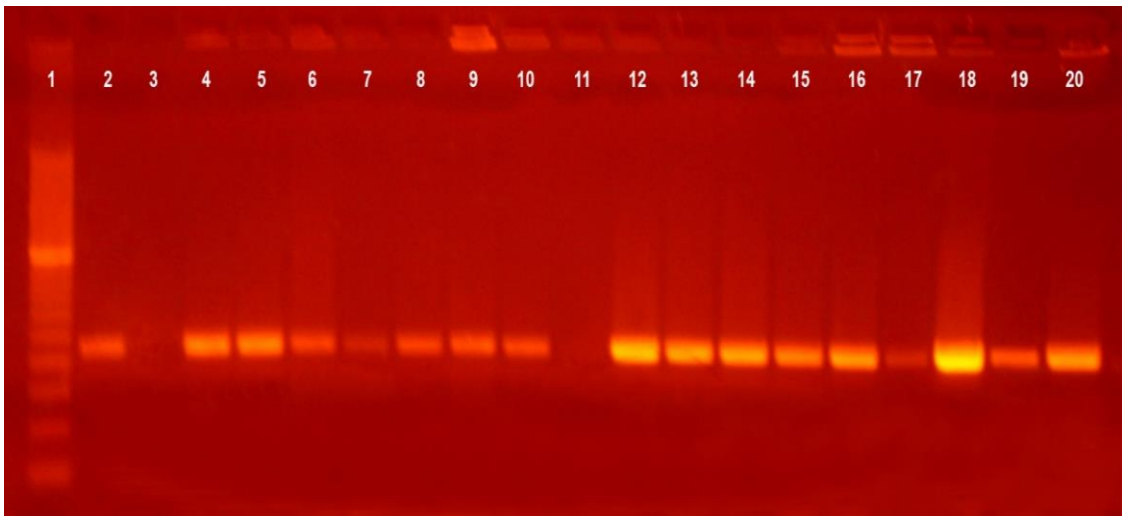
5.3.2.1. PCR скрининг за детерминанти на вирулентност с участие в образуването на биофилм

PCR скринингът включи четири гена, кодиращи ключови фактори на вирулентност при *A. baumannii* с разнородни функции, сред които се открояват участие в бактериалната адхезия (*ompA* и *csuE*), растеж в серума и оцеляване при тъканни инфекции (*epsA*) и формиране на биофилм (*bapA*, *ompA*, *epsA* и *csuE*). Общата честота на разпространение на *ompA*, *epsA*, *csuE* и *bap* 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 *bap*-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.). На **Фигури 43.–45.** са показани дигитални изображения на амплифицирани продукти съответно на *ompA* (531 bp), *epsA* (451 bp) и *csuE* (515 bp) гени.

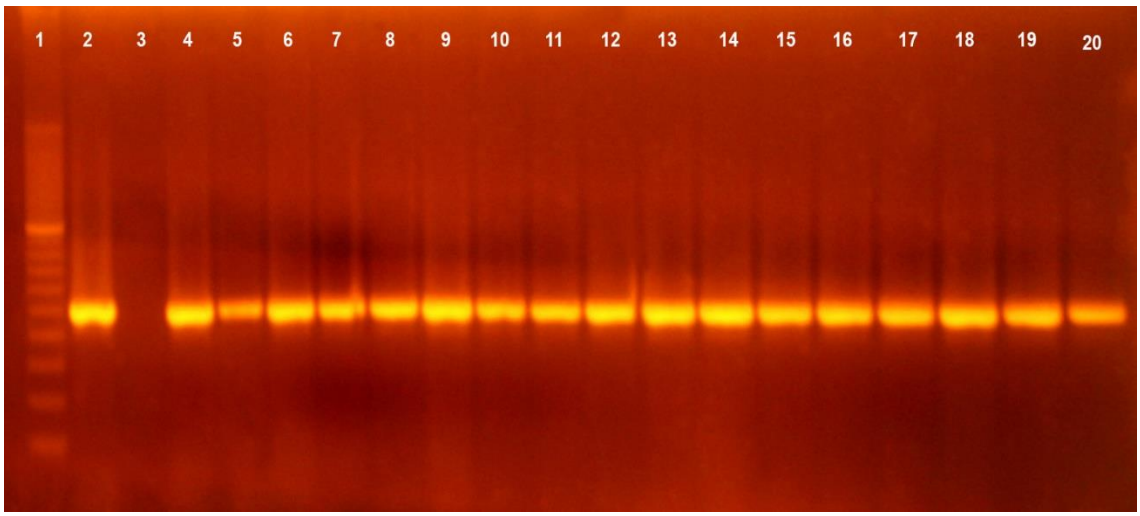
Честотата на разпространение на генетичните детерминанти на вирулентност според произхода на изолатите е представена на **Фигура 46.** Сравнителният анализ показа по-малка вариация при *ompA* и *csuE*, и широк диапазон при *epsA* (от 51.7% сред инвазивните изолати *A. baumannii* от кръв до 82.4% сред изолатите от ГДП) и *bap* (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 *bap* 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%).



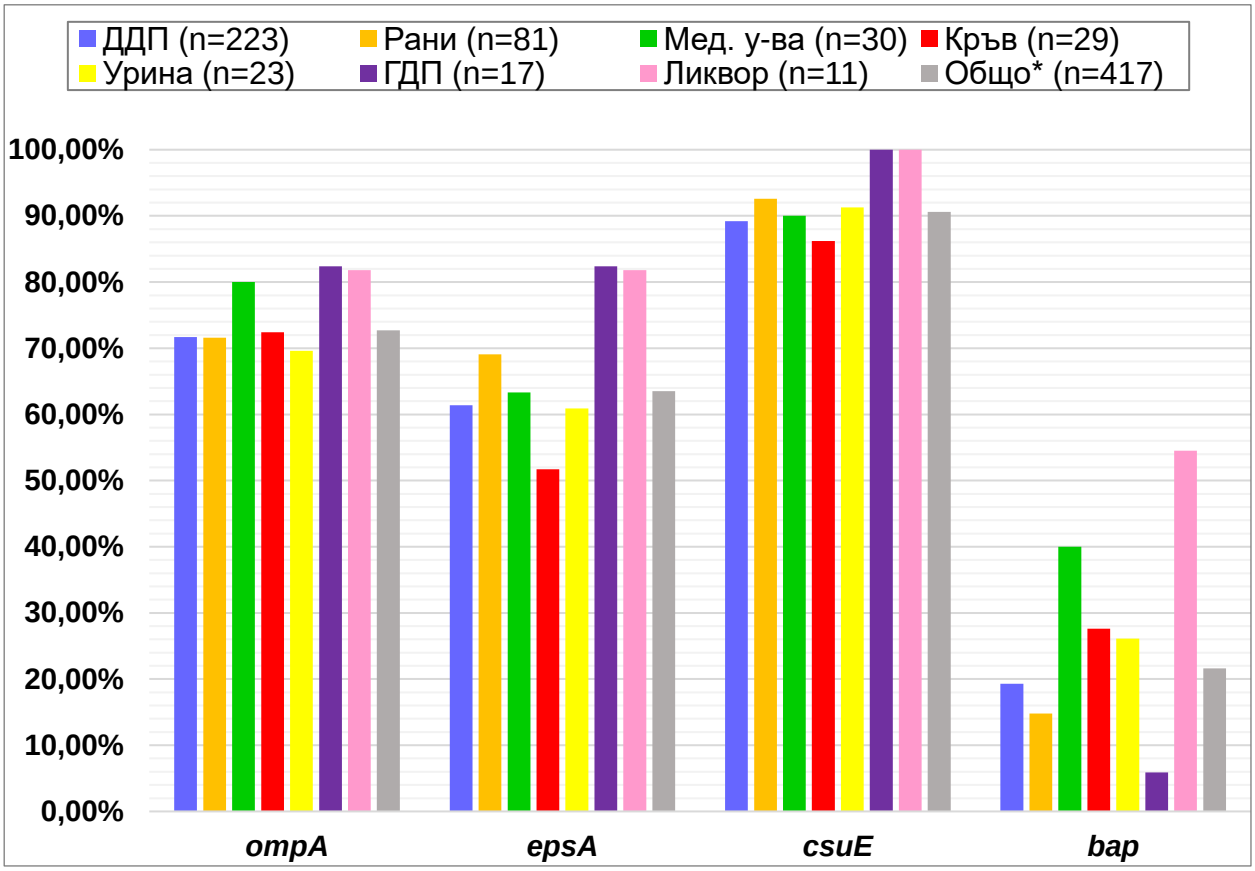
Фигура 43. Агарозна гел-електрофореза на PCR-амплифицирани продукти (**531-bp**) на ***ompA*** ген, открит в клинични изолати *A. baumannii*. Линия 1 – **Ladder 100 bp**; линия 2 – положителна контрола (*A. baumannii* ATCC 19606); линии 3-6 – PCR-отрицателни изолати; линии 7-12 – PCR-положителни изолати; линия 13 – отрицателна контрола.



Фигура 44. Агарозна гел-електрофореза на PCR-амплифицирани продукти (**451-bp**) на ***epsA*** ген, открит в клинични изолати *A. baumannii*. Линия 1 – **Ladder 100 bp**; линия 2 – положителна контрола; линия 3 – отрицателна контрола; линии 4-10 и 12-20 – PCR-положителни продукти; линия 11 – PCR-отрицателен продукт.



Фигура 45. Агарозна гел-електрофореза на PCR-амплифицирани продукти (**515-bp**) на ***csuE*** ген, открит в клинични изолати *A. baumannii*. Линия 1 – **Ladder 100 bp**; линия 2 – отрицателна контрола; линии 4-20 – PCR-положителни продукти.



Фигура 46. 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.

Ролята на външномембранните протеини (OMPs) на *A. baumannii*, като OmpA, CarO, Omp33 OprD-like и PstS, във формирането на биофилм и свързаната с него антибиотична резистентност е документирана от много автори (Eze et al. 2018; Shenkutie et al. 2020; Upmanyu et al. 2022). От друга страна, чрез намаляване на преноса на антибиотици в периплазменото пространство посредством промени в порините или OMPs, ензимната активност на продуцираните от щамовете карбапенемази се засилва допълнително (Chakravarty 2020). 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, медииране на антимикробната лекарствена резистентност, модулиране на имунния отговор на гостоприемника, иницииране 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 профилите 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 изотати 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 неколкократно по-голям, изолирани са в продължение на 19 години (2004–2022) от няколко университетски болници в страната, което предполага по-хетерогенна популация от щамове.

В по-ранни проучвания са били идентифицирани два гена, за които се смята, че са необходими за полимеризация и сглобяване на капсулите на *A. baumannii*. Първият, *ptk*, кодира предполагаема тирозин киназа (PTK), а вторият, *epsA*, кодира предполагаем OMP

за експорт на полизахариди (EpsA) (Cuthbertson et al. 2009; Russo et al. 2010). Ptk и EpsA са потенциални мишени за създаване на нови антимикробни средства за лечение на инфекциите, причинени от *A. baumannii*. 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). В проучване в Иран е иследвана способността за образуване на биофилм и наличието на БАГ сред MDR-AB изолати от имунокомпрометирани ICU пациенти със симптоматична вътреболнична инфекция, причинена от *A. baumannii* (Zeighami et al. 2019). В контраст с вече цитираните азиатски проучвания, отчетеното от авторите разпространение на *epsA* е по-високо от установеното от нас (95% / 63.5%, $p < 0.0001$).

Csu пилите от тип 1 са ключови фактори на вирулентност на *A. baumannii*, отговорни за първоначалната адхезия на бактериалните клетки към биотични и абиотични повърхности (Upmanyu et al. 2022). Те са съставени от четири субединици: основна субединица CsuA/B, две адаптерни субединици CsuA и CsuB и връх CsuE. Протеините CsuC и CsuD имат транспортна функция. Изследвано е влиянието на делецията на всеки от кодиращите гени, включени в оперона *csuA/BABCDE*, върху образуването на биофилм. Мутантите *csuA/B* и *csuE* демонстрират пълно премахване на структурата на пилите, докато мутантите *csuA* и *csuB* произвеждат малко анормални влакна. Делеционните мутанти не са способни да образуват биофилм върху пластмасова повърхност, което предполага, че и четирите субединици са необходими за функционални пили (Tomaras et al. 2003). Освен в процеса на образуване на биофилм *csuE* генът играе роля в подвижността чрез „трептене“ (Pakharukova et al. 2018). Установено е, че субинхибиторните концентрации на SXT напълно потискат експресията на Csu pili при *A. baumannii*, което предполага, че неподходящата употреба на антибиотици може да промени поведението на популационно ниво и да предизвика преход към планктонен начин на живот (Moon et al. 2017). Генът *csuE* 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%).

Идентифицираният от Loehfelm et al. високомолекулен (854-kDa) Bap протеин на *A. baumannii* (Loehfelm et al. 2008) е хидрофобен повърностно адхезионен протеин с ключова роля при образуване, съзряване и поддържане на биофилми както върху човешки клетки, така и върху медицински устройства и повърхности, изработени от полистирен, полипропилен и титан (Brossard and Campagnari 2012; Upmanyu et al. 2022). През последните 10 години зачестяват проучванията върху биофилм-формиращата способност на клиничните изолати *A. baumannii*, в които важна част е скринингът за БАГ и търсенето на корелация между фенотип и генотип. Безспорно *bap* присъства във всички анализи. Детайлен преглед на литературата показва изключителна вариабилност по отношение на разпространението на гена. Авторите на различни кохортни проучвания докладват следната честота: 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; Depka et al. 2023). Както е показано по-горе (**Фигура 46.**), общата честота на *bap* 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 *bap* в българските нозокомиални MDR/XDR-AB изолати е значимо по-ниско ($p < 0.0001$). Находката за значима разлика в разпространението на *bap* сред двете хронологични групи *A. baumannii* от настоящата работа (63.8% vs. 5.3%, $p < 0.0001$) не е необична предвид дългия времеви интервал на събиране на изолатите (2004–2011 и 2014–2022) и различните болници, от които са получени. Подобни са резултатите от две проучвания в Иран ($p < 0.0001$), включващи клинични изолати *A. baumannii* от хоспитализирани пациенти в различни универсистетски болници, по различно време, съответно в Техеран (8.4%) и Занджан (43%) (Ghasemi et al. 2018; Zeighami et al. 2019).

В по-ранно проучване в Тайланд е открита корелация между наличието на два от БАГ при *A. baumannii* (*ompA* и *bap*) и профила на антимикробна чувствителност. Честотата на разпространение и на двете детерминанти на вирулентност е значимо по-висока ($p < 0.05$) в групата “MDR-AB” в сравнение с “Non-MDR-AB”: *ompA* (87.1% vs. 67.7%, $p =$

0.013) и *bap* (51.5% vs. 25.8%, $p = 0.011$). От друга страна разпространението на *epsA* е почти идентично в двете групи изолати (22.6% vs. 22.1%) (Thummeepak et al. 2016). Поради селективните критерии за включване, в настоящото проучване всички изолати *A. baumannii* са с MDR или XDR профил и не могат да бъдат потърсени подобни закономерности.

5.3.2.2. Вируломен анализ, базиран на WGS

В **Таблица 47.** 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. Механизмите на резистентност към CFDC са подбробно описани в **т. 5.2.2.2.** Както е показано в таблицата, 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. Като цяло 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. Особено интересни са генетичните детерминанти, кодиращи TonB-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). Тяхното присъствие, структура и съответните нива на експресия трябва да се разглеждат не само като фактори на вирулентност, свързани с усвояването на Fe, но и през призмата на антибиотичната резистентност.

Прави вечатление присъствието на *bap*, който не беше доказан при предварително извършения PCR скрининг. В скорошно изследване на еволюционната и патогенната роля на Bap протеина на *A. baumannii* чрез *in silico* структурно моделиране са анализирани 7338 генома на *A. baumannii* от базата данни на NCBI. Авторите установяват, че Bap или Bap-подобен протеин (BLP) присъства в 6422 (87.5%) изолата. По-нататъшната класификация показва, че 12.1% са носители на Bap тип 1, 68.4% са носители на Bap тип 2, 6.9% притежават Bap тип 3, 0.05% се характеризират с Bap тип 6 или SDF тип, а 12.5% нямат Bap или BLP. По-голямата част от изолатите с тип 1, тип 2 и тип 3 Bap принадлежат съответно към ST1, ST2 и ST25 (Upmanyu et al. 2024). Възможно е кодиращият ген на този силно полиморфен протеин да е с нарушена или скъсена нуклеотидна последователност, което да доведе до липса на специфична амплификация с приложената двойка праймери за PCR детекция.

Таблица 47. Гени / оперони за фактори на вирулентност, идентифицирани в генома на cefiderocol-резистентния изолат *A. baumannii* Aba52 от ST2.

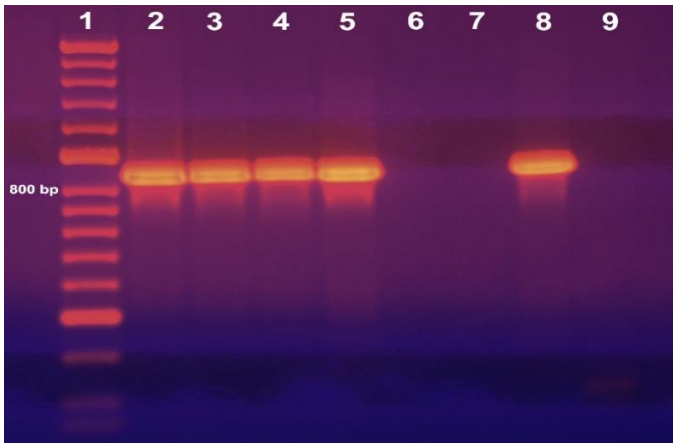
Клас	Фактори на вирулентност	Идентифицирани гени / оперони
Адхезия	Външномембранен протеин	*ompA*
Биофилм формиране	AdeFGH ефлукс помпа / транспортен автоиндуктор	*adeFGH*
	Биофилм-асоцииран протеин BapAb	*bap*
	Csu пили	*csuABCDE*
	Полизахарид поли-N-ацетил-глюкозамин	*pgaABCD*
Ензими	Фосфолипаза C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

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

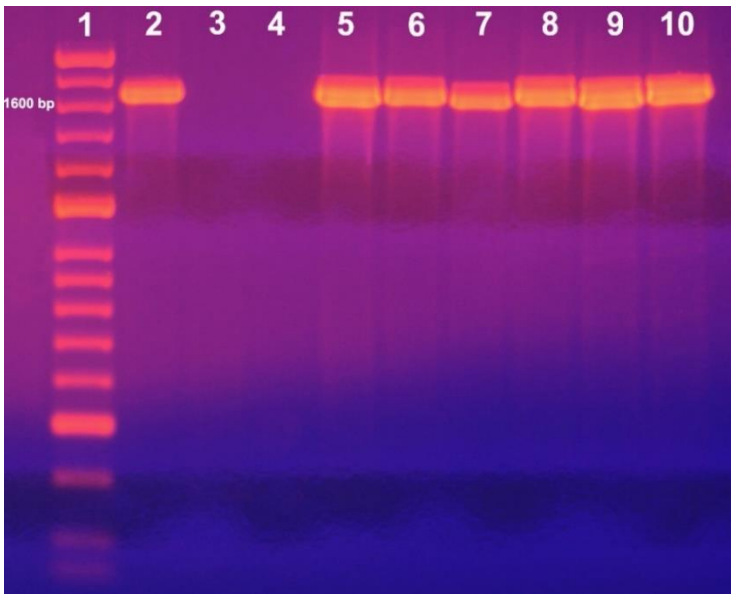
5.3.3.1. PCR скрининг за детерминанти на вирулентност

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 С) 99.1% и *smf-1* (SMF тип 1 фимбрии) 96.4%. На **Фигури 47.** и **48.** са показани дигитални изображения на PCR-продукти, съответно на късия и на дългия алелен вариант на *stmPr1*, а на **Фигура 49.** – на *plcN1*, за чието доказване беше използвана оригинална двойка праймери за амплификация.

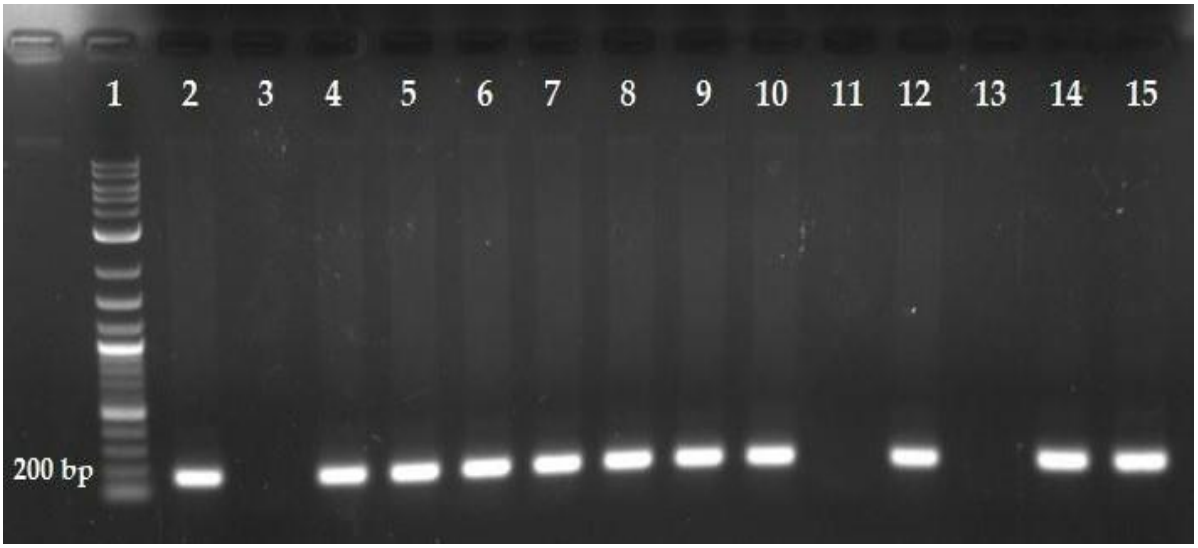
Разпределението на алелните варианти на *stmPr1* според произхода на изолатите е представено в **Таблица 48.** Най-общо, дългият алелен вариант беше най-често откриваният (61.1%), следван от комбинираният 868-bp+1621-bp алелен вариант (17.6%) и *stmPr1*-отрицателният генотип (12.7%). Късият вариант беше 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.



Фигура 47. Агарозна гел-електрофореза на PCR-продукти на ***stmPr1*** ген (**868-bp алелен вариант**) на *S. maltophilia.* Линия 1 – **HypperLadder 50 bp**; 2-5 – положителни PCR-продукти на клинични изолати *S. maltophilia*; 6, 7 – отрицателни PCR-продукти; 8 – положителна контрола; 9 – отрицателна контрола.



Фигура 48. Агарозна гел-електрофореза на PCR-продукти на ***stmPr1*** ген (**1621-bp алелен вариант**) на *S. maltophilia.* Линия 1 – **HypperLadder 50 bp**; 2 – положителна контрола; 3 – отрицателна контрола; 4 – отрицателен PCR-продукт; 5-10 – положителни PCR-продукти на клинични изолати *S. maltophilia*.



Фигура 49. Агарозна гел-електрофореза на **174-bp** PCR-продукти на ***plcN1*** ген на *S. maltophilia*. Линия 1 – **1 kb plus DNA Ladder**; 2 – положителна контрола; 3 – отрицателна контрола; 4-10, 12, 14-15 – положителни PCR-продукти на клинични изолати *S. maltophilia*; 11 и 13 – отрицателни PCR-продукти.

Таблица 48. Генотипове на голямата извънклетъчна протеаза StmPr1 според произхода на изследваните изолати *S. maltophilia* (*n* = 221).

Произход (Брой)	***stmPr1* (868 bp)**	***stmPr1* (1621 bp)**	**Комбиниран**	**Липсва ген**
	Брой (%)	**Брой (%)**	**Брой (%)**	**Брой (%)**
Клинични материали				
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)
COVID-19 инфекция				
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).

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 *stmPr*2 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.

Разпределението на StmPr1 генотипове сред нашите изолати от ДДП беше много сходно до установеното сред ДДП изолати от пациенти с МВ в Италия (в периода 2003–2005), както следва: 69.8% (дълъг алелен вариант), 11.6% (комбиниран алелен вариант), 11.6% (липсващ *stmPr1* ген) и 7% (къс алелен вариант) (Nicoletti et al. 2011).

Авторите на скорошно проучване, фокусирано върху изолати *S. maltophilia* от инфекции на кръвта сред пациенти в Южна Корея, установяват сходни стойности (съответно, 48.38% и 45.16% за комбинирания *stmPr1* генотип и 1621-bp варианта) до нашите, касаещи изолатите от кръв. Късият алел (868-bp), както и липсващият ген за StmPr1 протеаза, са отчетени при 3.22% от корейските изолати (Kim et al. 2019b).

Установената в настоящото изследване честота на *plcN1* 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). За разлика от българските *S. maltophilia*, повечето бразилски изолати са определени като слаби и умерени продуценти на биофилм. Наскоро е докладвана значима корелация между *smf-1* гена за тип 1 фимбрии и биофилм-формиращата способност на *S. maltophilia* (Azimi et al. 2020).

5.3.3.2. Фенотипни характеристики на вирулентност

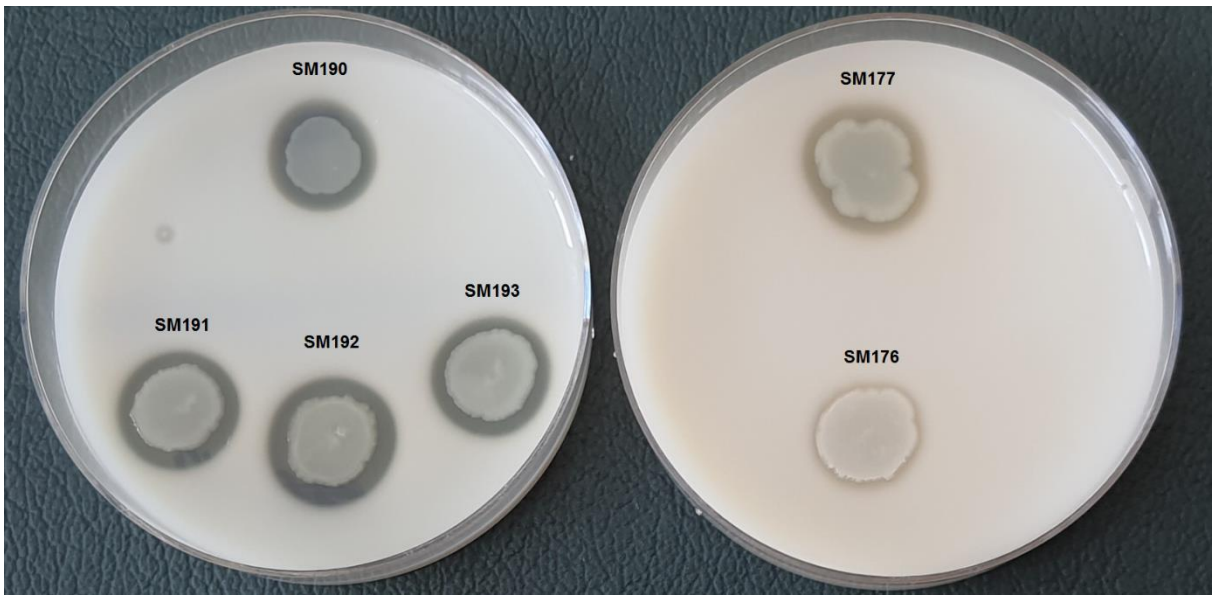
В съответствие с проучените гени на вирулентност, кодиращи протеази, външномембранна естераза и нехемолитична фосфолипаза С, беше определена кореспондиращата активност на тези ензими. Разпределението на продуциращите извънклетъчни ензими *S. maltophilia* изолати от различни източници е показано в **Таблица 49.** Протеазна (**Фигура 50.**) и естеразна активност (**Фигура 51.**) беше установена съответно в 95% и 98.2% от проучените 221 изолата. Контрастно на това, лецитиназна продукция (**Фигура 52.**) беше открита само при 17.2% ($n = 38$) от изолатите. Честотата на ензимна продукция показа лека вариабилност според произхода на изолатите, с изключение на тези от урина. Те демонстрираха най-ниска протеазна и естеразна продукция (съответно 72.7% и 90.9%), както и абсолютна липса на лецитиназна активност.

Таблица 49. Ензимна активност на проучените изолати *S. maltophilia* от различни източници.

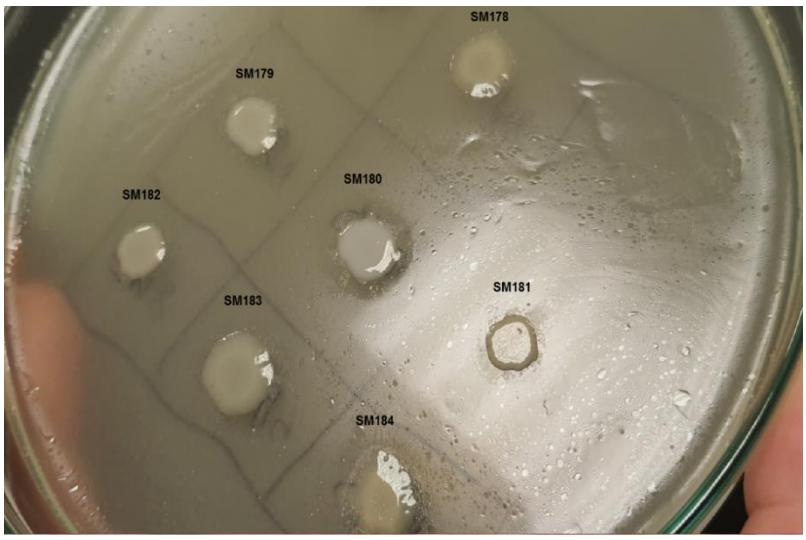
	Брой (%) положителни изолати						
Ензимна активност	**ДДП** (n = 120)	**Рани** (n = 27)	**ГДП** (n = 26)	**Кръв** (n = 17)	**Урина** (n = 11)	**Смесени** [a] (n = 20)	**Общо** (n = 221)
Протеаза	117 (97.5)	25 (92.6)	25 (96.2)	16 (94.1)	8 (72.7)	19 (95)	210 (95.1)
Естераза	120 (100)	27 (100)	26 (100)	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.

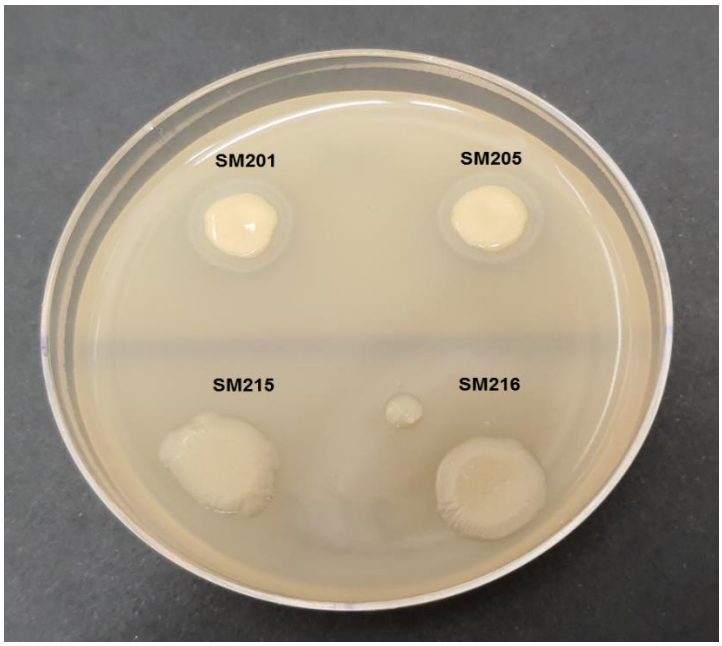
[a] Изолати от: медицински устройства (n = 9), болнична среда (n = 4), фецес (n = 3), асцит (n = 2), жлъчка (n = 1) и ликвор (n = 1).



Фигура 50. Демонстрация на **протеазна активност** чрез тест за **казеинова хидролиза върху Mueller–Hinton агар + 3% skim milk (култивиране на 37 °C за 24 h).** SM177, SM190, SM191, SM192, SM193 – положителна реакция (ясна, прозрачна зона около инокулираното петно); SM176 – отрицателна реакция.



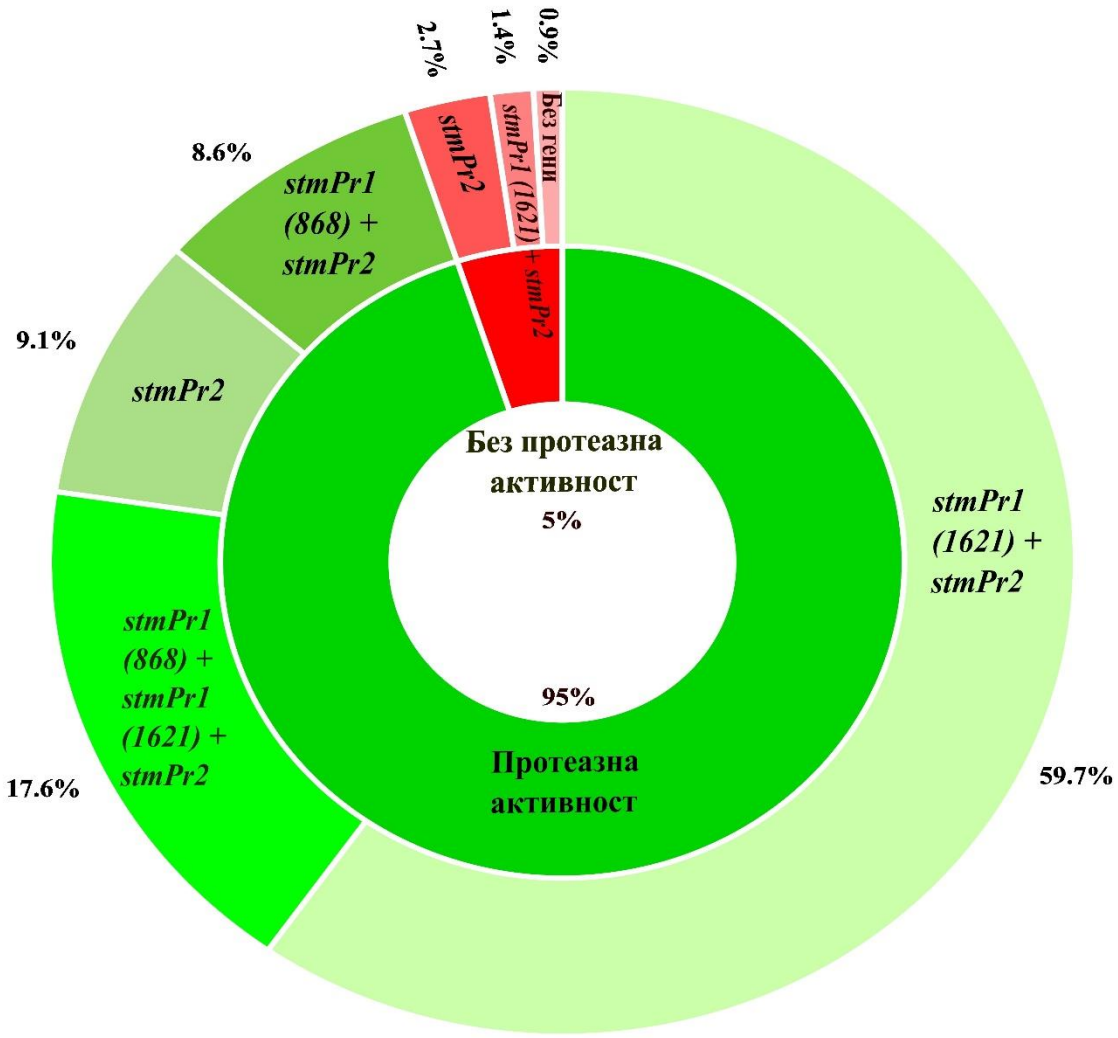
Фигура 51. Демонстрация на **естеразна активност** върху **Tributyrin Agar с добавена Tributyrin-Arabic gum (култивиране на 37 °C за 24 h).** SM179, SM180, SM181, SM182, SM183, SM184 – положителна реакция (хало около инокулираното петно); SM178 – отрицателна реакция.



Фигура 52. Демонстрация на **лецитиназна активност** върху **Egg Yolk Agar с добавена 10% Egg Yolk емулсия (култивиране на 37 °C за 72 h).** SM201 и SM205 – положителна реакция (бял преципитат около инокулата); SM215 и SM216 – отрицателна реакция.

5.3.3.3. 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 53.**



Фигура 53. Връзка между SmltPr1/2 генотипове и протеазна активност в 221 нозокомиални изолата *S. maltophilia*.

Най-честият генотип сред изолатите *S. maltophilia* с протеазна активност (общо 95%) беше "*stmPr1* (l621-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 (общо 17.6%). Доминиращият брой от непродуцентите на ензима (6 от 11 изолата) притежаваха само *stmPr2*.

Продукцията на протеази играе ключова роля в патогенезата на бактериалните инфекции. Доказано е участието им в инвазията, тъканното увреждане и избягване на защитните механизми на гостоприемника (DuMont et al. 2015; Trifonova and Strateva 2019). Широко разпространение на протеаза-продуциращи клинични изолати *S. maltophilia* е открито в предишни проучвания в Италия (90.7%) (Nicoletti et al. 2011), Тайланд (91.5%) (Yinsai et al. 2023), Бразилия (100%) (Travassos et al. 2004) и Малайзия (100%) (Thomas et

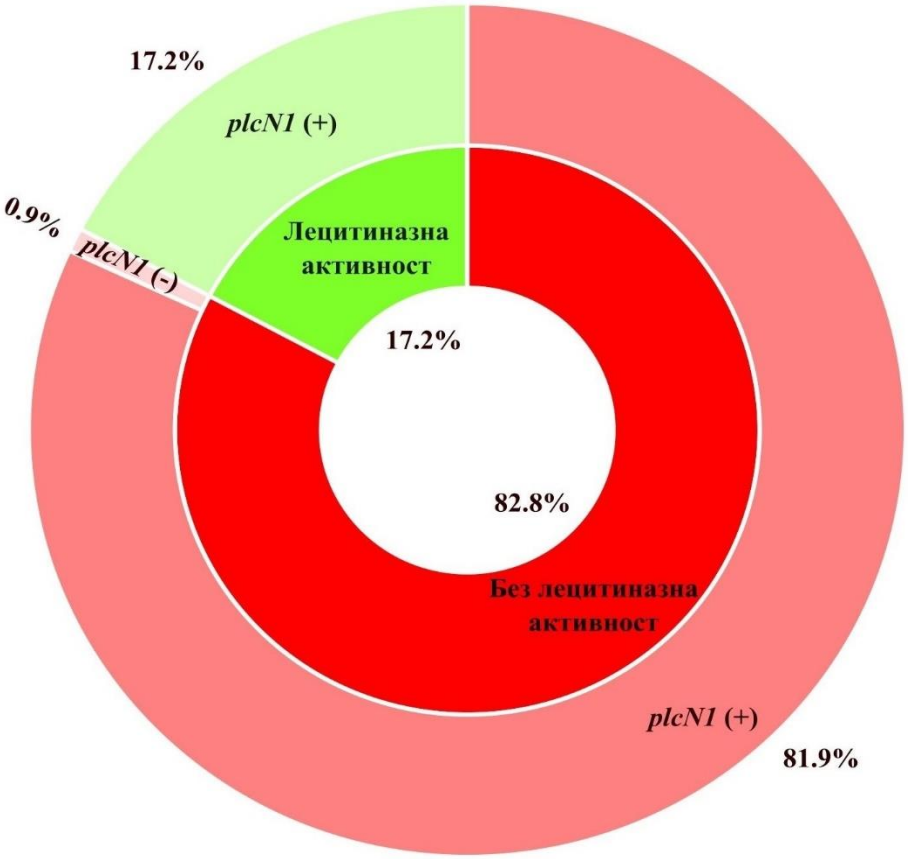
al. 2014). Наблюдаваните малки разлики могат да бъдат обяснени с вариации в използваните среди и методи за детекция (качествени или количествени) или са свързани с различен екзоензимен потенциал на тестваните изолати *S. maltophilia*.

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%).

Естеразите са група хидролитични ензими, които могат да бъдат асоциирани с вирулентността на *S. maltophilia* (Trifonova and Strateva 2019). Честотата на изолати, демонстриращи естеразна активност в настоящото проучване, беше значимо по-висока от установената такава сред клинични изолати *S. maltophilia*, получени предимно от пациенти с МВ в Италия (98.2% срещу 81.4%, $p < 0.01$) (Nicoletti et al. 2011). За разлика от нашите естеразни непродуценти (1.8%), които не притежаваха Smlt3773, авторите откриват изолати без естеразна активност, независимо от присъствието на кодиращ ген (18.6%) и обясняват находката с налични мутации с изместване на рамката на четене, формиращи преждевременни стоп кодони. Техният анализ на ампликони от естераза-продуциращи щамове потвърждава наличието на wild-тип Smlt3773 локус. Резултатите на Nicoletti et. al. показват, че локусът, кодиращ външномембранна естераза, е високо консервативен, както и съществуването на често срещащи се, нефункционални генни варианти сред изследваните клинични изолати *S. maltophilia* от болни от генетичното заболяване МВ.

Всички изолати *S. maltophilia*, които демонстрираха лецитиназна активност (17.2%) бяха *plcN1*-положителни. Също така почти всички изолати без лецитиназна активност притежаваха гена (**Фигура 54**).



Фигура 54. Връзка между *plcN1* генотип и лецитиназна активност в 221 нозокомиални изолата *S. maltophilia*.

Гени, кодиращи нехемолитична фосфолипаза C и фосфолипази от клас D, са идентифицирани в генома на *S. maltophilia* K279a от Crossman et al. (Crossman et al. 2008). Бактериалните фосфолипази, в това число лецитиназа, са хетерогенна група металоензими, продуцирани от много микроорганизми, някои от които играят роля в инфекциозната патогенеза. Като фактори на вирулентност те участват в деструкцията на защитни молекули или структури, като муцин, липопротеинови мембрани и имуноглобулини (Figueirêdo et al. 2006; Trifonova and Strateva 2019). Честотата на лецитиназа-продуциращи клинични изолати *S. maltophilia* варира в широки граници в по-ранни проучвания. Figueirêdo et al. установяват лецитиназна активност само в изолати, получени от трахея и черен дроб, и 50% честота на такива изолати (следва да се отбележи малкият брой проучени щамове – само 10) (Figueirêdo et al. 2006). Thomas et al. докладват 69.4% изолати с лецитиназна активност сред колекция от нозокомиални щамове *S. maltophilia* с различен произход от Малайзия (Thomas et al. 2014), което е значимо по-високо разпространение от констатираното от нас (17.2%, $p < 0.001$). Авторите не откриват

продуценти на лецитиназа сред изолатите от урина, което беше потвърдено и от нашето изследване. По-ранно бразилско проучване открива наличие на фосфолиполитична активност във всички тествани клинични изолати, с вариабилно, но ниско количество на ензима (от 0.0011 до 0.49 PU) (Travassos et al. 2004). Следва да се отбележи, че тестването на ензимна активност е извършено с по-прецизен количествен метод.

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 *plcN1*. 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 *plcN1*-положителни, което предполага, че този ген е повсеместно разпространен и не корелира с фенотипната експресия на лецитиназната активност.

5.3.3.4. Геномни характеристики на вирулентност

Геномите на деветте избрани за WGS нозокомиални изолата *S. maltophilia* (**Таблица 42.**) бяха изследвани за наличие на точкови мутации, засягащи проучените гени на вирулентност. Идентифицираните аминокиселинни (АК) замени бяха разделени на консервативни и неконсервативни мутации. Броят им е представен в **Таблица 50.** Най-ниска вариация беше открита в *smf-1* гена, кодиращ тип 1 фимбрии. Противоположно на тази находка, късият 868-bp алелен вариант на *stmPr1* показа 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 (OD_{550}: 1.253–1.789) и малък брой мутации в протеазните гени и *smf-1*. Три други изолата (SM8, SM62 и SM148) имаха единствено късия алелен вариант (868-bp), показаха по-слаба продукция на биофилм (OD_{550}: 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, OD_{550}=0.177) не притежаваше *stmPr1* алели. Мутациите в Smlt3773 и *plcN1* бяха равномерно разпределени между групите изолати. Както е видно от **Таблица 50.**, 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.

Таблица 50. 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**	***stmPr1* (868 bp)** 617 АК	***stmPr1* (1621 bp)** 630 АК	***stmPr2*** 580 АК	**Smlt3773** 611 АК	***plcN1*** 707 АК	***smf-1*** 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; OD_{550}, 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. 5.4.2.2.

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*. Освен това се наблюдава тенденция, че щамове с къс алелен вариант на *stmPr1* притежават по-голям брой мутации в техните кодиращи гени за протеази и по-ниска способност да образуват биофилми. Оттук може да се направи заключение, че определянето на протеазните детерминанти на *S. maltophilia* има потенциал също така да оцени други аспекти на неговата вирулентност, като образуването на биофилм.

Два от общо деветте целогеномно секвенирани изолата *S. maltophilia* (SM62 и SM105) образуваха бял преципитат около инокулираното петно след култивиране на Egg Yolk Agar, което беше интерпретирано като проява на лецитиназна активност. Съответните промоторни региони на техните *plcN1* гени бяха детайлно анализирани за наличие на общи регулаторни мутации и/или инсерционни последователности. Такива не бяха открити, което изключва хипотезата, че мутационна свръхрегулация в този локус може да доведе до изява на лецитиназна активност.

5.4. Образуване на биофилм от изследваните НФГБ изолати

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

Способността на *A. baumannii* да образува биофилм върху биотични и абиотични повърхности е едно от главните проявления на неговата вирулентност (Gedefie et al. 2021; Upmanyu et al. 2022). Резултатите от скрининга за гени, кодиращи фактори на вирулентност с доказана роля в образуването на биофилм от клиничните изолати (*bap*, *ompA*, *epsA* и *csuE*), наричани по-долу биофилм-асоциирани гени (БАГ), бяха представени в т. 5.3.2.1.

При 89 избрани изолата (88 клинични MDR-AB и референтния щам *A. baumannii* ATCC 19606) с различни БАГ генни профили беше изследвана способността за биофилм образуване върху абиотична повърхност. Преобладаващата част от клиничните изолати (78 от 88) притежаваха *bap* ген, а останалите (10 от 88) бяха *bap*-отрицателни. Резултатите за всеки от тестваните щамове бяха съотнесени към отрицателна контрола със стойност на оптичната плътност OD_{570} = 0.033 ± 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 *A. baumannii* в следните категории: „силни продуценти“, „умерени продуценти“, „слаби

продуценти“ и „непродуциращи биофилм“ (Thummeepak et al. 2016; Bardbari et al. 2017; Yang et al. 2019a; Shenkutie et al. 2020). Общо 84 от проучените 88 MDR-AB изолати (95.5%) демонстрираха биофилм-формираща способност върху полистиренова повърхност, 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 51**). Референтният щам *A. baumannii* ATCC 19606, в чийто геном не е идентифициран *bap*, образува силен биофилм (0.892 ± 0.025, което е над 3.5 пъти повече от средната стойност за изследваната група от клинични изолати).

Таблица 51. Биофилм-формираща способност върху полистиренова повърхност на 88 нозокомиални MDR-AB изолата, измерена след 24 часа инкубация.

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

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

Може да се потърси връзка между високия относителен дял на биофилм-формиращите изолати (95.5%) и техния MDR фенотип, който беше задължителен критерий за включване в дисертационния труд. Такава корелация е открита в предходни проучвания (Gurung et al. 2013; Bardbari et al. 2017). Bardbari et al. отчитат средна стойност на биомасата на биофилма върху абиотична повърхност 0.649 ± 0.289 и 0.556 ± 0.346, съответно при MDR-AB и non-MDR-AB изолати от респираторен тракт на ICU пациенти от университетски болници в Иран, както и статистически потвърдена корелационна зависимост (p = 0.008) между MDR профил и способност за образуване на биофилм (Bardbari et al. 2017). В литературата са докладвани и противоположни резултати. В експерименти, включили non-MDR-AB, MDR-AB и XDR-AB изолати от хоспитализирани пациенти в Тайланд, биофилм-формираща способност са демонстрирали 77.3% от MDR/XDR групата (n = 194) и 74.2% от non-MDR групата (n = 31) (p = 0.654). Освен това не е намерена статистически значима разлика (p = 0.536) в количеството биофилм, образуван върху полистиренова повърхност от изолатите с различен профил на резистентност към АМЛС (Thummeepak et al. 2016). Интересни са резултатите от изследване на Al-Shamiri et al., проведено върху клинични изолати *A. baumannii* от

хоспитализирани пациенти в болница в провинция Шанси, Китай. Повечето са получени от ICU пациенти (77.1%) и притежават MDR или XDR профил (87.1%). Авторите установяват силна корелация между антибиотичната резистентност и способността за образуване на биофилм, според която всички MDR/XDR щамове могат да образуват биофилми, като по-голямата част от тях са в умерени и силни нива. Такава способност нямат 2.9 % от чувствителните изолати. От друга страна чувствителните щамове *A. baumannii*, които продуцират биофилми, обаче показват по-силна способност за образуване на биофилми в ранния етап до 24 часа в сравнение с резистентните изолати, въпреки че след това те стават по-слаби (Al-Shamiri et al. 2021).

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). Като способни да образуват биофилм са охарактеризирани и всички изследвани респираторни изолати *A. baumannii* от хоспитализирани пациенти в напреднала възраст с диагноза HAP, лекувани в болница в Пекин, Китай. Преобладаващата част от тях (54.5%) са образували умерено количество биофилм върху полистиренова повърхност (Zhang et al. 2016a). 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%.

След количественото определяне на образувания биофилм от нашите MDR-AB изолати беше потърсена зависимост между фенотип и генотип, като резултатите са изложени в **Таблица 52.**

Таблица 52. 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)	$bap^+/ompA^+/epsA^+/csuE^+$	0.192 ± 0.042	4	0.192 ± 0.042
16 (18.2)	$bap^+/ompA^-/epsA^+/csuE^+$	0.184 ± 0.038	3	0.192 ± 0.036
8 (9.1)	$bap^+/ompA^+/epsA^-/csuE^+$	0.205 ± 0.043		
6 (6.8)	$bap^+/ompA^-/epsA^-/csuE^+$	0.320 ± 0.053	2	0.586 ± 0.084
6 (6.8)	$bap^+/ompA^-/epsA^+/csuE^-$	1.174 ± 0.158		
4 (4.5)	$bap^-/ompA^+/epsA^-/csuE^+$	0.108 ± 0.018		
6 (6.8)	$bap^-/ompA^-/epsA^-/csuE^-$	0.022 ± 0.005	0	0.022 ± 0.005

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

Прави впечатление, че преобладаващата част от изолатите (47.7%) притежават четирите БАГ (*bap*-*ompA*-*epsA*-*csuE*), като групата включва силни и умерени продуценти на биофилм. Подобна находка е открита при проучване на характеристиките на вирулентност на биофилм-образуващи MDR-AB от ICU пациенти с клинично манифестирани инфекции в Иран (Zeighami et al. 2019). От 100 изследвани изолата, 38 са носители на тези гени, в различни комбинации с допълнителни генетични детерминанти, въвлечени в образуване на биофилм от *A. baumannii* (*bfmS*, *kpsMT*, *ptk*, *pgaB* и bla_{PER-1}). Липсата на четирите БАГ (*bap*, *ompA*, *epsA* и *csuE*) в проучените от нас щамове се свързва с незначително количество до пълна липса на биофилм (средна OD_{570}=0.022 ± 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 *bap* (p = 0.2). Всички *bap*-положителни изолати (n = 78) бяха продуценти на биофилм (62 силни и 16 умерени). При преобладаващата част от *bap*-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 ± 0.021). В редица проучвания е открита корелация между наличие на *bap* и образуване на биофилм (Azizi et al. 2016; Bardbari et al. 2017; Sung 2018; Saadati et al. 2021). Например при изследване, фокусирано върху клинични *A. baumannii* от ICU пациенти в три болници в Иран (2015–2016), авторите намират значима корелация (p = 0.004) между носителство на *bap* (83.2%) и способност за образуване на биофилм (Bardbari et al. 2017). Тази закономерност е потвърдена по-късно от Saadati et al. при клинични MDR/XDR-AB изолати също от Иран. В групата на *bap*-положителните изолати (n = 84) 91.7% са

продуценти и 8.3% не образуват биофилм, докато при *bap*-отрицателните (n = 16) съотношението е 25% vs. 75% (p = 0.05) (Saadati et al. 2021).

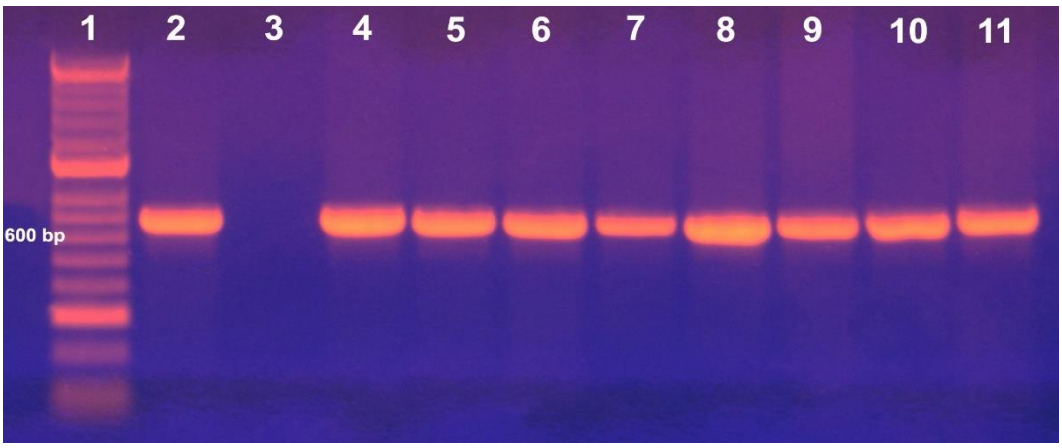
От **Таблица 52.** е видно също, че по-големият брой БАГ не корелира с по-голяма биомаса на биофилма върху полистиренова повърхност, като дори средната OD_{570} при изолати само с два от общо четирите гена е най-висока (0.586 ± 0.084). Откриването на изолати, които при липса на два БАГ са способни да 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.) (Upmanyu et al. 2022).

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

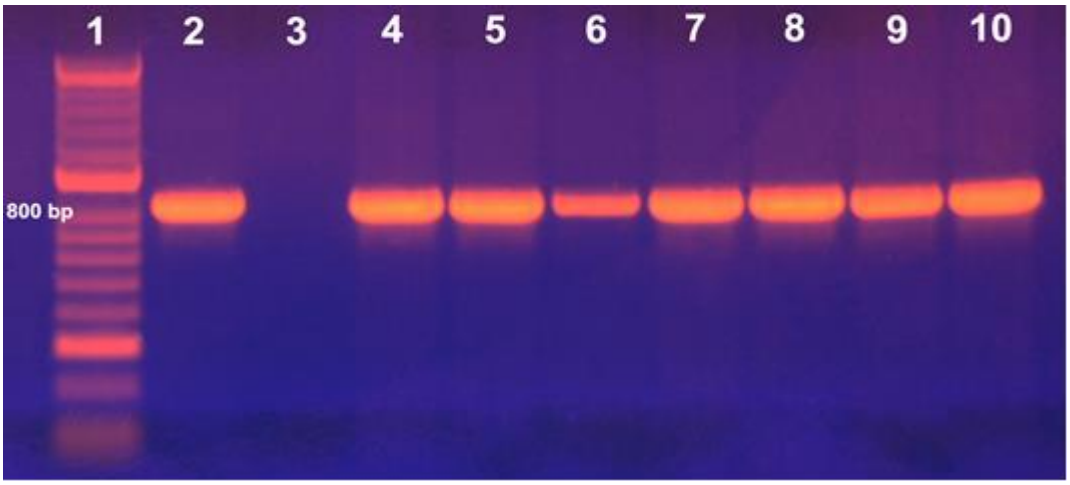
5.4.2.1. PCR скрининг за БАГ

Както беше описано в Раздел „Материали и методи“, молекулярно-генетичните проучвания бяха извършени върху три БАГ: *spgM* (кодиращ бифункционален ензим с фосфоглюкомутазна и фосфоманомутазна активност), *rmlA* (глюко-1-фосфат тимидилтрансфераза) и *rpfF* (синтаза за дифузионния сигнализиращ фактор (DSF), оперирщ като медиатор на междуклетъчната сигнализация). 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%. На **Фигури 55–57.** са показани дигитални изображения съответно на PCR-продукти на *spgM*, *rmlA* и *rpfF*.

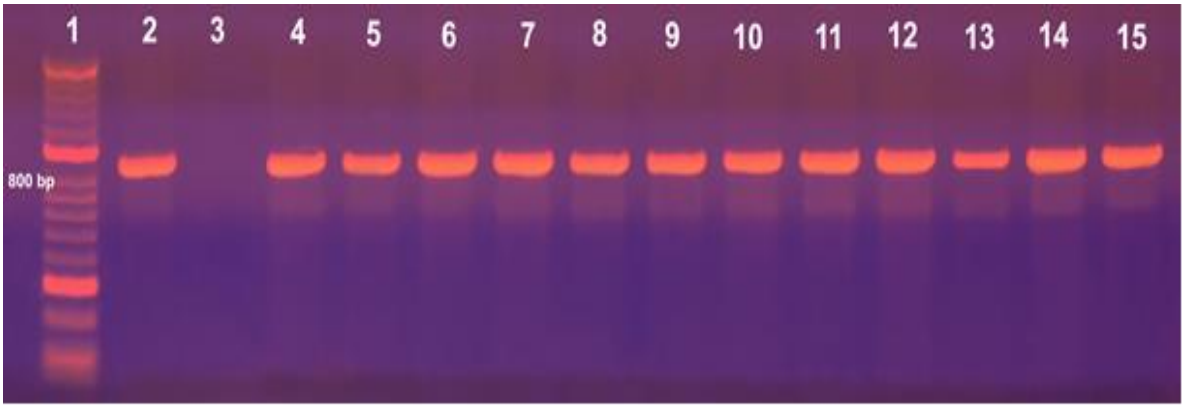
Щамовете *S. maltophilia*, използвани в настоящото проучване, бяха групирани в две категории: „*Клинични изолати от секрети и телесни течности*“ и „*Изолати от медицински устройства и болнична среда, намиращи се в контакт с абиотични повърхности*“. Сравнителната честота на разпространение на *spgM*, *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.



