

**УНИВЕРСИТЕТСКА СПЕЦИАЛИЗИРАНА БОЛНИЦА ЗА  
АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ ПО ОНКОЛОГИЯ  
„ПРОФ. ИВАН ЧЕРНОЗЕМСКИ“**

**проф. д-р Стефана Донева Събчева, дм**

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ РЕЗИСТОМА НА  
ЕНТЕРОБАКТЕРИАЛНИ ПАТОГЕНИ ПРИ  
ОНКОЛОГИЧНО БОЛНИ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**на дисертационен труд**

**за присъждане на научна степен „Доктор на науките“**

**по научна специалност 03.01.46 „Онкология“**

**София 2025**

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

<b>ДДМ</b>	Дисково-дифузионен метод
<b>МПК</b>	Минимална потискаща концентрация
<b>РНК</b>	Рибонуклеинова киселина
<b>16S-РМТ</b>	16S рибозомна РНК метилтрансфераза
<b>ArmA</b>	Aminoglycoside resistance methyltransferase A
<b>bla</b>	Гени, кодиращи $\beta$ -лактамази
<b>BMD</b>	Broth micro dilution (микроразреждане в бульон)
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standards Institute
<b>CPE</b>	Carbapenemase-producing <i>Enterobacterales</i> (карбапенемаза-продуциращи <i>Enterobacterales</i> )
<b>EARS-Net</b>	European Antimicrobial Resistance Surveillance - net
<b>ECDC</b>	European Centre for Disease Prevention and Control
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>ESBL</b>	Extended-spectrum $\beta$ -lactamase ( $\beta$ -лактамаза с разширен спектър)
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>IS</b>	Insertion sequence (инсерционна последователност)
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
<b>MBL</b>	Metallo- $\beta$ -lactamase (метало $\beta$ -лактамаза)
<b>MCR</b>	Mobile colistin resistance
<b>MDR</b>	Multidrug-resistant
<b>MLST</b>	Multilocus sequence typing
<b>MLVA</b>	Multiple locus variable-number tandem repeat analysis
<b>NDM</b>	New Delhi methallo $\beta$ -lactamase
<b>OXA</b>	Oxacillinase
<b>PBRT</b>	PCR-based replicon typing (PCR-базирано репликоново типизиране)
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PDR</b>	Pandrug-resistant
<b>PFGE</b>	Pulse field gel electrophoresis
<b>PMQR</b>	Plasmid-mediated quinolone resistance (плазмидно-медирана хинолонова резистентност)
<b>RmtA-H</b>	Ribosomal methyltransferases A-H
<b>ST</b>	Sequence type (секвенционен тип)
<b>VIM</b>	Verona integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase
<b>WGS</b>	Whole-genome sequencing (целогеномно секвениране)
<b>XDR</b>	Extensively drug-resistant

## I. УВОД

През последните години са постигнати значителни успехи в лечението на болните със злокачествени заболявания главно поради използването на по-перспективни интензивни методи. Тези успехи са свързани със задълбочаване на уврежданията на имунната система, съпътстващи неоплазмите, които поставят онкологично болните в състояние на повишен риск от животозастрашаващи инфекциозни усложнения. Множествено-резистентните ентеробактериални патогени са сред основните причинители на труднолечими инфекции с голям болестен товар. Основно препятствие за успешното им лечение е резистентността на микроорганизмите към антимикробни препарати. През последните години балансът между темповете на възникване на нови механизми на антимикробна резистентност и въвеждане на нови антибиотици с активност срещу тях е нарушен в полза на микробните патогени. В тази ситуация осъществяването на ефективен надзор за ограничаване разпространението на множествено-резистентните бактерии и тяхното навременно лечение придобива първостепенно значение. В съвременните условия провеждането само на фенотипен надзор е недостатъчно, тъй като не дава познания за пътищата на дисеминация на гените за резистентност. Геномния надзор обаче, основан на целогеномното секвениране на микроорганизмите, предоставя цялостна информация за всички геномни характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) при ентеробактериалните патогени, което позволява не само провеждането на ефективни противоепидемични мерки, но и геномно насочена антимикробна терапия.

Въпреки наличието на отделни публикации по тези проблеми досега у нас не е провеждано системно многогодишно геномно проучване на резистома при ентеробактериални патогени за изясняване механизмите на резистентност, динамиката на предаване на детерминантите на антибиотичната резистентност и подобряване на терапията на инфекциите причинени от тях. Настоящото над 20-годишно изследване си поставя тези задачи с грижа към една част от уязвимите от инфекциозни усложнения пациенти – онкологично болните. Получените резултати и изводи ще допренесат за изграждането на система за ранно откриване на механизмите на резистентност в множествено-резистентните ентеробактериални патогени и ограничаване на тяхното разпространение чрез ефективен противоепидемичен контрол и геномно насочена антимикробна терапия.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучат генетичните основи на лекарствената резистентност (резистом) при ентеробактериални патогени, изолирани от онкологично болни, за разкриване механизмите и динамиката на предаване на детерминантите на антибиотичната резистентност и подобряване терапията на инфекциите, причинени от тях.

За постигане на тази цел са поставени следните задачи:

1. Фенотипно характеризиране на клинични щамове *Enterobacterales*, изолирани през периода 2000-2024 година и селекция на множествено-резистентни щамове за генетични изследвания.
2. Доказване на генетични механизми на резистентност и геномен анализ на ентеробактериални патогени, продуциращи 16S рибозомни РНК метилтрансферази.
3. Доказване на генетични механизми на резистентност и геномен анализ на карбапенемаза-продуциращи ентеробактериални патогени.
4. Доказване на генетични механизми на резистентност и геномен анализ при colistin-резистентни, *mcr*-позитивни клинични щамове *Enterobacterales*.

### **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

**Представяне на болницата.** Университетската специализирана болница за активно лечение по онкология „Проф. Иван Черноеземски“ е медицинско заведение с национално значение за консултация и лечение на болни със злокачествени новообразувания, към които се прилага мултидисциплинарен диагностичен подход и комплексно противотуморно лечение: хирургично, лъчелечение и лекарствено противотуморно лечение. Болницата разполага с 242 легла, разпределени в 7 хирургични клиники, интензивно отделение, химиотерапевтична и лъчетерапевтична клиника. За периода 2000-2024 г., средногодишният прием на болни в стационара е бил 193 391 със средна продължителност на болничния престой – 7.74 дни.

#### **1. Бактериални щамове**

##### **1.1. Клинични изолати**

През периода 2000-2024 г. бяха проучени фенотиповете на резистентност на 14 254 щама *Enterobacterales*, изолирани последователно от амбулаторни и хоспитализирани пациенти в Микробиологичната лаборатория на болницата. Проучването включваше по един изолат/пациент от даден бактериален вид с уникален профил на антибиотична резистентност съгласно категоризирането по Magiorakos (Magiorakos et al. 2011). На този принцип бяха дефинирани отделните клинични случаи. При многократно изолиране на микроорганизъм с фенотипни характеристики, идентични на зададените, се включваше първият изолат от целия период на проучването. При изолиране на този микроорганизъм от различни клинични материали приоритет се отдаваше на изолата от кръв или от други нормално стерилни клинични материали.

##### **1.2. Референтни щамове**

За контролиране на антимикробното тестване бяха използвани еталонните щамове *Escherichia coli* ATCC 25922 и *E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1*-позитивен). Като реципиенти при конюгацията бяха използвани азид-резистентните щамове *E. coli* J53 и *E. coli* C600.

#### **2. Идентификация на клиничните изолати**

Видовата идентификация на бактериалните изолати беше извършена с мануалните системи API 20E (bioMerieux, Marcy l’Etoile, France), BBL Crystal Enteric/Non-Fermenter (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) или полуавтоматизираната система Vitek-2 (bioMerieux-Vitek, Hazelwood, Mo). Идентификацията на множествено-резистентни

щамове, селектирани за извършване на генетични изследвания беше потвърдена с MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Bremen, Germany) с референтната библиотека MALDI Reference 2022 Library v4.0.0.

Селектираните щамове бяха съхранявани при  $-70^{\circ}\text{C}$  в среда, съдържаща сърдечно-мозъчен инфузионен бульон и 15% глицерол.

### **3. Методи за определяне на чувствителността към антимикробни средства**

#### **3.1. Дифузионен дисков метод на Bauer-Kirby**

Тестовите бяха извършени и интерпретирани в съответствие с препоръките на EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)) върху Мюлер-Хинтън агар с дискове, доставени от Becton Dickinson (BD, Sparks, MD, USA).

#### **3.2. Определяне на минималните потискащи концентрации**

Минималните потискащи концентрации (МПК) чрез метода на микро Разреждане в бульон бяха определени с помощта на панелите на MicroScan NM-EN52 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) и плаките на Micronaut-S MDR (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany).

Определянето на МПК на colistin беше извършено чрез MIKROLATEST MIC COLISTIN (Erba Group - Erba Lachema, Czech republic). Впоследствие резистентността към colistin на трите *mcr-1*-позитивни щамове *E. coli* беше потвърдена с MIC-strip colistin (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).

Всички тестове бяха извършени по указанията на производителя. Резултатите от тестовите за определяне на МПК бяха интерпретирани в съответствие с клиничните гранични стойности на EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

### **4. Методи за определяне на фенотипове на резистентност**

#### **4.1. Дисково-дифузионен метод за определяне на фенотипове на вродена и придобита резистентност към $\beta$ -лактамни антибиотици**

Методът е основан на използването на антибиотични дискове, които самостоятелно или като 2-дискови тестове действат като фенотипни маркери, индикаторни за наличието на вродени и придобити  $\beta$ -лактамази. Те включват: 2-дисковия тест за антагонизъм между дисковете ceftiofuran (силен индуктор на цефалоспоринози) и ceftazidime, чрез който се откриват индуцибелни цефалоспоринози; 2-дисковия тест за синергизъм между дисковете amoxicillin/clavulanic acid и ceftazidime, чрез който се открива продукция на ESBL;

индивидуални маркери за всеки отделен фенотип на резистентност към  $\beta$ -лактамите. Подредени по определен начин в рамките на рутинната антибиограма те позволяват системното определяне на фенотипове на вродена и придобита резистентност към  $\beta$ -лактамни антибиотици (Събчева 1998).

#### **4.2. Дисково-дифузионен метод за скрининг на високо ниво на резистентност към аминогликозиди**

За скрининг на високо ниво на резистентност към аминогликозиди, медирана от 16S рРНК метилтрансферази, беше използван дисково-дифузионен метод, който включваше следните фенотипни маркери: едновременна резистентност към gentamicin и amikacin без зона на задръжка около дисковете и чувствителност към apramycin, показателна за продукция на N7-G1405 метилтрансферази; едновременна резистентност към apramycin, gentamicin и amikacin – показателна за наличие на N1-A1408 метилтрансферази. Освен това добавянето на меропенем като индикатор за продукция на карбапенемази и на 2-дисковия синергичен тест с дисковете amoxicillin/clavulanic acid и ceferime, способен да открие ESBLs при всички видове *Enterobacteriales*, позволяваше да се проследи и асоциираната резистентност. Всички фенотипни маркери бяха съставна част от рутинната антибиограма (Sabtcheva 2016).

#### **4.3. Доказване на продукция на карбапенемази**

##### **4.3.1. Комбиниран дисков метод за доказване на продукция на карбапенемази**

За доказване на продукция на карбапенемази в съответствие с инструкциите на EUCAST ([https://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](https://www.eucast.org/resistance_mechanisms)) бяха използвани комбинираните дискови тестове KPC&MBL&OXA-48 disc tests (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy). Тестовите бяха извършвани и интерпретирани по указанията на производителя.

##### **4.3.2. Имунохроматографски метод за доказване на карбапенемази**

За доказване на NDM, VIM, IMP, KPC и OXA-48-like карбапенемази чрез имунохроматографски метод беше използван O.K.N.V.I. RESIST-5 (CORIS BioConcept, Gemblux, Belgium). Тестът беше извършван от антибиограмата със селектиран инокулум взет около диска ertapenem, следвайки инструкциите на производителя.

#### **4.4. Културелен метод за скрининг на colistin-резистентни изолати**

Методът е предназначен за работа с чисти бактериални култури. Селективната среда – DiaPlate™ EMB Agar + Colistin medium (Diachim, България) беше инокулирана с

индивидуален стерилен памучен тампон паралелно с рутинната антибиограма като се използваше една и съща бактериална суспензия от 0,5 McFarland. Средата се инкубираше при същите условия като антибиограмата. При наличие на растеж изолатът се отчиташе като резистентен към colistin и се изследваше с PCR за наличие на *mcr* гени. (Sabtcheva 2024).

## **5. Молекулярно-генетични методи**

### **5.1. Екстракция на ДНК**

Екстракцията на тотална геномна ДНК за PCR и секвениране на целия геном беше извършена с помощта на PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Missouri, TX, USA) следвайки инструкциите на производителя като, всички стъпки на хомогенизиране се извършваха чрез пипетиране.

### **5.2. Методи, базирани на PCR**

**5.2.1. Детекция на карбапенемази от молекулярен клас А, В и D чрез мултиплексен EVAGREEN Real Time PCR** – IMP, VIM и NDM (Goudarzi et al. 2019), SIM, SPM, OXA-48-like, GES и KPC (Poirel et al. 2006; Mendes et al. 2007; Cole et al. 2009; Gröbner et al. 2009).

**5.2.2. Детекция на 16S рРНК метилтрансферазни гени** – *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *npmA* (Berçot et al. 2011), *rmtE* (Davis et al. 2010) и *rmtF* (Hidalgo et al. 2013).

**5.2.3. Детекция на *mcr* гени за мобилна колистинова резистентност** – *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* и *mcr-5* (Lescat et al. 2018).

### **5.2.4. Детекция на асоциирани детерминанти на резистентност**

**5.2.4.1. Детекция на гени, кодиращи ESBLs** – *bla*<sub>CTX-M</sub> гените бяха идентифицирани, както е описано от Woodford al. (Woodford al. 2006); *bla*<sub>SHV</sub> гените бяха идентифицирани, както е публикувано (Ivanov et al. 2014).

**5.2.4.2. Детекция на гени, кодиращи плазмидно-медирувани AmpC β-лактамази** – беше извършено, както е публикувано (Pérez-Pérez et Hanson 2002).

**5.2.4.3. Детекция *bla*<sub>OXA</sub> гени** – *bla*<sub>OXA-1-like</sub>, *bla*<sub>OXA-2-like</sub>, *bla*<sub>OXA-9-like</sub> и *bla*<sub>OXA-10-like</sub>, беше извършено по Mlynarcik et al. (Mlynarcik et al. 2020).

**5.2.4.4. Детекция на детерминанти на плазмидно-медирувана хинолонова резистентност (PMQR)** – *qnr*, *qepA* и *aac(6')-Ib-cr*

**5.2.4.4.1. Детекция на *aac(6')-Ib-cr***

Идентификацията на бифункционалния ген *aac(6')-Ib-cr*, кодиращ хинолонова ацетилтрансфераза беше извършено, както е описано от Ivanov et al. (Ivanov et al. 2018)

**5.2.4.4.2. Детекция на *qnr* и *qepA* – *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* (Cattoir et al. 2007), *qnrC* (Wang et al. 2009), *qnrD* (Cavaco et al. 2009) и *qepA* (Yamane et al. 2008).**

За детекция на гените, кодиращи синтеза 16S рРНК метилтрансферази, карбапенемази и MCR ензими, както и на асоциираните детерминанти на резистентност беше приложен Multiplex Real-time PCR. Праймерни двойки за всеки ген бяха набавени от предварително публикувани източници. Полимеразно-верижната реакция беше проведена в обем 20 µl с използването на публикувани протокол за работа и PCR програма (Stoikov et al. 2023; Sabtcheva, Stoikov, Georgieva et al. 2024).

Секвенирането на гените *bla<sub>CTX-M-3</sub>*, *bla<sub>SHV-12</sub>*, *bla<sub>VIM-1</sub>* и *bla<sub>NDM-1</sub>* при щамове, които не бяха подложени на целогеномно секвениране, беше извършено с праймери, амплифициращи пълните гени на GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), след като ампликоните бяха пречистени с помощта Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) (Sabtcheva, Stoikov, Georgieva et al. 2024); Ivanov et al. 2014; Todorova et al. 2016).

### **5.2.5. PCR-базираното репликоново типизиране (PBRT)**

Плазмидното репликоново типизиране на трансконгантите, насочено към доказване 21 реплика бе извършено, както е публикувано от Ruekit et al. (Ruekit et al. 2014).

### **5.3. Типизиране на изолатите, изследвани с молекулярно-генетични методи**

Изолатите *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* complex и *Serratia marcescens*, продуциращи 16S рРНК метилтрансферази, както и част от карбапенемаза-продуциращите *K. pneumoniae*, които бяха селективно секвенирани, бяха подложени на молекулярно типизиране, за да се очертае клоналността на различните изолати. Изолатите *K. pneumoniae* са типизирани с помощта на многолокусен анализ с променлив брой тандемни повторения (MLVA8+) по Donchev et al. (Donchev et al. 2023). Изолатите от *E. cloacae* комплекс и *S. marcescens* са типизирани чрез BOX-PCR метода, както е описано от Adler et al. (Adler et al. 2015). Изолатите *P. mirabilis* са типизирани чрез пулсова гел-електрофореза (PFGE) с използването на *ApaI* рестриктаза, както е описано от Ivanov et al. (Ivanov et al. 2014).

### **5.4. Разделяне на PCR продукти чрез капилярна електрофореза**

Всички ампликони бяха визуализирани на автоматизираната система за капилярна гел електрофореза с висока разделителна способност QIAxcel Advanced (Qiagen, Hilden, Germany).

### **5.5. Целогеномно секвениране (WGS)**

Целогеномното секвениране беше осъществено на платформа Illumina MiSeq с MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles PE) (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). При част от изолатите беше извършено дълговерижно секвениране на MinION Mk1C с набора Rapid Barcoding Kit 96 (SQK-RBK110.96) и FLO-MIN106D (R9.4.1) (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK), както е описано от Stoikov et al. (Stoikov et al. 2023).

### **5.6. Биоинформатичен анализ**

Получените от целогеномното секвениране данни бяха подложени на обстоен биоинформатичен анализ, целящ пълно охарактеризиране на изследваните изолати, както е описано от Stoikov et al. (Stoikov et al. 2023).

## **6. Конюгация**

Спонтанната трансмисия на плазмиди, носещи детерминанти на резистентност, беше изследвана чрез техниката filter mating (Livermore and Jones 1986). Като реципиентни щамове бяха използвани устойчивите на натриев азид *E. coli* C600 и *E. coli* J53. Трансконюгантите бяха селективно култивирани върху Luria–Bertani agar с 150 mg/L натриев азид в комбинация с 2 mg/L colistin сулфат или 0.5 mg/L meropenem или amikacin (50 mg/L) заедно с gentamicin (50 mg/L) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) в зависимост от проучваните детерминанти на резистентност.

## **7. Статистически методи**

Статистическата обработка се извърши с помощта на програмния продукт SPSS / + v. 25 за Windows, като избраното ниво на значимост за достоверност на статистическите хипотези се прие да бъде при “ $p=0.05$ ”. Бяха използвани следните методи:

**Линеен регресионен анализ** – за анализ и оценка на количествената взаимовръзка между изучаваните променливи;

Сравняване на показатели за относителен дял чрез **t критерия** и използване на **95% доверителни интервали**;

Адекватни **графични методи**.

## IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Фенотипно характеризиране на клинични щамове *Enterobacterales* и селекция на множествено-резистентни щамове за генетични изследвания

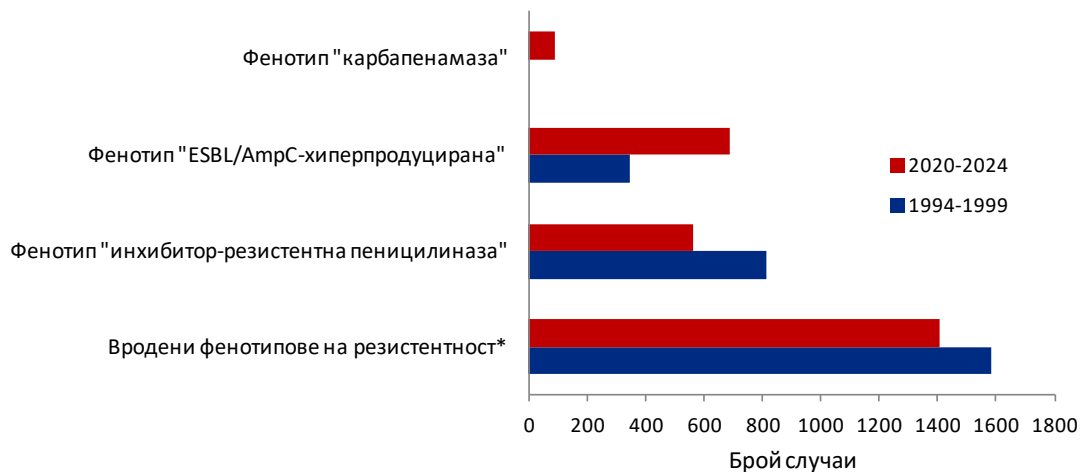
Общо 14 254 клинични щамове *Enterobacterales* бяха изследвани с авторски дисково-дифузионен метод за определяне на фенотиповете на резистентност през периода 2000-2024 година (Събчева 1998). Чрез фенотипния метод се определяше наличието на фенотипове на вродена и придобита  $\beta$ -лактамна резистентност при всички изолати. Фенотиповете на вродена  $\beta$ -лактамна резистентност включваха характерните за „дивия“ тип фенотипове („чувствителен“; „пеницилиназа“; „индуцибелна цефалоспориноза“). Фенотиповете на придобита  $\beta$ -лактамна резистентност се подразделяха на две групи. Първата група включваше фенотипове със съхранена чувствителност към трета генерация цефалоспориноза (фенотип „инхибитор-резистентна пеницилиназа“), докато втората група обединяваше фенотиповете с придобита резистентност към трета генерация цефалоспориноза (ESBL-фенотип, AmpC-фенотип). При сравняване на фенотиповете от периода преди настоящото проучване със същия брой щамове от периода в края на проучването беше установено статистическо значимо нарастване на фенотиповете на придобита  $\beta$ -лактамна резистентност ( $p < 0.001$ ), както и възникването на нови такива, като фенотип „карбапенемаза“ (Таблица 1 и Фигура 1).

**Таблица 1.** Честота и относителен дял (%) на фенотиповете на резистентност към  $\beta$ -лактамни антибиотици при 2746 щамове *Enterobacterales* от периода 1994-1999 г. спрямо същия брой щамове, изолирани през 2020-2024 г.

Фенотипове на резистентност към $\beta$ -лактами	Изследвани щамове:				t	p
	1994-1999		2020-2024			
	брой	отн. дял в %	брой	отн. дял в %		
Вродени фенотипове на резистентност*	1586	57.8	1406	51.2	4.1251	0.0001
Фенотип "инхибитор-резистентна пеницилиназа"	814	29.6	564	20.5	3.8981	0.0001
Фенотип "ESBL/AmpC-хиперпродуцирана"	346	12.6	690	25.1	5.1429	0.0001
Фенотип "карбапенемаза"	0	0.0	86	3.1		
Общо	2746	100.0	2746	100.0		

\* Фенотип "чувствителен"; "пеницилиназа"; "индуцибелна цефалоспориноза"

Използването на този метод за фенотипен мониторинг на антимикробната резистентност ни позволи да откриваме нововъзникнали механизми на резистентност демонстриращи „непознат“ фенотип.



**Фигура 1.** Графично изобразяване на фенотиповете на резистентност към  $\beta$ -лактамни антибиотици при 2746 щамове *Enterobacterales* от периода 1994-1999 спрямо същия брой щамове, изолирани през 2020-2024 г. (\*) Фенотип "чувствителен"; "пеницилиназа"; "индуцибелна цефалоспориноза".

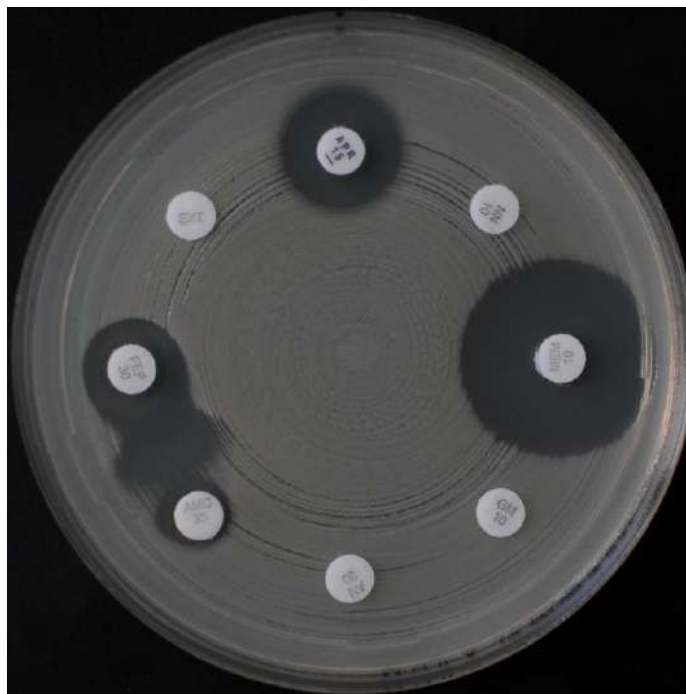
Впоследствие те се изследваха чрез молекулярно-генетични методи. Така се постави началото на геномния мониторинг, прилаган спрямо новите механизми на резистентност, благодарение на което те се контролираха и запазиха относително ниски нива.

## 2. Генетични механизми на резистентност и геномни характеристики на ентеробактериални патогени, продуциращи 16S рибозомни РНК метилтрансферази

### 2.1. Идентифициране на продуцентите на 16S рРНК метилтрансферази

Общо 12 048 клинични щамове *Enterobacterales* бяха изследвани за продукция на 16S рибозомни РНК метилтрансферази (16S-PMT) през периода 2004-2024 г. Систематичен фенотипен скрининг за високо ниво на резистентност към аминогликозиди беше осъществяван с авторски дисково-дифузионен метод (Sabtcheva 2016), който включваше характерните за този механизъм фенотипни маркери – едновременна резистентност към gentamicin и amikacin без зона на задръжка около дисковете, като част от рутинната антибиограма (Фигура 2). Добавянето на двойно-дисковия синергичен тест с дисковете amoxicillin/clavulanic acid и ceferime, способен да открие ESBLs при всички видове *Enterobacterales* (Tzelepi et al. 2000), позволяваше откриването на докладваната асоциация

на 16S-PMT с ESBL (Galimand et al. 2005). Диска apramycin служеше за фенотипно диференциране на N7-G1405 метилтрансферазите от N1-A1408 ензима, който е единствената позната метилтрансфераза инактивираща apramycin (Wachino et al. 2007).



**Фигура 2.** Илюстриране на резистентност, медирана от 16S рРНК метилтрансфераза, наблюдавана при клинични щамове *Enterobacteriales* в онкологичната болница. По посока на часовниковата стрелка: APR, apramycin; NN, tobramycin; MEM, meropenem; GM, gentamicin; AN, amikacin; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; FEP, cefepime; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole.

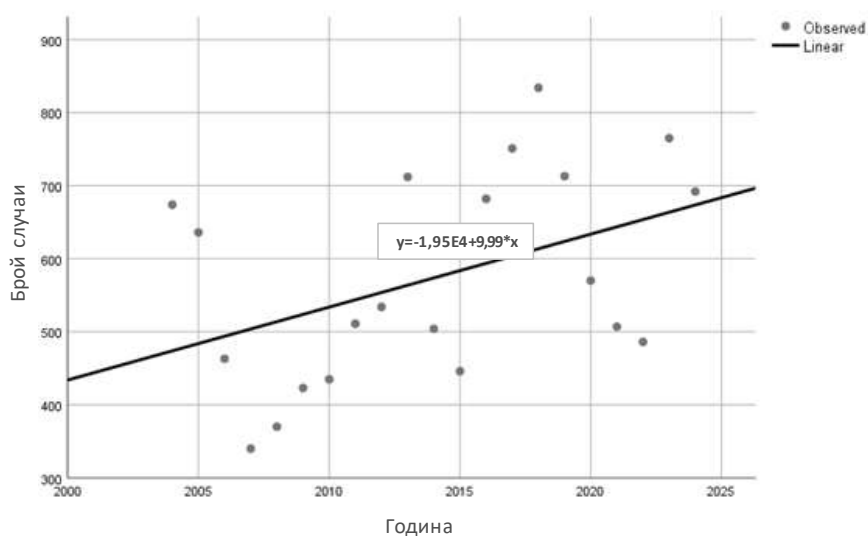
Характерното високо ниво на резистентност едновременно към gentamicin и amikacin беше установено при 195 от изследваните 12 048 изолата (1.6%). Всички те бяха apramycin чувствителни, което ги определяше като продуценти на N7-G1405 ензими. При PCR анализа беше установено наличие на метилтрансферазни гени при всички селектирани изолати. Честотата на продуцентите на 16S рРНК метилтрансферази през отделните години на периода е представена в Таблица 2.

Проведеният регресионен анализ показва трайна тенденция за статистически значимо нарастване на случаите с 16S-PMT продуценти през периода 2004-2024 г.

( $y = -1,95E4 + 9,99x$ ) с 9.99 средногодишно, при  $p(b) = 0.048$  и 95% доверителен интервал на  $b = 0.102 \div 19.872$  (Фигура 3).

**Таблица 2.** Честота на 16S–PMT-продуциращите *Enterobacterales* през отделните години на периода 2004-2024 г.

Година	Брой изследвани изолати	16S–PMT-продуциращи изолати	
		брой	отн. дял в %
2004	674	7	1.0
2005	636	13	2.0
2006	463	2	0.4
2007	340	4	1.2
2008	370	9	2.4
2009	423	13	3.1
2010	435	8	1.8
2011	511	6	1.2
2012	534	15	2.8
2013	712	8	1.1
2014	504	15	3.0
2015	446	8	1.8
2016	682	7	1.0
2017	751	4	0.5
2018	834	10	1.2
2019	713	14	2.0
2020	570	7	1.2
2021	507	9	1.8
2022	486	4	0.8
2023	765	17	2.2
2024	692	15	2.2
<b>Общо</b>	<b>12 048</b>	<b>195</b>	<b>1.6</b>



**Фигура 3.** Динамика на клиничните случаи с продуценти на 16S рРНК метилтрансфери през периода 2004-2024 г.

Продуцентите на 16S рНК метилтрансферази принадлежаха към 13 вида от разред *Enterobacteriales*. Честотата на 16S–PMT продуцентите при всеки бактериален вид с техния 95% доверителен интервал е представена в Таблица 3.

**Таблица 3.** Честота и 95% доверителен интервал на продуцентите на 16S рНК метилтрансферази сред видовете *Enterobacteriales*

Бактериален вид	Изследвани щамове:			95% доверителен интервал
	Общ брой	16S–PMT-продуциращи		
		брой	отн. дял в%	
<i>K. pneumoniae</i>	2195	61	2.8	2.09 ÷ 3.47
<i>E. cloacae complex*</i>	710	32	4.5	2.98 ÷ 6.03
<i>P. mirabilis</i>	732	27	3.7	2.32 ÷ 5.05
<i>S. marcescens</i>	385	25	6.5	4.03 ÷ 8.96
<i>E. coli</i>	6326	18	0.3	0.15 ÷ 0.42
<i>C. freundii complex**</i>	302	16	5.3	2.77 ÷ 7.82
<i>K. oxytoca complex***</i>	555	7	1.3	0.33 ÷ 2.19
<i>M. morgani</i>	424	5	1.2	0.15 ÷ 2.21
<i>K. aerogenes</i>	187	3	1.6	0.20 ÷ 3.40
<i>P. stuartii</i>	7	1	14.3	11.64 ÷ 40.21
Други****	225	0	0.0	-
Общо	12 048	195	1.6	1.39 ÷ 1.84

\*16S–PMT-продуциращите изолати от *Enterobacter cloacae complex* включваха *E. hormaechia* ( $n = 31$ ) и *E. asburiae* ( $n = 1$ ).

\*\*16S–PMT-продуциращите изолати от *Citrobacter freundii complex* включваха *C. freundii* ( $n = 15$ ) и *C. portucalensis* ( $n = 1$ ).

\*\*\*16S–PMT-продуциращите изолати *Klebsiella oxytoca complex* включваха *K. michiganensis* ( $n = 4$ ) и *K. oxytoca* ( $n = 3$ ).

\*\*\*\**Proteus vulgaris* ( $n = 99$ ); *Citrobacter koseri* ( $n = 60$ ); *Providencia rettgeri* ( $n = 21$ ); *Proteus penneri* ( $n = 16$ ); *Hafnia alvei* ( $n = 12$ ); *Serratia plymuthica* ( $n = 4$ ); *Pantoea agglomerans* ( $n = 3$ ); *Salmonella* spp. ( $n = 3$ ); *Escherichia hermannii* ( $n = 2$ ); *Providencia alcalifaciens* ( $n = 2$ ); *Serratia rubidea* ( $n = 1$ ); *Rahnella aquatilis* ( $n = 1$ ); *Leclercia decarboxylata* ( $n = 1$ ).

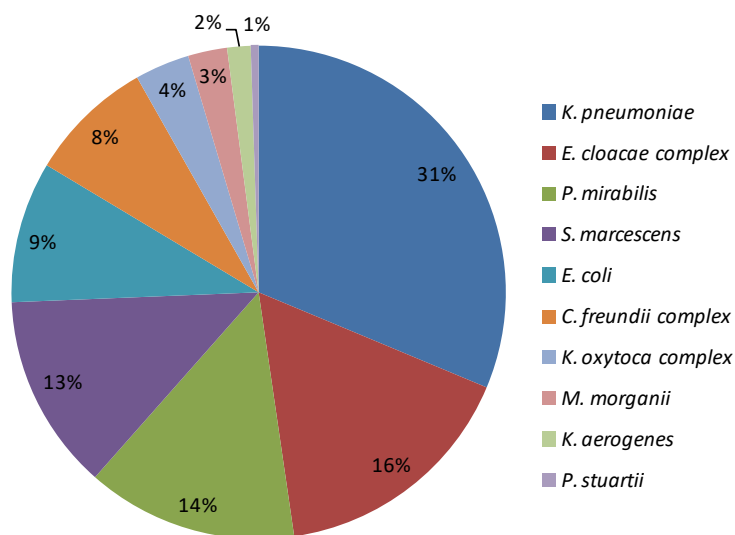
Честотата на разпространение в рамките на всеки бактериален вид варираше от 0.3% до 14.3%. Анализирайки вътревидовото разпространение на продуцентите на 16S рНК метилтрансферази следва да се отбележи, че 14.3% от общия брой щамове *Providencia stuartii* експресираха метилтрансферазни гени, докато при *Klebsiella pneumoniae* честотата на 16S–PMT продукция беше по-ниска – 2.8%. С нарастваща спрямо тази честота бяха 16S–PMT-продуциращите щамове *Proteus mirabilis* (3.7%), *Enterobacter cloacae complex*

(4.5%), *Citrobacter freundii* complex (5.3%) и *Serratia marcescens* (6.5%). Наблюдаваният по-висок относителен дял на 16S–PMT продуценти при *P. stuartii* варираше в по-широки граници (11.64 ÷ 40.21), но доверителният интервал беше правдоподобен. Най-ниска честота на 16S–PMT продукция беше установена при *E. coli* (0.3%). При *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca* complex, и *Klebsiella aerogenes* тя беше съответно 1.2%, 1.3% и 1.6% от общия брой изолати на бактериалния вид.

Структурата на продуцентите на 16S рРНК метилтрансферази е показана в Таблица 4 и Фигура 4.

**Таблица 4.** Структура на 16S–PMT-продуциращите *Enterobacteriales*

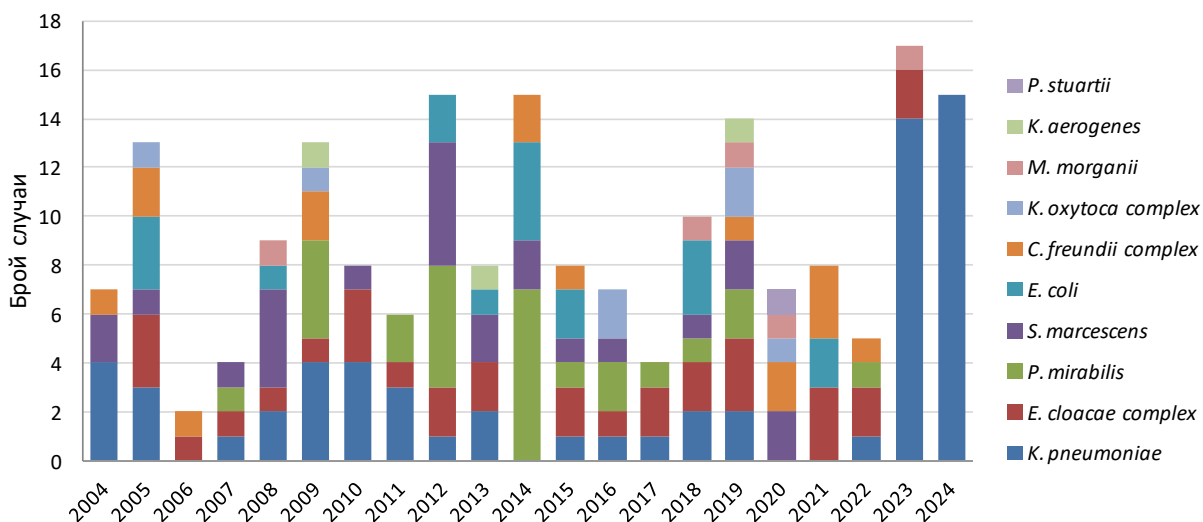
Бактериален вид	16S–PMT продуценти	
	общ брой	отн. дял в %
<i>K. pneumoniae</i>	61	31.3
<i>E. cloacae</i> complex	32	16.4
<i>P. mirabilis</i>	27	13.8
<i>S. marcescens</i>	25	12.8
<i>E. coli</i>	18	9.2
<i>C. freundii</i> complex	16	8.2
<i>K. oxytoca</i> complex	7	3.6
<i>M. morganii</i>	5	2.6
<i>K. aerogenes</i>	3	1.5
<i>P. stuartii</i>	1	0.5
Общо	195	100.0



**Фигура 4.** Диаграма изобразяваща процентното разпределение на 16S–PMT-продуциращите *Enterobacteriales* между бактериалните продуценти

Основният 16S–PMT продуциращ вид беше *K. pneumoniae* ( $n = 61$ ), следван от *E. cloacae* complex ( $n = 32$ ) и видовете *P. mirabilis* ( $n = 27$ ) и *S. marcescens* ( $n = 25$ ). Останалите видове съставляваха общо  $\frac{1}{4}$  от общия брой щамове с метилтрансферази. Получените резултати потвърждават значението на *K. pneumoniae* и *E. cloacae* complex като основни нозокомиални патогени. Видовото многообразието обаче е специфична структурна особеност на болнично ниво. Тези данни са убедително доказателство за ролята на индуцибелните ентеробактерии, като *E. cloacae* complex, *S. marcescens*, *C. freundii* complex, *M. morgani*, *K. aerogenes* и *P. stuartii* в дисеминирането на метилтрансферазните гени. Следователно, контролирането на инфекциите от продуценти на 16S рНК метилтрансферази изисква систематичното им откриване при всички видове *Enterobacterales*.

Годишното разпределение на 195 случая с продуценти на 16S рНК метилтрансферази в зависимост от бактериалния вид е представено на Фигура 5. Анализът на данните очертава две тенденции: нарастване броя на случаите сред обичайния 16S–PMT продуциращ вид (*K. pneumoniae*) до степен на абсолютна доминация през 2024 г. и увеличаване броя на бактериалните видове с метилтрансферази.



