

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА МИКРОБИОЛОГИЯ



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

Д-Р ВИРНА-МАРИЯ ЦИТУ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на научна и образователна степен „доктор”

Научна специалност: МИКРОБИОЛОГИЯ

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ
ПРОФ. Д-Р РАЙНА ГЕРГОВА, ДМ

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	8
1. Исторически данни и таксономия и характеристика на <i>S.aureus</i>	8
2. Морфология и физиология	13
3. Фактори на вирулентност при <i>S. aureus</i> и патогенеза на инфекциите	16
3.1. Фактори, свързани с клетъчната стена (клетъчно-асоциирани)	21
3.1.1. Капсула	21
3.1.2. Плазмокоагулаза и кълмпинг фактор (CF).....	22
3.1.3. Стафилококов Протеин А.....	23
3.1.4. Колаген-свързващ адхезин (CNA)	25
3.1.5. Фибронектин-свързващи протеини А и В (FnbpA и FnbpB).....	26
3.2. Екстрацелуларни фактори на вирулентност (секретирани от живата клетка) - токсини и ензими.....	27
3.2.1 Екзотоксини	27
3.2.1.1. Хемолизини (алфа, бета, гама).....	28
3.2.1.2. Panton -Valentine Leukocidin (PVL).....	29
3.2.1.4. Токсини, свързани с типични клинични изяви.....	30
3.2.2. Ензими	34
3.2.2.1. Каталаза	35
3.2.2.2. Коагулаза	35
3.2.2.3. Липази.....	36
3.2.2.4. Хиалуронидаза.....	37
3.2.2.5. Стафилокиназа.....	38
3.2.2.6. Протеази	39
3.2.3. Регулиране на експресията на детерминантите за вирулентност	40
4. Механизми на резистентност на <i>S. aureus</i> към бета-лактами	41
4.1. Резистентност към макролиди, линкозамиди, стрептограмини (MLS група).	48
5. Молекулярна епидемиология	54
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	56
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	57

1. Бактериални изолати и пациенти.....	57
2. Микроорганизми.....	58
3. Микроскопско изследване.....	58
4. Изследване на пациентски проби.....	59
4.1. Клинични материали.....	59
4.2. Културелно изследване.....	59
5. Определене на антимикробна чувствителност с фенотипни методи.....	60
5.1. Определяне чувствителността чрез стандартизиран дисково-дифузионен метод на Бауер-Кърби на Мюлер-Хинтон агар.....	61
5.2. Определяне на Минимални инхибираща концентрации (MIC).....	62
5.2.1. Методът на E-test.....	62
6. Молекулярно-генетични техники.....	63
6.1. Изолиране на бактериална ДНК.....	63
6.2. Полимеразо-верижна реакция (PCR).....	63
6.3. Конвенционален мултиплекс PCR за директно откриване на <i>S. aureus</i> и метицилинова резистентност в клинични проби: хемокултури и пунктати.....	65
6.4. Конвенционален мултиплекс PCR за откриване на гени на вирулентност при <i>S. aureus</i>	66
7. Епидемиологично типизиране.....	71
7.1. Епидемиологично типизиране посредством RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA).....	71
7.1.1 RAPD.....	71
7.1.2. Обработка и графично представяне на резултатите от RAPD-PCR.....	72
7.2. Мутилокусно секвениране, MLST (multilocus sequence typing).....	73
8. Статистически анализ и интерпретиране на резултатите.....	77
V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	78
1. Демографски и клинични данни за пациентите с изолати <i>S. aureus</i>	78
2. Разработване на бърз молекулярно-генетичен метод за директно откриване на <i>S. aureus</i> и метицилинова резистентност в хемокултури и пунктати.....	82
3. Определене на антимикробната чувствителност при <i>S. aureus</i> и клинично значимите механизми на резистентността.....	88
3.1. Определяне на чувствителността и интерпретация на резултатите.....	88
3.2. Проучване на клинично-значимите механизми на резистентност към пеницилин, метицилин, макролиди и линкозамиди.....	98
3.2.1. Механизми на резистентност към бета-лактами/пеницилин, метицилин.....	98
3.2.2. Механизми на резистентност към макролиди и линкозамиди.....	99

4. Проучване на вирулентността чрез откриване на важни генни детерминанти.....	103
5. Препоръки за адекватна терапия въз основа на анализиране чувствителността на изследваните клинични изолати през последните 5 години.	115
5.1. Регионална информация за стафилококовите етиологични агенти	115
5.2. Инхибиране на бактериалния кворум (Quorum Sensing Inhibition)	117
5.3. Инхибиране на лектина.....	118
5.4. Хелатиране на желязо.	119
5.5. Фагова терапия	119
5.6. Нанотехнологията.....	121
6. Епидемиологично охарактеризиране и типизиране на щамове <i>S. aureus</i>	122
7. Изводи:.....	141
8. Справка за приносите на дисертационния труд.....	143
9. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд	145
10. Участия в проекти, свързани с дисертационния труд:.....	146
Книгопис:	147

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

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

I. ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

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

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

смъртност от стафилококови инфекции е наличието на метицилиновата резистентност, а другата причина е възможността за развитие на сериозни инвазивни заболявания. MRSA причинява приблизително 80,64% от инфекциите в САЩ през 2011 г. От тези инфекции 78% са настъпили в амбулаторни условия (Dantes R et al. 2013).

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

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

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

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

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Исторически данни и таксономия и характеристика на *S.aureus*

Staphylococcus aureus принадлежат към семейство *Staphylococcaceae*, род *Staphylococcus*, който съдържа повече от 40 вида и подвидове (Митов И и съавт. 2015; Harrison L et al. 2007; Jawetz, Melnick & Adelberg's 2013)

Има две групи в този род: коагулазо-положителни стафилококи, към които принадлежи *S.aureus* и коагулазо-отрицателни - *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylois*, *S. auricularis*, *S. pasteurii*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. equorum*, *S. lentus*, *S. pettenkoferi*, *S. carnosus*, *S. condimentii*, *S. equorum*, *S. piscifermentans*, *S. succinus* (Faria C et al. 2009).

Съвременното таксономично подреждане е показано на **Фигура 1**.

Стафилококите обитават кожа и мукозни мембрани на хора, млекопитаещи и птици, често като резидентна флора (Митов И и съавт. 2015; Harrison L et al. 2007). Понякога *S.aureus* може да е част от човешкия микробиом на носните ходове без да причинява очевидно заболяване, но в същото време е и един от най-честите патогенни бактерии, които са етиологични агенти на разнообразни по тежест и локализация инфекции, причина за сериозна заболяемост и смъртност в целия свят (Brown AF et al. 2014).

От ноздрите бактериите могат допълнително да се разпространяват до други локализации като гърлото, вагината, перинеума и стомашно-чревния тракт. *S.aureus* може да инфектира отворите на космените фоликули в кожата или да причини абсцеси в меките тъкани, особено след травми или следоперативно, рискът от стафилококви инфекции се повишава при използването на импланти, може да причини инвазивни заболявания като остеомиелит, пневмония, ендокардит, ендоваскуларни инфекции, сепсис, септичен артрит, менингит, и/или синдром на токсичен шок синдром. (Diekema DJ et al. 2019; Pérez-Montarelo D et al. 2017). Често се използват молекулярното типизиране и биохимичните тестове за по-

задълбочено диференциране на произхода и разпространението на щамовете на *S. aureus*. (Klevens RM et al. 2007).

Резистентният на метицилин *S. aureus* (MRSA) и метицилин резистентни коагулазо-отрицателни стафилококи (MRCoNS), освен когато последните са замърсители, са основна причина за живото-застрашаващи инфекции на кръвоносната система като ендокардит, постоперативни инфекции на меките тъкани, остеомиелит, септичен артрит, метастатични абсцеси, особено нозокомиални, и представляват глобален проблем за общественото здраве (Ivić I et al. 2013; Mehrshad S et al. 2016; Tevell S et al. 2017). Арсеналът за вирулентност на стафилококови изолати се различава основно в зависимост от бактериалните видове, а коагулазо-положителният *S. aureus* е доказан като най-вирулентния. Най-честите тежки инфекции, причинени от този патоген, се дължат на различни извънклетъчни продукти, напр. ензими, хемолизини и други токсини, които играят роля като фактори за вирулентност (Aman MJ & Adhikari RP. 2014; Pérez-Montarelo D et al. 2017; Sipahi OR et al. 2017). *S. aureus* също е открит като един от често срещаните етиологични причинители на респираторни инфекции, особено при българските деца през периода 1998 - 2014 г. (Gergova RT et al. 2016). Този микроорганизъм е най-често изолирания при български пациенти с лезии поради хронична венозна недостатъчност на долните крайници и напреднала диабетна микроангиопатия (Tzaneva V et al. 2016).

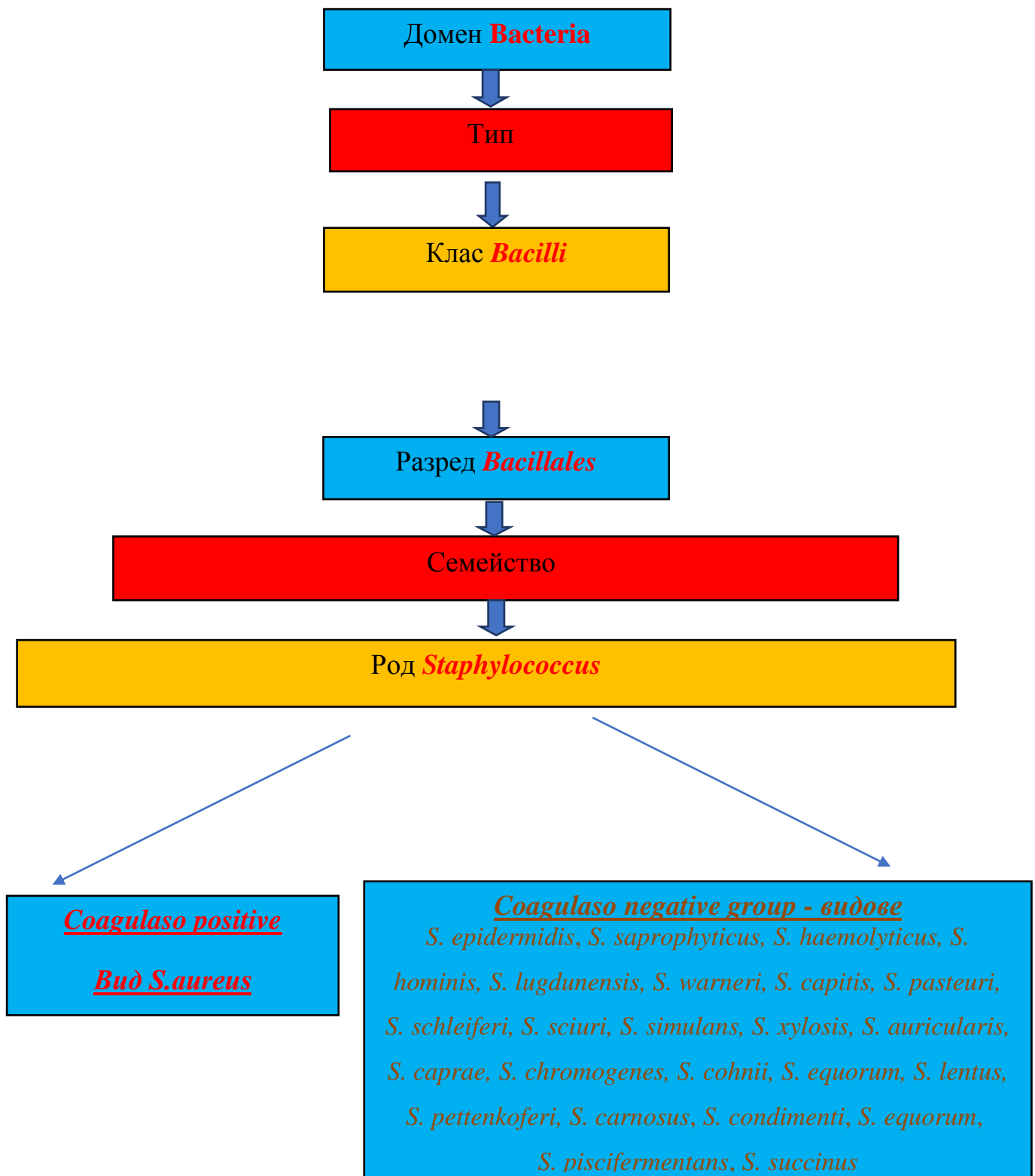
S. aureus също е сред най-често срещаните патогенни бактерии, причиняващи заболявания, пренасяни с хранителни продукти, включително осолени, поради издържливостта на по-високи концентрации натриев хлорид, неговата т. нар. халофилност (Argudín MÁ et al. 2010; Jung BS et al. 2015; Momtaz H et al. 2013; Özdemiri H & Keyvan E. 2016; Ortega E et al. 2010). Този вид е свързан и с тежки, понякога животозастрашаващи гнойни заболявания при животни като мастит, септичен артрит, ендокардит, остеомиелит, инфекции на пикочните пътища и сепсис (Cantekin Z et al. 2015; Li T et al. 2017).

Четири са най-често изолираните коагулазо-негативни вида с клинично значение през последните десетина години *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* и *S. saprophyticus* (Jawetz, Melnick, & Adelberg's 2013). Приблизително 75% от инвазивните инфекции, причинени от коагулазно-отрицателни стафилококи са с причинител *S. epidermidis*. Това е основният опортюнистичен етиологичен агент от групата на коагулазо-отрицателните стафилококи. Инфекциите, причинени от този вид са свързани най-вече с чужди тела в организма - изкуствени сърдечни клапи, интраваскуларни катетри, ставни протези, черепно-мозъчни шънтове. Предпоставка за колонизацията и участието в протрахиранни инфекции на този вид и на подобния му *Staphylococcus haemolyticus* е възможността им да продуцират извънклетъчна слуз и протеино-свързващи вещества, които стимулират лесното образуване на биофилм (Schleifer KH & Kloos WE. 1975; Czekaj T et al. 2015; Mitova Y et al. 2017; Nguyen TH et al. 2017; Seng R et al. 2017; Usha MG et al. 2013; Widerström M. 2016).

Други сравнително чести причинители на бактериемии от тази група са *S. lugdunensis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. cohnii*. Първият - *S. lugdunensis* може да е част от нормалната флора на кожата, среща се по-специално в областта на таза и перинеума. Подобно на *S. aureus* произвежда свързана коагулаза, но не и свободна такава. Повечето *S. lugdunensis* се изолират от абсцеси, целулит, остеомиелит или рани (Bieber L. 2010; Lucas A et al. 2017). *S. warneri* се изолира по-рядко, от пациенти с изкуствени сърдечни клапи, при извличане на цереброспинална течност, интраваскуларни катетри, подобно на другите представители на CoNS, но са съобщени някои случаи на сепсис и при имунокомпетентни пациенти с липса на рискови фактори, причинени то този вид (Ivić I et al. 2013). Първият случай на *S. warneri*, изолиран от есетрови риби със сепсис, е докладван от български автори (Rusev V et al. 2016). Друг рядък причинител, който може да бъде изолиран от пациенти с рискови фактори, е *S. capitis*. Има някои съобщения за неговата роля при перитонит, след бъбречна диализа, пейсмейкър и протезно-клапанния ендокардит, менингит, остеомиелит и други (Bianco C et al. 2014; Tevell S et al. 2017). Определен е клонът *S. cohnii subsp. cohnii* hu-01 се изолира от болнична среда с нарастваща

честота в сравнение с други CoNS в Китай и Полша през последните години (Hu XJ et al. 2014; Szewczyk EM et al. 2013).

S. saprophyticus най-често е непатогенен, но може да предизвика инфекция на пикочните пътища, предимно в сексуално активни млади жени и значително по-рядко от изброените по-горе видове причинява инфекции при хоспитализирани пациенти. Други стафилококови видове са важни във ветеринарната медицина (Jawetz, Melnick, & Adelberg's 2013; Kloos WE & Musselwhite MS. 1975).



Фиг. 1. Таксономия на род *Staphylococcus* (**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2009**. Volume 3: The Firmicutes. Editors: Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W. (Eds.)

2. Морфология и физиология

Стафилококите имат правилна сферична форма, те са Грам-положителни коки с размери около 1 μm (0,5-1,5 μm), разположени гроздовидно (**Фигура 2**), неподвижни, неспоробразуващи. Понякога образуват каплулоподобно вещество – слайм. *S. aureus* се диференцира от останалите стафилококи въз основа на способността и да произвежда златист пигмент - стафилоксантин, който оцветява специфично колониите, бета-хемолиза на кръвен агар, (Фигура2), както и продукцията на плазмокоагулаза. Колониите на твърди среди са кръгли, гладки, изпъкнали и блестящи. Образуват пигмент най-добре при стайна температура (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013; Mahon CR et al. 2007).

За по-задълбочено диференциране на коагулазо-отрицателните стафилококи се използват различни биохимични тестове (Митов И и съавт. 2015; Mahon CR et al. 2007).

Стафилококите растат лесно върху много видове носители, на обикновени среди в среда с кислород и без кислород (факултативни анаероби са), както и в микроаерофилна такава, невзискателни към условията за култивиране, растат и в среди с 9-10 % NaCl. Метаболитно са активни, ферментират различни въглехидрати и произвеждащи пигменти, които варират от бяло до наситено жълто. Те са каталаза положителни, за разлика от негативните стрептококи и ентерококи, с които имат сходна морфология (Митов И 2015 и съавт; Mahon CR et al. 2007). Стафилококите бавно ферментират много въглехидрати, произвеждащи млечна киселина, но не и газ. Протеолитичната активност значително варира при различните изолати. Те са относително устойчиви на изсушаване, топлина (издържат на 50°C за 30 минути) и 9% натриев хлорид, но лесно се инхибират от определени дезинфектанти (например 3% хексафлорофен) (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013).



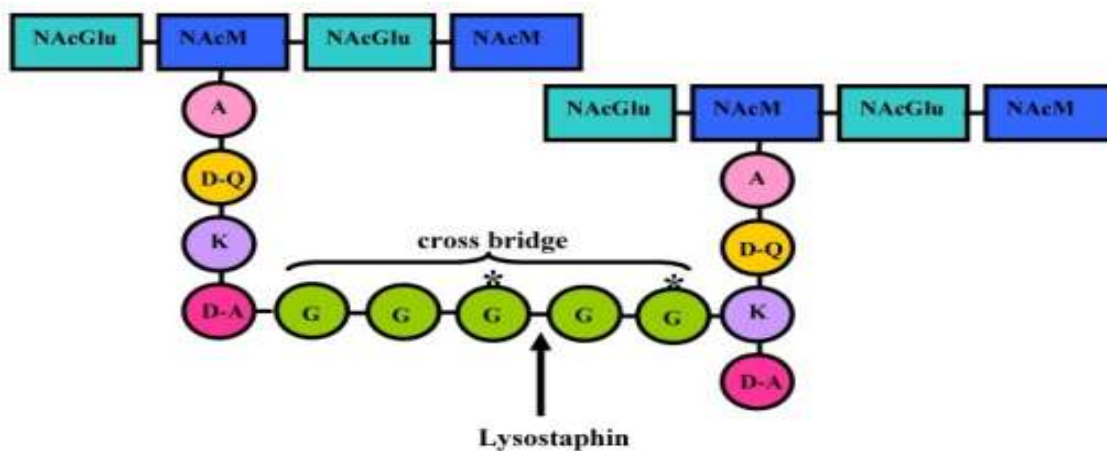
Фигура 2. Микроскопска и културелна характеристика на *Staphylococcus aureus*: **2.А.** Сканираща електронна микроскопия; **2.В.** Оцветяване по Грам; **2.С.** Морфология на колониите с бета-хемолиза върху кръвен агар.

Бактериалната клетъчна стена е преградата, която формира и защитава микроорганизмите. Тя е външна за цитоплазмената мембрана и е вътрешна за капсулата, притежавана от някои микроорганизми. Стените на грам-положителни бактерии, които представляват около 20% от сухото тегло на клетките, имат сравнително прост състав в сравнение с по-сложните стени на грам-отрицателните организми (Salton MRJ. 1953 & Salton MRJ. 1956).

Пептидогликанът (муреин) е основен, специфичен компонент на бактериалната клетъчна стена. Основната му функция е да запазва целостта на клетката, като противостои на тургорното налягане. Инхибирането на биосинтезата му (чрезмутация, под действието на антибиотици) или специфичното му разграждане (например от лизозим) по време на клетъчния растеж, води до лизис на клетката.

Пептидогликанът е важен и за поддържане на определена форма на клетката и служи като основа за прикрепване на различни други компоненти, например белтъци (Dramsı S et al. 2008) и тейхоеви киселини (при Грам положителните бактерии) (Neuhaus FC & Baddiley J. 2003). Той е тясно свързан с процесите на клетъчен растеж и делене.

Основните структурни компоненти на пептидогликана са линейни гликанови вериги, омержени от къси пептиди. Гликановите вериги са съставени от редуващи се N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамова киселина, свързани чрез β -(1-4) връзки. D-лактоиловата група на всеки остатък N-ацетилмурамова киселина е заместена с пептидна верига, която най-често има следната структура: L-Ala- γ -D-Glu-мезо-A₂pm (или L-Lys) -D-Ala-D-Ala (A₂pm е 2,6-диаминопимелинова киселина), като при зреене на макромолекулата, последният D-аланинов остатък се губи (Vollmer W et al. 2008). Омержването на гликановите вериги обикновено възниква между карбоксилната група на D-аланина на четвърта позиция и аминокгрупата на диаминопимелиновата киселина на трета позиция, или директно, или чрез къс интерпептиден мост. Така, химическата характеристика на този хетерополимер включва присъствието на необичайния въглехидрат N-ацетилмурамова киселина, γ -свързана D-глутаминова киселина, L-D (или дори D-D) връзки и небелтъчни аминокиселини (A₂pm) (Vollmer W et al. 2008). показано на **Фигура 3.**



Фигура 3. Химическа характеристика на пептидогликана при *S. aureus* (BaStos MCF et al. 2010)

Пептидогликанът на *S. aureus* представлява хетерогенен, силно омержен полимер, което го прави особено труден за разрушаване. Дебелината му е около 20-30 nm. Пептидните вериги при *S. aureus* имат следната структура: L-аланин-D-изоглутамин-L-лизин-D-аланин-D-аланин, а транспептидният мост е пентаглицинов сегмент

Последните стъпки от изграждането на пептидогликана включват участието на два много важни ензима – трансгликозилаза (Labischinski H. 1992) и транспептидаза (De Lencastre H et al. 1994), разположени от външната страна на цитоплазматичната мембрана. Трансгликозилазата катализира формирането на β -(1–4) гликозидна връзка между дизахаридите на гликановите единици, които формират полимера на основната гликанова верига. Новоформираната гликанова верига, често наричана насцентен пептидогликан, се вгражда в клетъчната стена от транспептидазата. Транспептидазата медира омержването чрез създаване на пептидна връзка между N-края на последния глицинов остатък от пентаглициновия сегмент, прикачен към една от пептидните вериги, и D-аланина на четвърто място, който е част от съседна пептидна верига (Van Heijenoort J. 2001). Резултатът от активностите на трансгликозилазата и транспептидазата е формирането на пептидогликанова мрежа, която обхваща цялата клетка (Sharif MO et al. 2009).

3. Фактори на вирулентност при *S. aureus* и патогенеза на инфекциите

Бактериалните компоненти, свързани с клетъчната стена и секретираните екстрацелуларни продукти, които повлияват патогенезата на инфекциите, свързани със *S. aureus*, са многобройни и включват повърхностно свързани адhezини, капсулен полизахарид, екзоензими и екзотоксини. Това съзвездие от бактериални продукти позволява стафилококите да се адхерират към еукариотните мембрани, да се противопоставят на опсонизацията и фагоцитозата, да лизират еукариотните клетки чрез продукцията на ензими и токсини и да задействат производството на имуномодулиращи молекули в гостоприемника (Diekema DJ et al. 2019; Karbuz A et

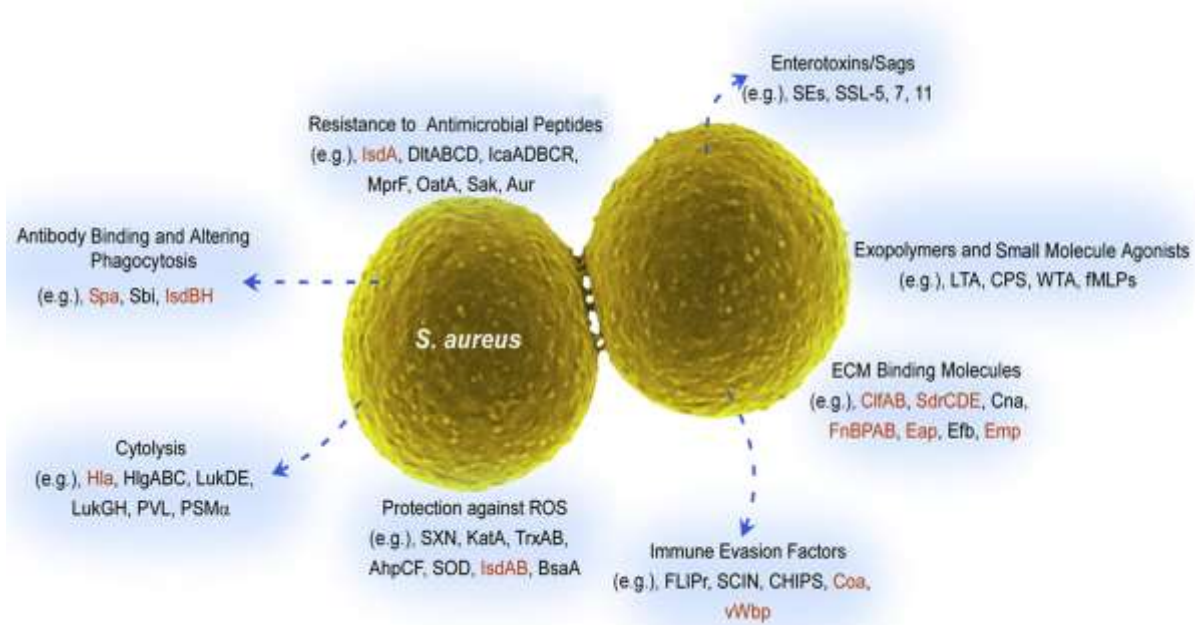
al. 2017). Поради многофакторния характер на стафилококовите инфекции и функционалния излишък на адhezини и екзогенни протеини на *S.aureus* е трудно да се определи тежестта и ролята, която отделните детерминанти на вирулентност, имат в патогенния процес. Патогенният капацитет на даден щам на *S aureus* се дължи на комбиниран ефект на извънклетъчните фактори и токсините заедно с инвазивните свойства на щама. В единия край на болестният спектър е хранително отравяне със стафилококи, което се дължи единствено на приемане на предварително отделения ентеротоксин; в другият край са стафилококовата бактериемия и септицемия с абсцеси във всички органи. Патогенният, инвазивен *S aureus* произвежда коагулаза и има тенденция да произвежда пигмент, придаващ на колониите златист звят и да е по-силно хемолитичен (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013). Непатогенни, неинвазивни стафилококи като *S epidermidis* са коагулазно отрицателни и са склонни да бъдат нехемолитични. Такива организми рядко предизвикват инфекции, но могат да заразяват ставни или сърдечно-съдови протези или причиняват заболяване при имуносупресирани лица. Те могат да бъдат резистентни при антибиотично лечение поради образуването на биофлми. *S lugdunensis* се е превърнал в по-вирулентен микроорганизъм с инфкциозен спектър, подобен на *S aureus*, с когото споделя част от факторите на вирулентност и има сходни фенотипични характеристики като хемолиза и притежава CF, но не произвежда свободна коагулаза. *S saprophyticus* обикновено е непигментиран, новобиоцин-устойчив и нехемолитичен; причинява уроинфекции при млади жени (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013). На клетъчно ниво, неутрофилите са първите клетки, които се опитват да ликвидират *S. aureus* (Greenlee-Wacker MC et al. 2014). Те фагоцитират бактериите и използват агенти като хипохлориста киселина и кислородни радикали, за да унищожат погълнатия микроб. Тези активирани неутрофили в допълнение могат да освободят ДНК в екстрацелуларната матрица, за да произведат допълнителни неутрофилни филтри, които контролират микробното разпространение и повишават цитотоксичността на антимикробните агенти, като ограничават имунопатологията. След поглъщането на бактериите, неутрофилите

обикновено претърпяват ускорена апоптоза и се прочистват от макрофагите. Този процес възстановява възпалената тъкан и на хомеостазата. (Greenlee-Wacker MC et al. 2014). Въпреки това, при някои обстоятелства патогенността на *S. aureus* се усилва от среда, богата на неутрофили (Greenlee-Wacker MC et al. 2014). Когато механизмите на вродения имунитет (естествената резистентност) не са достатъчни за отстраняване на бактериалната инфекция, се активират тези на придобития имунитет. Адаптивната имунна реакция към *S.aureus* изисква смес от TH1, TH17 и реакциите на хуморалните антитела. Например при SSST се наблюдават клетъчни и хуморални реакции (първични или вторични) (Montgomery CR et al. 2014). Реакцията на TH1 / TH17 е свързана с производството на IL-1 и IL-17A, за да се стимулира образуването на абсцес на мястото на инфекцията, (Miller LS & Cho JS. 2011). Абсцесификацията е отличителен белег на инфекциите на *S. aureus* и е необходима за изчистването от бактериите чрез фагоцитоза и оксидативен стрес (Miller LS & Cho JS. 2011). Синдромът на Hyper-IgE (HIES) установява значението на TH17 реакциите за контролиране на инфекциите със *S.aureus*. При този синдром мутацията в *stat3* гена води до по-ниски нива на свързания с ретиноид орфанен рецептор (ROR) γ_t , който е главният регулатор на TH17 линейната диференциация. По този начин, пациентите показват ненормална продукция на IL-17A и повишена чувствителност към *S. aureus* инфекции (Milner JD et al. 2008). Известно е, че дефицитът на IL-17RA води до чувствителност към лигавична кандидоза, но не и към *S. aureus* (Soltesz B et al. 2015). В допълнение, една скорошна публикация отбелязва, че дефицита на ROR γ_t сам по себе си води до чувствителност към инфекции с *Candida* и *Mycobacterium*, но не и до повишена чувствителност към *S. aureus* (Okada S et al. 2015).

Стафилококовите суперантигени (SAGs) активират около 20% от Т-клетките, което води до масивна пролиферация и производство на цитокини (Grumann D et al. 2008). Това действие се осъществява чрез свързване на SAG със селективни вариабилни участъци на Т-клетъчния рецептор В-верига (TCR-V B) и с някои МНС клас II молекули на антиген-представящи клетки (APC), което води до

неспецифично активиране. Проявата на SAg не се отнася само за изолати от TSS-асоциирани щамове. Всъщност, клъстерът на стафилококовия ентеротоксинов ген (egc), съдържащ 6 SAgс, обикновено се намира в коменсални изолати (Grumann D et al. 2008). Друг пример е стафилококовият ентеротоксин А (SEA), който е добре известен с предизвикване на силно провъзпалителна TH1 реакция и може да бъде открит в патогенни, както и в коменсални изолати. Това обаче не е уникално само за SEA, тъй като е установено, че всички SAgс имат сходна суперантегенност, когато се измерват нива на про-възпалителни / TH1 цитокини *in vitro* (Grumann D et al. 2008).

В допълнение към Т-клетъчните реакции, установено е, че хуморалните реакции играят роля в инфекциите, причинени от *S. aureus*. В серума на пациенти със бактериемия на *S. aureus* могат да се открият IgG антитела, таргетиращи осем консервирани извънклетъчни белтъка. От тези таргети, седем са кодирани от генома на ядрото на бактериите (Stentzel S et al. 2015). Протеините, към които са насочени тези антитела, включват фосфолипаза и имунодоминантен стафилококов протеин А (IsaA) (Stentzel S et al. 2015). Тези антитела могат да имат прогностично значение, тъй като антителата с по-висок афинитет са свързани с по-добри резултати за пациенти със сепсис (Stentzel S et al. 2015).



Фигура 4. Фактори на вирулентност при *S.aureus*. (Kenneth Todar. 2012 textbook of bacteriology.net/resantimicrobial.html)

Легенда: **Hla** - α -хемолизин; **HlgABC** - гама-хемолизин субединици А, В и С; **Luk** - левкоцидин; **PVL** - Левкоцидин на Panton-Valentine; **PSM** - фенол разтворим модулин; **SpA** - Протеин А; **Sbi** - IgG-свързващ протеин; **IsdAB** / **IsdBH** - повърхостни детерминанти за регулиране на желязото в клетката; **IcaADBCR** - междуклетъчни адхезини, субединици А, D, В, С и R; **MprF** - фактор за множествена пептидна резистентност; **OatA** - О-ацетилтрансфераза А; **Sak**- стафилокиназа; **SE** - стафилококов ентеротоксин; **SSL** - суперантиген-подобен протеин; **LTA** - липотейхоева киселина; **CPS** - капсула; **WTA** - тейхоева киселина в клет. стена; **fMLP** - N-формил-метионил-левцил-фенилаланин; Clf - клъмпинг (слепващ) фактор; **SdrCDE** - сиалопротеин, свързващ костта, субединици С, D и E; **Cna** - колаген, свързващ адхезин; **FnBPAB** - фибронектин, свързващи протеини А и В; **Eap** - извънклетъчен адхезивен протеин; **Efb** - извънклетъчен фибриноген, свързващ протеин; **Emp** - екстрацелуларен матриксен протеин; **FLIPr** - формил рецептор, инхибитор на IgG; **SCIN** - стафилококов инхибитор на комплемента; **CHIPS** - протеин, инхибиращ хемотаксис на имунни клетки; **Coa** - коагулаза; **vWbp** - белтък, свързващ фактор на von Willebrand; **SXN** - стафилоксантин; **KatA** - каталаза; TrxAB- тиоредуксин редуктаза А и В; **AhpCF** - алкил хидропероксид редуктаза субединици С и F; **SOD** - супероксиддисмутаза; **BsaA** - глутатион пероксидаза.

3.1. Фактори, свързани с клетъчната стена (клетъчно-асоциирани)

3.1.1. Капсула

Стафилококите съдържат антигенни полизахариди и протеини, както и други вещества, важни за структурата на клетъчната стена. Микроорганизмите, които причиняват инвазивно заболяване, обикновено произвеждат извънклетъчни капсулни полизахариди (Robbins JB et al. 1980). Полизахарид А - групово-специфичен, съставен от N-ацетилглюкозамин-рибитол-тейхоева киселина, полимер на полирибитол-фосфат, медиращ прикрепването на стафилококите към мукозните мембрани, като се свързват към фибронектина. Липофилни връзки свързват липотейхоевите киселини към цитоплазмената мембрана. Капсулата повишава вирулентността на стафилококите чрез възпрепятстване на завършената фагоцитоза, което води до устойчивост и преживяване на бактериалната клетка в неблагоприятните условия в биологичните течности на заразения гостоприемник. Повечето щамове *S aureus* с клинично значение имат полизахаридни капсули, които инхибират фагоцитозата в полиморфонуклеарните левкоцити. Капсулните антигени на *S. aureus* са повърхностно свързани, ограничени в антигенната специфичност и силно консервирани сред клиничните изолати. Установени са най-малко 11 серотипа, но типове 5 и 8, отговорни за по-голямата част от инфекциите. Тези типове капсули са мишени за конюгирана ваксина. (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013; Karbuz A et al. 2017).

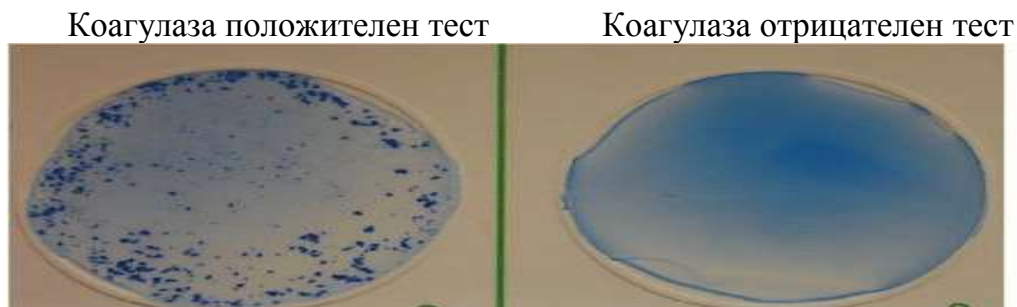
Други адhezини

Прикрепването на *S. aureus* към повърхността на клетката гостоприемник, инициращо процеса на колонизация, се медира от и от няколко други вида адhezини (**Фигура 4**). Един голям клас стафилококови адhezини включва протеини, ковалентно свързани към клетъчния пептидогликан, които специфично се свързват с компонентите на извънклетъчната матрица (ECM) и заедно образуват микробен повърхностен компонент, разпознаващ адhezивните матрични молекули (MSCRAMMs) (Foster TJ. 2005). Тези молекули разпознават най-важните

компоненти на ЕСМ или кръвната плазма, включително фибриноген, фибронектин и колагени. Типични стафилококови протеини, членове на семейството MSCRAMM са стафилококовия протеин А (SpA), фибронектин-свързващи протеини А и В (FnbpA и FnbpB), колаген-свързващ протеин (CNA) и clumping фактор (Clf) А и В (Foster TJ. 2005).

3.1.2. Плазмокоагулаза и клъмпинг фактор (CF)

Клъмпинг фактор (ClfA) А и В, свързващ фибриногена или още известен като свързана коагулаза. Коагулазата е ензим, продуциран от *S. aureus*, който превръща (разтворим) фибриноген в плазмата до (неразтворим) фибрин. *S. aureus* има две форми коагулаза, свързани и свободни.



Фигура 5. Тест за свързана коагулаза (Clumping factor) на предметно стъкло (FoSter TJ. 2005)



Фигура 6. Плазмо-коагулаза положителна и коагулаза отрицателна реакция (Rahman MM et al. 2018)

Коагулазният тест се използва за диференциране на *S.aureus* (положителен) от Coagulase Negative *Staphylococcus* (CONS).

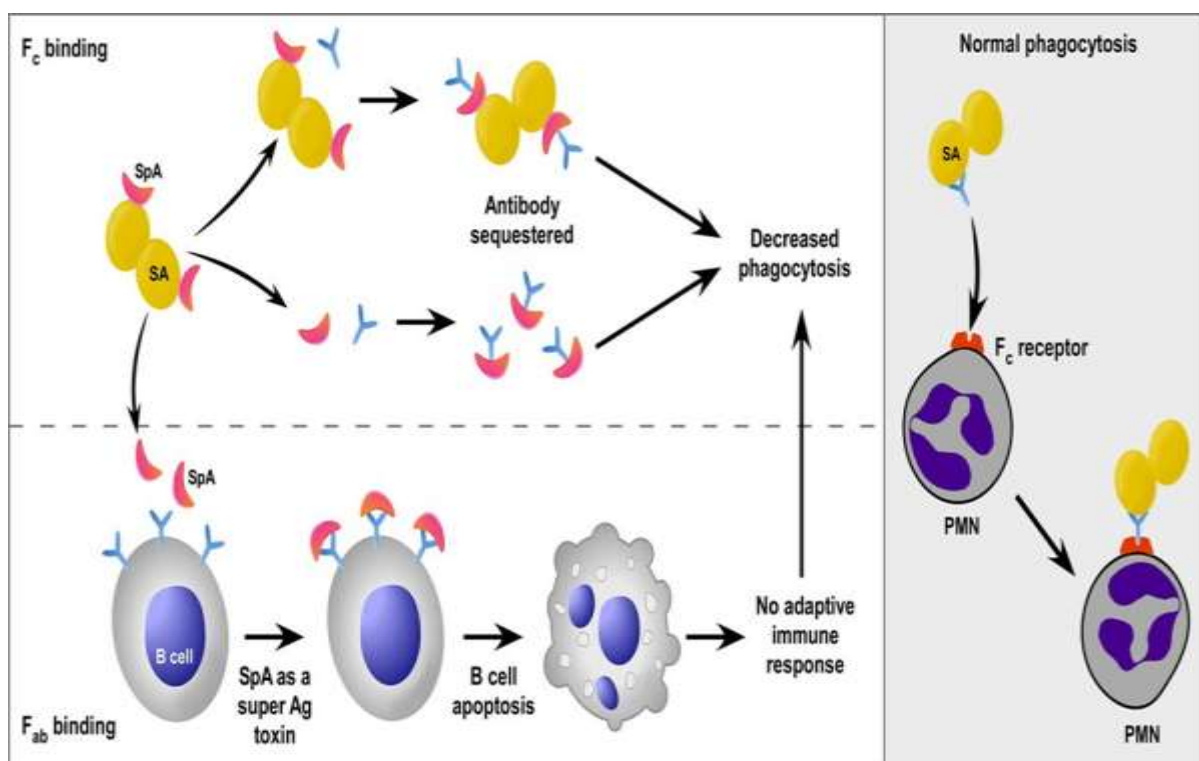
Извършва се тест за коагулаза на предметно стъкло с капка заешка плазма (**Фигура 5**), евентуално с добавено метиленово синьо за контраст, за да се открие свързаната коагулаза или клъмпинг фактора (Cf). Провежда се и тест в епруветка (**Фигура 6**), за коагулиране на 1 мл заешка плазма в интервала от 2 до 6 часа в епруветка при 36°C, за да се открие свободната коагулаза. (Dickinson RB et al. 1995).