Фигура 55. Агарозна гел-електрофореза на **648-bp** PCR-продукти на ***spgM*** ген на *S. maltophilia*. Линия 1 – **HypperLadder 50 bp**; 2 – положителна контрола; 3 – отрицателна контрола; 4-11 – положителни PCR-продукти на клинични изолати *S. maltophilia*.



Фигура 56. Агарозна гел-електрофореза на **799-bp** PCR-продукти на ***rmlA*** ген на *S. maltophilia*. Линия 1 – **HypperLadder 50 bp**; 2 – положителна контрола; 3 – отрицателна контрола; 4-10 – положителни PCR-продукти на клинични изолати *S. maltophilia*.



Фигура 57. Агарозна гел-електрофореза на **835-bp** PCR-продукти на ***rpfF*** ген на *S. maltophilia.* Линия 1 – **HypperLadder 50 bp**; 2 – положителна контрола; 3 – отрицателна контрола; 4-15 – положителни PCR-продукти на клинични изолати *S. maltophilia*.

Продуцираните от *S. maltophilia* биофилми играят ключова роля в установяването на ИСМО, особено при употреба на медицински устройства, като VAP, ЦВК-свързани инфекции на кръвта, катетър-асоциирани UTIs и инфекции на хирургичната рана (Brooke 2021). Не е напълно изяснено дали съществуват вариациии във формирането на биофилм при клонално несвързани клинични изолати *S. maltophilia* и дали има някаква връзка между способност за образуване на биофилм и мутация или експресия на основните БАГ, като *spgM*, *rmlA* и *rpfF* (Zhuo et al. 2014).

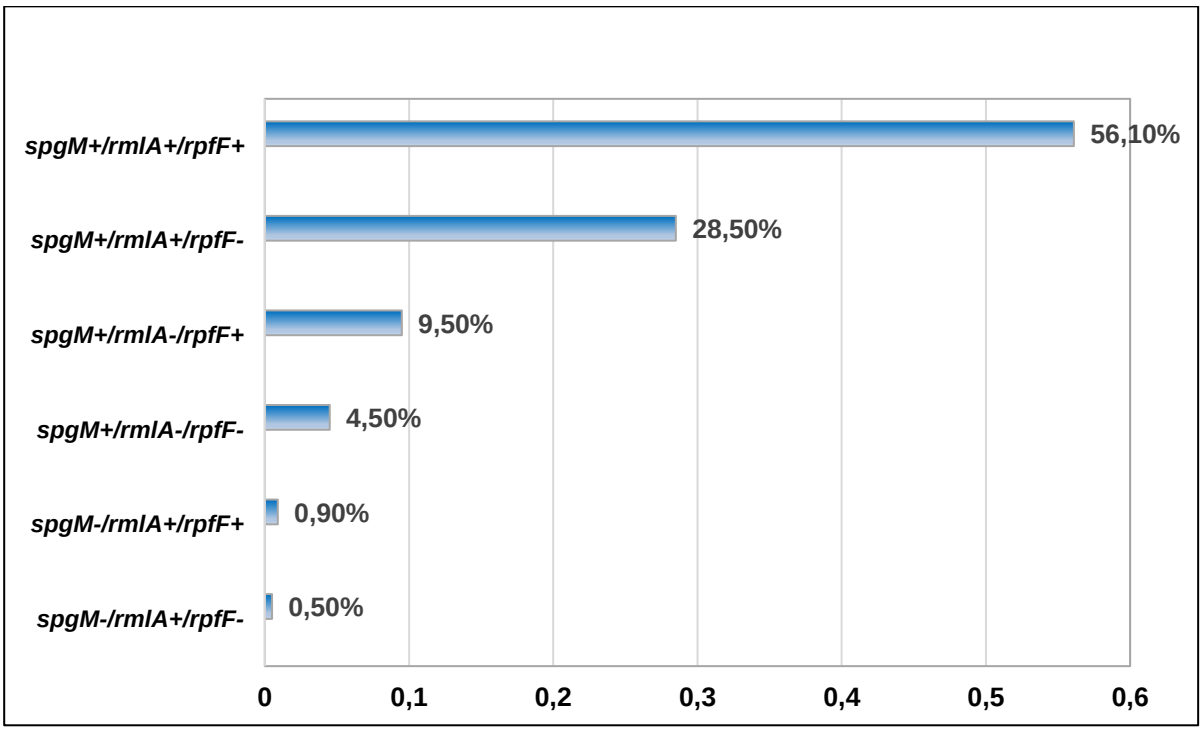
Генът *spgM* играе ключова роля във вирулентността и биофилм образуването при *S. maltophilia*. По-ранни изследвания съобщават следната честота на разпространение на този ген: 88.8% сред изолати от клинични източници и околна среда от Италия и Чехия (Pompilio et al. 2011), 83.3% сред респираторни *S. maltophilia* от Китай (2010–2011) (Zhuo et al. 2014) и 71.6% при щамове, изолирани предимно от деца с МВ и без МВ в Сърбия от 2013 до 2015 (Madi et al. 2016). Три по-нови проучвания върху продукцията на биофилм от клинични изолати *S. maltophilia* от няколко университетски болници в Иран докладват честота на *spgM* в диапазона от 97.3% до 100% (Bostanghadiri et al. 2019, 2021; Azimi et al. 2020), която кореспондира с отчетената от нас (98.6%).

Гените на ЛПЗ/ЕПЗ-свързания биосинтетичен път *rmlA*, *rmlC* и *xanB* са необходими за образуването на биофилм и подвижността чрез „трептене“ при *S. maltophilia* (Huang et al. 2006). Общата честота на *rmlA*, установена от нас (86%), съответства на тази в гореспоменатите по-ранни проучвания – 87.5%, докладвана от Zhuo et al. в Китай (Zhuo et al. 2014), и 88.41%-89.41%, отчетена от Bostanghadiri et al. в Иран (Bostanghadiri et al. 2019, 2021). Значително по-ниско разпространение на генетичната детерминанта е регистрирано от Pompilio et al. (65.2%, $p < 0.001$) (Pompilio et al. 2011), а по-високо – сред събрани клинични изолати *S. maltophilia* от педиатрична болница в Белград, Сърбия (97.7%, $p < 0.001$) (Madi et al. 2016).

Генът *rpfF* е част от клъстера *rpf* (от англ. регулиране на факторите на патогенност) и синтезът на DSF е напълно зависим от него (Huedo et al. 2015). Сигналната система *rpf*/DSF на *S. maltophilia* регулира положително образуването на биофилм, производството на извънклетъчни фактори на вирулентност и индукцията на L1/L2 β-лактамази (Alcaraz et al. 2019). Отчетената честота на *rpfF* сред нашите нозокомиални изолати *S. maltophilia* (66.5%) е по-висока от посочената в китайското проучване (Zhuo et al. 2014), много близка до регистрираната сред италианските (65.2%) и сръбските (70.4%) клинични изолати (Pompilio et al. 2011; Madi et al. 2016) и значително по-ниска от тази сред щамовете *S. maltophilia* от Иран (83.53%-84.71%, $p < 0.001$) (Bostanghadiri et al. 2019, 2021).

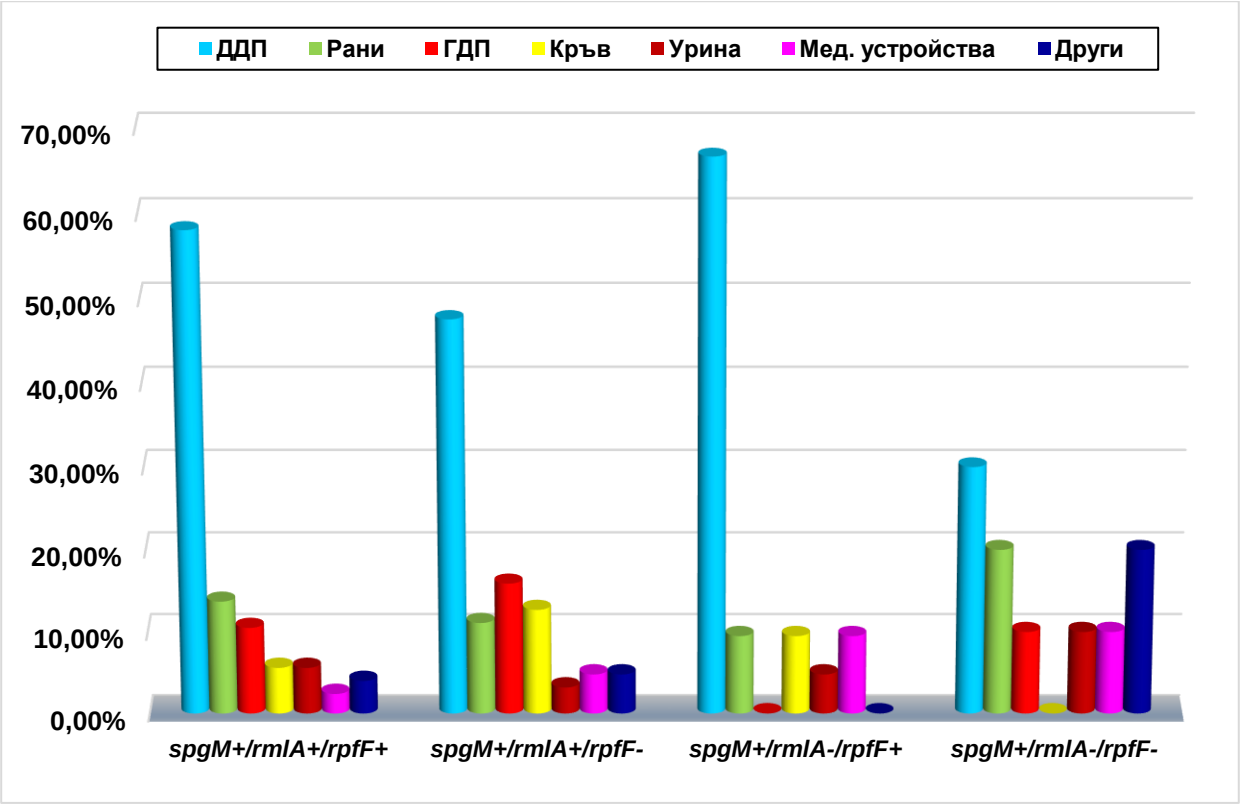
Необходими са данни и от други региони, както и от по-голям брой изследвани щамове, за да се провери възможността за вероятно географско разпределение на този ген.

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 58**). 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%).



Фигура 58. Процентно разпределение на генните профили от биофилм-асоциирани гени сред проучените изолати *S. maltophilia* (*n* = 221).

На **Фигура 59.** 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 59. 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.

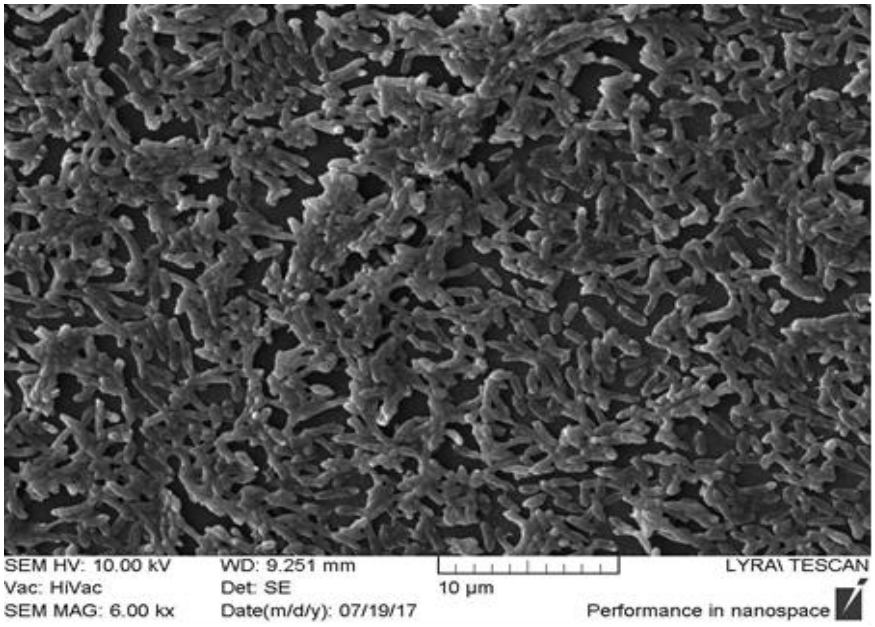
ДДП, долни дихателни пътища; ГДП, горни дихателни пътища.

В преобладаващата част от изследваните нозокомиални изолати *S. maltophilia* от български болници беше доказано наличието и на трите БАГ. 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). Нашето проучване включва три изолата от ДДП, получени от пациенти с МВ, в които бяха открити трите БАГ. 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).

5.4.2.2. Способност за образуване на биофилм върху полистиренова повърхност и връзка между генотипните и фенотипните характеристики на биофилма

Измереното количество на образуван биофилм от изследваните 92 нозокомиални щама *S. maltophilia*, изразено като стойност на оптична плътност при λ=550 nm (средна OD_{550} ± CO), вариране в широк диапазон (от 0.177 ± 0.024 до 2.065 ± 0.023). Усреднената стойност за цялата колекция беше OD_{550}=1.313 ± 0.090. Всички тествани щамове с изключение на един от ДДП (умерен продуцент) бяха определени като силни продуценти на биофилм с OD_{550} над 0.344 (98.9%). Резултатите за всеки от тестваните щамове бяха съотнесени към отрицателна контрола със стойност на оптичната плътност OD_{550} = 0.051 ± 0.008.

Образуваният 24-часов биофилм от избрани щамове *S. maltophilia* беше наблюдаван чрез СЕМ. Представената микрография при силния продуцент SM72 (**Фигура 60.**) 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 клъстери (микроколонии, типични за биофилма), които формират плътна мрежа.



Фигура 60. Сканираща електронна микроскопия, демонстрираща силен биофилм (OD_{550}=1.693 ± 0.170), формиран от щам *S. maltophilia* SM72, след 24-часова инкубация върху полистиренова повърхност.

Предишни проучвания също отчитат производство на биофилми от всички или повечето от тестваните изолати, но демонстрират по-висок относителен дял на слаби и умерени продуценти на биофилм, за разлика от нашите резултати (Pompilio et al. 2011, 2020a; Zhuo et al. 2014; Flores-Treviño et al. 2014; Bostanghadiri et al. 2019). В проучване на Flores-Treviño et al., обхващащо клинични *S. maltophilia* от Мексико (2006–2013 г.), изолатите са категоризирани като: слаби (47.9%), умерени (38.7%) и силни (13.4%) продуценти на биофилм (Flores-Treviño et al. 2014). В по-ново проучване, проведено в Иран, преобладаващата част от изследваните изолати *S. maltophilia* от периода 2018–2019 г. също са слаби и умерени продуценти на биофилм, съответно 28.23% и 37.65% (Bostanghadiri et al. 2021). За разлика от тях Gallo et al. докладват, че бразилските клинични изолати са слаби (3%), умерени (45%) или силни (48%) продуценти на биофилм (Gallo et al. 2016). Установеният от нас относителен дял на силните продуценти на биофилм е почти идентичен с отчетения (98.41%) в по-ранно проучване на клинични изолати *S. maltophilia* от пациенти, лекувани в университетска болница в Аржентина за 8-годишен период (2004–2012) (Alcaraz et al. 2018). Авторите свързват високия процент на тези щамове с изолирането им в случаи на инфекции, свързани с инвазивни медицински изделия, като бронхоскопи, интубационни тръби, катетри и дренажи (76.92%).

Количеството биофилм, образувано от изолатите от различни източници, както и връзката му с наблюдаваните генотипове, са представени подробно в **Таблица 53.** Като цяло не се наблюдават значителни разлики в количеството на биофилма по отношение на източника на изолиране (почти еднакви средни стойности на OD_{550} 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 малкия брой изолати от тези групи, съответно шест и три.

Фенотипните характеристики на биофилма, образуван от изолати *S. maltophilia* от пациенти с COVID-19 (n = 35) и с инфекции, различни от COVID-19 (n = 57), включваха близки средни стойности за количество върху абиотична повърхност (съответно 1.256 ± 0.028 и 1.348 ± и 1.348 ± 0.128), но по-широк диапазон в групата на non-COVID-19 изолати (0.177 – 2.065 спрямо 0.362 – 1.698).

Таблица 53. 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
spgM^{+}/*rmlA*$^{+}$/*rpfF*$^{+}$	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
spgM^{+}/*rmlA*$^{-}$/*rpfF*$^{+}$ [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
spgM^{+}/*rmlA*$^{+}$/*rpfF*$^{-}$ [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
spgM^{+}/*rmlA*$^{-}$/*rpfF*$^{-}$	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; OD_{550}, 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 ± 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 щамовете 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). Сред нашите щамове, изследвани за продукция на биофилм (98.9% силни продуценти), преобладаваха изолати от респираторни секрети, както и в цялото проучване.

Проспективно многоцентрово проучване на клинични изолати *S. maltophilia* от пет европейски държави (Италия, Сърбия, Чехия, Германия и Испания) открива, че изолатите от кръв показват най-висока способност за образуване на биофилм в сравнение с тези от други клинични източници (Pompilio et al. 2020a), което се потвърди и в нашата работа. Авторите съобщават, че фенотипът „силен продуцент“ е най-разпространен сред щамовете, изолирани от кръв (78.3%; p < 0.0001 спрямо другите групи). Също така те установяват, че щамовете, способни да образуват по-голямо количество биофилм, са значително по-разпространени сред придобитите в болница инфекции, отколкото сред придобитите в обществото (съответно 60.6 % спрямо 33.3 %; p < 0.05). В настоящото проучване всички тествани изолати са нозокомиални, включително тези от пациенти с COVID-19 (предимно получени от респираторни секрети), и както вече беше съобщено, не бяха открити значителни разлики в способността за образуване на биофилм между COVID-19 и non-COVID-19 изолати *S. maltophilia*. Понастоящем в литературата не съществуват

подобни сравнителни анализи. По-широкият диапазон на OD_{550}, установен в групата „изолати, които не от пациенти с COVID-19“, може да се дължи на по-голямото разнообразие на местата на изолиране и свързаните с това различия между отделните щамове в ефективността на образуване на биофилм (Pompilio et al. 2020a).

5.4.2.3. 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 54**). 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 анализираните 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.

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 54**). 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 кодираният от *rmlA* ензим е необходим за образуването на О-антиген, който благоприятства колонизацията на тези хабитати.

Таблица 54. "Missense" мутации, идентифицирани в биофилм-асоциираните гени на избрани изолати *S. maltophilia*, подложени на целогеномно секвениране.

Изолат	Ген (CDS)			
	Консервативни мутации	**Неконсервативни мутации**	**Идентичност (%)**	**Сходства (%)**
		***rmlA* (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
		***rpfF* (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
		***spgM* (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	95	96
SM64		pT671A	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

CDS, кодираща последователност.

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).

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 кодираният 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).

Генът *spgM* беше най-често идентифицираният БАГ по време на нашия PCR скрининг (98.6%). По-висока честота на откриване е отчетена в скорошно проучване, в което се посочва наличието на *spgM* в 100% от изследваните изолати и че всички те са имали способността да образуват биофилм (Bostanghadiri et al. 2021). Анализът на деветте сглобени генома в настоящия труд показа, 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.

5.5. Епидемиологично типизиране на проучените терапевтично проблемни НФГБ изолати

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

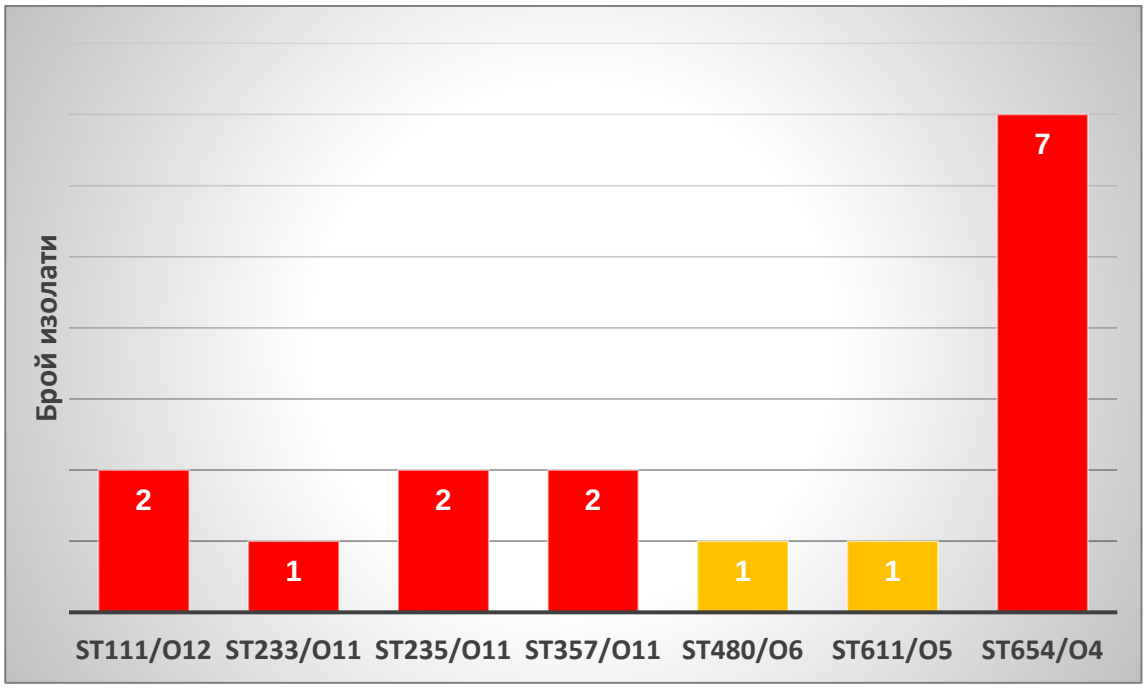
5.5.1.1. MLST анализ на CRPA изолати, базиран на WGS

MLST анализът при шестнадесетте избрани CRPA изолата, подложени на WGS (11 MBL+ и 5 MBL−, от които 15 нозокомиални и 1 от амбулаторен пациент), показа групиране в общо 7 секвенционни типа (STs), както следва: ST111, ST233, ST235, ST357, ST480, ST611 и ST654. С изключение на ST480 (изолат Pae48 от храчка на пациент с МВ) и ST611 (Pae57, $bla_{\text{NDM-1}}$-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 55.** 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 61.**

Таблица 55. 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
			acsA	*aroE*	*guaA*	*mutL*	*nuoD*	*ppsA*	*trpE*	
Pae41	VIM-4	ExoS+	16	5	30	11	4	31	41	233
Pae48	He	ExoS+	11	5	11	3	1	6	27	480
Pae49	VIM-2	ExoS+	17	5	5	4	4	4	3	111
Pae50	VIM-2	ExoS+	17	5	5	4	4	4	3	111
Pae51	He	ExoU+	2	4	5	3	1	6	11	357
Pae52	He	ExoU+	2	4	5	3	1	6	11	357
Pae53	He	ExoU+	38	11	3	13	1	2	4	235
Pae55	NDM-1	ExoS+	17	5	26	3	4	4	26	654
Pae57	NDM-1	ExoS+	17	5	12	98	4	14	10	611
Pae58	NDM-1	ExoS+	17	5	26	3	4	4	26	654
Pae59	NDM-1	ExoS+	17	5	26	3	4	4	26	654
Pae60	NDM-1	ExoS+	17	5	26	3	4	4	26	654
Pae61	NDM-1	ExoS+	17	5	26	3	4	4	26	654
Pae62	NDM-1	ExoS+	17	5	26	3	4	4	26	654
Pae67	NDM-1	ExoS+	17	5	26	3	4	4	26	654
Pae68	He	ExoU+	38	11	3	13	1	2	4	235

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



Фигура 61. Идентифицирани секвенционни типове и свързани с тях О-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 $bla_{\text{NDM-1}}$-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 $bla_{\text{NDM-1}}$ гени (от Кюстендил и Бургас), а 1 – на $bla_{\text{VIM-2}}$ (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). В скорошно проучване се съобщава за откриването на XDR-PA изолат (означен като P-469) от бронхиален лаваж, копродуциращ NDM-1 и VIM-80 MBLs, в Чили (Opazo-Capurro et al. 2022). Заслужава да се спомене принадлежността на P-469 към ST654, серотип O4 и $exoS^{+}$ генотип подобно на седемте NDM-1-продуциращи изолата (Pae55, Pae58, Pae59, Pae60, Pae62 и Pae67 – **Таблица 55., Фигура 61.**) от ST654 в настоящата работа.

Двата VIM-2-положителни изолата в нашето проучване (Pae49 и Pae50) са първите докладвани български изолати с идентифициран $bla_{\text{VIM-2}}$ (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 различини 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).

Изолатът Pae41 от ST233 беше определен като носител на $bla_{\text{VIM-4}}$. Последните данни на ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group сочат, че ST233 и ST235 (Pae53 и Pae68 от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София) са единствените от десетте глобални високорискови клона, които са открити във всички континенти (Oliver et al. 2024). Двата изолата от ST235 бяха класифицирани в серотип O11 и притежаваха характерния за този високорисков клон *exoU*$^{+}$ генотип (del Barrio-Tofiño et al. 2020). Клонът ST235 се характеризира с висока вирулентност *in vitro* и *in vivo*, която поне отчасти се дължи на мощния ExoU цитотоксин, „инжектиран“ в клетките на гостоприемника чрез T3SS. Нещо повече, доказано е, че *exoU*$^{+}$ генотипът и ST235 се асоциират с по-висока смъртност при инфекции на кръвта, причинени от *P. aeruginosa* (Recio et al. 2018; del Barrio-Tofiño et al. 2020). Въпреки че в световен мащаб високорисковият клон ST235 се свързва с производството на разнообразни β-лактамази, в това число карбапенемази от класове B и A (Oliver et al. 2024), нашите изолати бяха CRPA с XDR профил, чувствителни единствено на COL и CFDC, в чиийто геноми не бяха идентифицирани такива AMR детерминанти. Подобна находка е констатирана в проучването на геномните характеристики на клинични CRPA от цялата страна от периода 2010–2023 г., в което ST235 е определен като най-честият ST (40.7%), но само един от изолатите е доказан продуцент на карбапенемаза (VIM-1) (Стойков 2023). Това дава основание да се счита, че българските изолати *P. aeruginosa* от ST235 се отличават с XDR, но в механизмите на резистентност към карбапенеми рядко са въвлечени карбапенемази, в т.ч. MBLs.

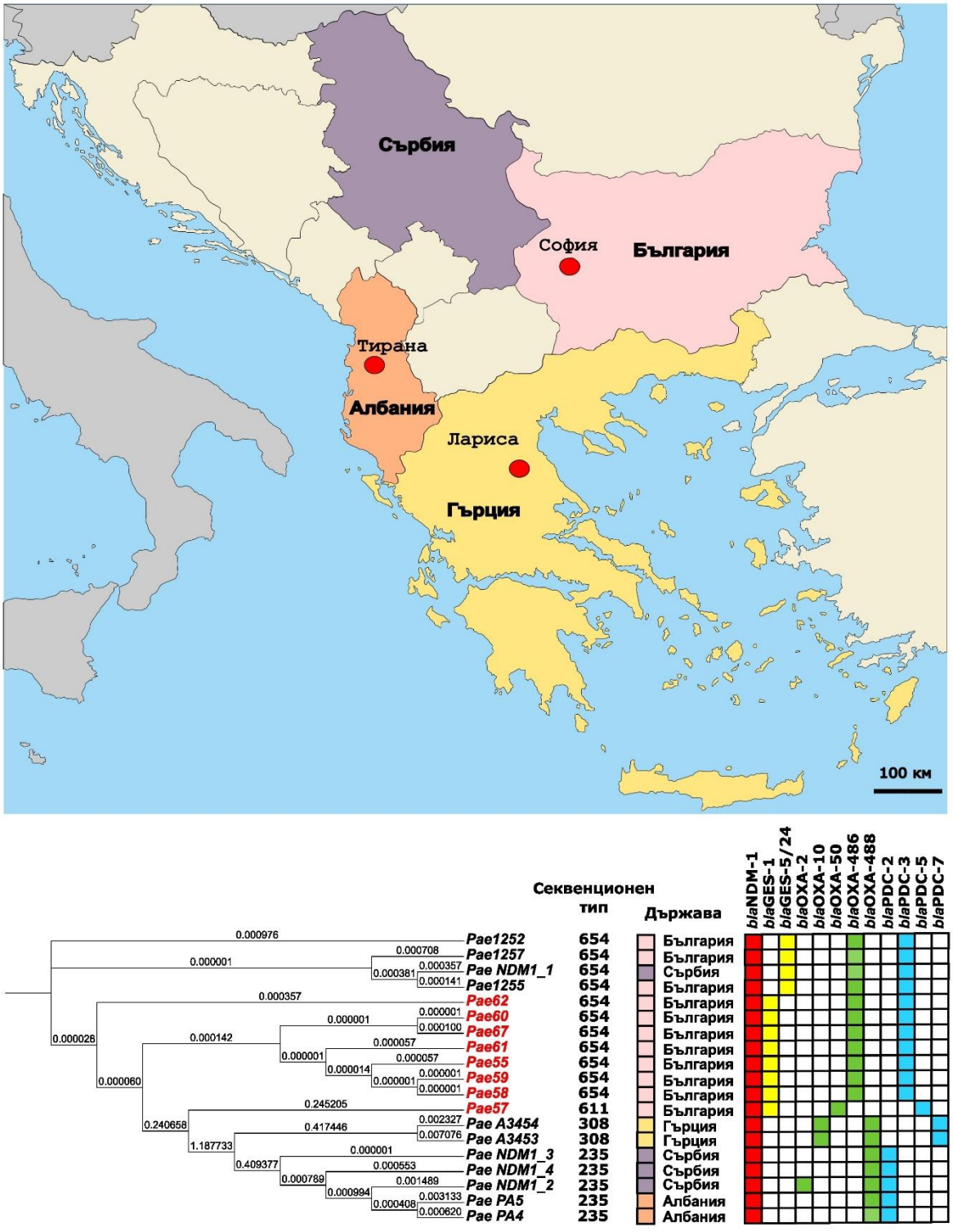
Двата CRPA от високорисковия ST357 (Pae51 и Pae52) също бяха изолирани от ICU пациенти, лекувани в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Подобно на изолатите от ST235, в техните геноми не бяха идентифицирани детерминанти за MBLs и карбапенемази от молекулярен клас A, но бяха открити *exoU* гени. Беше потвърдена типичната принадлежност на изолатите *P. aeruginosa* от този секвенционен тип към серотип O11 (Oliver et al. 2024). В гореспоменатото проучване на Стойков само 4 от общо 91 MDR/XDR-PA изолата (4.4%), подложени на MLST и cgMLST анализ, са определени като членове на високорисковия ST357 (Стойков 2023).

5.5.1.2. 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*$_{\text{NDM-1}}$-положителни CRPA изолати от Балканите (2018–2021), описани в научни публикации и с депозирани геноми в свободно достъпните бази данни. Към 01.04.2024 г. бяха открити общо 11 такива генома, както следва: 2 на изолати от Албания, 3 от България, 2 от Гърция и 4 от Сърбия (**Таблица 27.** в раздел „Материали и методи“). Генерираното филогенетично дърво е представено на **Фигура 62.**

Както е видно от фигурата, 57.9 % (11 от 19) от съдържащите *bla*$_{\text{NDM-1}}$ 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*$_{\text{NDM-1}}$, всички изолати от доминиращия ST654 съдържат AMR детерминанти *bla*$_{\text{GES-1/5}}$, *bla*$_{\text{PDC-3}}$ и *bla*$_{\text{OXA-486}}$. Нашият *P. aeruginosa* Pae57 е единственият изолат, който не е част от циркулиращите глобални високорискови клонове *P. aeruginosa* (ST611). Pae57 показа 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. Най-сходни с групата са щамове *P. aeruginosa* ST654 Pae1255 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 показа, 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 Pae1255 (август 2018), а най-късно Pae67 (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*$_{\text{NDM-1}}$-положителни клинични изолати *P. aeruginosa*. Генетичното обкръжение и локализацията на *bla*$_{\text{NDM-1}}$ гена в идентифицираните в настоящата работа CRPA ST654 изолати от УМБАЛ „Лозенец“ беше детайлно описано в **т. 5.2.1.2.**



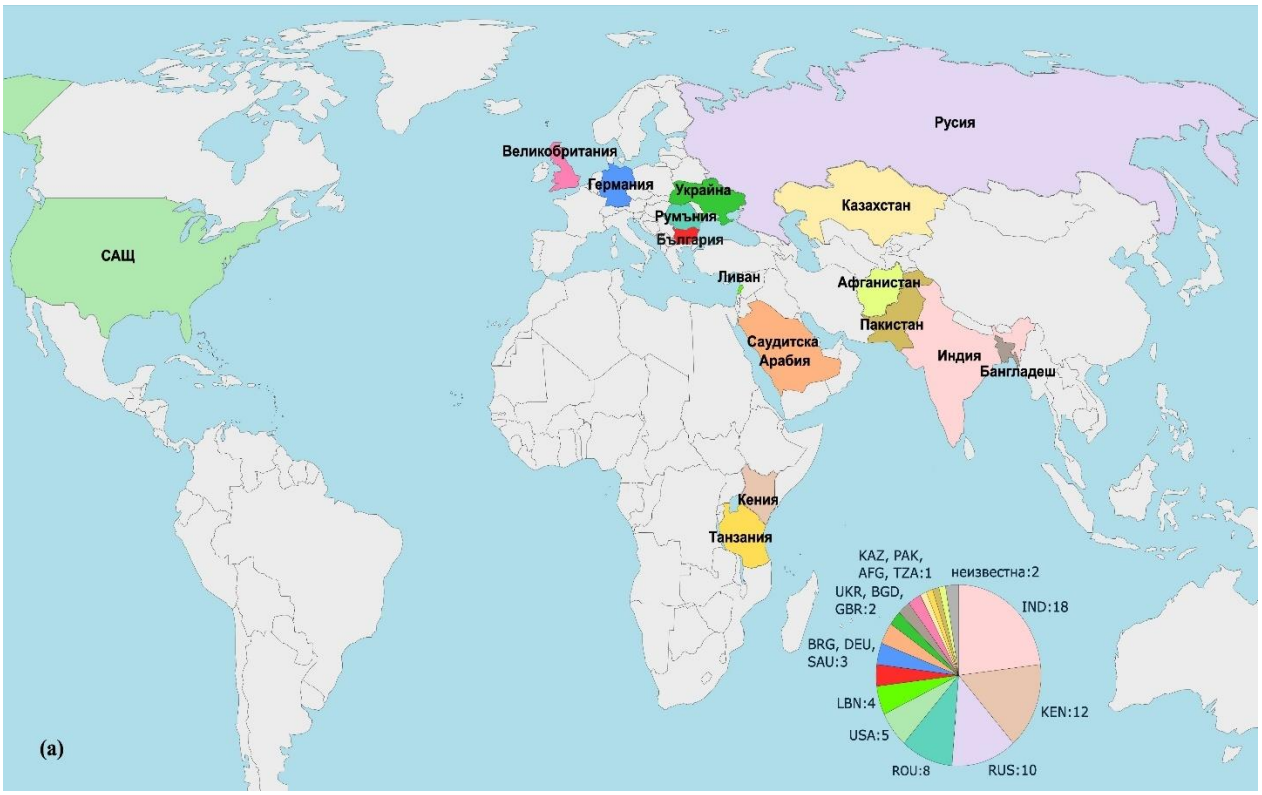
Фигура 62. Филогенетично дърво, конструирано чрез извикване на SNPs от подравняване на коровите гени на 19 *bla*$_{\text{NDM-1}}$-положителни клинични изолата *P. aeruginosa* от Балканите. Номерата на изолатите от настоящото проучване са в червен цвят. Представена е и матрица за присъствие / отсъствие на гени, кодиращи β-лактамази от молекулярни класове A, B, C и D.

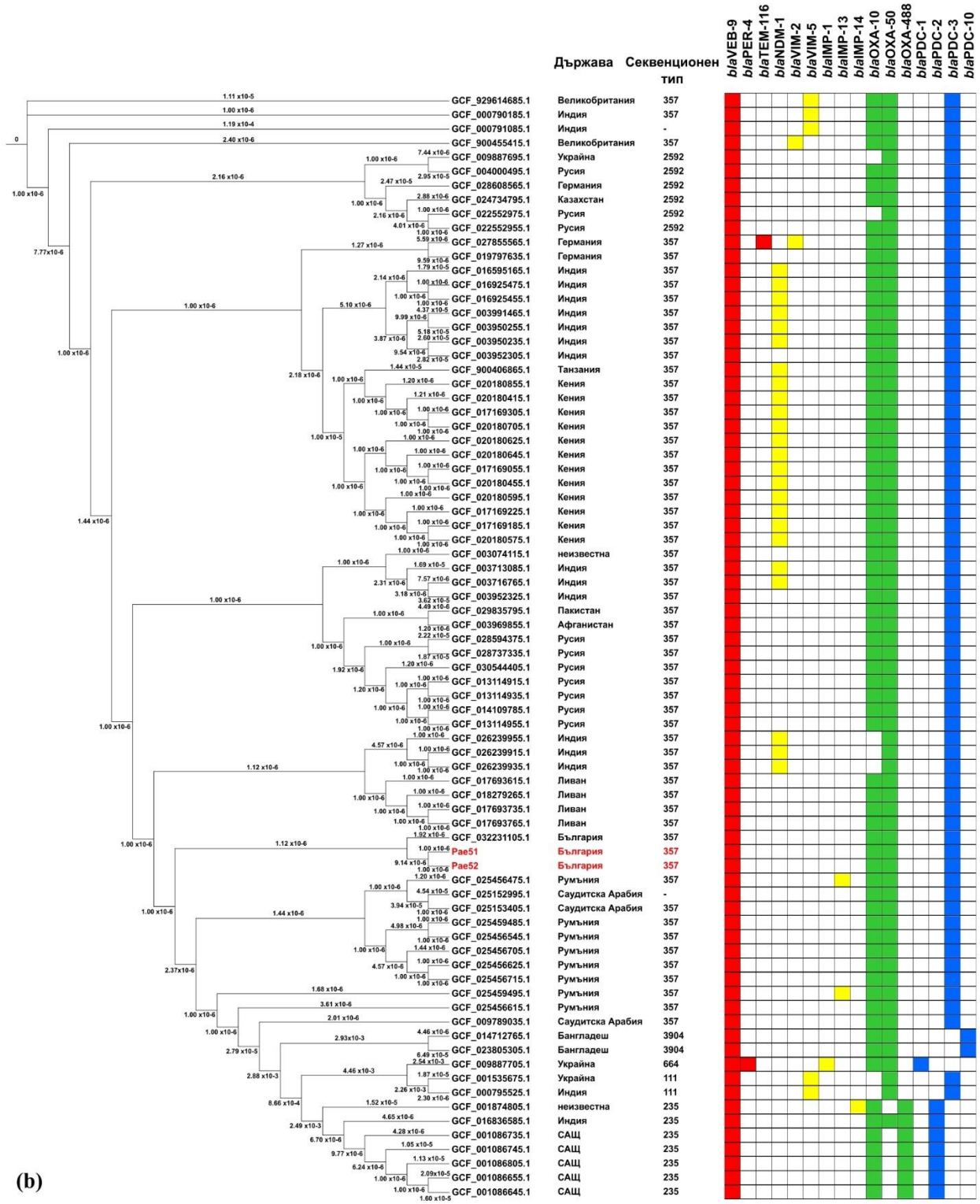
***Забележка*:** В литературния източник не е налична информация за точния географски произход (населено място) на изолати от NDM1_1 до NDM1_4 от Сърбия (Kabic et al. 2023).

5.5.1.3. Филогеномен анализ на VEB-9-продуциращи XDR-PA изолати

Филогеномният анализ, базиран на корови гени в пангенома на *P. aeruginosa*, включи откритите два VEB-9-продуциращи CRPA изолата с XDR профил от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (2020 г.) и всички *bla*$_{\text{VEB-9}}$-положителни изолати *P. aeruginosa* с депозирани пълни геноми в свободнодостъпните бази данни, отговарящи на критериите, изложени в **т. 4.8.4.1.** от раздел „Материали и методи“. Към дата 01.07.2024 г. техният брой беше 76. По този начин проведеният филогеномен анализ включи общо 78 клинични изолата *P. aeruginosa* от целия свят. Техният географски произход е показан на **Фигура 63 (a).** Построеното филогенетично дърво, базирано на секвенционните варианти от подравняване на коровите гени, е изобразено на **Фигура 63 (b).**

Изолатите от настоящия труд, обозначени като Pae51 и Pae52 (в червено), са изключително сходни и се различават един от друг само с 4 SNPs в коровите геномни области. Най-близкият до тях геном е GCF_032231105.1 (48 SNPs разлика), който принадлежи на клиничен изолат *P. aeruginosa* Pae3125 от гр. Варна (България). Този щам е бил подложен на WGS, но нашето внимателно търсене не откри публикувани резултати за неговия геном в литературата.





Фигура 63. Филогеномен анализ на *bla*$_{\text{VEB-9}}$-положителни щамове *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*$_{\text{VEB-9}}$-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 A, B, C и D.

Както е показано на фигурата, 74.4 % (58/78) от съдържащите *bla*$_{\text{VEB-9}}$ 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 63 (b).** са изброени и всички гени, кодиращи β-лактамази от молекулярни класове A, B, C 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*$_{\text{VEB-9}}$, 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*$_{\text{NDM-1}}$, кодиращи NDM-1 MBL. Видно е, че всички *bla*$_{\text{VEB-9}}$- и *bla*$_{\text{NDM-1}}$-съдържащи изолати *P. aeruginosa* са част от ST357 (CC357) и произхождат от държави с нисък индекс на човешко развитие, като Индия, Кения и Танзания. Комбинацията от VEB-9 ESBL от клас A и NDM-1 MBL от клас B осигурява резистентност към всички β-лактами, включително тези в комбинация с BLIs, което значително ограничава наличните възможности за лечение (Ferous et al. 2024).

Другите STs бяха представени от единични *bla*$_{\text{VEB-9}}$-положителни изолати *P. aeruginosa*, включени във филогеномния анализ. Въпреки това ST2592 (n = 6) заслужава внимание поради присъствието си в широк географски регион, включващ Русия, Украйна, Германия и Казахстан. Продължаващият военен конфликт между Русия и Украйна потенциално би могъл да улесни бързото разпространение на продуциращите VEB-9 изолати *P. aeruginosa* от ST2592. Управлението на този риск изисква повишени мерки за контрол на инфекциите и надзор на AMR в съответните държави.

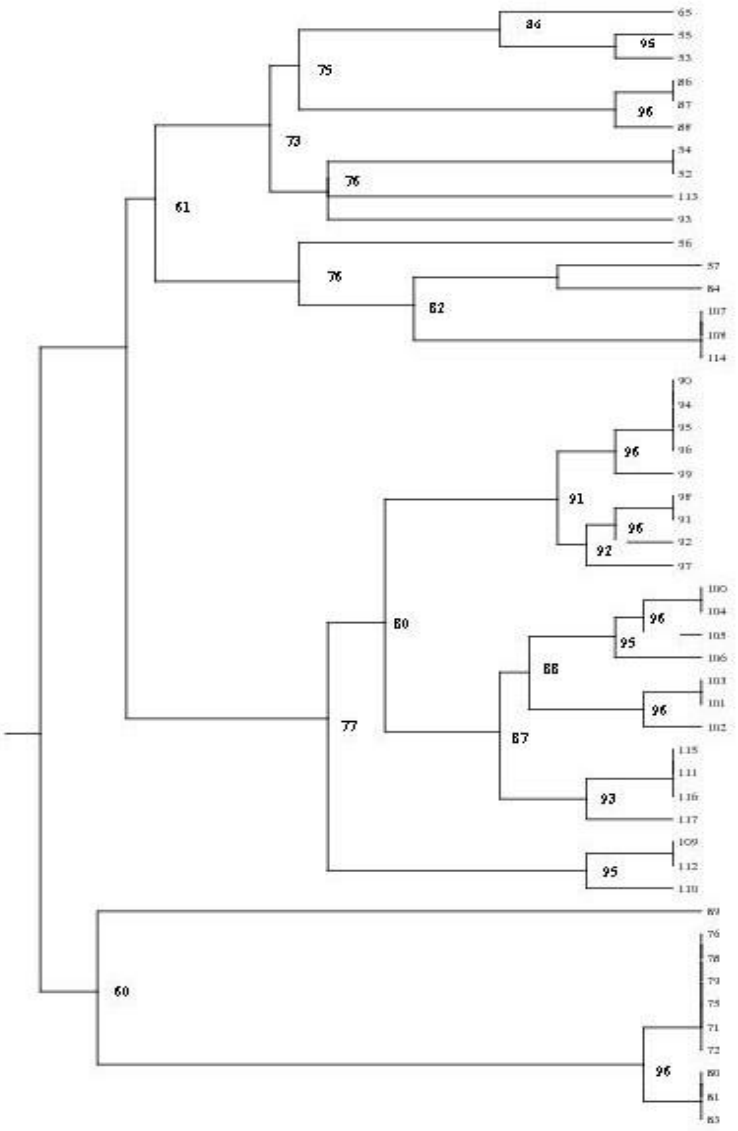
5.5.2. Епидемиологично типизиране на карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii*

5.5.2.1. Епидемиологично типизиране посредством RAPD-PCR

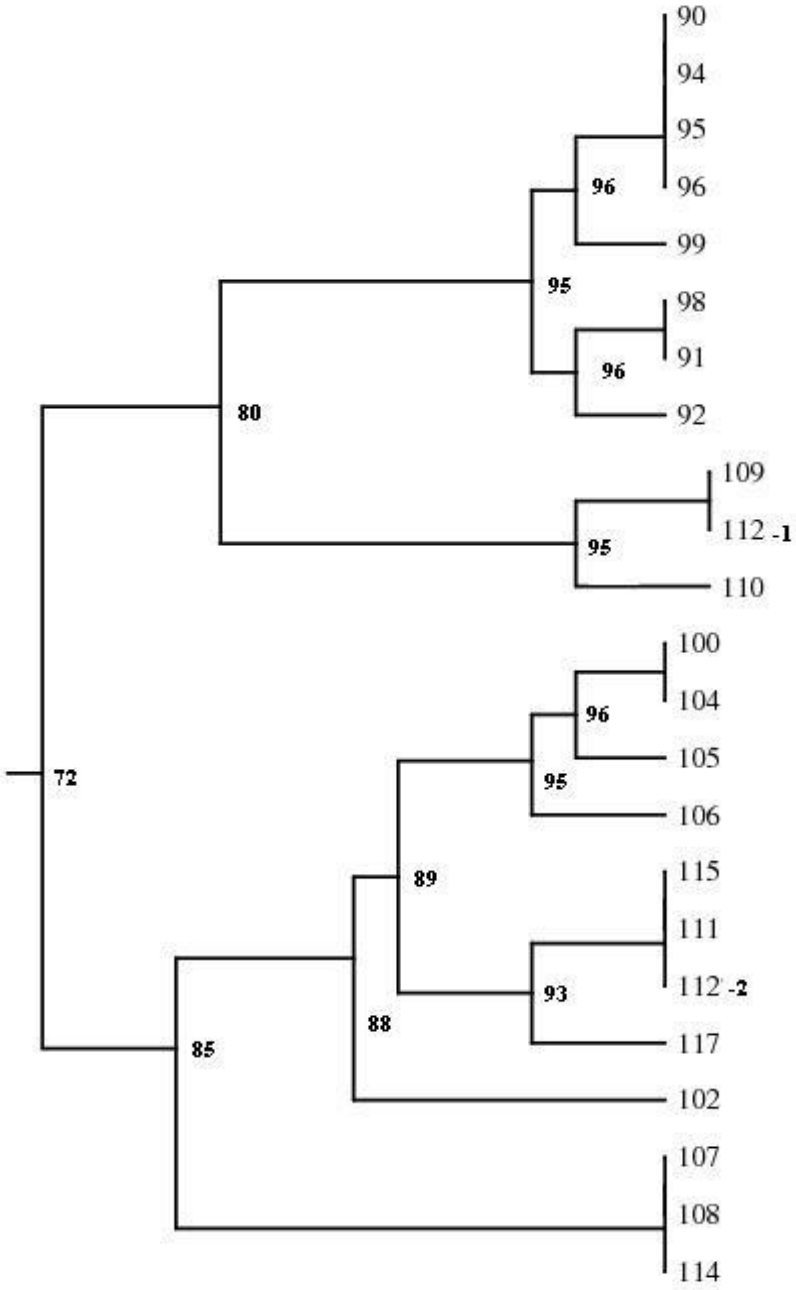
Епидемиологично типизиране на MDR-AB изолати от УМБАЛ „Александровска“ от периода 2005–2011 г.

В хода на изследване на 70 MDR-AB, получени от пациенти на четири ICUs в периода 2005–2011 г., бяха идентифицирани 49 CRAB изолата (70%). Освен това бяха открити 23 изолата (32.9%), демонстриращи високо ниво на резистентност (>256 mg/L) към аминогликозидите с клинично приложение (AMK, GEN и TOB). Във всички CRAB

изолати *A. baumannii* бяха доказани $bla_{\text{OXA-23}}$, а в тези с високо ниво на устойчивост към аминогликозиди – съответно *armA* гени, като резултатите са подробно изложени в **т. 5.2.2.1.** Двете групи с терапевтично проблемни изолати *A. baumannii* 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 64.** и **65.**



Фигура 64. Дендрограма, илюстрираща връзката между OXA-23-продуциращи карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* (*n* = 49) от клиники за интензивни грижи на УМБАЛ „Александровска“ (2005–2011), базирана на коефициент на сходство (Dice) между получените RAPD-профили (представен като процент).



Фигура 65. Дендрограма, илюстрираща връзката между ArmA-продуциращи изолати *A. baumannii* с високо ниво на резистентност към аминогликозиди (*n* = 23) от клиники за интензивни грижи на УМБАЛ „Александровска“ (2010–2011), базирана на коефициент на сходство (Dice) между получените RAPD-профили (представен като процент).

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

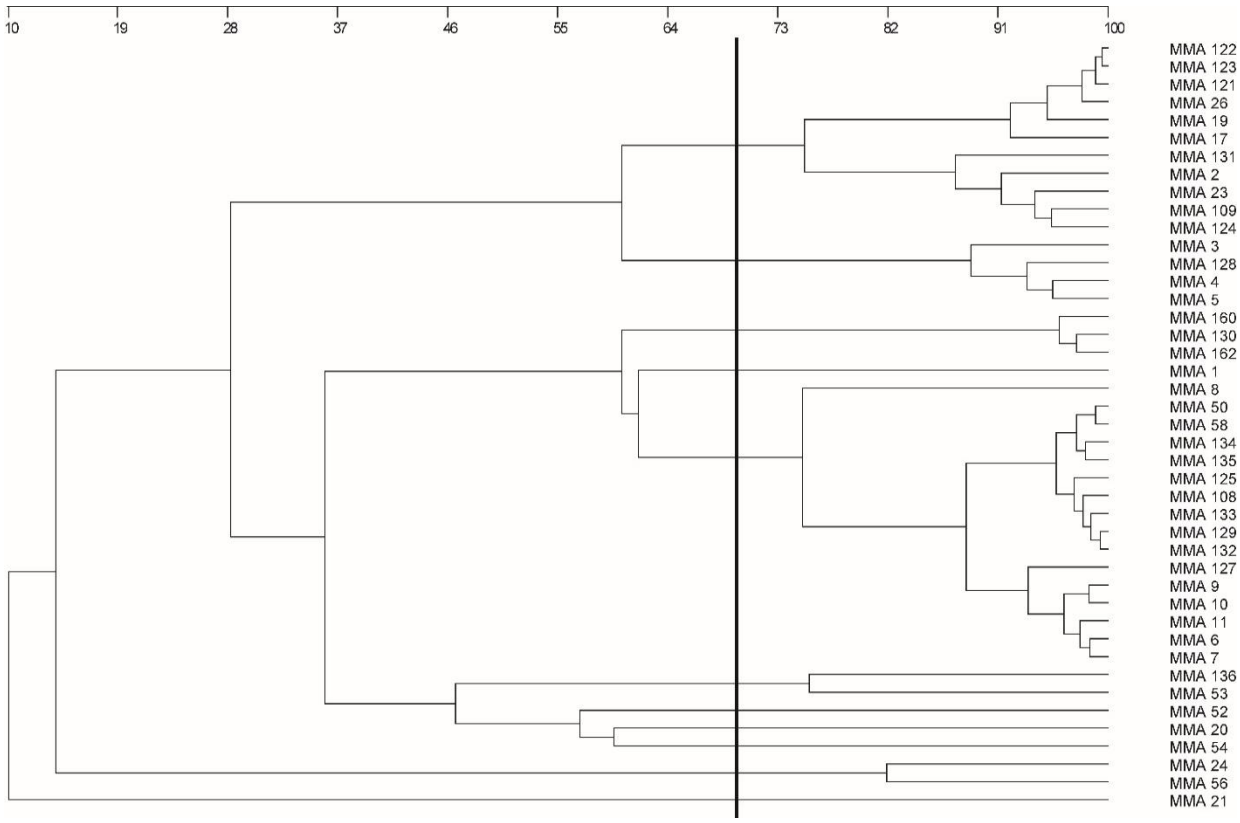
три ендемични клона в болницата, включващи OXA-23 продуциращи *A. baumannii*, в периода 2005–2011 г. Само един от изследваните изолати генерира уникален RAPD-профил и липса на клъстерна принадлежност. Беше доказана висока степен на клонално сходство (72%) между всички ArmA-продуциращи изолати (n = 23), които обособиха две основни CGs. Първата включи 11 изолата (80% сходство), а втората останалите 12 (85%), както е видно от **Фигура 65.**

Епидемиологично типизиране на CRAB изолати от университетски болници в България от периода 2014–2016 г.

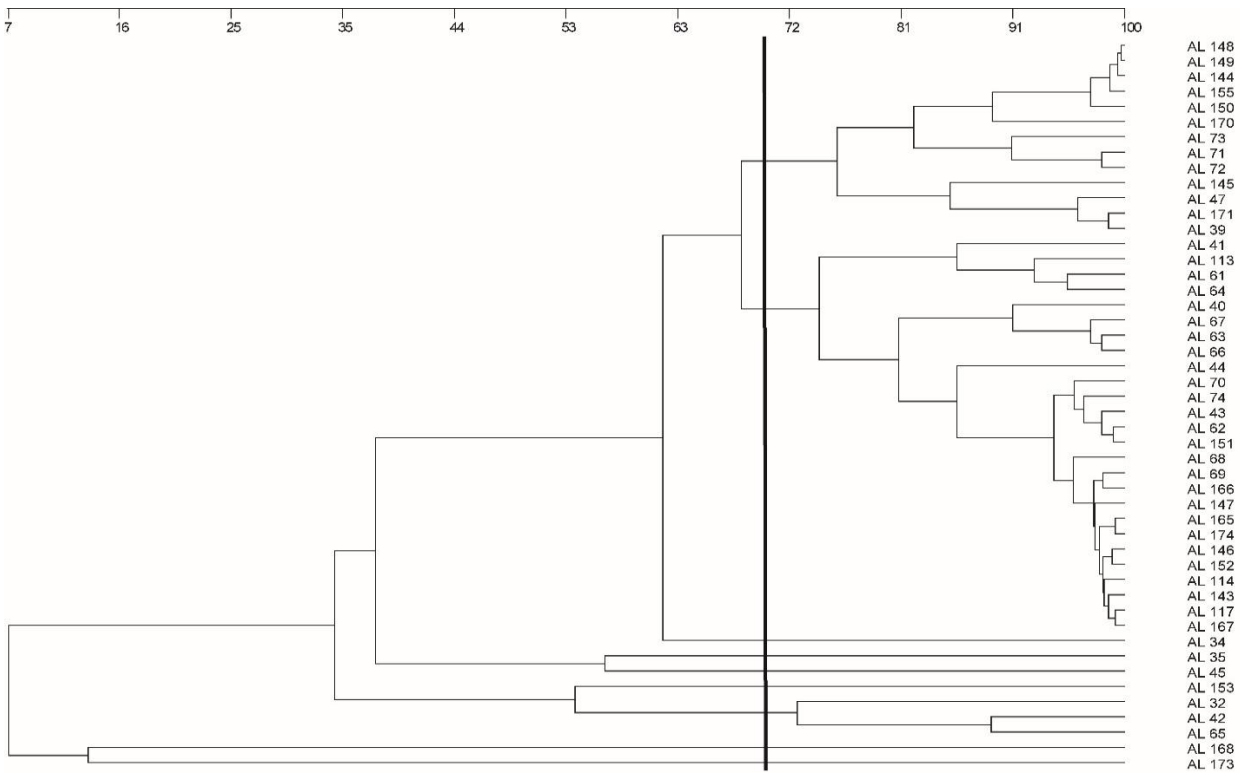
Епидемиологично типизиране на избрани CRAB изолати от различни клиники на четири университетски болници (43, 48, 45 и 27 – съотв. от Военномедицинска академия (ВМА), УМБАЛ „Александровска“, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна и УМБАЛ „Св. Иван Рилски“) беше извършено чрез RAPD-PCR с праймер M13 (5′-GAGGGTGGCGGTTCT-3′) и подложено на UPGMA биоинформатичен анализ. Критериите за избор на щамове включваха: различни отделения/клиники в съответната болница, различни клинични материали и различна година на изолиране.