**Фигура 5.** Разпределение на 195 клинични случая с продуценти на 16S рНК метилтрансферази в зависимост от бактериалния вид и година на изолиране

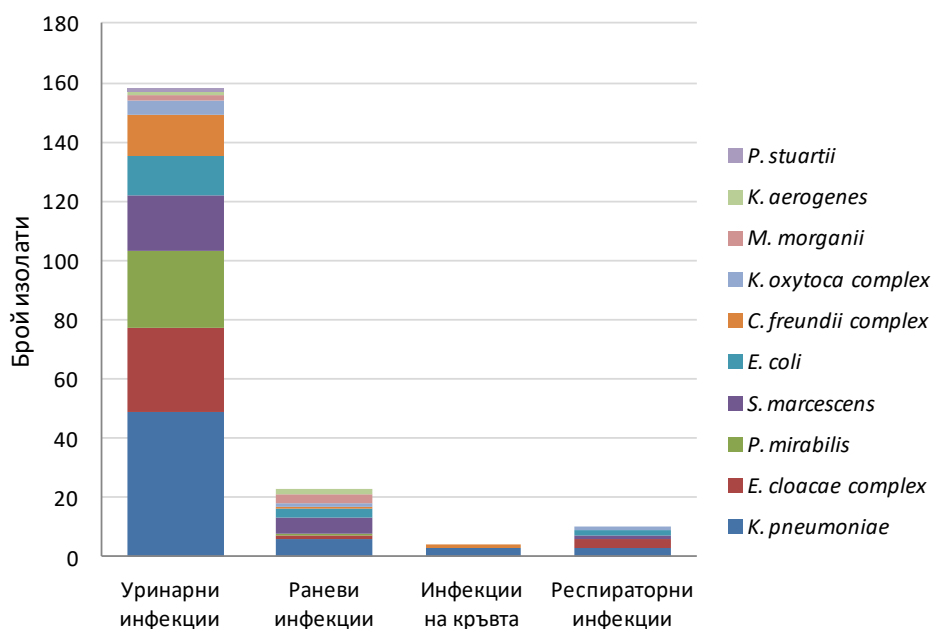
Докато в началото на проучването продуцентите на метилтрансферази принадлежаха към три бактериални вида, установените към 2020 г. 16S–PMT продуценти

принадлежаха към 13 бактериални вида. В същото време 16S–PMT-продуциращите *K. pneumoniae* нарастваха от 4 случая през 2004 г. до 15 – през 2024 г.

Продуценти на 16S рРНК метилтрансферази бяха изолирани най-често при инфекции на уринарния тракт (81%) и раневи инфекции (12%), относително по-рядко при респираторни инфекции (5%) и само в 4 случая при инфекции на кръвта (Таблица 5).

**Таблица 5.** Разпределение на 195 клинични случая с продуценти на 16S рибозомни РНК метилтрансферази в зависимост от бактериалния вид и източника на инфекция

Бактериален вид	Уринарни инфекции	Раневи инфекции	Инфекции на кръвта	Респираторни инфекции	Общо
<i>K. pneumoniae</i>	49	6	3	3	61
<i>E. cloacae</i> complex	28	1		3	32
<i>P. mirabilis</i>	26	1			27
<i>S. marcescens</i>	19	5		1	25
<i>E. coli</i>	13	3		2	18
<i>C. freundii</i> complex	14	1	1		16
<i>K. oxytoca</i> complex	5	1		1	7
<i>M. morgani</i>	2	3			5
<i>K. aerogenes</i>	1	2			3
<i>P. stuartii</i>	1				1
Общо	158 (81.0%)	23 (11.8%)	4 (2.1%)	10 (5.1%)	195



**Фигура 6.** Етиологична структура на инфекциите, причинени от продуценти на 16S рРНК метилтрансферази

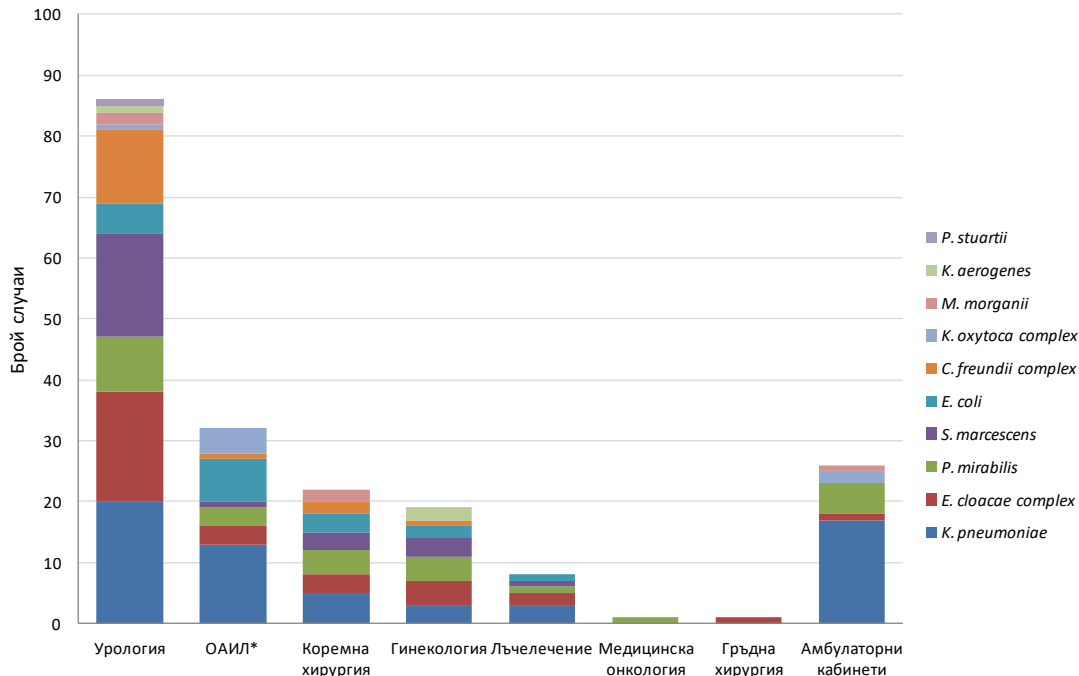
*K. pneumoniae* беше доминиращия 16S–PMT-продуциращ патоген, който се изолираше при всички видове инфекции (Фигура 6). В спектралния състав на уринарните инфекции присъстваха всички бактериални видове с установена 16S–PMT-продукция. Подобно видово разнообразие беше установено и при раневите инфекции. Единичните случаи на инфекции на кръвта се причиняваха главно от *K. pneumoniae*, докато над 50% от респираторните инфекции се асоциираха с видовете *E. cloacae* complex и *K. pneumoniae*. Получените резултати подчертават значението на ранното откриване на 16S–PMT-продуциращи патогени за провеждане на адекватна терапия за успешно лечение на животозастрашаващи инфекциозни усложнения.

Таблица 6 и Фигура 7 показват произхода на 16S–PMT-продуциращите *Enterobacterales* спрямо болничните структури. Анализът на данните показва, че 66% от болните са били хоспитализирани в хирургичните клиники в момента на изолиране на първия 16S–PMT-продуциращ щам. Почти всички болни са били подложени на големи хирургични интервенции с последващ престой в Отделението по анестезиология и интензивно лечение откъдето произхождат 16% от 16S–PMT продуцентите. Наблюдаваните инфекции от 16S–PMT продуценти при амбулаторни пациенти в 13% от случаите показват, че ентеробактериалните патогени с метилтрансферазни гени са предимно нозокомиални.

**Таблица 6.** Разпределение на 195 клинични случая с продуценти на 16S рРНК метилтрансферази в зависимост от бактериалния вид и болничната структура

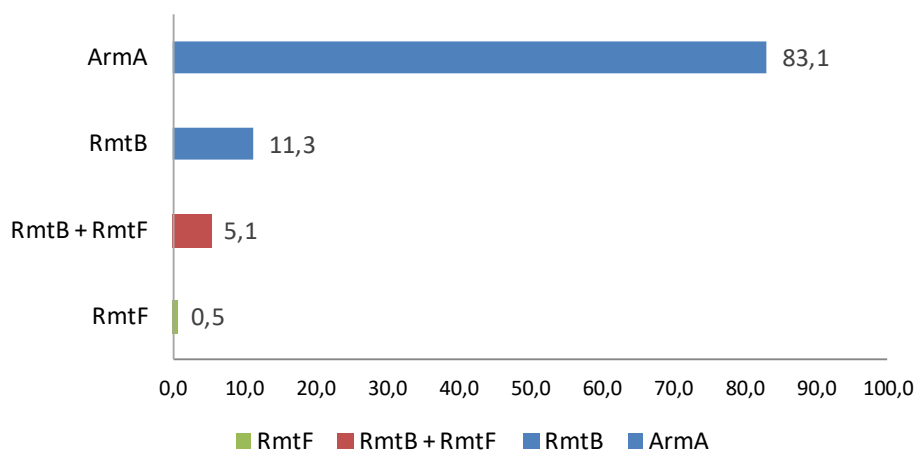
Бактериален вид	Урология	ОАИЛ*	Обща и коремна хирургия	Гинекология	Лъчелечение	Медицинска онкология	Гръдна хирургия	Амбулаторни кабинети	Общо
<i>K. pneumoniae</i>	20	13	5	3	3			17	61
<i>E. cloacae</i> complex	18	3	3	4	2		1	1	32
<i>P. mirabilis</i>	9	3	4	4	1	1		5	27
<i>S. marcescens</i>	17	1	3	3	1				25
<i>E. coli</i>	5	7	3	2	1				18
<i>C. freundii</i> complex	12	1	2	1					16
<i>K. oxytoca</i> complex	1	4						2	7
<i>M. morgani</i>	2		2					1	5
<i>K. aerogenes</i>	1			2					3
<i>P. stuartii</i>	1								1
Общо	86	32	22	19	8	1	1	26	195
(%)	(44.1%)	(16.4%)	(11.3%)	(9.7%)	(4.1%)	(0.5%)	(0.5%)	(13.3%)	

\* Отделение по анестезиология и интензивно лечение



**Фигура 7.** Графично изобразяване на разпределението на 195 клинични случая с продуценти на 16S рРНК метилтрансферази в зависимост от бактериалния вид и болничната структура. (\*) Отделение по анестезиология и интензивно лечение.

При PCR анализите бяха идентифицирани три вида метилтрансферзни гени, от които *armA* гена беше най-разпространеният (83%), следван от *rmtB* и *rmtF* (Фигура 8). При десет случая (5%) беше установено наличие едновременно на *rmtB* и *rmtF* метилтрансферзни гени в щамове *K. pneumoniae*.

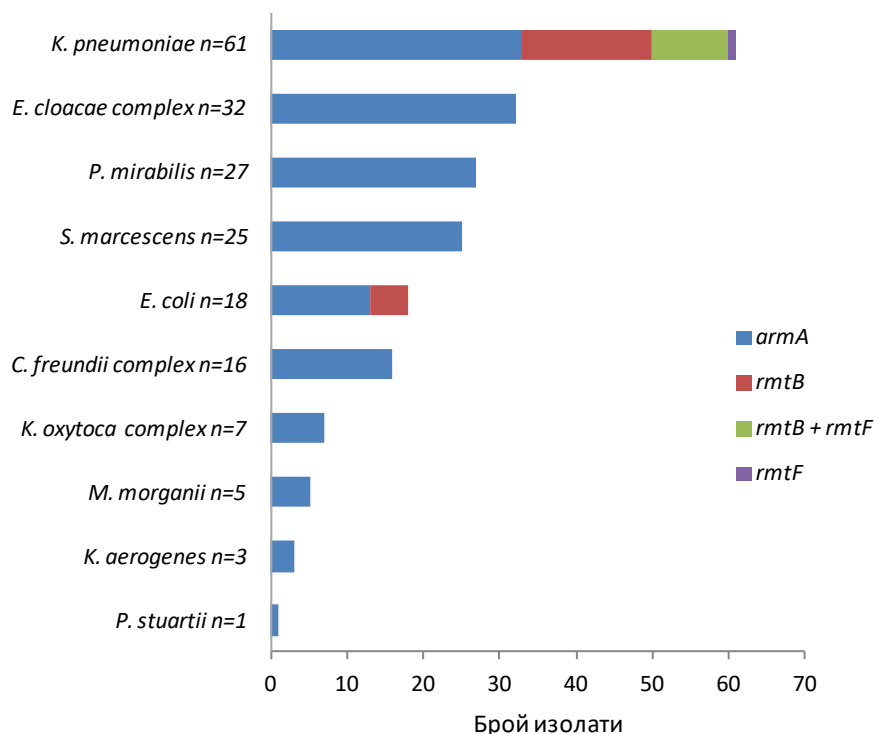


**Фигура 8.** Относителен дял (%) на отделните 16S рРНК метилтрансферази сред общия брой клинични случаи

Разпределението на отделните 16S рРНК метилтрансферази сред бактериалните видовете е представено в Таблица 7 и на Фигура 9.

**Таблица 7.** Разпределение на отделните 16S рРНК метилтрансферази сред бактериалните продуценти

Бактериален вид	ArmA	RmtB	RmtB + RmtF	RmtF	Общо
<i>K. pneumoniae</i>	33	17	10	1	61
<i>E. cloacae</i> complex	32				32
<i>P. mirabilis</i>	27				27
<i>S. marcescens</i>	25				25
<i>E. coli</i>	13	5			18
<i>C. freundii</i> complex	16				16
<i>K. oxytoca</i> complex	7				7
<i>M. morgani</i>	5				5
<i>K. aerogenes</i>	3				3
<i>P. stuartii</i>	1				1
Общо	162 (83.1%)	22 (11.3%)	10 (5.1%)	1 (0.5%)	195



**Фигура 9.** Графично изобразяване на гените *armA*, *rmtB* и *rmtF*, кодиращи метилтрансферази при отделните бактериални видове

Генът *armA* беше разпространен в щамове от всички бактериални видове. Генът *rmtB* се откриваше само при *E.coli* и *K. pneumoniae*, чиито щамове единствено кумулираха и трите типа метилтрансферазни гени самостоятелно или в комбинацията *rmtB+rmtF*.

## **2.2. Геномно разнообразие и резистом на изолатите, продуциращи 16S рибозомни РНК метилтрансферази**

Геномните характеристики, корелацията между придобитите гени за антимикробна резистентност, годината на изолиране, MLST профилите (където е приложимо) и филогенетичната свързаност на изолатите в рамките на всеки бактериален вид са показани на Фигури 10 и 11.

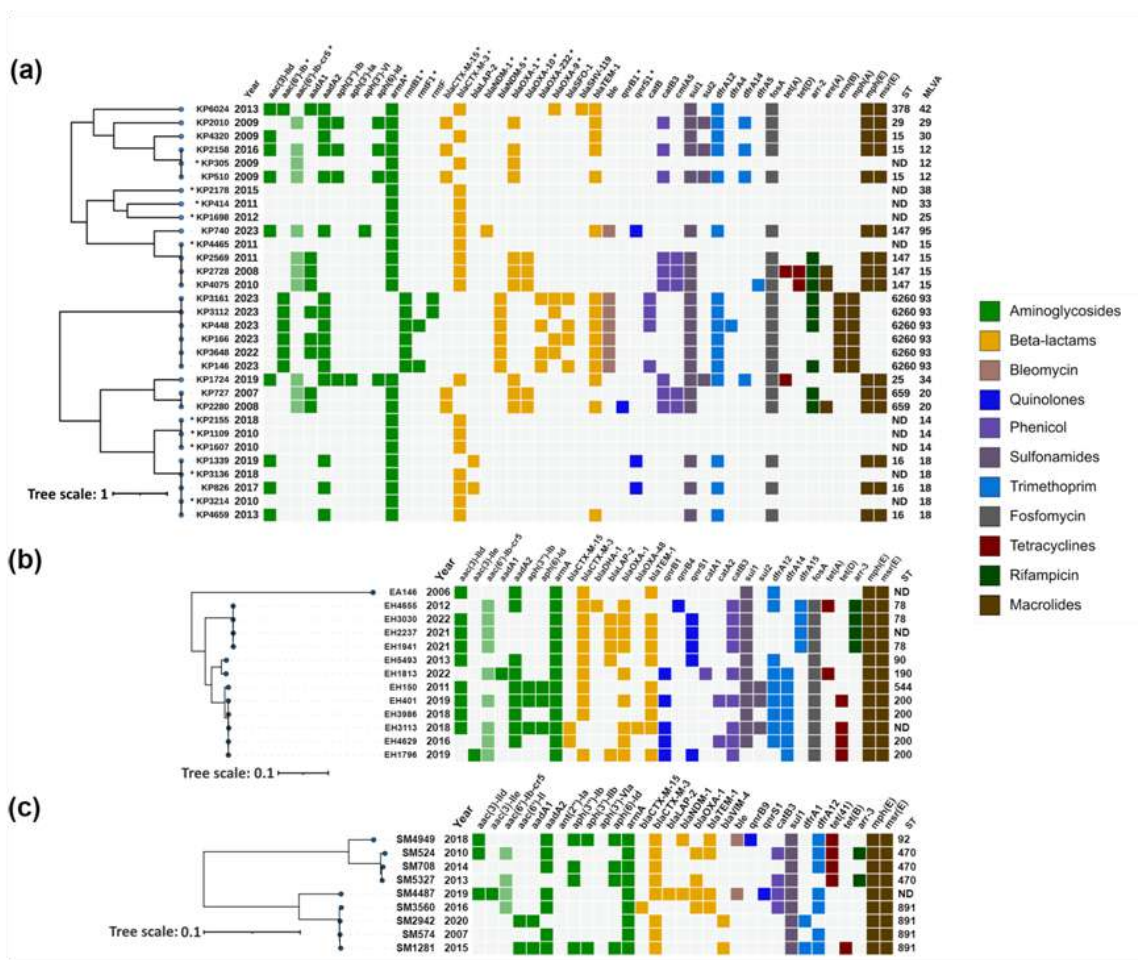
### **2.2.1. *Klebsiella pneumoniae***

Изолатите *K. pneumoniae* бяха разпределени в шест основни клъстера, съответстващи на секвенционните типове (ST) ST15, ST147, ST6260, ST659 и ST16, в допълнение към MLVA тип 14, за който ST остана неопределен (Фигура 10a).

Клъстерът ST15 се състоеше от четири изолата, три от 2009 г. и един от 2016 г. Всички изолати бяха носители на *armA*, като два от тях (KP4320 и KP305) бяха носители на *bla<sub>CTX-M-3</sub>*, а другите два (KP2158 и KP510) съдържаха *bla<sub>CTX-M-15</sub>*.

Клъстерът ST147 включваше пет изолата, изолирани между 2008 г. и 2023 г., като всички притежаваха *armA* и *bla<sub>CTX-M-3</sub>*. За отбелязване е, че един изолат, KP740, съдържаха и карбапенемазния ген *bla<sub>NDM-1</sub>*, както и гените за хинолонова резистентност *qnrS1* и *aac(6)-Ib-cr5*.

Изолатите *K. pneumoniae* ST6260 притежаваха голям брой гени за резистентност. Анализът на дълговерижното секвениране показва, че гените *rmtB1* и *bla<sub>NDM-5</sub>*, които присъстваха във всички щамове са хромозомно кодирани. Освен това четири изолата носеха *rmtF* гени, които бяха идентифицирани като *rmtF1*. Гените *rmtF* бяха разположени в плазмиди от типа IncFIB(K), като някои от тях бяха мултирепликационни плазмиди, които съдържаха репликони IncFIB(pQil) и IncFII(pKP91). В някои изолати RmtF плазмидите съдържаха допълнително β-лактамазните гени *bla<sub>SFO-1</sub>* и *bla<sub>OXA-9</sub>*. Освен това в четири от изолатите ST6260 беше открит карбапенемазният ген *bla<sub>OXA-232</sub>*, разположен на малък плазмид от типа ColKP3 с дължина ~6141 bp. Гените *rmtF*, *bla<sub>SFO-1</sub>*, *bla<sub>OXA-9</sub>* и *bla<sub>OXA-232</sub>* бяха успешно трансферирани чрез конюгация и бяха потвърдени чрез PCR (Таблица 8).