3.1.3. Стафилококов Протеин А

Протеин А (SpA) е един от най-важните повърхностни антигени и фактори на вирулентността (**Фигура 7**). Той е ковалентно прикрепен към клетъчната стена на повечето щамове на *S. aureus* се характеризира като със способност за неспецифично взаимодействие с Fc фрагмента на човешкия и на някои бозайници IgG. Частта Fab на IgG, свързана с протеин А, е свободен за комбиниране със специфичен антиген. (Foster TJ. 2005; Karbuz A et al. 2017). Това неспецифично покриване с имуноглобулини, свързани посредством Fc фрагмента към протеин А има силно изразено антифагоцитно действие и парализира имунния отговор, така че стафилококите остават защитени като с щит от самите продукти на имунната система (**Фигура 7**). Освен участие в адхезията и колонизацията на гостоприемника със стафилококовия причинител, SpA има известен потискащ ефект срещу активирането на комплемента и най-вече се проявява като суперантиген. Суперантигените са микробни продукти, които са мощни имуностимулатори, свързващи неспецифично Т-хелперните лимфоцити и антиген-представящите клетки, което води до поликлонален имунен отговор (Argudin MA et al. 2010; Payne AS. 2004). Това свързване води и до прекалено повишена секреция на цитокини (туморнекротизиращ фактор- TNF, интерлевкин-1) и Т-клетъчни медиатори (интерлевкин-2 - IL2, интерферон-гама - IFN γ). Неконтролируемото освобождаване на тези имуномодулатори води до хипотензия и мултиорганна недостъпност (Bispo

A et al. 2003). Те се превръщат в оръжия, насочени срещу гостоприемника и по този начин се получава неефективния имунен отговор (Karbuз A et al. 2017). SpA може също да взаимодейства с други компоненти на гостоприемника (Hartleib J et al. 2000; Sjobring U. 1989). Свързването на SpA към Fc и Fab домейни допринася за вирулентността на *S. aureus* в миши модел на системна инфекция (Falugi F et al. 2013). Взаимодействието на SpA с IgM Fab задейства пролиферацията и изчерпването на В клетките (Goodyear CS & Silverman GJ. 2013), потискайки развитието на адаптивни имунни отговори. Следователно, инфекцията с SpA-експресиращи бактерии не осигурява защита срещу последваща инфекция с *S. aureus* (Falugi F et al. 2013). Протеин А също инхибира фагоцитното убиване на *S. aureus* в човешка и миша кръв (Falugi F et al. 2013, Smith EJ et al. 2011). Този процес вероятно зависи от взаимодействието на SpA с IgG Fc, тъй като *S. aureus*, експресиращ вариант на SpA, който няма способността да разпознава IgG Fc, оцелява слабо в кръвта на мишка, подобно на SpA-дефицитен мутант (Falugi F et al. 2013). IgB Ds на SpA също стимулират възпалението чрез взаимодействието им с рецептора на тумор некрозис фактор (TNF1) (Gomez MI et al. 2006). Хиперпроменливата Hg област на SpA включва променлив брой октапептидни повтори, които допринасят за възпалението чрез активиране на интерферон-бета сигнализация в епителни и имунни клетки на дихателните пътища (Martin FJ et al. 2009). Протеин А се синтезира като прекурсор с N-крайна сигнална последователност и C-терминален сортиращ сигнал. Сигналната последователност се разцепва чрез сигнална пептидаза по време на транслокацията на прекурсора през цитоплазмената мембрана чрез общата секреторна (Sec) пътека (Sibbald MJ et al. 2006). Сигналят за сортиране включва LPETG мотив, хидрофобен мембранно обхващащ домен и, при екстремния C-край, участък от положително заредени остатъци. Последните два елемента забавят секрецията през мембраната и улесняват разпознаването и разцепването чрез сортаза А (Schneewind O et al. 1993). Сортира А разцепва между треонин и глицин от LPETG мотива, образувайки ацил-ензимно междинно съединение, улавящо C-терминалната карбоксилна група на

протеина с неговия цистеин тиол (Mazmanian SK et al. 1999). Ациловите междинни съединения се освобождават от нуклеофилната атака на аминокгрупата на пентаглициновия кръстосан мост на липид II (Perry AM et al. 2002). След трансгликозилиране и транспептидация, SpA става ковалентно закотвена към пептидогликан и се показва на повърхността на бактериите (Mazmanian SK et al. 2011). Също така, всяка от повтарящите се единици има афинитет за Fab домени, кодирани от някои фазови генни семейства на имуноглобулин на специфични имуноглобулини (Sasso EH et al. 1989; Seppala I et al. 1990).



Фигура 7. Роля на протеин А за свързване с IgG (Kobayashi & DeLeo FR. 2013)

3.1.4. Колаген-свързващ адхезин (CNA)

Това е важен фактор на вирулентността с изразени адхезивни свойства, насочени особено силно към важна съставка на всеки човешки и животински

организъм - колагена. Освен това потиска силно активирането на комплемента и по този начин пречи на ефективния имунен отговор. Този протеин има водеща роля в колонизацията на тъканите и хронифицирането на инфекциозния процес, особено при засягане на тъкани, по-богати на колаген. В животински модели експреиментално е доказано неговото значение за усложняване и персистирането на стафилококвата инфекция в кости и стави. Докато Clf е специфичен за *S. aureus*, подобни на CNA фактори на вирулентност се срещат и при други бактерии като YadA в *Yersinia enterocolitica*, ACE при *Enterococcus faecalis*, ACM - *Enterococcus faecium* и CNM в изолати *Streptococcus mutans* (Madami A et al. 2017).

3.1.5. Фибронектин-свързващи протеини А и В (FnbpA и FnbpB)

Повечето щамове на *S. aureus* експресират два свързващи фибронектин (Fn) адхезини. Фибронектин-свързващите протеини А и В (FnBPA и FnBPB) медираат адхезията на *S. aureus* към фибриноген, еластин и фибронектин. FnBPA и FnBPB са кодирани съответно от два тясно свързани гена, *fnbA* и *fnbB*. С изключение на N-крайните региони, аминокиселинните последователности на FnBPA и FnBPB са силно запазени. През 2016 г. в Япония се съобщава, че от осемдесет секвенирани стафилококови изолата, приблизително по равно са били съответно с гени *fnbA* и *fnbB*. Въпреки, че филогенезата на *fnbA* и *fnbB* е била различна, всеки тип *fnbA* свързан със специфичен тип *fnbB*, което показва, че *fnbA* и *fnbB* мутират независимо, докато комбинацията от двата гена след рекомбинация е стабилна. Следователно тези комбинации *fnbA-fnbB* са дефинирани като типове последователности FnBP (Fnsts). Анализът на неравновесието на свързване (LD) на A67-B региона с MLST разкрива, че не само променливите аминокиселинни остатъци, но и добре запазените аминокиселинни остатъци между FnBPA и FnBPB са разположени на повърхността на протеина. Тези резултати подчертават молекулярния процес на FnBP, който се развива чрез смесена мутация и рекомбинация със запазване на функциите (Murai M et al. 2016). При инфекция в клетъчна линия е показано, че FnBPA е необходим за адхезия и интернализация от

непрофесионални фагоцитиращи клетки при поглъщане от възпалителни макрофаги и активиране на неутрофилните левкоцити. А домейнът на FnBPA се свързва с тропоеластин с висок афинитет. И двата FnBP са необходими за ефективни клетъчни отговори. Резултатите от проучаване, публикувано през 2020 година показват, че FnBPA е по-важен при експериментални инфекции. Въпреки това, сътрудничеството между FnBPA и FnBPB е необходимо за предизвикване на тежки и смъртоносни инфекции (Speziale P and Pietrocola G. 2020).

S. aureus има и други специфични протеини, които могат да имат силно въздействие върху имунния отговор. Примери за такъв вид протеини са стафилококовият инхибитор на комплемента (SCIN), хемотаксисен инхибиторен протеин на *S. aureus* (CHIPS), стафилокиназа (SAK), екстрацелуларен фибриногенен свързващ протеин (Efb), извънклетъчен адхерентен протеин (Eap) и формил - подобен на инхибиторен протеин (FLIPr). SCIN е C3 конвертазен инхибитор, който блокира фиксирането на C3 върху повърхността на бактериите и по този начин способността на човешките неутрофили да фагоцитират *S. aureus* (Below S et al. 2009; Rooijackers SHM et al. 2005). CHIPS и FLIPr блокират неутрофилните рецептори за хемоатрактанти (Prat C et al. 2002). Eap блокира миграцията на неутрофили от кръвоносни съдове в тъканите свързването на SAK към α -дефензини премахва техните бактерицидни свойства, докато Efb инхибира и класическия, и алтернативния път на активиране на комплемента (Bokarewa MI et al. 2006; Prat C et al. 2002).

3.2. Екстрацелуларни фактори на вирулентност (секретирани от живата клетка) - токсини и ензими.

3.2.1 Екзотоксини

S. aureus произвежда **екзотоксини**, които притежават цитолитична активност. Цитолитичните токсини увръждат с детергентно - подобно действие различни интрацелуларни мембранни структури на широк кръг еукариотни клетки (еритроцити, тромбоцити, неутрофилни левкоцити, макрофаги, моноцити,

лимфцити), пробиват пори в клетъчните мембрани и причиняват изтичане на съдържанието на клетката, както и лизис на клетката-мишена (Aman MJ & Adhikari RP. 2014). *S. aureus* секретира няколко цитолитични токсина, сред които α -, β - и γ -хемолизини, левкоцидин и Panton-Valentine левкоцидин (PVL) (Aman MJ & Adhikari PR. 2014; Dinges MM & Orwin PM. 2000).

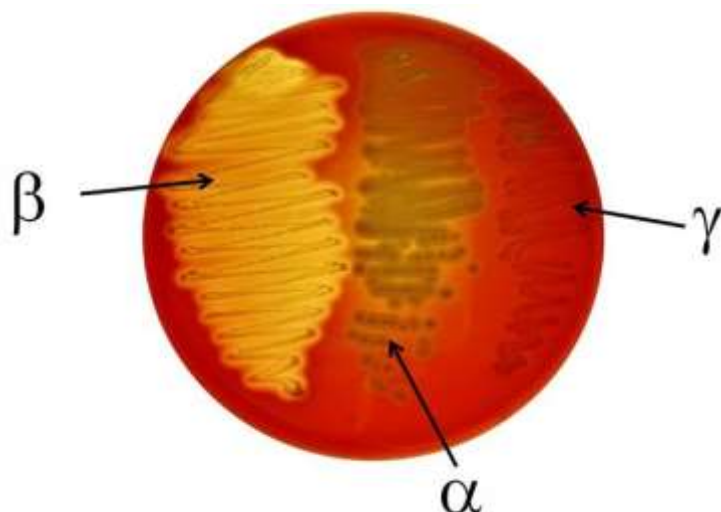
3.2.1.1. Хемолизини (алфа, бета, гама)

Хемолизините разграждат сфингомиелина и следователно са токсични за много видове клетки, включително човешки червени кръвни клетки. Лизата на еритроцити и тяхното действие обикновено е медирано от рецептор. Има много класове хемолизини, включително α , β и γ -хемолизини. Единствено δ -хемолизинът е класифициран като фенол-разтворим модулин (PSM), който не изисква рецептор за неговата хемолитична активност (Aman MJ & Adhikari RP. 2014).

α -хемолизинът е най-добре изученият член на стафилококови хемолизини. Този малък цитотоксин, образуващ пори в еритроцити и левкоцити, но не и неутрофили, чрез свързване към протеиновия рецептор ADAM10, дезинтегрин и металопроотеиназа (Aman MJ & Adhikari RP. 2014).

β -хемолизинът не е порообразуващ и е характеризирани като сфингомиелиназа. Токсинът хидролизира сфингомиелина и също лизира моноцитите; той обаче лизира човешките еритроцити, за разлика от овнешките само при ниски температури и не е цитолитичен по отношение на лимфоцитите и гранулоцитите (Aman MJ & Adhikari RP. 2014).

γ -хемолизинът уврежда човешки и еритроцитите на заек и има токсичност и срещу левкоцити, в експериментален модел проявява и дермонекротично и летална активност в зависимост от дозата. Тази група хемолизини са двукомпонентни и се състоят от полипептиди, обозначени като **S** (бавно, HlgA или HlgC) и **F** (бързо, HlgB) (Vandenesch F et al. 2012) действащи (**Фигура 8**).



Фигура 8. Хемолизини - *алфа, бета, гама* хемолиза на кръвен агар с овнешка кръв (Vandenesch F et al. 2012).

3.2.1.2. Panton -Valentine Leukocidin (PVL)

Този токсин проявява висок афинитет към левкоцити и може да убие белите кръвни клетки на хора и зайци. Има два компонента и се класифицира като двукомпонентен цитолизин (LukF-PV и LukS-PV) и за разлика от хромозомно кодирани хемолизини по-горе, PVL е кодиран от гени, намиращи се на подвижен бактериофаг. Двата компонента, обозначени като S и F, действат синергично върху мембраната на белите кръвни клетки, образувайки пори, както е описано за γ токсин (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013). Човешките и заешките неутрофили са силно чувствителни към порообразуващите свойства на PVL и бързо се стига до клетъчна смърт. Образуването на пори изисква наличието на двата компонента на токсина. Миелоидните клетки са основната цел на PVL, също така е известно, че ниските концентрации на токсина причиняват апоптоза, докато по-високите количества предизвикват лизис на неутрофили (Loffer VM et al. 2010). Клиничните проучвания доказват връзка на екзотоксин PVL с инвазивни и инфекции с некротични поражения като некротизираща пневмония. Суб-летални концентрации на пречистен PVL индуцират изразено освобождаване на хистамин от човешки

базофили и стимулират човешките неутрофили да освобождават ензими (Р-глюкуронидаза и лизозим), хемотактични компоненти (левкотриен-В4 и IL-8) и кислородни метаболити (Aman MJ & Adhikari PR. 2014; Dinges MM & Orwin PM. 2000; Loffer VM et al. 2010). Този токсин е важен фактор за вирулентност при придобити в обществото - CA-MRSA инфекции. Експресията на детерминантите на стафилококова вирулентност е регулирана от няколко системи, които чувстват и реагират на сигнали от околната среда. Първата от тези системи се състои от два протеина (двукомпонентни системи), пример за което е наличието на допълнителен генен регулатор (*agr*). И двете групи хемолизини са регулирани от този ген (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013).

3.2.1.4. Токсини, свързани с типични клинични изяви

S. aureus произвежда допълнителна група **екзотоксини**, които включват токсичен **шок синдром токсин-1** (TSST-1), **стафилококови ентеротоксини** (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH и SEI) и **ексфолиативни токсини** (ET). Сред тях TSST-1 и стафилококовите ентеротоксини (SE) принадлежат към групата на токсините, известни като **суперантигени** на пирогенния токсин (PTSAgs). Най-добре характеризираното свойство на тази група е суперантигенността, която се отнася до способността на им да стимулират поликлонална пролиферацията на Т-лимфоци за неефективен имунен отговор (Argudin MA et al. 2010; Payne AS. 2004).

Вирулентността на *S. aureus* обикновено се счита за мултифакторно обусловена и се дължи на комбинираното действие на няколко детерминанти на вирулентност. Едно изключение са някои токсини като TSST-1, ET, SE, които самостоятелно могат да доведат до типична клинична картина като синдром на токсичен шок, синдром на попарената кожа (SSSS) и стафилококови хранителни отравяния (Dinges MM & Orwin PM. 2000).

➤ **Ентеротоксини** Около половината от изолираните *S. aureus* произвеждат един или повече от различните ентеротоксини (А – Е, G – J, K – R и U, V) (Argudin MA et al. 2010 ; Karbuz A et al. 2017).

Тяхната роля в патогенезата на стафилококовата инфекция е представена в **Таблица 1**. Най-честите стафилококови ентеротоксини са SEA, SEB и SED. В много страни SEA е най-често срещаният токсин в много страни при хранително отравяне, свързано с стафилококи. Предполага се, че SED е вторият най-често срещан стафилококов токсин, свързан с хранителните отравяния в световен мащаб, и едно проучване показва, че само много малки количества от този токсин са необходими за предизвикване на хранително отравяне (Argudin MA et al. 2017). SEE също е документиран в някои случаи на хранително отравяне, докато SEF се счита за един от продуктите, участващи в етиологията на синдрома на токсичен шок. SEG, SEN и SEI не са толкова добре проучени, колкото останалите, но са свързани с едно от огнищата на хранителни отравяния в Тайван (Chen TR et al. 2004). SEN също е идентифициран като една от причините за масово хранително отравяне, свързано с консумацията на заразено сухо мляко в Осака, Япония през 2000 г (Ikeda T et al. 2005). Наблюдават се географски различия при установяване на честотата на тези ентеротоксини в стафилококови изолати (Ortega E et al. 2010; Rao S et al. 2013).

Ентеротоксините са устойчиви на топлина и устойчиви на действието на чревните ензими. Те са важни причинители на хранително отравяне, като ентеротоксините се получават, когато *S aureus* се развива във въглехидратни и протеинови храни. Поглъщане на 25 µg ентеротоксин В (SEB) предизвиква повръщане и диария. Еметичният ефект на ентеротоксина вероятно е резултат от стимулация на централната нервна система (център за повръщане), след като токсинът действа върху нервните рецептори в червата (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013).

Таблица 1. Ентеротксини и тяхната роля в патогенезата на стафилококовата инфекция (Puthuppally A et al. 2012)

Стафилококови ентеротоксини	Роля в патогенезата	Свързване с клас II молекулата на ГКТС
SEA	най-често срещаният токсин в много страни при хранително отравяне	алфа и бета вериги
SEB	изучаван като биологично оръжие	алфа вериги
SEC	най-често срещаният токсин при животни	извън основното място на свързване на алфа веригите
SED	хранително отравяне	алфа и бета вериги
SEE	хранително отравяне	бета вериги
SEF	участваща в етиологията на синдрома на токсичен шок	алфа и бета вериги
SEG	хранителни отравяния	SEB - подобно действие
SEH	хранителни отравяния	алфа вериги
SEI	хранителни отравяния	бета вериги

➤ **Ексфолиативните токсини**

Известни са също като "епидермолитични" токсини и са особено интересни фактори на вирулентност, продуцирани от някои щамове *S. aureus*. Тези изключително специфични серинови протеази разпознават и разцепват протеините само в повърхностните слоеве на кожата, което е пряко отговорно за клиничната проява на синдрома на попарената кожа (Staphylococcal scalded skin syndrome - SSSS) Този синдром се характеризира основно с ексфолиране на епидермиса от дермата на кожата. Ранните симптоми на SSSS са с треска и увредено съзнание, летаргия, отказ от храна. Тези симптоми са последвани от еритематозен обрив и образуването на големи, крехки, пълни с течности мехури. Мехурчетата след спукване, оставят засегнатите части на тялото без защитен слой от епидермиса. SSSS засяга големи части от тялото и лезиите често, поне в началото са стерилни. Ексфолиативният токсин А е кодиран от гена *eta*, разположен на бактериофаг и е устойчив на топлина (издържа кипене в продължение на 20 минути). Ексфолиативният токсин В е кодиран от плазмиди (*etb*) и е топлинно лабилен. Тези епидермолитични токсини произвеждат генерализирана десквамация на епидермиса на кожата чрез разтваряне на мукополизахаридната матрица на епидермиса. Токсините са суперантигени. (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013). Локализираната форма на SSSS, ограничена до местата на инфекция, се признава за „булозно импетиго”. И двете състояния имат еднаква етиология и се различават само по степента на увреждане на кожата. Причинителите, съдържащи епидермолитични токсини могат да се изолират, както от хора, така и от животни, особено от хипервирулентни щамове (Payne AS et al. 2004; Vancreynest D et al. 2007).

➤ **Токсин 1 на токсичния шок синдром (TSST-1)**

Токсинът на токсичен шок синдром - 1 (TSST - 1) е суперантиген, продуциран от 5 до 25% изолатите *S. aureus*. Причинителят отделя пирогенен токсин, подобен на ентеротоксина и ексфолиативния токсин. Той действа подобно на суперантиген - свързва по неспецифичен начин голям брой макрофаги и Th1

лимфоцитите и ги активира за производство на проинфламаторни цитокини (IL - 6, IL - 1, TNF - α , IFN - γ), които предизвикват тежките прояви на токсичния шок синдром: повишена пропускливост на ендотелните клетки при ниски концентрации и цитотоксичен ефект при високи концентрации. TSST-1 се свързва към основния клас на хистосъвместимост (MHC) II молекули, индуцирайки T-клетъчна стимулация, която промотира протеановите прояви на синдрома на токсичния шок (Deodhar D et al. 2015). Токсинът се произвежда в мястото на инфекцията и след това навлиза в кръвния ток. TSST-1 е прототип на суперантиген, секретирани от щам *S. aureus* в чувствителен гостоприемник, действа върху съдовата система, като причинява възпаление, треска, полиорганна дисфункция и шок (Mehtrotra M et al. 2000). Бактериален щам, който произвежда TSST-1, може да обитава различна ниша на гостоприемника, но предимно се развива във влагалището на заразените жени. TSST-1 е открит при пациенти, които са развили синдром на токсичен шок (TSS), най-често щамът продуцент може да бъде изолиран от жени, използващи менструални тампони, но също така може да колонизира всеки мъж или дете. Една трета от всички случаи на TSS са открити при мъже, причината най-често е хирургическа или друга рана (Bushra JS. 2019). TSST-1 е причина за 50% от неменструалните и 100% от всички менструални TSS случаи. Ексфолиативните токсини, TSST-1 и ентеротоксиновите гени са на хромозомен елемент, наречен **остров на патогенност**. Той взаимодейства с допълнителни генетични елементи - бактериофаги, за да произвежда токсините (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013).

3.2.2. Ензими

Почти всички щамове на *S. aureus* секретират група екзогенни протеини освен екзотоксини и ензими, включително нуклеази, протеази, липази, хиалуронидаза и колагеназа. Основната функция на тези протеини може да бъде превръщането на локалната тъкан на гостоприемника в хранителни вещества, необходими за растежа на бактериите (Dinges MM & Orwin PM. 2000).

3.2.2.1. Каталаза

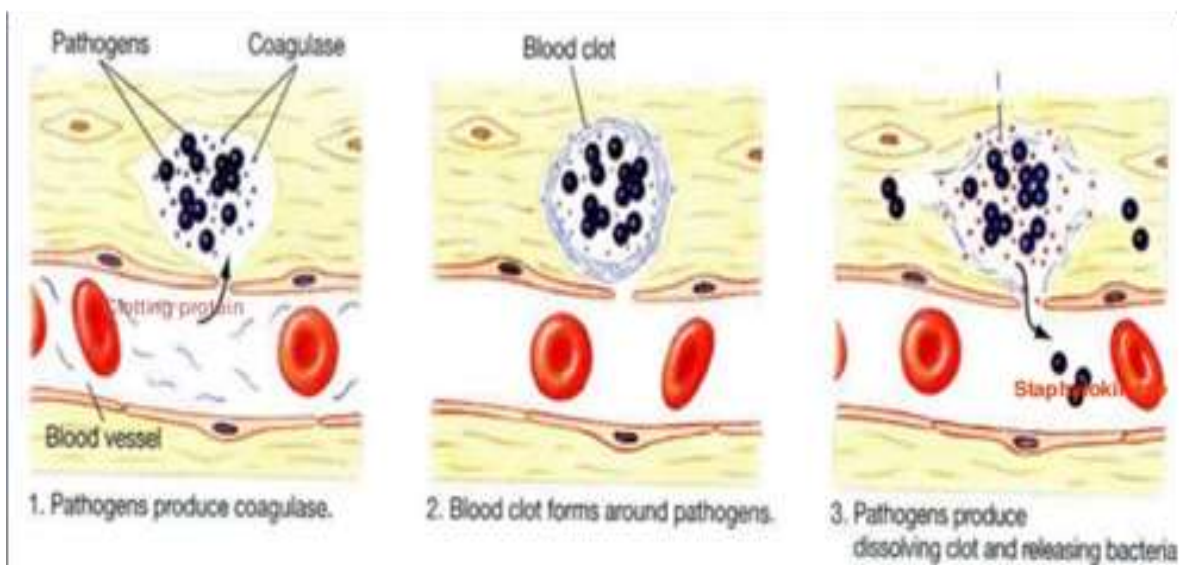
Каталазата е ензим, присъстващ в клетките на растенията, животните и аеробните (изискващи кислород) бактерии, които превръщат водородния пероксид във вода и кислород. За да оцелее, *S. aureus* има много защитни механизми като този ензим, който улеснява клетъчната детоксикация, неутрализира бактерицидните ефекти на H_2O_2 и подпомага разграничаването на стафилококовите видове, вкл. *S. aureus* (с положителна реакция) и стрептококови и ентерококови видове (каталаза отрицателни) (Brooks GF et al. 2004), представени на **Фигура 9**.



Фигура 9. Каталаза положителна и каталаза отрицателна реакция (Sagar A. 2018)

3.2.2.2. Коагулаза

Коагулазата реагира с протромбина в кръвта. Полученият комплекс се нарича стафилотромбин, който позволява на ензимната протеаза да преобразува фибриногена, плазмен протеин, произведен от черния дроб, до фибрин. Това води до съсирване на кръвта. Коагулазата се свързва с протромбина; заедно те стават ензимно активни и иницират фибринова полимеризация. Коагулазата е тясно свързана с повърхността на бактериалната клетка и може да покрие повърхността на *S. aureus* с фибрин при контакт с кръвта. Фибриновият съсирек може да предпази бактериалната клетка от фагоцитоза и да я изолира от други защитни механизми на гостоприемника като по този начин подпомага инвазията и дисеминирането на стафилококите в организма на гостоприемника (**Фигура 10**).

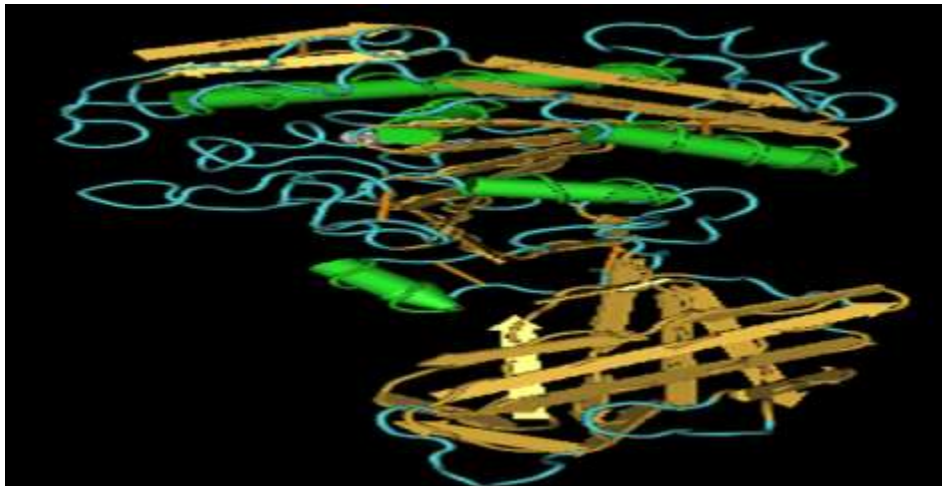


Фигура 10. Участие на ензима коагулаза в патогенезата на инфекцията. (Lotfy H et al. 2017)

Фибриновото предпазно покритие може да направи бактериите повирulentни. С помощта на коагулумите инфекцията при бактериемия и сепсис може да «метастазира», да се разпространи с кръвта и да попадне във всички органи. Производството на коагулаза се счита за синоним на инвазивно патогенен потенциал. Въпреки това няма налични ваксини срещу този фактор към днешна дата. (Jawetz Melnick & Adelberg's. 2013; Rahman MM et al. 2018).

3.2.2.3. Липази

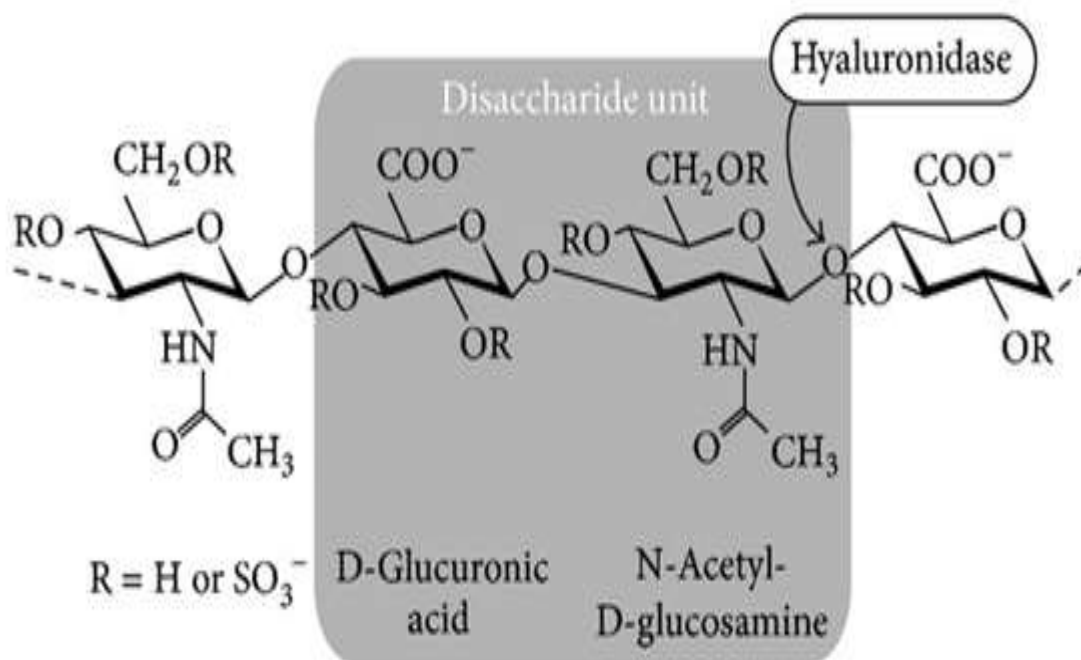
Липазите са клас хидролази и по-конкретно, естерази, които катализират хидролизата на ацил-глицерол в глицерол и свободни мастни киселини. Липазите могат също да катализират хидролизата и трансестерификацията на други естери в допълнение към синтеза на естери. В повечето липазни структури активният център е покрит от повърхностни бримки и винтови структури, което я прави недостъпна. Активният център (**Фигура 11**) се излага на взаимодействие с мицели и субстратни молекули (Sayari A et al. 2001).



Фигура 11. Структура на липазите.

3.2.2.4. Хиалуронидаза

S. aureus произвежда **хиалуронидаза**, способна да разгражда хиалуроновата киселина (**Фигура 12**). Хиалуронидазите са бактериални ензими, които разцепват β -1,4 гликозидната връзка на хиалуроновата киселина (НА), високомолекулен полимер, съставен от повтарящи се дизахаридни единици на N-ацетилглюкозамин и d-глюкуронова киселина (Hynes WL & Walton SL. 2000). Хиалуроновата киселина се синтезира и секретира от плазмената мембрана на клетки на бозайници и е в изобилие в кожата, скелетната тъкан, пъпната връв, белите дробове, сърдечните клапи, мозъка и редица други тъкани. Този субстрат също така изпълнява множество функции за гостоприемника, включително осигуряване на структура на тъканите и хомеостазата на водата, подпомагане на клетъчната пролиферация и действа като имунен регулатор. Ето защо продукцията на хиалуронидаза, разграждаща този важен елемент от човешкия, респ. животинския организъм е важен фактор на вирулентност (HynesWL & Walton SL. 2000).



Фигура 12. Химична структура на Хиалуроновата киселина и място на действие на хиалуронидазата.

3.2.2.5. Стафилокиназа

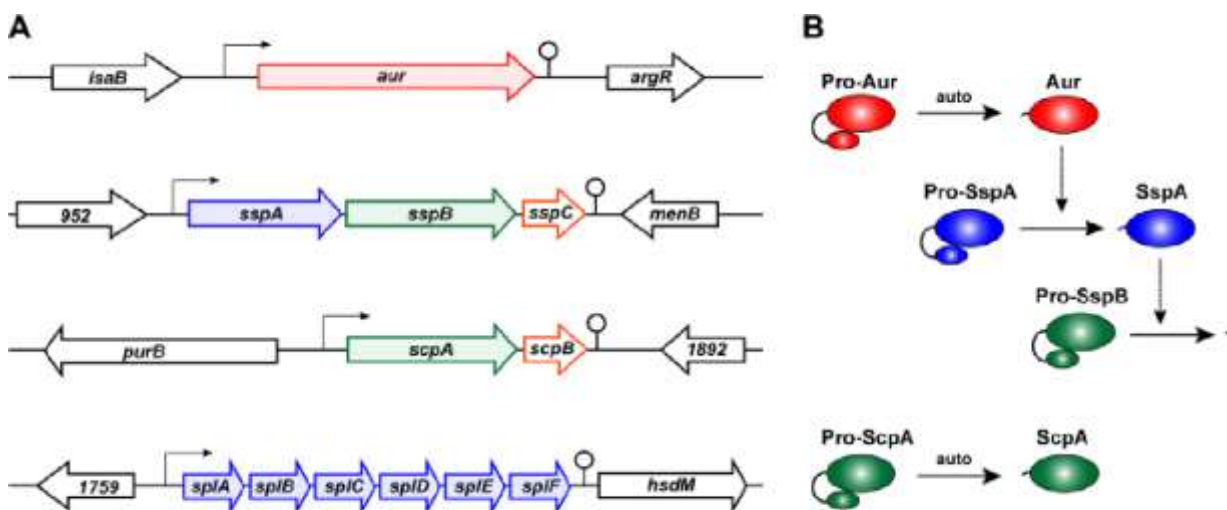
Стафилокиназата (SAK) има 136 аминокиселинни остатъка и е 15 kDa протеин. Синтезът на стафилокиназата се наблюдава в късна експоненциална фаза на стафилококивия растеж (Vokarewa MI et al. 2006). Тя е положително регулирана от генния регулатор "*agr*". Той активира плазминогена за образуване на плазмин, който усвоява фибриновите съсиреци. Това нарушава фибриновата мрежа, която често може да се образува, за да се запази локализацията на инфекцията. Стафилокиназата взаимодейства с плазминогена, за да образува комплекс, който излага активния център на плазминогенната молекула. Комплексът плазмин SAK се неутрализира с антиплазмин в плазмата в отсъствието на фибрин, което води до лизис. Обаче, в присъствието на фибрин, инхибирането е забавено, създавайки

уникален механизъм за селективност на фибрина в плазмата (Below S et al. 2009; Ortega F et al. 2010).

3.2.2.6. Протеази

S. aureus продуцира четири основни екстрацелуларни протеази, включително металопротеиназа (Aur), серин-глутамил-ендопептидаза (серинпротеаза, SspA) и две цистеин а-протеази, стапопаин А (ScpA) и стапопаин В (SspB). SspA и SspB са котранскрибирани в *sspABC* оперона, който също включва трета отворена рамка на четене *sspC*, кодиращ цитоплазмен инхибитор на SspB (Massimi I et al. 2002). Протеазите Aur, SspA и SspB са изразени като проензими, които впоследствие се активират в така наречената стафилококова протеолитична каскадна пътека (**Фигура 13**).

Ензимите, които разграждат ядрения материал на клетката гостоприемник се наричат **ДНК-зи** или още т.нар. **нуклеази**. *S. aureus* произвежда силни ензими от тази група, които могат да се използват и в идентификацията на бактериалния вид (Митов И. 2015 и съавт. 2015; Mahon CR. 2007).



Фигура 13. Екстрацелуларни протеази, на *S.aureus*.

Най-честият механизъм на резистентност, наблюдаван при близо 100% от стафилококите е производството на **бета-лактамази**, ензими, които хидролитично разрушават бета-лактамните антимикробни средства. Гените, кодиращи тези ензими се кодират от **плазмид**. Плазмидите се предават посредством **трансдукция**. Този механизъм прави микроорганизмите устойчиви на много пеницилини (пеницилин G, ампицилин, тикарцилин, пиперацилин) (Brooks GF et al. 2004; Jawetz, Melnick, & Adelberg's 2013).

3.2.3. Регулиране на експресията на детерминантите за вирулентност

Експресията на стафилококова вирулентност се регулира от няколко системи, които реагират на различни сигнали. Първата от тези системи се състои от две протеини (двукомпонентни системи), пример за което е аксесорния генен регулатор (*agr*). Другите две системи се състоят от ДНК-свързващи протеини (например, *Sar* протеини) и малки регулаторни РНК молекули. Обвързване на сензорите към специфични извънклетъчни лиганди или рецептор води до фосфорилиране - каскада, която води до свързване на регулатора към специфични последователности на ДНК. Това в крайна сметка води до активиранена функциите за регулиране на транскрипцията. Има няколко добре описани двукомпонентни регулаторни системи в *S. aureus*. Те включват *agr*, най-добре описаният, *sae RS*, *srrAB*, *arlSR*, и *lytRS*. Генният регулатор (*agr*) е от съществено значение за кварумсензиг контрола на генната експресия. Той контролира преференциално експресията на повърхностните адhezини (протеин А, свързана коагулаза и фибронектин, свързващ протеин), както и производство на екзопрозеини (токсини като TSST-1) в зависимост от фазата на растеж (а оттам и бактериална плътност). При ниска клетъчна плътност промоторът P2 е изключен и транскрипцията на трансмембранен протеин, AgrB, пептиден прекурсор, AgrD, трансмембранен сензор, AgrC са в ниски нива. С увеличаване на плътността на клетките по време на стационарната фаза на

растеж, сензорът AgrC се активира регулатора AgrA. AgrA е ДНК-свързващ протеин, който активира промотор P2 и промотор P3. Промоутър P3 инициира транскрипция на 8-хемолизин и ефектор, наречен RNAIII, което понижава експресията на повърхностните адхезиви и активира секрецията на екзопротеини както при транскрипцията и транслационни нива. Agr също се контролира положително от а ДНК-свързващ протеин, наречен SarA (кодиран от *sar*) и възможно от други регулаторни системи. Най-малко четири допълнителни двукомпонентни регулаторни системи е доказано, че влияят на експресията на вирулентността на гените. Те се наричат *sae*, *S aureus*_екзопротеини; *srrAB*, стафилококов дихателна реакция; *arlS*, локус, свързан с автолиза сензор; и *lytRS*. *Sae* регулира генната експресия при транскрипцията ниво и е от съществено значение за производството на α -токсин, β -хемолизини и коагулаза. Дейността му е независима от тази на *agr*. *SsrAB* е важен за регулиране на фактора на вирулентност израз, който се влияе от кислорода в околната среда. Локусът на *arlSR* е важен за контрола на автолизата и намалява активирането на *agr* локуса. Локусът на *lytRS* е също участва в автолиза (Jawetz, Melnick, & Adelberg's 2013).