Дендрограмите, илюстриращи клоналната връзка между отделните щамове в четирите болници, базирани на коефициент на сходство (S_{AB}), или коефициент на Dice, са представени на **Фигури 66.-69.** Следва да се отбележи използването на най-често прилагания критерий за клонална свързаност на типизирани изолати, S_{AB} ≥70% (Grundmann et al. 1997). Дигиталните изображения на генерираните RAPD-профили са показани на **Фигура 70. Таблица 56.** обобщава разпределението на CRAB по клъстерни групи и представя кратки епидемиологични и молекулярно-генетични характеристики (придобити CHDLs) на изолатите.

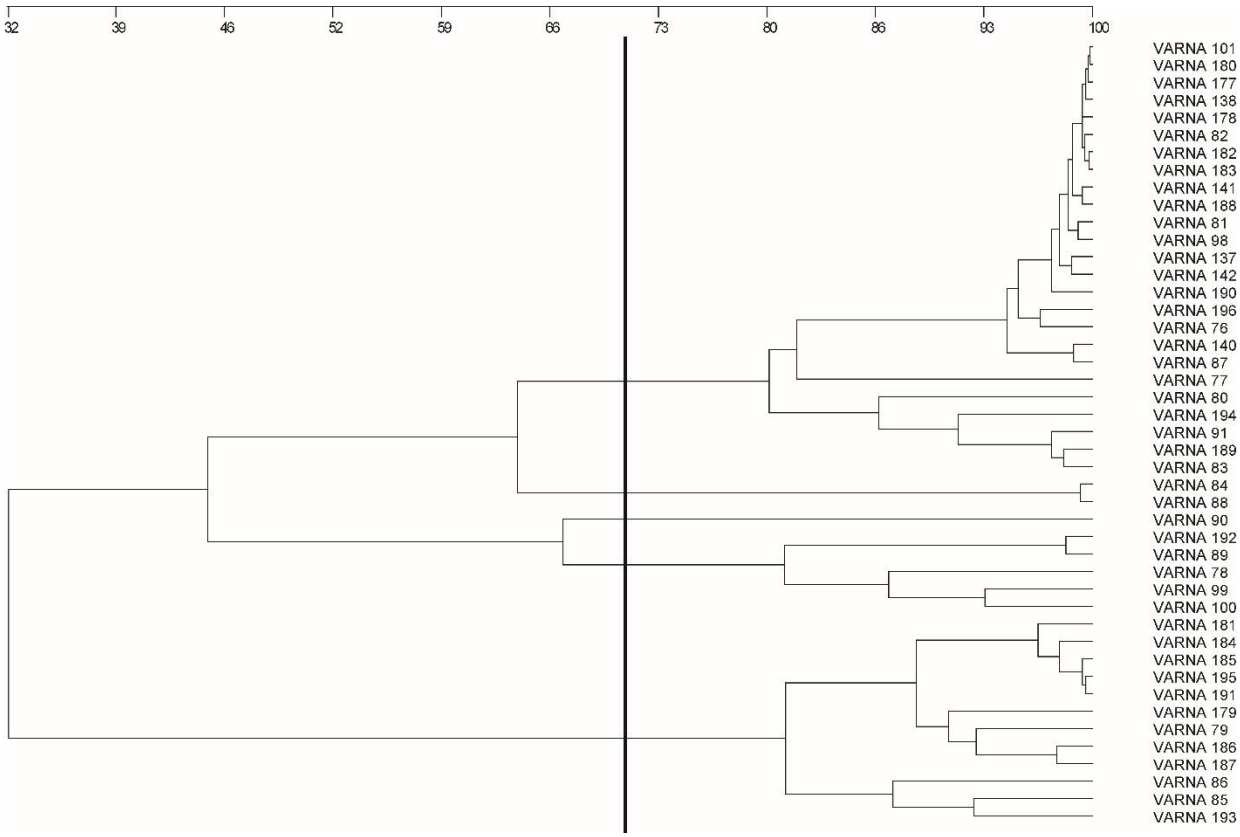
Клъстерният анализ показа групиране на преобладаващата част CRAB изолати в малък брой клъстерни групи (CGs) и единични изолати, които генерираха уникални RAPD-профили и не попаднаха в образуваните групи. Както е видно от **Таблица 56.**, повечето CGs в четирите мониторирани болници включваха CRAB изолати 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.



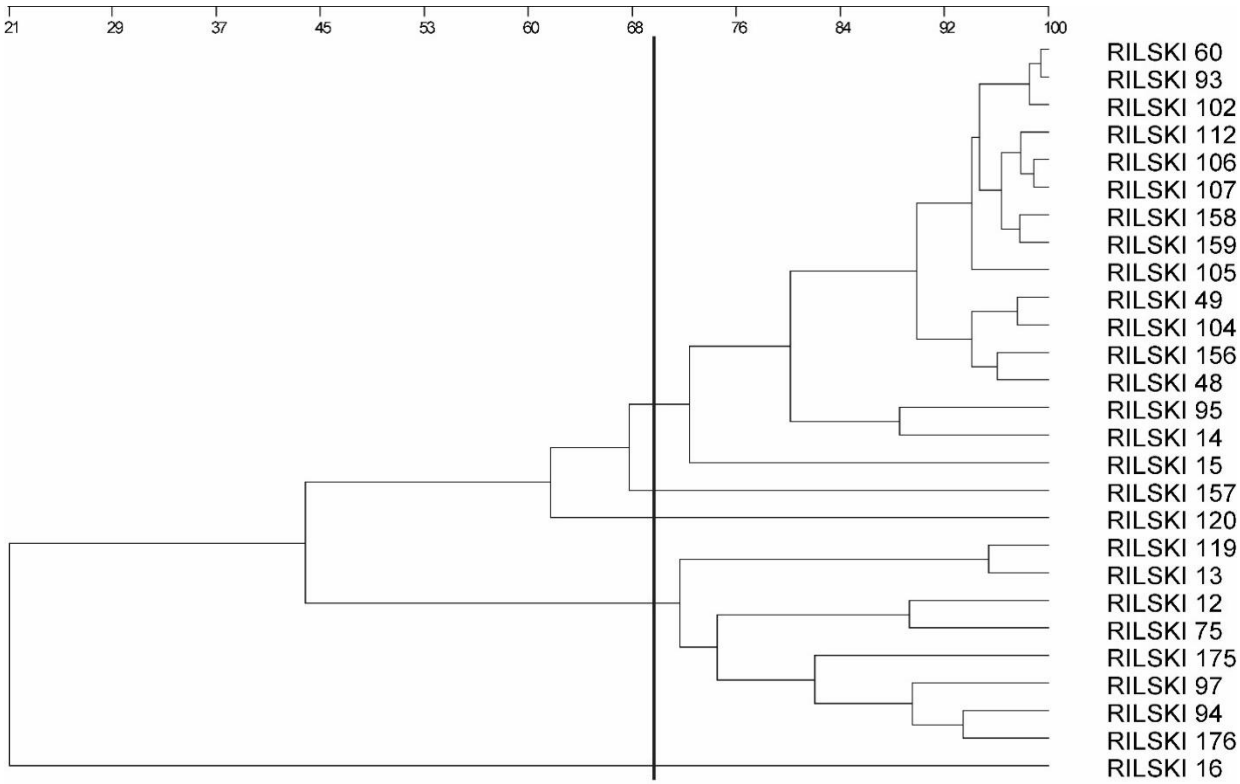
Фигура 66. Дендрограма, илюстрираща връзката между 43 нозокомиални изолата *A. baumannii* от Военномедицинска академия (2014–2016 г.), базирана на коефициента на Dice.



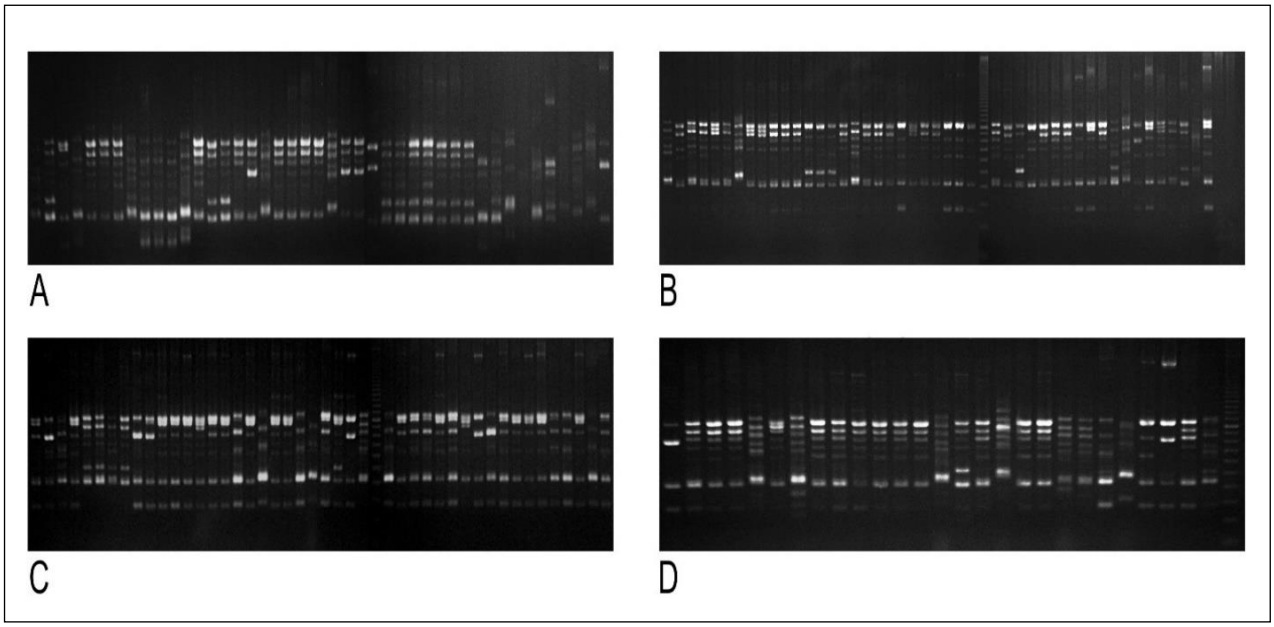
Фигура 67. Дендрограма, илюстрираща връзката между 48 нозокомиални изолата *A. baumannii* от УМБАЛ „Александровска“ (2014–2016 г.), базирана на коефициента на Dice.



Фигура 68. Дендрограма, илюстрираща връзката между 45 нозокомиални изолата *A. baumannii* от УМБАЛ „Св. Марина“ (2014–2016 г.), базирана на коефициента на Dice.



Фигура 69. Дендрограма, илюстрираща връзката между 27 нозокомиални изолата *A. baumannii* от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (2014–2016 г.), базирана на коефициента на Dice.



Фигура 70. RAPR-профили на типизираните нозокомиални изолати *A. baumannii*, генерирани с M13 праймер (агарозна гел-електрофореза): A. Военномедицинска академия, B. УМБАЛ „Александровска“, C. УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, D. УМБАЛ „Св. Иван Рилски“.

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 щамовете), 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 щама 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. Както е видно от **Фигура 67.**, 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 персистиране 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.

Таблица 56. Групиране на изолатите *A. baumannii* в клъстери от клонално свързани щамове, обособени при праг на сходство 70%.

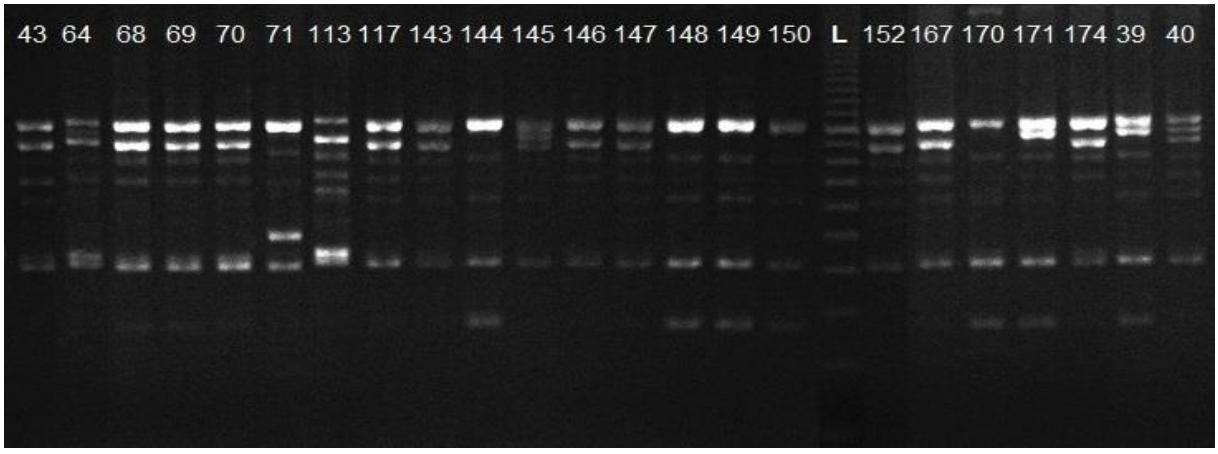
Клъстерна група (CG)	Военномедицинска академия	УМБАЛ „Св. Марина“	УМБАЛ „Александровска“	УМБАЛ „Св. Иван Рилски“
CG-I	Общ брой: 11 Дата на изолиране: 2014 (5), 2015 (1), 2016 (5) Придобити CHDLs: OXA-23 (6), OXA-24 (1), OXA-23+OXA-24 (4) ***75% сходство***	Общ брой: 25 Дата на изолиране: 2014 (4), 2015 (11), 2016 (10) Придобити CHDLs: OXA-23 (1), OXA-24 (19), OXA-23+OXA-24 (5) ***80% сходство***	Общ брой: 13 Дата на изолиране: 2014 (2), 2015 (3), 2016 (8) Придобити CHDLs: OXA-23 (2), OXA-24 (9), OXA-23+OXA-24 (2) ***76% сходство***	Общ брой: 16 Дата на изолиране: 2014 (3), 2015 (11), 2016 (3) Придобити CHDLs: OXA-23 (7), OXA-24 (1), OXA-23+OXA-24 (3), none (5) ***72% сходство***
CG-II	Общ брой: 4 Дата на изолиране: 2014 (3), 2016 (1) Придобити CHDLs: OXA-23 (3), OXA-23+OXA-24 (1) ***88% сходство***	Общ брой: 2 Дата на изолиране: 2015 (2) Придобити CHDLs: OXA-23 (2) ***98% сходство***	Общ брой: 26 Дата на изолиране: 2014 (4), 2015 (13), 2016 (9) Придобити CHDLs: OXA-23 (12), OXA-24 (9), OXA-23+OXA-24 (5) ***74% сходство***	Общ брой: 8 Дата на изолиране: 2014 (2), 2015 (3), 2016 (3) Придобити CHDLs: OXA-23 (2), OXA-24 (2), липсващи (4) ***71.5% сходство***
CG-III	Общ брой: 3 Дата на изолиране: 2016 (3) Придобити CHDLs: OXA-23 (3) ***95% сходство***	Общ брой: 5 Дата на изолиране: 2015 (4), 2016 (1) Придобити CHDLs: OXA-23 (1), OXA-24 (3), липсващи (1) ***81% сходство***	Общ брой: 3 Дата-изолиране: 2014 (2), 2015 (1) Придобити CHDLs: OXA-24 (1), OXA-23+OXA-24 (2) ***72% сходство***	
CG-IV	Общ брой: 16 Дата на изолиране: 2014 (4), 2015 (5), 2016 (7) Придобити CHDLs: OXA-23 (12), OXA-24 (2), OXA-23+OXA-24 (2) ***75% сходство***	Общ брой: 12 Дата на изолиране: 2014 (3), 2015 (1), 2016 (8) Придобити CHDLs: OXA-24 (7), OXA-23+OXA-24 (4), липсващи (1) ***80% сходство***		
CG-V	Общ брой: 2 Дата на изолиране: 2015 (1), 2016 (1) Придобити CHDLs: OXA-23 (1), OXA-23+OXA-24 (1) ***75% сходство***			
CG-VI	Общ брой: 2 Дата на изолиране: 2015 (1), 2016 (1) Придобити CHDLs: OXA-23+OXA-24 (1), OXA-58 (1) ***80% сходство***			
Брой CGs	**6**	**4**	**3**	**2**
Брой щамове без клъстерна група	**5**	**1**	**6**	**3**

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.

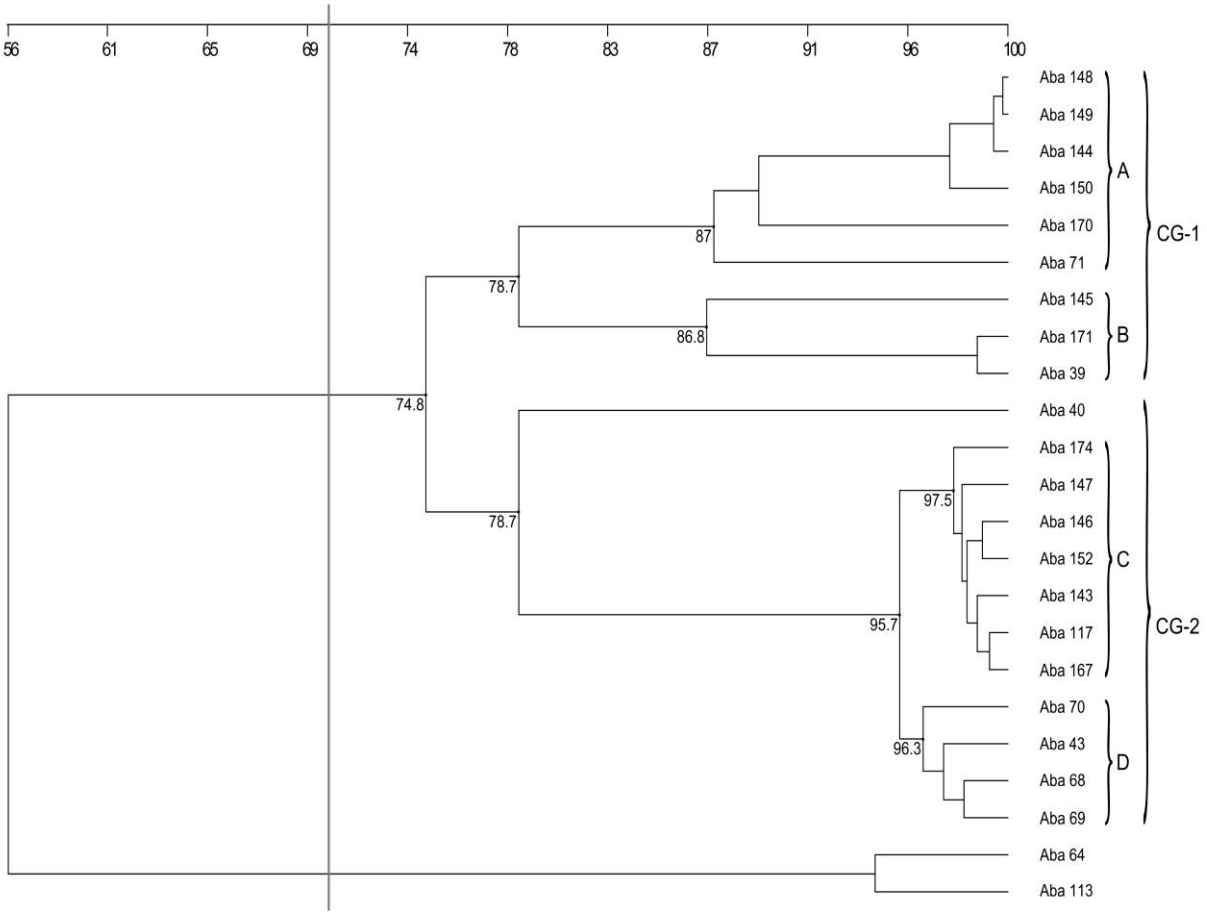
Епидемиологично типизиране на MDR/XDR-AB изолати от критично болни пациенти, провели БЗТ в КАИЛ на УМБАЛ „Александровска“ в периода 2016–2018 г.

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 (интермитентна хемодиализа или продължителна 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). Те генерираха RAPD-профили, съставени от 6 до 9 броя бандове с големина от 270 до 1200 bp (**Фигура 71**). Дендрограмата, илюстрираща клоналната връзка между отделните щамове, базирана на коефициента на Dice, е представена на **Фигура 72.**



Фигура 71. Агарозна гел-електрофореза, представяща RAPD-профилите на типизирани изолати *A. baumannii* от пациенти на бъбречнозаместителна терапия, лекувани в КАИЛ на УМБАЛ „Александровска”, в периода 2016–2018 г. С цифри са означени номерата на изолатите, а с L – 100-bp DNA ladder.

Клъстерният анализ, използващ най-масово прилагания критерий за клонално сходство между типизираните изолати (S_{AB} ≥70%), разпредели проучените XDR/MDR-AB изолати в две главни CGs, с клонална връзка между тях 74.8% (**Фигура 72**). CG-1 обедини 9 щама *A. baumannii* с проблемна антибиотична резистентност (78.7% клонално сходство между тях), а CG-2 включи 12 клонално свързани щама (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 подклъстера: A (6 щама с 87% клонална връзка помежду им) и B (3 щама; 86.8%). CG-2 беше съставена от подклъстер C (7; 97.5%), подклъстер D (4; 96.3%) и щам Aba 40. Бяха открити два чифта изолати, Aba 148/Aba 149 (подклъстер A, 100% клонална връзка) и Aba 146/Aba 152 (подклъстер C, 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).



Фигура 72. 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).

До масовото нализане на MLST, а в последните години и на SNP-базирани подходи за високорезолюционно типизиране при изучаване на молекулярната епидемиология на нозокомиалните инфекции, причинени от терапевтично проблемни *A. baumannii*, RAPD анализът беше една от предпочитаните молекулярно-генетични типизиращи техники поради редица свои предимства (Rafei et al. 2019; Babu et al. 2021). Отличава се с голяма флексибилност, техническа простота, широка достъпност на апаратура и реагенти, ниска цена и бърз резултат. От 90-те години на миналия век до наши дни, RAPD-PCR се прилага самостоятелно или в съчетание с други молекулярно-биологични техники за типизиране на клинични изолати *A. baumannii* (Grundmann et al. 1997; D'Arezzo et al. 2009; Piran et al. 2017; Mohammadi et al. 2021). Той е изключително полезен при установяване на взривове от вътреболнични инфекции, причинени от MDR-AB, които се констатират непрекъснато в съвременната здравна система. В подобни случаи се идентифицират клонално свързани

нозокомиални изолати, често с напълно идентични RAPD-профили (Graser et al. 1993; Struelens et al. 1993; Fatmawati et al. 2023). Също така RAPD-PCR демонстрира добра дискриминация между близките геномни видове *Acinetobacter*, показващи под 50% сходство помежду си, което носи допълнителна диагностична стойност на метода (Koeleman et al. 1998).

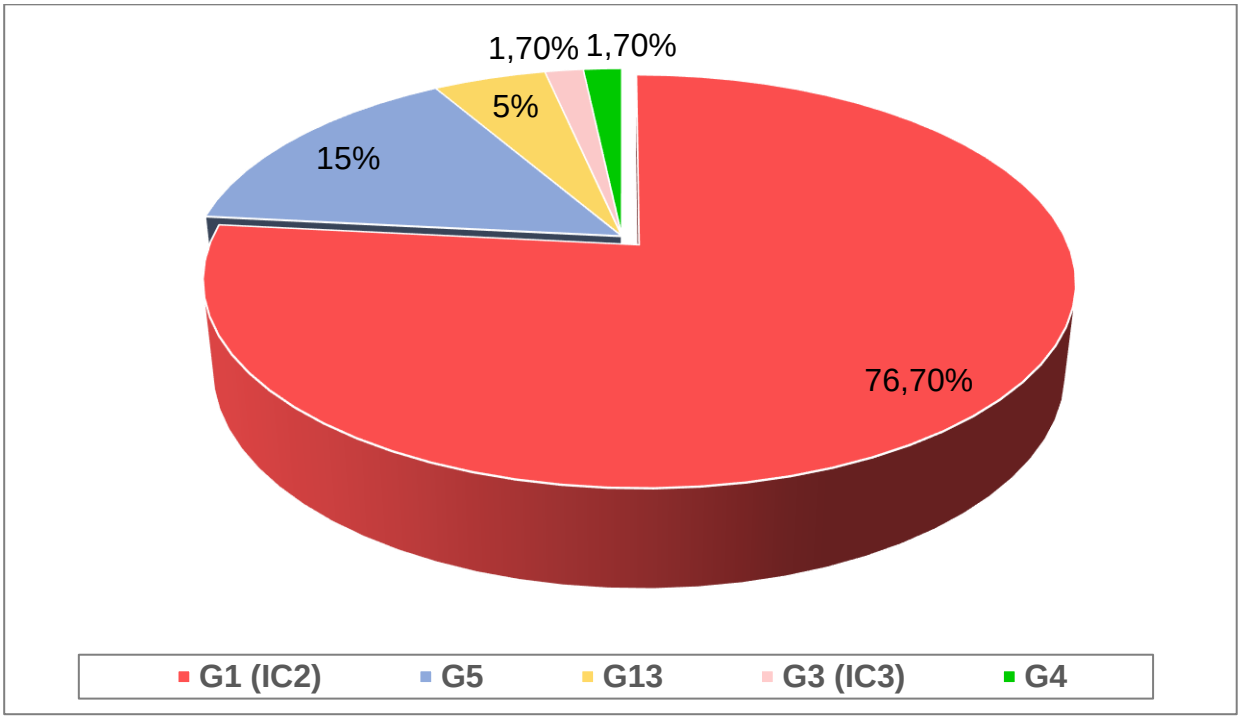
Въпреки безспорните предимства, най-вече бързина и лесно изпълнение, докладвана е и липса на възпроизводимост на RAPD техниката, дължаща се на нейната висока чувствителност към вариациите на използвани праймери и концентрация на ДНК, качеството на изолираната ДНК, типа на ДНК полимеразата и агарозната гел-електрофореза (Tyler et al. 1997). Преодоляването на тези проблеми е възможно чрез използване на стандартизирани концентрации на пречистена геномна ДНК и стандартизирани RAPD китове (Koeleman et al. 1998). Изборът на праймери за RAPD при *A. baumannii* обикновено се свежда до M13 и DAF4, насочени към консервативни последователности в генома на вида, които хибридизират при относително висока температура. В дисертационния труд беше приложен M13 праймер, за който по-стари проучвания показват, че генерира отчетливи RAPD-профили, ясно видими при агарозна гел-електрофореза, с относително малък брой вторични или слаби бандове (Grundmann et al. 1997).

Преди няколко години е въведен надежден комбиниран метод за идентификация и типизиране на епидемични и ендемични клонове сред клинични MDR-AB изолати, включващ три различни техники: PCR-базирано типизиране на “open reading frames (отворени рамки на четене)”; секвенционно типизиране на $bla_{\text{OXA-51-like}}$, съдържащи се във всички щамове на вида *A. baumannii*; и RAPD-PCR (Piran et al. 2017). Получените резултати са сравнени с тези от MLST. Авторите правят извод за добра дискриминативна способност на RAPD и висока корелация с прецизния MLST метод при извършване на анализ за филогенетично сходство между клиничните изолати *A. baumannii*.

5.5.2.2. Определяне на секвенционни групи/клонални комплекси чрез мултиплекс PCR метод, откриващ алелни варианти в *ompA*, *csuE* и $bla_{\text{OXA-51-like}}$ 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 последните изпратени до нас 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. Както беше описано в раздел „Материали и методи“, интерпретацията на резултатите от двете групови мултиплексни PCR беше направена по схемата на Karah et al. (Karah et al. 2012). В **Таблица 57.** е представен пълен списък на типизираните CRAB изолати заедно с отчетените резултати и принадлежността им към секвенционни групи / ICs. 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 73**).



Фигура 73. 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.

Таблица 57. Епидемиологично типизиране на нозокомиални карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* чрез мултиплекс PCR-базиран метод за определяне на алелни варианти в гените *ompA*, *csuE* и *bla*OXA-51-like.

Изолати	Болница	Клиника	Година	CHDL група	Gr1 PCR	Gr1 PCR	Gr1 PCR	Gr2 PCR	Gr2 PCR	Gr2 PCR	Секвенционна група
					csuE (702 bp)	*bla* $_{OXA-51}$ (559 bp)	*ompA* (355 bp)	*csuE* (580 bp)	*ompA* (343 bp)	*bla* $_{OXA-51}$ (162 bp)	(Клонален комплекс)
Aba223	ВМА	КИТ	2017	OXA-24/40	-	-	+	-	-	-	G5
Aba224	ВМА	КЧПХТ	2017	OXA-24/40	-	-	+	-	-	-	G5
Aba225	ВМА	КАРИЛ	2017	OXA-23, OXA-24/40	-	+	+	-	-	-	G4
Aba229	ВМА	КСХ	2017	OXA-24/40	+	+	-	-	+	-	G3 (IC 3)
Aba230	ВМА	КГЕ	2017	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba231	Рилски	ОАИЛ	2017	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba239	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23, OXA-24/40	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba240	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba241	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba242	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba243	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba244	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba245	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba246	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba247	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba248	Рилски	КНХ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba249	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba250	Рилски	ККХ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba251	Рилски	ККХ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba252	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba253	Рилски	Ревматология	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba254	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba255	Рилски	ОАИЛ	2020	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba257	Рилски	ОАИЛ	2020	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba258	Рилски	ОАИЛ	2020	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba259	Рилски	ККХ	2020	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba260	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba261	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba262	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba263	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba264	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba265	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba266	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba267	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba268	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba269	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba270	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba271	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	-	+	-	-	-	G13
Aba272	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	-	+	-	-	-	G13
Aba273	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba274	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba275	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	-	+	-	-	-	G13
Aba276	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba277	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba278	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba279	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba280	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba281	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba282	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba283	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba284	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba285	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba286	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba287	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba288	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba289	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba290	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba291	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba292	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)
Aba293	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC 2)

PCR, полимеразна верижна реакция; ВМА, Военномедицинска академия; КИТ, Клиника за интензивна терапия; КЧПХТ, Клиника по чернодробно-панкреатична хирургия и трансплантология; КАРИЛ, Клиника по анестезиология, реанимация и интензивно лечение; КСХ, Клиника по сърдечна хирургия; КГЕ, Клиника по гастроентерология; ОАИЛ, Отделение по анестезиология и интензивно лечение; ККХ, Клиника по коремна хирургия; G, секвенционнна група; IC, международен клон.

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 показаха 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 продукция на придобити CHDLs от групите OXA-23, OXA-24/40 и OXA-58 (Moubareck and Halat 2020).

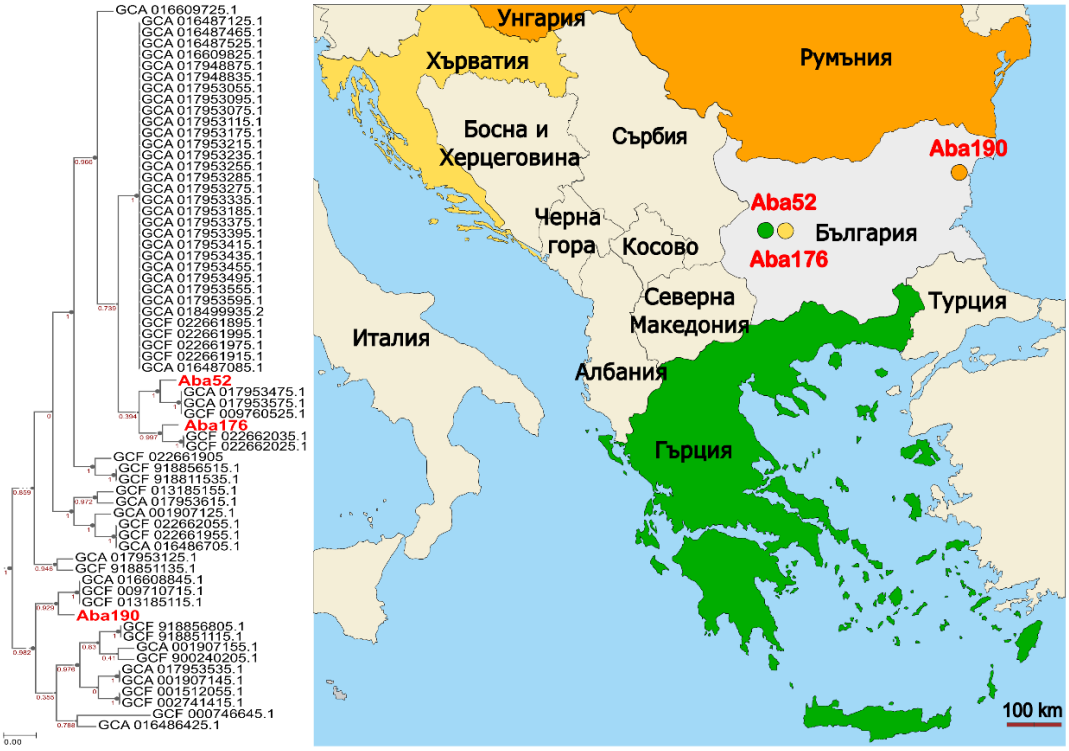
IC1 и IC2 са идентифицирани във всички континенти, което потвърждава повсеместното им разпространение и характеристиката им на глобални клонове в популационната структура на *A. baumannii* (Shelenkov et al. 2023). CRAB изолати от глобалните клонове IC1 и IC2 обикновено се асоциират с OXA-23 карбапенемаза (Castanheira et al. 2023), което се потвърждава и от нашите резултати. В миналото IC3 е бил причисляван към главните клонове, но в последната декада е слабо разпространен и включва предимно изолати с нечовешки произход (Rafei et al. 2015; Klotz et al. 2019). През 2018 г. е докладвано за появата на клинични CRAB изолати в Перу (Levy-Blitchtein et al. 2018). В последните години се установяват спорадични случаи на клинични CRAB от IC3, най-вече в Испания, САЩ и Южна Америка (Shelenkov et al. 2023). В нашето проучване сред представителна извадка от 60 изолата *A. baumannii* беше открит само един, отнасящ се към IC3 (№ 229, **Таблица 57**). Той беше изолиран през 2017 г. от пациент в Клиниката по съдова хирургия на ВМА и беше идентифициран като носител на OXA-24/40 карбапенемаза.

В стари епидемиологични проучвания, проведени с използване на мултиплекс PCR-базирания метод на Turton et al. (Turton et al. 2007), CRAB изолати от G5 и G13 са докладвани с ниска честота в няколко европейски държави (Австрия, Дания и Швеция) (Towner et al. 2008; Karah et al. 2011), което корелира с находките от настоящата работа.

5.5.2.3. 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 39.** от **т. 5.2.2.2.** 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*$_{\text{OXA-23}}$. 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*$_{\text{OXA-23}}$ и *bla*$_{\text{OXA-72}}$ (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 (**Таблица 28**). Конструираното филогенетично дърво е показано на **Фигура 74.**



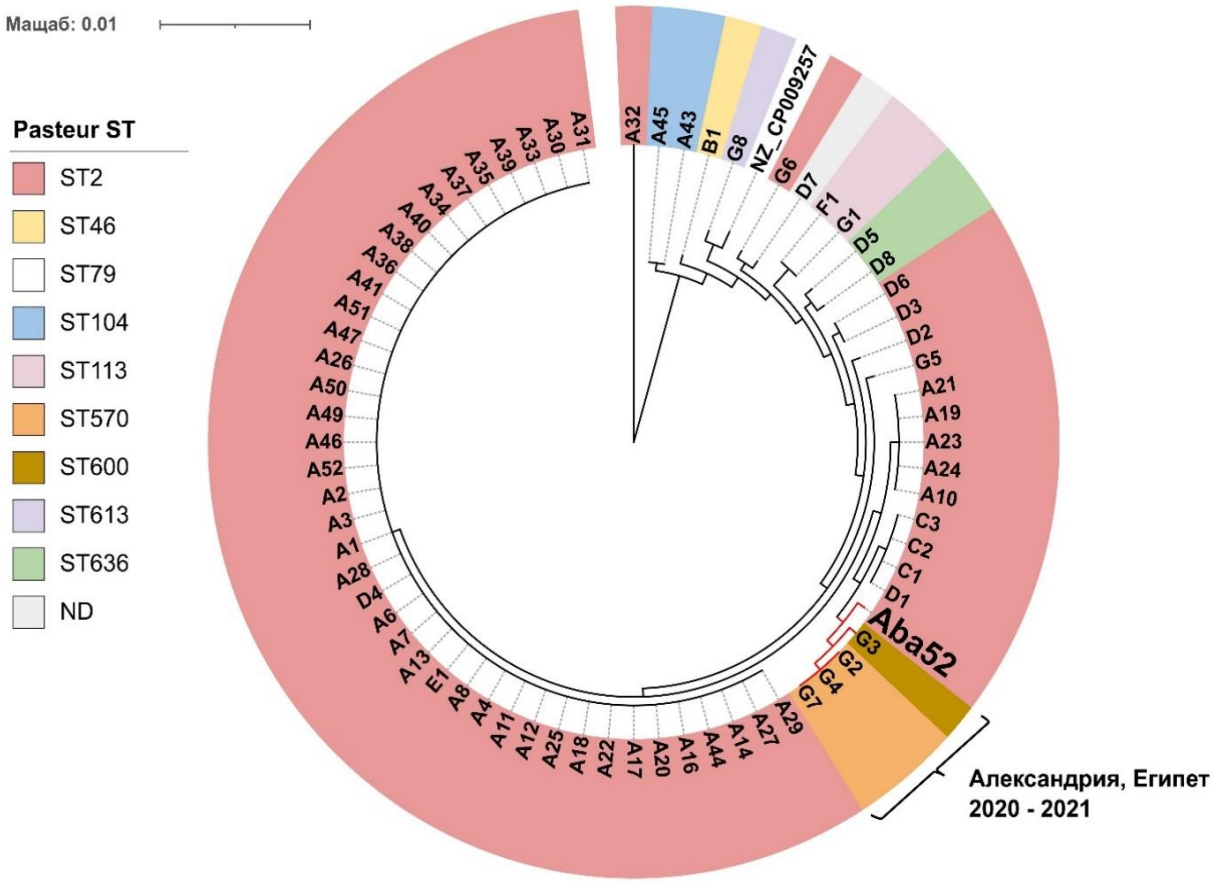
Фигура 74. Филогенетично дърво, построено чрез множествено подравняване на нуклеотидните последователности на 49 универсални корови гена на български XDR-AB (Aba52, Aba176 и Aba190) и colistin-чувствителни клинични изолати *A. baumannii* от съседни страни от Югоизточна Европа. Страните на произход за най-близките съвпадения на нашите три изолата са обозначени с цвят.

Изолатът Aba52 (София, 2018 г.) е тясно свързан с група от три клинични изолата от Гърция, получени през периода 2013–2016 г. Aba176 (София, 2019 г.) беше позициониран в група с два хърватски изолата, получени през 2020 г. Третият XDR-AB изолат от настоящото проучване, 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 (Słoczyńska 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 държави, както следва: Гърция (93.5%), Италия (82.9%) и Израел (40%) (Frenk et al. 2022). Неотдавна Cherubini et al. изследват инвазивни изолати *A. baumannii* от кръв на 43 критично болни пациенти с COVID-19, лекувани в ICU на болница в Пескара, Централна Италия. Интересно е, че всички изолати демонстрират забележителна антимикробна резистентност, включително към MEM и COL, и принадлежат към високорисковия международен клон ST2 (Cherubini et al. 2022). Сред клинични изолати *A. baumannii*, събрани в Белгия в периода 2014–2017 г., преобладава идентифицираният в нашето проучване ST2 (58.1%), следван от другия доказан секвенционен тип – ST636 (14%). Колекцията включва CRAB, MDR-AB, XDR-AB и дори PDR-AB изолати (Valcek et al. 2022). През 2021 г. Gajic et al. докладват взрив на BSI при недоносени новородени, причинен от *A. baumannii* с AMR детерминанти $bla_{\text{OXA-66}}$ и $bla_{\text{OXA-72}}$ от ST636 (характеристики и на нашия изолат Aba190) в неонатологично ICU в Сърбия (Gajic et al. 2021). Освен това OXA-72-продуциращи CRAB, принадлежащи към ST636, са открити преди това в национално проучване, проведено в съседна Сърбия (Lukovic et al. 2020).

Филогеномният анализ показа, че българските изолати попадат в различни клъстерни групи в зависимост от географския си произход, съответно София (ST2) и Варна (ST636). От друга страна нашите XDR-AB изолати са тясно свързани с терапевтично проблемни *A. baumannii* от Гърция, Хърватия и Румъния. Тези резултати предполагат, че миграцията и пътуванията на хора улесняват разпространението на високорискови клонове на CRAB на Балканите.

Както беше обсъдено подробно в **т. 5.2.2.2.**, при разработване на дисертационния труд беше идентифициран и детайлно изследван първият за страната CFDC-резистентен изолат *A. baumannii*. Касае се отново за Aba52, изолиран от кръв на ICU пациент, който е приет за оперативно лечение на мозъчен тумор в Клиниката по неврохирургия на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ в София. Изолатът Aba52 беше подложен на още един филогеномен анализ, в този случай включващ 69 генома на CFDC-резистентни клинични изолати *A. baumannii* с различен географски произход, налични в свободнодостъпните бази данни на NCBI (**Таблица 29.** в раздел „Материали и методи“). Беше конструирано филогенетично дърво, основано на секвенционните варианти в набор от 49 универсални корови гена, което е графично представено на **Фигура 75.**



Фигура 75. Филогенетично дърво, конструирано чрез множествено подравняване на нуклеотидните последователности на 49 универсални корови гена на първия български cefiderocol-резистентен изолат Aba52 и 69 cefiderocol-резистентни клинични изолата *A. baumannii* от различни части на света. Секвенционните типове на щамовете са обозначени с цветен код. NZ_CP009257 е най-близкият пълен геном на *A. baumannii*, открит в RefSeq. ST, секвенционен тип; ND, неопределен.

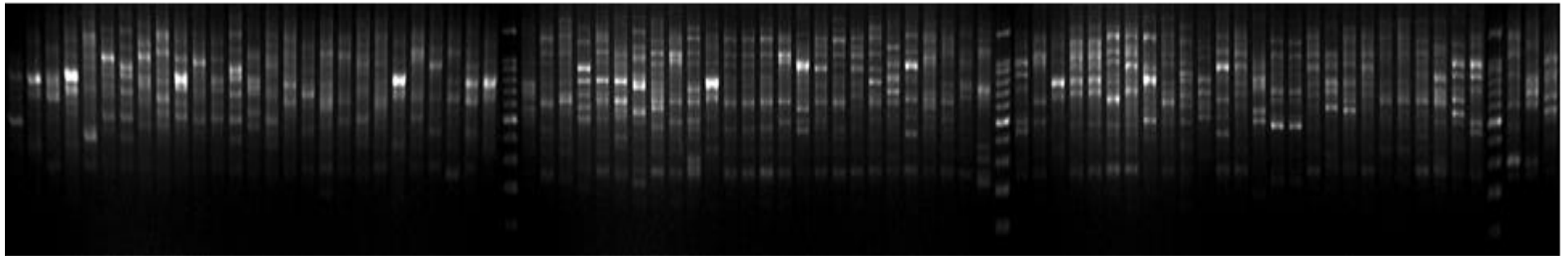
Както се вижда от фигурата, 81.2% (56 от 69) от CFDC-резистентните изолати *A. baumannii*, подложени на филогеномен анализ, принадлежат към високорисковия ST2, част от CC2. Нашият изолат Aba52 (ST2) е най-тясно свързан с група от четири нозокомиални изолата *A. baumannii* от Александрия, Египет (Sánchez-Urtaza et al. 2023b). Три от тях, означени като G2, G4 и G7, образуваха малка подгрупа и 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.

ST2 е най-разпространеният секвенционен тип, включващ CFDC-резистентни *A. baumannii*. Неотдавнашно проучване разкрива високо разпространение на CFDC-резистентни изолати *A. baumannii* в световен мащаб, повечето от които (65.2%) принадлежат към ST2 (Ballesté-Delpierre et al. 2022). Тази констатация се потвърждава и от нашия филогеномен анализ. От друга страна, заслужава да се спомене, че и за четирите изолата от Египет, които са тясно свързани с Aba52, е установено съдържание на $bla_{\text{NDM-1}}$ гени като част от съкратен транспозон Tn*125* с хромозомна локализация (Sánchez-Urtaza et al. 2023b). Тези данни илюстрират появата на NDM-продуциращи CRAB изолати, произхождащи от високорисковия ST2 и неговите еднолокусни варианти, както и продължаващата еволюция на тези бактерии. Предишни проучвания съобщават за повишени МПК на CFDC при изолати *A. baumannii*, произвеждащи различни варианти на металоензима NDM (Poirel et al. 2021), което допълнително усложнява терапията на инфекциите.

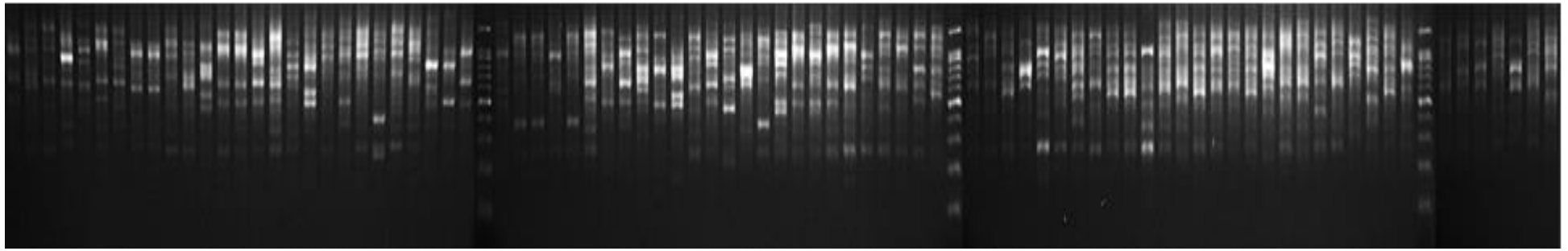
5.5.3. Епидемиологично типизиране на проучените изолати *S. maltophilia*

5.5.3.1. 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). Всички изолати генерираха RAPD-профили, съставени от 5 до 17 броя бандове с големина от 230 до 2500 bp (**Фигура 76**).



А.



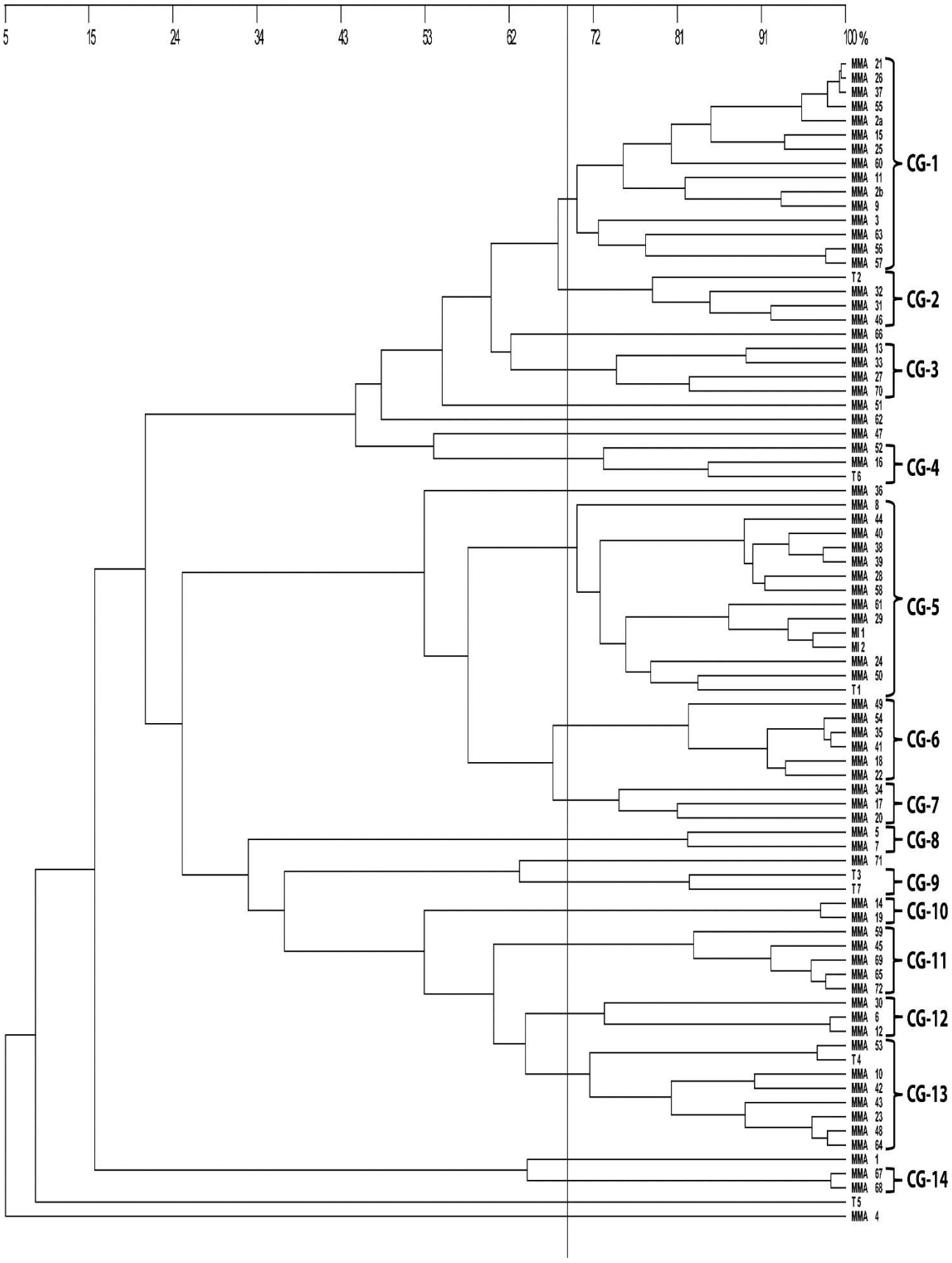
Б.

Фигура 76. Агарозна гел-електрофореза, представяща RAPD-профилите на **168 нозокомиални изолата *S. maltophilia***, генерирани с праймер 270. **А.** Първи хронологичен период (**2011–2013 г.**) – **82 изолата**; **Б.** Втори хронологичен период (**2014–2016 г.**) – **86 изолата**.

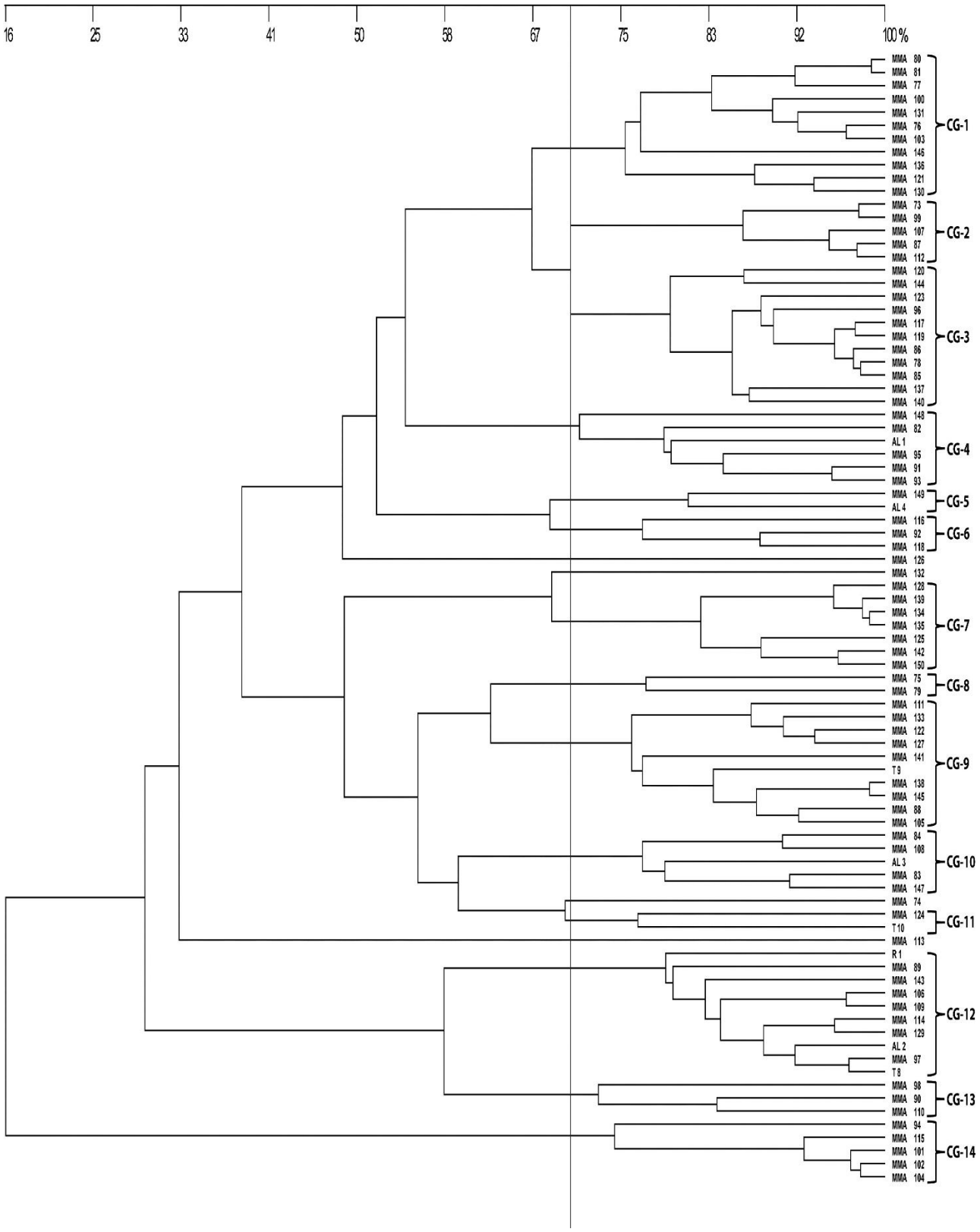
Клъстерният анализ демонстрира хетерогенна популация, включваща голям брой клъстерни групи (CGs) при прилагане на общоприетия праг за клонално сходство (70%), в двата хронологични периода. Нозокомиалните изолати от първия хронологичен период бяха групирани в 14 CGs, обединяващи клонално свързани щамове, както следва: CG-1 беше представена от 15 щама *S. maltophilia* (със 71% клонално сходство между тях), CG-2 (4 щама; 79% клонално сходство), CG-3 (4 щама; 75%), CG-4 (3 щама; 73.5%), CG-5 (14 щама; 71%), CG-6 (6 щама; 83%), CG-7 (3 щама; 75%), CG-8 (2 щама; 83%), CG-9 (2 щама; 83%), CG-10 (2 щама; 97%), CG-11 (5 щама; 83%), CG-12 (3 щама; 73%), CG-13 (8 щама; 80.5%) и CG-14 (2 щама; 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 77.**

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

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 Hasçelik 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 (Трифонова 2020).



Фигура 77. Епидемиологично типизиране – I период (2011–2013). Дендрограма, илюстрираща връзката между 82 нозокомиални изолата *S. maltophilia*, базирана на анализ върху коефициента на сходство (Dice) на RAPD-профили. CG, клъстерна група; ММА, Военномедицинска академия; Т, УМБАЛ „Токуда“; МІ, Медицински институт на МВР.



Фигура 78. Епидемиологично типизиране – II период (2014–2016). Дендрограма, илюстрираща връзката между 86 нозокомиални изолата *S. maltophilia*, базирана на анализ върху коефициента на сходство (Dice) на RAPD-профили. CG, клъстерна група; ММА, Военномедицинска академия; Т, УМБАЛ „Токуда“; AL, УМБАЛ „Александровска“; R, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“.

Рядкост са проучванията, които регистрират хомогенност и клоналност при щамовете, разпространени в една болница (Gallo et al. 2016). Съществуват обаче и съобщения за откриване на клинични изолати с идентичен генотип, доказващи вътреболнични взривове (Guyot et al. 2013; Kampmeier et al. 2017). От друга страна, проучване от преди няколко години отчита т. нар. „мултиклонален взрив“ с продължителност от 1 месец, при който са събрани 11 респираторни изолата *S. maltophilia* от пациенти в ICU в Кипър, демонстрирали ниска степен на генетично сходство при проведеното епидемиологично типизиране (Güvenir et al. 2018). Авторите считат, че евентуална мултиклоналност на щамовете при вътреболничен взрив може да се дължи на изменения на генетичния им профил при субкултивиране, в резултат на хипермутации, характерни за клиничните изолати.