**Фигура 10.** Представяне на гените за придобита антимикробна резистентност на: (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Enterobacter cloacae* complex; (c) *Serratia marcescens*. Филогенетичните дървета за отделните бактериални видове, с изключение на *K. pneumoniae*, са конструирани с помощта на PhaME v1.0.4 (Shakya et al. 2020), като се вземат предвид само SNP в рамките на кодиращите области на основния геном. За изграждане на филогенетичното дърво на *K. pneumoniae* са използвани типовете MLVA по Grissa et al. (Grissa et al. 2008). За щамовете *K. pneumoniae*, отбелязани със звезда (\*), данните за резистентността са получени от PCR анализа, а за останалите щамове – от WGS. Гените, свързани с отделните групи антибиотици, са оцветени в съответствие с легендата (вдясно). Единственото изключение от легендата е генът *aac(6′)-Ib-cr5*, оцветен в бледозелено, за да покаже наличието на резистентност към аминогликозиди и флуорохинолони. Филогенетичните дървета бяха свързани със съответните топлинни карти с гени за резистентност и визуализирани с iTOL v6.8.1 (Letunic et al. 2021). Секвенционният тип (ST) е определен по наличните MLST схеми за отделните видове. ND,

not determined – не е определен поради липсващи алели или непълно съвпадение. KP, *Klebsiella pneumoniae*; EA, *Enterobacter asburiae*; EH, *Enterobacter hormaechei*; SM, *Serratia marcescens*.

**Таблица 8.** Характеристики на трансконюгантите, притежаващи метилтрансферазни и карбапенемазни гени

Трансконюганти от посочените донори (брой) *	Трансферирани гени за резистентност и група на несъвместимост на плазмидите		
	16S–PMT ген	Асоциирани гени за резистентност	Репликон(и)
Трансконюганти от донори, притежаващи <i>armA</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> и <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> гени			
<i>S. marcescens</i> 4487	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>S. marcescens</i> 4949	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>aadA2</i> , <i>qnrB9</i>	IncL/M
<i>C. freundii</i> (3) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>aadA2</i> , <i>qnrB9</i>	IncL/M
<i>E. coli</i> 52491	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-4</sub> , <i>aadA2</i> , <i>qnrB9</i>	IncL/M
<i>E. coli</i> 52492	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	IncL/M
	-	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>qnrB9</i>	IncA/C
<i>K. pneumoniae</i> 740	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>aadA2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrS1</i>	IncL/M
Трансконюганти от донори, притежаващи <i>armA</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> и <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> гени			
<i>M. morgani</i> 4395	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aadA2</i> , <i>qnrB1</i>	IncT
Трансконюганти от донори, притежаващи <i>armA</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> и <i>bla</i> <sub>VIM-4</sub> гени			
<i>S. marcescens</i> 2942	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	IncL/M
<i>S. marcescens</i> 1281	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	IncL/M
<i>C. freundii</i> 2748	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM-4</sub>	IncL/M
Трансконюганти от донори, притежаващи <i>armA</i> , <i>bla</i> <sub>CMY-4</sub> и <i>bla</i> <sub>VIM-86</sub> гени			
<i>P. stuartii</i> 3347	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>VIM-86</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-4</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	IncA/C
Трансконюганти от донори, притежаващи <i>armA</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> and <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>			
<i>E. hormaechei</i> 3113	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aadA2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB1</i>	IncL/M
Трансконюганти от донори, притежаващи <i>rmtB</i> , <i>rmtF</i> , <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-232</sub> и <i>bla</i> <sub>SFO-1</sub> гени			
<i>K. pneumoniae</i> (2) *	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> <sub>SFO-1</sub>	IncFIB, IncFII
<i>K. pneumoniae</i> 3161	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> <sub>SFO-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub>	IncFIB
<i>K. pneumoniae</i> 3112	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-9</sub>	IncFIB
<i>K. pneumoniae</i> (4) *	-	<i>bla</i> <sub>OXA-232</sub>	Col

\* Броят на получените трансконюганти с идентични резултати от PCR при всеки бактериален вид е показан в скоби.

Клъстерът ST659 включваше два изолата от 2007 и 2008 г., и двата носещи *armA*, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub> и *aac(6')-Ib-cr5*, като единият изолат (KP2280) допълнително носеше *qnrB1*.

Клъстерът MLVA тип 14 се състоеше от три изолата, два изолирани през 2008 г. и един изолат през 2018 г., като всички притежаваха *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub>.

Клъстерът ST16, с шамове изолирани между 2010 г. и 2019 г., неизменно съдържа *armA*, като повечето изолати, с изключение на KP1339, съдържаха също така и *bla*<sub>CTX-M-3</sub>. Два изолати, KP1339 и KP826, притежаваха също и *qnrS1*.

**Таблица 9.** Характеристики на трансконогвантите, притежаващи метилтрансферазни гени

Трансконогванти от посочените донори (брой) *	Трансферирани гени за резистентност и група на несъвместимост на плазмидите		
	16S-PMТ ген	Асоциирани гени за резистентност	Репликон
Трансконогванти от донори, притежаващи <i>armA</i> и <i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> гени			
<i>K. pneumoniae</i> (14) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>K. pneumoniae</i> (3) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-10</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	untypable
<i>K. pneumoniae</i> 1698	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	IncL/M
<i>E. hormaechei</i> (14) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>E. hormaechei</i> (7) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	IncL/M
<i>E. hormaechei</i> (2) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	IncL/M
<i>E. hormaechei</i> 401	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrB1</i>	IncL/M
<i>E. asburiae</i> 146	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>S. marcescens</i> (14) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>S. marcescens</i> 2921	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	IncL/M
<i>S. marcescens</i> 5327	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	IncA/C
<i>S. marcescens</i> 3247	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	IncL/M
<i>E. coli</i> (8) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>C. freundii</i> (2) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>C. freundii</i> (2) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	IncL/M
<i>C. freundii</i> 1739	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i> , <i>qnrB38</i>	IncL/M
<i>C. freundii</i> 3757	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrB9</i>	IncL/M
<i>C. portucalensis</i> 2648	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>K. michiganensis</i> (3) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>K. oxytoca</i> 1673	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>K. oxytoca</i> 1765	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	IncL/M
<i>M. morgani</i> 1990	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>M. morgani</i> 2789	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	IncL/M
<i>M. morgani</i> 2117	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	IncL/M
<i>K. aerogenes</i> (3) *	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
Трансконогванти от донори, притежаващи <i>armA</i> и <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> гени			
<i>K. pneumoniae</i> 2010	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>K. pneumoniae</i> 510	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>aadA2</i>	untypable
<i>K. pneumoniae</i> 727	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	untypable
<i>K. pneumoniae</i> 2280	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-10</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrB1</i>	untypable
<i>K. pneumoniae</i> 2158	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aadA2</i> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	IncR
<i>S. marcescens</i> 3560	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>aadA2</i>	IncL/M
<i>C. freundii</i> 979	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	IncL/M
<i>C. freundii</i> 2739	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	IncFIB
<i>K. michiganensis</i> 2117	<i>armA</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	IncL/M

\* Броят на получените трансконогванти с идентични резултати от PCR при всеки бактериален вид е показан в скоби.

Останалите изолати извън тези клъстери, макар и генетично несвързани, включваха KP6024, KP2178, KP414, KP1698, KP1724 и KP2010, като всички притежаваха *armA* и

*bla*<sub>CTX-M-3</sub>, с изключение на KP2010, който носеше *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. KP6024 съдържаеше също така *bla*<sub>OXA-9</sub>.

Конюгативен пренос на високо ниво на резистентност към аминогликозиди беше постигнат при 24/25 клинични щама *K. pneumoniae*. *armA*-положителните трансконюганти винаги носеха *bla*<sub>CTX-M-3</sub> или *bla*<sub>CTX-M-15</sub> и в по-малка степен *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *aac(6')-Ib-cr* и *qnrB1* (Таблица 9). PCR-базираното репликационно типизиране (PBRP) показва, че *armA* се носи главно от IncL/M плазмиди. Освен това, в трансконюганта получен от KP2158, беше открито съвместно носителство на *armA* и *bla*<sub>CTX-M-15</sub> в IncR плазмид, докато три плазмиди, носещи *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, и три други с *armA* и *bla*<sub>CTX-M-15</sub> не можаха да бъдат типизирани с метода на PBRT.

### 2.2.2. *Enterobacter cloacae* complex

Повечето изолати бяха идентифицирани като *Enterobacter hormaechei*, с изключение на EA146, който беше характеризирани като *Enterobacter asburiae* на базата на данни от целогеномно секвениране. Наличие на *armA* и *bla*<sub>CTX-M</sub> гени беше установено при всички изолати. Освен това бяха открити карбапенемазни гени при два щама – *bla*<sub>NDM</sub> в EN1824 и *bla*<sub>OXA-48-like</sub> в EN3113. Чрез PCR и секвениране бяха доказани CTX-M-3 ESBL в 30/32 изолата. Гени от *bla*<sub>OXA-1</sub> групата, както и детерминантите на хинолонова резистентност, *aac(6')-Ib-cr* и *qnr*, бяха открити съответно в 16/32, 17/32 и 14/32 ArmA-продуценти. Генотипизирането чрез BOX-PCR идентифицира осем генотипа. Въз основа на резултатите от PCR и молекулярното типизиране бяха избрани тринадесет изолата за WGS.

EA146, изолиран през 2006 г., носеше *armA* заедно с гените *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *aadA2*, *dfrA12* и *sul1* (Фигура 10b), подобно на генетичния контекст на *armA* в IncL/M pCTX-M3 плазмид (Golebiewski et al. 2007). Сред изолатите на *E. hormaechei*, подложени на WGS анализ, четири изолата от периода 2012-2022 г. образуваха клъстер, съответстващ на ST78. Най-ранният изолат от този клъстер (EN4655) носеше *qnrB4*, докато следващите изолати бяха носители на *qnrS1*. Освен това EN4655 притежаваше придобит *bla*<sub>DNA-1</sub> AmpC ген. Всички изолати в този клъстер носеха също така гените *bla*<sub>OXA-1</sub> и *aac(6')-Ib-cr5* заедно с *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub>.

Друг клъстер, обхващащ годините от 2016 до 2019 г. и съответстващ на ST200, се състоеше от пет изолата. В рамките на тази група три изолата бяха идентифицирани с

*bla*<sub>CTX-M-3</sub>, а два – с *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Наличието на карбапенемазен ген, *bla*<sub>OXA-48</sub>, в EH3113 беше също установено. Четири изолата от този клъстер бяха носители на гена *qnrB1*, като един от тях допълнително притежаваше *qnrS1*.

Останалите три изолата бяха свързани с различни секвенционни типове (ST90, ST190 и ST544) и показаха сходен генетичен профил на придобита антимикробна резистентност с наличие на *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub>. Сред тях изолатите EH5493 и EH1813 се отличаваха като носители съответно на *qnrS1* и *qnrB1*.

*armA*-позитивни трансконюганти бяха получени от 26 клинични изолата. При EH3113 беше наблюдаван съвместен пренос на *armA* с *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aadA2*, *qnrB1* и *aac(6')-Ib-cr* на IncL/M плазмид (Таблица 8). При останалите трансконюганти *armA* беше неизменно разположен на CTX-M-3 IncL/M плазмиди, които често бяха асоциирани с допълнителни гени за резистентност като *bla*<sub>OXA-1</sub> и *aac(6')-Ib-cr* (Таблица 9).

### 2.2.3. *Serratia marcescens*

При PCR анализите бяха установени *armA* и *bla*<sub>CTX-M</sub> гени при всички изолати. Освен това при два изолата бяха открити *bla*<sub>VIM</sub> гени, а при други два – *bla*<sub>NDM</sub>. Гени от групата на *bla*<sub>OXA-1</sub> и гена *aac(6')-Ib-cr* бяха идентифицирани при 10/25, а *qnrB* или *qnrS* – при единични щамове. Чрез PCR и секвениране бяха доказани CTX-M-3 ESBP в 24/25 изолата. BOX-PCR типизирането разграничи осем генотипа. Въз основа на данните от PCR и генотипирането бяха подбрани девет изолата за WGS.

Изолатите *S. marcescens*, подложени на WGS анализ, бяха разпределени в три секвенционни типа, ST92, ST470 и ST891, като всеки изолат беше носител на гените *armA* и *bla*<sub>CTX-M</sub> (Фигура 10в). Групата ST92 включваше един изолат от 2018 г., който притежаваше разнообразен набор от гени за резистентност, включващи *armA*, *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> и *qnrB9*. Изолатите в групата ST470, изолирани между 2010 и 2014 г., показваха наличие на *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub>. В клъстера ST891 всички изолати бяха носители на *armA*, като повечето от тях носеха и *bla*<sub>CTX-M-3</sub>; този клъстер включваше SM3560 с CTX-M-15 и два други изолата с VIM-4 карбапенемаза. Освен това беше установено, че един изолат с неопределен ST, изолиран през 2019 г., е носител на *armA*, *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> и *qnrS1*.

Конюгативен пренос на *armA* беше постигнат от всички донорни щамове. *armA* беше трансфериран заедно с *bla*<sub>CTX-M-3</sub> или *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, а в един случай – с *bla*<sub>OXA-1</sub> и *aac(6')-Ib-cr* на IncL/M плазмиди (Таблица 9). При трансконюганта, получен от SM5327 беше

наблюдавано съвместно пренасяне на *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub> на IncA/C плазмид. Карбапенемазните гени не бяха пренесени съвместно с *armA*, с изключение на SM4949, чийто трансконюгант съдържаше *armA*, *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *aadA2* и *qnrB9* на IncL/M плазмид (Таблица 8).

#### 2.3.4. *Escherichia coli*

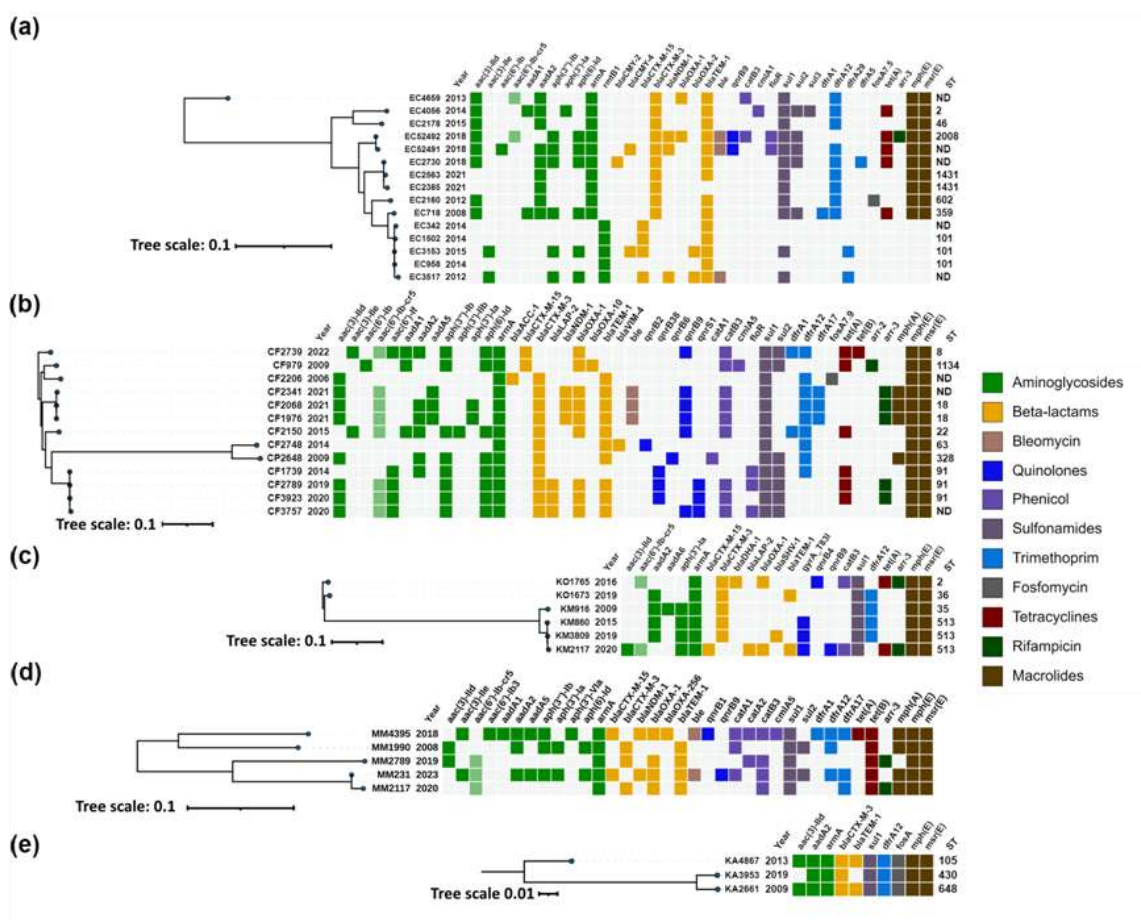
При изолатите *E.coli* бяха установени два основни профила от гени за резистентност, включващи един с *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub> и един с *rmtB* и *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Фигура 11a). Първият профил беше представен от два клъстера, съответстващи на ST2008 и ST1431, както и три несвързани изолата, изолирани между 2013 и 2015 г., и два допълнителни изолата от 2012 и 2008 г. съответно с ST602 и ST359. Изолатите от клъстера ST2008 бяха изолирани през 2018 г. и бяха свързани с наличието на *bla*<sub>NDM-1</sub> и *qnrB9*. Освен това единият от изолатите (EC52491) носеше и *bla*<sub>CMY-4</sub>, а другият изолат (EC52492) носеше *bla*<sub>OXA-1</sub> и *aac(6')-Ib-cr5*. Изолатите от клъстера ST1431 притежаваха класическата асоциация от *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub> и само един от тези изолати (EC2730) от 2018 г. съдържаше допълнително *bla*<sub>CMY-2</sub>. Несвързаните изолати, изолирани между 2008 г. и 2015 г. от първия профил, имаха същата асоциация от *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, като един от тези изолати (EC4659) от 2013 г. допълнително съдържаше *bla*<sub>OXA-1</sub> и *aac(6')-Ib-cr5*.

Вторият профил беше представен с един клъстер, съответстващ на ST101, и включваше изолати, получени между 2012 и 2015 г. Всички изолати бяха носители на *rmtB1* и всички, с изключение на един (EC958), имаха *bla*<sub>CTX-M-15</sub> гени. Освен това един изолат (EC3517) притежаваше карбапенемазния ген *bla*<sub>NDM-1</sub>, а друг изолат от 2015 г. (EC3153) беше носител на *bla*<sub>CMY-4</sub> AmpC гена.

Трансконюгантите бяха получени от всички изолати, които съдържаха ArmA и CTX-M-3. Всички те бяха положителни за *armA* и *bla*<sub>CTX-M-3</sub> на IncL/M плазмиди (Таблица 9). При EC52491 беше наблюдаван съвместен пренос на *armA* с *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CMY-4</sub> и *qnrB9* на IncL/M плазмид (Таблица 8). За разлика от EC52491, при EC52492 бяха получени два трансконюганта, един, носещ *armA*, *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> и *aac(6')-Ib-cr* на IncL/M плазмид, и друг, носещ *bla*<sub>NDM-1</sub> и *qnrB9* на IncA/C плазмид.

Въпреки многократните опити не се постигна конюгативен пренос на *rmtB1* от донорните щамове *E. coli*. Все пак WGS анализът на плазмидните репликони на донорите и

*in silico* плазмидният анализ показва, че при EC3517, EC342 и EC3153 генът *rmtB1* е разположен съответно на IncFII, IncA/C и IncFII плазмиди.