Наличието на голямо разнообразие от фактори на вирулентност обуславя възможността *S.aureus* да противодейства в различни ситуации на различни нива срещу имунната защита на човешкия или животинския гостоприемник - от медиране на адхезията, възпрепятстване на фагоцитозата, до отклоняване или избягване на имунния отговор, а понякога дори насочването му към самоунищожителни процеси в макроорганизма.

4. Механизми на резистентност на *S. aureus* към бета-лактами

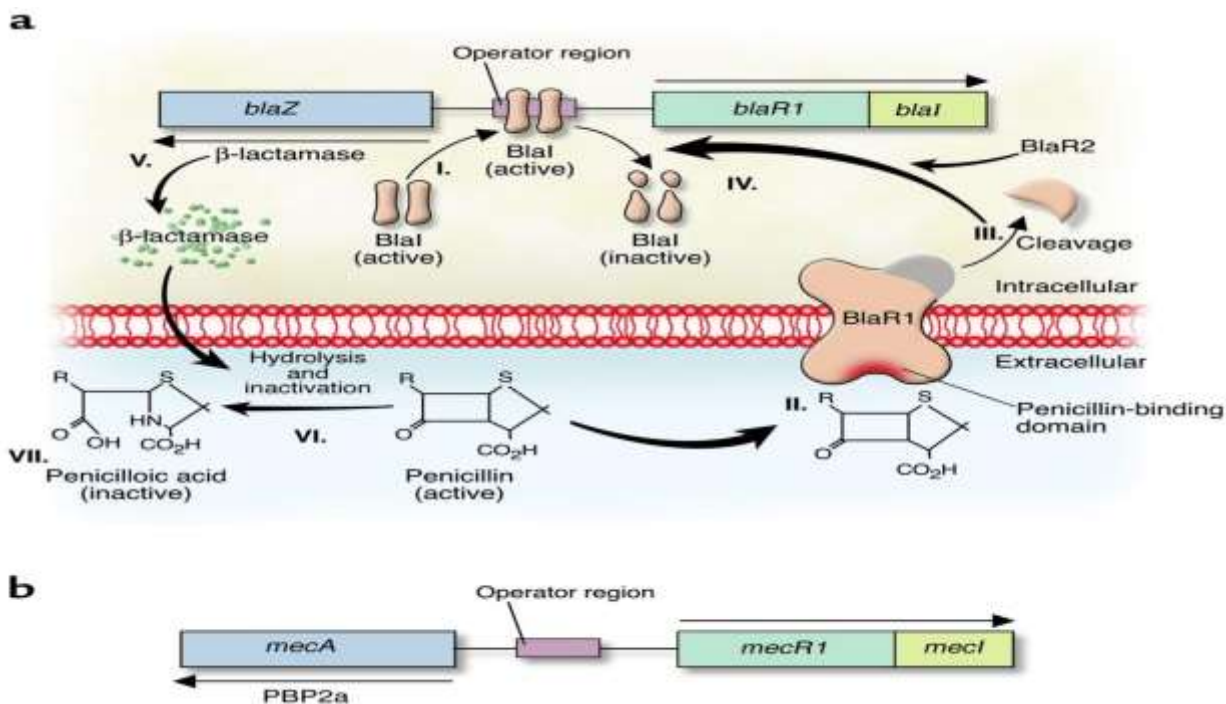
Първоначалният оптимизъм от откритието на антимикробните лечебни средства е разклатен от повишаване на резистентността към множество антибиотици сред такива важни патогенни агенти като *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Mycobacterium tuberculosis*, а през

последните години и при някои енторобктарии като клебсиели, протеуси и др.. Еволюцията на все по-устойчиви на антимикробни средства бактериални видове произтича от множество фактори, които включват широкото и понякога неподходящо използване на антимикробните средства, широкото използване на тези средства като стимулатори на растежа в храната на животните и с увеличаването на регионалните и международните пътувания, относителната лекота с които резистентните бактерии преминават географски бариери (Blanquart F. 2019; Swartz MN. 1997; Schroeder M et al. 2017). Преобладаващата резистентност с клинично значение сред човешките и животинските изолати *S. aureus* е тази срещу антибиотици като пеницилин, метицилин и макролиди - линкозамиди (Karbuz A et al. 2017; Li T et al. 2017; Sarrou S et al. 2018). Пеницилиновите антибиотици са производни на 6-амино-пеницилановата киселина. Те са първите антибиотици въведени в практиката и използвани и до днес. Името на пеницилина произлиза от плесента *Penicillium notatum*, от която е бил изолиран през 1928 година от Александър Fleming. Разработването на пеницилина като лекарство човечеството дължи на Чейн и Флори, които правят възможно приложението на болен за първи път през 1941 година. С масовото производство на пеницилина от 1943 година започва ерата на антибиотиците. Пеницилиновите антибиотици оказват бактерицидно действие върху чувствителните микроорганизми, включително и стафилококи (Jawetz, Melnick, & Adelberg's 2013). Основният тип резистентност към пеницилиновите антибиотици е ензимен. **Бета-лактамазата** е ензимът, който най-често медира резистентността към пеницилиновите антибиотици като хидролизира техния бета-лактам пръстен, присъщ на цялата група бета-лактами и свързан с тяхната биохимична активност, наричан още активен център (Митов И, и съавт. 2015; Jawetz, Melnick, & Adelberg's 2013). Този ензим, кодиран от гени *blaZ*, локализиран на **транспозон**, инактивира бета-лактамазо-чувствителните тясноспектърни: Benzylpenicilin; и широкоспектърни: Ampicillin, Amoxicillin, Carbenicillin, Ticarcillin, Azlocillin, Mezlocillin, Piperacillin, но не действа на цефалоспорините,

затова се нарича и пеницилиназа. Генът за пеницилиназата е част от **елемент, разположен върху голям плазмид, понякога с допълнителни гени за антимикуробна резистентност** (например, гентамицин и еритромицин). Този ензим, се синтезира, когато стафилококите са изложени на бета-лактамните антибиотици, превръщайки бета-лактама в неактивен (**Фигура 14**). Експресията на гена *blaZ* под контрола на два съседни регулаторни гена, ко-репресора *blaR1* и репресорния *blaI* (Kernodle DS et al. 2000). По-нови проучвания показват, че сигналният път, отговорен за синтеза на бета-лактамаза, изисква последователно включване на регулаторните протеини BlaR1 и BlaI. След излагане на бета-лактами, BlaR1, трансмембранен сензор-преобразувател, се разцепва и разцепеният протеин функционира като протеаза, която разцепва репресора BlaI директно или индиректно (допълнителен протеин BlaR2 може да бъде включен в този път) и позволява да започне синтезата на ензима (Zhang HZ et al. 2001;). Разпространението на резистентността към пеницилин се осъществява основно чрез разпространение на резистентни щамове. До края на 60-те години на миналия век повече от 80% от стафилококови изолати, придобити от обществото и в болнични заведения, стават устойчиви на пеницилин, а през следващите години техния процент приближава 90%. Този модел на резистентност, първоначално стартира вътреболнично и след това се разпространява към обществото (Chambers HF. 2001; Karbuz A et al. 2017). Действието на извънклетъчната стафилокова бета-лактамаза се блокира от специфичните инхибитори на тези ензими и комбинациите Amoxicillin+Acidum clavulanicum; Amoxicillin + Sulbactam са устойчиви не ензимното инактивиране, т.е. запазват антимикуробното си действие (Митов И, и съавт. 2015; Jawetz, Melnick, &Adelberg's 2013). Има специфична група тясно-спектърни, бета-лактамазо-резистентни със следните представители: Methicillin, Охасillin, Слорасillin, Диклорасillin, Флуклорасillin, които са създадени специално за въздействие на стафилококи, произвеждащи пеницилинази.

Бета-лактамните антимикуробни средства, за да навлязат в клетката, се свързват със специфични бактериални белтъци от клетъчната ѝ стена, означавани като

пеницилин-свързващи протеини (PBPs). Тези протеини играят роля на транспептидази, създаващи напречните белтъчни мостчета в пептидогликана, съшиващи предварително изградените гликанни вериги от остатъци на N-ацетилмурамова киселина и N-ацетил-глюкозамин. След мутации на тези протеини, в така наречените метицилин-резистентни *S. aureus* (MRSA), поради невъзможност бета-лактамите да се свържат с PBPs) както и да осъществят своето блокиращо действие върху изграждане на напречните съшивки, респ. не успяват да потиснат синтеза на клетъчната стена и стафилококите преживяват, т.е. стават резистентни към групата на най-често използваната група антибиотици, тази на бета-лактамите. Разпространението на MRSA е проблематично за общественото здравеопазване и всички здравни заведения по света (Asante J et al. 2019; Chambers HF. 2001; Mitova Y et al. 2016; Pérez-Montarelo D et al. 2017).



Фигура 14. Механизми на резистентност към бета-лактами при стафилококи. А. Продукция на бета-лактамаза, кодирана от *blaZ* гени; В. Промяна в PBPs, кодирана от *mecA* гени. (Franklin D & J Clin Invest 2003).

Метицилинът, въведен през 1961 г., е първият от полусинтетичните пеницилини, устойчиви на пеницилин. Въвеждането му бързо се наблюдава от

съобщения за метицилин-резистентни изолати. От първото документирано огнище на инфекцията причинено от MRSA през 1968 г. (Barrett FF et al. 1968), постепенно тези резистентни стафилококи се превръщат във все по-важен човешки патогенен агент (Asante J et al. 2019; Diekema DJ et al. 2019; Liang Y et al. 2019; Pekana A & Green E. 2019). Инфекциите, причинени от MRSA са трудни за терапевтично повлияване и в тази връзка смъртността от тях, особено в интензивни отделения е значително по-висока. В допълнение, наличието на гени на вирулентност, които се съдържат **в мобилен генетичен елемент, открит в почти всички щамове на MRSA като ентеротоксините или левкоцидинът PVL** също може да допринесе за тежестта на инфекцията. Катаяма и др. (Katayama Y et al. 2000) демонстрира, че *tecA* е част от геномния остров на вирулентност, обозначен като *SCCtec*. Описани са четири различни *SCCtec* елемента, вариращи по размер от 21 до 67 kb (Hiramatsu K. 2001; Liang Y et al. 2019). За разлика от многобройните различни щамове на метицилин-чувствителния *S.aureus* (MSSA), които причиняват инфекции, се наблюдават само **ограничен брой клонове, отговорни за епидемичното разпространение на MRSA**. Това разграничение отразява генетичните ограничения за хоризонтално пренасяне на свързания с *tec* елемент от стафилококови щамове *S. aureus*. (Franklin D. 2003; Liang Y et al. 2019) **Генът *tecA* е отговорен за синтеза на пеницилин-свързващ протеин PBP2a; 78-kDa протеин.** PBPs са мембранно-ограничени ензими, които катализират реакцията на транспептидиране, която е необходима за кръстосаното свързване на пептидогликанните вериги. Тяхната активност е подобна на тази на серин-протеазите, от които изглежда е еволюирало. PBP2a заместители на другите PBPs и поради ниския афинитет към всички бета-лактамни антибиотици, позволяват да издържат, изложени на високи концентрации на тези агенти. По този начин, **резистентността към метицилин съдържа резистентност към всички бета-лактамни агенти, включително цефалоспорини.** Има проучвания, които определят кристалната структура на разтворимо производно на PBP2a. PBP2a се различава от другите PBP по това, че активното му място блокира свързването на всички бета-

лактами, но позволява реакцията на транспептидацията да продължи (Lim D & Strynadka NC. 2002). Експресията на устойчивост в някои MRSA щамове се регулира от хомолози на регулаторните гени за *blaZ*. Тези гени, *mecI* и *mecR1*, регулират *mecA* отговор на бета-лактамните антибиотици по начин, подобен на този на регулацията на *blaZ* и на гените *blaR1* и *blaI* при излагане на пеницилин. В действителност, ДНК последователностите, свързани от гените на репресора, за да се постигне инхибиране на генната активация са идентични (Archer GL & Bosilevac JM. 2001). Хомоложността на последователността на *mecI-mecR1* с регулаторните гени на *blaR1-blaI* води до индукция на експресията на *mecA* от тази пропусклива алтернативна система. Делециите или мутациите в промотора на *mecA* водят предимно до конститутивна експресия, отколкото от променлива експресия на *mecA* или *mecI* и трябва да функционира във всички MRSA (Rosato AE et al. 2003). *SCCmec* островите могат да съдържат допълнителни гени за антимикуробна резистентност и вмъкване на последователности. Четирите *SCCmec* съдържат две рекомбинази, *CCrA* и *CCrB* от семейството на ензимите, които са отговорни за сайт-специфична интеграция и изрязване от хромозомата *atattBsCC*, част от отворена рамка за четене с неизвестна функция в близост до произхода на репликацията (Katayama Y et al. 2000). Генетичните механизми, отговорни за прехвърлянето на тези големи мобилни елементи, са неясни. Couto et al. идентифицират *mecA* ген в метицилин-чувствителен *Staphylococcus sciuri* с 88% хомоложност на ниво аминокиселина в MRSA. Трансдукция на *S. sciuri mecA* в MSSA, довела до повишена резистентност към метицилин, заедно с откриването на PBP2a в *S. aureus* (Couto I et al. 2003). Тези проучвания предполагат един възможен източник на елемент *mecA S. aureus*. Хирамацу и неговите сътрудници уточняват, че **едновременното откриване на новия тип IV *SCCmec* в различни географски региони в света потенциално отразява неговата засилена мобилност и многократно едновременно предаване между коагулазо-положителни и отрицателни стафилококи** (Hiramatsu K et al. 2002).

Установените рискови фактори за инфекция с MRSA включват доскорошно хоспитализиране или хирургична интервенция, престой за дългосрочно лечение, диализа и вътрешни перкутанны медицински катетри. **Резистентните на метицилин стафилококи могат да образуват силен биофилм** и лесно да колонизират лигавицата, ендоваскуларните катетри и / или импланти, което е една от причините да причинява хронични, рецидивиращи или инвазивни нозокомиални инфекции (Mehrshad S et al. 2016; Paniagua-Contreras GL et al. 2014). Наскоро обаче, случаи на MRSA са документирани и при здрави хора или амбулаторни пациенти, без наличие на установените рискови фактори за заразяване с MRSA. Тъй като тези пациенти са се заразили извънболнично, тези инфекции са определят като придобити в обществото (CA) -MRSA (LeDell KH et al. 2002; Naimi TS et al. 2001). Такива CA-MRSA инфекции са открити в Северна Америка, Европа, Австралия, и Нова Зеландия (Adhikari RP et al. 2002; Karbuz A et al. 2017; Naimi TS et al. 2002; Rudkin JK et al. 2012). Секвенция на гените от изолат на CA-MRSA (Baba T et al. 2002; Takeuchi O et al. 2000), показва не само наличието на нов по-малък вариант на метицилин-резистентен локус (Takeuchi F et al. 2002), но също така и на локуса за левкоцидин на Panton-Valentine (PVL). **PVL локусът се намира на бактериофаг и присъства само в малък процент** от изолатите на *S. aureus* от Франция, където той е свързан с кожни инфекции, а понякога и с тежка некротизираща пневмония (Gillet Y et al. 2002; Lina G et al. 1999).

През изминалото десетилетие предизвикателството към здравеопазването се увеличи с епидемичната вълна от CA-MRSA. Тези щамове са известни като причиняващи тежки инвазивни инфекции, които не са наблюдавани при предишни огнища на резистентност към антибиотици. *S. aureus* е опортюнистичен патоген, способен да причини многообразен спектър от остри и хронични инфекции. Инвазивните инфекции, причинени от MRSA превъзхождат по-честота другите инфекциозни агенти като водеща причина за смърт (Diekema DJ et al. 2019; Klevens RM et al. 2007; Rudkin JK et al. 2012).

4.1. Резистентност към макролиди, линкозамиди, стрептограмини (MLS група).

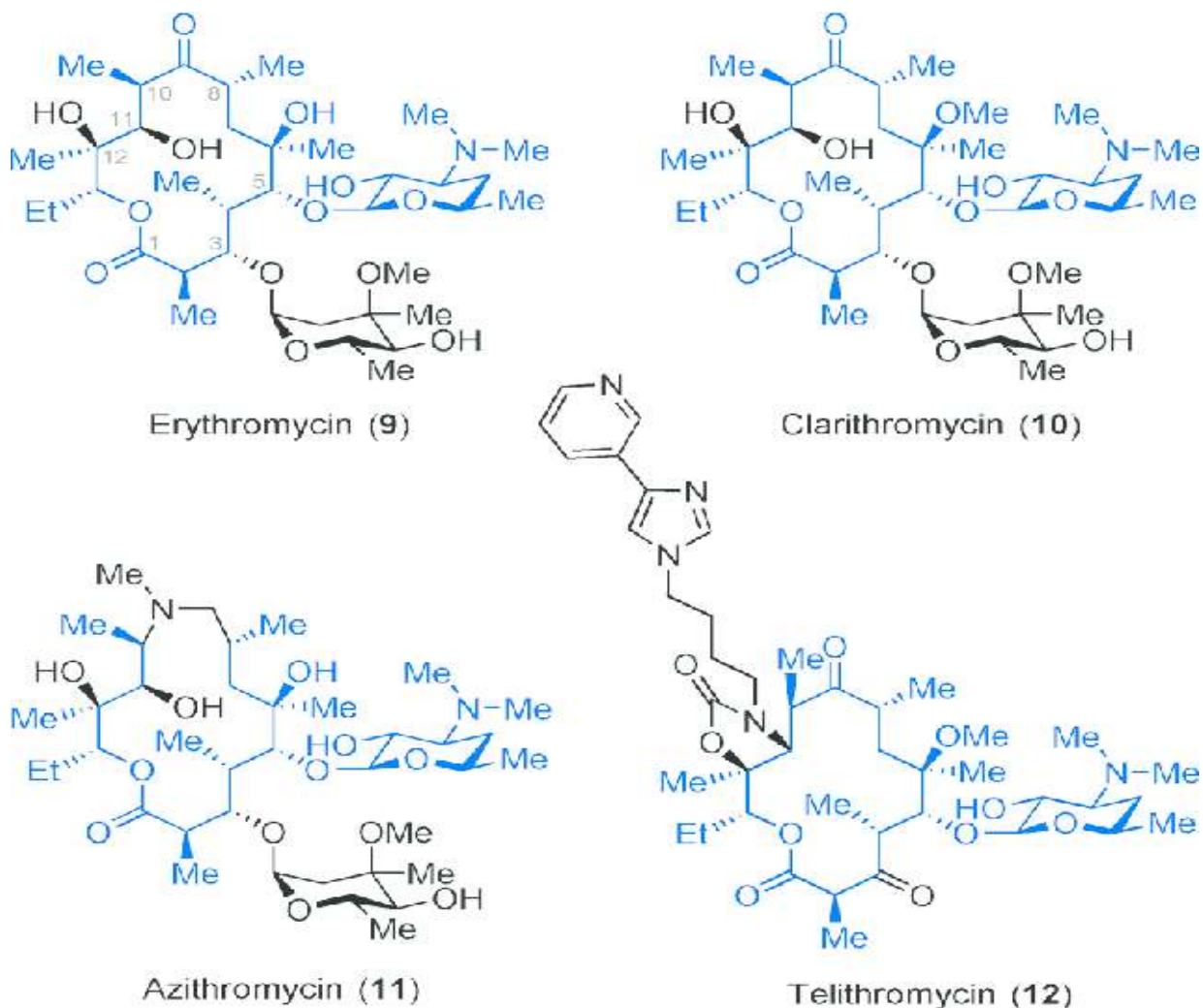
Макролидите са антибиотици на първи алтернативен избор при алергични пациенти и в случаите на слаб терапевтичен отговор към лечението с бета-лактами (Chaix C et al. 1999).

Те са група антимикробни средства с химична структура на макроциклични лактони с многочленен пръстен, съдържащ от 14 до 20 атома, базична аминоксахар и неутрална захар (**Фигура 15**). Основната химична структура на този клас антибиотици е представена от макроцикличен лактонен пръстен. В зависимост от броя на атомите въглерод в пръстена макролидите се подразделят на 14 - членни (Erythromycin, Clarithromycin, Roxithromycin и др.), 15 - членни (Azithromycin) и 16 - членни (Spiramycin, Josamycin, Midecamycin, Rokitamycin и др.). Еритромицинът е с 14-членен лактонен пръстен е първият открит и продължително използван в клиничната практика макролид (Kanoh S & Rubin B. 2010).

Ефект на тяхното действие е спиране на белтъчния синтез в 50S субединицата на бактериалната рибозома. След свързването на макролидния агент с голямата субединица на рибозомата се инхибира тРНК и трансляцията на белтъчния продукт във фазата на елонгация, синтезиран от бактериалната клетка. Тази група антимикробни средства е особено предпочитана в педиатричната практика, поради ниската токсичност, фармакокинетичните и фармакодинамичните предимства на новите представители (Leclercq R. 2002).

Макролидите проявяват бактериостатичен ефект, но при определени условия (високи концентрации и ниска микробна плътност) е възможен и бактерициден ефект. Те проникват с макрофагите в мястото на възпалението, което води до висока концентрация във възпалително огнище, отколкото в серума. Освен антибактериален ефект, макролидите оказват и противовъзпалително и имуномодулиращо действие. Имуномодулиращият ефект провокира активността на неутрофилите и хемотаксиса, опсонизация, фагоцитоза и вътреклетъчно убиване,

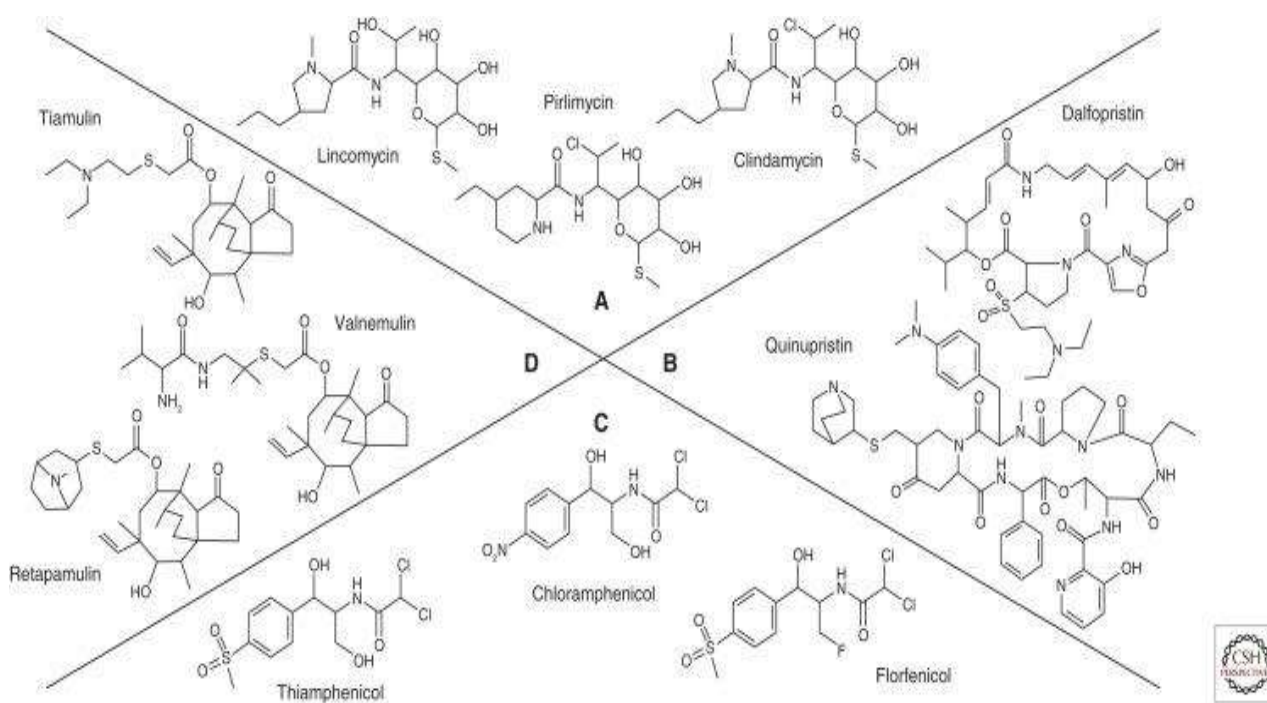
както и продукцията на възпалителни медиатори и цитокини, което липсва при бета-лактамните антибиотици (Sanchez ML et al. 1993).



Фигура 15. Химична структура на макролиди и кетолиди

Макролидите и линкозамидите имат различна химична структура (**Фигури 15 и 16**), но сходен механизъм на действие (**Фигура 17**). Техният спектър на действие включва Грам положителни коки и пръчковидни бактерии, предимно от родовете *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*., Грам-отрицателни коки (*Neisseria spp.*) и интрацелуларни бактерии като *Chlamydia spp.* и *Rickettsia spp.* (Leclercq R. 2002). За разлика от пеницилина, ефикасността на клиндамицина не се

влияе от размера на инокулума и растежната фаза на бактериите във възпалителното огнище (Leclercq R. 2002). Клиндамицинът също така супресира синтеза на токсини и подпомага фагоцитозата на стафилококи и стрептококи и намира приложение в лечението на тежки мекотъканни инфекции (Grundmann H et al. 2002; Leclercq R. 2002).

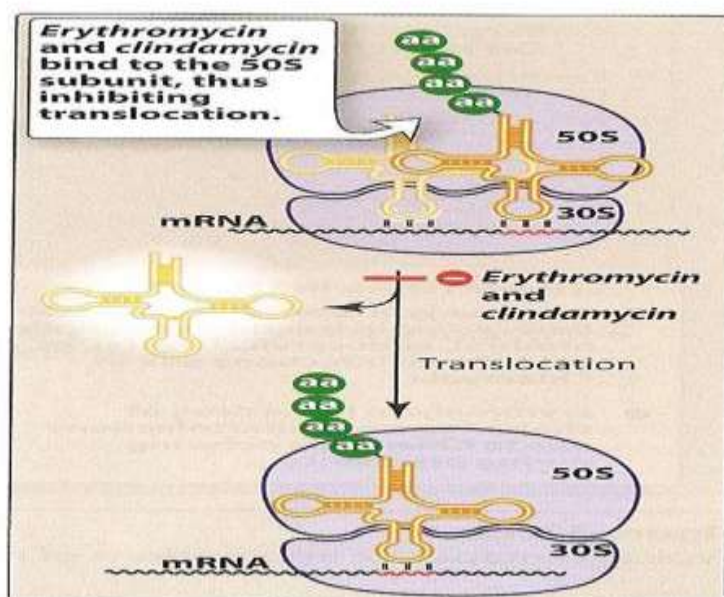


Фигура 16. Химична структура на линкозамиди (Stefan Schwarz et al. 2016).

Два основни механизма водят до резистентност към макролид, линкозамид и стрептограмин В (MLSB) антибиотиците в грам-положителните бактерии (Chancey ST et al. 2015). *S. aureus* притежава и двата главни механизма на макролидна резистентност (**Таблица 2**): **модификация на мишената** за свързване на антибиотика **и ефлуксна система** (Chancey ST et al. 2015; Leclercq R. 1991). По последни данни от 2019г. има 3 различни механизма на резистентност към MLSB: (1) *msr* гена, който кодира активна помпа за ефлукс; (2) гена *Lnu*, който кодира инактивирането на антимикробното лекарство; и (3) промяна на рибозомното място

на свързване (чрез метилиране и / или мутация в рамките на 23s рНК гена), кодирано от *erm* клъстер / гени (*ermA*, *ermB*, *ermC* и *ermF*), сред които *ermA* и *ermC* са основните гени, съответстващи на резистентност към MLSB при стафилококи, която може да бъде конститутивна или индуцируема. Генът *ermA* е разположен на транспозон Tn 554, който има места на вмъкване върху хромозомата на *S. aureus* (Cetin ES et al. 2008). Доказано е наскоро, през 2019, че генът *ermB* се носи от транспозон Tn551, докато генът *ermC* е върху плазмид и се намира на мобилен генетичен елемент от 3.7 kb (Khodabandeh M et al. 2019).

Mechanism of action of macrolide antibiotics



Фигура 17. Механизъм на действие на макролидите

Таблица 2. Основни генотипове и фенотипове за устойчивост на макролиди, линкозамиди и стрептограмини

Механизъм	Клас гени			Фенотип	Фенотип на резистентност ^a			
	Стафилококи	стрептококи	ентерококи		14- и 15-М	16-М	L	S
Рибозомно метилиране	<i>erm(A), erm(C)</i>	<i>erm(A) ermTR</i> субклас ^b		Индуциран MLS _β	R	S ^c	S ^c	S
	<i>erm(B)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>erm(B)</i>	Учредителен MLS _β	R	R	R	S ^d
Активна ефлукс помпа	<i>msr(A), msr(C)</i>	<i>msr(D)</i>	<i>msr(A), msr(C)</i>	MS _β	R	S	S	S ^e
Активна ефлукс помпа	<i>mef(A)</i>	<i>mef(A)/mef(E)</i>	<i>mef(A)</i>	M	R	S	S	S
Ензимна модификация	<i>Lnu(A)</i>	<i>Lnu(B)</i>	<i>Lnu(B)</i>	L LS	S	S	R ^f	S
Рибозомна протекция	<i>Vga (Av) Isa(B), vga-, lsa-</i>			LS _A	S	S	I	SA
Ензимна модификация на фактор А или В ± ефлукс на фактор А	<i>Vat (A), vat(B), vat(C), vga(A), vga(Av), vga(B), vgb(A), vgb(B), mph(C)</i> в комбинации		<i>vat(D), vat(E), vgb(A)</i> в различни комбинации	S или LS ^g	S	S	S или I ^g	R

^a – M, Макролиди; L, Линкозамиди; S, стрептограмини.

^b - отчетена конститутивна резистентност.

^c - риск от селекция на резистентни мутанти.

^d - намалена бактериална активност.

^e - 14 и 15-членни макролиди индуцират резистентност към стрептограмин В.

^f - резистентност към линкомицини чувствителност към клиндамицин.

^g - възможност за резистентност на линкомицин и клиндамицин в присъствието на *vga(A)* and *vga(Av)* гени.

● Модификация на мишената на свързване на антибиотика

Този механизъм зависи от ензима на метилазата (кодиран от *erm* гените), който причинява рибозомни конформационни промени водещи до резистентност на бактериалните щамове на повечето макролидни, линкозамидни и стрептограминни В съединения. Фенотипно, моделът е известен като резистентност на MLSB и експресията му може да бъде конститутивна или индуцируема индуцируема (Leclercq R. 1991; Leclercq R. 2002). При стафилококите, конститутивната експресия на *erm* гените, реп. MLSB резистентност (сMLSB) може да доведе до кръстосана резистентност към всички макролиди, линкозамиди и стрептограмин В (Leclercq R. 2002; Khoshnood S et al. 2019; Schmitz FJ et al. 2000). Щамове с индуцируема резистентност са устойчиви на индуциращите макролиди (притежават 14- и 15-членен пръстен). В противоположност, 16-членно пръстенни макролиди, линкозамиди (например, клиндамицин) и съединенията на стрептограмин В, които не са индуктори, остават активни. Въпреки това, терапията с клиндамицин за индуцируеми фенотипове може да доведе до клиничен провал на лечението (Chancey ST et al. 2015; Rao GG. 2000; Shoji K et al. 2015; Uzun B et al. 2015).

● Ефлуксна система

Вторият механизъм се осъществява с помпа за ефлукс. Стафилококите изглежда имат ефлуксна система, кодирана от *msr(A)* гена и притежават специфичност за молекулите на макролид и тип В стрептограмин, водещи до MS-резистентен фенотип (Eady EA et al. 1993, Ross JL et al. 2000;). Ефлуксна система, транспортни протеини изпомпват 14- и 15-членните макролиди от клетката, но не и 16-членните, т.нар. М-фенотип. Кодират се от *mef(A)* и *msr(D)* – гените (Ross JL et al. 2000). *Mef*-гените са представени от 4 субкласа: *mef(A)*, *mef(E)*, *mef(I)*, *mef(O)*. Вторият ген, отговорен за активен ефлукс на 14С и 15С-членните макролиди от цитоплазмата е *mrsD*. Той се намира непосредствено след *mef*-гена (Khodabandeh M et al. 2019; Sanchez ML et al. 1993).

Набелязват се два подхода в търсенията на причините за увеличението на макролидната резистентност и наблюдаваните резки отклонения в степените за различни периоди от време в различни географски региони. При първия се търси връзка между повишената честота еритромицин - резистентни щамове и повишената консумация на макролиди в популацията. Има данни, че рестрикцията в употребата на макролиди бива последвана от понижение в нивата на резистентност (Olivieri R et al. 2015).

Изследва се и относителният дял на различните фенотипове на резистентност към макролиди, линкозамиди и стрептограмини. Мултицентрови проучвания за продължителен период сочат доминирането на М-фенотип на еритромицинова резистентност с нива 14-35% (Испания. 1996-2007). За същия период М-фенотип на резистентност е характерен и за САЩ, Мексико, Франция, Италия, Руска федерация (Kanoh S & Rubin B. 2010).

Индуцибелният iMLSB и iMLS-D механизъм (*ermTR*-кодиран) преваляра сред изолатите от пациенти с инвазивни стафилококови инфекции, установено в различни части на света (Kanoh S & Rubin B. 2010), фенотипът на резистентност с iMLSB е докладван като най-чест в Япония през 2015г в мултицентрово проучване (Shoji K et al. 2015) докато cMLSB - е по-чест в Корея и Уругвай през последните няколко години (Khodabandeh M et al. 2019; Pardo L et al. 2020).

5. Молекулярна епидемиология

Проучването на епидемиологичната връзка между изолатите и тяхната еволюция се осъществява с помощта на съвременните генетични методи.

Анализът на случайно амплифицираната полиморфна ДНК (**Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD**) е разработена за първи път от Williams et al. (Williams JGK et al. 1990), като алтернатива на друга техника - рестрикционен анализ на генния полиморфизъм в случаен фрагмент (RFLP - Restriction fragment length polymorphism) за създаване на генетични карти. RAPD анализите разчитат на

редица кратки олигонуклеотидни (8-12 bp) произволни праймери, които нямат палиндромни последователности и имат високо съдържание на CG (Semagn K et al. 2006). Има голяма вероятност повечето геноми да съдържат няколко малки обърнати повторения близо един до друг. Когато се амплифицират чрез PCR, късите RAPD праймери се свързват с тези малки обърнати повторения в генома и амплифицират намесващите се ДНК сегменти, създавайки профили на ленти с различна големина, когато се визуализират върху гел. Като техника за генотипиране, RAPD придобива популярност поради няколко фактора: (а) няма нужда от предварителна информация за генетично секвениране, което я прави много полезна при немоделни организми, (б) има ниска цена в сравнение с други молекулярни методи и (в) е сравнително бързо да се определят генетичните разлики между и в рамките на видовете (Maiden CJM et al. 1998).

Multilocus Sequence Typing (MLST) е PCR-базирана техника, която сравнява генните последователности от няколко локуса, въз основа на броя на нуклеотидните разлики на алел на ген. Методът е описан за първи път в проучване на *Neisseria meningitis* (Maiden CJM et al. 1998). Този нов прецизен метод се разработва в лабораториите на Martin Maiden, Dominique Caugant, Ian Feavers, Mark Achtman and Brian Spratt и се разглежда като един от най-важните успехи при молекулярното типичане за последното десетилетие (Birtles A et al 2005; Woers SA et al 2012; Feil E et al 2004). Оттогава техниката успешно се използва за разкриване на генетично разнообразие в прокариотичните популации (Jessika C et al. 2019). MLST се прилага и за изучаване на нарастващо разнообразие от еукариотни организми като метод за типизиране, включително други паразитни организми като *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *Entamoebae histolytica* и *Acanthamoeba spp.* (Gelanew T et al. 2014; Roman F et al. 2018; Kuluev BR et al. 2018).

В това проучване MLST и RAPD бяха приложени за определяне молекулярната епидемиология на разнообразни по произход, резистентност и вирулентност микробни култури *S. aureus*.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд е:

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

За осъществяване на тази цел си поставихме следните задачи:

Задачи:

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

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

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

1. Бактериални изолати и пациенти

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

1.1. Разпределение по възраст на пациентите с изолати *S. aureus*:

- От 0 до 2 год.
- От 3 - 7 год.
- От 8 - 17 год.
- От 18 - 60 год.
- Над 60 год. възраст

1.2. Групи пациенти според пола: мъже и жени

1.3. Групи симптоматични пациенти според клиничната диагноза:

1.3.1. Суперфициални кожни и лигавични инфекции

- Импетиго
- Вулвовагинит

1.3.2. Инвазивни инфекции (засягащи стерилни в норма органи и тъкани)

- Синусит
- Отит - среден супуративен
- Мекотъканни абцеси
- Остеомиелит и гнойни ставни инфекции
- Сепсис
- Пневмония.

2. Микроорганизми

Бяха използвани следните референтни щамове: *S. aureus* ATCC 29213(MSSA), *S. aureus* (MRSA) ATCC43300, *S. aureus* ATCC BAA2312, *S. pneumoniae* ATCC 49619. В експерименталната дейност бяха използвани и голям брой други клинични щамове, изолирани в диагностичната лаборатория към Катедрата по медицинска микробиология МУ София, от които беше екстрахирана ДНК. За доказаване специфичността на праймерите, които бяха използвани за бърза детекция на *S. aureus* директно в проби от хемокултури и пунктати на пациенти бяха включени в реакцията ДНК от следните микроорганизми: Грам-позитивни: *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. bovinum*, *S. sanguis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*; Грам-негативни: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*; и дрождеподобни гъбички: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*

За съхранение след идентификацията, верифицираните щамове бяха замразявани и съхранявани в двойно концентрирано сухо обезмаслено мляко (Skim milk, BBL Germany) с криопротектор при - 70°C. Когато се налагаше да бъдат използвани, замразените или лиофилизирани щамове бяха ресуспендирани в триптиказа-соев бульон, след което трикратно субкултивирани на кръвен агар (КА). След опресняването бяха проучвани биохимичните им свойства и едва тогава бяха използвани в експеримент.

Всички колекционирани щамове бяха изследвани микробиологично, и с разширен набор от фенотипни тестове беше определяна тяхната антимикробна чувствителност, а с молекулярно-генетични методи бяха установени техните гени, кодиращи фактори на вирулентност и на резистентност.

3. Микроскопско изследване

Микроскопското изследване беше извършвано с помощта на рутинна процедура за оцветяване по Грам (модификация по Atkins) с оцветителен набор на

Merck. Първоначално бяха оцветявани по Грам директни натривки за охарактеризиране на храчките, пунктатите, бронхиалните лаважи, хемокултурите, ликворите, както се препоръчва за тези изследвания (Carroll KC. 2002).