Най-голямата CG в настоящото изследване (CG-1, I период) (**Фигура 77.**) включва 2 изолата *S. maltophilia* от болнично оборудване в реанимационно-интензивна клиника (номера ММА 56 – от шише за небулайзер, и ММА 57 – от стерилизирана вода). Контаминация на такава апаратура се среща сравнително често и е докладвана в редица научни публикации (Божкова 2016; Güvenir et al. 2018; Riquena et al. 2019).). Останалите щамове в тази група са 13 клинични изолата от пациенти, хоспитализирани в различни клиники на ВМА в периода април 2011 – октомври 2013 г. (Интензивни отделения, Съдова хирургия, Коремна хирургия, Пулмология, Ендоскопска хирургия и Травматология). Обобщените данни от епидемиологичното типизиране предполагат вътреболнична циркулация във ВМА на клонално свързани щамове, а също и способност за дълго персистиране на *S. maltophilia* в болнични условия, тъй като всеки от изследваните периоди е приблизително 3-годишен. Прехвърляне на *S. maltophilia* между различни болнични отделения и продължителни периоди на персистиране са документирани и преди, като се счита, че те се дължат на високия капацитет на този бактериален вид за биофилм формиране и колонизиране на влажни повърхности (Guyot et al. 2013; Alcaraz et al. 2018). Най-ранните изолати в CG-1 от I период бяха два морфологично различаващи се щама от един и същ пациент (с големи и малки колонии – съотв. ММА 2а и 2b) в Клиника по интензивна терапия. След анализа на резултатите от RAPD-PCR, те бяха определени като генетично родствени, но макар и да попадат в една CG, двата щама бяха по-близки клонално с други изолати, отколкото помежду си. Между последователното изолиране на някои от щамовете (ММА 26, 37 и 55) открихме големи времеви интервали от 8-11 месеца. Те произхождаха от пациенти на различни клиники във ВМА, но показаха много висока степен на клонална свързаност (>95%). Тази находка доказва, че *S. maltophilia* може да

персистира за дълги периоди в клинични условия. Поради факта, че не са регистрирани инфекции, причинени от вида в посочените интервали, може да се предположи, че през това време той оцелява в болничната среда, а не е изключена и вероятността за съществуване като колонизиращ агент или при безсимптомно носителство у пациенти.

По-голямата част от изолатите във втората голяма CG в I хронологичен период (CG-5) бяха от двете клиники за интензивно лечение на ВМА от периода януари 2012 – септември 2013 г. (9 щама – ММА 28, 29, 38, 39, 40, 44, 50, 58 и 61). При тях отново може да се предположи наличие на източници на *S. maltophilia* в болничната среда на ICUs, а в някои от случаите и кръстосана трансмисия посредством медицинско оборудване (поради застъпващ се престой на някои от пациентите в една и съща клиника). Възможно е това да са компоненти на респираторното оборудване, тъй като 6 от деветте щама произхождат от респираторни секрети на пациенти, претърпели апаратна вентилация. Както вече беше отбелязано, случаите на контаминиране са чести, а продължителната механична вентилация е значим рисков фактор за инфектиране със *S. maltophilia* (Gozel et al. 2015; Ince et al. 2020; Wang et al. 2023b). По-ранните изолати в CG-5 бяха от май и октомври 2011 г. (ММА 8 и 24), от пациенти в Пулмология и хирургична клиника. CG-5 включи изолати от три болници – ВМА (11 изолата), Медицински институт на МВР (MI 1 и MI 2) и УМБАЛ „Токуда“ (T 1). Щамовете от Медицински институт на МВР демонстрираха висока степен на клонално сходство помежду си (около 95%), а изолатът от УМБАЛ „Токуда“ показа >80% сходство с изолат от клиника за интензивно лечение във ВМА (ММА 50).

Във II период в CG-12 попаднаха изолати от четири болници в София – ВМА (7 изолата), УМБАЛ „Токуда“ (T 8), УМБАЛ „Александровска“ (AL 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. Вероятността за пренос на клонално свързани изолати посредством пациенти е минимална, тъй като при включените в проучването не бяха налични анамнестични данни за хоспитализиране в повече от една от мониторираните болници.

Сред по-големите клъстери в I период е CG-13, включващ 8 щама от различни клиники на две болници (7 от ВМА и 1 от УМБАЛ „Токуда“). Периодът на тяхното изолиране е май 2011 – октомври 2013 г. Три от изолатите в този период произхождаха от

една и съща хирургична клиника (ММА 23, 43 и 64), но бяха получени през големи интервали от време (16 и 8 месеца), през които генетично родствени на тях щамове бяха изолирани от пациенти на други клиники (една за интензивни грижи и две по вътрешни болести). По отношение на CG-13/I период може да се предполага дълготрайно вътреболнично персистиране и междуболнично разпространение.

Клъстерна група CG-6 на I период се състои от 6 щама, изолирани в периода септември 2011 – юни 2013 г. от пациенти на ВМА. Пет от тях са пребивавали в клиниките за интензивно лечение на болницата, а един – в клиника по вътрешни болести (ММА 49). Подобна ситуация беше констатирана и в CG-11, при който всички 5 изолата бяха от трахеобронхиални аспирати на пациенти, подложени на апаратна вентилация в клиниките за интензивно лечение на същата болница, но за по-кратък период (февруари – декември 2013 г.). При щамовете и от двете групи съществува вероятност за общ нозокомиален източник за инфектиране със *S. maltophilia*, а в някои от случаите и кръстосано предаване чрез медицинско оборудване.

По-малките CGs с по 3 и 4 изолата в I период са CG-2 (юни 2012 – март 2013 г.), CG-3 (юни 2011 – декември 2013 г.), CG-4 (август 2011 – декември 2013 г.), CG-7 (август 2011 – юни 2012 г.) и CG-12 (май 2011 – април 2012 г.). Във всички тях присъстват по 1 или 2 щама, изолирани от клиниките за интензивни грижи на ВМА. Изключение прави само CG-2, където бяха отнесени 3 изолата от пациенти на Пулмология в същата болница (ММА 31, 32 и 46), чиято диагноза е бронхиектатична болест. Подобно хронично белодробно заболяване изисква периодични хоспитализации с прилагане на инвазивни диагностични процедури, като бронхоскопии. Ето защо има вероятност щамовете, принадлежащи към клъстера, да са персистирали в клиниката като контаминанти на такова оборудване. В предходни проучвания е установено, че в такива случаи придобиване на щамове *S. maltophilia* е по-вероятно да се дължи на неуспешна стерилизация на бронхоскопи, отколкото на разпространение на микроорганизмите от други източници в болничната среда или между пациенти. Все пак авторите отбелязват, че често при вътреболнични взривове от *S. maltophilia* инфекции, източниците и начините на предаване не могат да бъдат открити (Denton and Kerr 1998)(Valdezate et al. 2004).

За групите с по 2 изолата от I период (CG-8, CG-9, CG-10 и CG-14) е характерно, че щамовете са от пациенти на различни клиники и са изолирани през кратки интервали (до 2 месеца). Изключение прави само CG-9, където двата щама са изолирани през 8 месеца, от педиатрични пациенти на УМБАЛ „Токуда“.

Във II период големите CGs, включващи по 10-11 изолата, бяха повече (CG-1, CG-3, CG-9 и CG-12) (**Фигура 78**). Следва да се отбележи, че съдържащите се в тях щамове са изолирани за сравнително по-кратки периоди (под 2 години), в сравнение с тези от големите клъстери на I хронологичен период. В CG-1 на II период попаднаха изолати от няколко клиники на ВМА от периода февруари 2014 – декември 2015 г. Преобладаваха изолатите от ICUs, но бяха открити и единични изолати от хирургични клиники (ММА 136, 146) и клиники по вътрешни болести (ММА 76, 80, 81). Разпределението в тази CG отново свидетелства за вътреболнично разпространение на клонално свързани щамове *S. maltophilia*.

В CG-3 от II период отново преобладаваха изолати от клиниките за интензивно лечение на ВМА (8 от общо 11), като най-ранният изолат от групата беше от февруари 2014 г., а последният – от декември 2015 г. В този случай също може да се предполага наличие на източници на *S. maltophilia* в болничната среда, като отново суспектно е респираторното оборудване в ICUs (6 от изолатите са от трахеобронхиални аспирати на пациенти, подложени на апаратна вентилация – ММА 78, 119, 120, 123, 137 и 144).

Сходно на CG-3 разпределение беше открито и при CG-9 на II период, където обаче попадна и един изолат от УМБАЛ „Токуда“. Периодът на изолиране беше от март 2014 г. до декември 2015 г. Сред общо 10 изолата в тази CG, 6 са от клиники за интензивно лечение на ВМА, от които 4 са изолирани от пациенти на механична вентилация (ММА 122, 127, 138 и 145).

За CG-12 на II период, освен наличието на щамове от четири различни болници, е характерно разнообразие от болнични звена – хирургични и по вътрешни болести. Само един изолат беше от ICU (ММА 129). Щамовете бяха изолирани между февруари 2014 г. (Т 8 от УМБАЛ „Токуда“) и декември 2015 г. (ММА 143). Интересно е да се отбележи, че изолат ММА 97 от ВМА демонстрира висока степен на генетично сходство (около 97%) с този от УМБАЛ „Токуда“ (Т 8), както и че двата щама са от клиниките по Съдова хирургия на двете болници. В същия клъстер попадна и изолат от УМБАЛ „Александровска“ (AL 2, от пациент на Белодробна клиника), но с по-малка степен на сходство с горните два, оценено на 90%. С най-малка степен на генетично сходство (77%) с останалите щамове от CG-12 е изолатът от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (R 1), също от пациент на белодробно отделение. Възможно е разнообразният произход на щамовете от тази CG да се дължи на разпространение на специфичен генотип, обуславящ по-висока адаптивност на изолатите *S. maltophilia* в болнични условия. Някои проучвания предполагат, че определени филогенетични групи притежават повишен инфекциозен потенциал в сравнение с други и

откриват значими различия в мутационната честота на клинични изолати и такива от околна среда (клиничните са по-често хипермутатори) (Turrientes et al. 2010; Adamek et al. 2011).

Подобно на находката, наблюдавана в CG-2 на I период, при клъстери CG-2 и CG-7 от II период беше открита съвкупност от щамове, изолирани от пациенти на Клиника по пулмология на ВМА, предимно с хронични белодробни заболявания. В CG-2 на II период, изолатите бяха от периода януари – ноември 2014 г. Четири от тях бяха изолирани от храчки на хоспитализирани в Пулмология, а един от хемокултура на пациент в ICU (ММА 99). Всички 7 щама в CG-7 произхождаха от Пулмология, от един и същ вид клиничен материал (бронхоалвеоларен лаваж), от периода юни 2015 – април 2016 г. Сравнително кратките периоди на изолиране и при двете клъстерни групи не дават основание да се предположи дълготрайна персистенция на ендемични клонове. Може са се касае за наличие на източници на *S. maltophilia* в клиниката, а също е възможно и кръстосано предаване поради едновременно пребиваване там на някои от пациентите. В научната литература са описани случаи на т. нар. „псевдовзривове“, при които се изолират клонално свързани щамове *S. maltophilia* от бронхоалвеоларен лаваж на пациенти без данни за специфична инфекция. Проведени изследвания и епидемиологичен анализ установяват, че това се дължи на попадане на щамовете в пробите от контаминиран/колонизиран бронхоскоп (Ece et al. 2014; Waite et al. 2016; Botana-Rial et al. 2016). Дали при CG-7 на II период е налице подобна ситуация, е трудно да се определи поради клинични изяви на инфекция при пациентите и липсата на изолати от бронхоскоп в настоящата колекция от щамове.

Сред по-малките CGs във II период бяха CG-4 (6 изолата *S. maltophilia* за 2-годишен период) и CG-14 (5 изолата за 6-месечен период). Събраната епидемиологична информация за изолатите показа, че при CG-4 преобладават изолати от пациенти на ICU на ВМА (ММА 91, 93, 95 и 148), а при CG-14 – всички изолати са от ICU. Беше отчетено, че клиничните материали произхождат от ДДП и повечето пациенти са били подложени на апаратна вентилация по време на престоя в клиниката за интензивни грижи.

В CG-10 от II период попаднаха 3 клинични изолата (ММА 83, 84 и 108) и 1 от болнична среда (ММА 147) на ВМА, както и един клиничен изолат от УМБАЛ „Александровска“ от пациент с МВ (AL 3). Беше констатиран дълъг период на изолиране, от април 2014 до март 2016 г. Интересна находка в клъстера беше, че изолатът от болнична среда (инструментална маса от хирургична клиника), който е хронологично най-късният в групата, се оказа най-близък генетично до най-ранния такъв (ММА 83 – от пациент в ICU).

Това наблюдение отново потвърждава възможността за вътреболнично разпространение и дълготрайна персистенция на щамовете *S. maltophilia*.

Най-малките CGs във II хронологичен период, с по 2 или 3 щама, са CG-5, CG-6, CG-8, CG-11 и CG-13. При две от тях (CG-6 и CG-11) бяха отчетени сравнително по-дълги интервали на изолиране от 8-14 месеца, докато при останалите, подобно на най-малките групи от I период, изолатите бяха получени в рамките на 1-6 месеца. В CG-8, състояща се само от 2 щама, попадна четвъртият изолат от болнична среда и оборудване от генотипизираната колекция от периода 2011–2016 г. (ММА 79), изолиран от гастроскоп в клиника по вътрешни болести.

За разлика от другото българско проучване, в което изолатите от болнична среда (вода за небулайзер) и ръце на медицински персонал са показали уникални RAPD-профили, съответно липса на клъстерна принадлежност (Божкова 2016), четирите подобни щама в нашето изследване се включват в CGs. След идентифицирането на контаминираните шише за небулайзер и стерилизирана вода в ICU през първия хронологичен период на настоящото проучване (ММА 56 и 57 от CG-1), бяха изолирани клонално свързани *S. maltophilia* от респираторни секрети на двама пациенти, пребиваващи в клиниката след 3 и 4-месечен период (ММА 60 и 63). Това предполага наличие и на други неидентифицирани източници на *S. maltophilia* и продължително персистиране на клонално свързани щамове в болничната среда. Тъй като изолатът от инструментална маса (ММА 147 от CG-10, II период) беше открит към края на мониторирания период във ВМА, не разполагаме с данни дали след неговото изолиране е постигната ерадикация на клона или съществуват и други източници в други клиники. Изолатът от гастроскоп (ММА 79 от CG-8, II период) показа генетично сходство само с един щам от друга клиника, а двата щама бяха идентифицирани в рамките на 1 месец в началото на 2014 г. Тъй като тези изолати попадат в граничен времеви интервал между двата хронологични периода (I и II), може да се предположи включването им в по-голям клъстер, заедно с изолати от I период (маркиран до декември 2013 г.). Установено е, че контаминирани ендоскопи са свързани с ИСМО по-често, отколкото други медицински устройства (Botana-Rial et al. 2016).

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 клиники. Сред тях се срещат и изолати от няколко ICUs, като в тези случаи е по-вероятно независимо инфектиране, а не последствие от кръстосана трансмисия.

5.5.3.2. 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. 5.2.3.2.** 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 клъстерна принадлежност. Получените резултати от MLST анализа на сглобените 9 „драфт“ генома, извършен чрез интегрирания за целта инструмент в платформата Galaxy, са представени в **Таблица 58.**

Таблица 58. Епидемиологични характеристики и мултилокусно секвенционно типизиране на избрани нозокомиални изолати *S. maltophilia* от Военномедицинска академия – София.

Изолат	**Клиника**	**Година**	**CG, период**	**ST**	**Алелни варианти**						
					atpD	***gapA***	***guaA***	***mutM***	***nuoD***	***ppsA***	***recA***
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, клъстерна 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 изолата *S. maltophilia* от два хронологични периода. При деветте изолата 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/bigsdb?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 клиники. От тази находка може да се предположи персистиране на някои STs в болницата в продължение на 2-3 години. Методологичните параметри на проведеното епидемиологично типизиране чрез RAPD-PCR, а именно разделянето на изследваните щамове *S. maltophilia* на две хронологични групи (2011–2013 и 2014–2016 г.), не позволява да се потърси корелация между ST и клъстерна група. Както е видно от **Таблица 58.**, 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 клъстерна 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 щама *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 щама. 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. Например в проучване, включило 31 изолата *S. maltophilia* от кръв на пациенти с онкохематологични заболявания, лекувани в болница в Сеул, Южна Корея в периода 2006–2016 г., са открити 18 различни STs (Kim et al. 2019b). С изключение на ST77, представен от 7 изолата (22.6%), всички останали STs са включвали от 1 до 3 изолата, което е сходно с находката от нашето изследване. Подобни са резултатите от MLST, получени в хода на многоцентровото проспективно проучване ANSELM, което е фокусирано върху способността за биофилм образуване на клинични изолати *S. maltophilia* от 5 европейски страни (Чехия, Сърбия, Испания, Германия и Италия) (Pompilio et al. 2020a). При участващи по 4-6 щама от държава авторите отчитат от 4 до 5 различни STs във всяка от тях, а общият брой идентифицирани генетични линии (STs) е 20. Единственото съвпадение на ST между нашите и щамовете от AMSELM е по отношение на ST172 с детекция в Италия. Преди няколко години Cruz-Córdova et al.

класифицират 21 клинични щама *S. maltophilia*, изолирани от пациенти в детска възраст, в 5 STs, както следва: ST239 (*n* = 8), ST304 (*n* = 8), ST24 (*n* = 2), ST150 (*n* = 2) и ST290 (*n* = 1) (Cruz-Córdova et al. 2020). По-малкото генетично разнообразие в това проучване може да се обясни с по-кратък период на изолиране (двумечесен от декември 2016 до февруари 2017) и произход само от една болница в Мексико. Изключителната генетична хетерогенност на вида *S. maltophilia* е доказана и 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). Въпреки това би било спекулативно да се приеме успешна адаптация на ST5 към болничните отделения в глобален мащаб, тъй като само 6 от 83 щама са били ST5 във френското проучване, а в американското са идентифицирани 9 представители на този ST в колекция от 130 изолата. Чрез анализ с помощта на eBURST v3, при който клоналната група се дефинира от изолати с 5 идентични локуса, Mojica et al. идентифицират общо 8 клонални групи. В две от тях, Gr3 и Gr8, участват съответно ST27 и ST119, установени и сред нашите нозокомиални изолати *S. maltophilia* SM64 (2013 г.) и SM 130 (2015 г.).

Съвременните широкомащабни проучвания, базирани на налични в нуклеотидните бази данни на NCBI пълни геноми на изолати от клинични източници и околна среда, демонстрират изключително разнообразие на *S. maltophilia* complex на нуклеотидно ниво (Ochoa-Sánchez and Vinuesa 2017; Steinmann et al. 2018; Patil et al. 2018; Gröschel et al. 2020). По тази причина популационните анализи и изследването на молекулярната епидемиология на инфекциите, причинени от патогена, са истинско предизвикателство. За преодоляване на този проблем Gröschel et al. предлагат нова схема на целогеномно (wg) MLST типизиране, състояща се от 17 603 генни таргети или локуси (Gröschel et al. 2020). Включването на локусите от 7-генната класическа схема за MLST типизиране, както и на гена *gyrB*, позволява обратна съвместимост и сравнение на номерата на алелите със секвенционните типове, получени чрез класическата схема за MLST. Прилагането на wgMLST подхода към географски разнообразната колекция от щамове *S. maltophilia* е позволило детайлно проучване на глобалната популационна структура на *S. maltophilia* complex, включително откриването на шест нови линии в допълнение към описаните преди това от други автори (Steinmann et al. 2018; Vinuesa et al. 2018).

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последните години вниманието на човечеството беше насочено предимно върху глобалното разпространение на COVID-19. Останала встрани от този актуален медицински проблем, антимикробната лекарствена резистентност е сериозна заплаха за общественото здраве и трябва да се разглежда като „тиха“ и подценявана пандемия. Инфекциите, причинени от Грам-отрицателни бактерии с MDR, в това число НФГБ, пораждат сериозно безпокойство в Европа. Според последните данни на надзорната мрежа EARS-Net, в периода 2018–2022 г. резистентността към карбапенеми е често срещана сред европейските инвазивни изолати *P. aeruginosa* (18.6% през 2022 г.) и *Acinetobacter* spp., представени основно от *A. baumannii* (36.3% през 2022 г.), и показва по-висок среднопретеглен процент за населението на ЕС/ЕИП в сравнение с *K. pneumoniae* (European Centre for Disease Prevention and Control 2023c). Близки са нивата и на MDR-PA и MDR *Acinetobacter* spp., съответно 13.4% и 31.8%. Броят на резистентните изолати се увеличава по осите „запад-изток“ и „север-юг“, като Балканите се очертават като регион с висок приоритет. Като част от този регион, България не прави изключение. През 2022 г. разпространението в страната на инвазивни CRPA и карбапенем-резистентни *Acinetobacter* spp. надвишава 2 пъти средното за ЕС/ЕИП. От друга страна са регистрирани 3.4 пъти повече MDR-PA и 2.6 пъти повече MDR *Acinetobacter* spp. спрямо средните нива за ЕС/ЕИП (European Centre for Disease Prevention and Control 2023c).

Лечението на нозокомиалните инфекции, причинени от *S. maltophilia*, особено при имунокомпрометирани и ICU пациенти, обикновено е сериозно предизвикателство с оглед на вродената резистентност към най-често прилаганите в болнични условия антибиотици – карбапенеми и аминогликозиди. В последната декада нараства резистентността на *S. maltophilia* към АМЛС от първа линия, в това число trimethoprim-sulfamethoxazole и особено levofloxacin в пост-COVID-19 ерата (Brooke 2021).

Динамиката в глобалната резистентност на патогените от група „НФГБ“ поставя много въпроси относно търсенето на успешни стратегии срещу тях. Наскоро беше поставено началото на нов етап в лечението на инфекции, причинени от терапевтично проблемни НФГБ с екстензивна или дори пълна антибиотична резистентност. Одобрените нови антибиотици, включващи cefiderocol, комбинации от β-лактами и β-лактамазни инхибитори (BL/BLIs) и sulbactam-durlobactam (разработен специално за лечение на инфекции с ABC complex), показват добра *in vitro* активност срещу някои CRPA и CRAB. Това осигурява възможност за ограничаване на режимите на базата на полимиксини както в емпиричната, така и в прицелната терапия (Bassetti et al. 2021). Независимо от това,

поради докладвани случаи на резистентност към новите агенти, употребата им трябва да се оптимизира въз основа на тяхната диференцирана активност (не само по отношение на целевите бактерии, но и на детерминантите на резистентност), най-актуалните данни за PK/PD на препаратите и локалната микробна епидемиология. При ограничени терапевтични опции в случаи на тежки инфекции с Грам-отрицателни патогени, включително *S. maltophilia*, се възлагат надежди и на скоро одобрения за клинична употреба в ЕС aztreonam-avibactam (Sader et al. 2020; Coppola et al. 2022).

Съвременната здравна система изисква създаване на всеобхватни инициативи за наблюдение на антимикробната резистентност, които да обединяват фенотипни, геномни данни и метаданни. Постижимите в момента стратегии за надзор на европейско равнище следва да включват поне: а) мониторинг на високорискови линии, в това число задължително *P. aeruginosa* и *A. baumannii*; б) анализи на тенденциите за разпространение на резистентността към наскоро въведени агенти (като новите BL/BLIs и cefiderocol) в допълнение към класическите АМЛС с активност срещу *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *S. maltophilia*; в) мониторинг на щамове, експресиращи хоризонтално придобити механизми за резистентност (особено карбапенемази и ESBLs); и г) наблюдение на хромозомните механизми на резистентност, като производни на AmpC цефалоспориназа от клас С при *P. aeruginosa*, участващи в резистентността към новите BL/BLIs (Oliver et al. 2024). Също така антимикробното управление и контролът на инфекциите, основан на класически мерки за ограничаване разпространението на вътреболнични MDR патогени (дезинфекция; скрининг за носителство на такива патогени, включващо CRPA и CRAB; отделяне на новоприетите пациенти от тези с вече доказана колонизация и инфекция и др.), са от първостепенно значение. В тази перспектива петте “D” (англ. Diagnosis, Drug, Dose, Duration и De-escalation) следва да са ключови характеристики на съвременните терапевтични алгоритми и рационалната антибитична политика в световен мащаб (Coppola et al. 2022).

7. 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 cefepime (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-лактам и β-лактамазен инхибитор, а продуцентите на метало-β-лактамази (MBLs) демонстрират абсолютна резистентност към тях. От своя страна карбапенем-резистентните изолати *P. aeuginosa* (CRPA) без MBLs показват по-висока чувствителност ($p < 0.05$), вариращa 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: $bla_{\text{VEB-like}}$, включително $bla_{\text{VEB-9}}$ (24.4%), $bla_{\text{PER-1}}$ (11.5%), $bla_{\text{NDM-1}}$ (10.3%), $bla_{\text{VIM-2}}$ (2.6%) и $bla_{\text{VIM-4}}$ (1.3%). Резистомният анализ при избрани CRPA показва наличие на множество детерминанти за антимикробна резистентност (AMR), предимно към β-лактами и аминогликозиди. Геномите притежават *sul1*, което предполага носителство на интегрони от клас 1. Идентифицирани и детайлно охарактеризирани са следните хромозомно-локализирани мобилни структури: In*59*-подобен интегрон (във VIM-2-положителен изолат), Tn*21* транспозон, включващ ble_{MBL}–$bla_{\text{NDM-1}}$–IS*Aba125*) и сложно устроен $bla_{\text{VEB-9}}$-носещ интегрон, показващ най-добри съответствия в TnCentral Database на база максимални

точки и общи точки, съответно с Tn*5086*-CP054343 (*E. coli*) и Tn*1412*-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 IS*Aba1* се открива в 88% от тях. В периода 2005–2011 г. всички CRAB изолати са носители на $bla_{\text{OXA-23}}$ и IS*Aba1*, разположена пред него. При CRAB изолатите от 2014–2022 г. честотата на вродени и придобити CHDLs е както следва: $bla_{\text{OXA-51-like}}$ (100%), $bla_{\text{OXA-23-like}}$ (42.9%), $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$ (35.5%), $bla_{\text{OXA-23-like}}$ + $bla_{\text{OXA-24/40-like}}$ (15.9%) и $bla_{\text{OXA-58-like}}$ (0.3%). Секвенционните техники, включващи и целогеномно секвениране (WGS), откриват OXA-23, OXA-72, OXA-58 и OXA-66. Установени са още $bla_{\text{PER-1}}$ (10.6%) и *armA*, определящ високо ниво на резистентност към всички аминогликозиди (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 $bla_{\text{OXA-58}}$ с разположени IS*Aba3-like* и IS*Aba3* 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: продукция 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 PBP3, и вероятна свръхекспресия на хромозомния $bla_{\text{ADC-73}}$ ген.

9. Резистентността към trimethoprim-sulfamethoxazole при *S. maltophilia* се свързва с гена *sul1* (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}), аминогликозиди (*aph(3')-IIc* и *aac(6')-Iz*) и tetracycline (*tetA* и *tetB*), а в ⅓ от тях се откриват и придобити AMR генни детерминанти. В два щама са идентифицирани интегрони от клас 1, носещи *sul1* 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_{OXA-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 (T3SS) и T3SS ефекторни протеини; и *токсини*, предполагащи висок патогенен потенциал на изследваните изолати.

11. Най-голям е процентният дял на изолатите *P. aeruginosa* с T3SS 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 екзополизахарид A), 63.5%; *csuE* (субединица E на тип I пилусна система), 90.6%; и *bap* (биофилм-асоцииран протеин Bap), 21.6%. Налице е значима разлика ($p < 0.0001$) между относителните дялове на *bap*-положителни изолати от двата главни хронологични периода (63.8% през 2004–2011 г. и едва 5.3% през 2014–2022 г.). Също така *bap* 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 (*bap-ompA-epsA-csuE*), като групата включва силни и умерени продуценти на биофилм (средна OD_{570}=0.192 ± 0.042). Липсата на четирите БАГ (6.8%) се свързва с незначително количество до пълна липса на биофилм (средна OD_{570}=0.022 ± 0.005). Всички *bap*-положителни изолати (*n* = 78) са продуценти на биофилм (62 силни и 16 умерени). При повечето *bap*-отрицателни щамове (8 от 10) е установена слаба или липсваща биофилм-формираща способност, което потвърждава откритата в предходни проучвания корелация между наличие на *bap* 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 C 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) – $bla_{\text{VEB-9}}$-положителни изолати. Доказани са вътреболнична циркулация на $bla_{\text{NDM-1}}$-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 клъстерни 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 щама без клъстерна принадлежност), вътреболнично и междуболнично разпространение на клонално свързани щамове. WGS-базираният MLST анализ потвърждава тези находки. Деветте щама *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.

8. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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 $bla_{\text{VIM-2}}$ 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 $bla_{\text{NDM-1}}$ и $bla_{\text{VEB-9}}$, който представя епидемиологични връзки, клонална принадлежност и детерминанти на антимикробна резистентност на щамовете. За първи път в света е открит $bla_{\text{NDM-1}}$-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-медиирана 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 мониторирани 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 депозирани геноми в свободнодостъпните 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 дифиренцирането 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/bigsdb?db=pubmlst_smaltophilia_seqdef).
11. При епидемиологично генотипизиране с RAPD-PCR е установено междуболнично разпространение на клонално свързани щамове *S. maltophilia*, неописвано 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 Tn*21* транспозон, който носи ble_{MBL}–bla_{NDM-1}–IS*Aba125*, 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*$_{\text{VIM-2}}$-положителен, ST111), BioProject accession No PRJNA1096960 (включващ геномите на 8 *bla*$_{\text{NDM-1}}$-положителни изолата, ST654 и ST611) и BioProject accession number PRJNA1138419 (2 *bla*$_{\text{VEB-9}}$-положителни изолата, ST357).

9. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

9.1. 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 **(IF$_{2023}$ 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. **(IF$_{2023}$ 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. **(IF$_{2023}$ 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. **(IF$_{2023}$ 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 **(IF$_{2023}$ 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 **(IF$_{2023}$ 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. **(IF$_{2023}$ 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. **(IF$_{2021}$ 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. **(IF$_{2020}$ 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. **(IF$_{2020}$ 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. **(IF$_{2019}$ 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 baimannii* and *Pseudomonas aeruginosa* – a pilot Bulgarian study. Infect. Dis. (Lond). 2019; 51 (11-12): 870-873. **(IF$_{2019}$ 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. **(IF$_{2019}$ 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. **(IF$_{2019}$ 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. **(IF$_{2019}$ 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. **(IF$_{2018}$ 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. **(IF$_{2012}$ 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. **(IF$_{2011}$ 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. **(IF_{2011} 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. **(IF_{2010} 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. **(IF_{2010} 0.632)**
22. **Strateva T.**, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. J. Med. Microbiol. 2009; 58 (9): 1133-1148. **(IF_{2010} 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. **(IF_{2008} 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. Кьолеян. 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 нозикомиални 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. Кьосева, **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, SJR$_{2016}$ 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, SJR$_{2009}$ 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**. Биофилм образуване от *Stenotrophomonas maltophilia*: етапи, участие в патогенезата на инфекциите и възможни терапевтични подходи. Детски и инфекциозни болести. 2018; 10 (2): 42-51.

9.2. Участия в научни форуми, свързани с дисертационния труд

1. **Стратева Т.**, Е. Кьолеян, 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. Биофилм 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 IMAB. 6-10 May 2010, Varna, Bulgaria. SY-19 "Current trends in investigations on bacterial resistance and pathogenicity". Journal of IMAB – 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**)

9.3. 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 типиране 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*“.

10. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Божкова М (2016) Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху епидемиологията и резистентността към антимикробни лекарствени средства в клинични изолати *Stenotrophomonas maltophilia*. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“. Медицински университет „Проф д-р Параскев Стоянов“ – Варна.
2. Божкова М (2018) Грам-отрицателни неферментиращи бактерии – клинично значение и нови възможности за терапия. Университетско издателство на МУ – Варна. ISBN: 978-619-221-149-3, Варна.
3. Българска Асоциация на Микробиолозите. Антибиотична резистентност на Грам-отрицателни бактерии 2018-2021. Антибиотична резистентност 2015-2017, v.1. https://bam-bg.net/index.php/bg/bulstar
4. Комитова Р (2018) За биофилмите и инфекциите, които причиняват. Детски и инфекциозни болести 10:18–24.
5. Петрова Г, Стратева Т, Переновска П (2011) Етиологичната структура на инфекциите на долните дихателни пътища при пациенти с муковисцидоза. InSpiro 15:40–43.
6. Петрова Г, Янева Н, Калчева М и съавт (2016) Пилотни данни от българския регистър на пациентите с муковисцидоза. Редки болести и лекарства сираци 7:11–16.
7. Савов Е, Трифонова А, Гергова И и съавт (2014) Резистентността към антибиотици – световно предизвикателство. Превантвна медицина III:3–9.
8. Стоева Т (2023) Антибиотична резистентност на най-честите причинители на бактериемии и леталитет, свързан с тях. Дисертационен труд за присъждане на научна степен „Доктор на науките“. Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.
9. Стоева Т (2009) Микробиологични и молекулярно-генетични изследвания върху епидемиологията и резистентността към антимикробни средства в клинични изолати *Acinetobacter baumannii*. Дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор“. Научна специалност „Микробиология“, 01.06.12. Висша Атестационна Комисия.
10. Стоева Т (2011) Вътреболнични инфекции, причинени от *Acinetobacter baumannii*. Български медицински журнал 5:7–12.
11. Стоева Т, Божкова К, Шивачев П и съавт (2007) Шънт-асоциирана инфекция причинена от *Stenotrophomonas maltophilia* при дете с вътрешна хидроцефалия. Педиатрия 1:33–36.
12. Стойков И (2023) Проучване върху геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) и вирулентността (вирулом) при екстензивно резистентни *Pseudomonas* spp. Автореферат на дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор“. Национален център по заразни и паразитни болести.
13. Стратева Т (2008) Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност и факторите на вирулентност на клинични щамове *Pseudomonas aeruginosa*. Дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор“. Научна специалност “Микробиология”, 01.06.12. Висша Атестационна Комисия.

14. Трифонова А (2020) Клинико-лабораторни и молекулярно-генетични проучвания върху нозокомиални инфекции, причинени от *Stenotrophomonas maltophilia*. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“. Медицински университет – София.

15. Abboud MI, Damblon C, Brem J, et al (2016) Interaction of Avibactam with Class B Metallo-β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 60:5655–5662. https://doi.org/10.1128/AAC.00897-16

16. Abd-Elmonsef MME, Maxwell SY (2022) Class 1, 2 and 3 integrons in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Tanta University Hospitals, Egypt. J Chemother 34:241–246. https://doi.org/10.1080/1120009X.2022.2031468

17. Abd El-Baky RM, Masoud SM, Mohamed DS, et al (2020) Prevalence and Some Possible Mechanisms of Colistin Resistance Among Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Drug Resist 13:323–332. https://doi.org/10.2147/IDR.S238811

18. Abdelaziz AA, Kamer AMA, Al-Monofy KB, Al-Madboly LA (2023) *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. Microb Cell Fact 22:110. https://doi.org/10.1186/S12934-023-02122-1

19. AboZahra R (2013) Quorum sensing and interspecies interactions in *Stenotrophomonas maltophilia*. Br Microbiol Res J 3:414–422

20. Adamek M, Overhage J, Bathe S, et al (2011) Genotyping of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and their pathogenic potential. PLoS One 6:e27615. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0027615

21. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, et al (2008) Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol 190:8053–8064. https://doi.org/10.1128/JB.00834-08

22. Adegoke AA, Okoh AI (2014) Antibiogram of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated From Nkonkobe Municipality, Eastern Cape Province, South Africa. Jundishapur J Microbiol 8:e13975. https://doi.org/10.5812/JJM.13975

23. Adegoke AA, Stenström TA, Okoh AI (2017) *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. Front Microbiol 8:2276. https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02276

24. Afgan E, Nekrutenko A, Grüning BA, et al (2022) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. Nucleic Acids Res 50:W345–W351. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC247

25. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM (2001) Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 45:583–588. https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.583-588.2001

26. Agarwal AK, Aggarwal K, Samanta R, et al (2019) Cluster endophthalmitis due to *Stenotrophomonas maltophilia* following intravitreal bevacizumab: outcomes of patients from North India. Br J Ophthalmol 103:1278–1283. https://doi.org/10.1136/BJOPHTHALMOL-2018-313131

27. Agnihotri N, Gupta V, Joshi RM (2004) Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms - A five-year study. Burns 30:241–243. https://doi.org/10.1016/j.burns.2003.11.010

28. Ahmad I, Nadeem A, Mushtaq F, et al (2023) Csu pili dependent biofilm formation and virulence of *Acinetobacter baumannii*. NPJ biofilms microbiomes 9:101. https://doi.org/10.1038/S41522-023-00465-6

29. Ahmad I, Nygren E, Khalid F, et al (2020) A Cyclic-di-GMP signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of *Acinetobacter baumannii* 17978. Sci Rep 10:1991. https://doi.org/10.1038/S41598-020-58522-5

30. Ahmed OB (2022) Detection of Antibiotic Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa* by Whole Genome Sequencing. Infect Drug Resist 15:6703. https://doi.org/10.2147/IDR.S389959

31. Ajiboye TO, Skiebe E, Wilharm G (2018) Contributions of ferric uptake regulator Fur to the sensitivity and oxidative response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics. Microb Pathog 119:35–41. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.03.060

32. Akhi MT, Khalili Y, Ghottaslou R, et al (2012) Prevalence of PER-1- type Extended-Spectrum Beta-Lactamaes in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Tabriz, Iran. Iran J Basic Med Sci 15:678

33. Akrami S, Ekrami A, Jahangirimehr | Fatemeh, et al (2024) High prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying integron and *exoA*, *exoS*, and *exoU* genes isolated from burn patients in Ahvaz, southwest Iran: A retrospective study. Heal Sci Reports 7:e2164. https://doi.org/10.1002/HSR2.2164

34. Al-Bayssari C, Valentini C, Gomez C, et al (2015) First detection of insertion sequence element ISPa1328 in the *oprD* porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from an idiopathic pulmonary fibrosis patient in Marseille, France. New microbes new Infect 7:26–27. https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2015.05.004

35. Al-Hamad A, Burnie J, Upton M (2011) Enhancement of antibiotic susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* using a polyclonal antibody developed against an ABC multidrug efflux pump. https://doi.org/101139/w11-076 57:820–828. https://doi.org/10.1139/W11-076

36. Al-Hassan L, Elbadawi H, Osman E, et al (2021) Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* From Khartoum State, Sudan. Front Microbiol 12:628736. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.628736

37. Al-Shamiri MM, Zhang S, Mi P, et al (2021) Phenotypic and genotypic characteristics of *Acinetobacter baumannii* enrolled in the relationship among antibiotic resistance, biofilm formation and motility. Microb Pathog 155:104922. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2021.104922

38. Alattraqchi AG, Mohd Rani F, A. Rahman NI, et al (2021) Complete Genome Sequencing of *Acinetobacter baumannii* AC1633 and *Acinetobacter nosocomialis* AC1530 Unveils a Large Multidrug-Resistant Plasmid Encoding the NDM-1 and OXA-58 Carbapenemases. mSphere 6:e01076-20. https://doi.org/10.1128/MSPHERE.01076-20

39. Alcaraz E, García C, Friedman L, De Rossi BP (2019) The rpf/DSF signalling system of *Stenotrophomonas maltophilia* positively regulates biofilm formation, production of virulence-associated factors and β-lactamase induction. FEMS Microbiol Lett 366:. https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNZ069

40. Alcaraz E, Garcia C, Papalia M, et al (2018) *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients exposed to invasive devices in a university hospital in Argentina: Molecular typing, susceptibility and detection of potential virulence factors. J Med Microbiol 67:992–1002. https://doi.org/10.1099/JMM.0.000764/CITE/REFWORKS

41. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N (2014) Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry 53:1565–1574. https://doi.org/10.1021/BI5000564/ASSET/IMAGES/LARGE/BI-2014-000564_0007.JPEG

42. Alenazi TA, Shaman MSB, Suliman DM, et al (2023) The Impact of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection in Critically Ill Patients with or without COVID-19 Infection. Healthc (Basel, Switzerland) 11:487. https://doi.org/10.3390/HEALTHCARE11040487

43. Alfiniyah C, Bees MA, Wood AJ (2019) Quorum machinery: Effect of the las system in rhl regulation of *P. aeruginosa*. AIP Conf Proc 2192: 060001. https://doi.org/10.1063/1.5139147/756164

44. Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen P, et al (2009) *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. Microbiology 155:3500–3508. https://doi.org/10.1099/MIC.0.031443-0/CITE/REFWORKS

45. Ali HM, Salem MZM, El-Shikh MS, et al (2017) Investigation of the Virulence Factors and Molecular Characterization of the Clonal Relations of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. J AOAC Int 100:152–158. https://doi.org/10.5740/JAOACINT.16-0139

46. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, et al (2000) Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. Infect Immun 68:3998–4004. https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.3998-4004.2000

47. Alosaimy S, Molina KC, Claeys KC, et al (2020) Early Experience With Eravacycline for Complicated Infections. Open forum Infect Dis 7: ofaa071. https://doi.org/10.1093/OFID/OFAA071

48. Alshalchi SA, Anderson GG (2015) Expression of the lipopolysaccharide biosynthesis gene lpxD affects biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. Arch Microbiol 197:135–145. https://doi.org/10.1007/S00203-014-1030-Y

49. Aly MM, Abu Alsoud NM, Elrobh MS, et al (2016) High prevalence of the PER-1 gene among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Riyadh, Saudi Arabia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 35:1759–1766. https://doi.org/10.1007/S10096-016-2723-8

50. Amala Reena Aa, Subramaniyan A, Kanungo R (2017) Biofilm formation as a virulence factor of *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogen in critical care units. J Curr Res Sci Med 3:74. https://doi.org/10.4103/JCRSM.JCRSM_66_17

51. Amirkamali S, Naserpour-Farivar T, Azarhoosh K, Peymani A (2017) Distribution of the *bla*$_{OXA}$,

bla$_{VEB-1}$, and *bla*$_{GES-1}$ genes and resistance patterns of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin, Iran. Rev Soc Bras Med Trop 50:315–320. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0478-2016

52. An SQ, Tang JL (2018a) The Ax21 protein influences virulence and biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. Arch Microbiol 200:183–187. https://doi.org/10.1007/s00203-017-1433-7

53. An SQ, Tang JL (2018b) Diffusible signal factor signaling regulates multiple functions in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. BMC Res Notes 11:569. https://doi.org/10.1186/S13104-018-3690-1

54. Anantharajah A, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F (2016) Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. Trends Pharmacol Sci 37:734–749. https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2016.05.011

55. Anđelković MV., Janković SM, Kostić MJ, et al (2019) Antimicrobial treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* invasive infections: Systematic review. J Chemother 31:297–306. https://doi.org/10.1080/1120009X.2019.1620405

56. Antunes LCS, Visca P, Towner KJ (2014) *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathog Dis 71:292–301. https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125

57. Aranda J, Bardina C, Beceiro A, et al (2011) *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. J Bacteriol 193:3740–3747. https://doi.org/10.1128/JB.00389-11

58. Araoka H, Baba M, Yoneyama A (2010) Risk factors for mortality among patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in Tokyo, Japan, 1996-2009. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 29:605–608. https://doi.org/10.1007/S10096-010-0882-6

59. Arca-Suárez J, Lasarte-Monterrubio C, Rodiño-Janeiro BK, et al (2021) Molecular mechanisms driving the in vivo development of OXA-10-mediated resistance to ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam during treatment of XDR *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Antimicrob Chemother 76:91–100. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA396

60. Ardebili A, Rastegar Lari A, Beheshti M, et al (2015) Association between mutations in *gyrA* and *parC* genes of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and ciprofloxacin resistance. Iran J Basic Med Sci 18:623–626. https://doi.org/10.22038/IJBMS.2015.4543

61. Arhin A, Boucher C (2010) The outer membrane protein OprQ and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human fibronectin. Microbiology 156:1415–1423. https://doi.org/10.1099/MIC.0.033472-0

62. Arkin AP, Cottingham RW, Henry CS, et al (2018) KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. Nat Biotechnol 36:566–569. https://doi.org/10.1038/NBT.4163

63. Armentrout EI, Kundracik EC, Rietsch A (2021) Cell-type-specific hypertranslocation of effectors by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Mol Microbiol 115:305–319. https://doi.org/10.1111/MMI.14617

64. Asadpour L (2018) Antimicrobial resistance, biofilm-forming ability and virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in northern Iran. J Glob Antimicrob Resist 13:214–220. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2018.01.018

65. Asif M, Alvi IA, Ur Rehman S (2018) Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. Infect Drug Resist 11:1249–1260. https://doi.org/10.2147/IDR.S166750

66. Asrat H, Samaroo-Campbell J, Ata S, Quale J (2023) Contribution of Iron-Transport Systems and β-Lactamases to Cefiderocol Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Endemic to New York City. Antimicrob Agents Chemother 67: e0023423. https://doi.org/10.1128/AAC.00234-23

67. Aubert D, Naas T, Héritier C, et al (2006) Functional Characterization of IS*1999*, an IS*4* Family Element Involved in Mobilization and Expression of β-Lactam Resistance Genes. J Bacteriol 188:6506-14. https://doi.org/10.1128/JB.00375-06

68. Auda IG, Ali Salman IM, Odah JG (2020) Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. Gene Reports 20:100666. https://doi.org/10.1016/J.GENREP.2020.100666

69. Avila-Calderón ED, Ruiz-Palma M del S, Aguilera-Arreola MG, et al (2021) Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. Front Microbiol 12: 557902. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.557902

70. Avison MB, von Heldreich CJ, Higgins CS, et al (2000) A TEM-2 beta-lactamase encoded on an active Tn*1*-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 46:879–884. https://doi.org/10.1093/JAC/46.6.879

71. Azak A, Kocak G, Huddam B, et al (2011) An unusual cause of continuous ambulatory peritoneal dialysis-associated outpatient peritonitis: *Stenotrophomonas maltophilia*. Am J Infect Control 39:618. https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2011.01.004

72. Azimi A, Aslanimehr M, Yaseri M, et al (2020) Distribution of *smf-1*, *rmlA*, *spgM* and *rpfF* genes among *Stenotrophomonas maltophilia* isolates in relation to biofilm-forming capacity. J Glob Antimicrob Resist 23:321–326. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2020.10.011

73. Azimi S, Kafil HS, Baghi HB, et al (2016) Presence of *exoY*, *exoS*, *exoU* and *exoT* genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. GMS Hyg Infect Control 11:Doc04. https://doi.org/10.3205/DGKH000264

74. Azizi O, Shahcheraghi F, Salimizand H, et al (2016) Molecular Analysis and Expression of *bap* Gene in Biofilm-Forming Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Reports Biochem Mol Biol 5:62

75. Azman A, Vasodavan K, Joseph N, et al (2019) Physiological and proteomic analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* grown under the iron-limited condition. Future Microbiol 14:1417–1428. https://doi.org/10.2217/FMB-2019-0174

76. Azzopardi EA, Azzopardi E, Camilleri L, et al (2014) Gram negative wound infection in hospitalised adult burn patients - systematic review and metanalysis. PLoS One 9: e95042. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0095042

77. Babu KN, Sheeja TE, Minoo D, et al (2021) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Derived Techniques. Methods Mol Biol 2222:219–247. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_13

78. Badave GK, Dhananjay K (2015) Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. J Clin Diagn Res 9:DC08. https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11014.5398

79. Badmasti F, Siadat SD, Bouzari S, et al (2015) Molecular detection of genes related to biofilm formation in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical settings. J Med Microbiol 64:559–564. https://doi.org/10.1099/JMM.0.000058

80. Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, et al (2002) Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS*1669*) located in *ampD*. Antimicrob Agents Chemother 46:3406–3411. https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3406-3411.2002

81. Bagge N, Schuster M, Hentzer M, et al (2004) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. Antimicrob Agents Chemother 48:1175–1187. https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1175-1187.2004

82. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, et al (2004) Detection of VIM-5 metallo-β-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. J Antimicrob Chemother 54:282–283. https://doi.org/10.1093/JAC/DKH321

83. Bai Y, Gong Y e., Shen F, et al (2024) Molecular epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in southeast Shanxi, China. J Glob Antimicrob Resist 36:301–306. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2023.12.029

84. Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K (2013) A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Nucleic Acids Res 41:1–20. https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1039

85. Balero de Paula S, Cayô R, Streling AP, et al (2017) Detection of $bla_{\text{VIM-7}}$ in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis 89:80–82. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2017.06.008

86. Ballarini A, Scalet G, Kos M, et al (2012) Molecular typing and epidemiological investigation of clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* using an oligonucleotide-microarray. BMC Microbiol 12:152. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-152

87. Ballesté-Delpierre C, Ramírez Á, Muñoz L, et al (2022) Assessment of In Vitro Cefiderocol Susceptibility and Comparators against an Epidemiologically Diverse Collection of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Antibiotics 11:187. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11020187

88. Barbieri JT, Sun J (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. Rev Physiol Biochem Pharmacol 152:79–92. https://doi.org/10.1007/S10254-004-0031-7

89. Barbolla R, Catalano M, Orman BE, et al (2004) Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Antimicrob Agents Chemother 48:666–669. https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.666-669.2004

90. Bardbari AM, Arabestani MR, Karami M, et al (2017) Correlation between ability of biofilm

formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. Microb Pathog 108:122–128. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.04.039

91. Bardoel BW, van der Ent S, Pel MJC, et al (2011) *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. PLoS Pathog 7: e1002206. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002206

92. Bardoel BW, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG, Milder FJ (2012) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence: characterization of the AprA-AprI interface and species selectivity. J Mol Biol 415:573–583. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2011.11.039

93. Barsky EE, Williams KA, Priebe GP, Sawicki GS (2017) Incident *Stenotrophomonas maltophilia* infection and lung function decline in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 52:1276–1282. https://doi.org/10.1002/PPUL.23781

94. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, et al (2005) Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 43:4382. https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005

95. Bassetti M, Russo C, Vena A, Giacobbe DR (2021) New antibiotics for the treatment of nonfermenting Gram-negative bacteria. Curr Opin Infect Dis 34:701. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000757

96. Bassetti M, Vena A, Castaldo N, et al (2022) Clinical evidence supporting cefiderocol for serious *Acinetobacter baumannii* infections. Curr Opin Infect Dis 35:545–551. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000880

97. Baumrin E, Piette EW, Micheletti RG (2017) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging multidrug-resistant opportunistic pathogen in the immunocompromised host. BMJ Case Rep 2017: bcr2017221053. https://doi.org/10.1136/BCR-2017-221053

98. Beceiro A, Tomás M, Bou G (2013) Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? Clin Microbiol Rev 26:185. https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12

99. Beckert U, Wolter S, Hartwig C, et al (2014) ExoY from *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for cGMP and cUMP formation. Biochem Biophys Res Commun 450:870–874. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.06.088

100. Bedos JP, Daikos G, Dodgson AR, et al (2021) Early identification and optimal management of carbapenem-resistant Gram-negative infection. J Hosp Infect 108:158–167. https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2020.12.001

101. Beg AZ, Khan AU (2019) Exploring bacterial resistome and resistance dessemination: an approach of whole genome sequencing. Future Med Chem 11:247–260. https://doi.org/10.4155/FMC-2018-0201

102. Behjati S, Tarpey PS (2013) What is next generation sequencing? Arch Dis Child Educ Pract Ed 98:236–238. https://doi.org/10.1136/ARCHDISCHILD-2013-304340

103. Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M (2021) It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the

Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiot (Basel, Switzerland) 10:1–29. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10010042

104. Behzadi P, Urbán E, Gajdács M (2020) Association between Biofilm-Production and Antibiotic Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): An In Vitro Study. Dis (Basel, Switzerland) 8:17. https://doi.org/10.3390/DISEASES8020017

105. Belzer A, Weiss E, Etaee F, et al (2022) *Stenotrophomonas maltophilia*, a Pathogen of Increasing Relevance to Dermatologists: A Case Report and Review of the Literature. Antibiot (Basel, Switzerland) 11:1398. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11101398

106. Belzunegui J, De Dios JR, Intxausti JJ et al. (2000) Septic arthritis caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Clin Exp Rheumatol 18:265

107. Bentancor L V., Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, et al (2012a) Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol 194:3950–3960. https://doi.org/10.1128/JB.06769-11

108. Bentancor L V., Routray A, Bozkurt-Guzel C, et al (2012b) Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections. Infect Immun 80:3381–3388. https://doi.org/10.1128/IAI.06096-11

109. Berdiev NS, Ziyavitdinov JF, Asrorov AM, et al (2019) Characterization of a novel lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Nov Biotechnol Chim 18:44-51–44–51. https://doi.org/10.2478/NBEC-2019-0006

110. Bergin SP, Coles A, Calvert SB, et al (2020) PROPHETIC: Prospective Identification of Pneumonia in Hospitalized Patients in the ICU. Chest 158:2370–2380. https://doi.org/10.1016/J.CHEST.2020.06.034

111. Beri S, Shandil A, Garg R (2017) *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging entity for cluster endophthalmitis. Indian J Ophthalmol 65:1166–1171. https://doi.org/10.4103/IJO.IJO_314_17

112. Berical A, Lee RE, Randell SH, Hawkins F (2019) Challenges Facing Airway Epithelial Cell-Based Therapy for Cystic Fibrosis. Front Pharmacol 10:. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00074

113. Bernardini A, Corona F, Dias R, et al (2015) The inactivation of RNase G reduces the *Stenotrophomonas maltophilia* susceptibility to quinolones by triggering the heat shock response. Front Microbiol 6:154620. https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01068/BIBTEX

114. Bernardini A, Martínez JL (2017) Genome-wide analysis shows that RNase G plays a global role in the stability of mRNAs in *Stenotrophomonas maltophilia*. Sci Reports 2017 71 7:1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16091-0

115. Berne C, Ducret A, Hardy GG, Brun Y V. (2015) Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. Microbiol Spectr 3:. https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.MB-0018-2015

116. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N (2002) Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother 50:11–18. https://doi.org/10.1093/JAC/DKF069

117. Bertini A, Giordano A, Varesi P, et al (2006) First Report of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* Isolates in Italy. Antimicrob Agents Chemother 50:2268. https://doi.org/10.1128/AAC.00166-06

118. Bezzerri V, d'Adamo P, Rimessi A, et al (2011) Phospholipase C-β3 is a key modulator of IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. J Immunol 186:4946–4958. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1003535

119. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, et al (2016) Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. BMC Pulm Med 16:1–22. https://doi.org/10.1186/S12890-016-0339-5/TABLES/2

120. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Shivakumar C, et al (2010) Etiology and antibacterial susceptibility pattern of community-acquired bacterial ocular infections in a tertiary eye care hospital in south India. Indian J Ophthalmol 58:497–507. https://doi.org/10.4103/0301-4738.71678

121. Bhaumik R, Aungkur NZ, Anderson GG (2023) A guide to *Stenotrophomonas maltophilia* virulence capabilities, as we currently understand them. Front Cell Infect Microbiol 13: 1322853. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2023.1322853

122. Bhuiyan MS, Ellett F, Murray GL, et al (2016) *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. Proc Natl Acad Sci U S A 113:9599–9604. https://doi.org/10.1073/PNAS.1523116113

123. Biagi M, Tan X, Wu T, et al (2020a) Activity of Potential Alternative Treatment Agents for *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Nonsusceptible to Levofloxacin and/or Trimethoprim-Sulfamethoxazole. J Clin Microbiol 58:. https://doi.org/10.1128/JCM.01603-19

124. Biagi M, Vialichka A, Jurkovic M, et al (2020b) Activity of Cefiderocol Alone and in Combination with Levofloxacin, Minocycline, Polymyxin B, or Trimethoprim-Sulfamethoxazole against Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 64: e00559-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00559-20

125. Biscaye S, Demonchy D, Afanetti M, et al (2017) Ecthyma gangrenosum, a skin manifestation of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in a previously healthy child: A case report. Medicine (Baltimore) 96:e5507. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005507

126. Bitar I, Salloum T, Merhi G, et al (2022) Genomic Characterization of Mutli-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates: Evaluation and Determination of Ceftolozane/Tazobactam Activity and Resistance Mechanisms. Front Cell Infect Microbiol 12:1. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.922976/FULL

127. Bocharova Y, Savinova T, Lazareva A, et al (2020) Genotypes, carbapenemase carriage, integron diversity and oprD alterations among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Russia. Int J Antimicrob Agents 55: 105899. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.105899

128. Bogaerts P, Naas T, Wybo I, et al (2006) Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. J Clin Microbiol 44:4189–4192. https://doi.org/10.1128/JCM.00796-06

129. Bonneau A, Roche B, Schalk IJ (2020) Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. Sci Rep 10:120. https://doi.org/10.1038/S41598-019-56913-X

130. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, et al (2011a) Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 55:349–354. https://doi.org/10.1128/AAC.00773-10

131. Bonnin RA, Poirel L, Licker M, Nordmann P (2011b) Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing β-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. Clin Microbiol Infect 17:1524–1528. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03622.X

132. Bonnin RA, Poirel L, Naas T, et al (2012) Dissemination of New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. Clin Microbiol Infect 18: E362-5. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2012.03928.X

133. Borges Duarte DF, Gonçalves Rodrigues A (2022) *Acinetobacter baumannii*: insights towards a comprehensive approach for the prevention of outbreaks in health-care facilities. APMIS 130:330–337. https://doi.org/10.1111/APM.13227

134. Bostanghadiri N, Ardebili A, Ghalavand Z, et al (2021) Antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-associated genes among *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. BMC Res Notes 14:151. https://doi.org/10.1186/S13104-021-05567-Y

135. Bostanghadiri N, Ghalavand Z, Fallah F, et al (2019) Characterization of Phenotypic and Genotypic Diversity of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Isolated From Selected Hospitals in Iran. Front Microbiol 10:1191. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01191

136. Botana-Rial M, Leiro-Fernández V, Núñez-Delgado M, et al (2016) A Pseudo-Outbreak of *Pseudomonas putida* and *Stenotrophomonas maltophilia* in a Bronchoscopy Unit. Respiration 92:274–278. https://doi.org/10.1159/000449137

137. Botelho J, Tüffers L, Fuss J, et al (2023) Phylogroup-specific variation shapes the clustering of antimicrobial resistance genes and defence systems across regions of genome plasticity in *Pseudomonas aeruginosa*. EBioMedicine 90: 104532. https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2023.104532