**Фигура 11.** Представяне на гените за придобита антимикробна резистентност на: (a) *Escherichia coli*; (b) *Citrobacter freundii* complex; (c) *Klebsiella oxytoca* complex; (d) *Morganella morganii*; (e) *Klebsiella aerogenes*. Филогенетичните дървета за отделните видове (a–e) са конструирани с помощта на PhaME v1.0.4 (Shakya et al. 2020), като се вземат предвид само SNP в рамките на кодиращите области на основния геном. Гените, свързани с отделните групи антибиотици, са оцветени в съответствие с легендата (вдясно). Единственото изключение от легендата е генът *aac(6′)-Ib-cr5*, оцветен в бледозелено, за да покаже наличието на резистентност към аминогликозиди и флуорохинолони. Филогенетичните дървета бяха свързани със съответните топлинни карти с гени за резистентност и визуализирани с iTOL v6.8.1 (Letunic et al. 2021). Секвенционният тип (ST) е определен по наличните MLST схеми за отделните видове. ND, not determined – не е

определен поради липсващи алели или непълно съвпадение. ЕС, *Escherichia coli*; CF, *Citrobacter freundii*; CP, *Citrobacter portucalensis*; КО, *Klebsiella oxytoca*; КМ, *Klebsiella michiganensis*; ММ, *Morganella morganii*; КА, *Klebsiella aerogenes*.

### 2.2.5. *Citrobacter freundii* complex

Изолатите от *C. freundii* complex, включващи щамове *C. freundii* и единичен изолат *Citrobacter portucalensis*, се характеризираха с неизменно наличие на *armA* и *bla*<sub>CTX-M</sub> гени (Фигура 11b). Те принадлежаха към различни секвенционни типове, като ясно се разграничаваха два клъстера: единият съответстваше на ST18, а другият – на ST91. Извън тези клъстери изолатите показваха уникални STs, което доказва липсата на родство помежду им.

Клъстерът ST18 включваше изолати, изолирани през 2021 г., които бяха положителни за *armA*, *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, а също така носеха карбапенемазния ген *bla*<sub>NDM-1</sub> заедно с *qnrB9* и *aac(6')-Ib-cr5* гените за хинолонова резистентност. Клъстерът ST91 притежаваше същата конфигурация *ArmA/CTX-M-3*, придружена от различни *qnr* гени. Един от изолатите, CF1739 (2014 г.), носеше само *qnrB38*. Другите изолати в този клъстер включваха CF2789 и CF3923, които носеха *qnrB38* в комбинация с *qnrS1*, и CF3757, който носеше както *qnrB9*, така и *qnrS1* в допълнение към *aac(6')-Ib-cr5*.

Изолатите CF2739 (2022 г.) и CF979 (2009 г.), се характеризираха с наличието на *bla*<sub>CTX-M-15</sub> вместо *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, като CF2739 притежаваше също *qnrB9* и *aac(6')-Ib-cr5*. Най-ранният изолат в този панел, CF2206 (2006 г.), притежаваше *armA*, *bla*<sub>CTX-M-3</sub> и *bla*<sub>ACC-1</sub> *AmpC* гена. Другите отличими изолати бяха CF2150, CF2748 и CP2648, които притежаваха конфигурацията *ArmA/CTX-M-3*. CF2150 допълнително съдържаше *qnrB9* и *aac(6')-Ib-cr5*, а CP2648 – *qnrB6*. CF2748 се отличаваше с наличие на карбапенемазния ген *bla*<sub>VIM-4</sub> в асоциация с *qnrB2*.

Конюгативен пренос на *armA* беше постигнат от всички донорни щамове. Получените трансконюганти имаха различно генетично съдържание, но бяха винаги положителни за *bla*<sub>CTX-M-3</sub> или *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, както и за *bla*<sub>NDM-1</sub> или *bla*<sub>VIM-4</sub>, когато тези гени присъстваха в донорите (Таблицы 8 и 9). PCR типизирането на репликоните потвърди, че *armA* е разположен в IncL/M плазмиди при всички трансконюганти, с изключение на един, получен от CF2739, при който беше наблюдавано съвместно пренасяне на *armA* и *bla*<sub>CTX-M-15</sub> на IncFIB плазмид (Таблица 9).

### 2.2.6. *Klebsiella oxytoca* complex

Изолатите от *K. oxytoca* complex бяха идентифицирани предимно като *Klebsiella michiganensis*, с изключение на два изолата, които бяха класифицирани като *K. oxytoca*. Всички изолати от този комплекс бяха носители на гените *armA* и *bla*<sub>CTX-M</sub> (Фигура 11c). Двата изолата *K. oxytoca* се характеризираха с конфигурацията ArmA/CTX-M-3, а единият от тях, KO1765, носеше и гените *bla*<sub>DHA-1</sub>, *qnrB4* и *aac(6')-Ib-cr5*.

Групата на *K. michiganensis* включваше един изолат от 2009 г., идентифициран като ST35, и три изолата, изолирани между 2015 и 2020 г., които споделяха секвенционен тип ST513 и образуваха отделен клъстер. При повечето изолати *K. michiganensis* се наблюдаваше профилът ArmA/CTX-M-3. Изключение правеше изолатът KM2117, който беше носител на *bla*<sub>CTX-M-15</sub> вместо *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, и носеше също *qnrB9* и *aac(6')-Ib-cr5* гени за хинолонова резистентност.

От всички клинични изолати бяха получени трансконюганти, носещи *armA*. Генът *armA* беше неизменно разположен в IncL/M плазмиди, които носеха също така гените *bla*<sub>CTX-M-3</sub> или *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, както и в различна степен *aadA2*, *bla*<sub>OXA-1</sub> и *aac(6')-Ib-cr* (Табл. 9).

### 2.2.7. *Morganella morganii*

Изолатите *M. morganii*, макар и генетично различни, неизменно съдържаха гените *armA* и *bla*<sub>CTX-M</sub> (Фигура 11d). Повечето носеха *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, с изключение на два изолата, MM4395 и MM231, които притежаваха *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Освен това MM4395 и MM231 се отличаваха с това, че имаха NDM-1 карбапенемаза и *qnrB* гени, по-специално *qnrB1* в MM4395 и *qnrB9* в MM231 заедно с *aac(6')-Ib-cr5*.

Генът *armA* беше трансфериран от почти всички клинични изолати, с изключение на един – MM231. В трансконюгантите от MM1990, MM2789 и MM2117 *armA* беше пренесен от CTX-M-3 IncL/M плазмиди заедно с разнообразни асоциирани гени за резистентност (Таблица 9). При MM4395 беше установено съвместно пренасяне на *armA* с *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *qnrB1* и *aadA2* на IncT плазмид (Таблица 8). При MM231 обаче не бяха открити плазмидни репликони и не се установи конюгативен пренос на никакви детерминанти на резистентност, което предполага хромозомно разположение на *armA* и асоциираните гени за резистентност.

### 2.2.8. *Klebsiella aerogenes*

Изолатите *K. aerogenes* бяха разпределени в три различни секвенционни типа – ST105, ST430 и ST648, като всички те притежаваха гените *armA*, *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *aadA2*, *dfrA12* и *sul1*, характерни за генетичния контекст на *armA* в IncL/M pCTX-M3 плазмиди (Golebiewski et al. 2007) при отсъствие на други детерминанти на резистентност (Фиг.11e).

Конюгативен пренос на *armA* беше постигнат от всички донорни щамове. Генът *armA* винаги беше пренасян от IncL/M плазмиди заедно с *bla*<sub>CTX-M-3</sub> и *aadA2* гени (Табл.9).

### 2.2.9. *Proteus mirabilis*

При PCR анализите се доказва наличие на *armA* и идентични асоциирани гени за резистентност във всички изолати. Типизирането чрез PFGE на избрани изолати от всяка година показва идентични профили, което предполага, че всички изолати принадлежаха към един клон, както вече беше установено за десет от изолатите, описани преди това (Ivanov I, 2014).

Резистомният анализ на представителния щам PM1502 установи наличие на множество гени на резистентност, включващи *armA*, *aac(6')-Ib*, *aadA1*, *aadA2*, *aph(3'')-Ib* и *aph(6)-Id*, които кодират резистентност към аминогликозиди, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>CMY-99</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>OXA-9</sub> и *bla*<sub>TEM-1</sub>, отговорни за резистентността към β-лактами, *dfrA1* и *dfrA12*, свързани с резистентност към триметоприм и *sul1*, *sul2*, обуславящи резистентност към сулфонамиди.

Конюгативен пренос на *armA* от клинични изолати *P. mirabilis* не беше постигнат, както и не бяха открити плазмидни репликони в PM1502, което предполага хромозомно разположение на *armA* и асоциирани с него гени за резистентност. Това обаче не беше изследвано допълнително, тъй като при PM1502 бяха налични само данни от късоверижно секвениране.

### 2.2.10. *Providentia stuartii*

Единственият щам *P. stuartii*, продуциращ ArmA метилтрансфераза, PS3347, беше изолиран през 2020 г. При резистомния анализ се установи, че PS3347 принадлежи към ST46 и притежава разнообразен набор от гени за резистентност, включващи детерминанти на резистентността към β-лактами (*bla*<sub>VIM-86</sub>, *bla*<sub>CMY-4</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>), към аминогликозиди (*armA*, *aac(6')-Ib-cr5*, *aac(6')-II*, *aadA1*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*), към триметоприм (*dfrA1*), сулфонамиди (*sul1*, *sul2*) и фениколи (*catA3*, *catB3*, *floR*). Повечето от тези гени, като *armA*,

*bla*<sub>VIM-86</sub>, *bla*<sub>CMY-4</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> и *aac(6')-Ib-cr5*) бяха разположени на IncA/C плазмид успешно трансфериран при конюгация (Таблица 8).

### 2.3. Идентифициране на асоциирани β-лактамазни гени и плазмидно-медирирани детерминанти на хинолонова резистентност

ESBL гени бяха идентифицирани в 95% (185/195) от продуцентите на 16S рНК метилтрансферази, като най-често срещаният беше *bla*<sub>CTX-M-3</sub> (64%, 119/185), следван от *bla*<sub>SHV-12</sub> (15%, 27/185), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (11%, 20/185) и *bla*<sub>SFO-1</sub> (10%, 19/185).

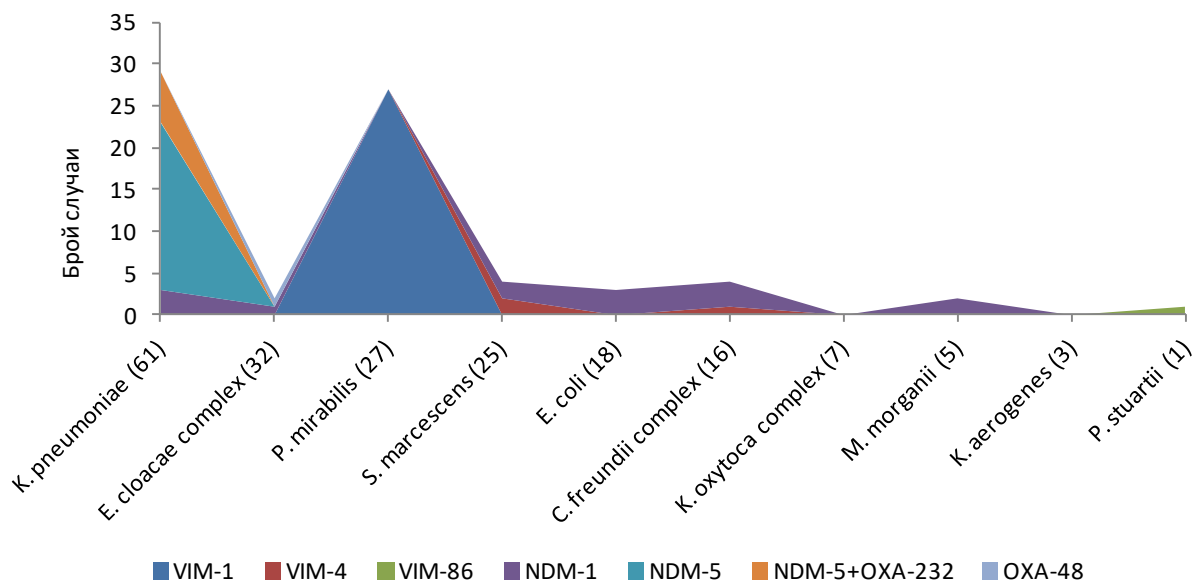
Придобити AmpC гени бяха идентифицирани в 17% (34/195) от 16S-PMT-продуциращите изолати, включващи *bla*<sub>CMY-99</sub> (*n* = 27), *bla*<sub>CMY-4</sub> (*n* = 3) и *bla*<sub>DHA-1</sub> (*n* = 2), както и *bla*<sub>CMY-2</sub> и *bla*<sub>AAC-1</sub> гени в по един изолат.

Плазмидно-медирианият ген за резистентност към флуорохинолони *aac(6')-Ib-cr* беше идентифициран в 29 % (56/195) от 16S-PMT-продуциращите изолати от почти всички видове, с изключение на *P. mirabilis* и *K. aerogenes*, докато варианти на *qnrB* и *qnrS1* бяха доказани съответно в 14 % и 7 % от продуцентите на метилтрансферази.

Карбапенемазни гени бяха доказани при 36% (72/195) от 16S-PMT продуцентите. При геномния анализ бяха идентифицирани алелните варианти *bla*<sub>NDM-1/5</sub> в 47% (34/72), *bla*<sub>VIM-1/4/86</sub> в 43% (31/72), *bla*<sub>NDM-5+bla</sub><sub>OXA-232</sub> в 8% (6/72) и *bla*<sub>OXA-48</sub> в един-единствен щам *E. hormaechei* (Таблица 10 и Фигура 12). Най-често срещаният *bla*<sub>NDM</sub> вариант, *bla*<sub>NDM-5</sub> (*n* = 26), беше специфично асоцииран с изолати *K. pneumoniae* с *rmtB*. Аналогично *bla*<sub>VIM-1</sub> (*n* = 27) беше свързан само с изолати *P. mirabilis* с *armA*.

**Таблица 10.** Разпределение на асоциираните карбапенемазни гени сред продуцентите на 16S рНК метилтрансферази

Бактериален вид (n)	VIM-1	VIM-4	VIM-86	NDM-1	NDM-5	NDM-5+OXA-232	OXA-48	Общ брой	Отн. дял в %
<i>K. pneumoniae</i> (61)				3	20	6		29	47.5
<i>E. cloacae</i> complex (32)				1			1	2	6.3
<i>P. mirabilis</i> (27)	27							27	100
<i>S. marcescens</i> (25)		2		2				4	16.0
<i>E. coli</i> (18)				3				3	16.7
<i>C. freundii</i> complex (16)		1		3				4	25.0
<i>K. oxytoca</i> complex (7)								0	0.0
<i>M. morgani</i> (5)				2				2	40.0
<i>K. aerogenes</i> (3)								0	0.0
<i>P. stuartii</i> (1)			1					1	100
Общо (195)	27	3	1	14	20	6	1	72	36.0



**Фигура 12.** Графично изобразяване на асоциираните карбапенемази сред продуцентите на 16S рРНК метилтрансферази

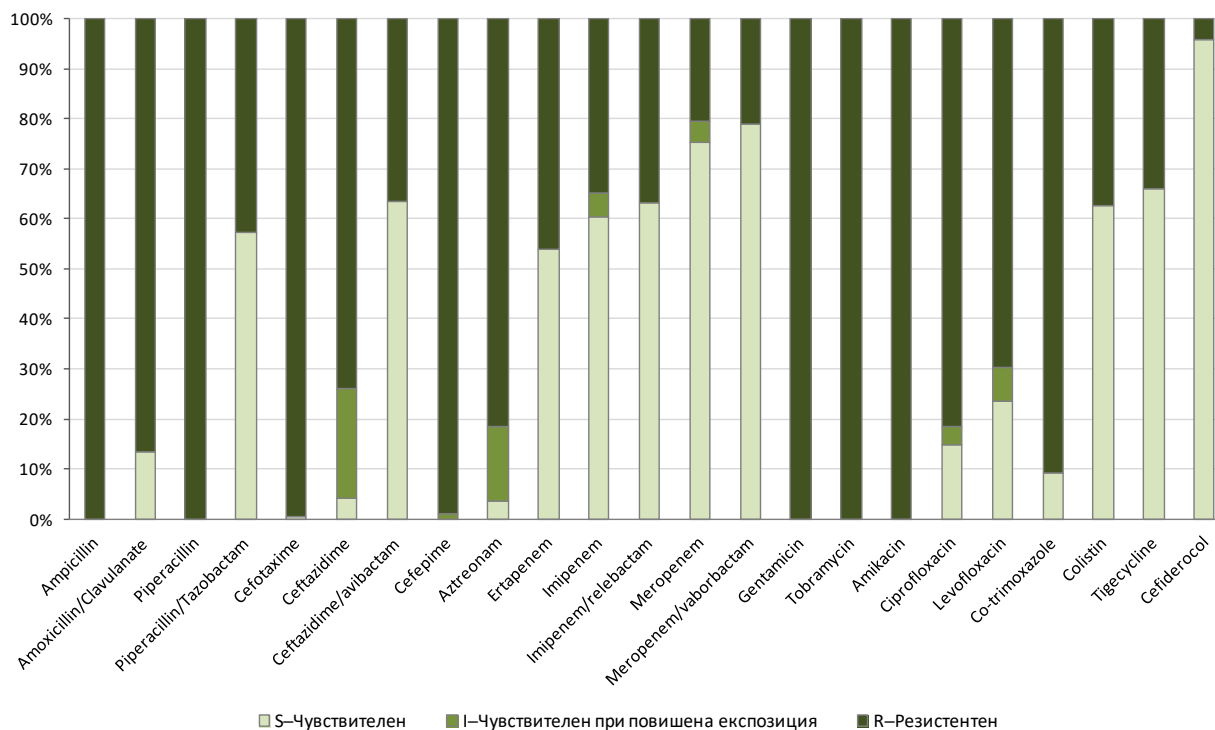
И в двата случая карбапенемазните и метилтрансферазните гени бяха хромозомно локализирани, а всички изолати принадлежаха съответно към *K. pneumoniae* ST6260 и един клон *P. mirabilis*. Допълнително някои от изолатите *K. pneumoniae* ST6260 съдържаха  $bla_{OXA-232}$  и *rmtF* в различни асоциации. Генът  $bla_{NDM-1}$  ( $n = 14$ ) беше идентифициран в изолати от различни видове, повечето носители на *armA*, с изключение на един изолат *E. coli* с *rmtB* и един изолат *K. pneumoniae* с *rmtF*. Останалите карбапенемазни гени ( $bla_{VIM-4}$ ,  $bla_{VIM-86}$  и  $bla_{OXA-48}$ ) бяха асоциирани с единични изолати *C. freundii*, *P. stuartii* и *E. hormaechei*, притежаващи *armA*.

#### 2.4. Чувствителност към антимикробни средства на 16S-PMТ-продуциращите *Enterobacterales*

Резултатите от тестовете за чувствителност са показани на Фигура 13. Всички изолати бяха едновременно резистентни във високо ниво към amikacin, gentamicin и tobramycin, което се обуславя от наличието на 16S рРНК метилтрансферазни гени.

Освен това почти всички изолати бяха резистентни към цефалоспорини, а повечето изолати – към флуорохинолони, което се дължеше съответно на ESBLs с или без карбапенемази и на детерминанти на хинолонова резистентност. Почти всички изолати (96%) бяха чувствителни на cefiderocol. Резистентността към карбапеними се определяше

от присъствието на карбапенемазни гени при около една трета от продуцентите на 16S рРНК метилтрансферази, докато резистентността към ceftazidime/avibactam, imipenem/relebactam и meropenem/vaborbactam беше обусловена от наличието на метало- $\beta$ -лактамазни гени.



**Фигура 13.** Антимикробна чувствителност на 195 ентеробактериални патогена продуценти на 16S рРНК метилтрансферази

Общо 73 (63%) изолата бяха резистентни към colistin. Повечето от тях (27 *P. mirabilis*, 25 *S. marcescens*, 5 *M. morgani* и 1 *P. stuartii*) притежаваха вродена резистентност към полимиксини. Сред 15-те изолата (13 *K. pneumoniae*, 1 *K. michiganensis* и 1 *E. asburiae*) с придобита резистентност към colistin 11 щама *K. pneumoniae* бяха едновременно карбапенемаза-продуциращи. Терапевтичните опции при тези случаи се обсъдени в следващия раздел заедно с другите случаи на инфекции от карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales*.