4. Изследване на пациентски проби

4.1. Клинични материали

А. Инвазивни

- Пунктат от синуси
- Пунктат от средно ухо
- Бронхоалвеоларен лаваж
- Хемокултура
- Пунктат от мекотъканен абсцес
- Ставен пунктат

Б. Неинвазивни

- Назофаренгиален секрет
- Очен секрет
- Ранев секрет от кожни лезии
- Генитален секрет
- Урина

4.2. Културелно изследване

Първоначалните микробиологичните посявки бяха направени на Колумбия агар с 5% овнешка кръв (Becton Dickinson). За евентуално съпътстващата микрофлора материалите от респираторен тракт бяха посявани и на шоколадов агар (Oxoid, UK) за хемофили от респираторен тракт, на Мак Конки (Oxoid, UK) за невзискателни Грам-отрицателни и на хром агар за патогенни гъбички (Becton Dickinson). Пробите бяха култивирани едно денонощие при 36°C, с 5-10% CO₂. Първоначално suspectните за *S. aureus* бяха идентифицирани по рутинни критерии

като, положителна каталазна реакция, кълмпинг фактор положителен и положителни плазмо-коагулазни тестове (Заешка плазма, Hi Media, India). За по-детайлно изследване бяха използвани идентификационни тестове Crystal GP (Becton Dickinson) или RapID STAPH System (Remel, BiotechLtd, UK).

Диагностиката и идентификацията директно в клинични материали с помощта на молекулярно-генетични методи е описана в съответния раздел за тези техники.

5. Определене на антимикробна чувствителност с фенотипни методи

Антимикробната активност на различни вещества от всички важни групи антибактериални средства, подходящи за лечение на стафилококови инфекции беше определяна с помощта на дифузионно-дисквия метод (ДДМ) на Бауер-Кърби и за по-прецизни резултати с минимални инхибиращи концентрации (MIC). За тази цел беше използван предимно ЕпсилOMETричен тест, известен още като Е-тест (получен от Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India), и бульонно разреждане в плака - другият метод, който понастоящем е приет за тестване на чувствителност, използвайки Microtatest MIC (ErbaLachema, Brno, Czech Republic) според указанията на EUCAST (<http://www.eucaSt.org>). За отчитането на зоните на задръжка се използваха препоръките на EUCAST версия 7.1/2017 за 2017г за отчитане на чувствителността при по-старите изолати от 2016 - 2017г., а за следващите респ. версии 8.1/2017 за 2018г, 9.1/2017 за 2019г и 10.1 за 2020г.

Качественият контрол на тестовете за чувствителност е извършван с *Staphylococcus aureus* - ATCC29213.

5.1. Определяне чувствителността чрез стандартизиран дисково-дифузионен метод на Бауер-Кърби на Мюлер-Хинтон агар

Изготвяна беше антибиограма с мътна на бактериалния инокулум 0.5 по Мак Фарланд (1.5×10^6 CFU /ml), който се посяваше върху Мюлер-Хинтон агар с 4 mm дебелина на слоя. Посявката на стандартизирания инокулум от чиста 24 часова микробна култура *S.aureus* беше извършвана с памучен тампон, за всяко петри – с различен тампон, с трикратно завъртане на петрито на 60°C. След плътно покриване на петрито с иноколума бяха поставяни дисковете, импрегнирани с антибиотици в точно определена концентрация. Петритата с антибиограми бяха култивирани 18 часа при 36°C, с 5% CO₂. Диаметрите на зоните на задръжка са измервани при отворен капак на петрито и отразена светлина (EUCAST).

За изпитване на чувствителността към пеницилин и аминокпеницилини без инхибитор е използван диск, натоварен с бензилпеницилин 1 unit. След инкубирането са отчитани резултатите за зоната на задръжка на бактериалния растеж според изискванията на EUCAST, където граничната стойност на диаметъра е 26 mm, т.е. над тази стойност са чувствителни и с диаметър по-малък от посочения са пеницилин и ампицилин нечувствителни. Метицилиновата чувствителност беше определяна с диск цефокситин (30 µg), резултата към който се интерпретира и като чувствителност към оксацилин и метицилин според използваната версия на EUCAST.

За другите антибиотици, които бяха тествани са използвани дискове със следните концентрации: гентамицин (10 µg), еритромицин (15 µg), клиндамицин (2 µg), тетрациклин (30 µg), хлорамфеникол (30 µg), триметоприм/ сулфаметоксазол (1,25/ 23,75 µg), левофлоксацин (5 µg), линезолид (10 µg), тигециклин (15 µg) и само чрез MIC се определя чувствителността към ванкомицин, отново според указанията на EUCAST за конкретната година. Някои от антимикробните средства са изследвани допълнително повторно с MIC за по-прецизни или уточняващи резултати.

За определяне на MLSB фенотипът на щамовете е използвана комбинация от антибиотичните дискове еритромицин (15µg) и клиндамицин (2µg), поставени на разстояние 12-16mm от ръб до ръб. Интерпретацията на резултатите за MLSB фенотип беше направена отново според изискванията, които не са променени през последните 5 години, според EUCAST 2017 - 2020. Интерпретацията на фенотиповете е отразена в Таблица 3.

Таблица 3. Интерпертация на възможни MLSB фенотипни варианти при *S.aureus*

Фенотипнамакролидна резистентност	Описание
iMSLB - индуцибелен тип	Наличие на антагонизъм между клиндамицин и еритромицин, при най-чест R на еритромицин и S на клиндамицин (т.нар D-фенотип, отсечена D-зона)
sMSLB - конститутивен тип	Липса на зона на задръжка около еритромицин и клиндамицин (R към еритромицин и R към клиндамицин)
MS – фенотип	R на еритромицин, S на клиндамицин (без отсечена D-зона)

5.2. Определяне на Минимални инхибираща концентрации (MIC)

5.2.1. Методът на E-test

Методът на E-test беше извършен в в петриева паничка с разлят агар на Мюлер-Хинтон без кръв. Бактериалният инокулум беше подготвен от 24 часова микробна култура *S. aureus*, стандартизирана до 0.5 MacFarland оптичен стандарт. Посявката на стандартизирания инокулум беше извършвана с с различен памучен тампон за всяко петри. След плътно покриване на агара в петрито с иноколума, беше поставяна лентичката, фабрично напоена в градиент с изпитваното антимикробно вещество, т.нар. E-teSt. При този тест използваните стрипове съдържат точно определени, експоненциално нарастващи концентрации на

изпитвания антибактериален препарат, които съответстват на определени МИС. Обикновено на петри бяха поставяни по две лентички. След инкубация при 36°C за 24 часа бяха отчитани МИС, изразяващи се в стерилни елипсовидни зони на инхибиране на растежа около лентичките като нивото, на което свършваше стерилното петно се приемаше за МИС, изразена в mg/L.

6. Молекулярно-генетични техники

Принципът на реакцията се състои в намножаването (амплифициране) на фрагмент двойноверижна ДНК, който съдържа търсената нуклеотидна последователност и служи за Матрица. Двойно-верижната ДНК се денатурира термично и освобождаващите се единични вериги се хибридизират с два къси олигонуклеотида с точно определена последователност, които са стартери (праймери) на синтезата на ДНК и маркират търсената последователност.

6.1. Изолиране на бактериална ДНК

ДНК екстрактите са извлечени по химичен начин от чиста микробна култура *S. aureus* или от пациентска проба, суспектна за инфекция с този микроорганизъм. За целта е използван DNAsorb-AM nucleic acid extraction kit (AmpliSensp, Русия) като екстракцията е осъществена според протокола и указанията на производителя. Получените ДНК екстракти са съхранени при -70°C и са използвани при моно- и мултиплекс PCR с детекция в гел.

6.2. Полимеразо-верижна реакция (PCR)

От всеки стартер протича удължаване на новосъздадената верига чрез една ДНК-полимераза. От 1988г. е въведена в техниката на PCR ДНК- полимеразата на *Thermus aquaticus* (Tag-полимераза). Многократно повтаряне на етапите на денатуриране, хибридизиране и ДНК-синтез, чрез цикъл на термичен режим, води до почти експоненциално размножаване на последователността на ДНК. С

помощта на подходяща двойка праймери може да се определи наличието на търсена последователност в проба от минимални количества генетичен материал.

Методът се използва за откриване на различни важни етиологични агенти с цел да се ускори и улесни диагностиката и идентификацията директно в клинични материали. Освен с тази цел все по-често се прилага и за установяване на гените на вирулентност и антибиотична резистентност, както и като начална стъпка от протокола при други техники, например при MLST и секвениране на гени.

Конвенционалният PCR беше използван при анализите на факторите на вирулентност и резистентност от екстрахирана ДНК от чисти микробни стафилококови култури според протокола за всеки конкретен случай. Бяха използвани готови миксове (Multiplex PCR 5X Master Mix - M0284 S, New England Biolabs) от полимераза нуклеотиди, йони, буфер. Към микса бяха добавяни съответните праймери и ДНК-пробите. Реакционната смес се приготвяше в краен обем 25 µl по следния алгоритъм и според изискванията, в ламинарен бокс:

- Подреждане и надписване на съответния брой епруветки от 200 µl за PCR реакции според подготвените проби за генетичен анализ.
- Разпределяне на приготвения Master Mix за реакцията равномерно x 10 µl във всички епруветки.
- Добавяне на смес от праймери, съдържаща 2 µl от всеки един в зависимост от вида на моноплекси или мултиплекс, според вида и броя на търсените гени, умножени по броя на анализиранияте проби. Предварително праймерите от 100 pmol бяха разреждани десетократно и в реакцията се използваха тези разреждени разтвори.
- Финално добавяне по 2 µl от изолираната микробна ДНК.
- Преди поставяне в апарат за амплификация, пробите бяха центрофугирани за 10 сек за да се смесят всички реагенти и тогава стартираше процедурата.

6.3. Конвенционален мултиплекс PCR за директно откриване на *S. aureus* и метицилинова резистентност в клинични проби: хемокултури и пунктати

ДНК екстрактите бяха получени директно от проби на пациента - позитивирали в апарата хемокултури ВАСТЕС (Becton Dickinson) или пунктати от абсцеси, след микроскопското изследване, доказващо наличие на Грам-позитивни коки в клъстери в хемокултурата, респ. пунктата. Генетичното изследване беше извършвано паралелно с посяването на твърди хранителни среди за едновременно рутинно микробиологично изследване изследване за всички проби. Изолиране и идентифициране на чистата култура Грам-положителни коки с гроздоподобно клъстерно подреждане бяха направени по рутинни критерии. Използвахме Crystal GP (BBL, Германия) за по-подробна биохимична видова идентификация. Анализът за антимикробната чувствителност е извършен с помощта на дифузионно-дискския метод на Кърби-Бауер.

За екстракция на ДНК е използван търговски кит DNAsorb-AM nucleic acid extraction kit (AmpliSensp, Русия) и са спазвани указанията в него. Обемът от хемокултурата или пунктата беше първоначално 500µl, който след центрофугиране в стерилна епендорфка беше намален до 100 µl, след отделяне на над-утаечната течност.

Секвенициите на праймерите *Sau327*, *Sau 1645* за видово специфичния ген за *S. aureus* и този за метицилинова резистентност *mecA*, са следните:

Sau327- 5'-GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA-3', *Sau 1645*- 5'-CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT-3'; *mecA*-F 5'-TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G-3' и R 5'-CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG-3'. Те бяха проверени за специфичност чрез програмата Basic Local Alignment Search Tool в базата данни на NCBI (Bethesda, MD) ([HTTP //: www.ncbi.nlm.nih. GOV / BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). За положителна контрола беше използвана геномна ДНК от щам *S. aureus* ATCC 25293 (MSSA) и ATCC 43300 (MRSA).

ДНК се амплифицираше след оптимизиране на протокола с полимеразната верижна реакция PCR: Първоначална денатурация при 94°C за 5 мин. и 35 цикъла на денатуриране при 94°C за 2 мин; Хибридизация при 57°C за 2 мин.; Удължаване при 72°C за 1 мин.; Крайно удължаване при 72°C в продължение на 7 мин.

Продуктите на PCR бяха идентифицирани въз основа на техния очакван размер на фрагмента (*Sau* – 1318 bp и *mecA* - 162 bp) представен на **Таблица 4**. За положителна контрола беше използвана и ДНК от щам *S. aureus* ATCC29213. За доказване на специфичността на праймерите и респ. като отрицателни контроли в двата варианта на PCR бяха използвани геномни ДНК, изолирани от чисти бактериални култури на микроорганизмите, описани по-горе - от 9 вида Грам-позитивни, от 5 Грам-негативни и 2 вида кандиди, които също бяха изолирани от хемокултури.

Таблица 4. Изполвани праймери за доказване на *S. aureus* и метицилинова резистентност с PCR директно в пациентска проба

Гени	Праймер (F* 5`→3`)	Ампликон
	Праймер (R** 5`→3`)	
<i>Sau</i> 327	GGACGACATTAGACGAATCA	1318 bp
<i>Sau</i> 1645	CGGGCACCTATTTTCTATCT	
<i>mecA</i> F	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162 bp
<i>mecA</i> R	CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG	

* F – Forward

** R – Reverse

6.4. Конвенционален мултиплекс PCR за откриване на гени на вирулентност при *S. aureus*

За откриване на гените за вирулентност при *S. aureus* щамовете бяха разделени на 2 групи: инвазивни и неинвазивни, според мястото и начина на тяхното изолиране. Първата група включваше изолати от суперфициални мукозни инфекции като инфекция на лигавицата или кожата:

назални/назофарингеални секрети, кожни лезии (импетиго, фурункулоза), проби от уро-гениталния тракт, секрети на очите. Втората група се състоеше от шамове, изолирани от: хемокултура, пунктати от средно ухо, пунктати от синуси, раневи секрети от дълбоки мекотъканни абцеси.

За откриване на гените за вирулентност бяха разработени варианти на мултиплекс PCR за следните групи фактори: *hlg* - за γ -хемолизин, *sna* - за колаген-свързващ протеин, *tst* - токсичен шок синдром токсин-1, гени за ентеротоксините A-J: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *she*, *sei*, *sej*. Всички тези гени бяха разделени в 4 отделни микса, като всяка смес беше използвана за мултиплекс PCR, представен на **Таблица 5**. Допълнително с микс 5 и 6 бяха търсени гени за метицилинова резистентност, за да се анализира разпространението на факторите при двете групи стафилококи MSSA и MRSA. Всеки праймер е проверяван за специфичност в BasicLocalAlignmentSearchTool (BLAST) в NCBI data base (Bethesda MD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) Всички използвани праймери в този и следващия раздел за доказване на гени на вирулентност и резистентност са от публикувани статии (**Таблицы 5 и 6**) и са синтезирани от Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK или Alpha DNA, USA или Metabion, Germany. Амплификацията е провеждана в реакционна смес с общ обем 25 μ l, съдържаща 12.5 μ l готов Tag-микс за мултиплекс реакции (Multiplex PCR 5X Master Mix - M0284 S, New England Biolabs), по 1 μ l от всеки използван праймер, 2 μ l ДНК екстракт и двойно дестилирана H₂O до 25 μ l. Количеството на използваната ddH₂O варираше при различните комбинации, поради различния брой на използваните праймери във всеки микс. Анализирането на резултатите, получени след амплификацията се извършва с хоризонтална електрофореза. Приготвен е 2 % агарозен гел. Използваната агароза е Sea Kem LE Agarose, Lonza, USA, 2 g от нея се прибавяни към 100 ml 10x TAE буфер (Tris/Борова киселина/0.5MEDTA) и е разтопявана до пълна прозрачност в микровълнова печка. Към разтопената агароза са добавяни 10 μ l - 1% разтвор на интеркалиращ агент-етидиев бромид. След изливане във формата са изчаквани 20-30 мин. за полимеризация. В ямките на гела

се накапвани по 10 μ l PCR продукт и 2 μ l Loading buffer предварително смесени. Използван е маркер Маркер (DNA Quick load Ladder 100 - 1500bp, New England Biolabs) за доказване на молекулно тегло на PCR сегментите. От него са накапвани по 10 μ l. Електрофорезата се провеждаше за 50 до 90 минути при 400 mA и 120V. Амплификационните продукти бяха визуализирани на UV-лъчев транслюминатор с дължина вълната 312 nm TFX-35M (Vilber Lourmat, France).

Таблица 5. Миксове и използвани праймери при доказване гените за вирулентност на *S. aureus*.

Гени за вирулентност	Праймери (5'→3')	Т °С хибризация	Размер на ампликона (bp)
Програма 1и микс 1 S.au 327 S.au 1645	GGACGACATTAGACGAATCACGGGCACCTATTTTCTATCT GGACGACATTAGACGAATCA CGGGCACCTATTTTCTATCT	63°C 30 sec	1318 440
Програма 2 и микс 2 Hlg Sea Sed Tst	GCCAATCCGTTATTAGAAAATGCCCATAGACGTAGCAACGGAT ATGGTTATCAATGTGCGGGTG TGAATACTGTCCTTGAGCACCA CTGAATTAAGTACCGCGCT TCCTTTTGCAAATAGCGCCTTG GTTGCTTGCGACAACCTGCTACAGTCAAGCTGATGCTGCCATCTGTG	54°C 40 sec	937 344 451 209
Програма 3 и микс 3 Seh See Sej	CAATCACATCATATGCGAAAGCAGCATCTACCCAAACATTAGCACC AGGTTTTTTCACAGGTCATCC CTTTTTTTCTTCGGTCAATC CATCAGAACTGTTGTTCCGCTAG CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	55°C 35 sec	376 209 577
Програма 4 и микс 4 Cna Seb Sec Sei	AGTGGTTACTAATACTG CAGGATAGATTGGTTTA TGGTATGACATGATGCCTGCAC AGGTA CTCTATAAGTGCCTGCCT GATGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCAGATTGGTCAAACCTTATCGCCTGG CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG AAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC	55°C 40 sec	744 196 399 577

Таблица 6. Използвани секвенции на праймери за доказване на гени, свързани с резистентността

Гени	Секвенции (5'–3')	Ампликон (bp)	Т °С хибридизация	Книгопис
<i>ermA</i>	F:TAT CTT ATC GTT GAG AAG GGA TT R: CTA CAC TTG GCT TAG GAT GAA A	139	54°C	Pekana A & Green E. 2018
<i>ermB</i>	F: CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATT' R: GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA	142	54°C	Pekana A & Green E. 2018
<i>ermC</i>	F: CTT GTT GAT CAC GAT AAT TTC C R: ATC TTT TAG CAA ACC CGT ATT C	190	54°C	Pekana A & Green E. 2018
<i>msrA</i>	F: TCC AAT CAT TGC ACA AAA TC R. AAT TCC CTC TAT TTG GTG GT	163	50°C	Pekana A & Green E. 2018
<i>blaZ</i>	F - ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC R -TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	173	54°C	Pekana A & Green E. 2018
<i>mecA</i>	F - TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G R - CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG	162	57°C	Chen X at al. 2017
<i>mecC</i>	F - TGTTGTAGCAATGTTACAC R - CAAGCACTTAATATCAACGC	138	59 °C	Monecke S, et al. 2013

Таблица 7. Температурни условия за провеждане на мултиплекс PCR за детекция на гени: *mef(A)*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm (C)*, *msr (A)*, *blaZ*

Етап	Температура	Време
Първоначална денатурация	95°C	4min
Денатурация	95°C	30s
Хибридизация	60°C	40s
Елонгация	72°C	90s
Финална елонгация	72°C	7min
Крайна фаза	4°C	∞

7. Епидемиологично типизиране

Проучването на молекулярната епидемиология на различни по произход, резистентност и вирулентност изолати *S. aureus* беше осъществена с помощта на съвременните генетични методи като RAPD-PCR, MLST и ДНК секвениране

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

7.1.1 RAPD - (случайна амплификация на полиморфна ДНК) е методът използващ големи фрагменти геномна ДНК и произволни къси праймери с около 10bp за получаване на полморфни бендове. Важен е изборът на праймер, за да се визуализират максимум бендове в профила на изследвания щам. Различните праймери показват различни възможности, защото свързват комплементарни на тях секвенции в изследвания геном (van Belkum A et al. 2017).

За да се избере правилния праймер бяха сравнени резултатите от 6 предварително подбрани праймера (S - TCACGATGCA; C - AGGGAACGAG; S224

- CCCCTCACGA; S232 - ACCCCCCACT; AP4: 5'-tcacgctgca-3'; P2: 5'-ATGTAACGCC-3') и С - AGGGAACGAG (Yoon JM. 2013; Yoon JM. 2018), който дава най-много и най-отчетливи бендове беше използван в по-следващите реакции. При използване на тотална ДНК се получава богата информация за генома на изпитвания геном.

Изолирането на ДНК от щамовете *S. aureus* беше осъществено с помощта на търговски кит DNAsorb-AM nucleic acid extraction kit (AmpliSens). RAPD-PCR реакциите бяха осъществени в обем от 20 µl в буферна система с KCl, при крайни концентрации на MgCl₂ 2 mM, на четирите dNTPs, съотв. по 0.2 mM от всяко (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), и на С праймера (5-AGGGAACGAG-3') 0.2 mM (Yoon JM. 2018), с общо количество на ДНК около 40 ng и 0.5 U Jumpstart™ Taq-полимераза (Sigma-Aldrich). След първоначалната стъпка на денатуриране за 5 мин. при 94 °C последваха 4 цикъла на денатуриране при 94 °C за 45 сек., хибридизация при 30 °C за 2 мин. и синтез при 72 °C за 30 сек.; 10 цикъла на денатуриране при 94 °C за 5 сек., хибридизация при 36 °C за 30 сек. и синтез при 72 °C за 30 сек.; 10 цикъла на денатуриране при 94 °C за 5 сек., хибридизация при 36 °C за 30 сек. и синтез при 72 °C за 40 сек.; 10 цикъла на денатуриране при 94 °C за 5 сек., хибридизация при 36 °C за 30 сек. и синтез при 72 °C за 50 сек. и 10 цикъла на денатуриране при 94 °C за 5 сек., хибридизация при 36 °C за 30 сек. и синтез при 72 °C за 60 сек. Финалната стъпка включваше досинтезиране при 72 °C за 10 мин. По 8 µl от получените продукти биваха нанасяни на 1,2% агарозен гел, с включен етидиев бромид. След приключването на електрофорезата геловете биваха фотографирани под UV светлина (Dimov SG et al. 2015/2016).

7.1.2. Обработка и графично представяне на резултатите от RAPD-PCR

UPGMA методът (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Soka. 1973), беше използван за определяне на филогенетичното родство между проучените клинични изолати *S. aureus* и за построяване на филогенетични

дървета. Групирането на шамовете се основаваше на пресмятането на т. нар. матрица на сходство и намирането на двойката от оперативни таксономични единици (operational taxonomic units, OTUs), която имаше най-голямо сходство. След това те се третираха като една нова OTU. Процесът се повтаряше, докато всички OTUs са подредени и се получаваше дендрограма.

За построяване на дендрограмите беше използван специализиран софтуер “GeneTools™” 4.01 (Syngene, UK).

7.2. Мултилокусно секвениране, MLST (multilocus sequence typing)

Чрез този метод - MLST (Multi Locus Sequence Typing) се позволява диференциране на изолатите на молекулярно ниво, които с конвенционалните методи като тестовете за чувствителност към антибиотици и серотипиране не могат да бъдат ясно разграничени. Принцип: MLST е метод, при който чрез ДНК секвениране на седем постоянно присъстващи гени (“house-keeping”) при *S. aureus* се определят отделните седем алела, което сигурява данни за проследяване на еволюционната биология на вида. Специфичната комбинация на алелите на локусите определят секвенционния тип (ST). Техника: Беше изолирана ДНК на проучваните изолати по описаният по горе начин. Амплифицирани бяха чрез стандартна PCR реакция седемте постоянно присъстващи гена, които заедно с праймерите са показани на **Таблица 8**.

Таблица 8. Седемте консервативни гени и използваните праймери за **MLST** и при нуклеотидното секвениране

Гени	Праймери (5' → 3')	Ампли кон
<i>Arc-up</i> <i>Arc-dn</i> (Глюкозо- киназа)	5' TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC -3' 5' AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG -3'	570
<i>Aro-up</i> <i>Aro-dn</i> (Дехидрогеназа)	5' ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC -3' 5' GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC -3'	536
<i>Glp-up</i> <i>Glp-dn</i> (Глицеролакиназа)	5' CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C -3' 5' TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC -3'	543
<i>Gmk-up</i> <i>Gmk-dn</i> (Гуанилат киназа)	5' ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC -3' 5' TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA -3'	488
<i>Pta-up</i> <i>Pta-dn</i> (Фосфатнаацетилтрансфераза)	5' GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG -3' 5' GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA -3'	575
<i>Tri-up</i> <i>Tri-dn</i> (Триосефосфатнаизомераза)	5' TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA -3' 5' TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC -3'	475
<i>Yqi-up</i> <i>Yqi-dn</i> (АцетилКОАацетилтрансфераза)	5' CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC -3' 5' CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC -3'	598

Чрез ДНК секвениране (и в двете посоки) на получените ампликони се установява точният алел в сайта за MLST на *S. aureus*. Комбинацията от седемте алела дава точния секвенционен тип се намират в сайта на Pubmed на сл. електронен адрес: <https://pubmlSt.org/saureus/info/primers.shtml>

Реакционната смес и условията за провеждане на MLST - PCR за 7-те консервативни локуса при *S.aureus* са показани в следващите **Таблицы 9 и 10.**

Отчитането на резултатите от амплификацията е след гел-електрофореза с 2% агарозен гел за 40 min, при 120 mV. Използван е маркер за молекулно тегло PCR Sizer 100 - 1000 bp DNA Ladder (BioLabs, NewEngland, САЩ).

В главната реакционна смес са прибавяни всички реагенти, а след това праймерите и геномната ДНК от проучваните щамове (**Таблица 9**).

Таблица 9. Реакционна смес за MLST

Компонент	Количество
Таг-микс	12,5µl
дН₂О	8,5µl
ПраймерF	1µl
ПраймерR	1 µl
ДНК екстракт	2µl
Краен обем	25µl

Таблица 10. Температурни условия за провеждане на PCR за мултилокусно секвениране (MLST).

Етап	Температура	
	Време	
Първоначална	95°C	
Денатурация	5min	
Денатурация	95°C	
	45s	
Хибридизация	54°C	
	45s	
Елонгация	72°C	
	45s	
Финална елонгация	72°C	
	5min	
Крайна фаза	4°C	∞

Гените бяха амплифицирани по описания вече начин за изпълнение на полимеразо-верижна реакция. Използваните праймери за амплификация са представени в **Таблица 8**. Пречистване на PCR продукта с цел последващо секвениране по Sanger бе извършено чрез Rapid PCR Cleanup Enzyme Set (ExoSAP, Applied Biosystems, USA) и секвениран по Sanger: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer, на секвенатор модел: Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer.

За определяне принадлежността към секвенционни типове и клонове на български клинично значими изолати MRSA се извърши епидемиологично типизиране с нуклеотидно секвениране на доказан ген и неговото мултилокусно секвениране (MLST). Резултатите, получени от различните методи RAPD, MLST и ДНК секвениране при *S. aureus* бяха сравнявани, обработени статистически и анализирани.

8. Статистически анализ и интерпретиране на резултатите

За да се увеличи познавателната стойност и достоверността на резултатите, беше използван алтернативен и дисперсионен статистически анализ при обработка на получените резултати (Величкова Н & Павлова В. 2006; Сепетлиев Д. 1976).

Самият анализ беше извършен с подходящи статистически показатели, изразени в проценти.

С помощта на този анализ бяха изчислени показателите за относителен дял, с цел да се докаже доколко наблюдаваната разлика е била в резултат на случайни фактори или е била породена от съществуваща закономерност. При репрезентативните проучвания се наблюдават само част от случаите, а получените резултати се обобщават за всички, в т.ч. и за ненаблюдаваните случаи. При това обобщение се допуска т.нар. репрезентативна грешка (Δ).

$$\Delta = t \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

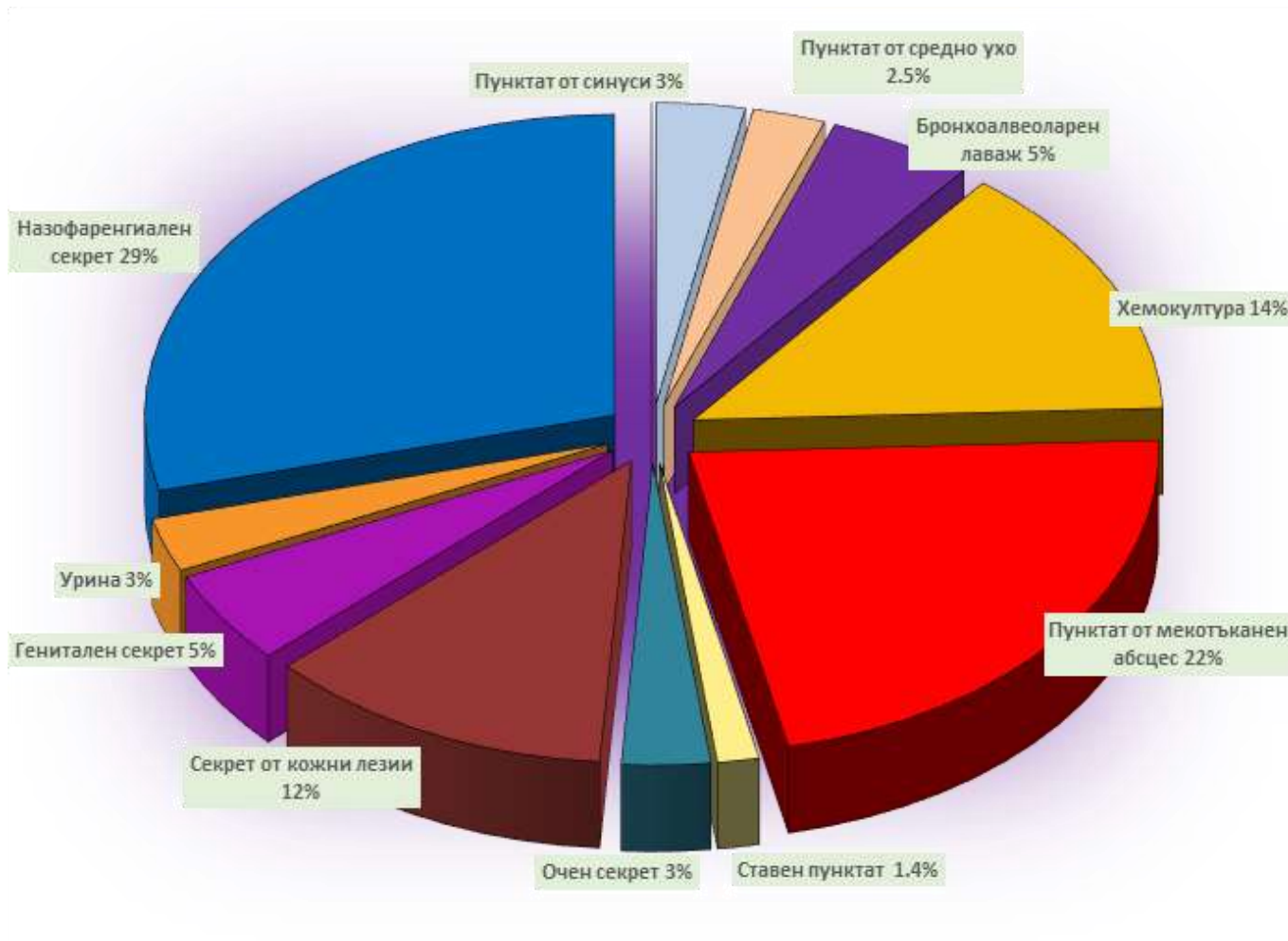
където t е коефициент, свързан с гаранционната достоверност, която подsigурява изследователя срещу допускане на погрешна преценка относно величината Δ , n е броят наблюдавани случаи, p е намереният процент, а q - допълващият процент до 100. Статистически значимите разлики бяха оценени с chi-square тест или теста на Fisher и бяха анализирани с помощта на точен тест на FisherQuickcal (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>). Разликата се счита за статистически значима при $p < 0,05$.

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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

В проучването са включени 558 изолата *S. aureus*, изолирани през 5 годишен период 2016-2020 г. от инвазивни и неинвазивни инфекции. Идентификацията беше направена най-напред чрез рутинни критерии за определяне на чиста култура от Грам-положителни коки с гроздоподобно кълъстерно подреждане и културални свойства: кремаво-златист пигмент, по-често налична бета-хемолиза, позитивни за тест на каталаза, кълмпинг-фактор и плазмокоагулаза, характерни за вида *S. aureus*. Използван е Crystal GP (BBL, Германия) за по-подробна биохимична видова идентификация, когато е наложително при изолати от хемокултури, пунктати и други инвазивни материали. Първата група изолати от стерилни в норма ниши са от: хемокултури - (n=73; 13%), пунктати от мекотъканни абсцеси (n=128; 23%), бронхоалвеоларни лаважи (28; 5%), пунктати от синуси (n=17; 3%), пунктати от средно ухо (n=14; 2,5%), ставни пунктати (n=8; 1,5%); неинвазивните изолати от кожни и лигавични области са от: назофаренгиални секрети (n=162; 29%), кожни лезии (n=67; 12%), очни (n=17; 3%), генитални секрети (n=28; 5%), урини (n=17; 3%). Разпределението според източника на изолата е представено на **Фигура 18**.

Болните, чиито данни са използвани в епидемиологичното проучване бяха разделени в различни групи според критериите: възраст, пол и клинични диагнози. Разпределението на пациентите с изолати *S. aureus* по пол беше приблизително по равно с леко преобладаване на мъжкия пол в 54%, представено във **Фигура 19**. Има единични нови експериментални данни, че женския пол е по-устойчив на стафилококви инфекции, което до известна степен може да обясни и нашия резултат (Castleman MJ et al. 2017).

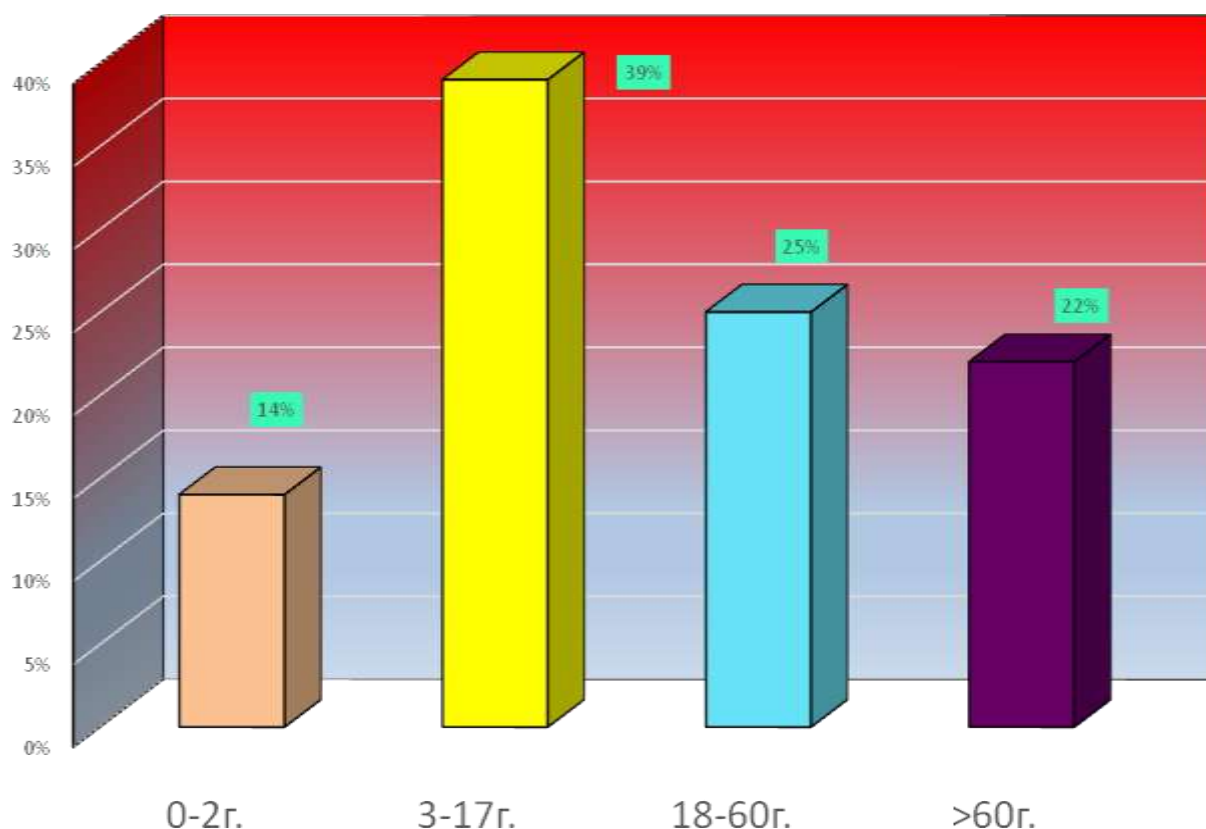


Фигура 18. Разпределение на изолатите според източника на материала.



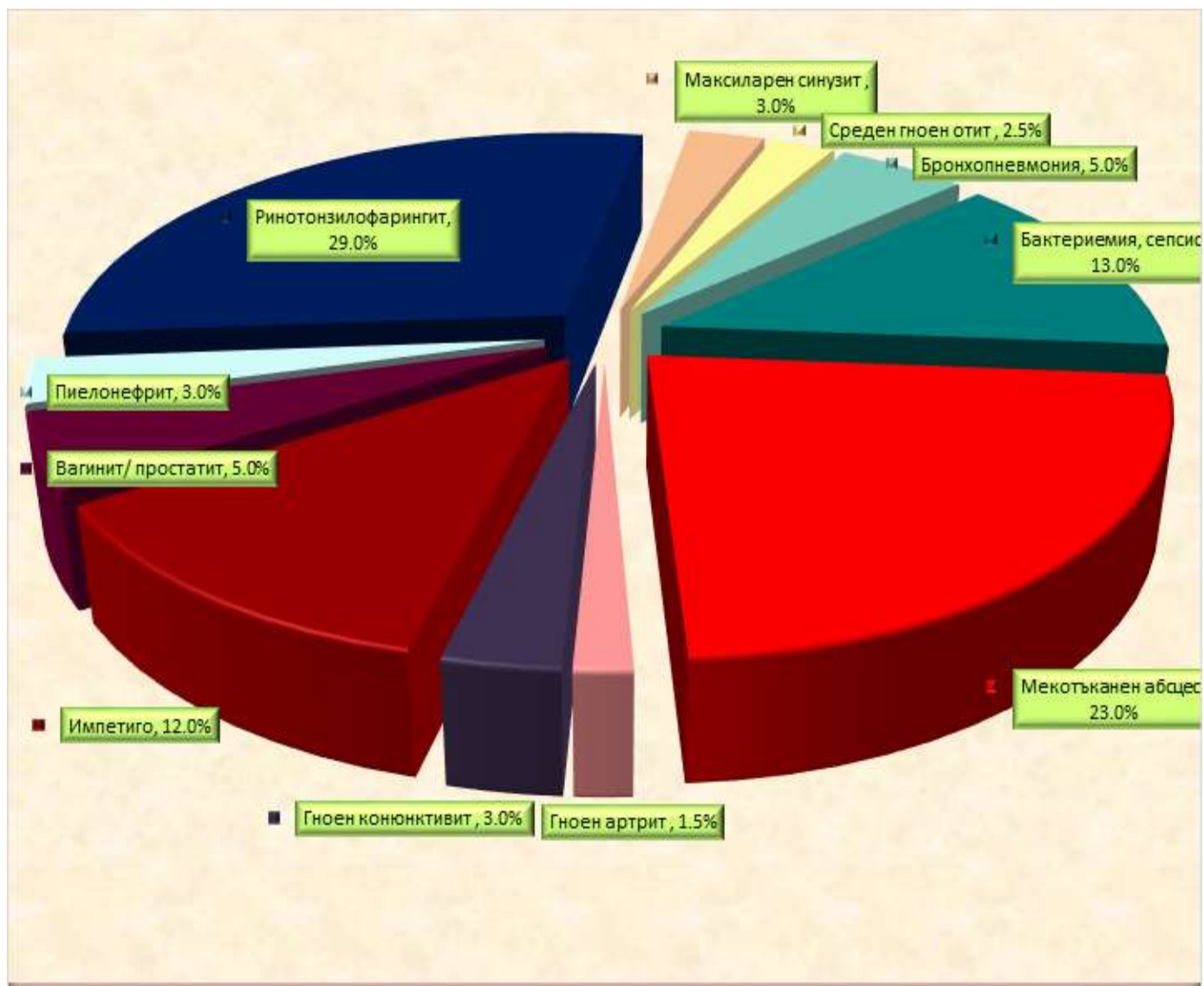
Фигура 19. Разпределение по пол на болните с инфекции, причинени от *S. aureus*.