138. Bottone EJ, Reitano M, Janda JM, et al (1986) *Pseudomonas maltophilia* exoenzyme activity as correlate in pathogenesis of ecthyma gangrenosum. J Clin Microbiol 24:995–997. https://doi.org/10.1128/JCM.24.6.995-997.1986

139. Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J (2000) OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother 44:1556–1561. https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1556-1561.2000

140. Bouvet PJM, Grimont PAD (1987) Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. Ann l'Institut Pasteur / Microbiol 138:569–578. https://doi.org/10.1016/0769-2609(87)90042-1

141. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW (2020) Metallo-β-Lactamases: Structure,

Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. Antimicrob Agents Chemother 64:e00397-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00397-20

142. Bradbury RS, Roddam LF, Merritt A, et al (2010) Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 59:881–890. https://doi.org/10.1099/JMM.0.018283-0

143. Brízio A, Conceição T, Pimentel M, et al (2006) High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the -35 promoter region of class 1 integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Int J Antimicrob Agents 27:27–31. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2005.08.023

144. Brooke JS (2012) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev 25:2–41. https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11

145. Brooke JS (2021) Advances in the Microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev 34:e0003019. https://doi.org/10.1128/CMR.00030-19

146. Brooke JS (2014) New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. Expert Rev Anti Infect Ther 12:1–4. https://doi.org/10.1586/14787210.2014.864553

147. Brossard KA, Campagnari AA (2012) The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. Infect Immun 80:228–233. https://doi.org/10.1128/IAI.05913-11

148. Bucior I, Pielage JF, Engel JN (2012) *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. PLoS Pathog 8:e1002616. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002616

149. Buermans HPJ, den Dunnen JT (2014) Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochim Biophys Acta 1842:1932–1941. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2014.06.015

150. Bukhari SI, Aleanizy FS (2020) Association of OprF mutant and disturbance of biofilm and pyocyanin virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Saudi Pharm J SPJ Off Publ Saudi Pharm Soc 28:196–200. https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2019.11.021

151. Burrows LL (2012) *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. Annu Rev Microbiol 66:493–520. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-092611-150055

152. Burstein D, Satanower S, Simovitch M, et al (2015) Novel type III effectors in *Pseudomonas aeruginosa*. MBio 6:e00161. https://doi.org/10.1128/MBIO.00161-15

153. Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 54:969–976. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09

154. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 39:1211–1233. https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211

155. Butterworth MB, Zhang L, Heidrich EM, et al (2012) Activation of the epithelial sodium channel

(ENaC) by the alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 287:32556–32565. https://doi.org/10.1074/JBC.M112.369520

156. Cabot G, López-Causapé C, Ocampo-Sosa AA, et al (2016) Deciphering the resistome of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 175 international high-risk clone through whole-genome sequencing. Antimicrob Agents Chemother 60:7415–7423. https://doi.org/10.1128/AAC.01720-16/SUPPL_FILE/ZAC012165766SD1.XLSX

157. Cabrera Alvargonzalez JJ, Hernando AV, Martín MDR, et al (2014) Sequential outbreaks in a Spanish hospital caused by multiresistant OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* ST92. J Med Microbiol 63:1093–1098. https://doi.org/10.1099/JMM.0.067280-0

158. Calvopika K, Dulyayangkul P, Avisona MB (2020) Mutations in ribosomal protein RplA or treatment with ribosomal acting antibiotics activates production of aminoglycoside efflux pump smeYZ in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 64:e01524-19. https://doi.org/10.1128/AAC.01524-19/ASSET/F12D3A9F-3913-41CE-8142-B0CE918A6EA3/ASSETS/GRAPHIC/AAC.01524-19-F0003.JPEG

159. Calza L, Manfredi R, Chiodo F (2003) *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* as an emerging opportunistic pathogen in association with HIV infection: a 10-year surveillance study. Infection 31:155–161. https://doi.org/10.1007/S15010-003-3113-6

160. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, et al (2010) Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. PLoS Pathog 6:1–14. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000834

161. Camargo CH, Yamada AY, Nagamori FO, et al (2022) Clonal spread of ArmA- and OXA-23-coproducing *Acinetobacter baumannii* International Clone 2 in Brazil during the first wave of the COVID-19 pandemic. J Med Microbiol 71:. https://doi.org/10.1099/JMM.0.001509

162. Caneiras C, Calisto F, da Silva GJ, et al (2018) First Description of Colistin and Tigecycline-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing KPC-3 Carbapenemase in Portugal. Antibiot 2018, Vol 7, Page 96 7:96. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS7040096

163. Canton R, Doi Y, Simner PJ (2022) Treatment of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a case for cefiderocol. Expert Rev Anti Infect Ther 20:1077–1094. https://doi.org/10.1080/14787210.2022.2071701

164. Cao L, Srikumar R, Poole K (2004) MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. Mol Microbiol 53:1423–1436. https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2004.04210.X

165. Carruthers MD, Nicholson PA, Tracy EN, Munson RS (2013) *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. PLoS One 8:e59388. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0059388

166. Carvalho AS, Lagana D, Catford J, et al (2020) Bloodstream infections in neutropenic patients with haematological malignancies. Infect Dis Heal 25:22–29.

https://doi.org/10.1016/J.IDH.2019.08.006

167. Casilag F, Lorenz A, Krueger J, et al (2016) The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. Infect Immun 84:162. https://doi.org/10.1128/IAI.00939-15

168. Cassin EK, Tseng BS (2019) Pushing beyond the Envelope: the Potential Roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Pathogenicity. J Bacteriol 201:e00050-19. https://doi.org/10.1128/JB.00050-19

169. Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, et al (2009) Carbapenem Resistance among *Pseudomonas aeruginosa* Strains from India: Evidence for Nationwide Endemicity of Multiple Metallo-β-Lactamase Clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the Newly Characterized VIM-18). Antimicrob Agents Chemother 53:1225. https://doi.org/10.1128/AAC.01011-08

170. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, et al (2014) Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother 69:1804–1814. https://doi.org/10.1093/JAC/DKU048

171. Castanheira M, Deshpande LM, Woosley LN, et al (2018) Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including Enterobacteriaceae molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. J Antimicrob Chemother 73:3346–3354. https://doi.org/10.1093/JAC/DKY344

172. Castanheira M, Mendes RE, Gales AC (2023) Global Epidemiology and Mechanisms of Resistance of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex. Clin Infect Dis 76:S166–S178. https://doi.org/10.1093/CID/CIAD109

173. Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, et al (2004a) Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother 48:2344–2345. https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2344-2345.2004

174. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, et al (2004b) Molecular Characterization of a β-Lactamase Gene, $bla_{\text{GIM-1}}$, Encoding a New Subclass of Metallo-β-Lactamase. Antimicrob Agents Chemother 48:4654. https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4654-4661.2004

175. Castanheira M, Wanger A, Kruzel M, et al (2008) Emergence and clonal dissemination of OXA-24- and OXA-58-producing *Acinetobacter baumannii* strains in Houston, Texas: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Clin Microbiol 46:3179–3180. https://doi.org/10.1128/JCM.00988-08

176. Castillo-Ramírez S, Graña-Miraglia L (2019) Inaccurate Multilocus Sequence Typing of *Acinetobacter baumannii.* Emerg Infect Dis 25:186–187. https://doi.org/10.3201/EID2501.180374

177. Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, et al (2011) Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob

Chemother 66:2053–2056. https://doi.org/10.1093/JAC/DKR267

178. Catel-Ferreira M, Nehmé R, Molle V, et al (2012) Deciphering the function of the outer membrane protein OprD homologue of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 56:3826–3832. https://doi.org/10.1128/AAC.06022-11

179. Catho G, Martischang R, Boroli F, et al (2021) Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM carbapenemase in an intensive care unit and its termination by implementation of waterless patient care. Crit Care 25:1–10. https://doi.org/10.1186/S13054-021-03726-Y/FIGURES/3

180. Centers for Disease Control and Prevention. (2019) Antibiotic Resistance Threats in the United States. https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/2019-ar-threats-report-508.pdf

181. Cha MK, Kang CI, Kim SH, et al (2016) Emergence of fluoroquinolone-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in blood isolates causing bacteremia: molecular epidemiology and microbiologic characteristics. Diagn Microbiol Infect Dis 85:210–212. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2016.02.020

182. Chagas TPG, Carvalho KR, de Oliveira Santos IC, et al (2014) Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). Diagn Microbiol Infect Dis 79:468–472. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2014.03.006

183. Chakravarty B (2020) Genetic mechanisms of antibiotic resistance and virulence in *Acinetobacter baumannii*: background, challenges and future prospects. Mol Biol Rep 47:4037–4046. https://doi.org/10.1007/S11033-020-05389-4

184. Chalmers JD, Rother C, Salih W, Ewig S (2014) Healthcare-associated pneumonia does not accurately identify potentially resistant pathogens: a systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis 58:330–339. https://doi.org/10.1093/CID/CIT734

185. Chang YT, Lin CY, Chen YH, Hsueh PR (2015) Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. Front Microbiol 6:893. https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00893

186. Chatterjee S, Datta S, Roy S, et al (2016) Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* and Other *Acinetobacter* spp. Causing Neonatal Sepsis: Focus on NDM-1 and Its Linkage to IS*Aba125*. Front Microbiol 7:1126. https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01126

187. Chen CH, Huang CC, Chung TC, et al (2011a) Contribution of resistance-nodulation-division efflux pump operon smeU1-V-W-U2-X to multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 55:5826–5833. https://doi.org/10.1128/AAC.00317-11/ASSET/446BF06F-7EF4-4361-9139-EC8023C40C6E/ASSETS/GRAPHIC/ZAC9991003920001.JPEG

188. Chen CT, Wang YC, Kuo SC, et al (2018a) Community-acquired bloodstream infections caused by *Acinetobacter baumannii*: A matched case-control study. J Microbiol Immunol Infect 51:629–635. https://doi.org/10.1016/J.JMII.2017.02.004

189. Chen H, Wubbolts RW, Haagsman HP, Veldhuizen EJA (2018b) Inhibition and Eradication of

Pseudomonas aeruginosa Biofilms by Host Defence Peptides. Sci Rep 8:10446. https://doi.org/10.1038/S41598-018-28842-8

190. Chen TL, Chang WC, Kuo SC, et al (2010) Contribution of a plasmid-borne bla_{OXA-58} gene with its hybrid promoter provided by IS*1006* and an IS*Aba3*-like element to beta-lactam resistance in *Acinetobacter* genomic species 13TU. Antimicrob Agents Chemother 54:3107–3112. https://doi.org/10.1128/AAC.00128-10

191. Chen TL, Wu RCC, Shaio MF, et al (2008) Acquisition of a plasmid-borne bla_{OXA-58} gene with an upstream IS*1008* insertion conferring a high level of carbapenem resistance to *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 52:2573–2580. https://doi.org/10.1128/AAC.00393-08

192. Chen W (2015) Current advances and challenges in the development of *Acinetobacter* vaccines. Hum Vaccin Immunother 11:2495–2500. https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1052354

193. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y (2011b) Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. J Antimicrob Chemother 66:1255–1259. https://doi.org/10.1093/JAC/DKR082

194. Chen YY, Wu HC, Lin JW, Weng SF (2015) Functional properties of the major outer membrane protein in *Stenotrophomonas maltophilia*. J Microbiol 53:535–543. https://doi.org/10.1007/S12275-015-5202-5/METRICS

195. Chen Z, Erickson DL, Meng J (2020) Benchmarking hybrid assembly approaches for genomic analyses of bacterial pathogens using Illumina and Oxford Nanopore sequencing. BMC Genomics 21:631. https://doi.org/10.1186/S12864-020-07041-8

196. Cherubini S, Perilli M, Segatore B, et al (2022) Whole-Genome Sequencing of ST2 *A. baumannii* Causing Bloodstream Infections in COVID-19 Patients. Antibiot (Basel, Switzerland) 11:955. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11070955

197. Chesnutis EJ, Ng A, Kruse D, Stone PA (2018) *Stenotrophomonas maltophilia*: A Rare Case of Osteomyelitis After an Open Distal Tibial Fracture. J Foot Ankle Surg 57:1037–1041. https://doi.org/10.1053/J.JFAS.2018.03.001

198. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, et al (2017) Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. FEMS Microbiol Rev 41:698–722. https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX020

199. Chin CY, Gregg KA, Napier BA, et al (2015) A PmrB-Regulated Deacetylase Required for Lipid A Modification and Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 59:7911–7914. https://doi.org/10.1128/AAC.00515-15

200. Cho HH, Sung JY, Kwon KC, Koo SH (2012) Expression of Sme efflux pumps and multilocus sequence typing in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Ann Lab Med 32:38–43. https://doi.org/10.3343/ALM.2012.32.1.38

201. Choi AHK, Slamti L, Avci FY, et al (2009) The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. J Bacteriol 191:5953–5963. https://doi.org/10.1128/JB.00647-09

202. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, et al (2008a) *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A

targets the nucleus and induces cytotoxicity. Cell Microbiol 10:309–319. https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2007.01041.X

203. Choi CH, Lee EY, Lee YC, et al (2005) Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol 7:1127–1138. https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2005.00538.X

204. Choi CH, Lee JS, Lee YC, et al (2008b) *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. BMC Microbiol 8:216. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-216

205. Choi JJ, McCarthy MW (2018) Cefiderocol: a novel siderophore cephalosporin. Expert Opin Investig Drugs 27:193–197. https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1426745

206. Choi YJ, Kim YA, Junglim K, et al (2023) Emergence of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 773 Clone: Shift of Carbapenemase Molecular Epidemiology and Spread of 16S rRNA Methylase Genes in Korea. Ann Lab Med 43:196–199. https://doi.org/10.3343/ALM.2023.43.2.196

207. Chong SY, Lee K, Chung HS, et al (2017) Levofloxacin Efflux and *smeD* in Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Microb Drug Resist 23:163–168. https://doi.org/10.1089/MDR.2015.0228

208. Chowdhury PR, Scott M, Worden P, et al (2016) Genomic islands 1 and 2 play key roles in the evolution of extensively drug-resistant ST235 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Open Biol 6: 150175. https://doi.org/10.1098/RSOB.150175

209. Chowdhury PR, Scott MJ, Djordjevic SP (2017) Genomic islands 1 and 2 carry multiple antibiotic resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* ST235, ST253, ST111 and ST175 and are globally dispersed. J Antimicrob Chemother 72:620–622. https://doi.org/10.1093/JAC/DKW471

210. Chumbita M, Monzo-Gallo P, Lopera-Mármol C, et al (2022) New treatments for multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli Infections. Rev Esp Quimioter 35 Suppl 3:51–53. https://doi.org/10.37201/REQ/S03.12.2022

211. Chung HS, Hong SG, Kim YR, et al (2013) Antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Korea, and the activity of antimicrobial combinations against the isolates. J Korean Med Sci 28:62–66. https://doi.org/10.3346/JKMS.2013.28.1.62

212. Chung HS, Kim K, Hong SS, et al (2015) The *sul1* gene in *Stenotrophomonas maltophilia* with high-level resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole. Ann Lab Med 35:246–249. https://doi.org/10.3343/ALM.2015.35.2.246

213. Čiginskienė A, Dambrauskienė A, Rello J, Adukauskienė D (2019) Ventilator-Associated Pneumonia due to Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Risk Factors and Mortality Relation with Resistance Profiles, and Independent Predictors of In-Hospital Mortality. Medicina (Kaunas) 55:49. https://doi.org/10.3390/MEDICINA55020049

214. Ciofu O, Tolker-Nielsen T (2019) Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. Front Microbiol 10:913.

https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00913

215. Çıkman A, Parlak M, Bayram Y, et al (2016) Antibiotics resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from various clinical specimens. Afr Health Sci 16:149–152. https://doi.org/10.4314/AHS.V16I1.20

216. Claeys G, Verschraegen G, De Baere T, Vaneechoutte M (2000) PER-1 beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. J Antimicrob Chemother 45:924–925. https://doi.org/10.1093/JAC/45.6.924

217. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN (2011) Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. Microbiology 157:2534–2544. https://doi.org/10.1099/MIC.0.049791-0

218. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2020) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-066-9 [Print]; ISBN 978-1-68440-067-6 [Electronic]). https://clsi.org/

219. Cody WL, Pritchett CL, Jones AK, et al (2009) *Pseudomonas aeruginosa* AlgR controls cyanide production in an AlgZ-dependent manner. J Bacteriol 191:2993–3002. https://doi.org/10.1128/JB.01156-08

220. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D (2006) Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. Antimicrob Agents Chemother 50:756–758. https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.756-758.2006

221. Cogen J, Emerson J, Sanders DB, et al (2015) Risk factors for lung function decline in a large cohort of young cystic fibrosis patients. Pediatr Pulmonol 50:763–770. https://doi.org/10.1002/PPUL.23217

222. Conibear TCR, Willcox MDP, Flanagan JL, Zhu H (2012) Characterization of protease IV expression in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. J Med Microbiol 61:180–190. https://doi.org/10.1099/JMM.0.034561-0

223. Cooke AC, Florez C, Dunshee EB, et al (2020) *Pseudomonas* Quinolone Signal-Induced Outer Membrane Vesicles Enhance Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. mSphere 5: e01109-20. https://doi.org/10.1128/MSPHERE.01109-20/SUPPL_FILE/MSPHERE.01109-20-ST002.DOCX

224. Coppola N, Maraolo AE, Onorato L, et al (2022) Epidemiology, Mechanisms of Resistance and Treatment Algorithm for Infections Due to Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria: An Expert Panel Opinion. Antibiotics (Basel) 11:1263. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11091263

225. Corlouer C, Lamy B, Desroches M, et al (2017) *Stenotrophomonas maltophilia* healthcare-associated infections: identification of two main pathogenic genetic backgrounds. J Hosp Infect 96:183–188. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.02.003

226. Cornelis P (2020) Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. Microbiologyopen 9:e962. https://doi.org/10.1002/MBO3.962

227. Cornelis P, Dingemans J (2013) *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. Front Cell Infect Microbiol 4:71138.

https://doi.org/10.3389/FCIMB.2013.00075/BIBTEX

228. Correia CR, Ferreira ST, Nunes P (2014) *Stenotrophomonas maltophilia*: rare cause of meningitis. Pediatr Int 56:e21–e22. https://doi.org/10.1111/PED.12352

229. Cosgaya C, Marí-Almirall M, Van Assche A, et al (2016) *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int J Syst Evol Microbiol 66:4105–4111. https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001318

230. Costa-Júnior SD, da Silva AMCM, Niedja da Paz Pereira J, et al (2021) Emergence of *rmtD1* gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying bla_{KPC} and/or bla_{VIM-2} genes in Brazil. Braz J Microbiol 52:1959–1965. https://doi.org/10.1007/S42770-021-00576-2

231. Coyne S, Courvalin P, Périchon B (2011) Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother 55:947–953. https://doi.org/10.1128/AAC.01388-10

232. Craig L, Pique ME, Tainer JA (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2:363–378. https://doi.org/10.1038/NRMICRO885

233. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, et al (2004) Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. J Clin Microbiol 42:5094–5101. https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5094-5101.2004

234. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, et al (2008) The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. Genome Biol 9:R74. https://doi.org/10.1186/GB-2008-9-4-R74

235. Croughs PD, Klaassen CHW, van Rosmalen J, et al (2018) Unexpected mechanisms of resistance in Dutch *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected during 14 years of surveillance. Int J Antimicrob Agents 52:407–410. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2018.05.009

236. Cruz-Córdova A, Mancilla-Rojano J, Luna-Pineda VM, et al (2020) Molecular Epidemiology, Antibiotic Resistance, and Virulence Traits of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Associated With an Outbreak in a Mexican Tertiary Care Hospital. Front Cell Infect Microbiol 10:50. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00050

237. Curran B, Jonas D, Grundmann H, et al (2004) Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 42:5644. https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004

238. Cuthbertson L, Mainprize IL, Naismith JH, Whitfield C (2009) Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 73:155–177. https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-08

239. D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, et al (2009) Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). Clin Microbiol Infect 15:347–357. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2009.02668.X

240. D'Onofrio V, Conzemius R, Varda-Brkić D, et al (2020) Epidemiology of colistin-resistant,

carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Croatia. Infect Genet Evol 81:104263. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104263

241. Da silva AMCM, Júnior SDC, Lima JLC, et al (2021) Investigation of the association of virulence genes and biofilm production with infection and bacterial colonization processes in multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. An Acad Bras Cienc 93(suppl 3):e20210245. https://doi.org/10.1590/0001-3765202120210245

242. Daaboul D, Osman M, Kassem II, et al (2024) Neonatal sepsis due to NDM-1 and VIM-2 co-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Morocco. J Antimicrob Chemother 79:1614–1618. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAE153

243. Daikos GL, da Cunha CA, Rossolini GM, et al (2021) Review of Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics (Basel) 10:1126. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10091126

244. Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, et al (2008) AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 52:557–562. https://doi.org/10.1128/AAC.00732-07/ASSET/8F4FE06F-AE14-4739-AC6D-43770ACD11D8/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0020870690002.JPEG

245. Dauner M, Skerra A (2020) Scavenging Bacterial Siderophores with Engineered Lipocalin Proteins as an Alternative Antimicrobial Strategy. ChemBioChem 21:601–606. https://doi.org/10.1002/CBIC.201900564

246. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 185:1027–1036. https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1027-1036.2003

247. Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ (2005) Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. Emerg Infect Dis 11:1218–1224. https://doi.org/10.3201/1108.050103

248. de Lima CDM, Calegari-Silva TC, Pereira RMS, et al (2012) ExoU activates NF-κB and increases IL-8/KC secretion during *Pseudomonas aeruginosa* infection. PLoS One 7:e41772. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0041772

249. de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, et al (2003) Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. Cell Microbiol 5:625–636. https://doi.org/10.1046/J.1462-5822.2003.00306.X

250. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, et al (2020) Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Clin Microbiol Rev 33:e00181-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19/ASSET/3E4D6196-21E6-4155-9313-1CCEB9570E66/ASSETS/GRAPHIC/CMR.00181-19-F0001.JPEG

251. de Rossi BP, García C, Alcaraz E, Franco M (2014) *Stenotrophomonas maltophilia* interferes via the DSF-mediated quorum sensing system with Candida albicans filamentation and its planktonic and biofilm modes of growth. Rev Argent Microbiol 46:288–297. https://doi.org/10.1016/S0325-

7541(14)70084-7

252. De Sá Cavalcanti FL, Mendes-Marques CL, Vasconcelos CRDS, et al (2017) High Frequency of OXA-253-Producing *Acinetobacter baumannii* in Different Hospitals in Recife, Brazil. Antimicrob Agents Chemother 61:e01309-16. https://doi.org/10.1128/AAC.01309-16

253. de Sousa T, Hébraud M, Enes Dapkevicius MLN, et al (2021) Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Sci 22:12892. https://doi.org/10.3390/IJMS222312892

254. Dedeić-Ljubović A, Granov Đ, Hukić M (2015) Emergence of extensive drug-resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii* in the Clinical Center University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. Med Glas (Zenica) 12:169–176. https://doi.org/10.17392/809-15

255. del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Oliver A (2020) *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β-lactamases: 2020 update. Int J Antimicrob Agents 56:106196. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106196

256. Delgado-Valverde M, Conejo MDC, Serrano L, et al (2020) Activity of cefiderocol against high-risk clones of multidrug-resistant *Enterobacterales*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 75:1840–1849. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA117

257. Demiraslan H, Sevim M, Pala Ç, et al (2013) Risk factors influencing mortality related to *Stenotrophomonas maltophilia* infection in hematology-oncology patients. Int J Hematol 97:414–420. https://doi.org/10.1007/S12185-013-1296-X

258. Denton M, Kerr KG (1998) Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev 11:57–80. https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.57

259. Depka D, Bogiel T, Rzepka M, Gospodarek-Komkowska E (2023) The Prevalence of Virulence Factor Genes among Carbapenem-Non-Susceptible *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains and Their Usefulness as Potential Molecular Biomarkers of Infection. Diagnostics (Basel, Switzerland) 13:1036. https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS13061036

260. Deshpande LM, Davies TA, Blandino G, et al (2013) IMP-33, a New IMP Variant Detected in *Pseudomonas aeruginosa* from Sicily. Antimicrob Agents Chemother 57:6401. https://doi.org/10.1128/AAC.02532-12

261. Devos S, Stremersch S, Raemdonck K, et al (2016) Intra-and interspecies effects of outer membrane vesicles from *Stenotrophomonas maltophilia* on β-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 60:2516–2518. https://doi.org/10.1128/AAC.02171-15/ASSET/3070A1C5-A689-4C9A-8F7E-AF28E56C079B/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0041649830002.JPEG

262. Devos S, Van Oudenhove L, Stremersch S, et al (2015) The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. Front Microbiol 6:139368. https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00298/ABSTRACT

263. Devos S, Van Putte W, Vitse J, et al (2017) Membrane vesicle secretion and prophage induction

in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress. Environ Microbiol 19:3930–3937. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13793

264. Dexter C, Murray GL, Paulsen IT, Peleg AY (2015) Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. Expert Rev Anti Infect Ther 13:567–573. https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1025055

265. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, et al (2006) Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. FEMS Microbiol Lett 256:145–150. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00112.X

266. Di Venanzio G, Flores-Mireles AL, Calix JJ, et al (2019) Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes. Nat Commun 10:2763. https://doi.org/10.1038/S41467-019-10706-Y

267. Diancourt L, Passet V, Nemec A, et al (2010) The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool. PLoS One 5:e10034. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010034

268. Diekema DJ, Hsueh PR, Mendes RE, et al (2019) The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother 63:e00355-19. https://doi.org/10.1128/AAC.00355-19

269. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol 5:939–951. https://doi.org/10.1038/NRMICRO1789

270. Dimopoulos G, Garnacho-Montero J, Paramythiotou E, et al (2023) Upraising *Stenotrophomonas maltophilia* in Critically Ill Patients: A New Enemy? Diagnostics (Basel, Switzerland) 13:1106. https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS13061106

271. Djordjevic ZM, Folic MM, Folic ND, et al (2016) Risk factors for hospital infections caused by carbapanem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Infect Dev Ctries 10:1073–1080. https://doi.org/10.3855/JIDC.8231

272. Doi Y, Arakawa Y (2007) 16S ribosomal RNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis 45:88–94. https://doi.org/10.1086/518605/2/45-1-88-TBL003.GIF

273. Doi Y, De Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL (2007) Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. Antimicrob Agents Chemother 51:852–856. https://doi.org/10.1128/AAC.01345-06

274. Doi Y, Wachino JI, Yamane K, et al (2004) Spread of novel aminoglycoside resistance gene aac(6')-Iad among *Acinetobacter* clinical isolates in Japan. Antimicrob Agents Chemother 48:2075–2080. https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2075-2080.2004

275. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young HK (2000) Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92.

Antimicrob Agents Chemother 44:196–199. https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.196-199.2000

276. Dönhöfer A, Franckenberg S, Wickles S, et al (2012) Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 109:16900–16905. https://doi.org/10.1073/PNAS.1208037109/SUPPL_FILE/SAPP.PDF

277. Dortet L, Bonnin RA, Bernabeu S, et al (2016) First Occurrence of OXA-72-Producing *Acinetobacter baumannii* in Serbia. Antimicrob Agents Chemother 60:5724–5730. https://doi.org/10.1128/AAC.01016-16

278. Dos Santos PAS, Rodrigues YC, Marcon DJ, et al (2023) Endemic High-Risk Clone ST277 Is Related to the Spread of SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* during the COVID-19 Pandemic Period in Northern Brazil. Microorganisms 11:2069. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11082069

279. Dössel J, Meyer-Hoffert U, Schröder JM, Gerstel U (2012) *Pseudomonas aeruginosa*-derived rhamnolipids subvert the host innate immune response through manipulation of the human beta-defensin-2 expression. Cell Microbiol 14:1364–1375. https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2012.01801.X

280. Doughty EL, Liu H, Moran RA, et al (2023) Endemicity and diversification of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. Lancet Reg Heal - West Pacific 37:100780. https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2023.100780

281. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, et al (2010) Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. Science 327:78–81. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1181498

282. Du X, Youle RJ, FitzGerald DJ, Pastan I (2010) *Pseudomonas* exotoxin A-mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1. Mol Cell Biol 30:3444–3452. https://doi.org/10.1128/MCB.00813-09

283. Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G (2013) Flagella and bacterial pathogenicity. J Basic Microbiol 53:1–8. https://doi.org/10.1002/JOBM.201100335

284. Dubois V, Poirel L, Marie C, et al (2002) Molecular characterization of a novel class 1 integron containing $bla_{(GES-1)}$ and a fused product of *aac3-Ib/aac6'-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 46:638–645. https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.638-645.2002

285. Duljasz W, Gniadkowski M, Sitter S, et al (2009) First Organisms with Acquired Metallo-β-Lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) Reported in Austria. Antimicrob Agents Chemother 53:2221. https://doi.org/10.1128/AAC.01573-08

286. Dulyayangkul P, Charoenlap N, Srijaruskul K, et al (2016) Major facilitator superfamily MfsA contributes to multidrug resistance in emerging nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 71:2990–2991. https://doi.org/10.1093/JAC/DKW233

287. DuMont AL, Cianciotto NP (2017) *Stenotrophomonas maltophilia* Serine Protease StmPr1 Induces Matrilysis, Anoikis, and Protease-Activated Receptor 2 Activation in Human Lung Epithelial

Cells. Infect Immun 85:e00544-17. https://doi.org/10.1128/IAI.00544-17

288. DuMont AL, Karaba SM, Cianciotto NP (2015) Type II secretion-dependent degradative and cytotoxic activities mediated by *Stenotrophomonas maltophilia* serine proteases StmPr1 and StmPr2. Infect Immun 83:3825–3837. https://doi.org/10.1128/IAI.00672-15/SUPPL_FILE/ZII999091394SO1.PDF

289. Dupont M, Pagès JM, Lafitte D, et al (2005) Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. J Proteome Res 4:2386–2390. https://doi.org/10.1021/PR050143Q

290. Durán-Manuel EM, Cruz-Cruz C, Ibáñez-Cervantes G, et al (2021) Clonal dispersion of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit designed to patients COVID-19. J Infect Dev Ctries 15:58–68. https://doi.org/10.3855/JIDC.13545

291. Ece G, Erac B, Limoncu MH, et al (2014) *Stenotrophomonas maltophilia* Pseudo-outbreak at a University Hospital Bronchoscopy Unit in Turkey. West Indian Med J 63:59. https://doi.org/10.7727/WIMJ.2013.005

292. Edberg SC, Gallo P, Kontnick C, et al (1996) Analysis of the Virulence Characteristics of Bacteria Isolated from Bottled, Water Cooler, and Tap Water. Microb Ecol Health Dis 9:67–77. https://doi.org/10.3109/08910609609166445

293. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32:1792–1797. https://doi.org/10.1093/NAR/GKH340

294. Ehmann DE, Jahić H, Ross PL, et al (2013) Kinetics of avibactam inhibition against class A, C, and D β-lactamases. J Biol Chem 288:27960–27971. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.485979

295. Eikelenboom-Boskamp A, Haaijman J, Bos M, et al (2019) Dutch guideline for preventing nosocomial transmission of highly-resistant micro-organisms (HRMO) in long-term care facilities (LTCFs). Antimicrob Resist Infect Control 8:146. https://doi.org/10.1186/S13756-019-0586-3

296. El-Mahdy TS (2014) Identification of a novel metallo-β-lactamase VIM-28 located within unusual arrangement of class 1 integron structure in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Egypt. Jpn J Infect Dis 67:382–384. https://doi.org/10.7883/yoken.67.382

297. El-Sayed Ahmed MAEG, Zhong LL, Shen C, et al (2020) Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). Emerg Microbes Infect 9:868–885. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133

298. El Mrimar N, Belouad EM, Benaissa E, et al (2024) Genetic alterations in the *pmrAB* two-component system and lipid A biosynthesis genes of polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Acta Microbiol Immunol Hung 71:134–139. https://doi.org/10.1556/030.2024.02268

299. ElBaradei A, Yakout MA (2022) *Stenotrophomonas maltophilia*: Genotypic Characterization of Virulence Genes and The Effect of Ascorbic Acid on Biofilm Formation. Curr Microbiol 79:180. https://doi.org/10.1007/S00284-022-02869-7

300. Elgohari S, Wilson J, Saei A, et al (2017) Impact of national policies on the microbial aetiology of surgical site infections in acute NHS hospitals in England: analysis of trends between 2000 and 2013 using multi-centre prospective cohort data. Epidemiol Infect 145:957–969.

https://doi.org/10.1017/S0950268816003058

301. Elhosseiny NM, Amin MA, Yassin AS, Attia AS (2015) *Acinetobacter baumannii* universal stress protein A plays a pivotal role in stress response and is essential for pneumonia and sepsis pathogenesis. Int J Med Microbiol 305:114–123. https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2014.11.008

302. Elhosseiny NM, El-Tayeb OM, Yassin AS, et al (2016) The secretome of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 type II secretion system reveals a novel plasmid encoded phospholipase that could be implicated in lung colonization. Int J Med Microbiol 306:633–641. https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2016.09.006

303. Elkheloui R, Laktib A, Mimouni R, et al (2020) *Acinetobacter baumannii* Biofilm: Intervening Factors, Persistence, Drug Resistance, and Strategies of Treatment. Mediterr J Infect Microbes Antimicrob 9:7. https://doi.org/10.4274/MJIMA.GALENOS.2020.2020.7

304. Empel J, Filczak K, Mrówka A, et al (2007) Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. J Clin Microbiol 45:2829–2834. https://doi.org/10.1128/JCM.00997-07

305. Enzor R, Bowers EMR, Perzia B, et al (2021) Comparison of Clinical Features and Treatment Outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis in Contact Lens and Non-Contact Lens Wearers. Am J Ophthalmol 227:1–11. https://doi.org/10.1016/J.AJO.2021.02.024

306. Epelman S, Stack D, Bell C, et al (2004) Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. J Immunol 173:2031–2040. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.173.3.2031

307. Erridge C, Moncayo-Nieto OL, Morgan R, et al (2007) *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. J Med Microbiol 56:165–171. https://doi.org/10.1099/JMM.0.46823-0

308. Espinal P, Fugazza G, López Y, et al (2011) Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. Antimicrob Agents Chemother 55:5396–5398. https://doi.org/10.1128/AAC.00679-11

309. European Centre for Disease Prevention and Control (2023a) Annual Epidemiological Report for 2018 - Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-intensive-care-units-annual-epidemiological-0

310. European Centre for Disease Prevention and Control (2024) Annual Epidemiological Report for 2020 - Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/healthcare-associated-infections-intensive-care-units-annual-epidemiological-report-2020.pdf

311. European Centre for Disease Prevention and Control (2018) Annual Epidemiological Report for 2016 - Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-intensive-care-units-annual-epidemiological-0

312. European Centre for Disease Prevention and Control (2022) Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2020. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-eueea-ears-net-annual-epidemiological-report-2020

313. European Centre for Disease Prevention and Control (2023b) Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-NET) - Annual Epidemiological Report 2022. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-consumption-europe-2022. Accessed 18 Feb 2024

314. European Centre for Disease Prevention and Control (2023c) Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2022. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2022

315. European Centre for Disease Prevention and Control (2017) Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC

316. European Centre for Disease Prevention and Control (2023d) Annual Epidemiological Report for 2019 – Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. Stockholm: ECDC

317. European Commission (2017) A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). https://health.ec.europa.eu/publications/european-one-health-action-plan-against-antimicrobial-resistance-amr_en

318. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2023) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 13.1. http://www.eucast.org

319. European Medicines Agency (2020a) An Overview of Zavicefta and Why It Is Authorised in the EU. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zavicefta-epar-medicine-overview_en.pdf

320. European Medicines Agency (2018) EMA Assessment Report-Vabomere. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/vabomere-epar-public-assessment-report_en.pdf

321. European Medicines Agency (2020b) Fetcroja (cefiderocol). An overview of Fetcroja and why it is authorised in the EU. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/fetcroja

322. Evdokiou A, Kanisicak O, Gierek S, et al (2020) Characterization of Burn Eschar Pericytes. J Clin Med 9:606. https://doi.org/10.3390/JCM9020606

323. Eze EC, Chenia HY, El Zowalaty ME (2018) *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. Infect Drug Resist 11:2277–2299. https://doi.org/10.2147/IDR.S169894

324. Fajardo Bonin R, Chapeaurouge A, Perales J, et al (2014) Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacter baumannii* using a proteomic approach. Proteomics Clin Appl 8:916–923. https://doi.org/10.1002/PRCA.201300133

325. Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, Dimopoulos G (2009) Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis

28:719–730. https://doi.org/10.1007/S10096-009-0709-5

326. Falagas ME, Valkimadi PE, Huang YT, et al (2008) Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. J Antimicrob Chemother 62:889–894. https://doi.org/10.1093/JAC/DKN301

327. Falcone M, Tiseo G, Leonildi A, et al (2022) Cefiderocol- Compared to Colistin-Based Regimens for the Treatment of Severe Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 66:e0214221. https://doi.org/10.1128/AAC.02142-21

328. Falcone M, Tiseo G, Nicastro M, et al (2021) Cefiderocol as Rescue Therapy for *Acinetobacter baumannii* and Other Carbapenem-resistant Gram-negative Infections in Intensive Care Unit Patients. Clin Infect Dis 72:2021–2024. https://doi.org/10.1093/CID/CIAA1410

329. Fang Z li, Zhang L yan, Huang Y min, et al (2014) OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. Infect Genet Evol 21:124–128. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2013.10.027

330. Fatmawati NND, Suwardana GNR, Dharmika IAGW, et al (2023) Early detection of a possible multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in the local hospital setting by using random amplified polymorphism DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR), oxacillinase gene profiles, and antibiograms. Iran J Microbiol 15:642. https://doi.org/10.18502/IJM.V15I5.13870

331. Fazeli N, Momtaz H (2014) Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iranian Hospital Infections. Iran Red Crescent Med J 16:e15722. https://doi.org/10.5812/IRCMJ.15722

332. Feltman H, Schulert G, Khan S, et al (2001) Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 147:2659–2669. https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659

333. Feng W, Lv J, Wang H, et al (2022) The first report of the $bla_{\text{IMP-10}}$ gene and complete sequence of the IMP-10-encoding plasmid p12NE515 from *Pseudomonas aeruginosa* in China. Acta Trop 228:106326. https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2022.106326

334. Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, et al (2003) Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 51:565–574. https://doi.org/10.1093/JAC/DKG097

335. Fernández-Cuenca F, Smani Y, Gómez-Sánchez MC, et al (2011) Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. Int J Antimicrob Agents 38:548–549. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2011.08.002

336. Ferous S, Anastassopoulou C, Pitiriga V, et al (2024) Antimicrobial and Diagnostic Stewardship of the Novel β-Lactam/β-Lactamase Inhibitors for Infections Due to Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiot (Basel, Switzerland) 13:285. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS13030285

337. Ferreira ML, Dantas RC, Faria ALS, et al (2015) Molecular epidemiological survey of the quinolone- and carbapenem-resistant genotype and its association with the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 64:262–271. https://doi.org/10.1099/JMM.0.000023

338. Ferreiro JLL, Otero JÁ, González LG, et al (2017) *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. PLoS One 12:e0178178. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0178178

339. Fiester SE, Arivett BA, Schmidt RE, et al (2016) Iron-Regulated Phospholipase C Activity Contributes to the Cytolytic Activity and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. PLoS One 11:e0167068. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0167068

340. Figueirêdo PMS, Furumura MT, Santos AM, et al (2006) Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. Lett Appl Microbiol 43:443–449. https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2006.01965.X

341. Findlay J, Nordmann P, Bouvier M, et al (2023) Dissemination of ArmA- and OXA-23-co-producing *Acinetobacter baumannii* Global Clone 2 in Switzerland, 2020-2021. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. https://doi.org/10.1007/S10096-023-04643-4

342. Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF (2004) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. J Clin Microbiol 42:5783–5792. https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5783-5792.2004

343. Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, et al (2011) Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. Infect Immun 79:1176–1186. https://doi.org/10.1128/IAI.00850-10

344. Flamm RK, Castanheira M, Streit JM, Jones RN (2016) Minocycline activity tested against *Acinetobacter baumannii* complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia* species complex isolates from a global surveillance program (2013). Diagn Microbiol Infect Dis 85:352–355. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2016.03.019

345. Flamm RK, Shortridge D, Castanheira M, et al (2019) *In Vitro* Activity of Minocycline against U.S. Isolates of *Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus* Species Complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia* Complex: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2014 to 2018. Antimicrob Agents Chemother 63:e01154-19. https://doi.org/10.1128/AAC.01154-19

346. Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269:496–512. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7542800

347. Flores-Díaz M, Monturiol-Gross L, Naylor C, et al (2016) Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. Microbiol Mol Biol Rev 80:597–628. https://doi.org/10.1128/MMBR.00082-15

348. Flores-Treviño S, Bocanegra-Ibarias P, Camacho-Ortiz A, et al (2019) *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm: its role in infectious diseases. Expert Rev Anti Infect Ther 17:877–893. https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1685875

349. Flores-Treviño S, Gutiérrez-Ferman JL, Morfín-Otero R, et al (2014) *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. J Med Microbiol 63:1524–1530. https://doi.org/10.1099/JMM.0.074385-0

350. Florez C, Raab JE, Cooke AC, Schertzer JW (2017) Membrane Distribution of the *Pseudomonas* Quinolone Signal Modulates Outer Membrane Vesicle Production in *Pseudomonas aeruginosa*. MBio 8:e01034-17. https://doi.org/10.1128/MBIO.01034-17

351. Fluit AC, Bayjanov JR, Aguilar MD, et al (2022) Taxonomic position, antibiotic resistance and virulence factor production by *Stenotrophomonas i*solates from patients with cystic fibrosis and other chronic respiratory infections. BMC Microbiol 22:129. https://doi.org/10.1186/S12866-022-02466-5

352. Fonseca ÉL, Morgado SM, Caldart R V., et al (2022) Emergence of a VIM-2-producing extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* ST309 in South America: a comparative genomic analysis. Int J Antimicrob Agents 59:106507. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2021.106507

353. Fonseca ÉL, Vieira V V., Cipriano R, Vicente ACP (2005) Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. FEMS Immunol Med Microbiol 44:303–309. https://doi.org/10.1016/J.FEMSIM.2005.01.004

354. Foong WE, Wilhelm J, Tam HK, Pos KM (2020) Tigecycline efflux in *Acinetobacter baumannii* is mediated by TetA in synergy with RND-type efflux transporters. J Antimicrob Chemother 75:1135–1139. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA015

355. Foulkes DM, McLean K, Haneef AS, et al (2019) *Pseudomonas aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections. Microorganisms 7:707. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7120707

356. Founou RC, Founou LL, Essack SY (2017) Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. PLoS One 12:e0189621. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0189621

357. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, et al (2006) Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet 2:62–72. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.0020007

358. Freire MP, de Oliveira Garcia D, Garcia CP, et al (2016) Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. Clin Microbiol Infect 22:352–358. https://doi.org/10.1016/J.CMI.2015.12.010

359. Frenk S, Temkin E, Lurie-Weinberger MN, et al (2022) Large-scale WGS of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates reveals patterns of dissemination of ST clades associated with antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother 77:934–943. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAC010

360. Fu Y, Jiang J, Zhou H, et al (2014) Characterization of a novel plasmid type and various genetic contexts of $bla_{\text{OXA-58}}$ in *Acinetobacter* spp. from multiple cities in China. PLoS One 9:e84680. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0084680

361. Fujimori N, Igarashi H, Ito T (2011) Acute obstructive suppurative pancreatic ductitis. Clin

Gastroenterol Hepatol 9:A28. https://doi.org/10.1016/J.CGH.2011.03.012

362. Fukuta Y, Muder RR, Agha ME, et al (2013) Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among cancer patients. Am J Infect Control 41:1249–1252. https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2013.04.003

363. Fuller CW, Middendorf LR, Benner SA, et al (2009) The challenges of sequencing by synthesis. Nat Biotechnol 27:1013–1023. https://doi.org/10.1038/NBT.1585

364. Fursova NK, Fursov M V., Astashkin EI, et al (2023) Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Causing Nosocomial Meningitis in the Neurological Intensive Care Unit. Microorganisms 11:2020. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11082020

365. Furuichi M, Ito K, Miyairi I (2016) Characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in children. Pediatr Int 58:113–118. https://doi.org/10.1111/PED.12745

366. Gaddy JA, Actis LA (2009) Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Future Microbiol 4:273–278. https://doi.org/10.2217/FMB.09.5

367. Gaddy JA, Actis LA, Arivett BA, et al (2012) Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. Infect Immun 80:1015–1024. https://doi.org/10.1128/IAI.06279-11

368. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA (2009) The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect Immun 77:3150–3160. https://doi.org/10.1128/IAI.00096-09

369. Gaiarsa S, Batisti Biffignandi G, Esposito EP, et al (2019) Comparative Analysis of the Two *Acinetobacter baumannii* Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes. Front Microbiol 10:930. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00930

370. Gaillot S, Oueslati S, Vuillemenot JB, et al (2023) Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9. Front Microbiol 14:1253160. https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1253160

371. Gajdács M, Urbán E (2019) Prevalence and Antibiotic Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* in Respiratory Tract Samples: A 10-Year Epidemiological Snapshot. Heal Serv Res Manag Epidemiol 6:233339281987077. https://doi.org/10.1177/2333392819870774

372. Gajic I, Jovicevic M, Milic M, et al (2021) Clinical and molecular characteristics of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* ST636 outbreak at a neonatal intensive care unit in Serbia. J Hosp Infect 112:54–60. https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2021.02.023

373. Galdino ACM, Branquinha MH, Santos ALS, Viganor L (2017) *Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases: Weapons to battle the host. Pathophysiol Asp Proteases 381–397. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7_16/COVER

374. Gales AC, Seifert H, Gur D, et al (2019) Antimicrobial Susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* Complex and *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical

Isolates: Results From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). Open forum Infect Dis 6:S34–S46. https://doi.org/10.1093/OFID/OFY293

375. Galle M, Jin S, Bogaert P, et al (2012) The *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system has an exotoxin S/T/Y independent pathogenic role during acute lung infection. PLoS One 7:e41547. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0041547

376. Gallego L, Towner KJ (2001) Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain. J Med Microbiol 50:71–77. https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-1-71

377. Gallo SW, Figueiredo TP, Bessa MC, et al (2016) Isolation and Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from a Brazilian Hospital. Microb Drug Resist 22:688–695. https://doi.org/10.1089/MDR.2015.0306

378. Gallo SW, Ramos PL, Ferreira CAS, de Oliveira SD (2013) A specific polymerase chain reaction method to identify *Stenotrophomonas maltophilia*. Mem Inst Oswaldo Cruz 108:390–391. https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000300020

379. Gao Y, Minca EC, Procop GW, Bergfeld WF (2016) *Stenotrophomonas maltophila* cellulitis in an immunocompromised patient presenting with purpura, diagnosed on skin biopsy. J Cutan Pathol 43:1017–1020. https://doi.org/10.1111/CUP.12765

380. Garai P, Berry L, Moussouni M, et al (2019) Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by *mgtC* and *oprF* mutants. PLoS Pathog 15:e1007812. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007812

381. García-León G, Ruiz de Alegría Puig C, García de la Fuente C, et al (2015) High-level quinolone resistance is associated with the overexpression of smeVWX in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. Clin Microbiol Infect 21:464–467. https://doi.org/10.1016/J.CMI.2015.01.007

382. García-León G, Salgado F, Oliveros JC, et al (2014) Interplay between intrinsic and acquired resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. Environ Microbiol 16:1282–1296. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12408

383. García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yanez M (2020) The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: Pseudomonas quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. J Med Microbiol 69:25–34. https://doi.org/10.1099/JMM.0.001116

384. García CA, Alcaraz ES, Franco MA, De Rossi BNP (2015) Iron is a signal for *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm formation, oxidative stress response, OMPs expression, and virulence. Front Microbiol 6:159746. https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00926/BIBTEX

385. Garcia CA, De Rossi BP, Alcaraz E, et al (2012) Siderophores of *Stenotrophomonas maltophilia*: detection and determination of their chemical nature. Rev Argent Microbiol 44:150–154

386. Garcia DDO, Timenetsky J, Martinez MB, et al (2002) Proteases (caseinase and elastase), hemolysins, adhesion and susceptibility to antimicrobials of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates obtained from clinical specimens. Brazilian J Microbiol 33:157–162. https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000200012

387. García G, Girón JA, Yañez JA, Cedillo ML (2022) *Stenotrophomonas maltophilia* and Its Ability to Form Biofilms. Microbiol Res 2023, Vol 14, Pages 1-20 14:1–20. https://doi.org/10.3390/MICROBIOLRES14010001

388. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ, et al (2003) Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. Clin Infect Dis 36:1111–1118. https://doi.org/10.1086/374337

389. Garneau-Tsodikova S, Labby KJ (2016) Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. Medchemcomm 7:11–27. https://doi.org/10.1039/C5MD00344J

390. Gebhardt MJ, Gallagher LA, Jacobson RK, et al (2015) Joint Transcriptional Control of Virulence and Resistance to Antibiotic and Environmental Stress in *Acinetobacter baumannii*. MBio 6:e01660-15. https://doi.org/10.1128/MBIO.01660-15

391. Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, et al (2021) *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. Infect Drug Resist 14:3711–3719. https://doi.org/10.2147/IDR.S332051

392. Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, et al (1991) Imipenem resistance in *Acinetobacter baumanii* is due to altered penicillin-binding proteins. Chemotherapy 37:405–412. https://doi.org/10.1159/000238887

393. Geisinger E, Isberg RR (2015) Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Pathog 11:e1004691. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004691

394. Gelbíčová T, Baráková A, Florianová M, Karpíšková R (2019) Detection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* with the *mcr-4* gene. Klin Mikrobiol Infekc Lek 25:4–6

395. Gellatly SL, Hancock REW (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis 67:159–173. https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033

396. Gentile I, Maraolo AE, Borgia G (2016) What is the role of the new β-lactam/β-lactamase inhibitors ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam? Expert Rev Anti Infect Ther 14:875–878. https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1233060

397. Gerner-Smidt P (1992) Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. J Clin Microbiol 30:2680–2685. https://doi.org/10.1128/JCM.30.10.2680-2685.1992

398. Gerson S, Betts JW, Lucaßen K, et al (2019) Investigation of Novel *pmrB* and *eptA* Mutations in Isogenic *Acinetobacter baumannii* Isolates Associated with Colistin Resistance and Increased Virulence *In Vivo*. Antimicrob Agents Chemother 63:e01586-18. https://doi.org/10.1128/AAC.01586-18/SUPPL_FILE/AAC.01586-18-S0001.PDF

399. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA (2011) Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. Appl Environ Microbiol 77:5238–5246. https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTAL_MATERIAL_REVISED.DOC

400. Ghasemi E, Ghalavand Z, Goudarzi H, et al (2018) Phenotypic and Genotypic Investigation of Biofilm Formation in Clinical and Environmental Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Arch Clin Infect Dis 2018 134 13:12914. https://doi.org/10.5812/ARCHCID.12914

401. Gheorghe I, Novais Â, Grosso F, et al (2015) Snapshot on carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in Bucharest hospitals reveals unusual clones and novel genetic surroundings for $bla_{\text{OXA-23}}$. J Antimicrob Chemother 70:1016–1020. https://doi.org/10.1093/JAC/DKU527

402. Gholami, Moshiri, Ahanjan, Salimi (2018) The diversity of class B and class D carbapenemases in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. Infez Med 26:329–335

403. Giani T, Arena F, Pollini S, et al (2018) Italian nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* from invasive infections: activity of ceftolozane/tazobactam and comparators, and molecular epidemiology of carbapenemase producers. J Antimicrob Chemother 73:664–671. https://doi.org/10.1093/JAC/DKX453

404. Gibb J, Wong DW (2021) Antimicrobial Treatment Strategies for *Stenotrophomonas maltophilia*: A Focus on Novel Therapies. Antibiot (Basel, Switzerland) 10:1226. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10101226

405. Gilardi G (1976) *Pseudomonas* species in clinical microbiology. Mt Sinai J Med 43:710–726

406. Giordano A, Varesi P, Bertini A, et al (2007) Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. Microb Drug Resist 13:37–43. https://doi.org/10.1089/MDR.2006.9995

407. Girija ASS, Vijayashree Priyadharsini J, Paramasivam A (2019) Plasmid-encoded resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by *dfrA1*, *dfrA5*, *sul1* and *sul2* among *Acinetobacter baumannii* isolated from urine samples of patients with severe urinary tract infection. J Glob Antimicrob Resist 17:145–146. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2019.04.001

408. Girija SAS, Priyadharsini JV, Arumugam P (2018) Prevalence of VIM- and GIM-producing *Acinetobacter baumannii* from patients with severe urinary tract infection. Acta Microbiol Immunol Hung 65:539–550. https://doi.org/10.1556/030.65.2018.038

409. Girlich D, Naas T, Leelaporn A, et al (2002) Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-pectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. Clin Infect Dis 34:603–611. https://doi.org/10.1086/338786

410. Girlich D, Naas T, Nordmann P (2004) Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 48:2043–2048. https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2043-2048.2004

411. Glen KA, Lamont IL (2021) β-lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. Pathogens 10:1638. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10121638/S1

412. Goltermann L, Tolker-Nielsen T (2017) Importance of the exopolysaccharide matrix in antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* aggregates. Antimicrob Agents Chemother 61:e02696-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02696-16/ASSET/22AA6EF8-AB0D-47B1-A80E-

F66437367F32/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0041760360004.JPEG

413. Gomersall J, Mortimer K, Hassan D, et al (2023) Ten-Year Analysis of Bacterial Colonisation and Outcomes of Major Burn Patients with a Focus on *Pseudomonas aeruginosa*. Microorganisms 12:42. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12010042

414. Gomis-Font MA, Pitart C, del Barrio-Tofiño E, et al (2021) Emergence of Resistance to Novel Cephalosporin-β-Lactamase Inhibitor Combinations through the Modification of the *Pseudomonas aeruginosa* MexCD-OprJ Efflux Pump. Antimicrob Agents Chemother 65:e0008921. https://doi.org/10.1128/AAC.00089-21

415. Gong YL, Yang ZC, Yin SP, et al (2016) Analysis of the pathogenic characteristics of 162 severely burned patients with bloodstream infection. Zhonghua Shao Shang Za Zhi 32:529–535. https://doi.org/10.3760/CMA.J.ISSN.1009-2587.2016.09.004

416. Gonzalez-Villoria AM, Tamayo-Legorreta E, Garza-Ramos U, et al (2016) A Multicenter Study in Mexico Finds *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Belonging to Clonal Complexes 636B (113B) and 92B Harboring OXA-72, OXA-239, and OXA-469. Antimicrob Agents Chemother 60:2587–2588. https://doi.org/10.1128/AAC.02042-15

417. Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, et al (2004) Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. Thorax 59:955–959. https://doi.org/10.1136/THX.2003.017707

418. Goudarzi M, Azimi H (2017) Dissemination of Classes 1, 2, and 3 Integrons in *Acinetobacter baumannii* Strains Recovered from Intensive Care Units Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism. Jundishapur J Microbiol 2017 105 10:13100. https://doi.org/10.5812/JJM.13100

419. Gozel MG, Celik C, Elaldi N (2015) *Stenotrophomonas maltophilia* Infections in Adults: Primary Bacteremia and Pneumonia. Jundishapur J Microbiol 8:e23569. https://doi.org/10.5812/JJM.23569

420. Graser Y, Klare I, Halle E, et al (1993) Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. J Clin Microbiol 31:2417–2420. https://doi.org/10.1128/JCM.31.9.2417-2420.1993

421. Greene C, Vadlamudi G, Newton D, et al (2016) The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. Am J Infect Control 44:e65–e71. https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2015.12.012

422. Gröschel MI, Meehan CJ, Barilar I, et al (2020) The phylogenetic landscape and nosocomial spread of the multidrug-resistant opportunist *Stenotrophomonas maltophilia*. Nat Commun 11:2044. https://doi.org/10.1038/S41467-020-15123-0

423. Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, et al (1997) Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 35:3071–3077. https://doi.org/10.1128/JCM.35.12.3071-3077.1997

424. Guénard S, Muller C, Monlezun L, et al (2014) Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob

Agents Chemother 58:221–228. https://doi.org/10.1128/AAC.01252-13

425. Guerrero DM, Perez F, Conger NG, et al (2010) *Acinetobacter baumannii*-Associated Skin and Soft Tissue Infections: Recognizing a Broadening Spectrum of Disease. Surg Infect (Larchmt) 11:49. https://doi.org/10.1089/SUR.2009.022

426. Guillon A, Brea D, Morello E, et al (2017) *Pseudomonas aeruginosa* proteolytically alters the interleukin 22-dependent lung mucosal defense. Virulence 8:810–820. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1253658

427. Gülmez D, Hasçelik G (2005) *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. Clin Microbiol Infect 11:880–886. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2005.01257.X

428. Gupta P, Kale P, Khillan V (2018) Resurgence of Global Opportunistic Multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. Indian J Crit Care Med 22:503–508. https://doi.org/10.4103/IJCCM.IJCCM_106_18

429. Gurung J, Khyriem AB, Banik A, et al (2013) Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. Indian J Crit Care Med 17:214–218. https://doi.org/10.4103/0972-5229.118416

430. Gurung M, Moon DC, Tamang MD, et al (2010) Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of $bla_{(IMP-1)}$ in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. Diagn Microbiol Infect Dis 68:468–470. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2010.07.021

431. Gutierrez C, Pravinkumar E, Balachandran D, Schneider V (2016) Fatal hemorrhagic pneumonia: Don't forget *Stenotrophomonas maltophilia*. Respir Med case reports 19:12–14. https://doi.org/10.1016/J.RMCR.2016.06.003

432. Guttenplan SB, Kearns DB (2013) Regulation of flagellar motility during biofilm formation. FEMS Microbiol Rev 37:849–871. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12018

433. Güvenir M, Otlu B, Tunc E, et al (2018) High Genetic Diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from Single Hospital: Nosocomial Outbreaks or Genotypic Profile Changes during Subcultures. Malays J Med Sci 25:40–49. https://doi.org/10.21315/MJMS2018.25.2.5