## 2.5. Обсъждане

Проведеното ретроспективно геномно проучване за периода 2004-2024 г. в онкологичната болница е първото дългосрочно системно проучване върху

панаминогликозидната резистентност, медирана от 16S рНК метилтрансферази в щамове *Enterobacteriales* в България. Установената честота на разпространение на 16S-PMТ-продуциращи ентеробактериални патогени (1.6% от 12 048) е сходна с наблюдаваната в Полша (1.1%, 20/1770) (Piekarska et al. 2016) по-висока от Обединеното кралство (0.1% от 56 172) (Taylor et al. 2021), но е много по-ниска от тази в Индия (46.3%, 57/123) (Wangkheimayum et al. 2017) и Иран (13.0%, 40/307) (Yeganeh Sefidan et al. 2019), въпреки че малкият брой изолати може да не отразява истинската честота на разпространение в тези страни.

Характеризирани са три вида метилтрансферазни гени. Сред тях *armA* беше преобладаващият (83.1%), докато *rmtB1* (11.3%), *rmtF1 + rmtB1* (5.1%) и *rmtF1* (0.5%) бяха идентифицирани само в редки случаи. Генът *armA* беше широко разпространен сред *Enterobacteriales*, обхващайки тринадесет вида, докато другите метилтрансферазни гени бяха специфични за отделни видове, като например *rmtF*, който беше открит само в *K. pneumoniae*, и *rmtB* – в *E. coli* и *K. pneumoniae*. През периода на проучването беше наблюдавано прогресиращо дисеминиране на *armA*, включващо изолати от нови видове. Освен това в нашата болница бяха идентифицирани изолати с гените *rmtF* и *rmtB*, като *rmtF* се съобщава за първи път в България. Нашите резултати потвърждават резултатите на други изследователи, че *ArmA* и *RmtB* са двете най-често разпространени метилтрансферази, и същевременно разкриват спецификата на разпространението им в рамките на нашата болницата (Doi et al. 2016; Yang et al. 2022).

Редица автори съобщават, че 16S рНК метилтрансферази често са асоциирани с  $\beta$ -лактамазни гени. В настоящето проучване висок процент от 16S-PMТ-продуциращите *Enterobacteriales* бяха носители на ESBL гени (95%), като най-често срещаният беше *bla<sub>CTX-M-3</sub>*, което е в съответствие с предишни наши проучвания (Galimand et al. 2005; Sabtcheva et al. 2008). Освен това през периода на изследването с помощта на WGS анализ бяха установени асоциации на *bla<sub>CTX-M-15</sub>* с *armA* или *rmtB* при няколко видове *Enterobacteriales*, както и на *bla<sub>SFO-1</sub>* с *rmtF* и *rmtB* при *K. pneumoniae*. Въпреки че асоциации на *bla<sub>CTX-M-15</sub>* с *armA* и *rmtB* са докладвани по-рано (Wei et al. 2015; Ayad et al. 2016), както и един случай на *E. coli*, притежаваща *bla<sub>SFO-1</sub>* с *rmtB* (Zhao et al. 2015), асоциация на *bla<sub>SFO-1</sub>* с *rmtF*, доколкото ни е известно, не е докладвана досега. Установи се, че една трета от 16S-PMТ-продуциращите *Enterobacteriales* притежават и карбапенемазни

гени, като *bla*<sub>VIM</sub> и *bla*<sub>NDM</sub> MBL бяха доминиращи. Карбапенемазите NDM-5 и OXA-232 бяха открити само в изолати *K. pneumoniae* ST6260. VIM-1 беше открита само в изолати, принадлежащи към клона *P. mirabilis*, докато NDM-1 беше широко разпространена сред различни бактериални видове. Тези резултати са в съгласие с докладваните в световен мащаб констатации за често срещани асоциации на метилтрансферазни с карбапенемазни гени (Wangkheimayum et al. 2017; Fournier et al. 2022; Taylor et al 2018). Други гени за антибиотична резистентност, често асоциирани с метилтрансферазни гени в това проучване, бяха плазмидно-медираните детерминанти на хинолонова резистентност *aac(6')-Ib-cr* (36%) и *qnr* (26%), чието съвместно съществуване с карбапенемази, ESBL, *armA* и *rmtB* е докладвано и от други изследователи Wei et al. 2015). Тези асоциации водят до ко-селекция на гените за антибиотична резистентност от множество антимикробни средства и компрометират клиничната употреба на трите основни групи бактерицидни антибиотици за лечение на животозастрашаващи бактериални инфекции.

В това проучване беше установено, че метилтрансферазите са свързани с плазмиди от различни групи на несъвместимост, което предполага множество източници на придобиване чрез хоризонтален трансфер на гените. Установи се, че дисеминирането на *armA* гена сред 162 изолата от тринадесет бактериални вида е медирано от поне пет типа плазмиди, като IncL/M е доминиращият. По-голямата част от IncL/M плазмидите, носещи *armA*, носеха и *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, подобно на IncL/M плазмида pCTX-M3 при *C. freundii* (Golebiewski et al. 2007) и pIP1204 при *K. pneumoniae* (Galimand et al. 2003), на които първоначално е идентифициран генът *armA*. Въпреки че в предишните ни проучвания (Galimand et al. 2005; Sabtcheva et al. 2008) не бяха открити нито карбапенемазни, нито плазмидни гени за хинолонова резистентност, в това проучване различни карбапенемазни гени (*bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-4</sub>, *bla*<sub>VIM-86</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>), PMQR (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrS*, *qnrB*) и други β-лактамазни гени (*bla*<sub>CMY-4</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>) бяха открити на IncL/M плазмиди, пренесени съвместно с *armA*. Генът *bla*<sub>CTX-M-15</sub> вместо *bla*<sub>CTX-M-3</sub> също беше открит в плазмидите IncL/M, носещи *armA*, от някои изолати. Освен това *armA* беше открит в конюгативни IncA/C, IncR, IncFIB и IncT плазмиди, пренесен съвместно с *bla*<sub>CTX-M-15</sub>/*bla*<sub>CTX-M-3</sub> или *bla*<sub>VIM-86</sub>/*bla*<sub>NDM-1</sub> и други гени за резистентност.

Генът *armA* често беше разположен заедно с *bla*<sub>NDM-1</sub> или други карбапенемазни гени (*bla*<sub>VIM-86</sub>, *bla*<sub>VIM-4</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub>) на едни и същи плазмиди, като някои от тях носеха

допълнително гени за флуорохинолонова резистентност, като *aac(6')-Ib-cr* и *qnrB*. Придобиването на тези мултирезистентни плазмиди би довело до едновременна резистентност към повечето  $\beta$ -лактами, включително карбапенеми, както и към аминокликозиди и флуорохинолони – трите основни групи антимикробни средства, активни срещу Грам-отрицателни бактерии.

В това проучване бяха установени няколко високорискови клона, свързани с гена *armA*, включващи *K. pneumoniae* ST147, *C. freundii* ST18 и ендемичен за България клон на *P. mirabilis*, за които е съобщено, че носят карбапенемазни гени, като например *bla<sub>NDM-1</sub>* при *K. pneumoniae* ST147 (Pajand et al. 2023) и *C. freundii* ST18 (Hammerum et al. 2016) и *bla<sub>VIM-1</sub>* при ендемичния *P. mirabilis* клон (Markovska et al. 2017). Освен тези клонове в проучването беше установено изобилие от второстепенни STs в ArmA-продуциращи *Enterobacteriales*. Въз основа на клоналното разнообразие, наблюдавано чрез MLST и MLVA, може да се предположи, че персистирането на метилтрансферазните гени в нашата болница се дължи по-скоро на плазмидно предаване, отколкото на клонално разпространение. Първоначално *rmtB* е идентифициран на плазмид заедно с *bla<sub>TEM-1</sub>* в клиничен изолат *S. marcescens* от Япония (Doi et al. 2004). В това проучване *rmtB1* беше идентифициран в пет щамове *E. coli* от високорисковия клон ST101, които са се появили като спорадични случаи през ограничен период от време (2012-2015 г.). Генът *rmtB* беше открит в неконюгативни IncFII и IncA/C плазмиди в 3/5 изолата, което може да обясни липсата на по-нататъшно разпространение. Единственият *bla<sub>NDM-1</sub>*-положителен щам, EC3517, изглежда подобен на щамове, за които е съобщено, че е открит по време на взрив в друга българска болница през 2012 г., тъй като и двата щамове са от ST101 и са носители на *bla<sub>CTX-M-15</sub>* в допълнение към *bla<sub>NDM-1</sub>* и *rmtB*. Докато обаче ние идентифицирахме *rmtB* в неконюгативен IncFII плазмид, е докладвано, че трансконюганти, получени от щамове от взрива, носят *rmtB* с *bla<sub>NDM-1</sub>* на нетипизиран конюгативен плазмид (Poirel et al. 2014).

Най-важното откритие от това проучване е идентифицирането на *K. pneumoniae* ST6260 в нашата болница, чието възникване датира от 2022 г. Анализът на дълговерижното секвениране разкри нова асоциация на гени за резистентност от метилтрансферазите RmtF1 и RmtB1, карбапенемазите NDM-5 и OXA-232 и SFO-1 ESBL. RmtB1 и NDM-5 бяха хромозомно кодирани при всички изолати. *rmtF1* беше разположен в конюгативни IncFIB(K) плазмиди, като някои от тях бяха мултирепликационни плазмиди,

които съдържат IncFIB(pQil) и IncFII(pKP91) репликони. Карбапенемазният ген *bla*<sub>OXA-232</sub> беше разположен на малък ColKP3 плазмид с дължина ~6141 bp, който беше пренесен чрез конюгация. ESBL генът *bla*<sub>SFO-1</sub> беше плазмидно кодиран и успешно трансфериран съвместно с *rmtF1*. За разлика от хромозомните RmtB1 и NDM-5, плазмидно кодираните RmtF1, OXA-232 и SFO-1 присъстваха в различни асоциации при изследваните изолати.

### **3. Генетични механизми на резистентност и геномни характеристики на ентеробактериални патогени, продуциращи карбапенемази**

#### **3.1. Идентифициране на карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales***

Общо 10 738 клинични щамове *Enterobacterales* бяха изследвани за продукция на карбапенемази през периода 2006-2024 г. Систематичен фенотипен скрининг за карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales* (CPE) беше осъществен чрез метода с комбинирани дискове и/или имунохроматографския O.K.N.V.I. RESIST-5 метод. Хронологично, до появата на O.K.N.V.I. RESIST-5 в България, беше използван KPC&MBL&OXA-48 методът с комбинирани дискове в съответствие с препоръките на EUCAST ([https://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](https://www.eucast.org/resistance_mechanisms)). Впоследствие беше проучен O.K.N.V.I. RESIST-5 методът, използвайки CPE с молекулярно доказани карбапенемази успоредно с дисковия KPC&MBL&OXA-48 метод. Получените резултати показаха, че методът O.K.N.V.I. RESIST-5 доказва бързо карбапенемазите NDM, VIM, IMP, KPC и OXA-48-like с 100% чувствителност и специфичност. Същевременно беше установено, че KPC&MBL&OXA-48 методът не открива карбапенемази с ниски МПК стойности на меропенем като VIM-1 при *P. mirabilis* и категорично не открива комбинацията от NDM-5 и OXA-232 в щамове *K. pneumoniae* (Таблица 11 и Фигури 14, 15, 16, 17, 18).

Въз основа на тези резултати беше изработен алгоритъм за рутинно доказване на карбапенемазите NDM, VIM, IMP, KPC и OXA-48-like с помощта на имунохроматографския метод O.K.N.V.I. RESIST-5 при всички щамове *Enterobacterales* в деня на изписване на антибиограмата, като за целта се използваше селектиран инокулум, взет около диска ertаренем при наличие на зона на задръжка <25 mm (Sabtcheva and Georgieva 2024).

**Таблица 11.** Резултати от изследванията с O.K.N.V.I. RESIST-5, KPC&MBL&OXA-48 и чувствителността към карбапеними при 50 карбапенемаза-продуциращите *Enterobacterales* с молекулярно характеризирани карбапенемази

Изолати <sup>a</sup>	Година	Бактериален вид	Карбапенемаза	МИК стойности (mg/L) <sup>b</sup> за:			KPC&MBL&OXA-48 дискови тестове <sup>c</sup>					O.K.N.V.I. RESIST-5	
				MEM	ETP	IMP	TMO	MRP	MR+CL	MR+BO	MR+ED		Интерпретация
KP746-PR3337 *	2017	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	>128	>1	>8	8	6	6	16	6	KPC	KPC
KP1335-PR2899 **	2014	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	0.5	>1	1	6	22	22	23	22	OXA-48-like	OXA-48-like
CF1843 ***	2014	<i>C. freundii</i>	OXA-48	2	>1	2	6	22	22	22	22	OXA-48-like	OXA-48-like
SM585 ***	2016	<i>S. marcescens</i>	OXA-48	4	>1	8	6	21	21	23	21	OXA-48-like	OXA-48-like
EH1401 ***	2018	<i>E. hormaechei</i>	OXA-48	4	>1	2	6	21	21	21	21	OXA-48-like	OXA-48-like
EH3113 ***	2018	<i>E. hormaechei</i>	OXA-48	4	>1	4	6	20	20	20	20	OXA-48-like	OXA-48-like
EH3371 ***	2018	<i>E. hormaechei</i>	OXA-48	2	>1	2	6	22	22	22	22	OXA-48-like	OXA-48-like
EH273 ***	2020	<i>E. hormaechei</i>	OXA-48	2	>1	2	6	23	23	23	23	OXA-48-like	OXA-48-like
EH1872 ***	2020	<i>E. hormaechei</i>	OXA-48	2	>1	2	6	23	23	23	23	OXA-48-like	OXA-48-like
EC3517 ****	2012	<i>E. coli</i>	NDM-1	32	>1	8	6	7	7	9	23	MBL	NDM
MM4395 ***	2018	<i>M. morgani</i>	NDM-1	2	>1	13	20	22	22	24	27	MBL	NDM
SM4015 ***	2018	<i>S. marcescens</i>	NDM-1	32	>1	>8	11	15	15	16	23	MBL	NDM
SM4949 ***	2018	<i>S. marcescens</i>	NDM-1	128	>1	>8	6	6	6	9	23	MBL	NDM
SM4487 ***	2019	<i>S. marcescens</i>	NDM-1	64	>1	>8	6	6	6	8	22	MBL	NDM
EH10088 ***	2020	<i>E. hormaechei</i>	NDM-1	32	>1	8	10	14	15	17	24	MBL	NDM
CF4015 ***	2018	<i>C. freundii</i>	NDM-1	16	>1	8	9	15	16	17	23	MBL	NDM
EC52491 ****	2018	<i>E. coli</i>	NDM-1	16	>1	8	14	16	16	18	27	MBL	NDM
EC52492 ****	2018	<i>E. coli</i>	NDM-1	8	>1	4	14	17	17	19	27	MBL	NDM
CF1976 ***	2021	<i>C. freundii</i>	NDM-1	32	>1	>8	11	14	15	16	21	MBL	NDM
CF2068 ***	2021	<i>C. freundii</i>	NDM-1	16	>1	8	12	15	15	17	23	MBL	NDM
CF2341 ***	2021	<i>C. freundii</i>	NDM-1	16	>1	8	12	15	15	17	22	MBL	NDM
MM231 ***	2023	<i>M. morgani</i>	NDM-1	2	>1	8	20	22	22	24	27	MBL	NDM
KP740 ****	2023	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	64	>1	8	8	12	12	14	24	MBL	NDM
KP166 ****	2023	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-5	64	>1	>8	10	10	10	12	22	MBL	NDM
KP3112 ****	2023	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-5	64	>1	>8	8	6	6	6	20	MBL	NDM
KP3648 ****	2022	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-5 + OXA-232	128	>1	>8	6	8	8	11	14	MBL	NDM + OXA-48-like
KP146 ****	2023	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-5 + OXA-232	64	>1	8	6	6	6	9	13	MBL	NDM + OXA-48-like
KP448 ****	2023	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-5 + OXA-232	128	>1	>8	6	6	6	7	12	MBL	NDM + OXA-48-like
KP3161 ****	2023	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-5 + OXA-232	128	>1	>8	6	6	6	8	12	MBL	NDM + OXA-48-like
PM1421 ****	2007	<i>P. mirabilis</i>	VIM-1	1	1	8	20	26	26	28	29	Negative	VIM
PM1502 ****	2021	<i>P. mirabilis</i>	VIM-1	1	1	8	19	25	25	27	28	Negative	VIM
CF2748 ***	2014	<i>C. freundii</i>	VIM-4	2	>1	4	6	22	22	24	27	MBL	VIM
SM502 ***	2014	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	2	>1	8	6	22	22	24	28	MBL	VIM
SM1281 ***	2015	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	16	>1	>8	8	18	18	20	26	MBL	VIM
SM666 ***	2017	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	32	>1	>8	6	15	15	18	26	MBL	VIM
SM681 ***	2018	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	64	>1	>8	6	9	9	12	23	MBL	VIM
SM791 ***	2018	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	16	>1	>8	6	17	17	20	27	MBL	VIM
SM2238 ***	2018	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	32	>1	>8	6	6	6	8	23	MBL	VIM
SM2704 ***	2018	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	128	>1	>8	6	6	6	9	23	MBL	VIM
SM3131 ***	2018	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	64	>1	>8	6	8	8	11	24	MBL	VIM
SM1524 ***	2020	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	32	>1	>8	6	10	10	12	22	MBL	VIM
SM2942 ***	2020	<i>S. marcescens</i>	VIM-4	32	>1	>8	6	10	10	12	23	MBL	VIM
PS316 ***	2017	<i>P. stuartii</i>	VIM-86	16	>1	>8	14	18	18	20	22	MBL	VIM
PS314 ***	2019	<i>P. stuartii</i>	VIM-86	16	>1	>8	13	18	18	20	25	MBL	VIM
PS995 ***	2019	<i>P. stuartii</i>	VIM-86	16	>1	>8	15	18	18	20	25	MBL	VIM
PS3722 ***	2019	<i>P. stuartii</i>	VIM-86	16	>1	>8	15	14	14	17	22	MBL	VIM
PS2654 ***	2020	<i>P. stuartii</i>	VIM-86	16	>1	>8	11	17	17	20	24	MBL	VIM
PS3347 ***	2020	<i>P. stuartii</i>	VIM-86	16	>1	>8	13	17	17	20	24	MBL	VIM
PS567 ***	2019	<i>P. stuartii</i>	VIM-86 + NDM-1	32	>1	>8	10	16	16	18	24	MBL	VIM + NDM
PS1396 ***	2019	<i>P. stuartii</i>	VIM-86 + NDM-1	64	>1	>8	10	11	11	13	24	MBL	VIM + NDM

<sup>a</sup> Изолатите са характеризирани в следните публикации: (\*), (Ivanova K et al. 2020); (\*\*), (Sabtcheva et al. 2015); (\*\*\*), (Sabtcheva, Stoikov, Ivanov et al. 2024); (\*\*\*\*), (Sabtcheva, Stoikov, Georgieva et al. 2024)

<sup>b</sup> MIC, Минимална потискаща концентрация; MEM, meropenem; ETP, ertapenem; IMP, imipenem

<sup>c</sup> Диаметър на зоната на задръжка (mm) при тестовете с комбинирани дискове на KPC&MBL&OXA-48; TMO, temocillin; MRP, meropenem; MR+CL, meropenem+cloxacillin; MR+BO, meropenem+фенилборонова киселина; MR+ED, meropenem+EDTA.



**Фигура 14.** Пример за положителен тест за КРС карбапенемаза с помощта на O.K.N.V.I. RESIST-5: отляво, касета за OXA-48-like, КРС и NDM; отдясно касета за VIM и IMP. С, контролна лента; О, OXA-48-like; К, КРС; N, NDM; V, VIM; I, IMP карбапенемази. Антибиограма: Положителен комбиниран дисков тест за КРС-продуциращ щам *K. pneumoniae* KP746 с помощта на КРС&MBL&OXA-48. По посока на часовниковата стрелка: MRP, меропенем; ТМО, temocillin; MR+ED, меропенем с EDTA; MR+BO, меропенем с фенолборонова киселина; MR+CL, меропенем с cloxacillin.