Стафилококивите инфекции се срещат често във всички възрасти, поради различната локализация и вида на инфекцията и мястото на придобиване. Прави впечатление, от данните на **Фигура 20**, че най-много изолати има от пациенти в детско юношеска възраст, за сметка на значителния брой респираторни изолати, включени в проучването, които са чести причинители на инфекции в тази възраст (Gergova et al. 2016), както и някои от кожните лезии, свързани с хормоналните промени, които се отразяват на по-честите инфекции на космените фоликули в юношеска възраст (Jawetz Melnick, &Adelberg's, 2013).



Фигура 20. Разпределение болните с инфекции, причинени от *S. aureus* според възрастта им.

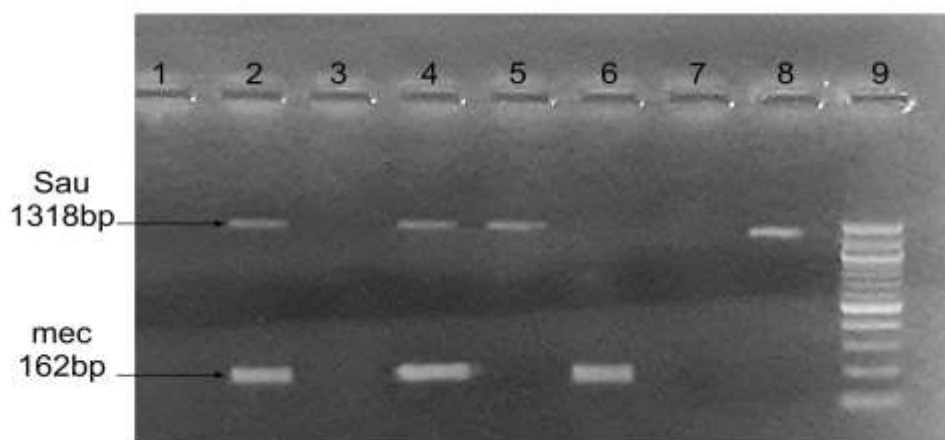
Пациентите бяха от град София, консултирани, хоспитализирани или амбулаторно лекувани с различни инфекции в клиниките на МБАЛ “Св. Иван Рилски”, СБАЛ Ортопедия “Бойчо Бойчев”, от различни клиники на ВМА, или от амбулаторни кабинети в София. Разпределението на клиничните диагнози, свързани с инфекциите, причинени от *S. aureus* е представено на **Фигура 21**.



Фигура 21. Разпределение на клиничните диагнози, свързани с инфекциите, причинени от *S. aureus*.

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

За разработване на бързия генетичен метод бяха използвани директни проби от пациенти общо 127 проби от хемокултури и абсцеси, включващи 77 хемокултури показали положителен растеж в системата ВАСТЕС (Becton Dickinson) и 50 пунктата от меко-тъканни абсцеси, след микроскопското изследване, доказващо наличие на Грам-позитивни коки в кълъстери в хемокултурата, респ. пунктата. Генетичното изследване беше извършвано едновременно с рутинно микробиологично изследване на всички проби, както е описано в раздела „Материали и методи“. За доказване на вида *S. aureus* са използвани праймерите *Sau327*, *Sau 1645* за видово специфичния ген.



Фигура 22. Мултиплекс PCR за откриване на *S. aureus* и *mecA*. Електрофоретично разделяне на ампликони, представени в bp (*Sau* 1318bp и *mecA* 162bp).

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

За доказване на метицилиновата резистентност са използвани праймери за *mecA*. Този ген се среща, както при вида *S. aureus*, така и при другите коагулазо-негативни стафилококи (CoNS). Сравнени са резултатите от двата метода (PCR анализ и стандартна микробна култура). Някои от резултатите, получени с PCR са представени на **Фигура 22**. От изолатите 36,4% са определени като *S. aureus*, с PCR и с културелно изследване, последвано и потвърдено от идентификация с Crystal GP (BBL, Германия) останалите 63,6% са идентифицирани до вид с Crystal GP (Becton Dickinson) като CoNS. Ампликони на специфичния ген за *S. aureus* липсваха при всички CoNS, идентифицирани биохимично. Има пълно съвпадение на видовата идентификация на *S. aureus* с PCR и с рутинното микробиологично изследване от хемокултурите. Има разминаване само в 5,2% от пробите от мекотъканен абсцес, поради липсващ микробен растеж в някои от пробите и доказани гени с PCR за *S. aureus* и *mecA*.

По отношение на метицилиновата резистентност - 39,3% от *S. aureus* и 93,9% от CoNS, изолирани от хемокултурите бяха доказани чрез sefoxitine диск, че са метицилин резистентни, респ. MRSA и MRCoNS. ДНК екстрактите на съответните хемокултури и пунктати позитивираха при PCR реакцията, както е представено в **Таблица 11**. Резултатите показаха пълно съвпадение по двата метода на доказването на метицилиновата резистентност при всички хемокултури, когато има бактериален растеж.

От 50 пунктата ние изолирахме 15,6% MRSA, докато използвайки PCR, беше определено, че MRSA са 20,8% (**Таблица 11**). Три проби от пунктатите не доведоха до растеж на микроорганизми, но бяха положителни за MRSA чрез PCR. Може да предположим, че растежа е потиснат, което често се случва в биологични течности.

Таблица 11. Сравнение на резултатите при откриване на метицилинова резистентност чрез използване на PCR и рутинно тестване

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

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

PCR анализът беше по-чувствителен при откриване на MRSA в пункти от абсцеси според това проучване, отколкото рутинното микробиологично изследване. Пробата от абсцес, подобна на други биологични течности, съдържа много фактори на гостоприемника като медиатори на възпалението, система на комплемента, фагоцитни клетки с бактерициден ефект и когато живите бактериални клетки не са достатъчни или не растат *in vitro*, може да открие само бактериална ДНК (Tsatsaronis JA et al. 2014). PCR анализът е по-чувствителен при откриване на MRSA от биологични течности, особено когато живите бактериални клетки не са достатъчни или не растат *in vitro*. С настоящото проучване беше установена бактериемия от силно вирулентните *S. aureus* в повече от 36% от изследваните с PCR хемокултури. Изследваните с PCR абсцеси със същата етиология бяха 96%, което показва значимостта на бързата диагноза. MRSA и MRCoNS са основна причина за животозастрашаващи инфекции на кръвоносната система като ендокардит, постоперативни инфекции на меките тъкани, остеомиелит, септичен

артрит, метастатични абсцеси, особено нозокомиални, и представляват глобален проблем за общественото здраве (Ivić I et al. 2013; Mehrshad S et al. 2016; Tevell S et al. 2017). Инфекциите, причинени от този вид са свързани най-вече с чужди тела в организма - импланти, изкуствени сърдечни клапи, интраваскуларни катетри, ставни протези, черепно-мозъчни шънтове. Предпоставка за колонизацията и участието в протрахираните инфекции на този вид и на подобния му *S. haemolyticus* е възможността им да продуцират извънклетъчна слуз и протеино-свързващи вещества, които стимулират лесното образуване на биофилм (Schleifer KH & Kloos WE. 1975; (Czekaj T et al. 2015; Mitova Y et al. 2017; Nguyen TH et al. 2017; Seng R et al. 2017; Usha MG et al. 2013; WiderStröm M. 2016).

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

Нараства броят на болнично-придобитите инфекции, особено тези на сърдечно-съдовата система от *Staphylococcus spp.*, През последните години това е тясно свързано с разпространението на гена *mecA* в щамове, живеещи в болничната среда, което улеснява способността им да оцелеят там (Mehrshad S et al. 2016; Sipahi

OR et al. 2017; Pérez-Montarelo D et al. 2017). В настоящото проучване, *mecA* се открива в 77,9% от положителните хемокултури със стафилококови изолати. Съответно бактериемията със стафилококова етиология се усложнява от появата на резистентни на метицилин патогени. Това е още една причина да се използва бърз PCR анализ за стриктно откриване на *mecA* както в MRSA, така и в MRSCoNS инвазивни изолати. Този метод е много полезен за правилния избор на етиологична терапия, която е изключително важна за ликвидиране на резистентните причинители и спасяване живота на пациентите.

Обобщение

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

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

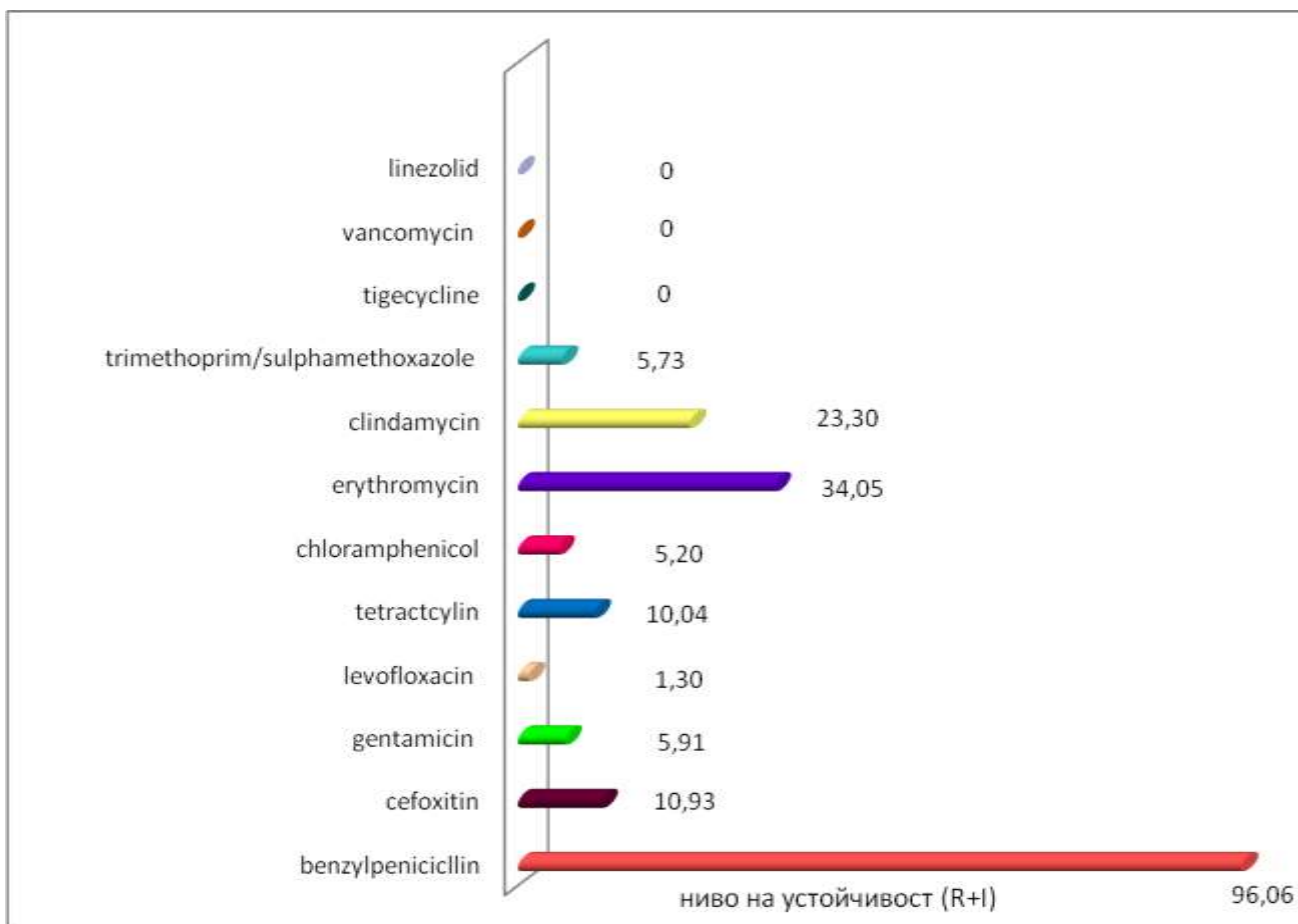
3.1. Определяне на чувствителността и интерпретация на резултатите

С помощта на дисково-дифузионния метод, а за някои групи и с МІС техники бяха определени резултатите от антимикробната чувствителност към 12 антимикробни препарати, представени на **Таблицы 12 и 13** и **Фигура 23**. Почти всички тествани 558 щама *S. aureus* бяха резистентни към пеницилин (96,06%), а 10,93% от тях бяха цефокситин, съответно метицилин резистентни. Нивата на резистентност към гентамицин, левофлоксацин, тетрациклин, хлорамфеникол и комбинацията триметоприм / сулфаметоксазол, бяха както следва: 5,91%, 1,30%, 10,04%, 5,20% и 5,73% са ниски и не се отразяват съществено при избора на терапията

Таблица 12. МІС към различни групи антимикробни средства.

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

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



Фигура 23. Резистентност при 558 изолата *S. aureus*, изразена в проценти, към антибиотици от 12 различни антимикуробни групи

Не се установиха резистентни щамове към ванкомицин, тигециклин или линезолид. Значително по-висока резистентност се наблюдаваше срещу групата на макролиди-линкозамидните (MLSB) антибиотици. Нивата на еритромицин и клиндамицин нечувствителните през периода 2017 - 2020 г. бяха определени в 34,05% и 23,30% от тестваните стафилококови изолати. Определените MIC на тези антимикуробни средства бяха в диапазона от 0,25- \geq 256 mg/L за еритромицин и между 0,25 до \geq 256 mg/L за клиндамицин и резултатите бяха съпоставими с тези от дифузионно-дисквия метод на Бауер-Кърби (Таблицы 12 и 13). Беше отчетена известна разлика в чувствителността на изолати *S. aureus* от хемокултури и абсцеси (Таблица 13).

Таблица 13. Определяне и сравнение на резистентността при изолати *S. aureus* от хемокултури и от абсцеси с МИС към различни групи антимикробни средства

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

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

** Trimethoprim/sulphamethoxazole

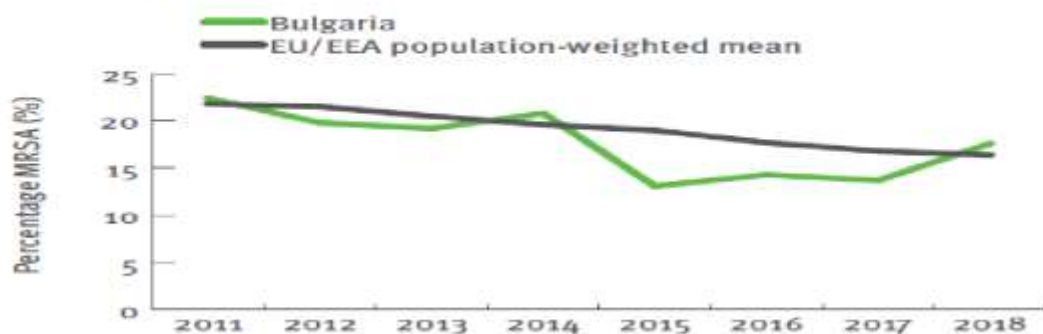
Резистентността към пеницилин е известна отдавна и прогресира постепенно в нашата страна в съответствие с по-ранни данни от 2014 г., когато българските стафилококови изолати са били 90% резистентни (Gergova R et al 2016). Същата

честота на настоящата резистентност (96,06%) е установена през последните години и при турски педиатрични пациенти с НА инфекции (Karbuз А et al. 2017). Основният механизъм, кодиран от *blaZ*, свързан с резистентността към пеницилини, е продукцията на бета-лактамази, които подобно на ензимите на *Moraxella catarrhalis* са екстрацелуларни и разрушават бета-лактамния пръстен, т.е. активния център на антимикробните агенти и може да попречи на успешното лечение на респираторни инфекции, причинени от други патогенни бактерии в комбинация със стафилококи, или респ. мораксели (Gergova R et al 2016; Gergova R & Markovska R 2020). Географското разпределение на MRSA, породено от *mecA* в момента варира в много широк диапазон според мястото, на което е била придобита инфекция, както и дали е СА или НА. Данните варират от 2,9% - 8,7 % в турските здрави назални носители до 36,2% от турските болнични изолати (Dagi HT et al. 2015; Karbuз А et al. 2017, Sipahi OR et al. 2017), 25% от болничните изолати в Непал (Adhikari RP et al. 2017), 38,7% са изолираните в Колумбия (Arias LFC et al. 2016), а в 39,6% в Индия (Deodhar D et al. 2015), и в 40,9% до 48% от иранските НА инфектирани пациенти се доказват MRSA (Abbasi M et al. 2017; Sabouni F et al. 2014), около 46% са MRSA в американските болници (Sader HS et al. 2017), 47% MRSA се докладват и от болниците в Гана (Asante J et al. 2019), MRSA са били 52% в ХИВ-позитивни лица за разлика от 20,80%, изолирани от ХИВ-негативни в Етиопия (Manilal A et al. 2019), 44% MRSA в животински изолати са установени в Нигерия ((Nwaogaraku CN et al. 2019) и 55% в китайските болници (Liang Y et al. 2019). Степента на метицилинова резистентност за български изолати *S. aureus* от амбулаторни и хоспитализирани болни през 2016-2020 г., установена в това проучване, е 10,93% и може да се отбележи, че липсва тенденция за увеличаване през последните 5 - 10 години, сравнявайки новите данни за периода и с тези за 2014 г. от предишно българско проучване (Gergova R et al 2016). При анализиране на данните за инвазивните български изолати MRSA, публикувани от Европейския център за превенция и контрол на заболяванията през периода 2011г. и 2018г ([https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-](https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance)

europre-2018) се установява, че има флукутираща честота от 15 до 22%, подобна на тази, която установяваме и с това проучване за периода 2016 - 2020г. - около 20% за инвазивните изолати и около 9-10% за неинвазивните (**Фигура 24**) Нашите резултати за инвазивните изолати показват леко по-високи стойности от тези на Европейския център за превенция и контрол на заболяванията (ECDC), без значима разлика, докато за неинвазивните стойностите са двойно по-ниски (**Фигура 25**).

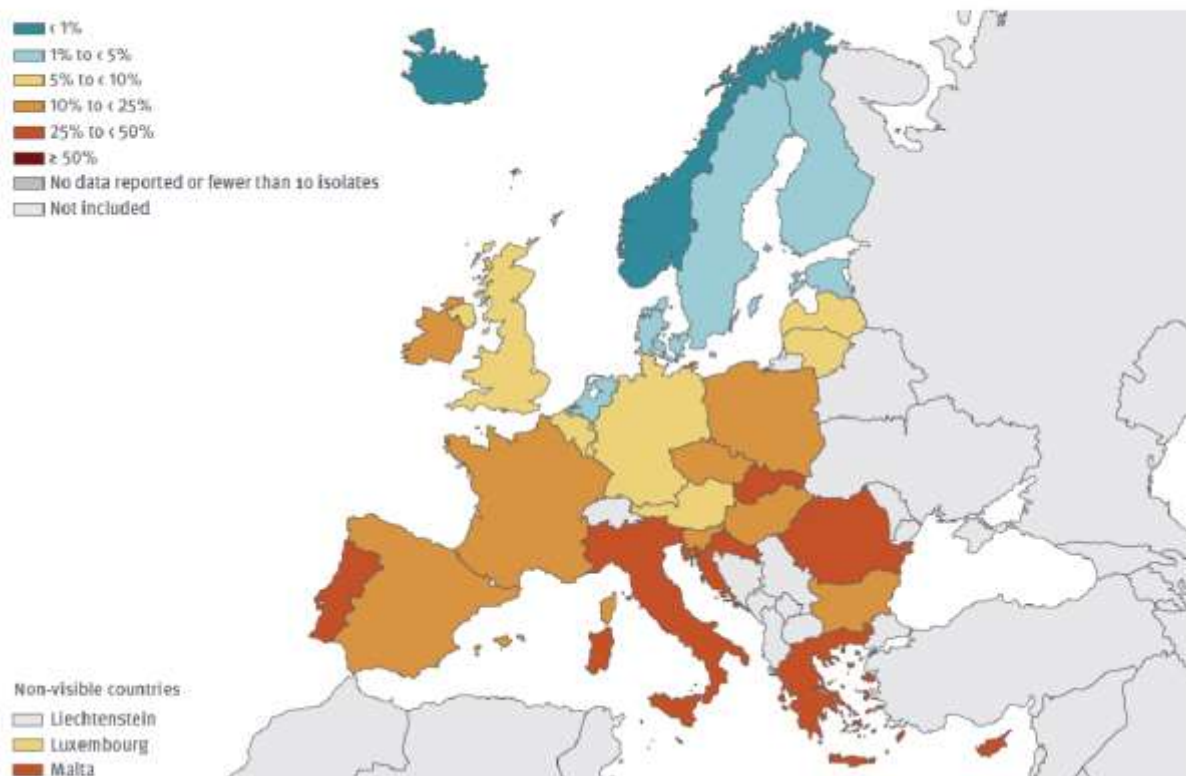
Макролидната резистентност в българските стафилококови изолати става проблематична за този период, като повече от 1/3 от изследваните *S.aureus* бяха вече резистентни към тази група лечебни средства, а близо ¼ са резистентни и към двете групи - макролиди и линкозамиди. В изолати от хемокултури беше установена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

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

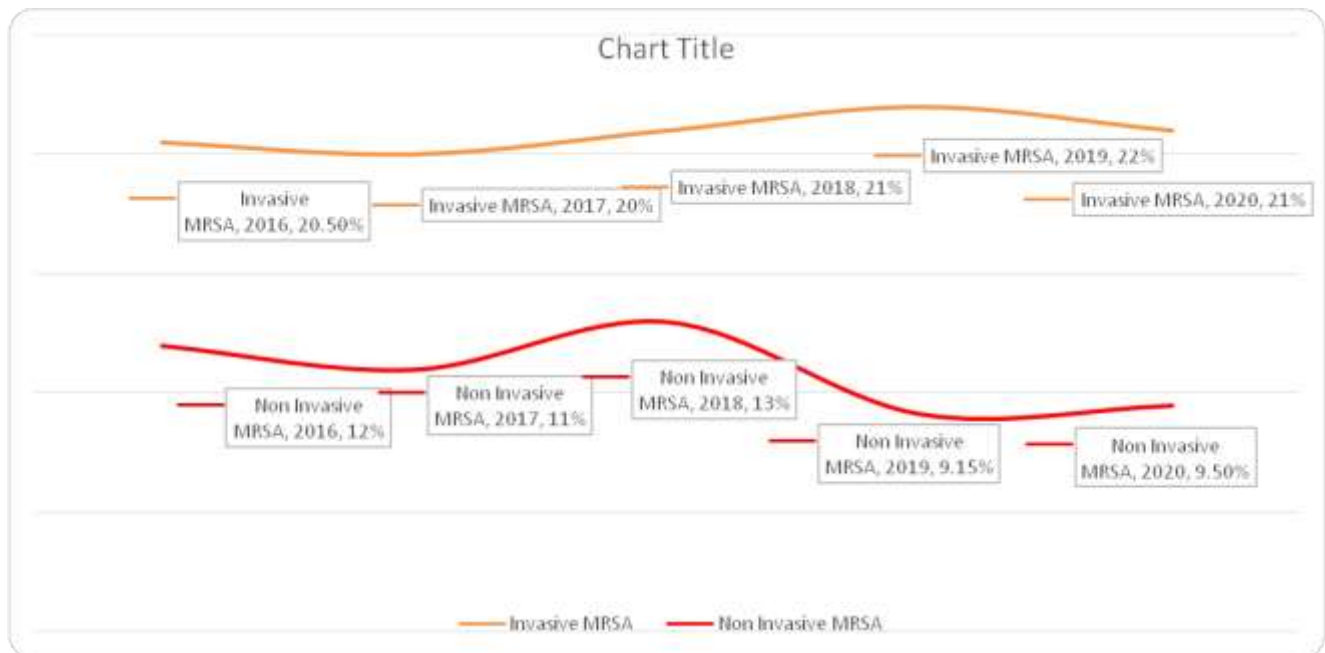


Фигура 24 А.

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

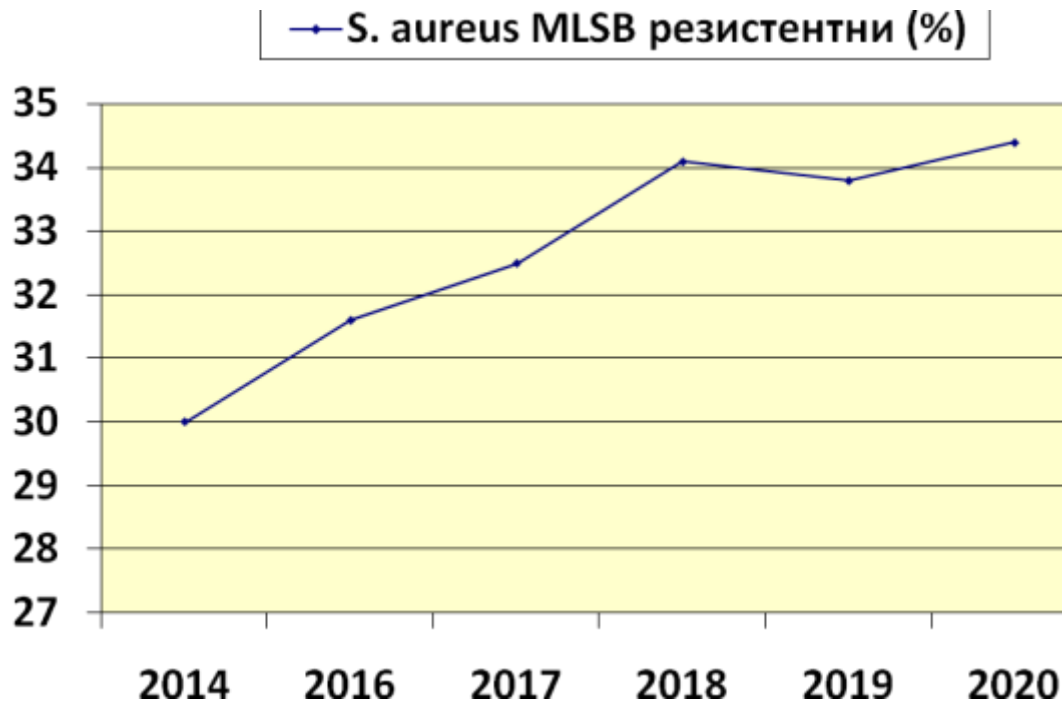


Фигура 24 В. Данни от ECDC за честотата на инвазивните MRSA изолати през последните години



Фигура 25. Честотата, с която е установена метицилинова резистентност в български инвазивни и неинвазивни изолати през периода 2016-2020г. (в %).

Резистентността към MLS антибиотици (според EUCAST) в българските клинични изолати *S. aureus* се повишава от 30% през 2014 г. (Gergova R et al. 2016) до 34% през 2018 - 2020 г., като се наблюдава по-бързо повишаване на нивото на тази резистентност през периода 2014 - 2018г (**Фигура 26**).

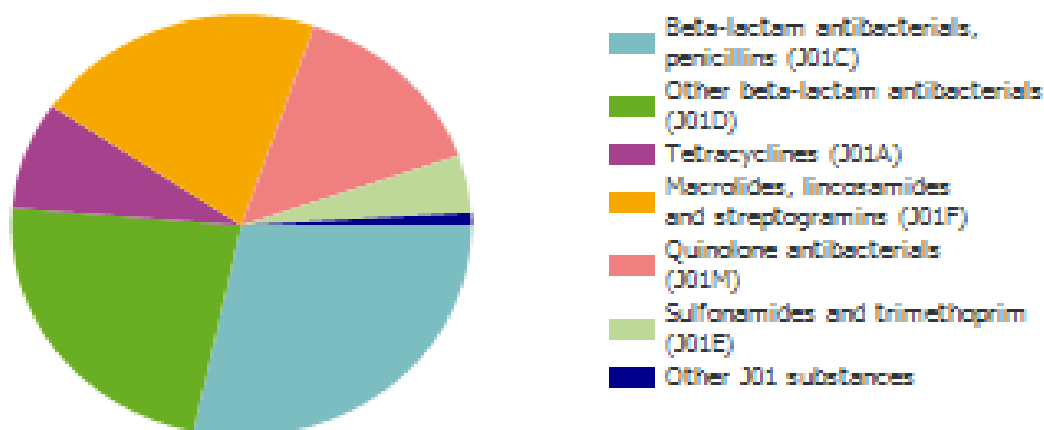


Фигура 26. Разпространение на макролид - резистентните щамове *S. aureus* през периода 2016-2020г., сравнени с предишни данни (Gergova R et al., 2016) за 2014г.

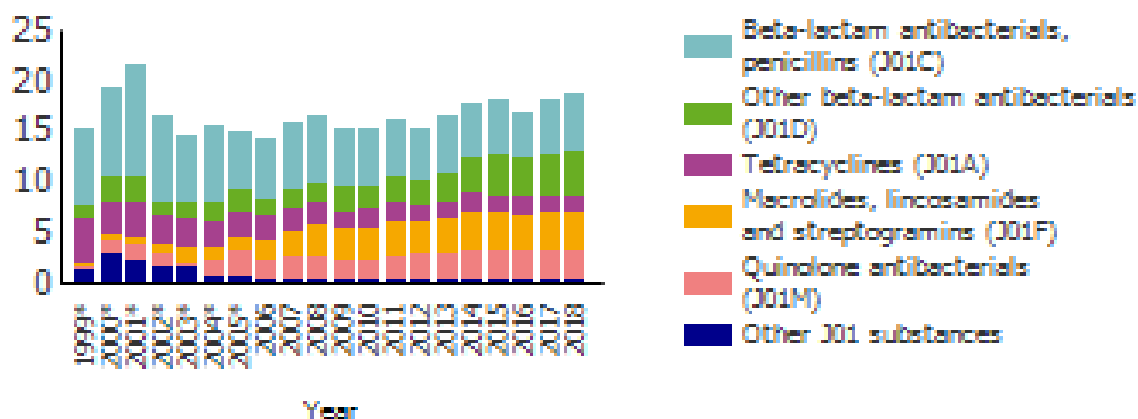
В България консумацията на макролидни антимикробни средства е на второ място след тази на бета-лактамни антибиотици и се засилва през последните години по данни на EuroStat (**Фигура 27**), което може да обясни увеличените нива на резистентност.

(<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/country-overview>).

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



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



Фигура 27. Консумацията на макролидни антиМІСробни средства през последните 20 години, с особено увеличаване през последните 10г. по данни на Eurostat 2018–
<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/country-overview>

72,13% от MRSA бяха едновременно резистентни и към макролиди (Таблица 14). Настоящите резултати потвърждават други данни за значително преобладаване на макролидна резистентност в MRSA, тъй като е известно, че резистентността към множество антибиотици възниква по-често в MRSA щамовете, отколкото в MSSA (Karbusz A et al. 2017; Li T et al. 2017; Sarrou S et al. 2019;

Adhikari RP et al. 2017; Khoshnood S et al. 2019). Установената от нас разлика за макролидната резистентност при MRSA, която достига 72,13% срещу 29,38% при MSSA (P=0,0026) е статистически значима (Таблица 14). Подобни са докладваните данни от гръцко проучване (Sarrou S et al. 2019), където отново има статистически достоверна разлика на макролидната резистентност при MRSA (58,6%) и MSSA (20,7%) (P = 0,002). Значителни разлики в географското разпределение на тази резистентност са установени сред клиничните изолати *S.aureus* през този период. Сегашното ниво на макролидна резистентност от 34,05% в български изолати (и за двете групи пациенти амбулаторни и хоспитализирани), е сходно, но е по-ниско от това в Централна Гърция, където се открива в 40,2% (Sarrou S et al. 2019). До 48,4% е била тази резистентност при ХИВ-позитивни пациенти в Етиопия (Manilal A et al. 2019), а 64,1% от изолатите в китайските болници са били макролид - резистентни (Liang Y et al. 2019). 79% от изолатите *S.aureus* в болница в Измир през 2011–2012 г. са били макролид - резистентни (Uzun B et al. 2014) и резистентността е достигнала през последните години до впечатляващото ниво от 91% в Токио, Япония (Shoji K et al. 2015).

Таблица 14. Разпределение на макролидната резистентност в MRSA и MSSA

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

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

Обобщение

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

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

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

След амплифицирането на седем гена, които могат да се видят в Таблица 6, определихме потенциалните механизми за клинично значима резистентност към бета-лактами и MLSB антибиотици. 96,06% от 558 *S. aureus*, което представлява 536 пеницилин-резистентни тествани изолата съдържат *blaZ* ген, свързващ се с пеницилинова резистентност. Всички метицилин-резистентни 61 щама *S. aureus*

(10,93% от сбирката) позитивираха за *tesA* гена. Не беше установен *tesC* ген, на който да се дължи метицилиновата резистентност при българските изолати MRSA.

3.2.2. Механизми на резистентност към макролиди и линкозамиди.

Тествани бяха 558 изолата с фенотипни методи (Фигури 28 и 29). От тях бяха установени 190 макролид резистенти и те се разделят според MLS фенотипа така, както са представени на Таблица 15, като преобладава cMLS в 58,95%. Другите фенотипове бяха установени, както следва: iMLS в 38,42% и MS най-рядко в 2,63%.



Фигура 28. Дифузионно-диск метод за установяване на антиминокробната чувствителност и доказване на iMLS фенотип в български клинични изолати *S. aureus*.



Фигура 29. Определяне с E-тест метод за установяване на чувствителността към антиминокробни средства при колекционирани щамове *S. aureus*

Таблица 15. Разпределение на гените за резистентност в 138 макролид-резистентни *S. aureus* според MLS фенотипа и епидемиологията на инфекцията

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

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

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

От макролид резистентите са проучени 138 щамове за наличието на генетични механизми, кодиращи резистентност. Данните за доказаните *erm*, *msrA* и *mef* гени са дадени в **Таблица 15**. Тези резултати са в контраст с данните от Япония, където са открити преобладаващи iMLS (Shoji K et al. 2015), но са в съответствие с други доклади от Корея (Khodabandeh M et al. 2019), Уругвай (Pardo L et al. 2020) и някои европейски страни (Schmitz FJ et al. 2000). Най-разпространените механизми на резистентност към макролидната и линкозамидната група антикробни средства в тестваните щамове са *erm* гените, предимно *ermA* (64/138; 46,38%) и *ermC* (n=65/138; 47,10%) (**Таблица 15**). *Erm* гените са **отговорни за продукцията на метилаза, водеща до по-високи нива** на резистентност, включително за важният при тежки инфекции на меките тъкани клиндамицин. Данни от различни изследвания, потвърждават нашите резултати за преобладаване на разпространението на *ermA*, и *ermC* последвани от *ermB* самостоятелно или в комбинации. В тези проучвания *msrA* и *mefA* са липсващи или с незначителна честота (Abbasi M et al. 2017; Khodabandeh M et al. 2019; Shahi F et al. 2015; Sarrou S et al. 2018; Uzun B et al. 2014). За разлика от тях в настоящия дисертационен труд *msrA* и *mefA* бяха установени в 2,90% и 5,80%, съответно. *ErmB* гени в настоящето проучване се откриват в значителна част от изолатите (n=39/138; 28. 26%). Някои автори съобщават, че нито един от MRSA изолатите не притежава *ermB* ген (Khoshnood S et al. 2019), но настоящото проучване не потвърждава това. Резултатите от нашата работа (**Таблица 15**) се доближават до някои данни от нов доклад от 2020г. за механизмите на резистентност към макролиди в болница на Уругвай (Pardo L et al. 2020) и до известна степен данните от предишно Европейско многоцентрово проучване (Schmitz FJ et al. 2000) относно значително **преобладаване на *ermA* в cMLS**, но за разлика от други предишни данни, ние наблюдаваме връзка между **комбинацията от *ermA*+*ermC* с cMLS** ($P < 0,05$). Най-разпространени са *erm* генотиповете, свързани с присъствието основно на *ermA* и *ermC* гени, и по-рядко с *ermB*. Разпределението на гени за резистентност според фенотипа на MLS и вида на инфекцията (СА или НА), са представени на **Таблица**

15. Обикновено се наблюдава самостоятелно ген *ermC*, последван от самостоятелно представен *ermA*, и двата значително по-често се срещат в стафилококови изолати със сMLS фенотип ($P=0,0001$). Най-честите комбинации *ermA* + *ermC* и *ermA* + *ermB*, бяха детектирани само в сMLS щамове ($P=0,0001$), но *mefA* беше преобладаващ в групата с iMLS ($P = 0,0068$) с доказана статистическа достоверност. Изолатите с MS фенотип бяха само 3 бройки и резултатите от генетичното им проучване, не бяха подложени на статистическа обработка. Само два резистентни генотипа: *ermC* ($P=0,0065$) и *ermA* + *ermB* ($0,0015$) са демонстрирали статистически достоверно преобладаване в стафилококови изолати от лежащо болни пациенти.

Обобщение

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

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

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

Резултатите са представени на **Таблица 16**, **Таблица 17** и **Фигура 30**. Открихме, че е ***hlg*** е най-разпространеният ген (близо до 100%) във всички групи с различен произход (инвазивни или неинвазивни изолати) и независимо от начина на придобиване (придобити в общността или свързани със здравните грижи). Той беше открит без значима разлика в пациентите с инфекции, придобити в обществото и болнично придобити, както и при инвазивни и неинвазивни инфекции (**Таблица 16**),. Този ген кодира синтеза на извънклетъчен токсичен полипептид (образуващ пори гама-хемолизин) със силна цитолитична активност срещу широк спектър клетки (Aman MJ and Adhikari RP. 2014), т.е уврежда човешки и заешки еритроцити и проявява токсичност срещу всички левкоцити (неутрофили, моноцити, гранулоцити и макрофаги). В експериментален модел проявява и дермонекротична и летална активност в зависимост от дозата. Тази група хемолизини са двукомпонентни и се състоят от полипептиди, обозначени като S (с бавно действие, HlgA или HlgC) и F (с бързо действие, HlgB) (Vandenesch F et al. 2012). Има данни, че *hlg* и съответно неговият извънклетъчен продукт допринася за отклонения в имунния отговор и потенциалното стафилококово оцеляване в биологични течности. Този двукомпонентен порообразуващ токсин във високи концентрации има дермонекротична и летална активност в експериментален животински модел и се проучва като потенциален компонент на многовалентна ваксина (Aman MJ and Adhikari RP. 2014). Нашите резултати са сходни с данните от

САЩ и Иран, които отчитат високо присъствие на *hlg* сред изолатите на MRSA, но и при MSSA (Abbasi M et al. 2013; Shukla SK et al. 2010).