434. Guyot A, Turton JF, Garner D (2013) Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* on an intensive care unit. J Hosp Infect 85:303–307. https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2013.09.007

435. Habib M, Saunders PJ, Rubinstein TJ (2021) *Stenotrophomonas maltophilia*-Associated Dacryocystitis in Leukemia-Infiltrated Lacrimal Sacs: Case and Review of Literature. Ophthal Plast Reconstr Surg 37:E143–E145. https://doi.org/10.1097/IOP.0000000000001925

436. Hackel MA, Tsuji M, Yamano Y, et al (2018) *In Vitro* Activity of the Siderophore Cephalosporin, Cefiderocol, against Carbapenem-Nonsusceptible and Multidrug-Resistant Isolates of Gram-Negative Bacilli Collected Worldwide in 2014 to 2016. Antimicrob Agents Chemother 62:e01968-17. https://doi.org/10.1128/AAC.01968-17

437. Hackel MA, Tsuji M, Yamano Y, et al (2017) *In Vitro* Activity of the Siderophore Cephalosporin, Cefiderocol, against a Recent Collection of Clinically Relevant Gram-Negative Bacilli from North

America and Europe, Including Carbapenem-Nonsusceptible Isolates (SIDERO-WT-2014 Study). Antimicrob Agents Chemother 61:e00093-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00093-17

438. Haghighi S, Goli HR (2022) High prevalence of *bla*$_{VEB}$, *bla*$_{GES}$ and *bla*$_{PER}$ genes in beta-lactam resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. AIMS Microbiol 8:153. https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2022013

439. Hagiya H, Ogawa H, Ishida T, et al (2014) Recurrent *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia after iliac crest bone graft harvest. Intern Med 53:1693–1698. https://doi.org/10.2169/INTERNALMEDICINE.53.1995

440. Haidar G, Philips NJ, Shields RK, et al (2017) Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Clinical Effectiveness and Evolution of Resistance. Clin Infect Dis 65:110–120. https://doi.org/10.1093/CID/CIX182

441. Haiko J, Westerlund-Wikström B (2013) The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. Biology (Basel) 2:1242–1267. https://doi.org/10.3390/BIOLOGY2041242

442. Halat DH, Moubareck CA (2022) Focus: Antimicrobial Resistance: The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: CurrentStatus, Genetic Profile, and Global Epidemiology. Yale J Biol Med 95:507

443. Halldorsson S, Gudjonsson T, Gottfredsson M, et al (2010) Azithromycin maintains airway epithelial integrity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. Am J Respir Cell Mol Biol 42:62–68. https://doi.org/10.1165/RCMB.2008-0357OC

444. Hameed F, Khan MA, Muhammad H, et al (2019) Plasmid-mediated mcr-1 gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. Rev Soc Bras Med Trop 52:. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0237-2019

445. Hamidian M, Nigro SJ (2019) Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Microb genomics 5:. https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000306

446. Hammoudi D, Moubareck CA, Hakime N, et al (2015) Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. Int J Infect Dis 36:e56–e61. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.05.015

447. Hansen F, Porsbo LJ, Frandsen TH, et al (2023) Characterisation of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from danish patients 2014-2021: detection of a new international clone - IC11. Int J Antimicrob Agents 62:. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2023.106866

448. Hanson ND, Hossain A, Buck L, et al (2006) First Occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate in the United States Producing an IMP Metallo-β-Lactamase, IMP-18. Antimicrob Agents Chemother 50:2272. https://doi.org/10.1128/AAC.01440-05

449. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF (2018) Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. Nat Rev Microbiol 16:91–102. https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2017.148

450. Harding CM, Kinsella RL, Palmer LD, et al (2016) Medically Relevant Acinetobacter Species Require a Type II Secretion System and Specific Membrane-Associated Chaperones for the Export of

Multiple Substrates and Full Virulence. PLoS Pathog 12:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005391

451. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, et al (2013) *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. MBio 4:. https://doi.org/10.1128/MBIO.00360-13

452. Hasannejad-Bibalan M, Jafari A, Sabati H, et al (2021) Risk of type III secretion systems in burn patients with *Pseudomonas aeruginosa* wound infection: A systematic review and meta-analysis. Burns 47:538–544. https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2020.04.024

453. Hashem H, Hanora A, Abdalla S, et al (2017) Dissemination of metallo-β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Egypt: mutation in blaVIM-4. APMIS 125:499–505. https://doi.org/10.1111/APM.12669

454. Hassan A, Naz A, Obaid A, et al (2016) Pangenome and immuno-proteomics analysis of *Acinetobacter baumannii* strains revealed the core peptide vaccine targets. BMC Genomics 17:. https://doi.org/10.1186/S12864-016-2951-4

455. Hassuna NA, Darwish MK, Sayed M, Ibrahem RA (2020) Molecular Epidemiology and Mechanisms of High-Level Resistance to Meropenem and Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Drug Resist 13:285–293. https://doi.org/10.2147/IDR.S233808

456. Hatziagorou E, Orenti A, Drevinek P, et al (2020) Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis-data from the European cystic fibrosis society patient registry. J Cyst Fibros 19:376–383. https://doi.org/10.1016/J.JCF.2019.08.006

457. Hauser AR (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nat Rev Microbiol 7:654–665. https://doi.org/10.1038/NRMICRO2199

458. Hawkey J, Ascher DB, Judd LM, et al (2018) Evolution of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* during a prolonged infection. Microb genomics 4:e000165. https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000165/CITE/REFWORKS

459. He C, Zhou Y, Liu F, et al (2017) Bacterial Nucleotidyl Cyclase Inhibits the Host Innate Immune Response by Suppressing TAK1 Activation. Infect Immun 85:. https://doi.org/10.1128/IAI.00239-17

460. He T, Wang R, Liu D, et al (2019) Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. Nat Microbiol 2019 49 4:1450–1456. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0445-2

461. He X, Lu F, Yuan F, et al (2015) Biofilm Formation Caused by Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Is Associated with Overexpression of the AdeFGH Efflux Pump. Antimicrob Agents Chemother 59:4817. https://doi.org/10.1128/AAC.00877-15

462. He Y, Wang Y, Ma X, et al (2022) Resistance to Cefiderocol Involved Expression of PER-1 β-Lactamase and Downregulation of Iron Transporter System in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Infect Drug Resist 15:7177–7187. https://doi.org/10.2147/IDR.S392241

463. Hecker SJ, Reddy KR, Totrov M, et al (2015) Discovery of a Cyclic Boronic Acid β-Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. J Med Chem 58:3682–3692.

https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.5B00127

464. Heo YA (2021) Imipenem/Cilastatin/Relebactam: A Review in Gram-Negative Bacterial Infections. Drugs 81:377–388. https://doi.org/10.1007/S40265-021-01471-8/FIGURES/1

465. Héritier C, Dubouix A, Poirel L, et al (2005a) A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. J Antimicrob Chemother 55:115–118. https://doi.org/10.1093/JAC/DKH500

466. Héritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P (2003) Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 47:268–273. https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.268-273.2003

467. Héritier C, Poirel L, Fournier PE, et al (2005b) Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 49:4174–4179. https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4174-4179.2005

468. Héritier C, Poirel L, Nordmann P (2006) Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 12:123–130. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2005.01320.X

469. Hernández-García M, Cabello M, Ponce-Alonso M, et al (2024) First detection in Spain of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two patients transferred from Ukraine to a university hospital. J Glob Antimicrob Resist 36:105–111. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2023.12.022

470. Herrera-Heredia SA, Pezina-Cantú C, Garza-González E, et al (2017) Risk factors and molecular mechanisms associated with trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico. J Med Microbiol 66:1102–1109. https://doi.org/10.1099/JMM.0.000550

471. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H (2010a) Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 65:233–238. https://doi.org/10.1093/JAC/DKP428

472. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H (2010b) Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 35:305. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.10.014

473. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, et al (2013) OXA-235, a novel class D β-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 57:2121–2126. https://doi.org/10.1128/AAC.02413-12

474. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, et al (2009) OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 53:5035–5038. https://doi.org/10.1128/AAC.00856-09

475. Higgins PG, Prior K, Harmsen D, Seifert H (2017) Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. PLoS One 12:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0179228

476. Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H (2007) A PCR-based method to differentiate

between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. Clin Microbiol Infect 13:1199–1201. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2007.01819.X

477. Hilliam Y, Kaye S, Winstanley C (2020) *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. J Med Microbiol 69:3–13. https://doi.org/10.1099/JMM.0.001110

478. Holt K, Kenyon JJ, Hamidian M, et al (2016) Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. Microb genomics 2:1–16. https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000052

479. Hong BK, Wang M, Chi HP, et al (2009) *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 53:3582–3584. https://doi.org/10.1128/AAC.01574-08/ASSET/A4F9B584-DE8F-4BB4-8EC0-5AB4373C544C/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0080983380001.JPEG

480. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, et al (2015) Epidemiology and Characteristics of Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Chemother 47:81–97. https://doi.org/10.3947/IC.2015.47.2.81

481. Hong JS, Choi N, Kim SJ, et al (2020) Molecular Characteristics of GES-Type Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Long-Term Care Facilities and General Hospitals in South Korea. Microb Drug Resist 26:605–610. https://doi.org/10.1089/MDR.2019.0302

482. Hood MI, Becker KW, Roux CM, et al (2013) Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in *Acinetobacter baumannii*. Infect Immun 81:542–551. https://doi.org/10.1128/IAI.00704-12/SUPPL_FILE/ZII999099993SO1.XLS

483. Hood MI, Mortensen BL, Moore JL, et al (2012) Identification of an *Acinetobacter baumannii* zinc acquisition system that facilitates resistance to calprotectin-mediated zinc sequestration. PLoS Pathog 8:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003068

484. Horna G, Amaro C, Palacios A, et al (2019a) High frequency of the *exoU*+/*exoS*+ genotype associated with multidrug-resistant "high-risk clones" of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. Sci Rep 9:. https://doi.org/10.1038/S41598-019-47303-4

485. Horna G, Quezada K, Ramos S, et al (2019b) Specific type IV pili groups in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int Microbiol 22:131–141. https://doi.org/10.1007/S10123-018-00035-3

486. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, et al (2010) AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 65:1589–1593. https://doi.org/10.1093/JAC/DKQ218

487. Hotta G, Matsumura Y, Kato K, et al (2014) Risk factors and outcomes of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia: a comparison with bacteraemia caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. PLoS One 9:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0112208

488. Hou PF, Chen XY, Yan GF, et al (2012) Study of the Correlation of Imipenem Resistance with Efflux Pumps AdeABC, AdeIJK, AdeDE and AbeM in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Chemotherapy 58:152–158. https://doi.org/10.1159/000335599

489. Howell HA, Logan LK, Hauser AR (2013) Type III secretion of ExoU is critical during early

Pseudomonas aeruginosa pneumonia. MBio 4:. https://doi.org/10.1128/MBIO.00032-13

490. Hsueh SC, Lee YJ, Huang YT, et al (2019) *In vitro* activities of cefiderocol, ceftolozane/tazobactam, ceftazidime/avibactam and other comparative drugs against imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia*, all associated with bloodstream infections in Taiwan. J Antimicrob Chemother 74:380–386. https://doi.org/10.1093/JAC/DKY425

491. Hu D, Liu B, Dijkshoorn L, et al (2013) Diversity in the major polysaccharide antigen of *Acinetobacter baumannii* assessed by DNA sequencing, and development of a molecular serotyping scheme. PLoS One 8:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0070329

492. Hu LF, Chang X, Ye Y, et al (2011) *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class 1 integron. Int J Antimicrob Agents 37:230–234. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2010.10.025

493. Hu LF, Chen GS, Kong QX, et al (2016) Increase in the Prevalence of Resistance Determinants to Trimethoprim/Sulfamethoxazole in Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in China. PLoS One 11:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0157693

494. Hu RM, Liao ST, Huang CC, et al (2012) An Inducible Fusaric Acid Tripartite Efflux Pump Contributes to the Fusaric Acid Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. PLoS One 7:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0051053

495. Hu Y, Peng W, Wu Y, et al (2021) A Potential High-Risk Clone of *Pseudomonas aeruginosa* ST463. Front Microbiol 12:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.670202

496. Huang C, Long Q, Qian K, et al (2015a) Resistance and integron characterization of *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Chongqing, China. New microbes new Infect 8:103–108. https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2015.09.015

497. Huang HH, Lin YT, Chen PY, et al (2018) ClpA and HtpX proteases are involved in intrinsic aminoglycoside resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* and are potential aminoglycoside adjuvant targets. Antimicrob Agents Chemother 62:. https://doi.org/10.1128/AAC.00554-18/ASSET/21F9CB38-17D0-4146-8586-0801E3C9DDC4/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0071872990001.JPEG

498. Huang L, Sun L, Xu G, Xia T (2008) Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 62:326–332. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2008.06.008

499. Huang TP, Somers EB, Wong ACL (2006) Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. J Bacteriol 188:3116–3120. https://doi.org/10.1128/JB.188.8.3116-3120.2006

500. Huang W, Yao Y, Long Q, et al (2014a) Immunization against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* effectively protects mice in both pneumonia and sepsis models. PLoS One 9:.

https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0100727

501. Huang W, Yao Y, Wang S, et al (2016) Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Sci Rep 6:. https://doi.org/10.1038/SREP20724

502. Huang X, Liu J, Ding J, et al (2009) The investigation of nematocidal activity in *Stenotrophomonas maltophilia* G2 and characterization of a novel virulence serine protease. Can J Microbiol 55:934–942. https://doi.org/10.1139/W09-045

503. Huang Y, Zhou Q, Wang W, et al (2019a) *Acinetobacter baumannii* Ventilator-Associated Pneumonia: Clinical Efficacy of Combined Antimicrobial Therapy and in vitro Drug Sensitivity Test Results. Front Pharmacol 10:. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00092

504. Huang YW, Hu RM, Chu FY, et al (2013a) Characterization of a major facilitator superfamily (MFS) tripartite efflux pump EmrCABsm from *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 68:2498–2505. https://doi.org/10.1093/JAC/DKT250

505. Huang YW, Hu RM, Lin CW, et al (2012) NagZ-dependent and NagZ-independent mechanisms for β-lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 56:1936–1941. https://doi.org/10.1128/AAC.05645-11/ASSET/41766DFA-E4CB-4584-A7E5-959ABD0A6A5E/ASSETS/GRAPHIC/ZAC9991006970001.JPEG

506. Huang YW, Hu RM, Lin YT, et al (2015b) The Contribution of Class 1 Integron to Antimicrobial Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. https://home.liebertpub.com/mdr 21:90–96. https://doi.org/10.1089/MDR.2014.0072

507. Huang YW, Hu RM, Yang TC (2013b) Role of the pcm-tolCsm operon in the multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 68:1987–1993. https://doi.org/10.1093/JAC/DKT148

508. Huang YW, Huang HH, Huang KH, et al (2019b) AmpI Functions as an Iron Exporter To Alleviate β-Lactam-Mediated Reactive Oxygen Species Stress in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 63:. https://doi.org/10.1128/AAC.02467-18/SUPPL_FILE/AAC.02467-18-S0001.PDF

509. Huang YW, Liou RS, Lin YT, et al (2014b) A linkage between SmeIJK efflux pump, cell envelope integrity, and σE-mediated envelope stress response in *Stenotrophomonas maltophilia*. PLoS One 9:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0111784

510. Huang YW, Wu CJ, Hu RM, et al (2015c) Interplay among membrane-bound lytic transglycosylase D1, the CreBC two-component regulatory system, the AmpNG-AmpDI-NagZ-AmpR regulatory circuit, and L1/L2 β-Lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 59:6866–6872. https://doi.org/10.1128/AAC.05179-14/SUPPL_FILE/ZAC011154515SO1.PDF

511. Hubenova Y, Hubenova E, Manasiev Y, et al (2022) Draft Genome Sequence of *Paenibacillus profundus* YoMME, a New Exoelectrogenic Gram-Positive Bacterium. Microbiol Resour Announc 11:. https://doi.org/10.1128/MRA.00235-22

512. Huedo P, Yero D, Martinez-Servat S, et al (2015) Decoding the genetic and functional diversity of the DSF quorum-sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia*. Front Microbiol 6:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00761

513. Huszczynski SM, Lam JS, Khursigara CM (2019) The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. Pathog (Basel, Switzerland) 9:. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9010006

514. Huys G, Cnockaert M, Vaneechoutte M, et al (2005) Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. Res Microbiol 156:348–355. https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2004.10.008

515. Ibn Saied W, Merceron S, Schwebel C, et al (2020) Ventilator-associated pneumonia due to *Stenotrophomonas maltophilia*: Risk factors and outcome. J Infect 80:279–285. https://doi.org/10.1016/J.JINF.2019.10.021

516. Iiyama K, Takahashi E, Lee JM, et al (2017) Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 364:. https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX051

517. Ikuta KS, Swetschinski LR, Robles Aguilar G, et al (2022) Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet 400:2221–2248. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7

518. Ilyas H, Tabaie S, Place H (2016) Diagnosis, Treatment, and Outcome of *Stenotrophomonas maltophilia* Discitis and Cervical Osteomyelitis: A Case Report and Review of the Literature. JBJS case Connect 6:. https://doi.org/10.2106/JBJS.CC.O.00117

519. Ince D, Sutterwala FS, Yahr TL (2015) Secretion of Flagellar Proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion-Injectisome System. J Bacteriol 197:2003–2011. https://doi.org/10.1128/JB.00030-15

520. Ince N, Yekenkurul D, Danış A, et al (2020) An evaluation of six-year *Stenotrophomonas maltophilia* infections in a university hospital. Afr Health Sci 20:1118–1123. https://doi.org/10.4314/AHS.V20I3.13

521. Insuwanno W, Kiratisin P, Jitmuang A (2020) *Stenotrophomonas maltophilia* Infections: Clinical Characteristics and Factors Associated with Mortality of Hospitalized Patients. Infect Drug Resist 13:1559–1566. https://doi.org/10.2147/IDR.S253949

522. Inviati A, Pellegrino DM, Schifano D (2018) Severe hepatic abscess: Conservative treatment of multi-organ infection by *Stenotrophomonas maltophilia*. A case report. Ann Med Surg 34:62–65. https://doi.org/10.1016/J.AMSU.2018.09.001

523. Iraz M, Duzgun AO, Cicek AC, et al (2014) Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. Diagn Microbiol Infect Dis 78:292–294. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2013.12.003

524. Iregui A, Khan Z, Landman D, Quale J (2020) Activity of Cefiderocol Against *Enterobacterales*,

Pseudomonas aeruginosa, and *Acinetobacter baumannii* Endemic to Medical Centers in New York City. Microb Drug Resist 26:722–726. https://doi.org/10.1089/MDR.2019.0298

525. Ito-Horiyama T, Ishii Y, Ito A, et al (2016) Stability of Novel Siderophore Cephalosporin S-649266 against Clinically Relevant Carbapenemases. Antimicrob Agents Chemother 60:4384–4386. https://doi.org/10.1128/AAC.03098-15

526. Iwashkiw JA, Seper A, Weber BS, et al (2012) Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. PLoS Pathog 8:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002758

527. Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, et al (2002) Detection of a Variant Metallo-β-Lactamase, IMP-10, from Two Unrelated Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* Strain. Antimicrob Agents Chemother 46:2014. https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.2014-2016.2002

528. Jacob AS, Chong GL, Lagrou K, et al (2021) No in vitro activity of cefiderocol against OXA-427-producing *Enterobacterales*. J Antimicrob Chemother 76:3317–3318. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAB304

529. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, et al (2010) Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. Infect Immun 78:1952–1962. https://doi.org/10.1128/IAI.00889-09

530. Jacobsen T, Bardiaux B, Francetic O, et al (2020) Structure and function of minor pilins of type IV pili. Med Microbiol Immunol 209:301–308. https://doi.org/10.1007/S00430-019-00642-5

531. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al (2018) Bacterial biofilm and associated infections. J Chin Med Assoc 81:7–11. https://doi.org/10.1016/J.JCMA.2017.07.012

532. Jan AT (2017) Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. Front Microbiol 8:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01053

533. Javanmardi F, Emami A, Pirbonyeh N, et al (2019) A systematic review and meta-analysis on Exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Infect Genet Evol 75:. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2019.104037

534. Jeannot K, Poirel L, Robert-Nicoud M, et al (2012) IMP-29, a Novel IMP-Type Metallo-β-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 56:2187. https://doi.org/10.1128/AAC.05838-11

535. Jensen P, Bjarnsholt T, Phipps R, et al (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 153:1329–1338. https://doi.org/10.1099/MIC.0.2006/003863-0

536. Jeon J, Kim YJ, Shin H, Ha UH (2017) T3SS effector ExoY reduces inflammasome-related responses by suppressing bacterial motility and delaying activation of NF-κB and caspase-1. FEBS J 284:3392–3403. https://doi.org/10.1111/FEBS.14199

537. Jeon YD, Jeong WY, Kim MH, et al (2016) Risk factors for mortality in patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. Medicine (Baltimore) 95:. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004375

538. Ji Y, Jiang C, Ji J, et al (2015) Post-cataract endophthalmitis caused by multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*: clinical features and risk factors. BMC Ophthalmol 15:. https://doi.org/10.1186/1471-2415-15-14

539. Jia H, Sun Q, Ruan Z, Xie X (2019) Characterization of a small plasmid carrying the carbapenem resistance gene bla OXA-72 from community-acquired *Acinetobacter baumannii* sequence type 880 in China. Infect Drug Resist 12:1545–1553. https://doi.org/10.2147/IDR.S202803

540. Jia W, Wang J, Xu H, Li G (2015) Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* to Fluoroquinolones: Prevalence in a University Hospital and Possible Mechanisms. Int J Environ Res Public Health 12:5177–5195. https://doi.org/10.3390/IJERPH120505177

541. Jiang X, Zhang Z, Li M, et al (2006) Detection of Extended-Spectrum β-Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 50:2990. https://doi.org/10.1128/AAC.01511-05

542. Jiang Y, Ding Y, Wei Y, et al (2022) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A challenge in the intensive care unit. Front Microbiol 13:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1045206

543. Jiménez-Guerra G, Heras-Cañas V, Gutiérrez-Soto M, et al (2018) Urinary tract infection by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and therapeutic alternatives. J Med Microbiol 67:790–797. https://doi.org/10.1099/JMM.0.000742

544. Jin JS, Kwon SO, Moon DC, et al (2011) *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. PLoS One 6:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0017027

545. Jo JTH, Brinkman FSL, Hancock REW (2003) Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. Antimicrob Agents Chemother 47:1101–1111. https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1101-1111.2003

546. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, et al (2021) Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. J Antimicrob Chemother 76:101–109. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA390

547. Johnson EN, Burns TC, Hayda RA, et al (2007) Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. Clin Infect Dis 45:409–415. https://doi.org/10.1086/520029

548. Johnson LE, D'Agata EMC, Paterson DL, et al (2009) *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia over a 10-year period: multidrug resistance and outcomes in transplant recipients. Transpl Infect Dis 11:227–234. https://doi.org/10.1111/J.1399-3062.2009.00380.X

549. Johnson TL, Waack U, Smith S, et al (2015) *Acinetobacter baumannii* Is Dependent on the Type II Secretion System and Its Substrate LipA for Lipid Utilization and In Vivo Fitness. J Bacteriol 198:711–719. https://doi.org/10.1128/JB.00622-15

550. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ (2018) Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res 3:. https://doi.org/10.12688/WELLCOMEOPENRES.14826.1/DOI

551. Jones CL, Clancy M, Honnold C, et al (2015) Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. Clin Infect Dis 61:145–154. https://doi.org/10.1093/CID/CIV225

552. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, et al (2011) Emergence of NDM-1 Metallo-β-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Serbia. Antimicrob Agents Chemother 55:3929. https://doi.org/10.1128/AAC.00226-11

553. Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, et al (2008) Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. Antimicrob Agents Chemother 52:3589–3596. https://doi.org/10.1128/AAC.00465-08

554. Juan C, Peña C, Oliver A (2017a) Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. J Infect Dis 215:S44–S51. https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIW299

555. Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A (2017b) Diversity and regulation of intrinsic β-lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. FEMS Microbiol Rev 41:781–815. https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX043

556. Jun SH, Lee DE, Hwang HR, et al (2023) Clonal evolution and antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korean hospitals over the last decade. Infect Genet Evol 108:. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2023.105404

557. Jun SH, Lee JH, Kim BR, et al (2013) *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. PLoS One 8:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0071751

558. Juni E (2015) *Acinetobacter*. Bergey's Man Syst Archaea Bact 1–26. https://doi.org/10.1002/9781118960608.GBM01203

559. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. Int J Mol Sci 22:1–37. https://doi.org/10.3390/IJMS22063128

560. Juttukonda LJ, Chazin WJ, Skaar EP (2016) *Acinetobacter baumannii* Coordinates Urea Metabolism with Metal Import To Resist Host-Mediated Metal Limitation. MBio 7:. https://doi.org/10.1128/MBIO.01475-16

561. Kabic J, Fortunato G, Vaz-Moreira I, et al (2023) Dissemination of Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Serbian Hospital Settings: Expansion of ST235 and ST654 Clones. Int J Mol Sci 24:. https://doi.org/10.3390/IJMS24021519/S1

562. Kabic J, Novovic K, Kekic D, et al (2022) Comparative genomics and molecular epidemiology of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. Comput Struct Biotechnol J 21:574–585. https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2022.12.045

563. Kadri SS, Adjemian J, Lai YL, et al (2018) Difficult-to-Treat Resistance in Gram-negative Bacteremia at 173 US Hospitals: Retrospective Cohort Analysis of Prevalence, Predictors, and Outcome of Resistance to All First-line Agents. Clin Infect Dis 67:1803–1814. https://doi.org/10.1093/CID/CIY378

564. Kaiser S, Biehler K, Jonas D (2009) A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. J Bacteriol 191:2934–2943. https://doi.org/10.1128/JB.00892-08

565. Kalidasan V, Azman A, Joseph N, et al (2018a) Putative Iron Acquisition Systems in *Stenotrophomonas maltophilia*. Molecules 23:. https://doi.org/10.3390/MOLECULES23082048

566. Kalidasan V, Joseph N, Kumar S, et al (2018b) Iron and Virulence in *Stenotrophomonas maltophilia*: All We Know So Far. Front Cell Infect Microbiol 8:413738. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00401/BIBTEX

567. Kalidasan V, Neela VK (2020) Twitching motility of *Stenotrophomonas maltophilia* under iron limitation: In-silico, phenotypic and proteomic approaches. Virulence 11:104–112. https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1713649

568. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al (2016) Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. Clin Infect Dis 63:e61–e111. https://doi.org/10.1093/CID/CIW353

569. Kampmeier S, Pillukat MH, Pettke A, et al (2017) Evaluation of a *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia cluster in hematopoietic stem cell transplantation recipients using whole genome sequencing. Antimicrob Resist Infect Control 6:. https://doi.org/10.1186/S13756-017-0276-Y

570. Kanafani ZA, Zahreddine N, Tayyar R, et al (2018) Multi-drug resistant *Acinetobacter* species: A seven-year experience from a tertiary care center in Lebanon. Antimicrob Resist Infect Control 7:1–8. https://doi.org/10.1186/S13756-017-0297-6/TABLES/6

571. Kanamori H, Yano H, Tanouchi A, et al (2015) Prevalence of Smqnr and plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from Japan: novel variants of Smqnr. New Microbes New Infect 7:8–14. https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2015.04.009

572. Kang CI, Kim SH, Wan BP, et al (2005) Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. Antimicrob Agents Chemother 49:760–766. https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.760-766.2005

573. Kang D, Kirienko N V. (2018) Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Microbiol 56:449–457. https://doi.org/10.1007/S12275-018-8114-3

574. Karah N, Dwibedi CK, Sjöström K, et al (2016) Novel Aminoglycoside Resistance Transposons and Transposon-Derived Circular Forms Detected in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother 60:1801–1818. https://doi.org/10.1128/AAC.02143-15

575. Karah N, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen O (2011) A diversity of OXA-carbapenemases and class 1 integrons among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Sweden belonging to different international clonal lineages. Microb Drug Resist 17:545–549.

https://doi.org/10.1089/MDR.2011.0089

576. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø (2012) Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. Drug Resist Updat 15:237–247. https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2012.06.001

577. Karakonstantis S, Rousaki M, Kritsotakis EI (2022) Cefiderocol: Systematic Review of Mechanisms of Resistance, Heteroresistance and In Vivo Emergence of Resistance. Antibiot (Basel, Switzerland) 11:. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11060723

578. Karakonstantis S, Rousaki M, Vassilopoulou L, Kritsotakis EI (2024) Global prevalence of cefiderocol non-susceptibility in *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect 30:178–188. https://doi.org/10.1016/J.CMI.2023.08.029

579. Kariminik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B (2017) *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. Immunol Lett 190:1–6. https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2017.07.002

580. Karvouniaris M, Almyroudi MP, Abdul-Aziz MH, et al (2023) Novel Antimicrobial Agents for Gram-Negative Pathogens. Antibiot (Basel, Switzerland) 12:. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12040761

581. Kaur P, Gautam V, Tewari R (2015) Distribution of Class 1 Integrons, sul1 and sul2 Genes Among Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from a Tertiary Care Hospital in North India. Microb Drug Resist 21:380–385. https://doi.org/10.1089/MDR.2014.0176

582. Kaya M, Beştaş R, Bacalan F, et al (2012) Microbial profile and antibiotic sensitivity pattern in bile cultures from endoscopic retrograde cholangiography patients. World J Gastroenterol 18:3585–3589. https://doi.org/10.3748/WJG.V18.I27.3585

583. Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, et al (2016) Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. Infect Dis Clin North Am 30:391–414. https://doi.org/10.1016/J.IDC.2016.02.005

584. Kaye KS, Shorr AF, Wunderink RG, et al (2023) Efficacy and safety of sulbactam-durlobactam versus colistin for the treatment of patients with serious infections caused by *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex: a multicentre, randomised, active-controlled, phase 3, non-inferiority clinical trial (ATTACK). Lancet Infect Dis 23:1072–1084. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00184-6

585. Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, et al (2016) Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo-β-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 60:1067. https://doi.org/10.1128/AAC.02379-15

586. Keam SJ (2023) Sulbactam/Durlobactam: First Approval. Drugs 83:1245–1252. https://doi.org/10.1007/S40265-023-01920-6

587. Keen EF, Robinson BJ, Hospenthal DR, et al (2010) Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. Burns 36:819–825.

https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2009.10.013

588. Kenyon JJ, Hall RM (2013) Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. PLoS One 8:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0062160

589. Ketko AK, Lin C, Moore BB, LeVine AM (2013) Surfactant protein A binds flagellin enhancing phagocytosis and IL-1β production. PLoS One 8:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0082680

590. Khanum I, Ilyas A, Ali F (2020) *Stenotrophomonas maltophilia* Meningitis - A Case Series and Review of the Literature. Cureus 12:. https://doi.org/10.7759/CUREUS.11221

591. Kim EJ, Kim YC, Ahn JY, et al (2019a) Risk factors for mortality in patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia and clinical impact of quinolone-resistant strains. BMC Infect Dis 19:. https://doi.org/10.1186/S12879-019-4394-4

592. Kim SH, Cha MK, Kang CI, et al (2019b) Pathogenic significance of hemorrhagic pneumonia in hematologic malignancy patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia: clinical and microbiological analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 38:285–295. https://doi.org/10.1007/S10096-018-3425-1

593. Kim SH, Cho SY, Kang CI, et al (2018a) Clinical predictors of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in adult patients with hematologic malignancy. Ann Hematol 97:343–350. https://doi.org/10.1007/S00277-017-3178-4

594. Kim SW, Choi CH, Moon DC, et al (2009) Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. FEMS Microbiol Lett 301:224–231. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2009.01820.X

595. Kim YJ, Jeon H, Na SH, et al (2016) *Stenotrophomonas maltophilia* outer membrane vesicles elicit a potent inflammatory response in vitro and in vivo. Pathog Dis 74:104. https://doi.org/10.1093/FEMSPD/FTW104

596. Kim YJ, Lee JH, Lee Y, et al (2014) Nucleoside diphosphate kinase and flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* induce interleukin 1 expression via the Akt/NF-κB signaling pathways. Infect Immun 82:3252–3260. https://doi.org/10.1128/IAI.02007-14

597. Kim YJ, Park JH, Seo KH (2018b) Presence of *Stenotrophomonas maltophilia* exhibiting high genetic similarity to clinical isolates in final effluents of pig farm wastewater treatment plants. Int J Hyg Environ Health 221:300–307. https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2017.12.002

598. Kirtikliene T, Naugzemys D, Steponkiene A, et al (2019) Evaluation of the Inter- and Intrahospital Spread of Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Lithuanian Hospitals. Microb Drug Resist 25:326–335. https://doi.org/10.1089/MDR.2018.0160

599. Kiser KA, Matharu KS, Sweeney AR, Yen MT (2018) *Stenotrophomonas maltophilia* Causing Recurrent Acute Canaliculitis. Ophthal Plast Reconstr Surg 34:602–603. https://doi.org/10.1097/IOP.0000000000001252

600. Kitagawa K, Shigemura K, Yamamichi F, et al (2019) Bacteremia complicating urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa*: Mortality risk factors. Int J Urol 26:358–362.

https://doi.org/10.1111/IJU.13872

601. Klotz P, Higgins PG, Schaubmar AR, et al (2019) Seasonal Occurrence and Carbapenem Susceptibility of Bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany. Front Microbiol 10:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00272

602. Koeleman JGM, Stoof J, Biesmans DJ, et al (1998) Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 36:2522–2529. https://doi.org/10.1128/JCM.36.9.2522-2529.1998

603. Koenigs A, Stahl J, Averhoff B, et al (2016) CipA of *Acinetobacter baumannii* Is a Novel Plasminogen Binding and Complement Inhibitory Protein. J Infect Dis 213:1388–1399. https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIV601

604. Koenigs A, Zipfel PF, Kraiczy P (2015) Translation Elongation Factor Tuf of *Acinetobacter baumannii* Is a Plasminogen-Binding Protein. PLoS One 10:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0134418

605. Koh TH, Khoo CT, Tan TT, et al (2010) Multilocus Sequence Types of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore Carrying Metallo-β-Lactamase Genes, Including the Novel $bla_{\text{IMP-26}}$ Gene. J Clin Microbiol 48:2563. https://doi.org/10.1128/JCM.01905-09

606. Koh TH, Wang GCY, Sng LH (2004) Clonal Spread of IMP-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Two Hospitals in Singapore. J Clin Microbiol 42:5378. https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5378-5380.2004

607. Kohira N, Hackel MA, Ishioka Y, et al (2020) Reduced susceptibility mechanism to cefiderocol, a siderophore cephalosporin, among clinical isolates from a global surveillance programme (SIDERO-WT-2014). J Glob Antimicrob Resist 22:738–741. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2020.07.009

608. Kohlenberg A, Brümmer S, Higgins PG, et al (2009) Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. J Med Microbiol 58:1499–1507. https://doi.org/10.1099/JMM.0.012302-0

609. Köhler T, Epp SF, Curty LK, Pechère JC (1999) Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 181:6300–6305. https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6300-6305.1999

610. Köhler T, Guanella R, Carlet J, Van Delden C (2010) Quorum sensing-dependent virulence during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation and pneumonia in mechanically ventilated patients. Thorax 65:703–710. https://doi.org/10.1136/THX.2009.133082

611. Kolayli F, Gacar G, Karadenizli A, et al (2005) PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. FEMS Microbiol Lett 249:241–245. https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2005.06.012

612. Kollef MH, Nováček M, Kivistik Ü, et al (2019) Ceftolozane–tazobactam versus meropenem for treatment of nosocomial pneumonia (ASPECT-NP): a randomised, controlled, double-blind, phase 3,

non-inferiority trial. Lancet Infect Dis 19:1299–1311. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30403-7

613. Kolmogorov M, Armstrong J, Raney BJ, et al (2018) Chromosome assembly of large and complex genomes using multiple references. Genome Res 28:1720–1732. https://doi.org/10.1101/GR.236273.118

614. Kolmogorov M, Raney B, Paten B, Pham S (2014) Ragout-a reference-assisted assembly tool for bacterial genomes. Bioinformatics 30:. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU280

615. Korostin D, Kulemin N, Naumov V, et al (2020) Comparative analysis of novel MGISEQ-2000 sequencing platform vs Illumina HiSeq 2500 for whole-genome sequencing. PLoS One 15:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0230301

616. Korotkov K V., Sandkvist M, Hol WGJ (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. Nat Rev Microbiol 10:336–351. https://doi.org/10.1038/NRMICRO2762

617. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ (2013) Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harb Perspect Med 3:. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A010306

618. Kostyanev T, Nguyen MN, Markovska R, et al (2020) Emergence of ST654 *Pseudomonas aeruginosa* co-harbouring $bla_{\text{NDM-1}}$ and $bla_{\text{GES-5}}$ in novel class I integron In1884 from Bulgaria. J Glob Antimicrob Resist 22:672–673. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2020.06.008

619. Kostyanev T, Xavier BB, García-Castillo M, et al (2021) Phenotypic and molecular characterizations of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected within the EURECA study. Int J Antimicrob Agents 57:. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2021.106345

620. Kovaleva J, Degener JE, van der Mei HC (2010) Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. J Hosp Infect 76:345–350. https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2010.07.008

621. Krishnan G, Sethumadhavan A, Muthusamy S, Mani M (2019) Antibiotic Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* harbor lasA Gene. In: Internet J. Microbiol. Corpus ID: 109532739

622. Krueger TS, Clark EA, Nix DE (2001) In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to various antimicrobial combinations. Diagn Microbiol Infect Dis 41:71–78. https://doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00281-4

623. Krzewinski JW, Nguyen CD, Foster JM, Burns JL (2001) Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 39:3597–3602. https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3597-3602.2001

624. Krzyściak P, Chmielarczyk A, Pobiega M, et al (2017) *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. APMIS 125:1017–1026. https://doi.org/10.1111/APM.12739

625. Kucharska I, Liang B, Ursini N, Tamm LK (2016) Molecular Interactions of Lipopolysaccharide

with an Outer Membrane Protein from *Pseudomonas aeruginosa* Probed by Solution NMR. Biochemistry 55:5061–5072. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.6B00630

626. Kulah C, Mooij MJ, Comert F, et al (2010) Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. Int J Antimicrob Agents 36:114–118. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2010.03.017

627. Kumar M (2016) Identification of a Novel NDM Variant, $bla_{\text{NDM-3}}$, From a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Infect Control Hosp Epidemiol 37:747–748. https://doi.org/10.1017/ICE.2016.66

628. Kuwahara M, Noma M, Sunakawa T, et al (2022) *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteremia Associated With Severe COVID-19: Successful Treatment With Appropriate Antimicrobial Therapy. Cureus 14:. https://doi.org/10.7759/CUREUS.21750

629. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A (2021) *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. Pathogens 10:. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10030373

630. Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, et al (2012) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. J Immunol 188:386–393. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1102162

631. Lahiri SD, Alm RA (2016) Identification of Novel VEB β-Lactamase Enzymes and Their Impact on Avibactam Inhibition. Antimicrob Agents Chemother 60:3183–3186. https://doi.org/10.1128/AAC.00047-16

632. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, et al (2011) Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. Front Microbiol 2:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00118

633. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, et al (2004) Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. J Med Microbiol 53:73–81. https://doi.org/10.1099/JMM.0.05324-0

634. Lapuebla A, Abdallah M, Olafisoye O, et al (2015) Activity of Imipenem with Relebactam against Gram-Negative Pathogens from New York City. Antimicrob Agents Chemother 59:5029–5031. https://doi.org/10.1128/AAC.00830-15

635. Lari AR, Ardebili A, Hashemi A (2018) AdeR-AdeS mutations & overexpression of the AdeABC efflux system in ciprofloxacin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Indian J Med Res 147:413–421. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_644_16

636. Laudy AE, Róg P, Smolinska-Król K, et al (2017) Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. PLoS One 12:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0180121

637. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al (1999) Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 43:1584–1590. https://doi.org/10.1128/AAC.43.7.1584

638. Lee CR, Lee JH, Park M, et al (2017) Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. Front Cell Infect Microbiol

7:. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00055

639. Lee HY, Hsu SY, Hsu JF, et al (2018) Risk factors and molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bacteremia in neonates. J Microbiol Immunol Infect 51:367–376. https://doi.org/10.1016/J.JMII.2017.07.013

640. Lee J, Wu J, Deng Y, et al (2013) A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. Nat Chem Biol 2013 95 9:339–343. https://doi.org/10.1038/nchembio.1225

641. Lee J, Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell 6:26–41. https://doi.org/10.1007/S13238-014-0100-X

642. Lee JS, Choi CH, Kim JW, Lee JC (2010) *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. J Microbiol 48:387–392. https://doi.org/10.1007/S12275-010-0155-1

643. Lee K, Chong Y, Shin HB, et al (2001) Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 7:88–91. https://doi.org/10.1046/J.1469-0691.2001.00204.X

644. Lee K, Yum JH, Yong D, et al (2005) Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, $bla_{(SIM-1)}$, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 49:4485–4491. https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4485-4491.2005

645. Lee Y, Kim CK, Lee H, et al (2011) A novel insertion sequence, IS*Aba10*, inserted into IS*Aba1* adjacent to the $bla_{(OXA-23)}$ gene and disrupting the outer membrane protein gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 55:361–363. https://doi.org/10.1128/AAC.01672-09

646. Lee YT, Kuo SC, Chiang MC, et al (2012) Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a $bla_{OXA-51-like}$ gene that is intrinsic to *A. baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 56:1124–1127. https://doi.org/10.1128/AAC.00622-11

647. Lees-Miller RG, Iwashkiw JA, Scott NE, et al (2013) A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. Mol Microbiol 89:816–830. https://doi.org/10.1111/MMI.12300

648. Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, et al (2005) The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN-γ-Mediated Macrophage Killing. J Immunol 175:7512–7518. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.11.7512

649. Letunic I, Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Bioinformatics 23:127–128. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTL529

650. Letunic I, Bork P (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic Acids Res 49:W293–W296. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB301

651. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, et al (2006) Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. Chest 129:102–109. https://doi.org/10.1378/CHEST.129.1.102

652. Levy-Blitchtein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, et al (2018) Emergence and spread of carbapenem-

resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. Emerg Microbes Infect 7:. https://doi.org/10.1038/S41426-018-0127-9

653. Li J, Wang J, Yang Y, et al (2020a) Etiology and antimicrobial resistance of secondary bacterial infections in patients hospitalized with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective analysis. Antimicrob Resist Infect Control 9:. https://doi.org/10.1186/S13756-020-00819-1

654. Li L, Hassan KA, Tetu SG, et al (2020b) The Transcriptomic Signature of Tigecycline in *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol 11:565438. https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.565438/BIBTEX

655. Li LH, Zhang MS, Wu CJ, et al (2019a) Overexpression of SmeGH contributes to the acquired MDR of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 74:2225–2229. https://doi.org/10.1093/JAC/DKZ200

656. Li S, Peng Y, Rui Y (2019b) Multiplex real-time PCR assays to detect *Stenotrophomonas maltophilia* carrying *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes. J Microbiol Methods 156:52–59. https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2018.12.002

657. Li T, Yang Y, Yan R, et al (2022) Comparing core-genome MLST with PFGE and MLST for cluster analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Glob Antimicrob Resist 30:148–151. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2022.06.014

658. Li W, Yan F, Zhou H, et al (2013) *P. aeruginosa* lipopolysaccharide-induced MUC5AC and CLCA3 expression is partly through Duox1 *in vitro* and *in vivo*. PLoS One 8:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0063945

659. Li XH, Lee JH (2019) Quorum sensing-dependent post-secretional activation of extracellular proteases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 294:19635–19644. https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.011047

660. Li XZ, Barre N, Poole K (2000) Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 46:885–893. https://doi.org/10.1093/JAC/46.6.885

661. Li Y, Guo Q, Wang P, et al (2015a) Clonal dissemination of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23 β-lactamase at a teaching hospital in Shanghai, China. J Microbiol Immunol Infect 48:101–108. https://doi.org/10.1016/J.JMII.2014.04.005

662. Li Y, Tang X, Zhao Z, et al (2019c) Intranasal immunization with recombinant outer membrane protein A induces protective immune response against *Stenotrophomonas maltophilia* infection. PLoS One 14:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0214596

663. Li YH, Tian X (2012) Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. Sensors (Basel) 12:2519–2538. https://doi.org/10.3390/S120302519

664. Li ZT, Zhang RL, Bi XG, et al (2015b) Outer membrane vesicles isolated from two clinical *Acinetobacter baumannii* strains exhibit different toxicity and proteome characteristics. Microb Pathog 81:46–52. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2015.03.009

665. Liao CH, Chen WC, Li LH, et al (2020) AmpR of *Stenotrophomonas maltophilia* is involved in stenobactin synthesis and enhanced β-lactam resistance in an iron-depleted condition. J Antimicrob Chemother 75:3544–3551. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA358

666. Liaw SJ, Lee YL, Hsueh PR (2010) Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. Int J Antimicrob Agents 35:126–130. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.09.015

667. Libanore M, Bicocchi R, Pantaleoni M, Ghinelli F (2004) Community-acquired infection due to *Stenotrophomonas maltophilia*: a rare cause of meningitis. Int J Infect Dis 8:317–319. https://doi.org/10.1016/J.IJID.2004.05.002

668. Libisch B, Poirel L, Lepsanovic Z, et al (2008) Identification of PER-1 extended-spectrum β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. FEMS Immunol Med Microbiol 54:330–338. https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2008.00483.X

669. Lila ASA, Rajab AAH, Abdallah MH, et al (2023) Biofilm Lifestyle in Recurrent Urinary Tract Infections. Life 13:. https://doi.org/10.3390/LIFE13010148

670. Lim DR, Kuk JC, Kim T, Shin EJ (2017) Unusual case of rapid growing intraabdominal abscess caused by *Stenotrophomonas maltophilia* after laparoscopic appendectomy due to perforated appendicitis: A case report. Medicine (Baltimore) 96:. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006913

671. Lima WG, Silva Alves GC, Sanches C, et al (2019) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with burn injury: A systematic review and meta-analysis. Burns 45:1495–1508. https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2019.07.006

672. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM (2002) Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. J Clin Microbiol 40:4776–4778. https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4776-4778.2002

673. Lin CW, Huang YW, Hu RM, et al (2009) The role of AmpR in regulation of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. Res Microbiol 160:152–158. https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2008.11.001

674. Lin CW, Huang YW, Hu RM, Yang TC (2014a) SmeOP-TolCSm efflux pump contributes to the multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 58:2405–2408. https://doi.org/10.1128/AAC.01974-13/SUPPL_FILE/ZAC004142699SO1.PDF

675. Lin CW, Lin HC, Huang YW, et al (2011a) Inactivation of *mrcA* gene derepresses the basal-level expression of L1 and L2 β-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 66:2033–2037. https://doi.org/10.1093/JAC/DKR276

676. Lin HC, Ma DHK, Chen YF, et al (2011b) Late-onset intrascleral dissemination of *Stenotrophomonas maltophilia* scleritis after pterygium excision. Cornea 30:712–715. https://doi.org/10.1097/ICO.0B013E31820007ED

677. Lin J, Cheng J (2019) Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and Its Relationship to Biofilm Development. ACS Symp Ser 1323:1–16. https://doi.org/10.1021/BK-2019-1323.CH001/ASSET/IMAGES/LARGE/BK-2018-007742_G002.JPEG

678. Lin J, Cheng J, Wang Y, Shen X (2018) The Pseudomonas quinolone signal (PQS): Not just for quorum sensing anymore. Front Cell Infect Microbiol 8:366060. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00230/BIBTEX

679. Lin J, Huang S, Liu M, et al (2022) Endophthalmitis Caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Characteristics, Outcomes, and Antibiotics Sensitivities. J Ophthalmol 2022:. https://doi.org/10.1155/2022/1265556

680. Lin J, Xu C, Fang R, et al (2019) Resistance and Heteroresistance to Colistin in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Wenzhou, China. Antimicrob Agents Chemother 63:. https://doi.org/10.1128/AAC.00556-19/SUPPL_FILE/AAC.00556-19-S0001.PDF

681. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, et al (2012) Inhibition of LpxC protects mice from resistant *Acinetobacter baumannii* by modulating inflammation and enhancing phagocytosis. MBio 3:. https://doi.org/10.1128/MBIO.00312-12

682. Lin MF, Chang KC, Yang CY, et al (2010) Role of integrons in antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter baumannii*. Jpn J Infect Dis 63:440–443. https://doi.org/10.7883/yoken.63.440

683. Lin MF, Kuo HY, Yeh HW, et al (2011c) Emergence and dissemination of $bla_{\text{OXA-23}}$-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. in a regional hospital in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 44:39–44. https://doi.org/10.1016/J.JMII.2011.01.008

684. Lin MF, Lan CY (2014) Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. World J Clin cases 2:787. https://doi.org/10.12998/WJCC.V2.I12.787

685. Lin YT, Huang YW, Chen SJ, et al (2015) The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. Antimicrob Agents Chemother 59:4067–4073. https://doi.org/10.1128/AAC.00372-15/ASSET/BE1B5697-B289-481F-A49A-371A082BC1FB/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0071541320006.JPEG

686. Lin YT, Huang YW, Liou RS, et al (2014b) MacABCsm, an ABC-type tripartite efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* involved in drug resistance, oxidative and envelope stress tolerances and biofilm formation. J Antimicrob Chemother 69:3221–3226. https://doi.org/10.1093/JAC/DKU317

687. Lindestam Arlehamn CS, Evans TJ (2011) *Pseudomonas aeruginosa* pilin activates the inflammasome. Cell Microbiol 13:388–401. https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2010.01541.X

688. Ling B-D, Zhang L, Li X-Z (2016) Antimicrobial Resistance and Drug Efflux Pumps in *Acinetobacter*. Efflux-Mediated Antimicrob Resist Bact 329–358. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39658-3_13

689. Liu B, Zheng D, Jin Q, et al (2019) VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an

interactive web interface. Nucleic Acids Res 47:D687–D692. https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1080

690. Liu B, Zheng D, Zhou S, et al (2022a) VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res 50:D912–D917. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1107

691. Liu C, Chen K, Wu Y, et al (2022b) Epidemiological and genetic characteristics of clinical carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains collected countrywide from hospital intensive care units (ICUs) in China. Emerg Microbes Infect 11:1730–1741. https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2093134

692. Liu D, Liu ZS, Hu P, et al (2016a) Characterization of surface antigen protein 1 (SurA1) from *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and fitness. Vet Microbiol 186:126–138. https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2016.02.018

693. Liu H, Wu YQ, Chen LP, et al (2016b) Biofilm-Related Genes: Analyses in Multi-Antibiotic Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates From Mainland China. Med Sci Monit 22:1801–1807. https://doi.org/10.12659/MSM.898959

694. Liu SC, Ju YR, Lu CL (2022c) Multi-CSAR: a web server for scaffolding contigs using multiple reference genomes. Nucleic Acids Res 50:W500–W509. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC301

695. Liu W, Tian XQ, Wei JW, et al (2017) BsmR degrades c-di-GMP to modulate biofilm formation of nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Sci Rep 7:. https://doi.org/10.1038/S41598-017-04763-W

696. Liu X, Chang Y, Xu Q, et al (2023) Mutation in the two-component regulator BaeSR mediates cefiderocol resistance and enhances virulence in *Acinetobacter baumannii*. mSystems 8:. https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.01291-22

697. Liu X, Lei T, Yang Y, et al (2022d) Structural Basis of PER-1-Mediated Cefiderocol Resistance and Synergistic Inhibition of PER-1 by Cefiderocol in Combination with Avibactam or Durlobactam in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 66:. https://doi.org/10.1128/AAC.00828-22

698. Liu YM, Chen YS, Toh HS, et al (2012) In vitro susceptibilities of non-*Enterobacteriaceae* isolates from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region from 2003 to 2010: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Int J Antimicrob Agents 40 Suppl: https://doi.org/10.1016/S0924-8579(12)70004-3

699. Livermore DM (1992) Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 36:2046–2048. https://doi.org/10.1128/AAC.36.9.2046

700. Livermore DM, Jamrozy D, Mushtaq S, et al (2017) AmpC β-lactamase induction by avibactam and relebactam. J Antimicrob Chemother 72:3342–3348. https://doi.org/10.1093/JAC/DKX298

701. Lixandru BE, Cotar AI, Straut M, et al (2015) Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Romania: A Six-Month Survey. PLoS One 10:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0143214

702. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, et al (2004) Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. Antimicrob Agents

Chemother 48:1797–1802. https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1797-1802.2004

703. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA (2008) Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. J Bacteriol 190:1036–1044. https://doi.org/10.1128/JB.01416-07

704. Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP (2006) Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. Antimicrob Agents Chemother 50:2941–2945. https://doi.org/10.1128/AAC.00116-06

705. Looney WJ, Narita M, Mühlemann K (2009) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. Lancet Infect Dis 9:312–323. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70083-0

706. Lopes BS, Amyes SGB (2012) Role of IS*Aba1* and IS*Aba125* in governing the expression of bla_{ADC} in clinically relevant *Acinetobacter baumannii* strains resistant to cephalosporins. J Med Microbiol 61:1103–1108. https://doi.org/10.1099/JMM.0.044156-0

707. López-Causapé C, Cabot G, del Barrio-Tofiño E, Oliver A (2018) The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol 9:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00685

708. Losito AR, Raffaelli F, Del Giacomo P, Tumbarello M (2022) New Drugs for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with Limited Treatment Options: A Narrative Review. Antibiot (Basel, Switzerland) 11:. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11050579

709. Lu Q, Eggimann P, Luyt CE, et al (2014) *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. Crit Care 18:. https://doi.org/10.1186/CC13697

710. Luke NR, Sauberan SL, Russo TA, et al (2010) Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. Infect Immun 78:2017–2023. https://doi.org/10.1128/IAI.00016-10

711. Lukovic B, Gajic I, Dimkic I, et al (2020) The first nationwide multicenter study of *Acinetobacter baumannii* recovered in Serbia: emergence of OXA-72, OXA-23 and NDM-1-producing isolates. Antimicrob Resist Infect Control 9:. https://doi.org/10.1186/S13756-020-00769-8

712. Lynch JP, Zhanel GG, Clark NM (2017) Infections Due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment Options. Semin Respir Crit Care Med 38:311–325. https://doi.org/10.1055/S-0037-1599225

713. MABROUK A, CHEBBI Y, RADDAOUI A, et al (2020) Clonal spread of PER-1 and OXA-23 producing extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in a burn intensive care unit in Tunisia. Acta Microbiol Immunol Hung 67:222–227. https://doi.org/10.1556/030.2020.01208

714. MacCannell D (2013) Bacterial strain typing. Clin Lab Med 33:629–650. https://doi.org/10.1016/J.CLL.2013.03.005

715. MacLeod DL, Nelson LE, Shawar RM, et al (2000) Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled

tobramycin treatment. J Infect Dis 181:1180–1184. https://doi.org/10.1086/315312

716. Madi H, Lukić J, Vasiljević Z, et al (2016) Genotypic and Phenotypic Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains from a Pediatric Tertiary Care Hospital in Serbia. PLoS One 11:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0165660

717. Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ (2012) The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunol Med Microbiol 65:183–195. https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2012.00960.X

718. Maes M, Higginson E, Pereira-Dias J, et al (2021) Ventilator-associated pneumonia in critically ill patients with COVID-19. Crit Care 25:. https://doi.org/10.1186/S13054-021-03460-5

719. Magalhães B, Valot B, Abdelbary MMH, et al (2020) Combining Standard Molecular Typing and Whole Genome Sequencing to Investigate *Pseudomonas aeruginosa* Epidemiology in Intensive Care Units. Front public Heal 8:. https://doi.org/10.3389/FPUBH.2020.00003

720. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, et al (2014) Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N Engl J Med 370:1198–1208. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1306801

721. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 18:268–281. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03570.X

722. Malik S, Kaminski M, Landman D, Quale J (2020) Cefiderocol Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Roles of β-Lactamases, Siderophore Receptors, and Penicillin Binding Protein 3. Antimicrob Agents Chemother 64:. https://doi.org/10.1128/AAC.01221-20

723. Malisova L, Vrbova I, Pomorska K, et al (2023) In Vitro Activity of Cefiderocol Against Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Drug Resist 29:485–491. https://doi.org/10.1089/MDR.2023.0090

724. Malkoçoğlu G, Aktaş E, Bayraktar B, et al (2017) VIM-1, VIM-2, and GES-5 Carbapenemases Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. Microb Drug Resist 23:328–334. https://doi.org/10.1089/MDR.2016.0012

725. Managò A, Becker KA, Carpinteiro A, et al (2015) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin induces neutrophil death via mitochondrial reactive oxygen species and mitochondrial acid sphingomyelinase. Antioxid Redox Signal 22:1097–1110. https://doi.org/10.1089/ARS.2014.5979

726. Mann EE, Wozniak DJ (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. FEMS Microbiol Rev 36:893–916. https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00322.X

727. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T (2004) Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. Antimicrob Agents Chemother 48:3298–3304. https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3298-3304.2004

728. Markovska R, Stankova P, Stoeva T, et al (2024) In Vitro Antimicrobial Activity of Five Newly Approved Antibiotics against Carbapenemase-Producing Enterobacteria-A Pilot Study in Bulgaria. Antibiot (Basel, Switzerland) 13:. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS13010081

729. Marqué S, Poirel L, Héritier C, et al (2005) Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. J Clin Microbiol 43:4885–4888. https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4885-4888.2005

730. Martins-Sorenson N, Snesrud E, Xavier DE, et al (2020) A novel plasmid-encoded mcr-4.3 gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. J Antimicrob Chemother 75:60–64. https://doi.org/10.1093/JAC/DKZ413

731. Massart N, Mansour A, Ross JT, et al (2022) Mortality due to hospital-acquired infection after cardiac surgery. J Thorac Cardiovasc Surg 163:2131-2140.e3. https://doi.org/10.1016/J.JTCVS.2020.08.094

732. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, et al (2000) Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 44:2242–2246. https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2242-2246.2000

733. Matos AP, Cayô R, Almeida LGP, et al (2019) Genetic Characterization of Plasmid-Borne blaOXA-58 in Distinct *Acinetobacter* Species. mSphere 4:. https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00376-19

734. Maunders E, Welch M (2017) Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. FEMS Microbiol Lett 364:. https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX120

735. Maura D, Hazan R, Kitao T, et al (2016) Evidence for Direct Control of Virulence and Defense Gene Circuits by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Regulator, MvfR. Sci Reports 2016 61 6:1–14. https://doi.org/10.1038/srep34083

736. Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT (2018) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Host response and clinical implications in lung infections. Am J Respir Cell Mol Biol 58:428–439. https://doi.org/10.1165/RCMB.2017-0321TR/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF

737. Mayhall CG (2003) The epidemiology of burn wound infections: then and now. Clin Infect Dis 37:543–550. https://doi.org/10.1086/376993

738. Mazzariol A, Mammina C, Koncan R, et al (2011) A novel VIM-type metallo-beta-lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. Clin Microbiol Infect 17:722–724. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2010.03424.X

739. McClean S (2012) Eight stranded β -barrel and related outer membrane proteins: role in bacterial pathogenesis. Protein Pept Lett 19:1013–1025. https://doi.org/10.2174/092986612802762688

740. McConnell MJ, Actis L, Pachón J (2013) *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev 37:130–155. https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2012.00344.X

741. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachón J (2011) Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. Vaccine 29:5705–5710. https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2011.06.001

742. McKay GA, Woods DE, MacDonald KL, Poole K (2003) Role of phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic

resistance. Infect Immun 71:3068–3075. https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3068-3075.2003

743. McQueary CN, Kirkup BC, Si Y, et al (2012) Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. J Microbiol 50:434–443. https://doi.org/10.1007/S12275-012-1555-1

744. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, et al (2004) Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, $bla_{\text{IMP-16}}$, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother 48:4693–4702. https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4693-4702.2004

745. Méndez-Sotelo BJ, Delgado-Beltrán M, Hernández-Durán M, et al (2024) *In vitro* activity of ceftazidime/avibactam, cefiderocol, meropenem/vaborbactam and imipenem/relebactam against clinical strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex. PLoS One 19:e0298577. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0298577

746. Mercier-Darty M, Royer G, Lamy B, et al (2020) Comparative whole-genome phylogeny of animal, environmental, and human strains confirms the genogroup organization and diversity of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex. Appl Environ Microbiol 86:. https://doi.org/10.1128/AEM.02919-19/SUPPL_FILE/AEM.02919-19-SD003.XLSX

747. Merino M, Acosta J, Poza M, et al (2010) OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. Antimicrob Agents Chemother 54:2724–2727. https://doi.org/10.1128/AAC.01674-09

748. Mestrovic T, Robles Aguilar G, Swetschinski LR, et al (2022) The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis. Lancet Public Heal 7:e897–e913. https://doi.org/10.1016/S2468-2667(22)00225-0

749. Meuskens I, Saragliadis A, Leo JC, Linke D (2019) Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions. Front Microbiol 10:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01163

750. Micek ST, Welch EC, Khan J, et al (2011) Resistance to empiric antimicrobial treatment predicts outcome in severe sepsis associated with Gram-negative bacteremia. J Hosp Med 6:405–410. https://doi.org/10.1002/JHM.899

751. Michalska M, Wolf P (2015) *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. Front Microbiol 6:15. https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00963

752. Millán-Díaz B, González-Tabarés L, Cobelo-Casas C, et al (2017) *Stenotrophomonas maltophilia*: A rare cause of peritonitis in capd patients. Nefrologia 37:646–647. https://doi.org/10.1016/J.NEFRO.2017.03.018

753. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, et al (2011) PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother 55:5761–5769. https://doi.org/10.1128/AAC.05391-11

754. Miller CL, Romero M, Karna SLR, et al (2016) RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. BMC

Microbiol 16:1–16. https://doi.org/10.1186/S12866-016-0771-Y/FIGURES/6

755. Mirzaei B, Bazgir ZN, Goli HR, et al (2020) Prevalence of multi-drug resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated in clinical samples from Northeast of Iran. BMC Res Notes 13:. https://doi.org/10.1186/S13104-020-05224-W

756. Mishra M, Ressler A, Schlesinger LS, Wozniak DJ (2015) Identification of OprF as a complement component C3 binding acceptor molecule on the surface of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 83:3006–3014. https://doi.org/10.1128/IAI.00081-15

757. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, et al (2009) Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. J Infect Public Health 2:101–111. https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2009.08.003

758. Mlynarcik P, Kolar M (2019) Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of mcr genes. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 163:28–38. https://doi.org/10.5507/BP.2018.070

759. Moffatt JH, Harper M, Boyce JD (2019) Mechanisms of Polymyxin Resistance. Adv Exp Med Biol 1145:55–71. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_5/COVER

760. Mohamad SM, Rostami S, Zamanzad B, et al (2017) Detection of Exotoxins and Antimicrobial Susceptibility Pattern in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. Avicenna J Clin Microbiol Infect 5:36–40. https://doi.org/10.34172/AJCMI.2018.07

761. Mohammadi F, Karami P, Arabestani MR, et al (2021) Molecular typing of clinical isolates of acinetobacter bau-mannii using random amplified polymorphic dna (Rapd-pcr). Iran J Public Health 50:850–851. https://doi.org/10.18502/IJPH.V50I4.6019

762. Mohanam L, Menon T (2017) Emergence of *rmtC* and *rmtF* 16S rRNA methyltransferase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Indian J Med Microbiol 35:282–285. https://doi.org/10.4103/IJMM.IJMM_16_231

763. Mohd Sazlly Lim S, Zainal Abidin A, Liew SM, et al (2019) The global prevalence of multidrug-resistance among *Acinetobacter baumannii* causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: A systematic review and meta-analysis. J Infect 79:593–600. https://doi.org/10.1016/J.JINF.2019.09.012

764. Mojica MF, Bonomo RA, van Duin D (2023) Treatment approaches for severe *Stenotrophomonas maltophilia* infections. Curr Opin Infect Dis 36:572–584. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000975

765. Mojica MF, Rutter JD, Taracila M, et al (2019) Population Structure, Molecular Epidemiology, and β-Lactamase Diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in the United States. MBio 10:. https://doi.org/10.1128/MBIO.00405-19

766. Möker N, Dean CR, Tao J (2010) *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. J Bacteriol 192:1946–1955. https://doi.org/10.1128/JB.01231-09

767. Molina-Mora JA, Campos-Sánchez R, Rodríguez C, et al (2020) High quality 3C de novo assembly and annotation of a multidrug resistant ST-111 *Pseudomonas aeruginosa* genome: Benchmark of hybrid and non-hybrid assemblers. Sci Rep 10:. https://doi.org/10.1038/S41598-020-58319-6

768. Monsuur HN, van den Broek LJ, Jhingoerie RL, et al (2017) Burn Eschar Stimulates Fibroblast and Adipose Mesenchymal Stromal Cell Proliferation and Migration but Inhibits Endothelial Cell Sprouting. Int J Mol Sci 18:. https://doi.org/10.3390/IJMS18081790

769. Monteith AJ, Miller JM, Maxwell CN, et al (2021) Neutrophil extracellular traps enhance macrophage killing of bacterial pathogens. Sci Adv 7:. https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABJ2101

770. Moon DC, Choi CH, Lee JH, et al (2012) *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. J Microbiol 50:155–160. https://doi.org/10.1007/S12275-012-1589-4

771. Moon KH, Weber BS, Feldmana MF (2017) Subinhibitory Concentrations of Trimethoprim and Sulfamethoxazole Prevent Biofilm Formation by *Acinetobacter baumannii* through Inhibition of Csu Pilus Expression. Antimicrob Agents Chemother 61:. https://doi.org/10.1128/AAC.00778-17

772. Moosavi SM, Pouresmaeil O, Zandi H, et al (2020) The Evaluation of Antibiotic Resistance and *nalB* Mutants in *Pseudomonas eruginosa* Isolated from Burnt Patients of Shohada Mehrab Yazd Hospital Burn Ward. Reports Biochem Mol Biol 9:140. https://doi.org/10.29252/RBMB.9.2.140

773. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. Front Cell Infect Microbiol 7:39. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00039

774. Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, et al (2017) Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* Population Isolated from Children with Bacteremia in Mexico City. Front Microbiol 8:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00313

775. Mori M, Tsunemine H, Imada K, et al (2014) Life-threatening hemorrhagic pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in the treatment of hematologic diseases. Ann Hematol 93:901–911. https://doi.org/10.1007/S00277-014-2028-X

776. Moriceau C, Eveillard M, Lemarié C, et al (2020) *Stenotrophomonas maltophilia* susceptibility to ceftazidime-avibactam combination versus ceftazidime alone. Med Mal Infect 50:305–307. https://doi.org/10.1016/J.MEDMAL.2020.01.003

777. Morris FC, Dexter C, Kostoulias X, et al (2019) The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol 10:448380. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01601/BIBTEX

778. Morrissey I, Olesky M, Hawser S, et al (2020) In Vitro Activity of Eravacycline against Gram-Negative Bacilli Isolated in Clinical Laboratories Worldwide from 2013 to 2017. Antimicrob Agents Chemother 64:. https://doi.org/10.1128/AAC.01699-19

779. Morte E, Tolmos M, Halperin A, et al (2018) Early prosthetic endocarditis caused by

Stenotrophomonas maltophilia. Med Mal Infect 48:543–546. https://doi.org/10.1016/J.MEDMAL.2018.09.004

780. Moshirabadi A, Razi M, Arasteh P, et al (2019) Polymerase Chain Reaction Assay Using the Restriction Fragment Length Polymorphism Technique in the Detection of Prosthetic Joint Infections: A Multi-Centered Study. J Arthroplasty 34:359–364. https://doi.org/10.1016/J.ARTH.2018.10.017

781. Mosqueda N, Espinal P, Cosgaya C, et al (2013) Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain. Antimicrob Agents Chemother 57:5155–5157. https://doi.org/10.1128/AAC.01486-13

782. Moubareck CA, Halat DH (2020) Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. Antibiotics 9:. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9030119

783. Moynié L, Serra I, Scorciapino MA, et al (2018) Preacinetobactin not acinetobactin is essential for iron uptake by the BauA transporter of the pathogen *Acinetobacter baumannii*. Elife 7:. https://doi.org/10.7554/ELIFE.42270

784. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P (2010) Worldwide dissemination of the $bla_{\text{OXA-23}}$ carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. Emerg Infect Dis 16:35–40. https://doi.org/10.3201/EID1601.090852

785. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K (2014) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. Microb Ecol 68:1–12. https://doi.org/10.1007/S00248-013-0297-X

786. Müller C, Reuter S, Wille J, et al (2023) A global view on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. MBio. https://doi.org/10.1128/MBIO.02260-23

787. Murphy K, Park AJ, Hao Y, et al (2014) Influence of O polysaccharides on biofilm development and outer membrane vesicle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 196:1306–1317. https://doi.org/10.1128/JB.01463-13

788. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, et al (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet 399:629–655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

789. Murray TS, Kazmierczak BI (2008) *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. J Bacteriol 190:2700–2708. https://doi.org/10.1128/JB.01620-07

790. Mushtaq S, Sadouki Z, Vickers A, et al (2020) In Vitro Activity of Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin, against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. Antimicrob Agents Chemother 64:. https://doi.org/10.1128/AAC.01582-20

791. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM (2005) Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. Antimicrob Agents Chemother 49:1432–1440. https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1432-1440.2005

792. Mussi MA, Relling VM, Limansky AS, Viale AM (2007) CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake. FEBS

Lett 581:5573–5578. https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2007.10.063

793. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, et al (2006) Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. J Antimicrob Chemother 58:178–182. https://doi.org/10.1093/JAC/DKL178

794. Naas T, Levy M, Hirschauer C, et al (2005) Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. J Clin Microbiol 43:4826–4829. https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4826-4829.2005

795. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, et al (2017) Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. J Enzyme Inhib Med Chem 32:917–919. https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235

796. Naas T, Poirel L, Karim A, Nordmann P (1999) Molecular characterization of In*50*, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 176:411–419. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1999.TB13691.X

797. Nadal Jimenez P, Koch G, Thompson JA, et al (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev 76:46–65. https://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11

798. Nadon C, Van Walle I, Gerner-Smidt P, et al (2017) PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. Euro Surveill 22:. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30544

799. Nafplioti K, Galani I, Angelidis E, et al (2020) Dissemination of International Clone II *Acinetobacter baumannii* Strains Coproducing OXA-23 Carbapenemase and 16S rRNA Methylase ArmA in Athens, Greece. Microb Drug Resist 26:9–13. https://doi.org/10.1089/MDR.2019.0075

800. Nairn BL, Lonergan ZR, Wang J, et al (2016) The Response of *Acinetobacter baumannii* to Zinc Starvation. Cell Host Microbe 19:826–836. https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2016.05.007

801. Nakamura R, Oota M, Matsumoto S, et al (2021) In Vitro Activity and In Vivo Efficacy of Cefiderocol against *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 65:. https://doi.org/10.1128/AAC.01436-20

802. Nas MY, Cianciotto NP (2017) Stenotrophomonas maltophilia produces an EntC-dependent catecholate siderophore that is distinct from enterobactin. Microbiol (United Kingdom) 163:1590–1603. https://doi.org/10.1099/MIC.0.000545/CITE/REFWORKS

803. Naskar S, Hohl M, Tassinari M, Low HH (2021) The structure and mechanism of the bacterial type II secretion system. Mol Microbiol 115:412–424. https://doi.org/10.1111/MMI.14664

804. Nazari M, Ahmadi H, Hosseinzadeh S, et al (2023) Imipenem resistance associated with amino acid alterations of the OprD porin in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Acta Microbiol Immunol Hung 70:206–212. https://doi.org/10.1556/030.2023.02060

805. Neeld D, Jin Y, Bichsel C, et al (2014) *Pseudomonas aeruginosa* injects NDK into host cells through a type III secretion system. Microbiology 160:1417–1426. https://doi.org/10.1099/MIC.0.078139-0

806. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, et al (2015) *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 65:934–942. https://doi.org/10.1099/IJS.0.000043

807. Nesme X, Vaneechoutte M, Orso S, et al (1995) Diversity and Genetic Relatedness within Genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* Using Restriction Endonuclease Site Differences of PCR-amplified 16S rRNA Gene. Syst Appl Microbiol 18:127–135. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80460-1

808. Newman JW, Floyd R V., Fothergill JL (2017) The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. FEMS Microbiol Lett 364:. https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX124

809. Nguyen M, Joshi SG (2021) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their importance in hospital-acquired infections: a scientific review. J Appl Microbiol 131:2715–2738. https://doi.org/10.1111/JAM.15130

810. Nhu NTK, Riordan DW, Nhu TDH, et al (2016) The induction and identification of novel Colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. Sci Reports 2016 61 6:1–8. https://doi.org/10.1038/srep28291

811. Nichols WW, De Jonge BLM, Kazmierczak KM, et al (2016) In Vitro Susceptibility of Global Surveillance Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to Ceftazidime-Avibactam (INFORM 2012 to 2014). Antimicrob Agents Chemother 60:4743–4749. https://doi.org/10.1128/AAC.00220-16

812. Nickzad A, Déziel E (2014) The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development – an approach for control? Lett Appl Microbiol 58:447–453. https://doi.org/10.1111/LAM.12211

813. Nicoletti M, Iacobino A, Prosseda G, et al (2011) *Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis patients: genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants. Int J Med Microbiol 301:34–43. https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2010.07.003

814. Nie D, Hu Y, Chen Z, et al (2020) Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. J Biomed Sci 27:. https://doi.org/10.1186/S12929-020-0617-7

815. Nie L, Lv Y, Yuan M, et al (2014) Genetic basis of high level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* from Beijing, China. Acta Pharm Sin B 4:295–300. https://doi.org/10.1016/J.APSB.2014.06.004

816. Nikolaidis M, Mossialos D, Oliver SG, Amoutzias GD (2020) Comparative Analysis of the Core Proteomes among the *Pseudomonas* Major Evolutionary Groups Reveals Species-Specific Adaptations for *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas chlororaphis*. Divers 2020, Vol 12, Page 289 12:289. https://doi.org/10.3390/D12080289

817. Nolan LM, Turnbull L, Katrib M, et al (2020) *Pseudomonas aeruginosa* is capable of natural transformation in biofilms. Microbiol (United Kingdom) 166:995–1003. https://doi.org/10.1099/MIC.0.000956/CITE/REFWORKS

818. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, et al (2016) Infection in Burns. Surg Infect (Larchmt) 17:250. https://doi.org/10.1089/SUR.2013.134

819. Nordmann P, Guibert M (1998) Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 42:128–131. https://doi.org/10.1093/JAC/42.2.128

820. Nordmann P, Naas T (1994) Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa and comparison with class A beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 38:104–114. https://doi.org/10.1128/AAC.38.1.104

821. Nordmann P, Poirel L (2019) Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. Clin Infect Dis 69:S521–S528. https://doi.org/10.1093/CID/CIZ824

822. Nordmann P, Shields RK, Doi Y, et al (2022) Mechanisms of Reduced Susceptibility to Cefiderocol Among Isolates from the CREDIBLE-CR and APEKS-NP Clinical Trials. Microb Drug Resist 28:398–407. https://doi.org/10.1089/MDR.2021.0180

823. Noval M, Banoub M, Claeys KC, Heil E (2020) The Battle Is on: New Beta-Lactams for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms. Curr Infect Dis Rep 22:1–9. https://doi.org/10.1007/S11908-020-0710-9/METRICS

824. Novelli A, Del Giacomo P, Rossolini GM, Tumbarello M (2020) Meropenem/vaborbactam: a next generation β-lactam β-lactamase inhibitor combination. Expert Rev Anti Infect Ther 18:643–655. https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1756775

825. Novović K, Jovčić B (2023) Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology. Antibiot (Basel, Switzerland) 12:. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12030516

826. Nowak J, Zander E, Stefanik D, et al (2017) High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. J Antimicrob Chemother 72:3277–3282. https://doi.org/10.1093/JAC/DKX322

827. Nurjadi D, Kocer K, Chanthalangsy Q, et al (2022) New Delhi Metallo-Beta-Lactamase Facilitates the Emergence of Cefiderocol Resistance in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 66:. https://doi.org/10.1128/AAC.02011-21

828. O'Brien M, Davis GHG (1982) Enzymatic profile of *Pseudomonas maltophilia*. J Clin Microbiol 16:417–421. https://doi.org/10.1128/JCM.16.3.417-421.1982

829. O'Neill J (2016) Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Wellcome Trust (London, England).

830. Ochoa-Sánchez LE, Vinuesa P (2017) Evolutionary Genetic Analysis Uncovers Multiple Species with Distinct Habitat Preferences and Antibiotic Resistance Phenotypes in the *Stenotrophomonas maltophilia* Complex. Front Microbiol 8:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01548

831. Okazaki A, Avison MB (2008) Induction of L1 and L2 beta-lactamase production in *Stenotrophomonas maltophilia* is dependent on an AmpR-type regulator. Antimicrob Agents Chemother 52:1525–1528. https://doi.org/10.1128/AAC.01485-07

832. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM (2014) Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol 5:116005. https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00643/BIBTEX

833. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C (2015) The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat 21–22:41–59. https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2015.08.002

834. Oliver A, Rojo-Molinero E, Arca-Suarez J, et al (2024) *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages: update from ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group. Clin Microbiol Infect 30:469–480. https://doi.org/10.1016/J.CMI.2023.12.026

835. Opazo-Capurro A, Morales-León F, Jerez C, et al (2022) Isolation of an Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa exoS*+/O4 Strain Belonging to the "High-Risk" Clone ST654 and Coproducer of NDM-1 and the Novel VIM-80. Microbiol Spectr 10:. https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01439-22

836. Orgad O, Oren Y, Walker SL, Herzberg M (2011) The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. Biofouling 27:787–798. https://doi.org/10.1080/08927014.2011.603145

837. Osawa K, Shigemura K, Kitagawa K, et al (2018) Risk factors for death from *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. J Infect Chemother 24:632–636. https://doi.org/10.1016/J.JIAC.2018.03.011

838. Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML (1990) Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 172:5915–5923. https://doi.org/10.1128/JB.172.10.5915-5923.1990

839. Özkaya E, Aydin F, Bayramoğlu G, et al (2014) Investigation of integrons, sul1-2 and dfr genes in trimethoprim-sulfametoxazole-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from clinical samples. Mikrobiyol Bul 48:201–212. https://doi.org/10.5578/MB.7262

840. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, et al (2004) Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. J Clin Microbiol 42:2523–2529. https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2523-2529.2004

841. Pai H, Kim JW, Kim J, et al (2001) Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 45:480–484. https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.480-484.2001

842. Pakharukova N, Tuittila M, Paavilainen S, et al (2018) Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Proc Natl Acad Sci U S A 115:5558–5563. https://doi.org/10.1073/PNAS.1800961115/-/DCSUPPLEMENTAL

843. Palioura S, Gibbons A, Miller D, et al (2018) Clinical Features, Antibiotic Susceptibility Profile, and Outcomes of Infectious Keratitis Caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. Cornea 37:326–330. https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001486

844. Palleroni NJ (1993) *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-

negative bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 64:231–251. https://doi.org/10.1007/BF00873084

845. Palleroni NJ (2015a) *Pseudomonas*. Bergey's Man Syst Archaea Bact 1–1. https://doi.org/10.1002/9781118960608.GBM01210

846. Palleroni NJ (2010) The *Pseudomonas* Story. Environ Microbiol 12:1377–1383. https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2009.02041.X

847. Palleroni NJ (2015b) *Stenotrophomonas*. Bergey's Man Syst Archaea Bact 1–20. https://doi.org/10.1002/9781118960608.GBM01237

848. Palleroni NJ, Bradbury JF (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. Int J Syst Bacteriol 43:606–609. https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-606

849. Palmieri M, D'Andrea MM, Pelegrin AC, et al (2020) Abundance of Colistin-Resistant, OXA-23- and ArmA-Producing *Acinetobacter baumannii* Belonging to International Clone 2 in Greece. Front Microbiol 11:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00668

850. Pan S, Huang X, Wang Y, et al (2018) Efficacy of intravenous plus intrathecal/intracerebral ventricle injection of polymyxin B for post-neurosurgical intracranial infections due to MDR/XDR *Acinectobacter baumannii*: a retrospective cohort study. Antimicrob Resist Infect Control 7:. https://doi.org/10.1186/S13756-018-0305-5

851. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, et al (2019) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv 37:177–192. https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.11.013

852. Panmanee W, Gomez F, Witte D, et al (2008) The peptidoglycan-associated lipoprotein OprL helps protect a *Pseudomonas aeruginosa* mutant devoid of the transactivator OxyR from hydrogen peroxide-mediated killing during planktonic and biofilm culture. J Bacteriol 190:3658–3669. https://doi.org/10.1128/JB.00022-08

853. Papa A, Koulourida V, Souliou E (2009) Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a newly established Greek hospital. Microb Drug Resist 15:257–260. https://doi.org/10.1089/MDR.2009.0060

854. Papagiannitsis CC, Medvecky M, Chudejova K, et al (2017) Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech Origin and Evidence for Clonal Spread of Extensively Resistant Sequence Type 357 Expressing IMP-7 Metallo-β-Lactamase. Antimicrob Agents Chemother 61:. https://doi.org/10.1128/AAC.01811-17

855. Papathanakos G, Andrianopoulos I, Papathanasiou A, et al (2020a) Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* treatment: still a debatable topic with no definite solutions. J Antimicrob Chemother 75:3081. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA264

856. Papathanakos G, Andrianopoulos I, Papathanasiou A, et al (2020b) Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii* Bacteremia: A Serious Threat for Critically Ill Patients. Microorganisms 8:. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020287

857. Pappa O, Kefala AM, Tryfinopoulou K, et al (2020) Molecular Epidemiology of Multi-Drug

Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Hospitalized Patients in Greece. Microorganisms 8:1–16. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8111652

858. Pappa O, Louka C, Karadimas K, et al (2024) Emergence of NDM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Nosocomial Isolates in Attica Region of Greece. Microorganisms 12:1753. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12091753

859. Park BC, Lim HR, Park SJ, Koh JW (2021) Clinical Features and Management of *Stenotrophomonas maltophilia* Keratitis. Ophthalmol Ther 10:525–533. https://doi.org/10.1007/S40123-021-00348-Z

860. Park BS, Lee JO (2013) Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. Exp Mol Med 45:. https://doi.org/10.1038/EMM.2013.97

861. Park S, Lee KM, Yoo YS, et al (2011a) Alterations of *gyrA*, *gyrB*, and *parC* and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. Osong public Heal Res Perspect 2:164–170. https://doi.org/10.1016/J.PHRP.2011.11.040

862. Park SJ, Kim SK, So YI, et al (2014) Protease IV, a quorum sensing-dependent protease of *Pseudomonas aeruginosa* modulates insect innate immunity. Mol Microbiol 94:1298–1314. https://doi.org/10.1111/MMI.12830

863. Park SM, Suh JW, Ju YK, et al (2023) Molecular and virulence characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates: a prospective cohort study. Sci Rep 13:19536. https://doi.org/10.1038/S41598-023-46985-1

864. Park SY, Shin HJ, Kim GJ (2011b) Screening and identification of a novel esterase EstPE from a metagenomic DNA library. J Microbiol 49:7–14. https://doi.org/10.1007/S12275-011-0201-7

865. Parte AC, Carbasse JS, Meier-Kolthoff JP, et al (2020) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. Int J Syst Evol Microbiol 70:5607–5612. https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004332

866. Pasteran F, Faccone D, Petroni A, et al (2005) Novel Variant ($bla_{\text{VIM-11}}$) of the Metallo-β-Lactamase bla_{VIM} Family in a GES-1 Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 49:474. https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.474-475.2005

867. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, et al (2011) Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta- lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. J Clin Microbiol 49:4301–4303. https://doi.org/10.1128/JCM.05602-11

868. Pathmanathan A, Waterer GW (2005) Significance of positive *Stenotrophomonas maltophilia* culture in acute respiratory tract infection. Eur Respir J 25:911–914. https://doi.org/10.1183/09031936.05.00096704

869. Patil PP, Kumar S, Midha S, et al (2018) Taxonogenomics reveal multiple novel genomospecies associated with clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Microb genomics 4:. https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000207

870. Paton R, Miles RS, Hood J, et al (1993) ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 2:81–87. https://doi.org/10.1016/0924-8579(93)90045-7

871. Paul D, Mallick S, Das S, et al (2020) Colistin Induced Assortment of Antimicrobial Resistance in a Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii* SD01. Infect Disord Drug Targets 20:501–505. https://doi.org/10.2174/1871526519666190426153258

872. Paul M, Carrara E, Retamar P, et al (2022) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). Clin Microbiol Infect 28:521–547. https://doi.org/10.1016/J.CMI.2021.11.025

873. Paulsson M, Su YC, Ringwood T, et al (2019) *Pseudomonas aeruginosa* uses multiple receptors for adherence to laminin during infection of the respiratory tract and skin wounds. Sci Rep 9:. https://doi.org/10.1038/S41598-019-54622-Z

874. Pazos MA, Lanter BB, Yonker LM, et al (2017) *Pseudomonas aeruginosa* ExoU augments neutrophil transepithelial migration. PLoS Pathog 13:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006548

875. Pea C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, et al (2015) Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Clin Infect Dis 60:539–548. https://doi.org/10.1093/CID/CIU866

876. Pek Z, Cabanilla MG, Ahmed S (2021) Treatment refractory *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia and pneumonia in a COVID-19-positive patient. BMJ Case Rep 14:. https://doi.org/10.1136/BCR-2021-242670

877. Peleg AY, Franklin C, Bell J, Spelman DW (2004) Emergence of IMP-4 metallo-β-lactamase in a clinical isolate from Australia. J Antimicrob Chemother 54:699–700. https://doi.org/10.1093/JAC/DKH398

878. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 21:538–582. https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07

879. Pelicic V (2019) Monoderm bacteria: the new frontier for type IV pilus biology. Mol Microbiol 112:1674–1683. https://doi.org/10.1111/MMI.14397

880. Pelletier MR, Casella LG, Jones JW, et al (2013) Unique structural modifications are present in the lipopolysaccharide from colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 57:4831–4840. https://doi.org/10.1128/AAC.00865-13

881. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, et al (2019) Relationship between quorum sensing and secretion systems. Front Microbiol 10:455464. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01100/BIBTEX

882. Penwell WF, Arivett BA, Actis LA (2012) The *Acinetobacter baumannii entA* gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence. PLoS One 7:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0036493

883. Pérez-Varela M, Corral J, Vallejo JA, et al (2017) Mutations in the β-Subunit of the RNA

Polymerase Impair the Surface-Associated Motility and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. Infect Immun 85:. https://doi.org/10.1128/IAI.00327-17

884. Pérez A, Merino M, Rumbo-Feal S, et al (2017) The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain. Virulence 8:959–974. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1262313

885. Pérez PN, Ramírez MA, Fernández JA, de Guevara LL (2014) A Patient Presenting with Cholangitis due to *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas aeruginosa* Successfully Treated with Intrabiliary Colistine. Infect Dis Rep 6:17–19. https://doi.org/10.4081/IDR.2014.5147

886. Persat A, Inclan YF, Engel JN, et al (2015) Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 112:7563–7568. https://doi.org/10.1073/PNAS.1502025112

887. Petri A, Tiszlavicz L, Nagy E, et al (2003) Liver abscess caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: report of a case. Surg Today 33:224–228. https://doi.org/10.1007/S005950300050

888. Petrova A, Feodorova Y, Miteva-Katrandzhieva T, et al (2019) First detected OXA-50 carbapenem-resistant clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* from Bulgaria and interplay between the expression of main efflux pumps, OprD and intrinsic AmpC. J Med Microbiol 68:1723–1731. https://doi.org/10.1099/JMM.0.001106

889. Petrova AP, Stanimirova ID, Ivanov IN, et al (2017) Carbapenemase Production of Clinical Isolates *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from a Bulgarian University Hospital. Folia Med (Plovdiv) 59:413–422. https://doi.org/10.1515/FOLMED-2017-0060

890. Peykov S, Stratev A, Kirov B, et al (2022) First detection of a colistin-resistant *Klebsiella aerogenes* isolate from a critically ill patient with septic shock in Bulgaria. Acta Microbiol Immunol Hung 69:209–214. https://doi.org/10.1556/030.2022.01833

891. Peykov S, Strateva T (2023) Whole-Genome Sequencing-Based Resistome Analysis of Nosocomial Multidrug-Resistant Non-Fermenting Gram-Negative Pathogens from the Balkans. Microorganisms 11:. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11030651

892. Pfeifer Y, Trifonova A, Pietsch M, et al (2017) Clonal Transmission of Gram-Negative Bacteria with Carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian Hospital. Microb Drug Resist 23:301–307. https://doi.org/10.1089/MDR.2016.0059

893. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, et al (2011) Molecular characterization of $bla_{\text{NDM-1}}$ in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. J Antimicrob Chemother 66:1998–2001. https://doi.org/10.1093/JAC/DKR256

894. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R (2016) A Structure-Based Classification of Class A β-Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. Clin Microbiol Rev 29:29–57. https://doi.org/10.1128/CMR.00019-15

895. Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, et al (2016) Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. Front Immunol 7:. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2016.00484

896. Piperaki ET, Tzouvelekis LS, Miriagou V, Daikos GL (2019) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: in pursuit of an effective treatment. Clin Microbiol Infect 25:951–957. https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.03.014

897. Piran A, Shahcheraghi F, Solgi H, et al (2017) A reliable combination method to identification and typing of epidemic and endemic clones among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Infect Genet Evol 54:501–507. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2017.08.018

898. Pirzadian J, Persoon MC, Severin JA, et al (2021) National surveillance pilot study unveils a multicenter, clonal outbreak of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST111 in the Netherlands between 2015 and 2017. Sci Reports 2021 111 11:1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00205-w

899. Piyakul C, Tiyawisutsri R, Boonbumrung K (2012) Emergence of metallo-β-lactamase IMP-14 and VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a tertiary-level hospital in Thailand. Epidemiol Infect 140:539–541. https://doi.org/10.1017/S0950268811001294

900. Planquette B, Timsit JF, Misset BY, et al (2013) *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia. predictive factors of treatment failure. Am J Respir Crit Care Med 188:69–76. https://doi.org/10.1164/RCCM.201210-1897OC

901. Pobiega M, Maciag J, Pomorska-Wesolowska M, et al (2016) Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* among children in Southern Poland: Virulence factors and antibiotic resistance. J Pediatr Urol 12:36.e1-36.e6. https://doi.org/10.1016/J.JPUROL.2015.05.034

902. Poirel L, Brinas L, Verlinde A, et al (2005a) BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In*120* in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 49:3743–3748. https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3743-3748.2005

903. Poirel L, De la Rosa JMO, Sadek M, Nordmann P (2022) Impact of Acquired Broad-Spectrum β-Lactamases on Susceptibility to Cefiderocol and Newly Developed β-Lactam/β-Lactamase Inhibitor Combinations in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 66:. https://doi.org/10.1128/AAC.00039-22

904. Poirel L, Kieffer N, Nordmann P (2018) Stability of cefiderocol against clinically significant broad-spectrum oxacillinases. Int J Antimicrob Agents 52:866–867. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2018.11.005

905. Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P (2008) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. Antimicrob Agents Chemother 52:1613–1617. https://doi.org/10.1128/AAC.00978-07

906. Poirel L, Marqué S, Héritier C, et al (2005b) OXA-58, a novel class D β-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 49:202–208. https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.202-208.2005

907. Poirel L, Naas T, Nicolas D, et al (2000) Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. Antimicrob Agents Chemother 44:891–897.

https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.891-897.2000

908. Poirel L, Naas T, Nordmann P (2010) Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 54:24–38. https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08

909. Poirel L, Nordmann P (2002) Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. Curr Pharm Biotechnol 3:117–127. https://doi.org/10.2174/1389201023378427

910. Poirel L, Nordmann P (2006) Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene $bla_{\text{OXA-58}}$ in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 50:1442–1448. https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1442-1448.2006

911. Poirel L, Rotimi VO, Mokaddas EM, et al (2001) VEB-1-like extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. Emerg Infect Dis 7:468–470. https://doi.org/10.3201/EID0703.010322

912. Poirel L, Sadek M, Nordmann P (2021) Contribution of PER-Type and NDM-Type β-Lactamases to Cefiderocol Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 65:877–898. https://doi.org/10.1128/AAC.00877-21

913. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis 70:119–123. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2010.12.002

914. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P (2002) A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. J Antimicrob Chemother 49:561–565. https://doi.org/10.1093/JAC/49.3.561

915. Pollini S, Maradei S, Pecile P, et al (2013) FIM-1, a new acquired metallo-β-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. Antimicrob Agents Chemother 57:410–416. https://doi.org/10.1128/AAC.01953-12/ASSET/6F1DFDAB-8F32-448A-A706-2CDE01E0454E/ASSETS/GRAPHIC/ZAC9991015110002.JPEG

916. Pompilio A, Crocetta V, Confalone P, et al (2010) Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. BMC Microbiol 10:. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-102

917. Pompilio A, Crocetta V, Di Bonaventura G (2018) *Stenotrophomonas maltophilia* mutant lacking flagella remains virulent in DBA/2N mice but is less efficient in stimulating TNF-α expression. FEMS Microbiol Lett 365:. https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNY205

918. Pompilio A, Crocetta V, Ghosh D, et al (2016) *Stenotrophomonas maltophilia* Phenotypic and Genotypic Diversity during a 10-year Colonization in the Lungs of a Cystic Fibrosis Patient. Front Microbiol 7:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01551

919. Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, et al (2008) Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. FEMS Microbiol Lett 287:41–47. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2008.01292.X

920. Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V, et al (2011) Phenotypic and genotypic characterization of

Stenotrophomonas maltophilia isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. BMC Microbiol 11:. https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-159

921. Pompilio A, Ranalli M, Piccirilli A, et al (2020a) Biofilm Formation among *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Has Clinical Relevance: The ANSELM Prospective Multicenter Study. Microorg 2021, Vol 9, Page 49 9:49. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9010049

922. Pompilio A, Savini V, Fiscarelli E, et al (2020b) Clonal Diversity, Biofilm Formation, and Antimicrobial Resistance among *Stenotrophomonas maltophilia* Strains from Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Patients. Antibiot 2020, Vol 9, Page 15 9:15. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9010015

923. Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, et al (1996) Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 21:713–725. https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1996.281397.X

924. Potron A, Poirel L, Nordmann P (2015) Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. Int J Antimicrob Agents 45:568–585. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2015.03.001

925. Pour NK, Dusane DH, Dhakephalkar PK, et al (2011) Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. FEMS Immunol Med Microbiol 62:328–338. https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2011.00818.X

926. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, et al (2006) Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. J Antimicrob Chemother 57:557–561. https://doi.org/10.1093/JAC/DKL004

927. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, et al (2002) Novel Variant ($bla_{\text{VIM-4}}$) of the Metallo-β-Lactamase Gene $bla_{\text{VIM-1}}$ in a Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 46:4026. https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.4026-4028.2002

928. Pressler T, Bohmova C, Conway S, et al (2011) Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. J Cyst Fibros 10 Suppl 2: https://doi.org/10.1016/S1569-1993(11)60011-8

929. Principe L, Lupia T, Andriani L, et al (2022) Microbiological, Clinical, and PK/PD Features of the New Anti-Gram-Negative Antibiotics: β-Lactam/β-Lactamase Inhibitors in Combination and Cefiderocol - An All-Inclusive Guide for Clinicians. Pharm 2022, Vol 15, Page 463 15:463. https://doi.org/10.3390/PH15040463

930. Principe L, Piazza A, Giani T, et al (2014) Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. J Clin Microbiol 52:3004–3010. https://doi.org/10.1128/JCM.00291-14

931. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, et al (2020) Using SPAdes De Novo Assembler. Curr Protoc Bioinforma 70:. https://doi.org/10.1002/CPBI.102

932. Prussing C, Canulla T, Singh N, et al (2021) Characterization of the First Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate Harboring $bla_{\text{SIM-1}}$ from the United States. Antimicrob

Agents Chemother 65:. https://doi.org/10.1128/AAC.01066-21

933. Pustijanac E, Hrenović J, Vranić-Ladavac M, et al (2023) Dissemination of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolate to Hospital Environment during the COVID-19 Pandemic. Pathog (Basel, Switzerland) 12:. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12030410

934. Qadi M, Lopez-Causapé C, Izquierdo-Rabassa S, et al (2016) Surfactant Protein A Recognizes Outer Membrane Protein OprH on *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Individuals With Chronic Infection. J Infect Dis 214:1449–1455. https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIW387

935. Qin S, Xiao W, Zhou C, et al (2022) *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduct Target Ther 7:. https://doi.org/10.1038/S41392-022-01056-1

936. Quinones-Falconi F, Galicia-Velasco M, Marchiaro P, et al (2010) Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo-beta-lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. Clin Microbiol Infect 16:126–131. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2009.02780.X

937. Quinteira S, Grosso F, Ramos H, Peixe L (2007) Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. Antimicrob Agents Chemother 51:3465–3466. https://doi.org/10.1128/AAC.00267-07

938. Raad M, Abou Haidar M, Ibrahim R, et al (2023) *Stenotrophomonas maltophilia* pneumonia in critical COVID-19 patients. Sci Rep 13:. https://doi.org/10.1038/S41598-023-28438-X

939. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, et al (2015) Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Med Chem 7:493–512. https://doi.org/10.4155/FMC.15.6

940. Rada AM, De La Cadena E, Agudelo CA, et al (2021) Genetic Diversity of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Carrying bla VIM-2 and bla KPC-2 Genes That Spread on Different Genetic Environment in Colombia. Front Microbiol 12:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.663020

941. Raddaoui A, Mabrouk A, Chebbi Y, et al (2024a) Outbreak caused by pandrug-resistant $bla_{\text{OXA-69}}$/$bla_{\text{OXA-23}}$/bla_{GES} harboring *Acinetobacter baumannii* ST2 in an intensive care unit. Acta Microbiol Immunol Hung. https://doi.org/10.1556/030.2024.02202

942. Raddaoui A, Mabrouk A, Chebbi Y, et al (2024b) Co-occurrence of $bla_{\text{NDM-1}}$ and $bla_{\text{OXA-23}}$ in carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* belonging to high-risk lineages isolated from burn patients in Tunisia. J Appl Microbiol 135:. https://doi.org/10.1093/JAMBIO/LXAE039

943. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, et al (2014) Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Lebanon using four different typing methods. PLoS One 9:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0115969

944. Rafei R, Hamze M, Pailhoriès H, et al (2015) Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. Appl Environ Microbiol 81:2359–2367. https://doi.org/10.1128/AEM.03824-14

945. Rafei R, Osman M, Dabboussi F, Hamze M (2019) Update on the epidemiological typing methods for *Acinetobacter baumannii*. Future Microbiol 14:1065–1080. https://doi.org/10.2217/FMB-2019-

0134

946. Rahman A, Styczynski A, Khaleque A, et al (2022) Genomic landscape of prominent XDR *Acinetobacter* clonal complexes from Dhaka, Bangladesh. BMC Genomics 23:. https://doi.org/10.1186/S12864-022-08991-X

947. Rajabi H, Salimizand H, Khodabandehloo M, et al (2022) Prevalence of *algD*, *pslD*, *pelF*, *Ppgl*, and *PAPI-1* Genes Involved in Biofilm Formation in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains. Biomed Res Int 2022:. https://doi.org/10.1155/2022/1716087

948. Ramirez MS, Tolmasky ME (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat 13:151–171. https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2010.08.003

949. Ramos-Esteban JC, Jeng BH (2008) Posttraumatic *Stenotrophomonas maltophilia* infectious scleritis. Cornea 27:232–235. https://doi.org/10.1097/ICO.0B013E318159A968

950. Rangel K, Chagas TPG, De-Simone SG (2021) *Acinetobacter baumannii* Infections in Times of COVID-19 Pandemic. Pathog (Basel, Switzerland) 10:. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10081006

951. Rangel SM, Logan LK, Hausera AR (2014) The ADP-ribosyltransferase domain of the effector protein ExoS inhibits phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. MBio 5:. https://doi.org/10.1128/MBIO.01080-14

952. Rao R, Karthika R, Singh S, et al (2008) Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Indian J Med Microbiol 26:333–337. https://doi.org/10.4103/0255-0857.43566

953. Ravasi P, Limansky AS, Rodriguez RE, et al (2011) IS*Aba825*, a functional insertion sequence modulating genomic plasticity and $bla_{(OXA-58)}$ expression in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 55:917–920. https://doi.org/10.1128/AAC.00491-10

954. Rayner B, Verderosa AD, Ferro V, Blaskovich MAT (2023) Siderophore conjugates to combat antibiotic-resistant bacteria. RSC Med Chem 14:800–822. https://doi.org/10.1039/D2MD00465H

955. Recio R, Mancheño M, Viedma E, et al (2020) Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* and Impact of Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence. Antimicrob Agents Chemother 64:. https://doi.org/10.1128/AAC.01759-19

956. Recio R, Villa J, Viedma E, et al (2018) Bacteraemia due to extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 high-risk clone: Facing the perfect storm. Int J Antimicrob Agents 52:172–179. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2018.03.018

957. Remans K, Vercammen K, Bodilis J, Cornelis P (2010) Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 156:2597–2607. https://doi.org/10.1099/MIC.0.040659-0

958. Repizo GD (2017) Prevalence of *Acinetobacter baumannii* strains expressing the Type 6 secretion system in patients with bacteremia. Virulence 8:1099–1101. https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1346768

959. Repizo GD, Gagné S, Foucault-Grunenwald ML, et al (2015) Differential Role of the T6SS in

Acinetobacter baumannii Virulence. PLoS One 10:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0138265

960. Restrepo MI, Babu BL, Reyes LF, et al (2018) Burden and risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients. Eur Respir J 52:. https://doi.org/10.1183/13993003.01190-2017

961. Reynaud Q, Weber E, Gagneux-Brunon A, et al (2015) Late *Stenotrophomonas maltophilia* pacemaker infective endocarditis. Med Mal Infect 45:95–97. https://doi.org/10.1016/J.MEDMAL.2015.01.016

962. Reynolds D, Kollef M (2021) The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. Drugs 81:2117–2131. https://doi.org/10.1007/S40265-021-01635-6

963. Ribeiro PCS, Monteiro AS, Marques SG, et al (2016) Phenotypic and molecular detection of the bla_{KPC} gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. BMC Infect Dis 16:1–16. https://doi.org/10.1186/S12879-016-2072-3/FIGURES/5

964. Ribera A, Ruiz J, Vila J (2003) Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 47:2310–2312. https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2310-2312.2003

965. Ribitsch D, Heumann S, Karl W, et al (2012) Extracellular serine proteases from *Stenotrophomonas maltophilia*: Screening, isolation and heterologous expression in *E. coli*. J Biotechnol 157:140–147. https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2011.09.025

966. Rice LB (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis 197:1079–1081. https://doi.org/10.1086/533452

967. Richmond GE, Evans LP, Anderson MJ, et al (2016) The *Acinetobacter baumannii* Two-Component System AdeRS Regulates Genes Required for Multidrug Efflux, Biofilm Formation, and Virulence in a Strain-Specific Manner. MBio 7:. https://doi.org/10.1128/MBIO.00430-16

968. Riera E, Cabot G, Mulet X, et al (2011) *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. J Antimicrob Chemother 66:2022–2027. https://doi.org/10.1093/JAC/DKR232

969. Riquelme SA, Liimatta K, Wong Fok Lung T, et al (2020) *Pseudomonas aeruginosa* Utilizes Host-Derived Itaconate to Redirect Its Metabolism to Promote Biofilm Formation. Cell Metab 31:1091-1106.e6. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.04.017

970. Riquena B, Velloso Monte LDF, Lopes AJ, et al (2019) Microbiological contamination of nebulizers used by cystic fibrosis patients: an underestimated problem. J Bras Pneumol 45:. https://doi.org/10.1590/1806-3713/E20170351

971. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC (2006a) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. Lancet Infect Dis 6:629–640. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70599-0

972. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al (2006b) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med 12:83–88.

https://doi.org/10.1038/NM1347

973. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, et al (2010) Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother 54:1354–1357. https://doi.org/10.1128/AAC.00899-09

974. Rodrigues Perez LR (2015) *Acinetobacter baumannii* displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. J Chemother 27:13–15. https://doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000159

975. Rodríguez-González F, Marrero-Saavedra D, Rutllán-Civit J, et al (2013) Ocular necrotizing fasciitis due to *Pseudomonas aeruginosa* in a non-neutropenic patient. Saudi J Ophthalmol Off J Saudi Ophthalmol Soc 27:281–282. https://doi.org/10.1016/J.SJOPT.2013.09.001

976. Rodriguez-R LM, Gunturu S, Harvey WT, et al (2018) The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. Nucleic Acids Res 46:W282–W288. https://doi.org/10.1093/NAR/GKY467

977. Rosenau F, Isenhardt S, Gdynia A, et al (2010) Lipase LipC affects motility, biofilm formation and rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 309:25–34. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2010.02017.X

978. Rosenthal VD, Al-Abdely HM, El-Kholy AA, et al (2016) International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. Am J Infect Control 44:1495–1504. https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2016.08.007

979. Ross K, Varani AM, Snesrud E, et al (2021) TnCentral: a Prokaryotic Transposable Element Database and Web Portal for Transposon Analysis. MBio 12:. https://doi.org/10.1128/MBIO.02060-21

980. Rouyer M, Strazzulla A, Youbong T, et al (2021) Ventilator-Associated Pneumonia in COVID-19 Patients: A Retrospective Cohort Study. Antibiot (Basel, Switzerland) 10:. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10080988

981. Rubio AM, Kline EG, Jones CE, et al (2021) In Vitro Susceptibility of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* following Treatment-Emergent Resistance to Ceftolozane-Tazobactam. Antimicrob Agents Chemother 65:. https://doi.org/10.1128/AAC.00084-21

982. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, et al (2011) Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 55:3084–3090. https://doi.org/10.1128/AAC.00929-10

983. Rumbo C, Tomás M, Moreira EF, et al (2014) The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. Infect Immun 82:4666–4680. https://doi.org/10.1128/IAI.02034-14/ASSET/182582D6-2801-488A-8A6A-3A83C48E9F36/ASSETS/GRAPHIC/ZII9990909330009.JPEG

984. Runci F, Gentile V, Frangipani E, et al (2019) Contribution of Active Iron Uptake to *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. Infect Immun 87:. https://doi.org/10.1128/IAI.00755-18

985. Russel J, Pinilla-Redondo R, Mayo-Muñoz D, et al (2020) CRISPRCasTyper: Automated

Identification, Annotation, and Classification of CRISPR-Cas Loci. Cris J 3:462–469. https://doi.org/10.1089/CRISPR.2020.0059

986. Russo TA, Beanan JM, Olson R, et al (2013) The K1 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* is a potential therapeutic target via passive immunization. Infect Immun 81:915–922. https://doi.org/10.1128/IAI.01184-12

987. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, et al (2010) The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. Infect Immun 78:3993–4000. https://doi.org/10.1128/IAI.00366-10

988. Russo TA, MacDonald U, Beanan JM, et al (2009) Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. J Infect Dis 199:513–521. https://doi.org/10.1086/596317

989. Russo TA, Manohar A, Beanan JM, et al (2016) The Response Regulator BfmR Is a Potential Drug Target for *Acinetobacter baumannii*. mSphere 1:. https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00082-16

990. Rutherford V, Yom K, Ozer EA, et al (2018) Environmental reservoirs for *exoS*+ and *exoU*+ strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol Rep 10:485–492. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12653

991. Ryan RP, Fouhy Y, Garcia BF, et al (2008) Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 68:75–86. https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2008.06132.X

992. Rybtke M, Jensen PØ, Nielsen CH, Tolker-Nielsen T (2021) The extracellular polysaccharide matrix of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is a determinant of polymorphonuclear leukocyte responses. Infect Immun 89:. https://doi.org/10.1128/IAI.00631-20/SUPPL_FILE/IAI.00631-20-S0001.PDF

993. Ryoo NH, Lee K, Lim JB, et al (2009) Outbreak by meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-6 metallo-beta-lactamase in a Korean hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 63:115–117. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2008.08.019

994. Saadati M, Rahbarnia L, Farajnia S, et al (2021) The prevalence of biofilm encoding genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Gene Reports 23:101094. https://doi.org/10.1016/J.GENREP.2021.101094

995. Sabtcheva S, Stoikov I, Georgieva S, et al (2023) Incidence and Characterization of Carbapenem Resistance Mediated by Acquired Beta-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Bulgarian Cancer Hospital. Acta Microbiol Bulg 39:418–422

996. Sadeghifard N, Valizadeh A, Zolfaghary MR, et al (2012) Relationship between the Presence of the nalC Mutation and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Microbiol 2012:. https://doi.org/10.1155/2012/575193

997. Sader HS, Castanheira M, Flamm RK (2017) Antimicrobial Activity of Ceftazidime-Avibactam against Gram-Negative Bacteria Isolated from Patients Hospitalized with Pneumonia in U.S. Medical

Centers, 2011 to 2015. Antimicrob Agents Chemother 61:. https://doi.org/10.1128/AAC.02083-16

998. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Flamm RK (2018) Frequency and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria isolated from patients with pneumonia hospitalized in ICUs of US medical centres (2015-17). J Antimicrob Chemother 73:3053–3059. https://doi.org/10.1093/JAC/DKY279

999. Sader HS, Duncan LR, Arends SJR, et al (2020) Antimicrobial Activity of Aztreonam-Avibactam and Comparator Agents When Tested against a Large Collection of Contemporary *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from Medical Centers Worldwide. Antimicrob Agents Chemother 64:. https://doi.org/10.1128/AAC.01433-20

1000. Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL (2013) Microbial siderophores: a mini review. J Basic Microbiol 53:303–317. https://doi.org/10.1002/JOBM.201100552

1001. Saint-Criq V, Villeret B, Bastaert F, et al (2018) *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. Thorax 73:49–61. https://doi.org/10.1136/THORAXJNL-2017-210298

1002. Saipriya K, Swathi CH, Ratnakar KS, Sritharan V (2020) Quorum-sensing system in *Acinetobacter baumannii*: a potential target for new drug development. J Appl Microbiol 128:15–27. https://doi.org/10.1111/JAM.14330

1003. Saleh RO, Hussen BM, Mubarak SMH, Mostafavi SKS (2021) High diversity of virulent and multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in Iraq. Gene Reports 23:. https://doi.org/10.1016/J.GENREP.2021.101124

1004. Salsgiver EL, Fink AK, Knapp EA, et al (2016) Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients With Cystic Fibrosis. Chest 149:390–400. https://doi.org/10.1378/CHEST.15-0676

1005. Sampedro I, Parales RE, Krell T, Hill JE (2015) *Pseudomonas* chemotaxis. FEMS Microbiol Rev 39:17–46. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12081

1006. Sana TG, Berni B, Bleves S (2016) The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. Front Cell Infect Microbiol 6:. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2016.00061

1007. Sana TG, Hachani A, Bucior I, et al (2012) The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur and modulates internalization in epithelial cells. J Biol Chem 287:27095–27105. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376368

1008. Sánchez-Diener I, Zamorano L, López-Causapé C, et al (2017) Interplay among Resistance Profiles, High-Risk Clones, and Virulence in the *Caenorhabditis elegans Pseudomonas aeruginosa* Infection Model. Antimicrob Agents Chemother 61:. https://doi.org/10.1128/AAC.01586-17

1009. Sánchez-Urtaza S, Ocampo-Sosa A, Molins-Bengoetxea A, et al (2023a) Co-Existence of blaNDM-1, blaOXA-23, blaOXA-64, blaPER-7 and blaADC-57 in a Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii* from Alexandria, Egypt. Int J Mol Sci 24:. https://doi.org/10.3390/IJMS241512515

1010. Sánchez-Urtaza S, Ocampo-Sosa A, Molins-Bengoetxea A, et al (2023b) Molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Alexandria, Egypt. Front Cell Infect Microbiol 13:. https://doi.org/10.3389/FCIMB.2023.1208046

1011. Sánchez MB (2015) Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Front Microbiol 6:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00658

1012. Sánchez MB, Martínez JL (2010) SmQnr Contributes to Intrinsic Resistance to Quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 54:580. https://doi.org/10.1128/AAC.00496-09

1013. Sánchez MB, Martínez JL (2015) The efflux pump SmeDEF contributes to trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 59:4347–4348. https://doi.org/10.1128/AAC.00714-15

1014. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74:5463–5467. https://doi.org/10.1073/PNAS.74.12.5463

1015. Sanschagrin F, Bejaoui N, Levesque RC (1998) Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 42:1966–1972. https://doi.org/10.1128/AAC.42.8.1966

1016. Santella G, Pollini S, Docquier JD, et al (2010) Intercontinental Dissemination of IMP-13-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Belonging in Sequence Type 621. J Clin Microbiol 48:4342. https://doi.org/10.1128/JCM.00614-10

1017. Sarges EDSNF, Rodrigues YC, Furlaneto IP, et al (2020) *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Virulotypes and Their Association with Clinical Features of Cystic Fibrosis Patients. Infect Drug Resist 13:3771–3781. https://doi.org/10.2147/IDR.S273759

1018. Satish M, Mumtaz MA, Bittner MJ, Valenta C (2019) *Stenotrophomonas maltophilia* Endocarditis of an Implantable Cardioverter Defibrillator Lead. Cureus 11:. https://doi.org/10.7759/CUREUS.4165

1019. Sato H, Frank DW, Hillard CJ, et al (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. EMBO J 22:2959–2969. https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG290

1020. Sato Y, Unno Y, Kawakami S, et al (2017) Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. J Med Microbiol 66:203–212. https://doi.org/10.1099/JMM.0.000394/CITE/REFWORKS

1021. Savini V, Catavitello C, D'Aloisio M et al. (2010) Chloramphenicol and rifampin may be the only options against *Stenotrophomonas maltophilia*. A tale of a colonized bladder device in a patient with myelofibrosis - PubMed. Infez Med 18:193–197

1022. Sawai T, Yoshioka S, Matsuo N, et al (2017) Intraabdominal abscess caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: A case report. Int J Surg Case Rep 41:212–214. https://doi.org/10.1016/J.IJSCR.2017.10.027

1023. Schafer JJ, Mangino JE (2008) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* osteomyelitis from Iraq. Emerg Infect Dis 14:512–514. https://doi.org/10.3201/EID1403.070128

1024. Schick A, Kassen R (2018) Rapid diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung-like conditions. Proc Natl Acad Sci U S A 115:10714–10719. https://doi.org/10.1073/PNAS.1721270115

1025. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc 3:1101–1108. https://doi.org/10.1038/NPROT.2008.73

1026. Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R, et al (2008) VIM-15 and VIM-16, Two New VIM-2-Like Metallo-β-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bulgaria and Germany. Antimicrob Agents Chemother 52:2977. https://doi.org/10.1128/AAC.00175-08

1027. Schroeder TH, Zooid T, Pier GB (2001) Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM1 on epithelial cells. Infect Immun 69:719–729. https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.719-729.2001/ASSET/8971EEB2-38FD-4FC8-AE16-E7A78D0A09EB/ASSETS/GRAPHIC/II0211177006.JPEG

1028. Schulert GS, Feltman H, Rabin SDP, et al (2003) Secretion of the Toxin ExoU Is a Marker for Highly Virulent *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Patients with Hospital-Acquired Pneumonia. J Infect Dis 188:1695–1706. https://doi.org/10.1086/379372/2/188-11-1695-FIG004.GIF

1029. Schultz MJ, Speelman P, Zaat SAJ, et al (2000) The effect of pseudomonas exotoxin A on cytokine production in whole blood exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Immunol Med Microbiol 29:227–232. https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2000.TB01527.X