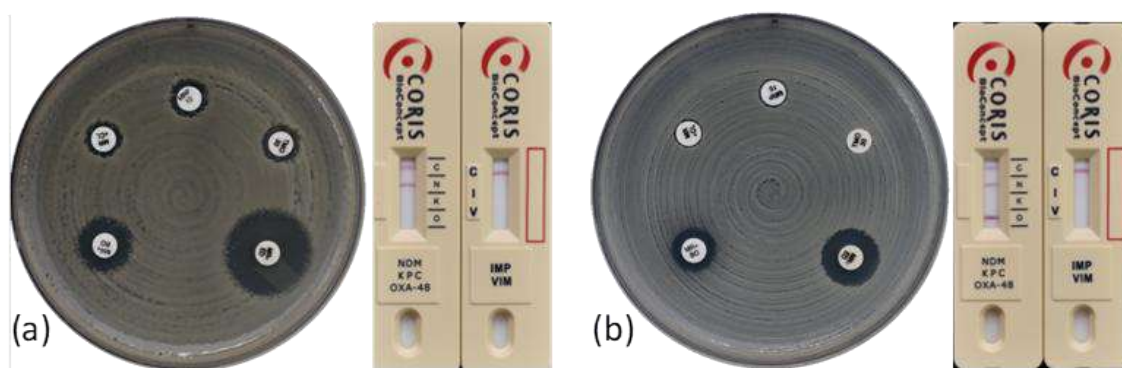


**Фигура 15.** Пример за положителен тест за OXA-48-like карбапенемаза с помощта на O.K.N.V.I. RESIST-5: отляво, касета за OXA-48-like, КРС и NDM; отдясно касета за VIM и IMP. С, контролна лента; О, OXA-48-like; К, КРС; N, NDM; V, VIM; I, IMP карбапенемази. Антибиограма: Положителен комбиниран дисков тест за OXA-48-like-продуциращ щам *S.marcescens* SM585 с помощта на КРС&MBL&OXA-48. По посока на часовниковата

стрелка: MRP, меропенем; ТМО, temocillin; MR+ED, меропенем с EDTA; MR+BO, меропенем с фенилборонова киселина; MR+CL, меропенем с cloxacillin.

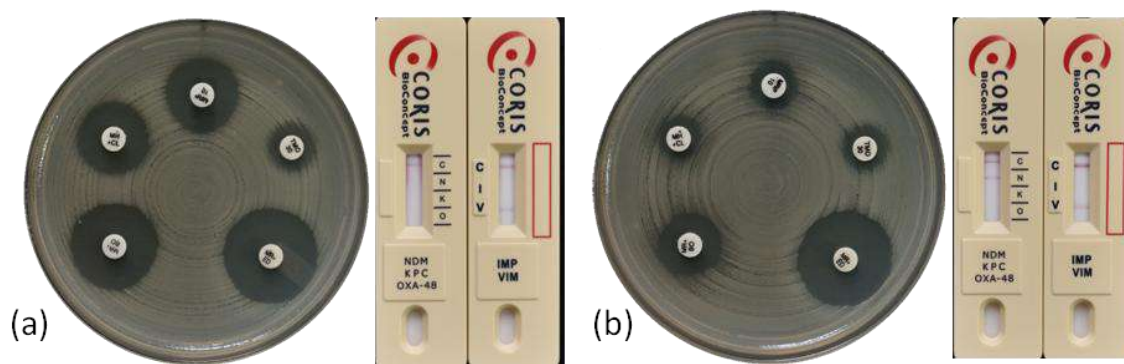


**Фигура 16.** Пример за положителен тест за NDM карбапенемаза с помощта на O.K.N.V.I. RESIST-5: отляво, касета за OXA-48-like, KPC и NDM; отдясно касета за VIM и IMP. С, контролна лента; О, OXA-48-like; К, KPC; N, NDM; V, VIM; I, IMP карбапенемази. Антибиограма: Положителен комбиниран дисков тест за NDM-продуциращ щам *K. pneumoniae* KP740 с помощта на KPC&MBL&OXA-48. Тестът е отчетен като MBL-положителен. По посока на часовниковата стрелка: MRP, меропенем; ТМО, temocillin; MR+ED, меропенем с EDTA; MR+BO, меропенем с фенилборонова киселина; MR+CL, меропенем с cloxacillin.



**Фигура 17.** (a) Пример за положителен тест за NDM карбапенемаза с помощта на O.K.N.V.I. RESIST-5: отляво, касета за OXA-48-like, KPC и NDM; отдясно касета за VIM и IMP. С, контролна лента; О, OXA-48-like; К, KPC; N, NDM; V, VIM; I, IMP карбапенемази.

Антибиограма: Положителен комбиниран дисков тест за NDM-продуциращ щам *K. pneumoniae* KP166 с помощта на KPC&MBL&OXA-48. Тестът е отчетен като MBL-положителен. По посока на часовниковата стрелка: MRP, меропенем; TMO, temocillin; MR+ED, меропенем с EDTA; MR+BO, меропенем с фенолборонова киселина; MR+CL, меропенем с cloxacillin. (b) Пример за положителен тест за NDM+OXA-48-like карбапенемази с помощта на O.K.N.V.I. RESIST-5: отляво, касета за OXA-48-like, KPC и NDM; отдясно касета за VIM и IMP. С, контролна лента; О, OXA-48-like; К, KPC; N, NDM; V, VIM; I, IMP карбапенемази. Антибиограма: Отрицателен комбиниран дисков тест за NDM+OXA-48-like-продуциращ щам *K. pneumoniae* KP146 с помощта на KPC&MBL&OXA-48. Тестът е отчетен като MBL-положителен. По посока на часовниковата стрелка: MRP, меропенем; TMO, temocillin; MR+ED, меропенем с EDTA; MR+BO, меропенем с фенолборонова киселина; MR+CL, меропенем с cloxacillin.



**Фигура 18.** (a) Пример за положителен тест за VIM карбапенемаза с помощта на O.K.N.V.I. RESIST-5: отляво, касета за OXA-48-like, KPC и NDM; отдясно касета за VIM и IMP. С, контролна лента; О, OXA-48-like; К, KPC; N, NDM; V, VIM; I, IMP карбапенемази. Антибиограма: Положителен комбиниран дисков тест за VIM-продуциращ щам *P. stuartii* PS2654 с помощта на KPC&MBL&OXA-48. Тестът е отчетен като MBL-положителен. По посока на часовниковата стрелка: MRP, меропенем; TMO, temocillin; MR+ED, меропенем с EDTA; MR+BO, меропенем с фенолборонова киселина; MR+CL, меропенем с cloxacillin. (b) Пример за положителен тест за NDM+VIM карбапенемази с помощта на O.K.N.V.I. RESIST-5: отляво, касета за OXA-48-like, KPC и NDM; отдясно касета за VIM и IMP. С, контролна лента; О, OXA-48-like; К, KPC; N, NDM; V, VIM; I, IMP карбапенемази.

Антибиограма: Положителен комбиниран дисков тест за NDM+VIM-продуциращ щам *P. stuartii* PS1396 с помощта на KPC&MBL&OXA-48. Тестът е отчетен като MBL-положителен. По посока на часовниковата стрелка: MRP, меропенем; ТМО, temocillin; MR+ED, меропенем с EDTA; MR+BO, меропенем с фенилборонова киселина; MR+CL, меропенем с cloxacillin.

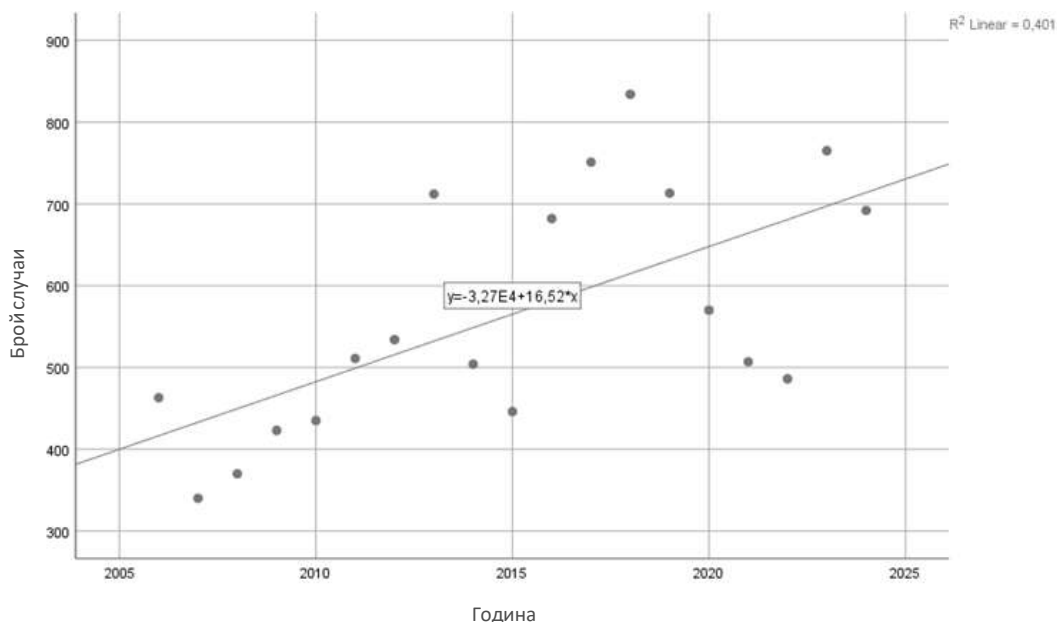
Карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales* бяха установени при 185 от изследваните 10 738 изолата (1.7%). При PCR анализите беше потвърдено наличие на карбапенемазни гени при всички селектирани изолати. Честотата на СРЕ през отделните години на периода е представена в Таблица 12.

**Таблица 12.** Честота на карбапенемаза-продуциращите *Enterobacterales* през отделните години на периода 2006-2024 г.

Година	Брой изследвани изолати	Продуценти на карбапенемази	
		брой	отн. дял в %
2006	463	1	0.2
2007	340	1	0.3
2008	370	0	0.0
2009	423	4	0.9
2010	435	0	0.0
2011	511	2	0.4
2012	534	6	1.1
2013	712	0	0.0
2014	504	9	1.8
2015	446	3	0.7
2016	682	4	0.6
2017	751	21	2.8
2018	834	35	4.2
2019	713	13	1.8
2020	570	9	1.6
2021	507	10	2.0
2022	486	11	2.3
2023	765	33	4.3
2024	692	23	3.3
<b>Общо</b>	<b>10 738</b>	<b>185</b>	<b>1.7</b>

Проведеният регресионен анализ показва трайна тенденция за статистически значимо нарастване на случаите с продуценти на карбапенемази през периода 2006-2024 г.

( $y = -3.27E4 + 16.52x$ ) с 16.52 средногодишно при  $p(b) = 0.004$  и 95% доверителен интервал на  $b = 6.190 \div 26.848$  (Фигура 19).



**Фигура 19.** Динамика на клиничните случаи с продуценти на карбапенемази през периода 2006-2024 г.

Продуцентите на карбапенемази принадлежаха към 8 вида от разред *Enterobacterales*. Честотата на CRE при всеки бактериален вид с техния 95% доверителен интервал е представена в Таблица 13.

**Таблица 13.** Честота и 95% доверителен интервал на продуцентите на карбапенемази сред видовете *Enterobacterales*

Бактериален вид	Изследвани шамове:			95% доверителен интервал
	Общ брой	Продуценти на карбапенемази		
		брой	отн. дял в%	
<i>K. pneumoniae</i>	1957	128	6.5	5.45 ÷ 7.64
<i>P. mirabilis</i>	674	30	4.5	2.89 ÷ 6.01
<i>E. coli</i>	5674	6	0.1	0.02 ÷ 0.19
<i>E. hormaechei</i>	632	6	0.9	0.19 ÷ 1.71
<i>S. marcescens</i>	326	6	1.8	0.38 ÷ 3.30
<i>C. freundii</i>	258	4	1.6	0.04 ÷ 3.06
<i>P. stuartii</i>	7	3	42.9	6.20 ÷ 79.52
<i>M. morgani</i>	363	2	0.6	0.21 ÷ 1.31
Други*	847	0	0.0	-
Общо	10 738	185	1.7	1.47 ÷ 1.96

\* *K. oxytoca* complex ( $n = 492$ ); *K. aerogenes* ( $n = 154$ ); *P. vulgaris* ( $n = 76$ ); *C. koseri* ( $n = 60$ ); *P. rettgeri* ( $n = 21$ ); *P. penneri* ( $n = 16$ ); *H. alvei* ( $n = 11$ ); *S. plymuthica* ( $n = 4$ ); *P. agglomerans* ( $n = 3$ ); *Salmonella* spp. ( $n = 3$ ); *P. alcalifaciens* ( $n = 2$ ); *E. hermannii* ( $n = 2$ ); *S. rubidea* ( $n = 1$ ); *R. aquatilis* ( $n = 1$ ); *L. decarboxylata* ( $n = 1$ ).

Честотата на разпространение в рамките на всеки бактериален вид варираше от 0.1% до 42.9%. Анализирайки вътревидовото разпространение на продуцентите на карбапенемази, следва се да отбележи, че 42.9% от общия брой щамове *P. stuartii* експресираха карбапенемазни гени, докато при *K. pneumoniae* честотата на карбапенемазите беше по-ниска – 6.7%. С намаляваща спрямо тази честота бяха карбапенемаза-продуциращите щамове *P. mirabilis* (4.5%), *S. marcescens* (1.8%) и *C. freundii* (1.6%). Най-ниска честота на карбапенемазна продукция беше установена при *E. coli* (0.1%). Под 1% бяха също така карбапенемаза-продуциращите щамове *E. hormaechei* (0.9%) и *M. morgani* (0.6%). Наблюдаваният по-висок относителен дял на карбапенемаза-продуциращи щамове *P. stuartii* обаче варираше в широки граници (6.20÷79.52). Следователно тези резултати не могат да се възприемат като реален израз на честотата на продуцентите на карбапенемаза поради малкия общ брой изследвани щамове.

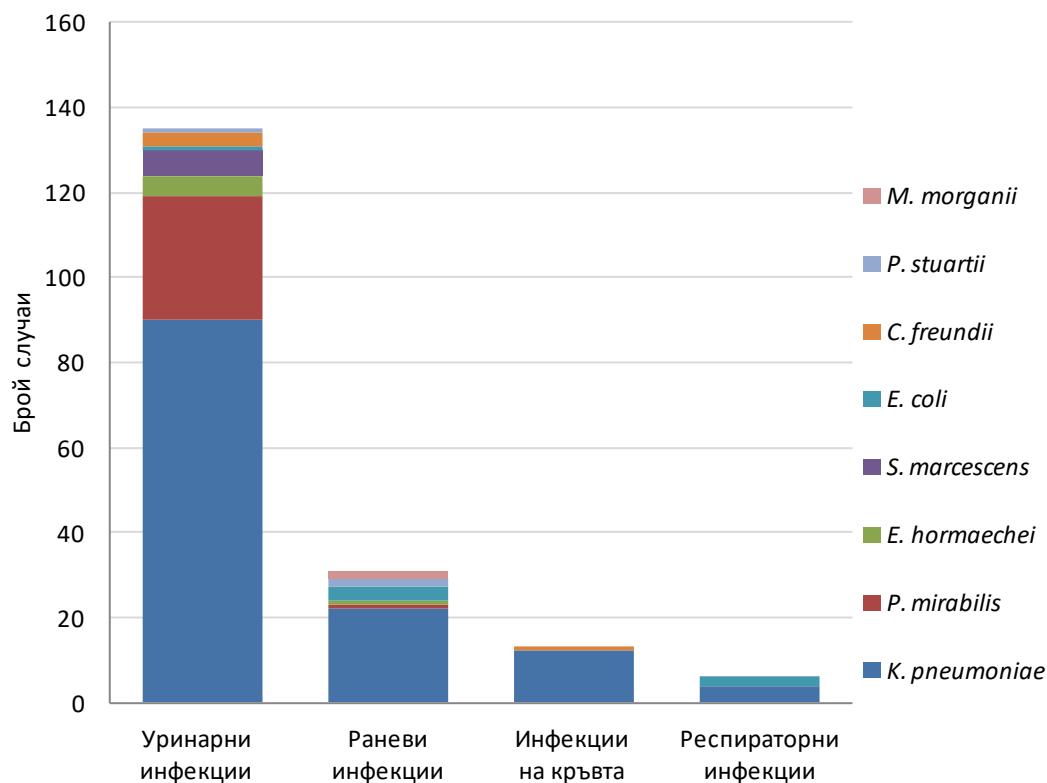
Карбапенемаза-продуциращите *Enterobacterales* бяха изолирани най-често при инфекции на уринарния тракт (73%), следвани от раневи инфекции (17%), инфекции на кръвта (7%) и само в 6 случая при респираторни инфекции (Таблица 14).

**Таблица 14.** Разпределение на 185 клинични случая с продуценти на карбапенемази в зависимост от бактериалния вид и източника на инфекция

Бактериален вид	Уринарни инфекции	Раневи инфекции	Инфекции на кръвта	Респираторни инфекции	Общ брой
<i>K. pneumoniae</i>	90	22	12	4	128
<i>P. mirabilis</i>	29	1			30
<i>E. coli</i>	1	3		2	6
<i>E. hormaechei</i>	5	1			6
<i>S. marcescens</i>	6				6
<i>C. freundii</i>	3		1		4
<i>P. stuartii</i>	1	2			3
<i>M. morgani</i>		2			2
Общо	135 (73.0%)	31 (16.8%)	13 (7.0%)	6 (3.2%)	185

*K. pneumoniae* беше доминиращият карбапенемаза-продуциращ патоген, който се изолираше при всички инфекции от CRE (Фигура 20). В спектралния състав на уринарните

инфекции присъстваха почти всички бактериални видове, с изключение само на *M. morganii*. Подобно видово разнообразие беше наблюдавано и при раневите инфекции. Инфекциите на кръвта се причиняваха почти винаги от *K. pneumoniae*, докато респираторните инфекции се асоциираха освен с *K. pneumoniae* и с *E. coli*.



**Фигура 20.** Етиологична структура на инфекциите от карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales*

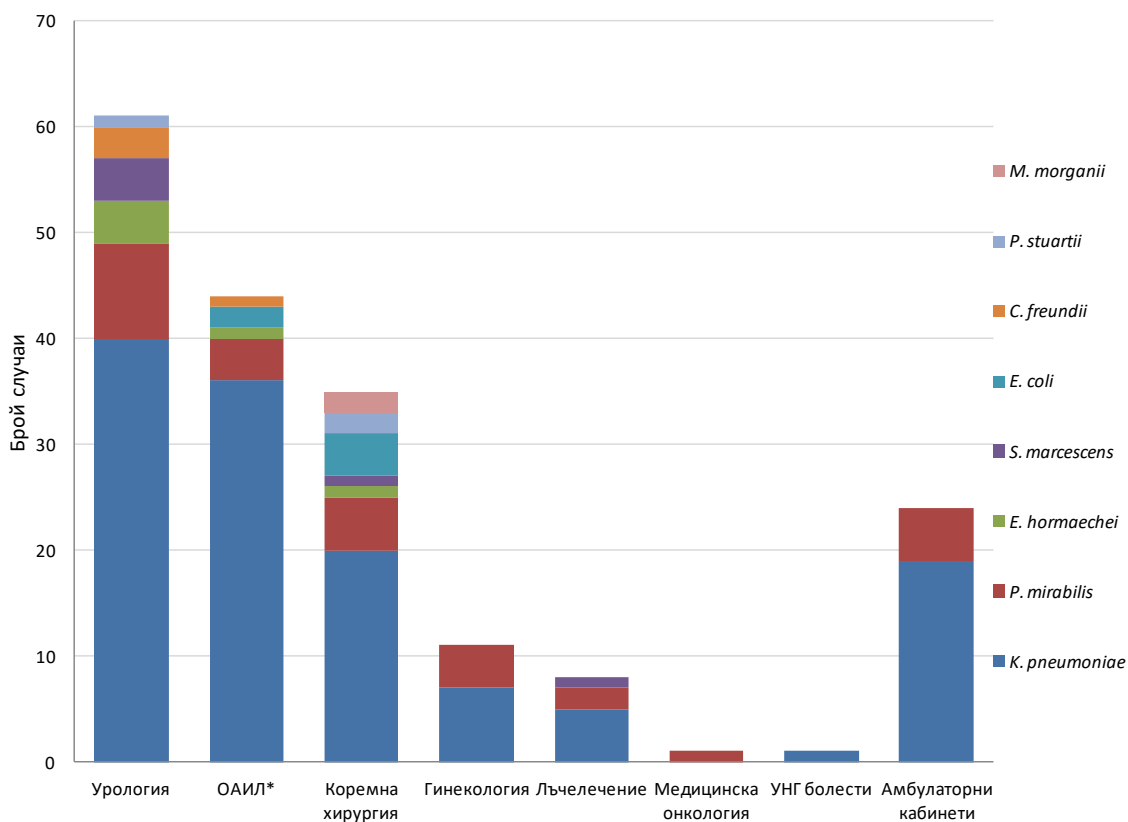
Получените резултати подчертават значението на ранното откриване на карбапенемаза-продуциращите патогени за провеждане на адекватна терапия и за успешно лечение на животозастрашаващи инфекциозни усложнения.