Обратно, генът *cna*, кодиращ колагенов адхезин с инхибиторен ефект върху комплементарната активация беше открит само при около 14% от всички изследвани български стафилококови щамове. При изолатите от хоспитализирани пациенти *cna* беше доказан със статистически значима разлика ($P=0,0001$) по-често в 24%, докато при амбулаторните беше едва в 3% (**Таблица 16**). **Честата корелация на *cna* с инвазивните изолати (Таблица 17) предимно при болни** ($P=0,0001$) показва, че *cna* кодира продукт, придаващ по-висок специфичен вирулентен потенциал, което се докладва и от други автори (Melania Cruciani et al. 2017; Nayeli Alva-Murillo et al. 2017). *S. aureus* може да произвежда колагенов адхезин (CNA), за да взаимодейства с този важен и задължителен протеин - колагена при хората и животните. Този адхезин има водеща роля в колонизацията, удължаването и персистирането на инфекцията в човешкия гостоприемник. Друг механизъм на действие на колагенов адхезин CNA е инхибирането на активирането на комплемента, съответно на имунния отговор. При експериментални животински модели е установено прогресиране на бактериални инфекции, дължащи се на стафилококов колагенов адхезин CNA или други подобни адхезини, като: *YadA* от *Yersinia enterocolitica*, *ACE* от *Enterococcus faecalis*, адхезин *ACM* от *E. faecium* и *CNM* от *Streptococcus mutans* (Madani A et al. 2017; Giampiero Pietrocola et al. 2017). В настоящият дисертационен труд генът *tst-1* беше установен в 4,3%, а тези за ентеротоксините (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*) бяха установени с честота, между 4,3% и 72,6% (**Таблицы 16 и 17**).

Таблица 16 Честота и разпределение на установените стафилококови гени на вирулентност сред изолати *S. aureus* от болнични (хоспитализирани) и амбулаторни пациенти (* сигнификантна разлика ($P < 0,05$) - подчертани)

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

Генът *tst-1* присъстваше при сходен процент хоспитализирани и амбулаторни пациенти ($P > 0,05$), но по-често се откриваше в инвазивните стафилококови изолати ($P = 0,0358$). Някои от гените, кодиращи ентеротоксини (*seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*) бяха статистически значимо по-чести при MRSA отколкото при MSSA (Таблица 17). Други автори, като Ортега и колектив 2010 г. (Ortega E et al. 2010) съобщават за някои от тези гени като преобладаващи в MRSA: *sea*, *seb*, *sed*, *seg*, *sei*, *sej*. Те откриват *tst-1* по-често в изолатите на MSSA, докато в

нашето изследване този ген е по-чест при MRSA. Честотата на *seb* и *sec* – най-често откритите генетични елементи при хоспитализирани пациенти, както и при инвазивни изолати, са със статистическа разлика спрямо останалите ($P=0.001$). Генът *tst-1* е открит при по-малък процент в европейски изолати *S. aureus*, включително в България (**Таблица 18**), в сравнение с други страни, например Китай и Корея, където се среща в около 50% от изолатите.

Комбинации от три гена, *sei*, *seg* и *seb*, които кодират **силни суперантигени (Sags)** са открити в **повече от 60% от българските стафилококови изолати**, изследвани в това проучване, предимно **в инвазивни изолати** със статистически значима разлика ($P=0,001$). Почти една трета от клиничните изолати на *S. aureus* в това проучване съдържат по седем гена, кодиращи супер-антигенни и токсини: *sei*, *seb*, *seh*, *sec*, *seg*, *sej*, *sea*. **До 25% от изолатите носят поне девет гена, а близо 40% носят най-малко шест от дванадесетте тествани важни гена на вирулентност.** Това създава риск от лесно и бързо разпространение на силно вирулентни щамове с повишен патогенен ефект. Разпределението на проучените генетични детерминанти, кодиращи вирулентност в MRSA и MSSA изолатите, както и в другите диференцирани групи хоспитализирани пациенти с и амбулаторни пациенти с инфекции, придобити в общността, е представено в **Таблица 16**. Докладвани са различни данни за честота на тези гени и SAg от изследователи от други страни (**Таблица 18**). Подобно разпространение на гените *sei* и *seg*, в комбинация с общ ДНК фрагмент, се съобщава от турски педиатри при пациенти и здрави ученици (Karbuз A et al. 2017; Dagi HT et al. 2015), а също така и в Чешката република, Франция, Колумбия, Мексико и Корея (Arias LF et al. 2016; Paniagua-Contreras GL et al. 2014; Madani A et al. 2017; Sauer P et al. 2008; Jarraud S et al. 2001; Peck KR et al. 2009). Данните от Индия, Китай, Иран и Канада се различават от нашите и от тези в посочените по-горе държави, защото представят *sea* като най-честия ген на SAg (**Таблица 18**). (Abbasi M et al. 2017; Deodhar D et al. 2015; Wang LX et al. 2013; Mehtrotra M et al. 2010).

Генетичният профил на инвазивните изолати на *S. aureus*, установен в настоящото изследване е различен, съдържа статистически значимо повече гени на вирулентност ($P=0,009$) в тази група. Гените, открити главно в инвазивните стафилококови изолати, бяха: *cna*, *tst-1*, *seb*, *seh*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* и *sei* в различни комбинации (Таблица 17). Някои от откритите гени се свързват по-често с нозокомиални и инвазивни инфекции и от други автори (Arias LFC et al. 2016; Paniagua-Contreras GL et al. 2014; Deodhar D et al. 2015). Поне пет гена на SAg от 22-те тествани генетични елемента са открити в инвазивни изолати в колумбийско проучване (Arias LFC et al. 2016). Някои от гените, които са с най-голяма честота в български щамове, като *sei*, *sea* и *seg*, са били открити при повече от 33% в изолати *S. aureus*, от пациенти, починали от стафилококова бактериемия (Deodhar D et al. 2015).

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

Таблица 17. Честота и разпределение на установените стафилококови гени на вирулентност сред MRSA и MSSA изолати и от пациенти с инвазивни и неинвазивни инфекции

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

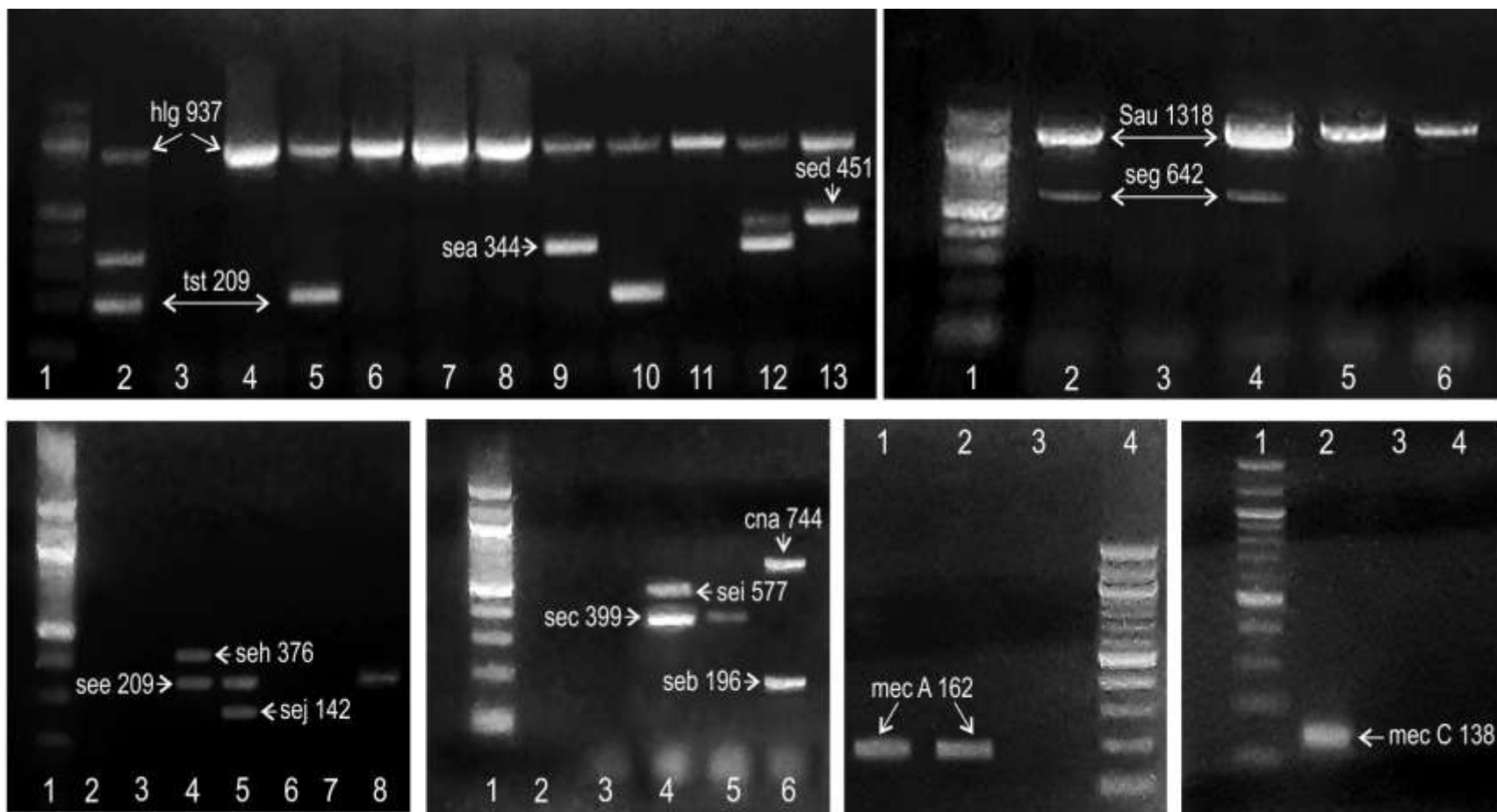
* сигнификантна разлика ($p < 0,05$) - в тъмно поле

Таблица 18. Сравнение на честотата на гените на вирулентност при изолати *S. aureus* в България и други страни

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

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

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



Фигура 24. Мултиплекс PCR за откриване на гени на вирулентност при *S. aureus*, разпределени в 4 микса и отделна детекция с моноплекс PCR на гените за резистентност *mecA* и *meCC*. Електрофоретично разделяне на ампликони, представени в бр.

Асоциацията между профилите на вирулентност и макролидната резистентност е представена на **Таблица 19**. PCR анализът разкрива, че много генетични елементи на вирулентност са установени в двете групи макролид чувствителни и резистентни стафилококови изолати без статистическа разлика, но някои от гените като самостоятелно *hlg*; *hlg* и *seb*; комбинациите: *hlg, seb, sec*; *hlg, seb, seh*; *hlg, sec*; *hlg, sec, sei*; *hlg, sec, sei*; *hlg, sei*; *hlg, sei, sej*; *hlg, sej* са значително по-чести при резистентните (**Таблица 19**).

Таблица 19. Корелация на макролидната резистентност с гените, детерминиращи вирулентност при 435 *S. aureus*

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

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

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

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

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

Обобщение

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

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

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

5.1. Регионална информация за стафилококовите етиологични агенти

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

От направените изследвания се установява, че при извънболничните, амбулаторните изолати метицилиновата резистентност комбинацията ѝ с макролидната резистентност са значително по-рядко за разлика от тази при вътреболничните изолати, което се установява и от други проучвания (Karbuз A et al. 2017; Li T et al. 2017; Sarrou S et al. 2018; Adhikari RP et al. 2017; Khoshnood S et al. 2019). Това дава възможност да бъдат използвани всички подходящи за терапията групи антимикробни средства в България според локализацията и тежестта на инфекцията, както и възрастовите и други здравословни особености на амбулаторните пациенти, с изключение на пеницилини, аминопеницилини без инхибитор на бета-лактамазата, поради много честото продуциране на тези ензими - в над 96% от изолатите. За респиратните инфекции като най-подходяща емпирична терапия остава аминопеницилин с β -лактамазен инхибитор, особено в детската възраст. Малко над 10% са резистентните на тетрациклинови препарати, които не се използват често в България, но би следвало и в тези случаи да се избягва емпиричната им употреба. Предпочитаните, особено в детска възраст и подходящи за терапия на различни респираторни инфекции макролиди (Gergova R et al 2016; Gergova R & Markovska R 2020) трябва да се прилагат задължително след

антибиограма, тъй като резистентността към тях нараства и вече е приблизително 34% в българските клинично значими изолати *S. aureus*. Нивото на **макролидната резистентност е значително по-високо в MRSA (72,13%) отколкото в MSSA (29,38%)**, със сигнификантна разлика $P=0,0026$, което затруднява лечението на инвазивни инфекции и нозокомиални такива, където и честотата на метицилиновата и макролидно-линкозамидната резистентност е по-висока от тази в амбулаторни условия - *mecA* е откриван в 77,9% от положителните хемокултури със стафилококови изолати и при 63,6% от инвазивните изолати *S. aureus*, а над 68% от изолатите MRSA са болнични. В тези случаи използването на бета-лактамни антибиотици е неприемливо и несигурно. Често в случаите на изолат MRSA от болнично лекуван пациент се установява и неговата множествена резистентност (Karbuз A et al. 2017; Li T et al. 2017; Sarrou S et al. 2018; Adhikari RP et al. 2017; Khoshnood S et al. 2019)., което налага използването на сигурните антимикробни средства, към които засега в България няма установена резистентност, а именно ванкомицин, тигециклин или линезолид. Разработеният и апробиран бърз метод за доказване на метицилинова резистентност и наличие на *S. aureus* в хемокултури и пунктати е изключително полезен и подходящ за подпомагане на избора на вече насочена етиологично терапия. Беше наблюдавана разлика в чувствителността на изолати от хемокултури и мекотъканни абсцеси като при тези от хемокултури беше установена резистентност към еритромицин в 28,57% и към клиндамицин в 17,86%, докато в пунктати от абсцеси до 37,78% и респ. 24,44%. Това драматично увеличение на комбинираната резистентност към макролиди и линкозамиди, особено в изолати от мекотъканни стафилококови инфекции се наблюдава и в някои други страни (Stein M et al. 2016). Според нашите резултати се налага да се избягва емперична монотерапия с клиндамицин, който е изключително подходящ за лечение на тези инфекции, поради проникване в тези тъкани, където малко антибиотици имат добра проникваемост и допълнително потиска токсинемията. Установените генетични профили на резистентност показват, че преобладават *erm* гените, кодиращи високо ниво на

макролидна резистентност, често кръстосана с линкозамидна. Терапията с клиндамицин в тези случаи, особено при индуцируеми фенотипове, когато може да се пропусне дискретна промяна в чувствителността от антибиограмата, може да доведе до клиничен провал на лечението (Chancey ST et al. 2015; Rao GG. 2000; ShojiK et al. 2015; Uzun B et al. 2015). При доказана *in vitro* чувствителност е препоръчително неговото приложение според конкретния случай самостоятелно или в комбинация с аминогликозиден или друг подходящ антиминокробен препарат. Правилният и своевременен избор на подходяща емперична, а когато е възможно и насочено етиологичната терапия, например след доказване на метицилинова резистентност с PCR директно в пробата от хемокултура или пунктат при животозастрашаващи инфекции имат решаващо значение за спасяването живота на пациентите.

5.2. Инхибиране на бактериалния кворум (Quorum Sensing Inhibition)

Инхибиране на бактериалния кворум е феномен, при който бактериалните клетки регулират поведението на бактериалните популации чрез произвеждане на самоиндуктори. Бактериите секретират сигнални молекули, наречени автоиндуциращи вещества (Perez-Perez M et al. 2017). Когато извънклетъчната концентрация на тези вещества се увеличи до определен праг с нарастване на популацията, бактериите включват експресията на специфични гени, като по този начин регулират груповото поведение на бактериите (Yin SL et al. 2011). Това е ефективно средство за обмен на информация между бактериите, включително биолуминесценция, биофилм и токсична генна експресия, а много други поведения се регулират от системата на кворум за чувствителност (Kalia VC & Purohit NJ 2011). МСРобните патогенни свойства на *S. aureus* са много сложни и са свързани главно с факторите на вирулентност (Yin SL et al. 2011). Тези фактори на вирулентност са главно екзотоксини, които нарушават клетките на гостоприемника, пречат на имунните реакции и някои протеини, участващи в

адхезията и защитата срещу защитата на гостоприемника (Kalia VC & Purohit NJ 2011; Yin SL et al. 2011). Експресията на токсините се регулира от сложна мрежа, съставена от множество гени, от които *agr* глобален регулаторен фактор H1, е най-важният ген, регулиран от механизмите за чувствителност на кворума (Haseeb A et al. 2019). Инхибирането на този механизъм за наблюдение на кворума при бактериите може да доведе до възпрепятстване на образуването на биофилми, намаляване на бактериалната вирулентност и намалена бактериална резистентност (Wang J et al. 2017; Haseeb A et al. 2019).

5.3. Инхибиране на лектина

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

5.4. Хелатиране на желязо.

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

5.5. Фагова терапия

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

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

проблеми при фаговата терапия. Следователно тези проблеми съществуват и в хода на лечението на стафилококовите инфекции.

5.6. Нанотехнологията

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

Широкото използване на антибиотици доведе до увеличаване на честотата на бактериална резистентност, започвайки с появата на резистентни към различни лекарства щамове като MRSA, което се счита за клинично важен проблем (Klein EY et al. 2017). Поради характеристиките си на лесно преносима инфекция, висока смъртност и мултирезистентност, MRSA се превърна в препъни камък в клиничното лечение (Khoshnood S et al. 2019). Следователно, как ефективно да се предотврати и контролира MRSA се превърна в гореща тема в съвременните

изследвания. В момента ванкомицин все още е най-доброто лекарство за лечение на MRSA инфекция. Резистентността на MRSA към много лекарства обаче значително увеличава трудностите при препоръчване на терапията (Vestergaard M et al. 2019).

Необходими са по-нататъшни изследвания за способността на MRSA да причинява инфекция, пътищата на разпространение на резистентността към антибиотици при MRSA, както и да се насърчава разработването на нови лекарствени средства срещу MRSA инфекцията, което ще даде на лекарите повече възможности за лечение на инфекции, причинени от MRSA, осигурявайки по-голяма защита на човешкото здраве.

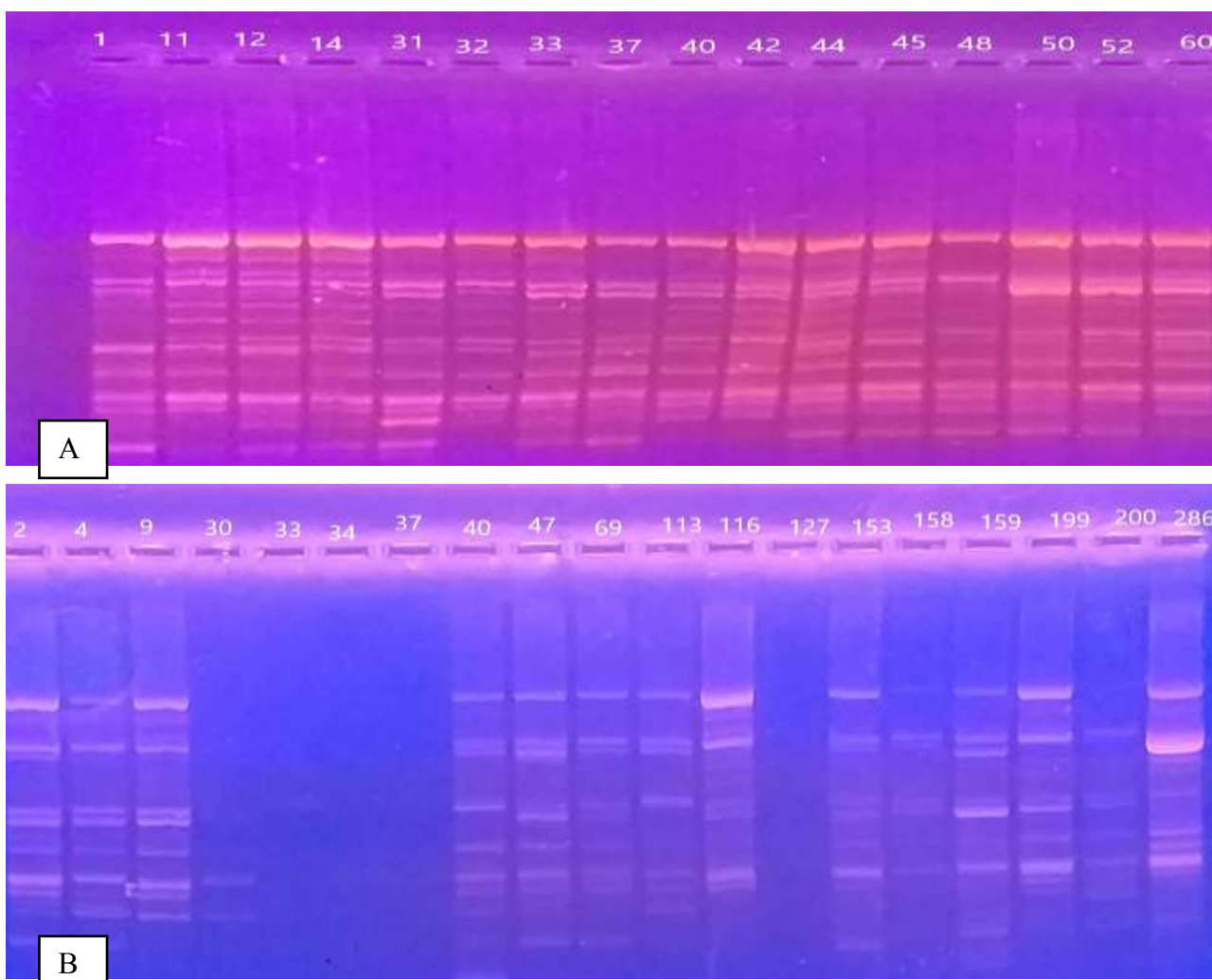
6. Епидемиологично охарактеризиране и типизиране на щамове *S. aureus*.

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

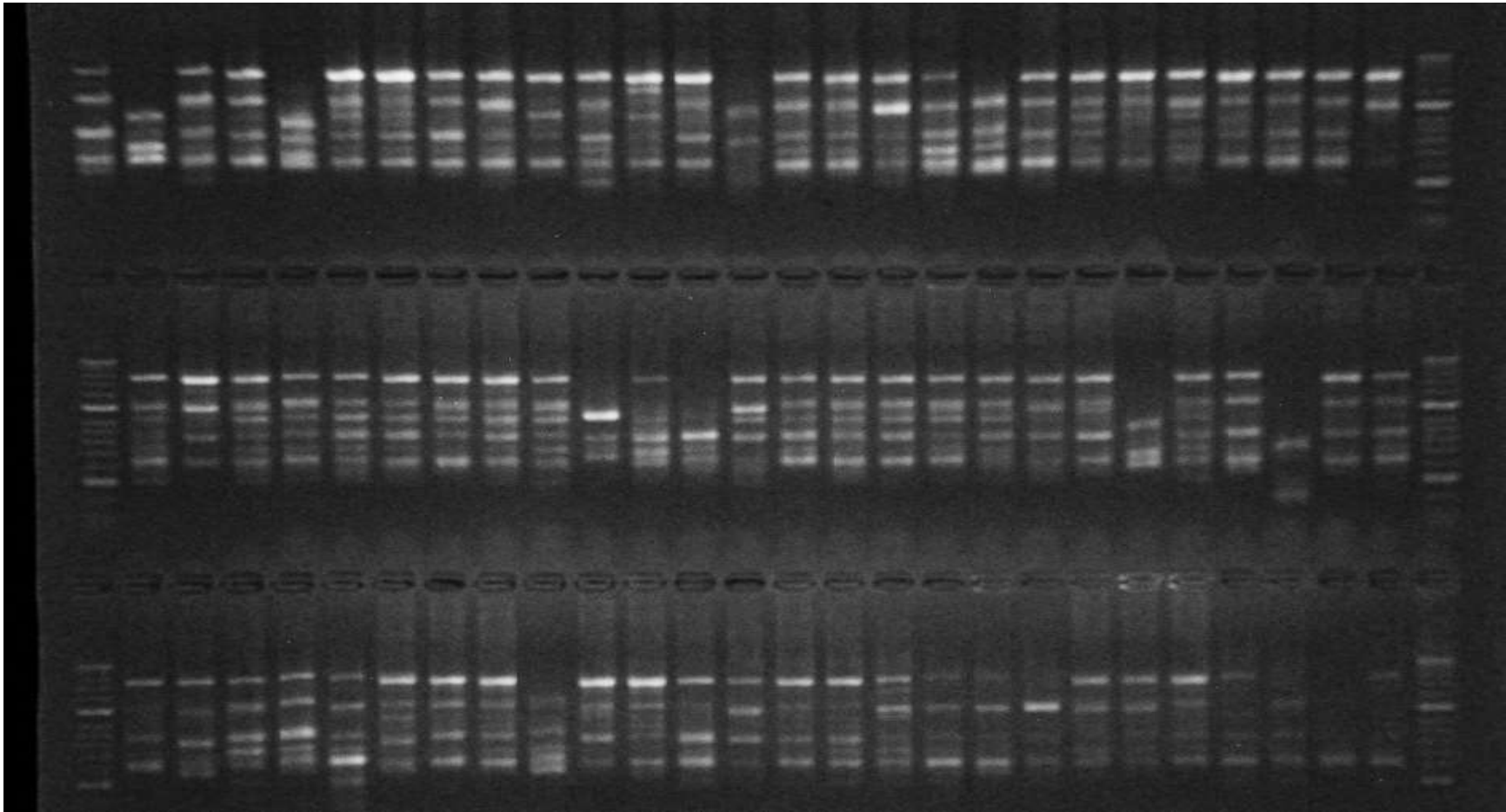
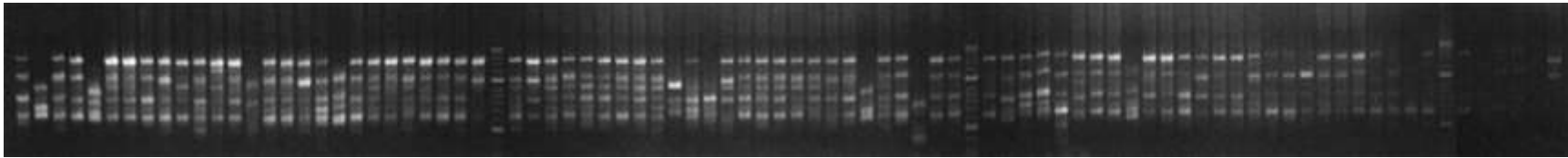
Беше извършено епидемиологично охарактеризиране на двете групи стафилококи, а именно MSSA и MRSA посредством RAPD. Проучени с RAPD бяха общо 112 изолата, които да представляват различни по произход, както от различни болници, отделения, амбулаторни, така и от различни локализации на инфекции, както инвазивни, така и неинвазивни изолати *S. aureus* (85 MSSA, 27 MRSA), изолирани в периода 2016-2020 г. от различни пациенти с инвазивна и неинвазивна инфекция, хоспитализирани в три Университетски болници в София УМБАЛ „Свети Иван Рилски“(SIR); СБАЛ по Ортопедия “Проф. Бойчо Бойчев” (ORT); Военно Медицинска Академия (ММА), както и изолирани от амбулаторни

пациенти. Означенията на клиниките в две от болниците са представени със сл. съкращения - легенда: **SIR:** HD - Hemodialysis (Хемодиализа); ID - Therapy of Internal diseases (Терапия на вътрешните болести); NS-Neurosurgery (Неврохирургия); PD - Profesional diseases (Професионални болести); RE - Reumathplogy (Ревматология); **ММА:** AS - Abdominal surgery (Коремна хирургия); CS - Chest surgery (Гръдна хирургия); DE - Dermatology (Дерматологична клиника); NS - Neurosurgery (Неврохирургия); SS - Septic surgery (Гнойно-септична хирургия); VS - Vascular surgery (Съдова хирургия).

За всеки изолат бяха генерирани разпознаваеми генетични профили, съставени от 5 до 10 бенда (**Фигура 25 А и В и Фиг. 26**).



Фигура 25. RAPD с праймер С - AGGGAACGAG показва най-отчетливи и най-многобройни бендове след сравнение с другите праймери



Фигура 26. RAPD профили на MSSA с праймер C - AGGGAACGAG

За клон приехме изолати с 80% съвпадение във филогенетичното дърво. При анализирането на резултатите от първата група, след построяване на дендрограмите с помощта на UPGMA метода (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Soka. 1973) беше установено, че в проучените болници и при амбулаторни пациенти от София циркулира голямо разнообразие от MSSA, което се отбелязва като характерно за тази група и в други проучвания (Mark CE et al. 2000). При анализиране на резултатите от 85 MSSA бяха установени 24 RAPD типа, от тях 10 типа имаха от 2 до 27 представителя и бяха означени като **A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K** (Фигура 27). От тях клон **A** е преобладаващ при 27 от изследваните щамове, респ. при 31,8%, а следващият по честота (клон **F**) е при 12,9% от тях. На трето място е клон **I** с 9,4% от тестваните щамове. Останалите типове съдържаха значително по-малко или единични изолати от стафилококови инфекции, установени амбулаторно или само в някои клиники (Фигура 28). В клон **A** преобладаваха изолатите от Университетската болница “Св. Ив. Рилски” (общо 14), предимно от Клиниката по хемодиализа - 8 изолата (7 от хемокултури, 1 от пунктат), 3 от този клон бяха изолирани в Клиниката по ревматология, 2 изолата от болни, лежащи в клиниката по Неврохирургия и 1 от пациент в Клиниката по професионални болести. Към този клон се причисляват още 7 щамове, изолирани от пациенти, оперирани в СБАЛ по Ортопедия “Проф. Бойчо Бойчев” и 6 амбулаторни изолата. Различни са видовете материали, от които са изолирани стафилококите, но голямата част от тях са изолати от хемокултури, със сигнификантна разлика $P = 0,0303$ пациенти с бактериемия и сепсис (29,7%, при общо 13% хемокултури като част от всички материали). Инвазивните изолати са 77,78% от всички изолати, в този клон и са от пациенти на хемодиализа **SIR-HD** или с тежки фрактури, по-рядко след ставно протезиране, оперирани в **ORT**, което предизвиква съмнение за по-висока вирулентност на този клон. Гените на вирулентност, които се срещат под различни комбинации в този клон са: *hlg, can, tSt, sea, seb, sec, sed, seg, sei, sej, seh*. Във всички изолати от хемокултури присъстваха *hlg, seg, sei, sej*. В другите изолати от рана, очен, ушен, назофарингеален секрет преобладаваше комбинацията *hlg, seb, sec, sei, sej*. Генът *hlg* кодира синтеза на силен цитолитичен извънклетъчен гама-хемолизин с

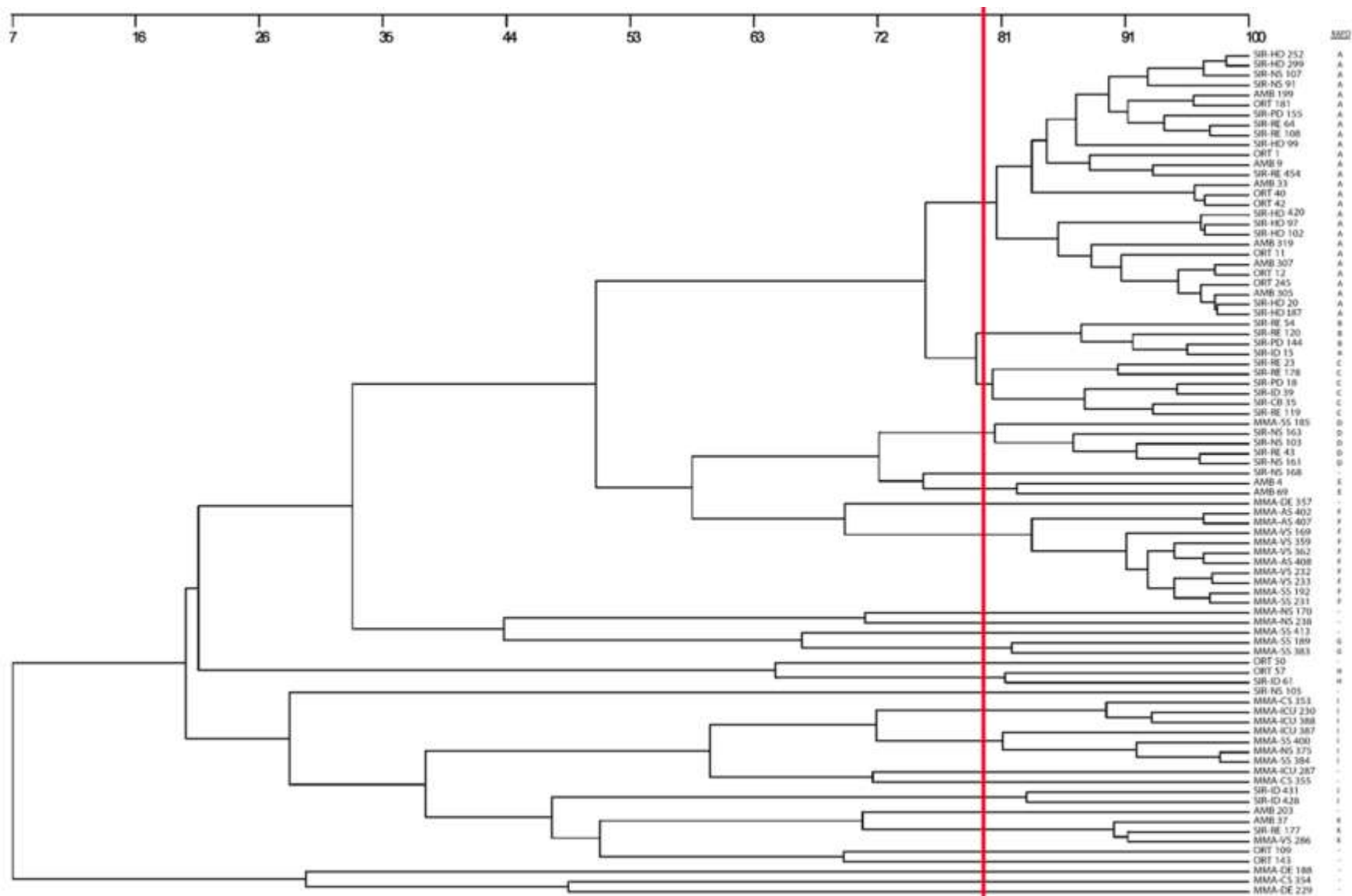
активност срещу широк спектър клетки - човешки и заешки еритроцити, както и срещу неутрофили, моноцити, гранулоцити и макрофаги (Aman MJ & Adhikari RP. 2014). Има данни, че *hlg* и съответно неговият извънклетъчен токсичен продукт са причина за отклонения в имунния отговор, неговото модулиране и потенциалното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

➤ Втората по големина група, означена като **клон F**, съдържаше 10 изолата, всички, циркулиращи във Военно Медицинска Академия, липсваха амбулаторни или други изолати, което показва регионално разпространение, доказано засега само в тази болница. Най-много бяха изолатите с този тип от Клиниката по съдова хирургия (n=5), следвани от Клиниката по коремна хирургия (n=3) и Клиниката по септична хирургия (n=2). За разлика от първата група, в тази всички изолати бяха НА, от постоперативни раневни инфекции, като половината от тях бяха аспирати от абсцеси, т.е. от инвазивни изолати, другите бяха секрети от постоперативни рани.

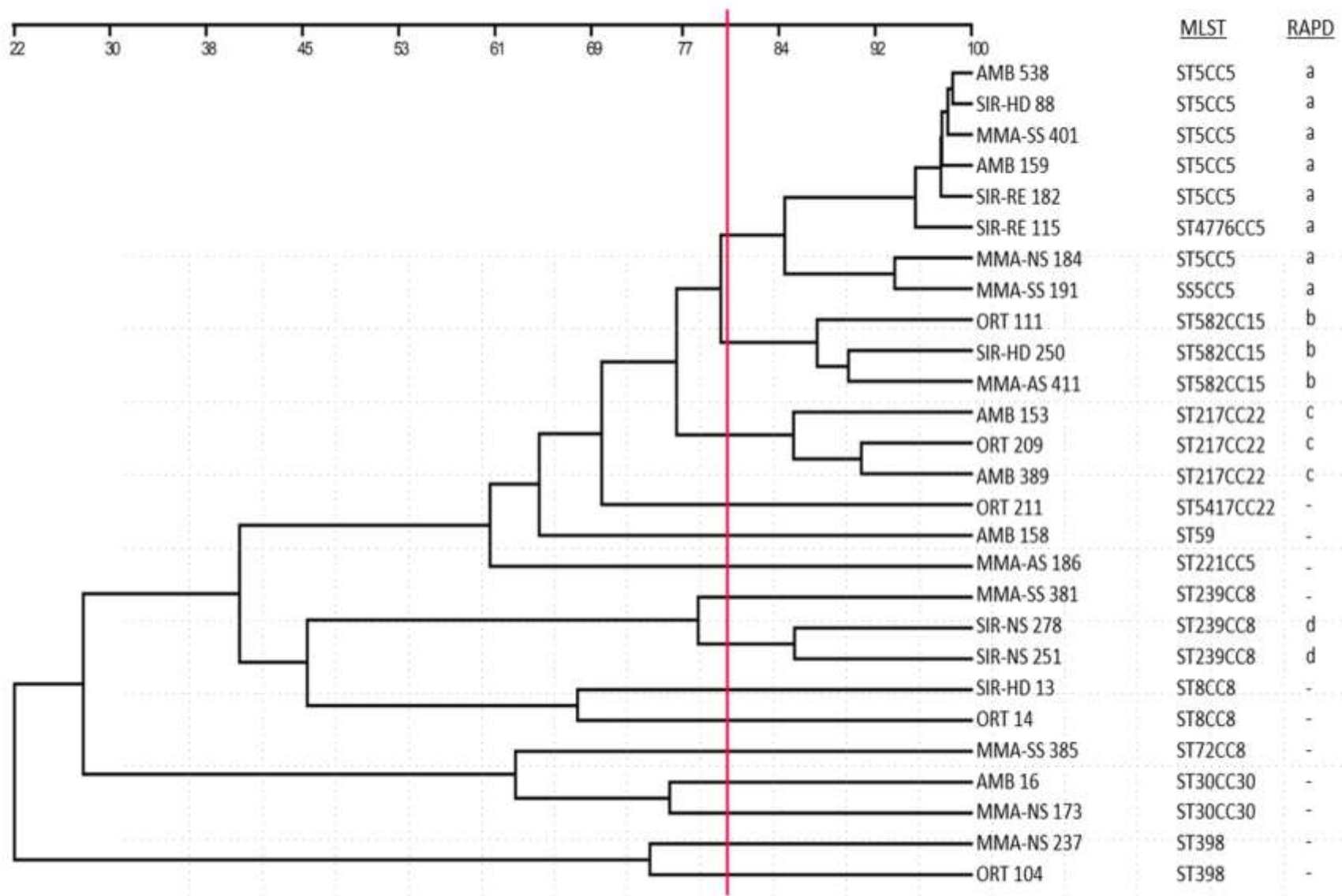
Друга разлика с първата група е че, щамовете в клон F, са изолирани предимно в периода 2018-2019г. Има само 2 изолата от 2017г и няма нито един от 2016г. Липсва съществена разлика във факторите на вирулентност. Отново се срещаха комбинации от гените *hlg*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *sei*, *sej* *seh*, липсваше само *seg*, като преобладаваха в повечето изолати генетичните елементи: *hlg*, *sei*, *sej*. Два от тези гена са отново от силните суперантигени, с изразена имуномодулираща роля, потискаща ефективния имунен отговор и подпомагаща навлизането на стафилококите в тъканите (Argudin MA et al. 2010; Jawetz, Melnick, &Adelberg's 2013; Karbuz A et al. 2017). Всички представители на този клон бяха чувствителни към макролиди и линкозамиди, както и към другите групи антимикробни средства.

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

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



Фигура 27. Епидемиологично типирание с RAPD на 83 изолата MSSA от три Университетски болници и от амбулаторни пациенти, уникален RAPD тип



Фигура 28. Епидемиологично типирание с RAPD на 27 изолата MRSA от 3 Университетски болници и от амбулаторни пациенти уникален тип.