1030. Schwarzer C, Fischer H, Machen TE (2016) Chemotaxis and Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to Scratch-Wounded Human Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. PLoS One 11:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0150109

1031. Schwarzer C, Fu Z, Patanwala M, et al (2012) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated homoserine lactone C12 rapidly activates apoptosis in airway epithelia. Cell Microbiol 14:698–709. https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2012.01753.X

1032. Schwarzer C, Ravishankar B, Patanwala M, et al (2014) Thapsigargin blocks P*seudomonas aeruginosa* homoserine lactone-induced apoptosis in airway epithelia. Am J Physiol - Cell Physiol 306:844–855. https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00002.2014/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH00091474870009.JPEG

1033. Sechi L, Karadenizli A, Deriu A, et al (2004) PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Med Sci Monit 10:BR180-4

1034. Seifert H, Müller C, Stefanik D, et al (2023) In Vitro Activity of Cefiderocol against a Global Collection of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. Antibiot (Basel, Switzerland) 12:1172. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12071172

1035. Seifert H, Stefanik D, Olesky M, Higgins PG (2020) *In vitro* activity of the novel fluorocycline TP-6076 against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 55:. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2019.10.010

1036. Seifert H, Stefanik D, Sutcliffe JA, Higgins PG (2018) *In-vitro* activity of the novel fluorocycline

eravacycline against carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 51:62–64. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2017.06.022

1037. Sen B, Joshi SG (2016) Studies on *Acinetobacter baumannii* involving multiple mechanisms of carbapenem resistance. J Appl Microbiol 120:619–629. https://doi.org/10.1111/JAM.13037

1038. Shakibaie MR, Azizi O, Shahcheraghi F (2017) Insight into stereochemistry of a new IMP allelic variant (IMP-55) metallo-β-lactamase identified in a clinical strain of *Acinetobacter baumannii*. Infect Genet Evol 51:118–126. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2017.03.018

1039. Sharma R, Goda R, Borkar SA, et al (2019) Outcome following postneurosurgical *Acinetobacter* meningitis: an institutional experience of 72 cases. Neurosurg Focus 47:. https://doi.org/10.3171/2019.5.FOCUS19278

1040. Sharon Goh HM, Beatson SA, Totsika M, et al (2013) Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. Appl Environ Microbiol 79:6535–6543. https://doi.org/10.1128/AEM.01402-13

1041. Shaver CM, Hauser AR (2004) Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. Infect Immun 72:6969–6977. https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6969-6977.2004

1042. Sheikhalizadeh V, Hasani A, Ahangarzadeh Rezaee M, et al (2017) Comprehensive study to investigate the role of various aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Infect Chemother 23:74–79. https://doi.org/10.1016/J.JIAC.2016.09.012

1043. Sheldon JR, Skaar EP (2020) *Acinetobacter baumannii* can use multiple siderophores for iron acquisition, but only acinetobactin is required for virulence. PLoS Pathog 16:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008995

1044. Shelenkov A, Akimkin V, Mikhaylova Y (2023) International Clones of High Risk of *Acinetobacter baumannii* - Definitions, History, Properties and Perspectives. Microorganisms 11:. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11082115/S1

1045. Shenkutie AM, Yao MZ, Siu GKH, et al (2020) Biofilm-Induced Antibiotic Resistance in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates. Antibiot (Basel, Switzerland) 9:1–15. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9110817

1046. Shields RK, Kline EG, Squires KM, et al (2023a) *In vitro* activity of cefiderocol against *Pseudomonas aeruginosa* demonstrating evolved resistance to novel β-lactam/β-lactamase inhibitors. JAC-antimicrobial Resist 5:. https://doi.org/10.1093/JACAMR/DLAD107

1047. Shields RK, Paterson DL, Tamma PD (2023b) Navigating Available Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex Infections. Clin Infect Dis 76:S179–S193. https://doi.org/10.1093/CID/CIAD094

1048. Shinohara DR, Dos Santos Saalfeld SM, Martinez HV, et al (2022) Outbreak of endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a coronavirus disease 2019 (COVID-19)-specific intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol 43:815–817. https://doi.org/10.1017/ICE.2021.98

1049. Shneider MM, Buth SA, Ho BT, et al (2013) PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type

VI secretion system spike. Nature 500:350–353. https://doi.org/10.1038/NATURE12453

1050. Shoji MK, Gutkind NE, Meyer BI, et al (2023) Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis Associated With Artificial Tear Use. JAMA Ophthalmol 141:. https://doi.org/10.1001/JAMAOPHTHALMOL.2023.1109

1051. Shortridge D, Carvalhaes C, Deshpande L, Castanheira M (2021) Activity of meropenem/vaborbactam and comparators against Gram-negative isolates from Eastern and Western European patients hospitalized with pneumonia including ventilator-associated pneumonia (2014-19). J Antimicrob Chemother 76:2600–2605. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAB252

1052. Shortridge D, Gales AC, Streit JM, et al (2019) Geographic and Temporal Patterns of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Over 20 Years From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2016. Open forum Infect Dis 6:S63–S68. https://doi.org/10.1093/OFID/OFY343

1053. Shortridge D, Streit JM, Mendes R, Castanheira M (2022) In Vitro Activity of Cefiderocol against U.S. and European Gram-Negative Clinical Isolates Collected in 2020 as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Microbiol Spectr 10:. https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02712-21

1054. Siarkou VI, Vitti D, Protonotariou E, et al (2009) Molecular Epidemiology of Outbreak-Related *Pseudomonas aeruginosa* Strains Carrying the Novel Variant blaVIM-17 Metallo-β-Lactamase Gene. Antimicrob Agents Chemother 53:1325. https://doi.org/10.1128/AAC.01230-08

1055. Sid Ahmed MA, Khan FA, Hadi HA, et al (2022) Association of $bla_{\text{VIM-2}}$, $bla_{\text{PDC-35}}$, $bla_{\text{OXA-10}}$, $bla_{\text{OXA-488}}$ and $bla_{\text{VEB-9}}$ β-Lactamase Genes with Resistance to Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiot (Basel, Switzerland) 11:. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11020130

1056. Sid Ahmed MA, Khan FA, Sultan AA, et al (2020) β-lactamase-mediated resistance in MDR-*Pseudomonas aeruginosa* from Qatar. Antimicrob Resist Infect Control 9:. https://doi.org/10.1186/S13756-020-00838-Y

1057. Skiebe E, de Berardinis V, Morczinek P, et al (2012) Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. Int J Med Microbiol 302:117–128. https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2012.03.003

1058. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM (2018) Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. Curr Protoc Mol Biol 122:. https://doi.org/10.1002/CPMB.59

1059. Słoczyńska A, Wand ME, Tyski S, Laudy AE (2021) Analysis of bla_{CHDL} Genes and Insertion Sequences Related to Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains Isolated in Warsaw, Poland. Int J Mol Sci 22:1–14. https://doi.org/10.3390/IJMS22052486

1060. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachón J (2013) Association of the Outer Membrane Protein Omp33 With Fitness and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. J Infect Dis 208:1561–1570. https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIT386

1061. Smani Y, Fàbrega A, Roca I, et al (2014) Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of

Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 58:1806–1808. https://doi.org/10.1128/AAC.02101-13

1062. Smani Y, McConnell MJ, Pachón J (2012) Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. PLoS One 7:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0033073

1063. Smith L, Rose B, Tingpej P, et al (2006) Protease IV production in *Pseudomonas aeruginosa* from the lungs of adults with cystic fibrosis. J Med Microbiol 55:1641–1644. https://doi.org/10.1099/JMM.0.46845-0

1064. Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, et al (2007a) New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. Genes Dev 21:601–614. https://doi.org/10.1101/GAD.1510307

1065. Smith SGJ, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP (2007b) A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. FEMS Microbiol Lett 273:1–11. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2007.00778.X

1066. Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, et al (2014) European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. J Cyst Fibros 13 Suppl 1: https://doi.org/10.1016/J.JCF.2014.03.010

1067. Snesrud E, Maybank R, Kwak YI, et al (2018) Chromosomally Encoded *mcr-5* in Colistin-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 62:. https://doi.org/10.1128/AAC.00679-18

1068. Sobel ML, Hocquet D, Cao L, et al (2005) Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 49:1782–1786. https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1782-1786.2005

1069. Solomkin J, Hershberger E, Miller B, et al (2015) Ceftolozane/Tazobactam Plus Metronidazole for Complicated Intra-abdominal Infections in an Era of Multidrug Resistance: Results From a Randomized, Double-Blind, Phase 3 Trial (ASPECT-cIAI). Clin Infect Dis 60:1462–1471. https://doi.org/10.1093/CID/CIV097

1070. Son YM, Na SY, Lee HY, et al (2009) Ecthyma Gangrenosum: A Rare Cutaneous Manifestation Caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in a Leukemic Patient. Ann Dermatol 21:389–392. https://doi.org/10.5021/AD.2009.21.4.389

1071. Song D, Meng J, Cheng J, et al (2019) *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing metabolite induces host immune cell death through cell surface lipid domain dissolution. Nat Microbiol 4:97–111. https://doi.org/10.1038/S41564-018-0290-8

1072. Song F, Wang H, Sauer K, Ren D (2018) Cyclic-di-GMP and oprF Are Involved in the Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Substrate Material Stiffness during Attachment on Polydimethylsiloxane (PDMS). Front Microbiol 9:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00110

1073. Song WS, Yoon S Il (2014) Crystal structure of FliC flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament. Biochem Biophys Res Commun 444:109–115. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.01.008

1074. Song Y, Mu Y, Wong N-K, et al (2023) Emergence of hypervirulent *Pseudomonas aeruginosa* pathotypically armed with co-expressed T3SS effectors ExoS and ExoU. hLife 1:44–56. https://doi.org/10.1016/J.HLIFE.2023.02.001

1075. Sood S, Kumar Vaid V, Bhartiya H (2013) Meningitis due to *Stenotrophomonas maltophilia* after a Neurosurgical Procedure. J Clin Diagn Res 7:1696–1697. https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5614.3248

1076. Soriano MC, Montufar J, Blandino-Ortiz A (2022) Cefiderocol. Rev Esp Quimioter 35 Suppl 1:31–34. https://doi.org/10.37201/REQ/S01.07.2022

1077. Soto SM, Smithson A, Horcajada JP, et al (2006) Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect 12:1034–1036. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2006.01543.X

1078. Spencer J, Murphy LM, Conners R, et al (2010) Crystal structure of the LasA virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*: substrate specificity and mechanism of M23 metallopeptidases. J Mol Biol 396:908–923. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2009.12.021

1079. Srinivasan VB, Vaidyanathan V, Rajamohan G (2015a) AbuO, a tolc-like outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*, is involved in antimicrobial and oxidative stress resistance. Antimicrob Agents Chemother 59:1236–1245. https://doi.org/10.1128/AAC.03626-14/SUPPL_FILE/ZAC002153720SO1.PDF

1080. Srinivasan VB, Venkataramaiah M, Mondal A, Rajamohan G (2015b) Functional Characterization of AbeD, an RND-Type Membrane Transporter in Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS One 10:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0141314

1081. Stahl J, Bergmann H, Göttig S, et al (2015) *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. PLoS One 10:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0138360

1082. Stamatakis A (2015) Using RAxML to Infer Phylogenies. Curr Protoc Bioinforma 51:6.14.1-6.14.14. https://doi.org/10.1002/0471250953.BI0614S51

1083. Stehr F, Kretschmar M, Kröger C, et al (2003) Microbial lipases as virulence factors. J Mol Catal B Enzym 22:347–355. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00049-3

1084. Steinmann J, Mamat U, Abda EM, et al (2018) Analysis of Phylogenetic Variation of *Stenotrophomonas maltophilia* Reveals Human-Specific Branches. Front Microbiol 9:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00806

1085. Stens O, Wardi G, Kinney M, et al (2018) *Stenotrophomonas maltophilia* Necrotizing Soft Tissue Infection in an Immunocompromised Patient. Case reports Crit care 2018:1–5. https://doi.org/10.1155/2018/1475730

1086. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 115:891–899. https://doi.org/10.1111/J.1600-0463.2007.APM_630.X

1087. Stevens TC, Ochoa CD, Morrow KA, et al (2014) The *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme Y

impairs endothelial cell proliferation and vascular repair following lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 306:. https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00135.2013

1088. Stevenson LJ, Dawkins RCH, Sheorey H, et al (2020) Gram-negative endophthalmitis: A prospective study examining the microbiology, clinical associations and visual outcomes following infection. Clin Experiment Ophthalmol 48:813–820. https://doi.org/10.1111/CEO.13768

1089. Stoeva T, Higgins P, Bojkova K et al. (2014) Molecular epidemiology of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from two Bulgarian hospitals. Scr Sci Medica 46:47–50

1090. Stoeva T, Higgins PG, Bojkova K, Seifert H (2008) Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. Clin Microbiol Infect 14:723–727. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2008.02018.X

1091. Stoeva T, Higgins PG, Savov E, et al (2009) Nosocomial spread of OXA-23 and OXA-58 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian hospital. J Antimicrob Chemother 63:618–620. https://doi.org/10.1093/JAC/DKN537

1092. Stoikov I, Ivanov IN, Donchev D, et al (2023) Genomic Characterization of IMP-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Bulgaria Reveals the Emergence of IMP-100, a Novel Plasmid-Mediated Variant Coexisting with a Chromosomal VIM-4. Microorganisms 11:. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11092270/S1

1093. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406:959–964. https://doi.org/10.1038/35023079

1094. Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, et al (2007a) Widespread detection of VEB-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Sofia, Bulgaria. J Chemother 19:140–145. https://doi.org/10.1179/JOC.2007.19.2.140

1095. Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, et al (2007b) Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. J Med Microbiol 56:956–963. https://doi.org/10.1099/JMM.0.46986-0

1096. Strateva T, Petrova G, Stratev A, et al (2013) Etiology of bronchopulmonary infections in Bulgarian cystic fibrosis patients. Braz J Infect Dis 17:617–618. https://doi.org/10.1016/J.BJID.2013.03.001

1097. Strateva T, Setchanova L, Peykov S (2021) Characterization of a Bulgarian VIM-2 metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate belonging to the high-risk sequence type 111. Infect Dis (London, England) 53:883–887. https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1934531

1098. Strateva T, Sirakov I, Savov E, Mitov I (2018) First detection of an OXA-58 carbapenemase-producing *Acinetobacter nosocomialis* clinical isolate in the Balkan States. J Glob Antimicrob Resist 13:123–124. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2018.04.006

1099. Strateva T, Sirakov I, Stoeva T, et al (2019) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*:

Current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014-2016). J Glob Antimicrob Resist 16:266–273. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2018.10.027

1100. Strateva T, Todorova A, Ouzounova-Raykova V, Mitov I (2008) Emergence of a PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Bulgaria. J Chemother 20:391–392. https://doi.org/10.1179/JOC.2008.20.3.391

1101. Strateva T, Yordanov D (2009) *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 58:1133–1148. https://doi.org/10.1099/JMM.0.009142-0

1102. Streling AP, Al Obaidi MM, Lainhart WD, et al (2021) Evolution of Cefiderocol Non-Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* in a Patient Without Previous Exposure to the Antibiotic. Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am 73:e4472. https://doi.org/10.1093/CID/CIAA1909

1103. Struelens MJ, Carlier E, Maes N, et al (1993) Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. J Hosp Infect 25:15–32. https://doi.org/10.1016/0195-6701(93)90005-K

1104. Su M, Satola SW, Read TD (2019) Genome-Based Prediction of Bacterial Antibiotic Resistance. J Clin Microbiol 57:. https://doi.org/10.1128/JCM.01405-18

1105. Su XZ, Chen J, Mizushima T, et al (2005) AbeM, an H^+-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. Antimicrob Agents Chemother 49:4362–4364. https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4362-4364.2005

1106. Subhani S, Patnaik AN, Barik R, Nemani L (2016) Infective endocarditis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: A report of two cases and review of literature. Indian Heart J 68 Suppl 2:S267–S270. https://doi.org/10.1016/J.IHJ.2015.07.048

1107. Sumida K, Chong Y, Miyake N, et al (2015) Risk Factors Associated with Stenotrophomonas maltophilia Bacteremia: A Matched Case-Control Study. PLoS One 10:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0133731

1108. Sun B, Liu H, Jiang Y, et al (2020) New Mutations Involved in Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. mSphere 5:. https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00895-19

1109. Sun E, Liang G, Wang L, et al (2016a) Antimicrobial susceptibility of hospital acquired *Stenotrophomonas maltophilia* isolate biofilms. Braz J Infect Dis 20:365–373. https://doi.org/10.1016/J.BJID.2016.04.002

1110. Sun F, Zhou D, Wang Q, et al (2016b) The first report of detecting the $bla_{\text{SIM-2}}$ gene and determining the complete sequence of the SIM-encoding plasmid. Clin Microbiol Infect 22:347–351. https://doi.org/10.1016/J.CMI.2015.12.001

1111. Sun J, Deng Z, Yan A (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochem Biophys Res Commun 453:254–267. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.05.090

1112. Sun Y, Karmakar M, Roy S, et al (2010) TLR4 and TLR5 on corneal macrophages regulate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by signaling through MyD88-dependent and -independent pathways. J Immunol 185:4272–4283. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1000874

1113. Sung JY (2018) Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of Biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Daejeon, Korea. Korean J Clin Lab Sci 50:100–109. https://doi.org/10.15324/KJCLS.2018.50.2.100

1114. Sunu Kumari AM, Routray A, Yadav D, Madhavan R (2013) Imipenem resistance and biofilm production in *Acinetobacter*. Drug Invent Today 5:256–258. https://doi.org/10.1016/J.DIT.2013.04.005

1115. Suresh M, Skariyachan S, Narayanan N, et al (2020) Mutational Variation Analysis of *oprD* Porin Gene in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Drug Resist 26:869–879. https://doi.org/10.1089/MDR.2019.0147

1116. Swietnicki W, Czarny A, Antkowiak L, et al (2019) Identification of a potent inhibitor of type II secretion system from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem Biophys Res Commun 513:688–693. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.04.055

1117. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis 18:318–327. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3

1118. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, et al (2014) Identification of a novel 6′-N-aminoglycoside acetyltransferase, AAC(6′)-Iak, from a multidrug-resistant clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 58:6324–6327. https://doi.org/10.1128/AAC.03354-14/ASSET/56A17F3E-E6AB-4DC7-8340-173AAC4D271D/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0101433390003.JPEG

1119. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, et al (2013a) Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. BMC Infect Dis 13:251. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-251

1120. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, et al (2013b) IMP-43 and IMP-44 Metallo-β-Lactamases with Increased Carbapenemase Activities in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 57:4427. https://doi.org/10.1128/AAC.00716-13

1121. Tafaj S, Gona F, Rodrigues CF, et al (2020) Whole-Genome Sequences of Two NDM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated in a Clinical Setting in Albania in 2018. Microbiol Resour Announc 9:. https://doi.org/10.1128/MRA.01291-19

1122. Takahashi T, Tada T, Shrestha S, et al (2021) Molecular characterisation of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Nepal. J Glob Antimicrob Resist 26:279–284. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2021.07.003

1123. Talà L, Fineberg A, Kukura P, Persat A (2019) *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. Nat Microbiol 4:774–780. https://doi.org/10.1038/S41564-019-0378-9

1124. Talfan A, Mounsey O, Charman M, et al (2013) Involvement of Mutation in *ampDI*, *mrcA*, and at Least One Additional Gene in β-Lactamase Hyperproduction in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 57:5486–5491. https://doi.org/10.1128/AAC.01446-13

1125. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, et al (2022) Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β-lactamase Producing *Enterobacterales* (ESBL-E), Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-*P. aeruginosa*). Clin Infect Dis 75:187–212. https://doi.org/10.1093/CID/CIAC268

1126. Tamma PD, Beisken S, Bergman Y, et al (2021) Modifiable Risk Factors for the Emergence of Ceftolozane-tazobactam Resistance. Clin Infect Dis 73:e4599–e4606. https://doi.org/10.1093/CID/CIAA1306

1127. Tammam S, Sampaleanu LM, Koo J, et al (2013) PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA. J Bacteriol 195:2126–2135. https://doi.org/10.1128/JB.00032-13

1128. Tan RM, Kuang Z, Hao Y, Lau GW (2014) Type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-A. J Innate Immun 6:227–239. https://doi.org/10.1159/000354304

1129. Tang A, Marquart ME, Fratkin JD, et al (2009) Properties of PASP: a *Pseudomonas* protease capable of mediating corneal erosions. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:3794–3801. https://doi.org/10.1167/IOVS.08-3107

1130. Taube MA, Del Mar Cendra M, Elsahn A, et al (2015) Pattern recognition receptors in microbial keratitis. Eye (Lond) 29:1399–1415. https://doi.org/10.1038/EYE.2015.118

1131. Tayabali AF, Nguyen KC, Shwed PS, et al (2012) Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. PLoS One 7:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037024

1132. Taylor E, Jauneikaite E, Sriskandan S, et al (2022) Novel 16S rRNA methyltransferase RmtE3 in *Acinetobacter baumannii* ST79. J Med Microbiol 71:. https://doi.org/10.1099/JMM.0.001531

1133. Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, et al (1999) *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. Infect Immun 67:2371–2376. https://doi.org/10.1128/IAI.67.5.2371-2376.1999

1134. Teran N, Egge SL, Phe K, et al (2023) The emergence of cefiderocol resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from a heteroresistant isolate during prolonged therapy. Antimicrob Agents Chemother. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-23

1135. Tesfaye T, Beyene G, Gelaw Y, et al (2013) Bacterial Profile and Antimicrobial Susceptibility Pattern of External Ocular Infections in Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia. Am J Infect Dis Microbiol 1:13–20. https://doi.org/10.12691/AJIDM-1-1-3

1136. Teweldemedhin M, Gebreyesus H, Atsbaha AH, et al (2017) Bacterial profile of ocular infections: a systematic review. BMC Ophthalmol 17:. https://doi.org/10.1186/S12886-017-0612-2

1137. Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, et al (2017) Results from a 13-Year Prospective Cohort Study Show Increased Mortality Associated with Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Compared to Other Bacteria. Antimicrob Agents Chemother 61:.

https://doi.org/10.1128/AAC.02671-16

1138. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA (2020) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Int J Mol Sci 21:1–25. https://doi.org/10.3390/IJMS21228671

1139. Thoma R, Seneghini M, Seiffert SN, et al (2022) The challenge of preventing and containing outbreaks of multidrug-resistant organisms and Candida auris during the coronavirus disease 2019 pandemic: report of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak and a systematic review of the literature. Antimicrob Resist Infect Control 11:. https://doi.org/10.1186/S13756-022-01052-8

1140. Thomas R, Hamat RA, Neela V (2014) Extracellular enzyme profiling of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. Virulence 5:326–330. https://doi.org/10.4161/VIRU.27724

1141. Thöming JG, Tomasch J, Preusse M, et al (2020) Parallel evolutionary paths to produce more than one *Pseudomonas aeruginosa* biofilm phenotype. npj Biofilms Microbiomes 2020 61 6:1–13. https://doi.org/10.1038/s41522-019-0113-6

1142. Thummeepak R, Kongthai P, Leungtongkam U, Sitthisak S (2016) Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Int Microbiol 19:121–129. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.270

1143. Tian GB, Adams-Haduch JM, Bogdanovich T, et al (2011) PME-1, an Extended-Spectrum β-Lactamase Identified in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 55:2710. https://doi.org/10.1128/AAC.01660-10

1144. Tian ZX, Yi XX, Cho A, et al (2016) CpxR Activates MexAB-OprM Efflux Pump Expression and Enhances Antibiotic Resistance in Both Laboratory and Clinical *nalB*-Type Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog 12:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005932

1145. Tielen P, Kuhn H, Rosenau F, et al (2013) Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol 13:. https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-159

1146. Tielen P, Rosenau F, Wilhelm S, et al (2010) Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 156:2239–2252. https://doi.org/10.1099/MIC.0.037036-0

1147. Tilley D, Law R, Warren S, et al (2014) CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. FEMS Microbiol Lett 356:53–61. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12496

1148. Ting DSJ, Ho CS, Deshmukh R, et al (2021) Infectious keratitis: an update on epidemiology, causative microorganisms, risk factors, and antimicrobial resistance. Eye (Lond) 35:1084–1101. https://doi.org/10.1038/S41433-020-01339-3

1149. Tipton KA, Rather PN (2017) An ompR-envZ Two-Component System Ortholog Regulates Phase Variation, Osmotic Tolerance, Motility, and Virulence in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. J Bacteriol 199:. https://doi.org/10.1128/JB.00705-16

1150. Todorova B, Velinov T, Ivanov I, et al (2014) First detection of OXA-24 carbapenemase-

producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Bulgaria. World J Microbiol Biotechnol 30:1427–1430. https://doi.org/10.1007/S11274-013-1562-3

1151. Tofas P, Samarkos M, Piperaki ET, et al (2017) *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in patients with hematologic malignancies: risk factors, treatment and outcome. Diagn Microbiol Infect Dis 88:335–341. https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2017.05.003

1152. Tokatly Latzer I, Nahum E, Cavari Y, et al (2019) Treatment Outcomes of *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteremia in Critically Ill Children: A Multicenter Experience. Pediatr Crit Care Med 20:e231–e239. https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000001919

1153. Toleman MA, Bennett PM, Bennett DMC, et al (2007) Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. Emerg Infect Dis 13:559–565. https://doi.org/10.3201/EID1304.061378

1154. Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, et al (2003) Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, $bla_{\text{IMP-13}}$, harboured by a novel Tn*5051*-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 52:583–590. https://doi.org/10.1093/JAC/DKG410

1155. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR (2004) blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. Antimicrob Agents Chemother 48:329–332. https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.329-332.2004

1156. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al (2002) Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 50:673–679. https://doi.org/10.1093/JAC/DKF210

1157. Tolker-Nielsen T (2014) Pseudomonas aeruginosa biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. APMIS Suppl 122:1–51. https://doi.org/10.1111/APM.12335

1158. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA (2003) Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology 149:3473–3484. https://doi.org/10.1099/MIC.0.26541-0

1159. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, et al (2008) Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. Microbiology 154:3398–3409. https://doi.org/10.1099/MIC.0.2008/019471-0

1160. Tomás MDM, Beceiro A, Pérez A, et al (2005) Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 49:5172–5175. https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5172-5175.2005

1161. Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, et al (2016) Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of *Acinetobacter baumannii* Outbreak and Sporadic Isolates. PLoS One 11:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0153014

1162. Tomich M, Planet PJ, Figurski DH (2007) The tad locus: postcards from the widespread colonization island. Nat Rev Microbiol 5:363–375. https://doi.org/10.1038/NRMICRO1636

1163. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, et al (2019) β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. J Mol Biol 431:3472. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.04.002

1164. Torrens G, Hernández SB, Ayala JA, et al (2019) Regulation of AmpC-Driven β-Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Different Pathways, Different Signaling. mSystems 4:. https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00524-19

1165. Torrens G, Van Der Schalk TE, Cortes-Lara S, et al (2022) Susceptibility profiles and resistance genomics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from European ICUs participating in the ASPIRE-ICU trial. J Antimicrob Chemother 77:1862–1872. https://doi.org/10.1093/JAC/DKAC122

1166. Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M, et al (2008) Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. Clin Microbiol Infect 14:161–167. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2007.01911.X

1167. Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, et al (2016) Environmental factors that shape biofilm formation. Biosci Biotechnol Biochem 80:7–12. https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701

1168. Travassos LH, Pinheiro MN, Coelho FS, et al (2004) Phenotypic properties, drug susceptibility and genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains from seven hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Appl Microbiol 96:1143–1150. https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2004.02248.X

1169. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, et al (2018) Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin Microbiol Infect 24:258–266. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.018

1170. Trifonova A, Strateva T (2019) *Stenotrophomonas maltophilia* - a low-grade pathogen with numerous virulence factors. Infect Dis (London, England) 51:168–178. https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1531145

1171. Trignano E, Manzo MJ, Fallico N et al (2014) First report of digital skin ulcer with *Stenotrophomonas maltophilia* infection in an immunocompetent patient. In Vivo (Brooklyn) 28:259–261

1172. Tsilipounidaki K, Gkountinoudis CG, Florou Z, et al (2023) First Detection and Molecular Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* $bla_{\text{NDM-1}}$ ST308 in Greece. Microorganisms 11:. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11092159

1173. Tsitsopoulos PP, Iosifidis E, Antachopoulos C, et al (2016) Nosocomial bloodstream infections in neurosurgery: a 10-year analysis in a center with high antimicrobial drug-resistance prevalence. Acta Neurochir (Wien) 158:1647–1654. https://doi.org/10.1007/S00701-016-2890-5

1174. Tu Y, Wang D, Zhu Y, et al (2022) Emergence of a KPC-90 Variant that Confers Resistance to Ceftazidime-Avibactam in an ST463 Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain. Microbiol Spectr 10:. https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01869-21

1175. Tuon FF, Dantas LR, Suss PH, Tasca Ribeiro VS (2022) Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. Pathog (Basel, Switzerland) 11:. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11030300

1176. Turrientes MC, Baquero MR, Sánchez MB, et al (2010) Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* populations. Appl Environ Microbiol 76:1746–1758. https://doi.org/10.1128/AEM.02817-09

1177. Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, et al (2007) Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 13:807–815. https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2007.01759.X

1178. Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al (2006) The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 258:72–77. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00195.X

1179. Turton JF, Wright L, Underwood A, et al (2015) High-resolution analysis by whole-genome sequencing of an international lineage (Sequence Type 111) of *Pseudomonas aeruginosa* associated with metallo-carbapenemases in the United Kingdom. J Clin Microbiol 53:2622–2631. https://doi.org/10.1128/JCM.00505-15/SUPPL_FILE/ZJM999094413SO1.PDF

1180. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM (1997) Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. J Clin Microbiol 35:339–346. https://doi.org/10.1128/JCM.35.2.339-346.1997

1181. U.S. Food and Drug Administration (2018a) NDA Multi-Disciplinary Review and Evaluation—NDA 206494 Supplements 005 and 006 AVYCAZ (Ceftazidime/Avibactam) for Injection. https://www.fda.gov/media/124307/download

1182. U.S. Food and Drug Administration (2017) Vabomere Highlights of Prescribing Information. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209776lbl.pdf

1183. U.S. Food and Drug Administration (2019) FDA News Release. FDA approves new antibacterial drug to treat complicated urinary tract infections as part of ongoing efforts to address antimicrobial resistance. https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-antibacterial-drug-treat-complicated-urinary-tract-infections-part-ongoing-efforts

1184. U.S. Food and Drug Administration (2018b) XERAVA (eravacycline) for injection, for intravenous use. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/211109lbl.pdf

1185. U.S. Food and Drug Administration (2023) FDA approves new treatment for pneumonia caused by certain difficult-to-treat bacteria [media release]. 23 May 2023. https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-treatment-pneumonia-caused-certain-difficult-treat-bacteria

1186. Uckan D, Kirazli S, Gür D, et al (2007) *Stenotrophomonas maltophilia* infection of the central venous catheter and lysis of an old thrombosis in a post-bone marrow transplantation child: implications in the fibrinolytic process. Scand J Infect Dis 39:376–379. https://doi.org/10.1080/00365540601034774

1187. Ueda A, Wood TK (2009) Connecting Quorum Sensing, c-di-GMP, Pel Polysaccharide, and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* through Tyrosine Phosphatase TpbA (PA3885). PLOS Pathog 5:e1000483. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000483

1188. Umar Z, Ashfaq S, Parikh A, et al (2022a) *Stenotrophomonas maltophilia* and Urinary Tract Infections: A Systematic Review. Cureus 14:. https://doi.org/10.7759/CUREUS.26184

1189. Umar Z, Ilyas U, Ashfaq S, et al (2022b) *Stenotophomonas maltophilia* As Not Just a Mere Colonozer: Two Cases of Urinary Tract Infection and Multidrug-Resistant Respiratory Infection. Cureus 14:. https://doi.org/10.7759/CUREUS.23541

1190. Upmanyu K, Haq QMR, Singh R (2022) Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: Opportunities for developing therapeutics. Curr Res Microb Sci 3:. https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2022.100131

1191. Upmanyu K, Kumar R, Rizwanul Haque QM, Singh R (2024) Exploring the evolutionary and pathogenic role of *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein (Bap) through in silico structural modeling. Arch Microbiol 206:. https://doi.org/10.1007/S00203-024-03992-8

1192. Urban TA, Goldberg JB, Forstner JF, Sajjan US (2005) Cable pili and the 22-kilodalton adhesin are required for *Burkholderia cenocepacia* binding to and transmigration across the squamous epithelium. Infect Immun 73:5426–5437. https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5426-5437.2005

1193. Uskudar-Guclu A, Danyildiz S, Mirza HC, et al (2024) In vitro activity of cefiderocol against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying various β-lactamase encoding genes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. https://doi.org/10.1007/S10096-024-04831-W

1194. Vahaboglu H, Coskunkan F, Tansel O, et al (2001) Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Med Microbiol 50:642–645. https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-642

1195. Vaiman M, Lazarovitch T, Heller L, Lotan G (2015) Ecthyma gangrenosum and ecthyma-like lesions: review article. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 34:633–639. https://doi.org/10.1007/S10096-014-2277-6

1196. Valcek A, Bogaerts P, Denis O, et al (2021) Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in Belgian acute-care hospitals. medRxiv 2021.07.06.21259728. https://doi.org/10.1101/2021.07.06.21259728

1197. Valcek A, Nesporova K, Whiteway C, et al (2022) Genomic Analysis of a Strain Collection Containing Multidrug-, Extensively Drug-, Pandrug-, and Carbapenem-Resistant Modern Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 66:. https://doi.org/10.1128/AAC.00892-22

1198. Valdezate S, Vindel A, Martín-Dávila P, et al (2004) High genetic diversity among Stenotrophomonas maltophilia strains despite their originating at a single hospital. J Clin Microbiol 42:693–699. https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.693-699.2003

1199. Valdezate S, Vindel A, Saéz-Nieto JA, et al (2005) Preservation of topoisomerase genetic sequences during *in vivo* and *in vitro* development of high-level resistance to ciprofloxacin in isogenic *Stenotrophomonas maltophilia* strains. J Antimicrob Chemother 56:220–223. https://doi.org/10.1093/JAC/DKI182

1200. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, et al (2007) Horizontal gene transfer in a polyclonal

outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 45:453–460. https://doi.org/10.1128/JCM.01971-06

1201. Vannatta M, Grier L, Khan MH, et al (2023) In Vivo Emergence of Pandrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain: Comprehensive Resistance Characterization and Compassionate Use of Sulbactam-Durlobactam. Open forum Infect Dis 10:. https://doi.org/10.1093/OFID/OFAD504

1202. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Kiwan EN, Papadakis KA (2000) The clinical spectrum of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* respiratory infection. Semin Respir Crit Care Med 21:349–355. https://doi.org/10.1055/S-2000-9859

1203. Vatansever C, Menekse S, Dogan O, et al (2020) Co-existence of OXA-48 and NDM-1 in colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235. Emerg Microbes Infect 9:152. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1713025

1204. Vatcheva-Dobrevska R, Mulet X, Ivanov I, et al (2013) Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. Microb Drug Resist 19:355–361. https://doi.org/10.1089/MDR.2013.0004

1205. Velázquez-Acosta C, Zarco-Márquez S, Jiménez-Andrade MC, et al (2018) *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia and pneumonia at a tertiary-care oncology center: a review of 16 years. Support Care Cancer 26:1953–1960. https://doi.org/10.1007/S00520-017-4032-X

1206. Verma N, Dollinger P, Kovacic F, et al (2020) The Membrane-Integrated Steric Chaperone Lif Facilitates Active Site Opening of *Pseudomonas aeruginosa* Lipase A. J Comput Chem 41:500–512. https://doi.org/10.1002/JCC.26085

1207. Vidigal PG, Dittmer S, Steinmann E, et al (2014) Adaptation of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: molecular diversity, mutation frequency and antibiotic resistance. Int J Med Microbiol 304:613–619. https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2014.04.002

1208. Vijayakumar S, Biswas I, Veeraraghavan B (2019) Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. Futur Sci OA 5:. https://doi.org/10.2144/FSOA-2018-0127

1209. Vijayakumar S, Rajenderan S, Laishram S, et al (2016) Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Front Public Heal 4:186935. https://doi.org/10.3389/FPUBH.2016.00105/BIBTEX

1210. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 59:1210–1215. https://doi.org/10.1093/JAC/DKL509

1211. Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al (2007) First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase. Antimicrob Agents Chemother 51:1553. https://doi.org/10.1128/AAC.01405-06

1212. Vinuesa P, Ochoa-Sánchez LE, Contreras-Moreira B (2018) GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*. Front Microbiol 9:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00771

1213. Vogne C, Aires JR, Bailly C, et al (2004) Role of the Multidrug Efflux System MexXY in the Emergence of Moderate Resistance to Aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. Antimicrob Agents Chemother 48:1676. https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1676-1680.2004

1214. Vourc'h M, Roquilly A, Broquet A, et al (2017) Exoenzyme T Plays a Pivotal Role in the IFN-γ Production after Pseudomonas Challenge in IL-12 Primed Natural Killer Cells. Front Immunol 8:. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01283

1215. Waack U, Warnock M, Yee A, et al (2018) CpaA Is a Glycan-Specific Adamalysin-like Protease Secreted by *Acinetobacter baumannii* That Inactivates Coagulation Factor XII. MBio 9:1–15. https://doi.org/10.1128/MBIO.01606-18

1216. Wagener BM, Anjum N, Christiaans SC, et al (2020) Exoenzyme Y Contributes to End-Organ Dysfunction Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Critically Ill Patients: An Exploratory Study. Toxins (Basel) 12:. https://doi.org/10.3390/TOXINS12060369

1217. Wagenlehner FM, Umeh O, Steenbergen J, et al (2015) Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: A randomised, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cUTI). Lancet 385:1949–1956. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62220-0

1218. Waite TD, Georgiou A, Abrishami M, Beck CR (2016) Pseudo-outbreaks of *Stenotrophomonas maltophilia* on an intensive care unit in England. J Hosp Infect 92:392–396. https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2015.12.014

1219. Walkty A, Karlowsky JA, Baxter MR, et al (2019) In Vitro Activity of Plazomicin against Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Pathogens Isolated from Patients in Canadian Hospitals from 2013 to 2017 as Part of the CANWARD Surveillance Study. Antimicrob Agents Chemother 63:. https://doi.org/10.1128/AAC.02068-18

1220. Walther-Rasmussen J, Høiby N (2006) OXA-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother 57:373–383. https://doi.org/10.1093/JAC/DKI482

1221. Wang A, Wang Q, Kudinha T, et al (2016) Effects of Fluoroquinolones and Azithromycin on Biofilm Formation of *Stenotrophomonas maltophilia*. Sci Rep 6:. https://doi.org/10.1038/SREP29701

1222. Wang CH, Yu CM, Hsu ST, Wu RX (2020a) Levofloxacin-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns in hospitalized patients. J Hosp Infect 104:46–52. https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2019.09.001

1223. Wang J, Li Y, Yan H, et al (2018) Association between the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system, antibiotic resistance and clinical features. Int J Clin Exp Med 11:11120–11126

1224. Wang J, Wang C, Yu HB, et al (2019) Bacterial quorum-sensing signal IQS induces host cell apoptosis by targeting POT1–p53 signalling pathway. Cell Microbiol 21:e13076. https://doi.org/10.1111/CMI.13076

1225. Wang L, Liu D, Lv Y, et al (2020b) Novel Plasmid-Mediated tet(X5) Gene Conferring Resistance to Tigecycline, Eravacycline, and Omadacycline in a Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolate.

Antimicrob Agents Chemother 64:. https://doi.org/10.1128/AAC.01326-19/SUPPL_FILE/AAC.01326-19-S0001.PDF

1226. Wang N, Lei T, Zhu Y, et al (2023a) Characterization of two novel VIM-type metallo-β-lactamases, VIM-84 and VIM-85, associated with the spread of IncP-2 megaplasmids in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Spectr 11:. https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01544-23

1227. Wang N, Ozer EA, Mandel MJ, Hauser AR (2014a) Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. MBio 5:. https://doi.org/10.1128/MBIO.01163-14

1228. Wang S, Yu S, Zhang Z, et al (2014b) Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 80:6724–6732. https://doi.org/10.1128/AEM.01237-14

1229. Wang Y, Wang Y, Rong H, et al (2023b) Risk factors of lower respiratory tract infection caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: Systematic review and meta-analysis. Front public Heal 10:. https://doi.org/10.3389/FPUBH.2022.1035812

1230. Warburton PJ, Amodeo N, Roberts AP (2016) Mosaic tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. J Antimicrob Chemother 71:3333–3339. https://doi.org/10.1093/JAC/DKW304

1231. Wargo MJ, Gross MJ, Rajamani S, et al (2011) Hemolytic phospholipase C inhibition protects lung function during *Pseudomonas aeruginosa* infection. Am J Respir Crit Care Med 184:345–354. https://doi.org/10.1164/RCCM.201103-0374OC

1232. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 35:147–151. https://doi.org/10.1128/AAC.35.1.147

1233. Waters V, Atenafu EG, Lu A, et al (2013) Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and mortality or lung transplantation in cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 12:482–486. https://doi.org/10.1016/J.JCF.2012.12.006

1234. Waters V, Zlosnik JEA, Yau YCW, et al (2012) Comparison of three typing methods for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31:3341–3350. https://doi.org/10.1007/S10096-012-1701-Z

1235. Waters VJ, Gómez MI, Soong G, et al (2007) Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Infect Immun 75:1698–1703. https://doi.org/10.1128/IAI.01469-06

1236. Weber BS, Kinsella RL, Harding CM, Feldman MF (2017) The Secrets of *Acinetobacter* Secretion. Trends Microbiol 25:532–545. https://doi.org/10.1016/J.TIM.2017.01.005

1237. Weber BS, Ly PM, Irwin JN, et al (2015) A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. Proc Natl Acad Sci U S A 112:9442–9447. https://doi.org/10.1073/PNAS.1502966112

1238. Wei C, Ni W, Cai X, et al (2016) Evaluation of Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT),

Minocycline, Tigecycline, Moxifloxacin, and Ceftazidime Alone and in Combinations for SXT-Susceptible and SXT-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* by In Vitro Time-Kill Experiments. PLoS One 11:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0152132

1239. Wei Q, Ma LZ (2013) Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Sci 14:20983–21005. https://doi.org/10.3390/IJMS141020983

1240. Weiel JJ, Zhang CZ, Smith JA, et al (2013) Clinicopathologic Aspects of Ecthyma Gangrenosum in Pediatric Patients: A Case Series and Review of the Literature. J Clin Anat Pathol 1:101

1241. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, et al (2016) Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. Infect Control Hosp Epidemiol 37:1288–1301. https://doi.org/10.1017/ICE.2016.174

1242. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P (2003) Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 47:2385–2392. https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2385-2392.2003

1243. Weldhagen GF, Prinsloo A (2004) Molecular detection of GES-2 extended spectrum β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. Int J Antimicrob Agents 24:35–38. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.12.012

1244. Wheatley RM, MacLean RC (2021) CRISPR-Cas systems restrict horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. ISME J 15:1420–1433. https://doi.org/10.1038/S41396-020-00860-3

1245. Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP (2017) Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. Nat 2017 5517680 551:313–320. https://doi.org/10.1038/nature24624

1246. WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control (2022) Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.

1247. Wilharm G, Piesker J, Laue M, Skiebe E (2013) DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. J Bacteriol 195:4146–4153. https://doi.org/10.1128/JB.00754-13

1248. Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, et al (2007) The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. J Bacteriol 189:6695–6703. https://doi.org/10.1128/JB.00023-07

1249. Williams FN, Herndon DN, Hawkins HK, et al (2009) The leading causes of death after burn injury in a single pediatric burn center. Crit Care 13:. https://doi.org/10.1186/CC8170

1250. Williams McMackin EA, Djapgne L, Corley JM, Yahr TL (2019) Fitting Pieces into the Puzzle of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Gene Expression. J Bacteriol 201:. https://doi.org/10.1128/JB.00209-19

1251. Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, et al (2002) The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. J Biol Chem 277:11042–11049. https://doi.org/10.1074/JBC.M109525200

1252. Winkler ML, Papp-Wallace KM, Hujer AM, et al (2015) Unexpected challenges in treating multidrug-resistant Gram-negative bacteria: resistance to ceftazidime-avibactam in archived isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 59:1020–1029. https://doi.org/10.1128/AAC.04238-14

1253. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA (2016) *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. Trends Microbiol 24:327–337. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.008

1254. Wisplinghoff H (2017) *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. Infect Dis 2-Volume Set 1579-1599.e2. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00181-7

1255. Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, et al (2012) Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. J Infect 64:282–290. https://doi.org/10.1016/J.JINF.2011.12.008

1256. Wohlfarth E, Kresken M, Higgins PG, et al (2022) The evolution of carbapenem resistance determinants and major epidemiological lineages among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Germany, 2010-2019. Int J Antimicrob Agents 60:. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2022.106689

1257. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, et al (2017) Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. Clin Microbiol Rev 30:409–447. https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16

1258. Wong MH yin, Chan BK wai, Chan EW chi, Chen S (2019) Over-Expression of IS Aba1-Linked Intrinsic and Exogenously Acquired OXA Type Carbapenem-Hydrolyzing-Class D-ß-Lactamase-Encoding Genes Is Key Mechanism Underlying Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol 10:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02809

1259. Woo TE, Lim R, Surette MG, et al (2018) Epidemiology and natural history of *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in non-cystic fibrosis bronchiectasis. ERJ open Res 4:. https://doi.org/10.1183/23120541.00162-2017

1260. Wood S, Goldufsky J, Shafikhani SH (2015) *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Induces Atypical Anoikis Apoptosis in Target Host Cells by Transforming Crk Adaptor Protein into a Cytotoxin. PLoS Pathog 11:. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004934

1261. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 27:351–353. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2006.01.004

1262. Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, et al (2008) Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother 62:1265–1268. https://doi.org/10.1093/JAC/DKN400

1263. World Health Organization (2015) Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. ISBN 978 92 4 150976 3. Geneva, Switzerland

1264. World Health Organization (2019) Thirteenth general programme of work 2019-2023. Geneva.

1265. World Health Organization (2018) International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD) 11th Revision. https://www.who.int/standards/classifications/classification-of-diseases

1266. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, et al (2014) New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen Acinetobacter baumannii from genomic analysis. MBio 5:. https://doi.org/10.1128/MBIO.00963-13

1267. Wu CJ, Lu HF, Lin YT, et al (2019) Substantial contribution of SmeDEF, SmeVWX, SmQnr, and heat shock response to fluoroquinolone resistance in clinical isolates of stenotrophomonas maltophilia. Front Microbiol 10:446257. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00822/BIBTEX

1268. Wu H, Wang JT, Shiau YR, et al (2012) A multicenter surveillance of antimicrobial resistance on *Stenotrophomonas maltophilia* in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 45:120–126. https://doi.org/10.1016/J.JMII.2011.09.028

1269. Xiao J, Zhang C, Ye S (2019) *Acinetobacter baumannii* meningitis in children: a case series and literature review. Infection 47:643–649. https://doi.org/10.1007/S15010-018-1234-1

1270. Xiong J, Hynes MF, Ye H, et al (2006) $bla_{(IMP-9)}$ and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. Antimicrob Agents Chemother 50:355–358. https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.355-358.2006

1271. Xiong X, Bromley EHC, Oelschlaeger P, et al (2011) Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a gram-negative bacterium. Nucleic Acids Res 39:3917–3927. https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ1296

1272. Xu A, Li M, Hang Y, et al (2024) Multicenter retrospective genomic characterization of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from Jiangxi patients 2021-2022: identification of a novel international clone, IC11. mSphere. https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00276-24

1273. Xu C, Bilya SR, Xu W (2019) adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. New Microbes New Infect 30:100549. https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2019.100549

1274. Xu G, Tang X, Shang X, et al (2018) Identification of immunogenic outer membrane proteins and evaluation of their protective efficacy against *Stenotrophomonas maltophilia*. BMC Infect Dis 18:. https://doi.org/10.1186/S12879-018-3258-7

1275. Yahav D, Giske CG, Gramatniece A, et al (2020) New β-Lactam-β-Lactamase Inhibitor Combinations. Clin Microbiol Rev 34:1–61. https://doi.org/10.1128/CMR.00115-20

1276. Yakout MA, Abdelwahab IA (2022) Diabetic Foot Ulcer Infections and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Production During the Covid-19 Pandemic. J Pure Appl Microbiol 16:138–146. https://doi.org/10.22207/JPAM.16.1.02

1277. Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, et al (2004) Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 48:2069–2074.

https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2069-2074.2004

1278. Yamano Y, Ishibashi N, Kuroiwa M, et al (2022) Characterisation of cefiderocol-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* isolates from Taiwan. J Glob Antimicrob Resist 28:120–124. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2021.12.017

1279. Yan F, Li W, Jono H, et al (2008) Reactive oxygen species regulate *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide-induced MUC5AC mucin expression via PKC-NADPH oxidase-ROS-TGF-alpha signaling pathways in human airway epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 366:513–519. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.11.172

1280. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, et al (2001) Metallo-β-Lactamases in Clinical *Pseudomonas* Isolates in Taiwan and Identification of VIM-3, a Novel Variant of the VIM-2 Enzyme. Antimicrob Agents Chemother 45:2224. https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2224-2228.2001

1281. Yan S, Wu G (2019) Can Biofilm Be Reversed Through Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*? Front Microbiol 10:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01582

1282. Yang CH, Su PW, Moi SH, Chuang LY (2019a) Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. Molecules 24:. https://doi.org/10.3390/MOLECULES24101849

1283. Yang J, Lee KM, Park S, et al (2017) Bacterial Secretant from *Pseudomonas aeruginosa* Dampens Inflammasome Activation in a Quorum Sensing-Dependent Manner. Front Immunol 8:. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00333

1284. Yang S, Hua M, Liu X, et al (2021) Bacterial and fungal co-infections among COVID-19 patients in intensive care unit. Microbes Infect 23:. https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2021.104806

1285. Yang Y, Xu Q, Li T, et al (2019b) OXA-23 Is a Prevalent Mechanism Contributing to Sulbactam Resistance in Diverse *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains. Antimicrob Agents Chemother 63:. https://doi.org/10.1128/AAC.01676-18

1286. Yinsai O, Deeudom M, Duangsonk K (2023) Genotypic Diversity, Antibiotic Resistance, and Virulence Phenotypes of *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Isolates from a Thai University Hospital Setting. Antibiot (Basel, Switzerland) 12:. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12020410

1287. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al (2003) Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet (London, England) 362:1888–1893. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14959-8

1288. Yoon EJ, Chabane YN, Goussard S, et al (2015) Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. MBio 6:. https://doi.org/10.1128/MBIO.00309-15

1289. Yoon EJ, Jeong SH (2021) Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol 12:. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.614058

1290. Yousefi-Avarvand A, Khashei R, Ebrahim-Saraie HS, et al (2015) The Frequency of Exotoxin A and Exoenzymes S and U Genes Among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran. Int J Mol Cell Med 4:167

1291. Yu H, He X, Xie W, et al (2014) Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm

formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. Can J Microbiol 60:227–235. https://doi.org/10.1139/CJM-2013-0667

1292. Yu K, Zeng W, Xu Y, et al (2021) Bloodstream infections caused by ST2 *Acinetobacter baumannii*: risk factors, antibiotic regimens, and virulence over 6 years period in China. Antimicrob Resist Infect Control 10:. https://doi.org/10.1186/S13756-020-00876-6

1293. Yu YS, Yang Q, Xu XW, et al (2004) Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a Chinese hospital. J Med Microbiol 53:653–656. https://doi.org/10.1099/JMM.0.05513-0

1294. Yuhan Y, Ziyun Y, Yongbo Z, et al (2016) Over expression of AdeABC and AcrAB-TolC efflux systems confers tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. Rev Soc Bras Med Trop 49:165–171. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0411-2015

1295. Yum JH, Yi K, Lee H, et al (2002) Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the $bla_{(VIM-2)}$ gene cassettes. J Antimicrob Chemother 49:837–840. https://doi.org/10.1093/JAC/DKF043

1296. Yusuf E, Tompa M, Strepis N, et al (2022) High Prevalence of ST502 Carrying an OXA-24 Carbapenemase gene in Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Isolates in Romania. Microb Drug Resist 28:636–644. https://doi.org/10.1089/MDR.2021.0274

1297. Zaki MES, Abou ElKheir N, Mofreh M (2018) Molecular Study of Quinolone Resistance Determining Regions of *gyrA* Gene and *parC* Gene s in Clinical Isolates of *Acintobacter baumannii* Resistant to Fluoroquinolone. Open Microbiol J 12:116–122. https://doi.org/10.2174/1874285801812010116

1298. Zander E, Nemec A, Seifert H, Higgins PG (2012) Association between β-lactamase-encoding $bla_{(OXA-51)}$ variants and DiversiLab rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. J Clin Microbiol 50:1900–1904. https://doi.org/10.1128/JCM.06462-11

1299. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A (2013) Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. Int J Antimicrob Agents 41:11–19. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2012.09.008

1300. Zeighami H, Valadkhani F, Shapouri R, et al (2019) Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. BMC Infect Dis 19:. https://doi.org/10.1186/S12879-019-4272-0

1301. Zeka AN, Poirel L, Sipahi OR, et al (2014) GES-type and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. J Antimicrob Chemother 69:1145–1146. https://doi.org/10.1093/JAC/DKT465

1302. Zeng B, Wang C, Zhang P, et al (2020) Heat Shock Protein DnaJ in *Pseudomonas aeruginosa* Affects Biofilm Formation via Pyocyanin Production. Microorganisms 8:. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8030395

1303. Zgair AK, Chhibber S (2011a) Immunoassay method to check the flagellin mediated binding of

Stenotrophomonas maltophilia to polystyrene. Microbiology 80:132–134. https://doi.org/10.1134/S0026261711010206/METRICS

1304. Zgair AK, Chhibber S (2011b) Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. J Med Microbiol 60:1032–1037. https://doi.org/10.1099/JMM.0.026377-0/CITE/REFWORKS

1305. Zgair AK, Chhibber S (2012a) Immunological and biological relationship among flagellin of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, and *Stenotrophomonas maltophilia*. Microbiol (Russian Fed 81:342–347. https://doi.org/10.1134/S0026261712030174/METRICS

1306. Zgair AK, Chhibber S (2012b) *Stenotrophomonas maltophilia* flagellin restricts bacterial colonization in BALB/c mouse lung in vivo. FEMS Immunol Med Microbiol 66:191–200. https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2012.00999.X

1307. Zhanel GG, Cheung D, Adam H, et al (2016) Review of Eravacycline, a Novel Fluorocycline Antibacterial Agent. Drugs 76:567–588. https://doi.org/10.1007/S40265-016-0545-8

1308. Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, et al (2018) Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem-β-Lactamase Inhibitor Combinations. Drugs 78:65–98. https://doi.org/10.1007/S40265-017-0851-9

1309. Zhang D, Xia J, Xu Y, et al (2016a) Biological features of biofilm-forming ability of *Acinetobacter baumannii* strains derived from 121 elderly patients with hospital-acquired pneumonia. Clin Exp Med 16:73–80. https://doi.org/10.1007/S10238-014-0333-2

1310. Zhang G, Hu C, Luo L, et al (2020) Clinical features and short-term outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China. J Clin Virol 127:104364. https://doi.org/10.1016/J.JCV.2020.104364

1311. Zhang G, Meredith TC, Kahne D (2013) On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. Curr Opin Microbiol 16:779–785. https://doi.org/10.1016/J.MIB.2013.09.007

1312. Zhang T, Xu X, Xu CF, et al (2021) Mechanical ventilation-associated pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in Northeast China region: analysis of genotype and drug resistance of bacteria and patients' clinical features over 7 years. Antimicrob Resist Infect Control 10:1–11. https://doi.org/10.1186/S13756-021-01005-7/TABLES/4

1313. Zhang X, Yang T, Cao J, et al (2016b) Mucosal immunization with purified OmpA elicited protective immunity against infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Microb Pathog 96:20–25. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2016.04.019

1314. Zhao F, Li R, Liu Y, Chen H (2023a) Perspectives on lecithin from egg yolk: Extraction, physicochemical properties, modification, and applications. Front Nutr 9:1082671. https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.1082671

1315. Zhao J, Xing Y, Liu W, et al (2016) Surveillance of Dihydropteroate Synthase Genes in *Stenotrophomonas maltophilia* by LAMP: Implications for Infection Control and Initial Therapy. Front Microbiol 7:1723. https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01723

1316. Zhao K, Li W, Li J, et al (2019) TesG is a type I secretion effector of *Pseudomonas aeruginosa*

that suppresses the host immune response during chronic infection. Nat Microbiol 4:459–469. https://doi.org/10.1038/S41564-018-0322-4

1317. Zhao S, Yang L, Liu H, Gao F (2017) *Stenotrophomonas maltophilia* in a university hospital of traditional Chinese medicine: molecular epidemiology and antimicrobial resistance. J Hosp Infect 96:286–289. https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2017.04.001

1318. Zhao Y, Chen D, Ji B, et al (2023b) Whole-genome sequencing reveals high-risk clones of *Pseudomonas aeruginosa* in Guangdong, China. Front Microbiol 14:1117017. https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1117017

1319. Zhao Y, Niu W, Sun Y, et al (2015) Identification and characterization of a serious multidrug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strain in China. Biomed Res Int 2015:580240. https://doi.org/10.1155/2015/580240

1320. Zhuo C, Zhao QY, Xiao SN (2014) The impact of *spgM*, *rpfF*, *rmlA* gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. PLoS One 9:e108409. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108409

1321. Zimbler DL, Park TM, Arivett BA, et al (2012) Stress response and virulence functions of the *Acinetobacter baumannii* NfuA Fe-S scaffold protein. J Bacteriol 194:2884–2893. https://doi.org/10.1128/JB.00213-12

1322. Zivanovic V, Gojkovic-Bukarica L, Scepanovic R, et al (2017) Differences in antimicrobial consumption, prescribing and isolation rate of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* on surgical and medical wards. PLoS One 12:e0175689. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0175689