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

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

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

епидемиология на MRSA инфекциите след определяне на типа последователност (ST) за даден бактериален изолат. Тази техника печели популярност сред изследователите, особено за изучаване на еволюцията на MRSA (CrisoStomo MI et al. 2001; Enright MC et al. 2002; Robinson DA et al. 2003; Feil EJ et al. 2003)

При епидемиологичното типизиране с RAPD на 27-те **MRSA** изолати бяха определени **4 клона и 11 изолата с уникален RAPD профил. Клоновете се състояха от между два и осем изолата и включваха 59,3 % от изолатите.** Те бяха означени като **a, b, c, d (Фигура 28).** Най-разпространен беше **клон a**, в 29,6% от тестваните изолати, а по 11,1% от щамовете попадаха в **клон b** и респективно в **клон c** и 7,4% са тези в **клон d**. Анализът на типизиране на мулти-локусни последователности при същите 27 изолати MRSA показва наличието на **пет клонални комплекси и 11 ST типа, включващи CC5 (ST5, ST221, ST4776), CC8 (ST8, ST239, ST72), CC15 (ST582), CC22 (ST217, ST5417), CC30 (ST30) и ST59, ST398, които не попадат в клонален комплекс (Таблица 20).** Разпределение на ST типовете сред колекцията от 27 MRSA клинични изолата е представено на **Фигура 29.** Най-честият клонален комплекс е **CC5** в 33,3%, а най-честия ST тип е **ST5CC5** (26,9%). На второ място с 22,2% е **CC8** и на трето (14,8%) е **CC22**. Три ST типове с еднаква честота от 11,1% се подреждат след най-честия **ST5CC5**. Това са **ST239CC8, ST582CC15, ST217CC22 (Фигура 29).** При сравнение с по-старо българско проучване върху стафилококови изолати за периода 2005-2011г. в НЦЗПБ, д-р Д. Нашев установява като най-чест секвенционен тип **ST5** в 38% от MRSA. С близка честота (37%) е установен тогава **ST239**, който сега се открива само в 11,5% и други съотваствия не се установяват (Нашев, 2013).

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

Първият **клон a**, респ. **клонален комплекс CC5**, който включва и най-много изолати (n=8) циркулира през целия период 2016 - 2020г в две от големите

Университетски болници SIR и MMA, както и сред амбулаторни пациенти. За ST5-CC5 е известно, че е опасен ендемичен клон, причиняващ тежки нозокомиални инфекции, наречен EMRSA Ню Йорк / Япония , защото има доказано разпространение в САЩ, Австралия и Азия (Geoffrey WC et al. 2006). Установени са няколко международни ендемични клона MRSA (EMRSA), циркулиращи на различни континенти и в различни държави. ST22-CC22 (EMRSA-15), ST239-CC8 (Aus-2 и Aus-3 EMRSA), ST8-CC8 педиатричен (ирландски-2 EMRSA), ST36-CC30 (EMRSA-16), ST5-CC5 (Ню Йорк / Япония EMRSA), ST8-CC8 вариант (ирландски-1 EMRSA) и класическия MRSA клон ST250-CC8. Само 3 EMRSA клона обикновено са полирезистентни ST239-CC8 (устойчив на тетрациклин, еритромицин, триметоприм, ципрофлоксацин и гентамицин), ST8-CC8 педиатричен (устойчив на еритромицин, триметоприм, и ципрофлоксацин) и варианта ST8-MRSA-II (устойчив на тетрациклин, еритромицин, триметоприм, ципрофлоксацин, гентамицин и мупироцин). (Geoffrey WC et al. 2006). Три от тези опасни ендемични клона EMRSA бяха установени в проучваните български изолати от болни със стафилококови инфекции, като един от тях **ST5CC5** е най-честият български клон MRSA. **75% от изолатите, принадлежащи към Клон а, респ. ST5CC5, са инвазивни** - от хемокултури и аспирати от абцес или от трехея на лежащо болни. Половината от изолатите съдържаха значителен брой гени, кодиращи фактори на вирулентност *hlg, seb, sec, seg, seh, sei, sej*, а останалите с 1-2 гена по-малко, което прави впечатление, че притежават голям брой от екзотоксините, които са същевременно и суперантигени. Тези данни са в унисон с изразената имуносупресираща роля и подпомагаща инвазията на стафилококите в тъканите и преживяването в биологичните течности (Argudin MA et al. 2010; Jawetz, Melnick, &Adelberg's 2013; Karbuz A et al. 2017). Освен присъщата им **повишена вирулентност е доказана пре всички от ST5CC5 и високо ниво на макролидна-линкозамидна резистентност от cMLSb тип (Таблица 18)**, кодирана предимно от *erm B*. Този клон освен като Ню Йорк е известен още като Марсилски клон, когато е свързан с муковисцидоза (Liu Y et al. 2016) Щамове, свързани с този клон са

докладвани в Португалия, Полша, Франция, Испания, Швеция, Дания, Великобритания, Колумбия, Бразилия, Аржентина, САЩ и Корея както като свързани с болнични инфекции, така и като придобити в обществото (Deurenberg et al. 2006, Monecke et al. 2011).

Клон b, съответстващ на секвенционен тип **ST582CC15**, беше установен през 2016 -2020г. и в трите болници, от които произхождаха изолатите. **В 2/3 от случаите изолатите бяха инвазивни и съдържаха сл. гени, кодиращи вирулентност *hlg, seb, sei,seh,sej*, а резистентността към макролиди-линкозамиди беше *ind MLSB* тип и се медираше от *ermA***. Представителите показаха голяма генетично сходство, запазено през годините, както по своите генетични детерминанти за патогенност, така и за отнасяне към антимикробни средства. Това е следващият секвенционен тип, който може да се асоциира с инфекции при болни с муковисцидоза муковисцидоза (Liu Y et al. 2016).

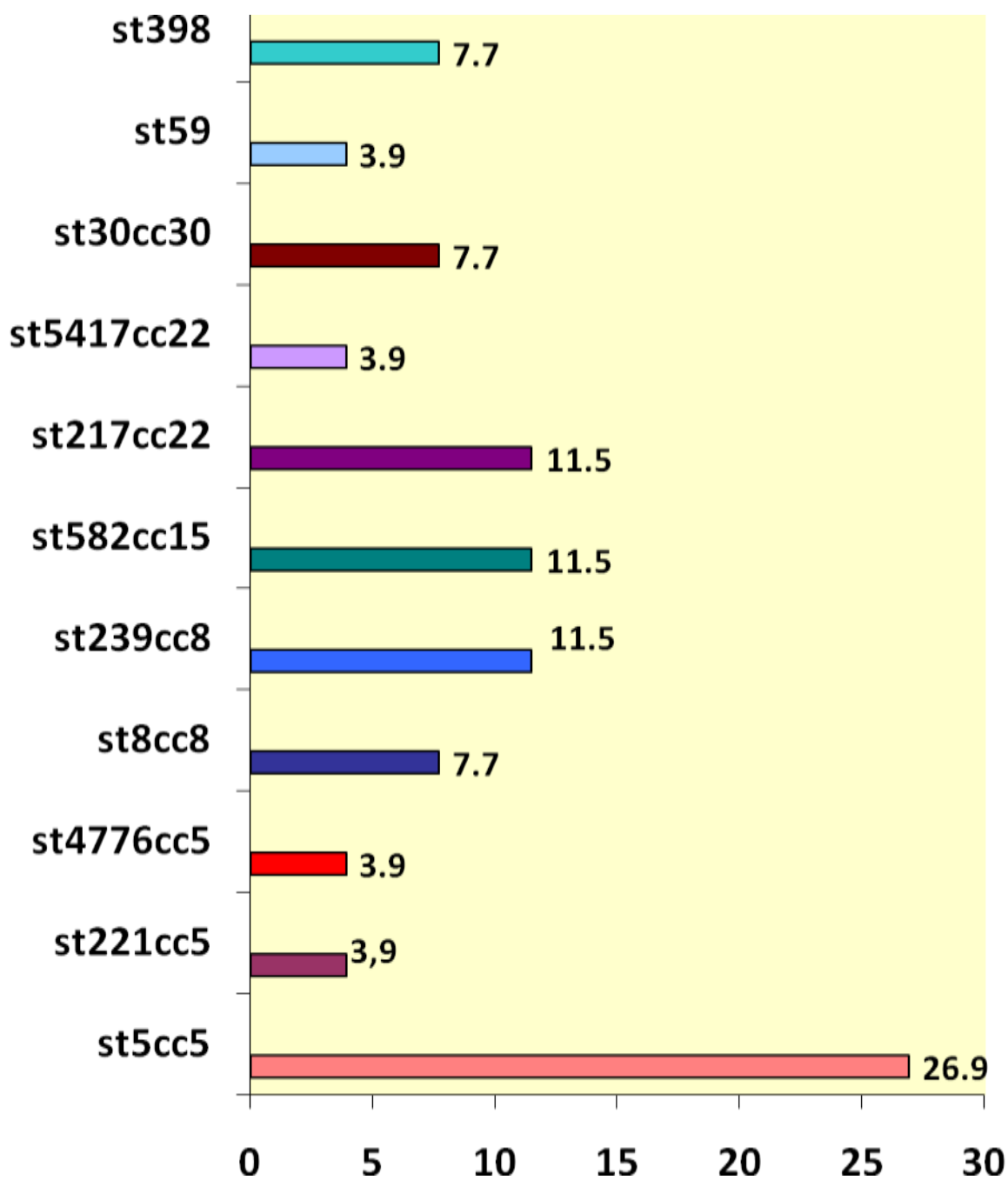
Клон c, който кореспондираше с **ST217CC22** беше установен само в 1 болница ORT и в амбулаторни пациенти. За разлика от предишната група, тук се наблюдаваше **значителна хетерогенност**, както при факторите на вирулентност, така и при резистентността - имаше чувствителни към макролиди/линкозамиди, а се откриваше и от трите типа на макролидна резистентност (**Таблица 20**) **ST 5417 CC22**, отново беше изолат от ORT. Този клон не се среща през 2019-2020г.

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

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

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

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



Фигура 29. Разпределение на ST типовете сред колекции от 27 MRSA клинични изолата

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

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

Беше установено, че **сред MRSA доминиращият тип е ST5CC5, съответстващ на RAPD тип а е персистиращ през целия проучван период (2016-2020г.), в две от големите Университетски болници SIR и MMA, както и сред амбулаторни пациенти. Това е известен международен епидемичен секвенционен тип, който е откриван и преди 10г. в България. Клон б, съответстващ на секвенционен тип ST582CC15 съдържаше щамове с висок епидемичен и инвазивен потенциал и циркулираше и в трите болници. Клон с, който кореспондираше с ST217CC22 беше установен само в 1 болница и в амбулаторни пациенти. За разлика от предишни групи, тук се наблюдаваше значителна хетерогенност. Клон d, респ. ST8-CC8 съдържаше само HA-MRSA и всички изолати бяха инвазивни. Този клон е известен като педиатричен ирландски EMRSA.**

Таблица 20. Разпределение на 27 изолата MRSA според MLST ST-CC, RAPD профила, клиничен материал, клиника, година на изолиране, носителство на гени за вирулентност и за резистентност към макролиди/линкозамиди, както и фенотипа макролидна резистентност

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

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

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

7. Изводи:

1. Разработеният и апробиран в практиката нов PCR алгоритъм за бързо откриване на *S. aureus*, MSSA и MRSA/CoN, директно в положителни хемокултури и/или при пунктати от абсцеси показва отлична специфичност и чувствителност. Той се явява много добра и по-бърза алтернатива на културелното изследване.

2. Установени са значителни нива на макролидна резистентност (34,05% за еритромицин и 23,03% за клидамицин) в проучените изолати *S. aureus* от 2016 – 2020г. Нивото на метицилиновата резистентност (10,93%) леко намалява през последните пет години в сравнение с предишен 10г. период. Устойчивостта към гентамицин, левофлоксацин, тетрациклин, хлорамфеникол и комбинацията триметоприм / сулфаметоксазол не превишава 10% и е недостатъчно клинично значима.

3. Докладват са нови факти за разпределението на важни фактори на вирулентност в различни по произход и антимикуробна чувствителност изолати *S. aureus*. Честотата на *cna* и *tst* е 14,2% и 6,5%, а гените за ентеротоксините се срещат в диапазона от 4,3% до 72,6%. Комбинации от три гена, *sei*, *seg* и *seb*, кодиращи суперантигени се доказват в повече от 60% от българските стафилококови изолати.

4. Открити са гените, преобладаващи в инвазивните *S. aureus*, независимо от тяхната антимикуробна чувствителност, в различни комбинации: *cna*, *tst-1*, *seb*, *seh*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* и *sei*, докато сред MRSA, които бяха изолирани в 63,6% от инвазивни инфекции и предимно от болнично лекувани пациенти доминират следните гени, кодиращи вирулентност: *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh* и *sei*.

5. Установено е, че при пеницилин резистентните стафилококови изолати се открива *blaZ* ген. Докато при метицилин резистентните се доказва само *mecA* гена.

6. Доказано е, че за резистентността към макролиди и линкозамиди в България са отговорни предимно *ermC* и *ermA*, следвани от *ermB* самостоятелно или в комбинации, а изключително рядко *msrA* и *mefA*.

7. Открива се ново доказателство за връзка между комбинацията от *ermA+ermC* със стафилококовия фенотип *sMLS* в проучените щамове *S. aureus*.

8. Препоръчва се подходяща емпирична терапия за инфекции, придобити в обществото и за такива, свързани с болничното обслужване, където са по-чести MRSA, с акцент към инвазивните инфекции. Ванкомицин, тигециклин или линезолид при инвазивни, системни инфекции. Нарастващата макролидна и линкозамидна резистентност налага тази група да се прилага само след доказана *in vitro* чувствителност.

9. Епидемиологичното типизиране чрез RAPD демонстрира широко вътреболнично разпространение на 24 клона и дивергенция на MSSA в периода 2016 – 2020г. Доминиращият тип А, циркулирал по-интензивно през 2016 и 2017 година, показва висок епидемичен и инвазивен потенциал. Изолатите от по-новия клон I, от 2018г. демонстрираха значително по-висока вирулентност и макролидна резистентност в 42,9%, кодирана от *ermB* и *ermC*.

10. Установени са чрез RAPD 15 клона MRSA, и посредством MLST пет клонални комплекса и 11 ST типа. Сред тях доминиращият секвенционен тип е ST5CC5 - известен международен епидемичен клон (EMRSA), съответстващ на RAPD клон **a** и персистиращ през целия проучван период с висок епидемичен и инвазивен потенциал. Секвенционен тип ST582CC15, съответстващ на клон **b**, отново съдържаше щамове с високи вирулентност и епидемичност от трите болници. Клон **c**, който кореспондираше с ST217CC22, проявяващ значителна хетерогенност, е установен само в 1 болница и в амбулаторни пациенти. Клон **d**, респ. ST8-CC8, съдържащ само инвазивни HA-MRSA, също е известен международен EMRSA.

8. Справка за приносите на дисертационния труд

❖ Приноси с оригинален характер

1. Установени са най-честите механизми, кодиращи клинично значимата резистентност към бета-лактами от *blaZ* ген, обуславящ пеницилинова резистентност и *mecA*, откриван при MRSA. За първи път са получени доказателства, че в България резистентността към макролиди и линкозамиди се дължи на *ermC* и *ermA*, последвани от *ermB* самостоятелно или в комбинации, а изключително рядко на *msrA* и *mefA*

2. Проучен е за първи път в България подробно генетичния профил на патогенния потенциал и разпределението на важни фактори на вирулентност в различни по произход и антимикуробна чувствителност български клинични изолати *S. aureus*, Комбинации от три гена, *sei*, *seg* и *seb*, които са а силни SAgs са открити в повече от 60% от българските стафилококови изолати.

3. За първи път в български изолати *S. aureus* е доказана асоциацията на гените на вирулентност *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh* и *sei* с MRSA и инвазивността на инфекциите.

4. Открива се за първи път връзка между комбинацията от *ermA+ermC* със стафилококовия фенотип cMLS в проучените щамове *S. aureus* и доминиращият секвенционен тип ST5CC5.

5. Извършено е мащабно епидемиологичното типизиране на подбрани *S. aureus* чрез RAPD. Доказва се широко вътреболнично разпространение на 24 клона MSSA в периода 2016 – 2020г. като преобладаващ е клон А в 31,8%. Установена е дивергенция на MSSA през проучения период.

6. Нови факти се откриват при MRSA - 15 циркулиращи клона MRSA с RAPD, а с MLST - пет клонални комплекса и 15 ST типа. Два от доминиращите клона се оказват известни международни секвенционни типа (EMRSA).

❖ Приноси с потвърдителен характер

1. Установена е преобладаваща честота на стафилококовите инфекции в детско юношеска възраст, за сметка на значителния брой респираторни изолати, включени в проучването; приблизително по равно се установяват при мъже и жени, с леко преобладаване на мъжкия пол в 54%.

2. Потвърдена е високата устойчивост на изолатите *S. aureus* към пеницилин, а метицилиновата резистентност е определена в 10,93% и не показва възходяща тенденция. Резистентността към гентамицин, левофлоксацин, тетрациклин, хлорамфеникол и комбинацията триметоприм / сулфаметоксазол е оценена като недостатъчно клинично значима.

❖ Приноси с научно-приложен характер

1. За първи път в България е разработен и апробиран в практиката нов алгоритъм за бързо откриване на *S. aureus* чрез PCR на MSSA и MRSA, а също и на MRSCoN директно в положителни хемокултури и / или при пунктати от абсцеси чрез откриване на *mecA* (кодиращ метицилинова резистентност) и специфичен ген за видова идентификация на *S. aureus* - методът дава ценна информация за избор на ранна етиологично насочена терапия при тежко болни пациенти.

2. След анализ на резултатите от определяне на чувствителността към изпитаните антимикробни средства и проучените механизми на резистентност се препоръчва подходяща емпирична терапия за инфекции, придобити в обществото, както и за такива, свързани с болничното обслужване.

9. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд

❖ Реални публикации

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

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

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

❖ Участия в научни форуми- симпозиуми и конгреси:

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

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

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

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

10. Участия в проекти, свързани с дисертационния труд:

1. Договор №Д-56/2017 с вх. №8263/2.12.16 на МУ-София, СМН: Проучване токсигенността и макролидната резистентност на клинично значими пиогенни коки *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*.

2. Договор № 45 /8.3.2021 на МУ-София, СМН: Епидемиологично типизиране с молекулярно-генетични методи на изолати *Staphylococcus aureus* от различни инфекции

Книгопис:

1. Величкова Н, Павлова В. Статистика. Основен курс. УНСС, Университетско издателство “Стопанство”. 2006; 225-229, 273-275.
2. Митов И, Сечанова Л, Боянова Л, Гергова Р, Марковска Р, Стратева Т, et al. Ръководство за практически упражнения по медицинска Микробиология, под ред. на чл. кор. проф. И. Митов, 2015.
3. Нашев ДГ. Микробиологична характеристика на метицилин-резистентните *Staphylococcus aureus*, изолирани в България. Дисертационен труд. 2013г
4. Сепетлиев Д. Медицинска статистика. Медицина и физкултура. 1976; 72-79.
5. AareSTRup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsberg CS, Jensen NE. Frequency of alpha and beta hemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. APMIS. 1999; (107): 425–430.
6. Abbasi M, Salehi MB, Bahador N, Taherikalani M. Antibiotic ResiSTance Patterns and Virulence Determinants of Different SCCmec and Pulsotypes of *Staphylococcus aureus* Isolated from a Major Hospital in Ilam, Iran. Open Microbiol J. 2017; (11): 211-223.
7. Abbasi M, Salehi MB, Bahador N, Twherikalani M. Antibiotic ResiSTance Patterns and Virulence Determinants of Different SCCmec and Pulsotypes of *Staphylococcus Aureus* Isolated from a Major Hospital in Ilam, Iran. Open Microbiol J. 2017; (11): 211-223.
8. Abraham T, SiSTla S. Molecular epidemiology of macrolide resiStant Group A Sreptococcii from Puducherry, India J Infect Dev Ctries 2017; 11(9): 679-683.
9. Adhikari RP, Cook GM, Lamont I, Lang S, Heffernan H. Phenotypic and molecular characterization of community occurring, WeSTern Samoan phage pattern

methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 50, (145): 825-831.

10. Adhikari RP, Shrestha S, Barakoti A, Amatya R. Inducible clindamycin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. *BMC Infectious Diseases* 2017; 417- 483.

11. Alghadban S, Kenawy HI, Dudler T, Schwaeble WJ, Brunskill, N. J. Absence of the lectin activation pathway of complement ameliorates proteinuria-induced renal injury. *Front. Immunol.* 2019; (10): 2238.

12. Aman MJ & Adhikari RP. Staphylococcal Bicomponent Pore-Forming Toxins: Targets for Prophylaxis and Immunotherapy. *Toxins.* 2014; 6, 950-972.

13. Archer GL & Bosilevac JM. Microbiology. Signaling antibiotic resistance in *Staphylococcus*. *Science.* 2001; (291): 1915–1916.

14. Aretz J, Anumala UR, Fuchsberger FF, Molavi N, Ziebart N, Zhang H. Allosteric inhibition of a mammalian lectin. *J. Am. Chem. Soc.* 2018; (140): 14915–14925.

15. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins.* 2010; 2, 1751–1773.

16. Arias LFC, Espinal JSL, Ortiz JIM, Ibarra JJ, Aldana AA. Relationship between super antigenicity, antimicrobial resistance and origin of *Staphylococcus aureus* isolated. *Colombia Médica.* 2016; 47, (1): 15-20.

17. Arvidson S, Holme T, Lindholm B Gram-positive pathogens. Washington DC: American Society for Microbiology, 2000; 38, (1): 379-385.

18. Asante J, Govinden U, Owusu-Ofori A, BeSTer L, Essack SY. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a hospital in Ghana *Afr J Clin Exper Microbiol* 2019; 20 (3): 164-174.

19. Asante J, Govinden U, Owusu-Ofori A, BeSTer L, Essack SY. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a hospital in Ghana *Afr J Clin Exper Microbiol.* 2019; 20, (3): 164-174.

20. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA Lancet, 2002; (359): 1819-1827.
21. Bantel H, Sinha B, Domschke W, Peters G, Schulze-OSThoff K, Jänicke RU. A-toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling, Journal of Cell Biology, 2001; 155, (3): 637–647.
22. Barbero F, Russo L, Vitali M, Piella J, Salvo I, Borrajo ML. Formation of the protein corona: the interface between nanoparticles and the immune syStem. *Semin Immunol.* 2017; (34): 52–60.
23. Barre A, Simplicien M, BenoiST H, Van Damme EJM, Rouge P. Mannose-specific lectins from marine algae: diverse Structural scaffolds associated to common virucidal and anti-cancer properties. *Mar. Drugs.* 2019; (17): 440.
24. Barrett FF, McGehee RF Jr, Finland M. Methicillin-resiSTant *Staphylococcus aureus* at BoSTon City Hospital: bacteriologic and epidemiologic observations, 1968; 279, (9): 441-488.
25. BaSTos MCF, Coutinho BG, Coelho MLV. LysoSTaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals* 2010; 3, 1139-1161.
26. Below S, Konkell A, Zeeck C. Virulence factors of *Staphylococcus aureus* induce Erk-MAP kinase activation and c-Fos expression in S9 and 16HBE14o- human airway epithelial cells, American Journal of Physiology, 2009; 296, (3): 470–479.
27. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP. A New Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin F, Associated with Toxic-Shock-Syndrome *Staphylococcus aureus* Isolates. Lancet. 1981; (1): 1017–1021.
28. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*, Microbiological Reviews, 1991; 55, (4):733–751.
29. Bianco C, Arena F, Rossetti B, Migliorini R, Gallizi P, De Luca A, Rossolini GM, Montagnani F. FirST report of spondylodiscitis due to vancomycin

heteroresistant *Staphylococcus capitis* in immunocompetent host. *J Infect Chemother.* 2014; 20, (10): 639–642.

30. Bieber L, Kahlmeter G. *Staphylococcus lugdunensis* in several niches of the normal skin flora. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; (16): 385–388.

31. Bismuth R, Zilhao R, Sakamoto H, Guesdon JL, Courvalin P. Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1990; (34): 1611–1614.

32. Blanquart F. Evolutionary epidemiology models to predict the dynamics of antibiotic resistance. *Evol Appl.* 2019; 21, (3): 365–383.

33. Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends Biochem. Sci.* 2016; (41): 274–286.

34. Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2006; 38, (4): 504–509.

35. Boswihi SS, Udo EE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Curr Med Res Pract* 8:18–24, Planet P (2017) Life after SA300: the rise and fall of a superbug. *J Infect Dis* 2018; (215): S71–S77.

36. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Cultivation of Microorganisms. In: Jawetz, Melnick & Adelbergs *Medical Microbiology*, 23rd edition. McGraw-Hill Companies, United States 2004; (6): 62–64.

37. Brown AF, Leech JM, Rogers TR, McLoughlin RM. *Staphylococcus aureus* colonization: Modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Front. Immunol.* 2004; 364, 703–705.

38. Bushra JS. What Are the Symptoms of Toxic Shock Syndrome? - WebMD <https://www.webmd.com> Women's Health Guide 2019.

39. Cantekin Z, Ergun Y, Solmaz H, Ozmen G. PCR assay with hoST specific internal control for *Staphylococcus aureus* from bovine milk samples. *Mac Vet Rev.* 2015; 38, (1): 97-100.
40. Carroll K. C. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums. *Journal of clinical microbiology*, (2002); 40, (9): 3115-3120.
41. Carver PL. The battle for iron between humans and microbes. *Curr. Med. Chem.* 2018; (25): 85–96.
42. Cary S, Krishnan M, Marion TN, Silverman GJ. The murine clan V(H) III related 7183, J606 and S107 and DNA4 families commonly encode for binding to a bacterial B cell super antigen. *Mol Immunol*, 1999; 36 (1): 769-776.
43. Cassidy P, Harshman S. biochemical studies on the binding of ¹²⁵I labeled α -toxin to rabbit erythrocytes, *Biochem J*, 1976; (15): 2348–2355.
44. CDC. Healthcare-associated Infections in the United States, 2006–2016: A Story of Progress. <https://www.cdc.gov/hai/surveillance/data-reports/data-summary-assessing-progress.htm>. Accessed 06 Oct 2018. Hassoun A, Linden PK, Friedman
45. Cetin ES, Gunes H, Kaya S. Macrolide–lincosamide–Streptogramin B resistance phenotypes in clinical Staphylococcal isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31, (4): 364–368.
46. Chaix C, Durand-Zaleski I, Alberti C, Brun-Buisson C. Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cost-benefit analysis in an intensive care unit, *JAMA* .1999; 282, (18): 1745-1751.
47. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis.* 2001; (7): 178–182.
48. Chancey ST, Bai X, Kumar N, Drabek EF, Daugherty SC, Colon T, Ott S, Sengamalay N, Sadzewicz I, Tallon LZ, Fraser SM, Tetelin H, Stephens DS. Transcriptional attenuation controls macrolide inducible efflux and resistance in

Streptococcus pneumoniae and in other Gram-positive bacteria containing *mef/mel(msr(D))* elements. *PLoS One*. 2015; 10, (1): 0116254.

49. Chang SC, Chen YC, Luh KT, Hsieh WC. Macrolide resistance of common bacteria isolated from Taiwan. *Diagn Microb Infect Dis*. 1995; 3, (2): 103-106.

50. Chavakis T1, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes, *Nature Medicine*, 2002; 8, (7): 687–693.

51. Cheesbrough M. Catalase test. In: *District Laboratory Practice Tropical Countries, Part 2, low price Egyptian edition*. The Anglo-Egyptian Bookshop, Egypt, 2004; 4, (4): 64-65.

52. Chen LF. The changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 50 years of a superbug. *Am. J. Infect. Control*, 2013; (41): 448-451.

53. Chen TR, Chiou CS, Tsen HY. Use of Novel PCR Primers Specific to the Genes of *Staphylococcal Enterotoxin G, H, I* for the Survey of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Food-Poisoning Cases and Food Samples in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol*. 2004; 92, (1): 189–197.

54. Chen TR, Chiou CS, Tsen HY. Use of Novel PCR Primers Specific to the Genes of *Staphylococcal Enterotoxin G, H, I* for the Survey of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol*. 2004; (92): 189–197.

55. Cheung AL, Projan SJ, Gresham H. The genomic aspect of virulence, sepsis, and resistance to killing mechanisms in *Staphylococcus aureus*, *Current Infectious Disease Reports*, 2002; 4, (3): 400–410.

56. Chitra Edwin, Jeffrey Parsonnet, Edward H. Kass *The Journal of Infectious Diseases*. 1998; 158, (6): 1287-1295

57. Cisek AA, Dabrowska I, Gregorczyk KP, Wyzewski Z. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. *Curr. Microbiol.* 2017; (74): 277–283.
58. Colin DA, Mazurier I, Sire S, Finck-Barbancon VF. Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation, *Infection and Immunity*, 1994; 62, (8): 3184–3188.
59. Couto I, Wu SW, Tomasz A, and de Lencastre H. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. *J. Bacteriol.* 2003; (185): 645–653.
60. Cribier B, Piemont Y, Grosshans E. Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. A clinical review illustrated with a new case. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1994; (30): 319–324.
61. Crisostomo MI, Weisheit H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, de Lencastre H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; (98): 9865–9870.
62. Cuny C, Wieler LH, Witte W. Livestock-associated MRSA: the impact on humans. *Antibiotics (Basel)* 2015; 4; (4): 521–543.
63. Czekał T, Ciszewski M, Szewczyk EM. *Staphylococcus haemolyticus* – an emerging threat in the twilight of the antibiotics age *Microbiology* 2015; (161): 2061–2068.
64. Dagi HT, Findik D, Deirel G, Aslan U. Detection of Methicillin Resistance and Various Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Nasal Carriers. *Balk Med J.* 2015; (32): 171-175.

65. Dantes R, Belflower Mu, Aragon Y, Dumyati R, Harrison D, Lessa G, et.al. National burden of invasive methicillin-resiSTant *Staphylococcus aureus* infections, United STates, 2011; (173): 1970–1978.
66. De Haas CJC, Veldkamp KE, Peschel A. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent, *Journal of Experimental Medicine*, 2004; 199, (5): 687–695.
67. De LencaSTre H, Couto I, Santos I, Melo-CriSTino J, TorresPereira A, Tomasz A. Methicillin-resiSTant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1994; (13): 64-73.
68. Deleo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin InveST*, 2009; (119): 2464–2474.
69. Delgado GJr, Neuhauser MM, Bearden DT, Danziger LH. QuinupriSTin-dalfopristin: an overview. *Pharmacotherapy*. 2000; (20): 1469–1485.
70. Deodhar D, Varghese G, Balaj VI, John J. Prevalence of Toxin Genes among the Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and its Clinical Impact. *J. Glob. Infect. Dis.* 2015; 3, 97–102.
71. Deodhar D, Varghese G, Balaji V, John J2, Rebekah G, Janardhanan J, Jeyaraman R, Jasmine S, Mathews P. Prevalence of Toxin Genes among the Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and its Clinical Impact. *J Glob Infect Dis.* 2015; 7, (3): 97–102.
72. Dickinson RB, Nagel JA, McDevitt D, FoSTer TJ, Proctor RA. Cooper SL. *Infect Immun.* Aug;1995; 63, (8): 3143-3150.
73. Diekema DJ, Hsueh PR, Mendes RE, Pfaller MA, RolSTon KV, Sader HS. The Microbiology of BloodSTream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 24, 63, (7): 00355-00419.

74. Diekema DJ, Hsueh PR, Mendes RE, Pfaller MA. The Microbiology of BloodStream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 7, 24-63.
75. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN. et al. 1999; 32, (3): 114-132.
76. Dimov SG, Strateva T, Petkova V, Dimitrova M, Atanasova D, Mitov I. Phylogenetic relatedness clustering thresholds of potentially bacteriocinogenic clinical and dairy *Enterococcus* spp. strains with respect to their geographical origins in Bulgaria. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* 2015/2016; 5, (3): 286-289.
77. Dinges MM, Orwin PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13, (1): 16-34.
78. Doery HM, Magnusson BJ, Cheyne IM, Gulasekharam J. A phospholipase in *Staphylococcus aureus* toxin which hydrolyses sphingomyelin, *Nature*, 1963; 198, (4885): 1091–1092.
79. Dragneva Y, Anuradha CD, Valeva A, Hoffmann A, Bhakdi S, Husmann M. Subcytotoxic attack by Staphylococcal alpha-toxin activates NF- κ B and induces interleukin-8 production, *Infection and Immunity*, 2001; 69, (4): 2630–2635.
80. Dramsi S, Magnet S, Davison S, Arthur M. *FEMS Microbiol.* 2008; 32, (2): 307-320.
81. Eady EA, Ross JI, Tipper JL, Walters CE, Cove JH, Noble WC. DiSTribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically diSTinct groups of Staphylococci *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 31, (2): 211–217.
82. Enright MC, Nicholas PJ Day, Catrin E Davies, Sharon J Peacock, Brian G Spratt. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus* *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* 2000. 38; (3): 1008–1015.

83. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary hiSTory of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; (9): 7687–7692.
84. European Center for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resiSTance in Europe; 2017. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resiSTance-europe-2018>.
85. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Breakpoint Tables – bacteria; Version 9.0. 2019; <http://www.eucaST.org>
86. Falugi F, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. Role of protein A in the evasion of hoST adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. 2013; 4, (5): 513-575
87. Faria C, Vaz-Moreira I, Serapicos E, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resiSTance in coagulase negative STaphylocoCCi isolated from wastewater and drinking water. *Sci. Total Environ.* 2009; 2, (407): 3876–3882.
88. Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NP (2003) How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 2003; (11): 3307–3316.
89. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F, Etienne J. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes, *Current Infectious Disease Reports*, 2005; 7, (6): 420–428.
90. Figdor CG, Kooyk Van, Adema YGJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; (2): 77-84.
91. Flick MJ, Du XL, Prasad JM, Raghu H, Palumbo JS, Smeds E, et al. Genetic elimination of the binding motif on fibrinogen for the *Staphylococcus aureus* virulence factor ClfA improves hoST survival in septicemia. *Blood*, 2013; 121, (10): 3400-3406.

92. Flock JI, Fröman G, Jönsson K, Guss B, Signäs C, Nilsson B, et al. Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*, EMBO Journal, 1987; 6, (8): 2351–2357.
93. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Maryland Heights, MO, USA: Mosby. 2007; 842-855.
94. Foster J. Immune evasion by Staphylococci, Nat. Rev. Microbiol. 2005; 12, (3): 948–958.
95. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*, Trends in Microbiology, 1998; 6, (12): 484–488.
96. Franklin D & J Clin Invest. Low Antimicrobial Resistance: the example of *Staphylococcus aureus* 2003; 111, (9): 1265-1273.
97. Frodermann V, Chau TA, Sayedyahosseini S, Toth JM, Heinrichs DE, Madrenas JA. Modulatory interleukin-10 response to Staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 2011; 204, (1): 253-262.
98. Fuda CC, Fisher JF, Mobashery S. Cell Mol Life Sci. Prevalence of blaOXA-1 and blaDHA-1 AmpC β -Lactamase-Producing and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Iran, 2005; 62, (22): 2617-2633.
99. Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids, EMBO Reports, 2004; 5, (8): 777–782.
100. Gelanew T, Hailu A, Schonian G, Lewis MD, Miles MA, Yeo M. Multilocus sequence and microsatellite identification of intra-specific hybrids and ancestor-like donors among natural Ethiopian isolates of *Leishmania donovani*. Int. J. Parasitol. 2014; 44, 751–757.
101. GeneTier AL, Michallet MC, Prévost G. *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils, Journal of Clinical Investigation, 2005; 115, (11): 3117–3127.

102. Geoffrey W Coombs, Julie C Pearson, Frances G O'Brien, Ronan J Murray, Warren B Grubb, Keryn J Christiansen, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clones, WeST.ern AuSTralia Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 12, No. 2, February. 2006; 12; (2): 241.

103. Gergova R, Petrova G, Gergov S, Minchev P, Mitov I, STrateva T. Microbiological Features of Upper Respiratory Tract Infections in Bulgarian Children for the Period 1998–2014. Balkan medical journal, 2016; 33, (6): 675-679.

104. Gergova R, Petrova G, Gergov S, STrateva T, Minchev P, Gergov S. Microbiological features of the upper respiratory tract infections in Bulgarian children for the period 1998-2014 our university's experience. Balk Med J. 2016; (33): 675-680.

105. Gergova RT, Gueorgieva T, Dencheva-Garova MS, KraSTeva-Panova AZ, Kalchinov V, Mitov I. Antimicrobial activity of different disinfection methods against biofilms in root canals. J InveSTig Clin Dent, 2016; (7): 254-262.

106. Gergova RT, Slavova MP, Boev MS, Mourdjeva VI, Yotova LK, Georgieva Nikolova RT. Comparative investigation the feasibility of bacterial biofilms formation on the surface of hybrid material UREASIL, Bulgarian Chemical Communications, 2015; 47, (2): 706-713.

107. Giampiero Pietrocola , Giulia Nobile, Simonetta Rindi and Pietro Speziale. *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017.

108. Giampiero Pietrocola , Giulia Nobile, Simonetta Rindi, Pietro Speziale. *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017.

109. Gilbert I. Dissociation in an encapsulated *Staphylococcus*. J. Bacteriol. 1931; (21): 157–160.

110. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for panton Valentine Leukocidin

and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002. (359): 53–60.

111. Gómez MI, Lee A, Reddy B. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1, *Nature Medicine*, 2004; 10, (8): 842–848.

112. Gomez MI, O'Seaghda M, Magargee M, FoSTER TJ, Prince AS. *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J BiolChem*. 2006; 281, (2): 20190–20196.

113. Goodyear CS, Silverman GJ. Death by a B cell superantigen: *in vivo* VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a *Staphylococcus aureus* toxin. 2003; 197, (1): 1125–1139.

114. Gotz F, Verheij HM, RosenSTEIN R. Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chem Phys Lipids* 1998; (93): 15-25.

115. Greenlee-Wacker MC, Rigby KM, Kobayashi SD, Porter AR, DeLeo FR, Nauseef WM. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. *J. Immunol*. 2014; 15, (10): 4709-4717.

116. Grumann D, Scharf S, Holtfreter C, Kohler L, STEIL S, Engelmann M. Immune cell activation by enterotoxin gene cluster (egc)-encoded and non-egc superantigens from *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol*. 2008; (181): 5054-5061.

117. Grundmann. H, Hori. S, Winter B, Tami A, AuSTIN D. Risk factors for the transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an adult intensive care unit: fitting a model to the data, *J Infect Dis*. 2002; 185, (4): 481-488.

118. Guay GG, Khan SA, RothSTEIN DM. The *tet(K)* gene of plasmid pt181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. *Plasmid* 1993; 30, (1): 163–166.

119. Güdücüoğlu H. Hospital infections related with hospital microbial environment *EaST J Med* 2015; 20: 177-181.

120. Hany L. MD Assistant professor of medical microbiology and Immunology Sulaiman Al Rajhi Colleges. 2017;
121. Hardwick N, Parry CM, Sharpe GR. Staphylococcal scalded skin syndrome in an adult. Influence of immune and renal factors. *Br. J. Dermatol.* 1995; (132): 468–471.
122. Harrison L, Mahon CR, Lehman DC, Mansuelis G *STapphyloCCus*. Textbook of DiagnoSTic microbiology, Thirddedition, Editors. 2007; 84, (4): 367-381.
123. Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 2000; (96): 2149-2156.
124. Haseeb A, Ajit Singh V, Teh CSJ, Loke MF. Addition of ceftaroline fosamil or vancomycin to PMMA: an *in vitro* comparison of biomechanical properties and anti-MRSA efficacy. *J. Orthop. Surg.* 2019; (27): 2309499019850324.
125. Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit Care* 2017; (21): 211.
126. Hayashida A, Bartlett AH, FoSTer TJ, Park PW. *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1, *American Journal of Pathology*, 2009; 174, (2): 509–518.
127. Hedman P, Ringertz O, Eriksson B, Kvarnfors P, Andersson M, Bengtsson L, Olsson K. *Staphylococcus saprophyticus* found to be a common contaminant of food. *J. Infect.* 1990; (21): 11–19.
128. Hensler T, Konig B, PrevoST G, Piemont Y, Koller M, Konig W. Leukotriene B4 generation and DNA fragmentation induced by leukocidin from *Staphylococcus aureus*: protective role of granulocyte-macrophage colony-STimulating factor (GM-CSF) and G-CSF for human neutrophils, *Infection and Immunity*, 1994; 62, (6): 2529–2535.
129. Hildebrand A, Pohl M, Bhakdi S. *Staphylococcus aureus* α -toxin: dual mechanism of binding to target cells *Journal of Biological ChemiSTry*. 1991; 266, (26): 17195–17200.

130. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2001; (9): 486–493.

131. Holtfreter S, Bröker BM. *Staphylococcal* superantigens: do they play a role in sepsis *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2005; 53, (1): 13–27.

132. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Steiner TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; (23): 99–139.

133. Hu XJ, Li A, Lv LX, Yuan C, Guo L, Jiang X, Jiang H, Qian G, Zheng B, Guo J, Li LJ. High quality draft genome sequence of *Staphylococcus cohnii subsp. cohnii* strain hu-01 *Stand Genomic Sci.* 2014; 9, (3): 755–762.

134. Huffman DL, Abrami L, Sasik R, Corbeil J, Der Goot FG Van. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004; 101, (30): 10995–11000.

135. Husmann M, Dersch K, Bobkiewicz W, Beckmann E, Veerachato G, Bhakdi S. Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming *Staphylococcus aureus* alpha-toxin or streptolysin O, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; (344): 1128–1134.

136. Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; (183): 201–207.

137. Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, Makino S. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; (71): 2793–2795.

138. Ivić I, Karanović J, Pavičić-Ivelja M. Sepsis with multiple abscesses caused by *Staphylococcus warneri*: a case report *Cent Eur J Med*, 2013; 8, (1): 45-47.

139. Ivić I, Karanović J, Pavičić-Ivelja M. Sepsis with multiple abscesses caused by *Staphylococcus warneri*: a case report *Cent Eur J Med*, 2013;8(1): 45-47.

140. J Clin Invest. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. 2003; (9): 1265-1273.
141. Jaeger KE, Ransac BS, Dijkstra WC, Colson M, van Heuvel, Misset O. Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev 1994; (15): 29-63.
142. Jaffrézou JP, Maestre N, De Mas-Mansat V, Bezombes C, Levade T, Laurent G. Positive feedback control of neutral sphingomyelinase activity by ceramide, FASEB Journal, 1998; 12, (11): 999–1006.
143. Jansson B, Uhlen M, Nygren P. All individual domains of *Staphylococcus* protein A show Fab binding. FEMS 1998; (120): 66-78.
144. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G. A Highly Prevalent Operon of Enterotoxin Gene, Forms a Putative Nursery of Superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol. 2001; (166): 669-677.
145. Jawetz, Melnick, & Adelberg's. Medical Microbiology Twenty-Sixth Edition. The *Staphylococcus* 2013; 199 – 207.
146. Jessica C, Johnson-Mackinnon, Philip BB, Crosbie , Egil Karlsbakk, Mar Marcos-Lopez, Richard Paley, Barbara F Nowak, Andrew R Bridle. Typing (MLST) and Random Polymorphic DNA (RAPD) Comparisons of Geographic Isolates of *Neoparamoeba perurans*, the Causative Agent of Amoebic Gill Disease. *Pathogens* 2019; 8, (4): 244.
147. Jiang DL, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol. Rev.* 2011; 2, (91): 221–264.
148. Jung BS, Lee YJ, Na-Kyoung, Lee, Kim H, Oh M, Paik H. Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolated from Korean Pork bulgogi: Enterotoxin Production and Antimicrobial Resistance. *Korean J Food Sci An.* 2015; (35): 502-506.
149. Kalia VC, Purohit HJ. Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. *Crit. Rev. Microbiol.* 2011; (37): 121–140.

150. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures pore-forming mechanism organization of the genes, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004; 2, (68): 981–1003.

151. Kanoh S, Rubin B. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immune-modulatory medications. *Clinical microbiology reviews*, 2010; 23 (3): 590-615.

152. Karbuz A, Karahan ZC, Aldemir-Kocabaş B. Evaluation of antimicrobial susceptibilities and virulence factors of *Staphylococcus aureus* strains isolated from community-acquired and health-care associated pediatric infections. *Turk J Pediatr*. 2017; (59): 395-403.

153. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000; (44): 1549–1555.

154. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat. Immunol*. 2010; 11, (5): 373-384.

155. Kenneth Todar text book of.net/resantimicrobial.html 2012

156. Kernodle DS, Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JJ. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. In *Gram-positive pathogens*. editors. American Society for Microbiology. Washington, DC, USA. 2000; 609–620.

157. Khodabandeh M, Mohammadi M, Abdolsalehi MR, Alvandimanesh A, Gholami M, Bibalan, MJ, et al. Analysis of Resistance to Macrolide-Lincosamide-streptogramin B Among *mecA*-Positive *Staphylococcus Aureus* Isolates. *Osong Public Health Res Perspect*. 2019;10, (1): 25–31.

158. Khodabandeh M, Mohammadi M, Abdolsalehi MR, Alvandimanesh A, Gholami M, Bibalan MH, Pournajaf A, Kafshgari R, Rajabnia R. Analysis of Resistance to Macrolide-Lincosamide-streptogramin B Among *mecA*-Positive *Staphylococcus Aureus* Isolates. *Osong Public Health Res Perspect*. 2019; 10, (1): 25–31.

159. Khoshnood S, Heidary M, Asadi A, Soleimani S, Motahar M, Savari M. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of

mupirocin against *Staphylococcus aureus*. *Biomed. Pharmacother.* 2019; (109): 1809–1818.

160. Khoshnood S, Shahi F, Jomehzadeh N, Montazeri EA, Saki M, Mortazavi SM. DiSTribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn patients. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2019, 66, (3): 387-398.

161. Klein EY, Mojica N, Jiang W, Cosgrove SE, Septimus E, Morgan DJ. Trends in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations in the United States, 2010–2014. *Clin. Infect. Dis.* 2019; (65): 1921–1923.

162. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. 2007; (298): 1763-1771.

163. Kloos WE, Musselwhite MS. DiSTribution and resistance of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl. Microbiol.* 1975; (30): 381–385.

164. Kloos WE, Schleifer KH. Isolation and characterization of *Staphylococci* from human skin. II. Description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1975; (25): 62–79.

165. Kloos WE, Schleifer KH. *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983; (33): 9–14.

166. Kobayashi SD, DeLeo FR. *Staphylococcus aureus* protein A promotes immune suppression. *MBio*, 2013; 4, (5): 00764-13.

167. Koni BG, Prevost G, Piemont Y, Konig W. Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes, *Journal of Infectious Diseases*, 1995; 171, (3): 607–613.

168. Kreis T, Vale R. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*, Oxford University Press, Oxford, UK. 1999;

169. Kronvall G, Seal US, FinSTad J, Williams RCJ. Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of gG globulin using Staphylococcal protein A. *J Immunol*, 1970; (104): 140-147.
170. Kronvall G, Williams RC. Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. *J Immunol*, 1969; (103): 828-833.
171. Krut O, Bekeredjian-Ding I. Contribution of the immune response to phage therapy. *J. Immunol.* 2018; (200): 3037–3044
172. Kuluev BR, Baymiev AK, Gerashchenkov GA, Chemeris DA, Zubov VV, Kuluev AR, Baymiev AK, Chemeris AV. Random priming PCR strategies for identification of multilocus DNA polymorphism in eukaryotes. *Russ. J. Genet.* 2018; 54, (1): 499–513.
173. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia, *Science*, 2007; 315, (5815): 1130–1133.
174. Labischinski H. *Med Microbiol Immunol.* Consequences of interaction of β -lactam antibiotics, 1992 ;181, (5): 241-265.
175. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, PoSTon SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing Staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; (12): 224–242.
176. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J.* 1992; (6): 2397–2404.
177. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*, 2002; 34, (4): 482-492.
178. Lee LY1, Höök M, Haviland D, Wetsel RA, Yonter EO, Syribeys P. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *Journal of Infectious Diseases*, 2004; 190, (3): 571–579.
179. Lee LYL, Liang X, Höök M, Brown EL. Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb), *Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279, (49): 50710–50716.

180. Ler SG, Lee FK, Gopalakrishnakone P. Trends in Detection of Warfare Agents. Detection Methods for Ricin, Staphylococcal Enterotoxin B and T-2 Toxin. *J. Chromatogr. A*. 2006; 1133, (1-2): 1–12.

181. Li M, Al-Jamal KT, KoSTarelos K, Reineke J. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *ACS Nano*. 2010; (4): 6303–6317.

182. Li M, Zou P, Tyner K, Lee S. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of pharmaceutical nanoparticles. *AAPS J*. 2017; (19): 26–42.

183. Li N, Luo M, Fu YJ, Zu YG, Wang W, Zhang L. Effect of corilagin on membrane permeability of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Phytother. Res*. 2013; (27): 1517–1523.

184. Li T, Lu H, Wang X, Gao Q, Dai Y, Shang J. Molecular CharacteriSTics of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine MaSTitis between 2014 and 2015. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; (7): 127.

185. Liang Y, Tu C, Tan C, Dai M, Xia Y, Liu Y, Zhong LL, Shen C, Chen G, Tian GB, Liu J, Zheng X. Antimicrobial resiSTance, virulence genes profiling and molecular relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospitalized patients in Guangdong Province, China. *Infection and drug resistance*. 2019; 12, (1): 447–459.

186. Lim D, Strynadka NC. structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat.struct. Biol*. 2002; (9): 870–876.

187. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther*. 2017; (8): 162–173.

188. Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus* *Journal of Infectious Diseases*, 2004; 189, (12): 2334–2336.

189. Lina G1, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in

primary skin infections and pneumonia, *Clinical Infectious Diseases*, 1999; 29, (5): 1128–1132.

190. Lindmark R, Thoren-Tolling K, Sjoquist J. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J Immunol Methods*, 1983; (62): 1-13.

191. Liu Y, Zhang J, Zhong D, Ji L, Yang J, Phillips J. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients with cystic fibrosis. *World J Microbiol Biotechnol* 2016; (32): 162.

192. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils, *PLoS Pathogens*. 2010; 6, 733-751.

193. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils, *PLoS Pathogens*, 2010; 6, (1): 1000715.

194. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections, *The New England Journal of Medicine*, 1998; 339, (1): 520–532.

195. Lu WP, Sun Y, Bauer MD, Paule S, Koenigs PM, Kraft WG. *Biochemistry*. May 1999; 18, (20): 6537-6546.

196. Lucas A, Manica H, Cohen PR. *Staphylococcus lugdunensis* Infections of the Skin and Soft Tissue: A Case Series and Review *Dermatol Ther (Heidelb)* 2017; (7): 555–562.

197. Lyell A. Toxic epidermal necrolysis. *Nurs. Mirror Midwives J*. 1973; 136, (2): 42-45.

198. Madani A, Garakani K, Mofrad MRK. Molecular mechanics of *Staphylococcus aureus* adhesin, CNA, and the inhibition of bacterial adhesion by stretching collagen. *PLOS One*. 2017; 6, 95-1086.

199. Mahmoud Khodabandeh, Mohsen Mohammadi, Mohammad Reza Abdolsalehi, Azadeh Alvandimanesh, Mehrdad Gholami, Meysam Hasannejad Bibalan,

et al. Analysis of ResiSTance to Macrolide–Lincosamide–STreptogramin B Among mecA-Positive *Staphylococcus Aureus* Isolates Osong Public Health and Research Perspectives 2019; 10, (1): 25-31.

200. Mahon CR, Manuselis, G, Lehman DC. TextBook of Diagnostic Microbiology. 3th Edition, Saunders, USA. 2007; 321, 373, 383, 527.

201. Mahon CR. Textbook of Diagnostic microbiology, third edition, pp. 2007; 6, 367-382.

202. Maiden CJM, Bygraves J, Feil E, Morelli G, Russel J, Urwin R, Spratt B. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95, 3140–3145.

203. Manilal A, Shewangizaw M, Mama M, Gezmu T, Merdekios B. Methicillin-resiSTant *Staphylococcus aureus* colonization in HIV patients of Arba Minch province, Ethiopia: Carriage rates, antibiotic resiSTance, and biofilm formation. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2019; 66, (4): 469-483.

204. Maresso AW, Schneewind O. Sortase as a target of anti-infective therapy, Pharmacological Reviews, 2008; 60, (1): 128–141.

205. Mark C Enright, Nicholas PJ Day, Catrin E Davies, Sharon J Peacock, Brian G Spratt. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-ResiSTant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus* JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2000; 38; (3): 1008–1015.

206. Marques MB, Weller PF, Parsonnet J, Ransil BJ, Nicholson-Weller. A. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, a possible virulence factor of *Staphylococcus aureus*, Journal of Clinical Microbiology, 1989; 27, (11): 2451–2454.

207. Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006; 70, (1): 192–221.

208. Martin FJ, Gomez MI, Wetzel DM, Memmi G, O'Seaghda M, Soong G, et al. *Staphylococcus aureus* activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein A. *J Clin Invest*, 2009; (119): 1931–1939.

209. Massimi I, Park E, Rice K, Muller-Esterl W, Sauder D, McGavin MJ. Identification of a novel maturation mechanism and restricted substrate specificity for the Ssp B cysteine protease of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 2002; (277): 41770–41777.

210. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 1999; (285): 760–763.

211. Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. 2011; (40): 1049–1057.

212. Mehrshad S, Haghkhah M, Aghaei S. epidemiology and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin and soft tissue infections in Shiraz, Iran. *Turk J Med Sci*. 2016; 10. (46): 1507-1564.

213. Mehtrotra M, Wang G, Johns WM. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38, 1032–1035.

214. Melania Cruciani, Marilena P, Etna Romina Camilli, Elena Giacomini, Zulema A Percario, Martina Severa, Silvia Sandini, Fabiana Rizzo, Valentina Brandi, Giuliana Balsamo, Fabio Polticelli, Elisabetta Affabris, Annalisa PantoSTi, Fabio Bagnoli and Eliana M. CoCCia *Staphylococcus aureus* Exs Factors Control Human Dendritic Cell Functions Conditioning Th1/Th17 Response *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2017; 7, 330.

215. Melish ME, Glasgow LA. The *Staphylococcal* scalded-skin syndrome, *New England Journal of Medicine*, 1970; 282, (20): 1114–1119.

216. MeneSTrina GM, Dalla Serra, Prévost G. Mode of action of β -barrel pore-forming toxins of the Staphylococcal α -hemolysin family, *Toxicon*, 2011; 39, (11): 1661–1672.
217. Meyer F, Girardot R, Piemont Y, PrevoST G, Colin DA. Analysis of the specificity of Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect. Immun.* 2009; (77): 266–273.
218. Miles G, Movileanu L, Bayley H. Subunit composition of a bicomponent toxin: STaphylocoCCal leukocidin forms an octameric trans membrane pore, *Protein Science*, 2002; 11, (4): 894–902.
219. Miller LS, Cho JS. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11, (3): 505–518.
220. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM. Impaired T(h)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-ige syndrome. 2008; 452, (7188): 773-776.
221. Mitova Y, Angelova S, Doicheva V, Donkov D, Mincheva Ts. Clinical and etiological structure of nosocomial infections in Bulgaria for the period 2011-2016. *Acta Med Bulgar*, 2017; (2): 26-30.
222. Mitova Y, Angelova S, Doicheva V, Donkov M, Mincheva TS. Clinical and etiological structure of nosocomial infections in Bulgaria for the period 2011-2016. 2017; 44, (2): 26-30.
223. Moks T, Abrahmsen L, Nilsson B, Hellman U, Sjoquist J, Uhlen M. Staphylococcal protein A consiSTs of ®veIgGbindingdomains. *Eur J Biochem*, 1986; (156): 637-643.
224. Momtaz H, Dehkordi FS, Rahimi E, Tajbakhsh S, Shokoohizadeh L. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat in Isfahan province. *Iran J Appl Poult Res.* 2013; 22, (4): 913-921.
225. Monecke S, Gavier-Widen D, Mattsson R, RangSTrup-ChriSTensen L, Lazaris A, Coleman DC, Shore AC, Ehricht R. Detection of mecC-positive

Staphylococcus aureus (CC130-MRSA-XI) in diseased European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. *PLoS One*. 2013; 8, (6): 66166.

226. Montgomery CP, Daniels M, Zhao F, Alegre ML, Chong AS, Daum RS. Protective immunity against recurrent *Staphylococcus aureus* skin infection requires antibody and interleukin-17a. *Infect. Immun*. 2004; 82, (5): 2125-2134.

227. Moriah J Castleman, Srijana Pokhrel, Kathleen D Triplett, Donna F Kusewitt, Bradley O Elmore, Jason A Joyner, Jon K Femling, Geetanjali Sharma, Helen J Hathaway, Eric R. Prossnitz and Pamela R. Hall 8, The Journal of Immunology Innate Sex Bias of *Staphylococcus aureus* Skin Infection Is Driven by a-Hemolysin. 2017;

228. Morlock BA, Spero L, Johnson AD. Mitogenic activity of *Staphylococcal* exfoliative toxin, *Infection and Immunity*, 1980; 30, (2): 381–384.

229. Morris CA, Conway HD, Everall PH. Food-Poisoning Due to *Staphylococcus* Enterotoxin E. *Lancet*, 1972; (2): 1375–1376.

230. Murai M, Moriyama H, Hata E, Takeuchi F, Amemura-Maekawa J. Variation and association of fibronectin-binding protein genes *fnbA* and *fnbB* in *Staphylococcus aureus* Japanese isolates. *Microbiol Immunol*. 2016; 60, (5): 312 - 325.

231. Naimi TS, LeDell KH, Boxrud DJ, Groom AV, Steward CD, Johnson SK. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 2001; 33, (7): 990-996.

232. Nayeli Alva-Murillo, Alejandra Ochoa-Zarzosa, Joel E. López-Meza Sodium Octanoate Modulates the Innate Immune Response of Bovine Mammary Epithelial Cells through the TLR2/P38/JNK/ERK1/2 Pathway: Implications during *Staphylococcus aureus* Internalization *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2017; (7): 18.

233. Nesin M, Svec P, Lupski JR, Godson GN, Kreiswirth B, Kornblum J. Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, *tetA(M)*, from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990; 34, (2): 2273–2276.

234. Neuhaus FC, Baddiley J. Micro boil Mol Bio lRev. A continuum of anionic charge: STructures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. 2003; 67, (4): 686-723.
235. Nguyen T, Ghebrehiwet B, Peerschke EI. *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for Staphylococcal interactions with platelets. Infect Immun 2000; (68): 2061-2068.
236. Nguyen TH, Park MD, Otto M. HoST Response to Staphylococcus epidermidis Colonization and Infections, Front Cell Infect Microbiol, 2017; 21, (7): 90.
237. Nuti R, Goud NS, Saraswati AP, Alvala R, Alvala M. Antimicrobial peptides: a promising therapeutic STrategy in tackling antimicrobial resistance. *Curr. Med. Chem.* 2017; (24): 4303–4314.
238. Nys S, van Merode T, Bartelds AI, Stobberingh EE. Urinary tract infections in general practice patients: diagnoSTic teSTs versus bacteriological culture. J. Antimicrob. Chemother. 2006; (57): 955–958.
239. Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M. Immuno deficiencies. Impairment of immunity to candida and mycobacterium in humans with bi-allelic rorc mutations. 2015; 138, (6): 1531–1540.
240. Olivieri R, Morandi M, Zanchi A, Tordini G, Pozzi G, De Luca A. Evolution of macrolide resiSTance in *Streptococcus pyogenes* over 14 years in an area of central Italy, Journal of medical microbiology. 2015; 64, (10): 1186-1195.
241. Olson R, Nariya H, Yokota K, Kamio Y, Gouaux E. crystal STructure of STaphyloCCal LukF delineates conformational changes aCCompanying formation of a transmembrane channel. Nat. struct. Biol. 1999; 6, (2) 134–140.
242. Ortega E, Abrioue H, Lucas R, Gálvez A. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Super-antigenic Activity, and Correlation to Antibiotic ResiSTance.Toxins. 2010; 2, 2117-2131.
243. Otto M. Phenol-soluble modulins. Int. J. Med. Microbiol. 2014; 304, 164–169.

244. Özdemiri, H., and Keyvan, E. Isolation and characterisation of *Staphylococcus aureus* STraInS isolated from beef, sheep and chicken meat. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2016; (63): 333-338.

245. Paniagua-Contreras GL, Vaca-Paniagua Felipe E, Rodríguez-Moctezuma MP. Expression of enterotoxin-coding genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from Mexican haemodialysis patients. Ann Clin Microbiol Anti. 2014; (13): 55- 68

246. Pardo L, Machado V, Cuello D, Aguerrebere P, Seija V, Braga V, et al. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and their associated genotypes in *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary level public hospital of Uruguay. ReviSTa Argentina de Microbiología 2020; 369, (1): 9.

247. Pardo L, Machado V, Cuello D, Aguerrebere P, Seija V, Braga V, Varela G. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resiSTance phenotypes and their associated genotypes in *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary level public hospital of Uruguay. 2020;

248. Park PW, FoSTer TJ, Nishi E, Duncan SJ, Klagsbrun M, Chen Y. Activation of Syndecan-1 Ectodomain Shedding by *Staphylococcus aureus* α -Toxin and β -Toxin, Journal of Biological ChemiSTry, 2004; 279, (1): 251–258.

249. Patel D, Ellington MJ, Hope R, Reynolds R, Arnold C. Desai Identification of genetic variation exclusive to specific lineages associated with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. J Hosp Infect M. 2015; (91): 136–145.

250. Payne AS, Hanakawa Y, Amagai M, STanley JR. Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. Curr. Opin. Cell. Biol. 2004; 16, 536–543.

251. Peck KR, Baek JY, Song JH, Ko Ks. Comparison of genotypes and enterotoxin genes between *Staphylococcus aureus* isolates from blood and nasal colonizers in a Korean hospital. J Korean Med Sci. 2009; 24, (4): 585-591.

252. Pekana A & Green E. Antimicrobial Resistance Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat Carcasses and Bovine Milk in Abattoirs and Dairy Farms of the EaSTern Cape, South Africa. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2018; 15, 2223.

253. Pekana A, Green E. Antimicrobial ResiSTance Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat Carcasses and Bovine Milk in Abattoirs and Dairy Farms of the EaSTern Cape, South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2018; 15, 2223.
254. Pereira V, Lopes C, CaSTro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol*, 2009; 26, (3): 278-82.
255. Pérez-Montarelo D, Viedma E, Murcia M, Muñoz-Gallego I, Larrosa N, Brañas P, et al. Pathogenic CharacteriSTics of *Staphylococcus aureus* Endovascular Infection Isolates from Different Clonal Complexes. *Front Microbiol* 2017; 917, (8): 1-13
256. Perez-Perez M, Jorge P, Perez Rodriguez G, Pereira MO, Lourenco A. Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: new insights through network mining. *Biofouling*. 2017; (33): 128–142.
257. Perry AM, Ton-That H, Mazmanian SK, Schneewind O. Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. III. Lipid II is an *in vivo* peptidoglycan subStrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring. *J BiolChem*, 2002; (277): 16241–16248.
258. Planet P. Life after USA300: the riseand fall of a superbug. *J Infect Dis* 2017; (215): S71–S77.
259. Prat C, Bestebroer J, De Haas CJC, Van STrijp AG, Van Kessel KPM. A new Staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1, *Journal of Immunology*, 2006; 177, (11): 8017–8026.
260. Prat C, BeSTebroer J, De Haas CJ, Van STrijp JA. A new Staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1, *J. Immunol*. 2002; 11, 177-183.
261. Prince AS, Mizgerd JP, Wiener-Kronish J, Bhattacharya J. Cell signaling underlying the pathophysiology of pneumonia, *American Journal of Physiology*, 2006; 291, (3): 297–300.

262. Projan SJ, Novick RP. The molecular basis of pathogenicity, p. *In*. Crossley KB, Archer GL, The Staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, N.Y. 1997; 55-81.

263. Rahman MM, Amin KB, Rahman SMM, Khair A, Rahman M, Hossain A, Rahman AKMA, Parvez MS, Miura N, Alam MM. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates from humans and animals by culture methods and multiplex PCR. *BMC Vet Res.* 2018; 3, 14 (1): 300.

264. Rao S, Kumar A, Peravali JB, Ram KS, Pulicherla KK. Staphylokinase: a Boon in Medical Sciences. *Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences.* 2013; 2, (2): 28–34.

265. Ratner AJ, Hippe KR, Aguilar JL, Bender MH, Nelson AL, Weiser JN. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins, *Journal of Biological ChemiSTry*, 2006; 281 (18): 12994–12998.

266. Robbins JB, Egan WB, Vann W, Liu D. Virulence properties of bacterial capsular polysaccharides-unanswered questions, *In* H. Smith, J. Skehel, M. Turner (ed.), *The molecular basis of microbial pathogenicity.* VerlagChemie GmbH, Weinheim, Germany. 1980; 115–132.

267. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; (47): 3926–3934.

268. Roman F, Iniguez AM, Yeo M, Jansen AM. Multilocus sequence typing: Genetic diversity in *Trypanosoma cruzi* I (TC I) isolated from Brazilian didelphids. *Parasites Vectors* 2018; 11, 107.

269. Rooijackers SHM, Ruyken M, Roos A. Immune evasion by a *Staphylococcal* complement inhibitor that acts on C3 convertases, *Nature Immunology*, 2005; 6, (9): 920–927.

270. Rosato Adriana E, Rosato Barry N, Kreiswirth William A, Craig William Eisner, Michael W Climo, Gordon LArcher. *mecA-blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; (47): 1460–1463.

271. Rose F1, Dahlem G, Guthmann B, Grimminger F, Maus U, Hänze J. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *Staphylococcus aureus* α -toxin, *American Journal of Physiology*, 2002; 282, (2): 207–214.

272. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. Inducible erythromycin resistance in Staphylococci is encoded by a member of ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol*. 1990; (4): 1207–1214

273. Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, Chan WC, Williams P, OGara JP, Massey RC. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. *J Infect Dis*. 2012; 205, (5): 798–806.

274. Rupp ME, Soper DE, Archer GL. Colonization of the female genital tract with *Staphylococcus saprophyticus*. *J. Clin. Microbiol*. 2009; (30): 2975–2979.

275. Rusev V, Rusenova N, Simeonov R, Stratev D. *Staphylococcus warneri* and *Shewanella putrefaciens* Coinfection in Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) and Hybrid Sturgeon (*Huso huso* x *Acipenser baerii*) *J Microbiol Exp*. 2016; 3, (1): 00078.

276. Sader HS, Mendes RE, Streit JM, Flamm RK. Antimicrobial susceptibility trends among *Staphylococcus aureus* from U.S. hospitals: results from 7 years of the ceftaroline (AWARE) surveillance program (2010–2016). *Antimicrob Agents Chemother* 2017; (1): 01043-17.

277. Sagar AR. Biochemical TeST and Identification of *Staphylococcus aureus*. 2018; 15,

278. Saitou N & Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol*. 1987; 4, 406–425.

279. Salton MRJ. *biochim. Biophys. Acta*, 22, 495 Studies of the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some Gram-positive and Gram-negative bacteria. 10, 1995; (4): 512-523.

280. Sanchez ML, Flint KK, Jones RN. Occurrence of macrolide- lincosamide-Streptogramin resistances among Staphylococcal clinical isolates at a university

medical center. Is false susceptibility to new macrolides and clindamycin a contemporary clinical and in vitro testing problem. 1993;16, (3): 205-213.

281. Sarrou S, Malli E, Tsilipounidaki K, Florou Z, Medvecky M, Skoulakis A, et al. MLSB-Resistant *Staphylococcus aureus* in Central Greece: Rate of Resistance and Molecular Characterization. Microb Drug Res, Mary Ann Liebert, Inc. 2018;

282. Sarrou S, Malli E, Tsilipounidaki K, Patinaki F, Skoulakis A. MLSB-Resistant *Staphylococcus aureus* in Central Greece: Rate of Resistance and Molecular Characterization. Microb Drug Res, Mary Ann Liebert, Inc. 2019; 25, (4): 4. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0259>

283. Sasso EH, Silverman GJ, Mannik M. Human IgM molecules that bind Staphylococcal protein A contain VHIIIH chains. J Immunol, 1989; (142): 2778-2783.

284. Sauer P, Sila J, Stosová T, Večeřová R, Hejnar P, Vágnerová I, Kolář M, Raclavský V, Petrželová J, Lovečková Y, Koukalová D. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. J Med Microbiol. 2008; (57): 403–410.

285. Sayari A, Agrebi N, Jaoua S, Gargouri Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. Biochimie. 2001; 83, 863-71.

286. Sayari AN, Agrebi S, Jaoua Gargouri Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. Biochimie, 2001; (83): 863-871.

287. Schleifer KH, Kloos WE. Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1975; (25): 50–61.

288. Schleifer KH, Kroppenstedt RM. Chemical and molecular classification of *Staphylococcus*. 1990; (19): 9-24.

289. Schmitz FJ, R. Sadurski A, Kray M, Boos R, Geisel K, Köhrer J, Verhoeve J, Fluit AC. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45, (1): 891-894.
290. Schmitz FJ, Sadurski A, Kray M, Boos R, Geisel K, Köhrer J, et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45, 891-894
291. Schneewind O, Mihaylova-Petkov D, Model P. Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *EMBO* 1993; (12): 4803–4811.
292. Schneider PF, Riley TV. *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections: epidemiological data from Western Australia. *Eur. J. Epidemiol.* 1996; (12): 51–54.
293. Schroeder M, Brooks B D., Brooks A E. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. *Genes.* 2017; 8, (1): 39.
294. Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. *Genes.* 2017; 8, (1): 39.
295. Schwarz S, Roberts MC, Werckenthin C, Pang YJ, Lange C. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals, *Vet. Microbiol.* 1998; (63): 217-227.
296. Semagn K, Bjørnstad A, Ndjioudjop MN. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 2006; 5, 2540–2568.
297. Seng R, Kitti T, Thummeepak R, Kongthai P. Biofilm formation of methicillin- Resistant coagulase negative Staphylococci (MR-Co NS) isolated from community and hospital environments . *PLoS ONE.* 2017; 12, (8): (184172)
298. Seppala I, Kaartinen M, Ibrahim S, Makela O. Ig-coded by VH families S107 or J606 bind to protein A. *J Immunol.* 1990; (145): 293-298.

299. Shakibaie MR, Golkari Y, Salajegheh G. Antimicrobial susceptibility, virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from hospital infections in Kerman, Iran, *Journal of Microbiology and Infectious Diseases / JMID*/ 2014; 4, (4): 152-158.

300. Shasad Sharif, Manmilan Singh, Sung JoonKim, Jacob Schaefer. *Journal of the American Chemical Society*, 2009; 131, (20): 7023-7030.

301. Shlezinger M, Khalifa L, Hourri-Haddad Y, Copenhagen-Glazer S, Resch G, Que YA. Phage therapy: a new horizon in the antibacterial treatment of oral pathogens. *Curr. Top. Med. Chem.* 2017; (17): 1199–1211.

302. Shoji K, Shinjoh M, Horikoshi Y, Tang J, Watanabe Y, Sugita K, et al. High rate of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates – A multicenter Study in Tokyo, Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2015; 21 (2): 81-83

303. Shukla SK, Karow M E, Brady JM, Stemper ME, Kislow J, Moore N, Wroblewski K, Chyou PH, Warshauer DM, Reed KD, Lynfield R, Schwan WR.. Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2010; 48, (10): 3582–3592.

304. Sibbald MJ, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, de Jong A, Harmsen HJ. Mapping the pathways to Staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; (70): 755–788.

305. Sipahi OR, Uysal S, Aydemir SŞ, Pullukçu H, Taşbakan M, Tünger A, et al. Antibacterial resistance patterns and incidence of hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia in a tertiary care educational hospital in Turkey: a perspective through 2001-2013. *Turk J Med Sci.* 2017; 47, (4): 1210 – 1215.

306. Sjobring U, Trojnar J, Grubb A, Akerstrom B, Bjorck L. Ig-binding bacterial proteins also bind proteinaseinhibitors. *J Immuno*, 1998; (1143): 2948-2954

307. Sjødahl J. Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding. *Eur J Biochem*, 1977; (73): 343-351.
308. Smith EJ, Visai L, Kerrigan SW, Speziale P, Foster TJ. The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2011; (79): 3801–3809.
309. Sneath PHA & Soka RR. Numerical taxonomy. San Francisco: Freeman Publishing). 1973.
310. Speziale P1, Pietrocola G, Rindi S, Provenzano M, Provenza G, Di Poto A. Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host, *Future Microbiology*, 2009; 4, (10): 1337–1352,
311. Speziale P and Pietrocola G. The Multivalent Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in Host Infections. *Front. Microbiol.* 2020; (11): 2054.
312. Stefan Schwarz, Jianzhong Shen, Kristina Kadlec, Yang Wang, Geovana Brenner Michael, Andrea T. Feßler, Birte VeSTER Lincosamides, Streptogramins, Phenicol, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance. *Cold Spring Harbor Perspect Med.* 2016; 6, (11): 027-037.
313. Stentzel S, Sundaramoorthy N, Michalik S, Nordengrün M, Schulz S, Kolata J, Specific serum IgG at diagnosis of *Staphylococcus aureus* blood stream invasion is correlated with disease progression. *J. Proteom.* 2015; 14, (128): 1-7.
314. Surewaard BG, De Haas CJ, Vervoort F, Rigby KM, DeLe FR, Otto M. *Staphylococcus aureus* alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. *Cell. Microbiol.* 2016; 15, (1): 1427–1437.
315. Swartz MN. Use of antimicrobial agents and drug resistance. *N. Engl. J. Med.* 2007; (337): 491– 492.
316. Szewczyk EM, Nowak T, Cieślowski T. Potential Role of *Staphylococcus cohnii* in a Hospital Environment, *Microb Ecol Health Dis*, 2003; 1, (15): 51-56.

317. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010; 140, (6): 805-820.
318. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol*. 2000; 165, (10): 5392-5396.
319. Tevell S, Hellmark B, Nilsson-Augustinsson A, Söderquist B. *Staphylococcus capitis* isolated from prosthetic joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017; (36): 115 –122.
320. Tevell S, Hellmark B, Nilsson-Augustinsson A. *Staphylococcus capitis* isolated from prosthetic joint infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017; (36): 115 –122.
321. Tortora Gerard J, Funke Berdell R, Case Christine L. *Microbiology: An Introduction* (11 ed.). Glenview, IL: Pearson Education Inc. 2013; 978, (321): 73360-73363.
322. Tsatsaronis JA, Walker MJ, Sanderson-Smith ML. Host Responses to Group A *Streptococcus*: Cell Death and Inflammation *PLOS Pathogens*, 2014; 10, (8): 1004266.
323. Tzaneva V, Mladenova I, Todorova G, petkov D. Antibiotic treatment and resistance in chronic wounds of vascular origin. *Clujul Med* 2016; 89, (3): 365-370.
324. Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L, Lindberg M. Complete sequence of the Staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem*, 1984; 259, (3): 1695-1702.
325. Usha MG, Shwetha DC, Vishwanath G. Speciation of coagulase negative Staphylococcal isolates from clinically significant specimens and their antibiogram. *IJPM*; 2013;56, (3): 258-260.
326. Uzun B, Güngör S, Pektaş B, Aksoy Gökmen A, Yula E, Koçal F, et al. Macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) resistance phenotypes in clinical *Staphylococcus* isolates and investigation of telithromycin activity. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2014; (48): 469-476.

327. Valeva A, Walev I, Pinkernell M, Walker B, Bayley H, Palmer M. Transmembrane beta-barrel of Staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94, (1): 11607–11611.
328. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13, (3): 1-46.
329. van der Mee-Marquet N, Achard A, Mereghetti L, Danton A, Minier M, Quentin R. *Staphylococcus lugdunensis* infections: high frequency of inguinal area carriage. *J. Clin. Microbiol*. 2003; (41): 1404–1409.
330. Van Heijenoort J. *Glycobiology*. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. 2001; 11, (3): 25-36.
331. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. *Vet. Microbiol*. 2007; 121, 368–372.
332. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: A redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2012; 16, (2): 12-14.
333. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: A redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2012; 12, 651-657.
334. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Hechard Y. Delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* 2009; 30, 817–823.
335. VeSTergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiol. Spectr*. 2019; (7): GPP3-0057-2018.
336. Vollmer W, Blanot D, Pedro De. Peptidoglycan structure and architecture. *MA.FEMS Microbiol Rev Mar*, 2008; 32, (2): 149-167.

337. Walev I, Weller U, STrauch S, FoSTer T, Bhakdi S. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 1996; 64, 2974–2979.
338. Wang J, Pan Y, Shen J, Xu Y. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of bloodstream infections: a sySTEMatic review and meta-analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2017; (16): 24.
339. Wang LX, Hu ZD, Hu YM, Tian B, Li J, Wang FX, Yang H, Xu HR, Li YC, Li J. Molecular analysis and frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes isolated from bloodStream infections in a teaching hospital in Tianjin, China. *Genet Mol Res.* 2013; 12, (1): 646.
340. Wang Q, Yang Q, Wu W. Graphene-based steganographic aptasensor for information computing and monitoring toxins of biofilm in food. *Front. Microbiol.* 2020; (10): 3139.
341. Wardenburg JB, Schneewind O. Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia, *Journal of Experimental Medicine*, 2008; 205, (2): 287–294.
342. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, VanBelkum A, Voss A, VanKeulen JA. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet*, 2004; 364, (9435): 703-705.
343. WiderSTröm M. Significance of *Staphylococcus epidermidis* in Health Care-Associated Infections, from Contaminant to Clinically Relevant Pathogen: This Is a Wake-Up Call! *J Clin Microbiol*, 2016; 54, (7): 1679-1682.
344. Wilke GA, BubeckWardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107, 13473–13478.
345. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990; 10, 6531–6535.

346. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance Study. *Clin Infect Dis* 2004; (39): 309–317.
347. Wong H, Louie L, Watt C, Eric S. Characterization of *ermA* in Macrolide-Susceptible strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, 2009; 53, (8): 3602–3603.
348. Wu W, Yu C, Chen J, Yang Q. Fluorometric detection of copper ions using click chemistry and the target-induced conjunction of split DNAzyme fragments. *Int. J. Environ. Analyt. Chem.* 2020; (100): 324–332.
349. Yin SL, Chang YJ, Deng SP, Wang QC, Yu WG, Gong QH. [Research progress of new antibacterial drugs that target bacterial quorum sensing systems. *Yao Xue Xue Bao* 2011; (46): 613–621.
350. Yi-Tong Tanga, Rui Caob, Na Xiaoa, Zhi-Shan Lia c, Rong Wangc, Jiu-Ming Zouc, Jiao Peic Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-resiSTant *Staphylococcus aureus* isolates in Xiangyang, China, *Journal of Global Antimicrobial ResiSTance* 2018; (12): 31–36.
351. Yoon JM. Genetic Distances of *Paralichthys olivaceus* Populations InveSTigated by PCR. *Dev Reprod.* 2018; 22, (3): 283–288.
352. Yoon JM. Genetic Variations between Hairtail (*Trichiurus lepturus*) Populations from Korea and China. *Dev Reprod.* 2013; 17, (4): 363–367.
353. Yunlei Guo, Guanghui Song, Meiling Sun, Juan Wang *Front. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus* *Cell. Infect. Microbiol.*, 17 March 2020.
354. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in *Staphylococci*. *Science.* 2001; (291): 1962–1965.