Таблица 15 и Фигура 21 показват произхода на карбапенемаза-продуциращите *Enterobacterales* по отношение на болничните структури. Анализът на данните показва, че 58% от болните са били хоспитализирани в хирургичните клиники в момента на изолиране на първия карбапенемаза-продуциращ щам. Почти всички болни са били подложени на големи хирургични интервенции с последващ престой в Отделението по анестезиология и интензивно лечение, откъдето произхождат 24% от продуцентите на карбапенемази.

**Таблица 15.** Разпределение на 185 клинични случая с продуценти на карбапенемази в зависимост от бактериалния вид и болничната структура

Бактериален вид	Урология	ОАИЛ*	Обща и коремна хирургия	Гинекология	Лъчелечение	Медицинска онкология	УНГ болести	Амбулаторни кабинети	Общ брой
<i>K. pneumoniae</i>	40	36	20	7	5		1	19	128
<i>P. mirabilis</i>	9	4	5	4	2	1		5	30
<i>E. coli</i>		2	4						6
<i>E. hormaechei</i>	4	1	1						6
<i>S. marcescens</i>	4		1		1				6
<i>C. freundii</i>	3	1							4
<i>P. stuartii</i>	1		2						3
<i>M. morgani</i>			2						2
Общо	61	44	35	11	8	1	1	24	185
(%)	(33.0%)	(23.8%)	(18.9%)	(5.9%)	(4.3%)	(0.5%)	(0.5%)	(13.0%)	

\* Отделение по анестезиология и интензивно лечение



**Фигура 21.** Графично изобразяване на разпределението на 185 случая с продуценти на карбапенемази в зависимост от бактериалния вид и болничната структура. (\*) Отделение по анестезиология и интензивно лечение.

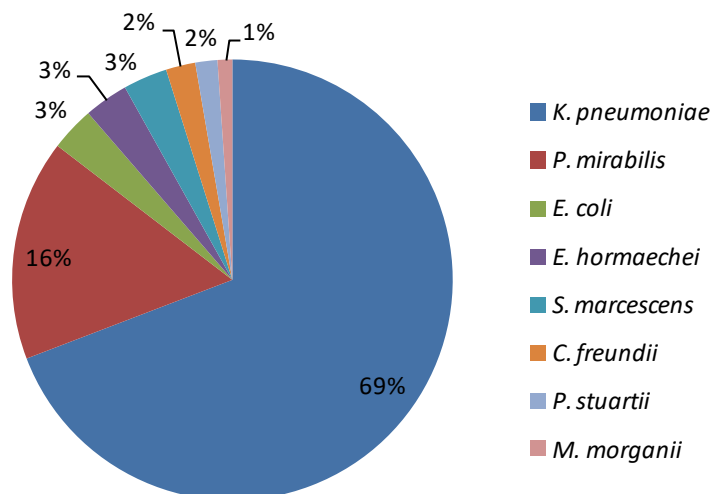
Силно обезпокоителна е констатацията, че в 13% от случаите пациентите са амбулаторни, което ги поставя в голям риск, тъй като инфекциите от CRE са трудно лечими в болнични условия и на практика нелечими в амбулаторни поради отсъствието на препарати в таблетъчни форми за лечението им.

В структурата на CRE *K. pneumoniae* беше доминиращият карбапенемаза-продуциращ вид ( $n = 128$ ), следван от *P. mirabilis* ( $n = 30$ ) (Таблица 16).

**Таблица 16.** Структура на карбапенемаза-продуциращите *Enterobacterales*

Бактериален вид	Продуценти на карбапенемази	
	общ брой	отн. дял в %
<i>K. pneumoniae</i>	128	69.2
<i>P. mirabilis</i>	30	16.2
<i>E. coli</i>	6	3.2
<i>E. hormaechei</i>	6	3.2
<i>S. marcescens</i>	6	3.2
<i>C. freundii</i>	4	2.2
<i>P. stuartii</i>	3	1.6
<i>M. morgani</i>	2	1.1
Общо	185	100.0

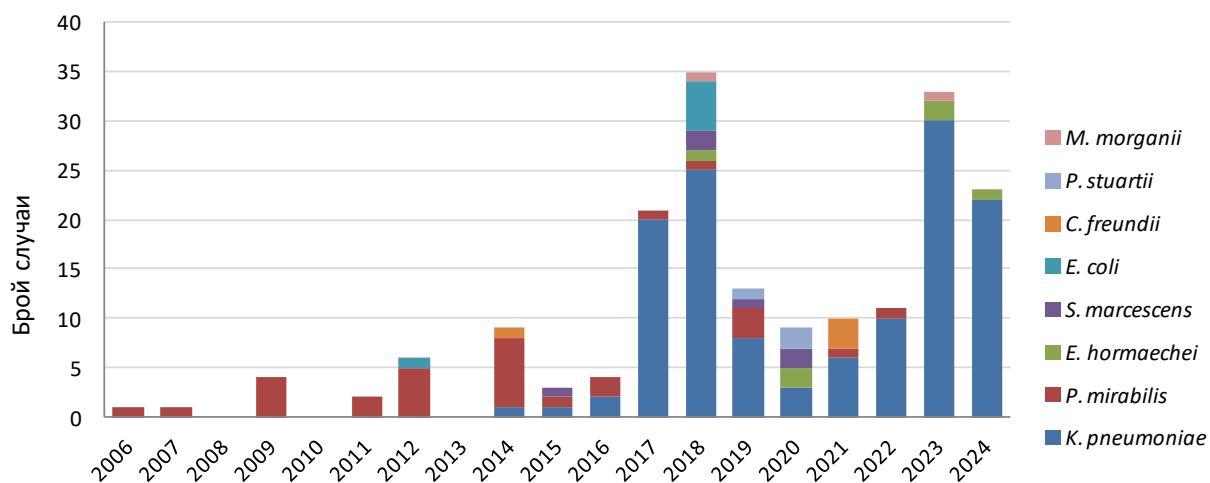
Останалите видове съставляваха общо около 15% от общия брой щамове с карбапенемази (Фигура 22).



**Фигура 22.** Диаграма, изобразяваща процентното разпределение на карбапенемаза-продуциращите *Enterobacterales* между бактериалните продуценти

Получените резултати потвърждават значението на *K. pneumoniae* като основен нозокомиален патоген. Видовото разнообразие обаче е специфична структурна особеност на болнично ниво. Тези данни свидетелстват за ролята на индуцибелните ентеробактерии, като *E. cloacae* complex, *S. marcescens*, *C. freundii* complex, *M. morgani*, *K. aerogenes* и *P. stuartii* в дисеминирането на гени, кодиращи карбапенемази. Следователно контролирането на инфекциите от продуценти на карбапенемази изисква систематичното им откриване при всички видове *Enterobacteriales*.

Годишното разпределение на случаите с продуценти на карбапенемази в зависимост от бактериалния вид е представено на Фигура 23. Анализът на данните очертава две тенденции: нарастване броя на случаите сред обичайния карбапенемаза-продуциращ вид (*K. pneumoniae*) до степен на почти пълна доминация през 2023-2024 година и постепенно увеличаване броя на бактериалните видове с карбапенемази. Докато в началото на проучването продуцентите на карбапенемази принадлежаха към *P. mirabilis*, то към 2020 г. установените CRE принадлежаха към 8 бактериални вида, от които 5 бяха от групата на индуцибелните ентеробактерии. В същото време карбапенемаза-продуциращите *K. pneumoniae* нарастваха от единични случаи през 2014-2016 година до 30 случая през 2023 г.



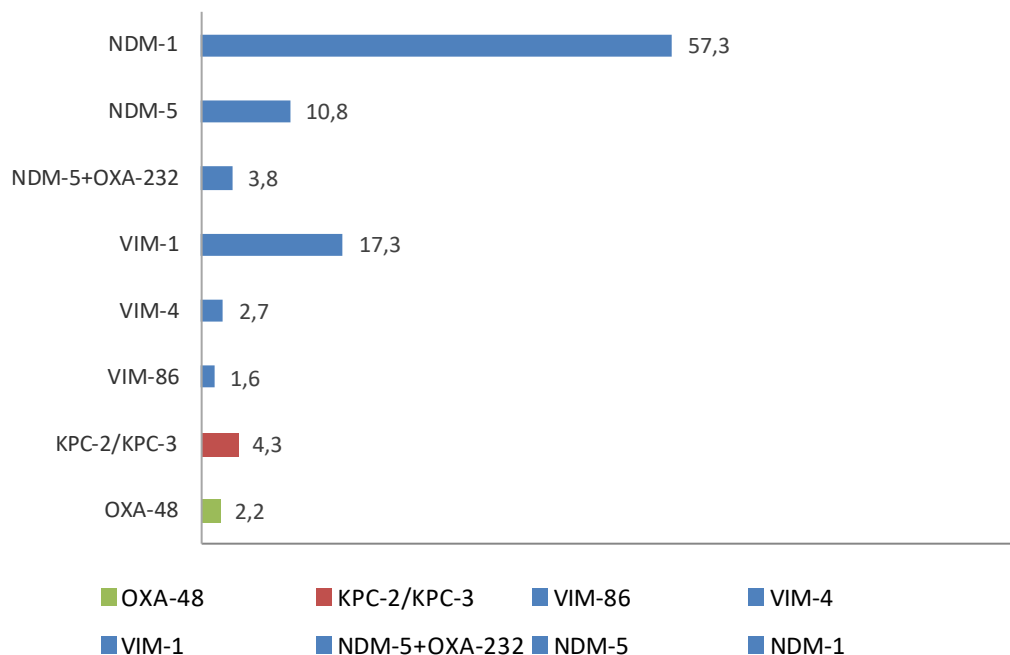
**Фигура 23.** Разпределение на 185 случая с продуценти на карбапенемази в зависимост от бактериалния вид и година на изолиране

При PCR анализите бяха идентифицирани четири семейства карбапенемазни гени –  $bla_{NDM}$ ,  $bla_{VIM}$ ,  $bla_{KPC}$  и  $bla_{OXA-48-like}$ . Над всички доминираха  $bla_{NDM}$  гените, открити в *K. pneumoniae* ( $n = 119$ ), *E. coli* ( $n = 6$ ), *C. freundii* ( $n = 3$ ), *M. organii* ( $n = 2$ ), *S. marcescens* ( $n = 2$ ) и един щам *E. hormaechei*. Те бяха следвани от други метало- $\beta$ -лактамазни гени –  $bla_{VIM}$  идентифицирани в *P. mirabilis* ( $n = 30$ ), *S. marcescens* ( $n = 4$ ), *P. stuartii* ( $n = 3$ ), *E. hormaechei* ( $n = 2$ ) и един-единствен щам *C. freundii*. Гени от семейство KPC бяха открити само в *K. pneumoniae* ( $n = 8$ ), докато  $bla_{OXA-48-like}$  гени бяха идентифицирани в *E. hormaechei* ( $n = 3$ ) и един щам *K. pneumoniae*. Освен това в седем от изолатите *K. pneumoniae*, които съдържаха  $bla_{NDM}$ , бяха идентифицирани също и  $bla_{OXA-48-like}$  гени (Таблица 17).

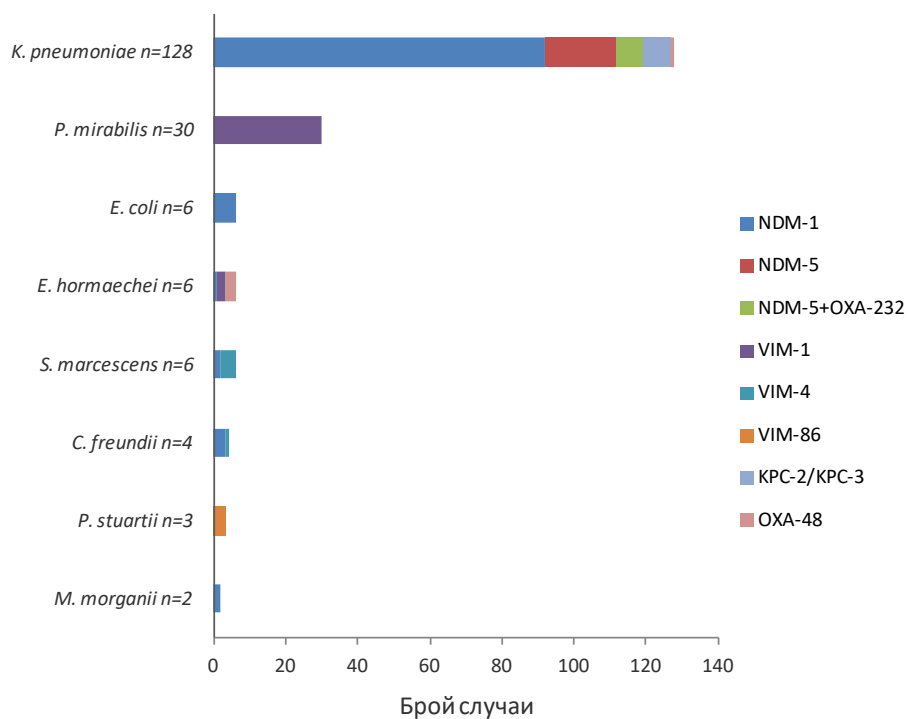
**Таблица 17.** Разпределение на карбапенемазите сред отделните бактериални видове

Бактериален вид	NDM-1	NDM-5	NDM-5+OXA-232	VIM-1	VIM-4	VIM-86	KPC-2	KPC-3	OXA-48	Общ брой
<i>K. pneumoniae</i>	92	20	7				6	2	1	128
<i>P. mirabilis</i>				30						30
<i>E. coli</i>	6									6
<i>E. hormaechei</i>	1			2					3	6
<i>S. marcescens</i>	2				4					6
<i>C. freundii</i>	3				1					4
<i>P. stuartii</i>						3				3
<i>M. organii</i>	2									2
Общо	106	20	7	32	5	3	6	2	4	185
(%)	(57.3%)	(10.8%)	(3.8%)	(17.3%)	(2.7%)	(1.6%)	(3.2%)	(1.1%)	(2.2%)	

Що се отнася до алелните варианти на  $bla_{NDM}$ ,  $bla_{NDM-1}$  ( $n = 106$ ) беше най-често срещаният алел, а най-близкият до него вариант  $bla_{NDM-5}$  беше установен самостоятелно в двадесет изолата *K. pneumoniae* и в асоциация с  $bla_{OXA-232}$  в седем. Останалите карбапенемазни гени кодираха три различни варианта на  $bla_{VIM}$  ( $bla_{VIM-1}$ ,  $n = 32$ ;  $bla_{VIM-4}$ ,  $n = 5$  и  $bla_{VIM-86}$ ,  $n = 3$ ), два варианта на  $bla_{KPC}$  ( $bla_{KPC-2}$ ,  $n = 6$  и  $bla_{KPC-3}$ ,  $n = 2$ ) и два  $bla_{OXA-48-like}$  ( $bla_{OXA-48}$ ,  $n = 4$  и  $bla_{OXA-232}$ ,  $n = 7$ ). Генът  $bla_{NDM-1}$  беше разпространен в щамове от почти всички бактериални видове, докато другите карбапенемазни гени демонстрираха видова специфичност. Така например  $bla_{VIM-86}$  беше доказан само в щамове *P. stuartii*, докато  $bla_{KPC-2/3}$  и  $bla_{NDM-5}$  самостоятелно или в асоциация с  $bla_{OXA-232}$  – само в щамове *K. pneumoniae* (Фигури 24 и 25).

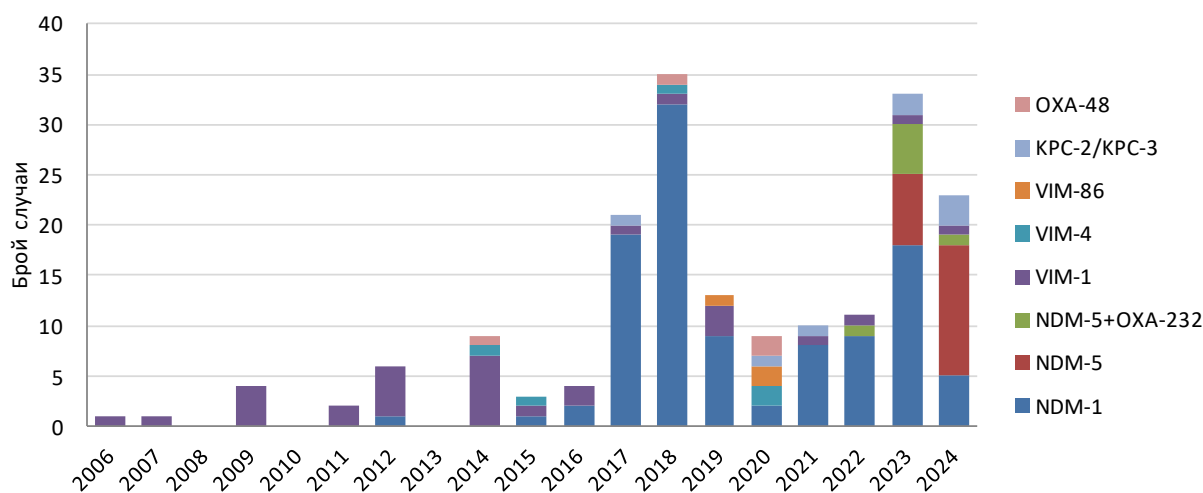


**Фигура 24.** Относителен дял (%) на отделните карбапенемази сред общия брой клинични случаи



**Фигура 25.** Графично изобразяване на карбапенемазите в отделните бактериални видове

Анализът на динамиката на дисеминиране на карбапенемазните гени показва, че броят на случаите с CRE годишно, разнообразието на карбапенемазните варианти и бактериалните видове са се увеличили по време на изследвания период с тенденция към доминиране на NDM вариантите и увеличаване броя на карбапенемаза-продуциращите *K. pneumoniae* (Фигури 23—26).



**Фигура 26.** Годишно разпределение на 185 случая с карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales* според идентифицираната карбапенемаза

Общият брой от 185 случая на инфекции от CRE бяха идентифицирани при 172 пациенти, от които 161 бяха хоспитализирани болни. Анализът на демографските данни показва, че 60% от болните бяха мъже (Таблица 18).

**Таблица 18.** Разпределение на пациентите с инфекции от продуценти на карбапенемази в зависимост от половата принадлежност и бактериалния причинител

Бактериален вид	Мъж	Жена	Общ брой
<i>K. pneumoniae</i>	78	50	128
<i>P. mirabilis</i>	17	13	30
<i>E. coli</i>	3	3	6
<i>E. hormaechei</i>	4	2	6
<i>S. marcescens</i>	5	1	6
<i>C. freundii</i>	3	1	4
<i>P. stuartii</i>	0	3	3
<i>M. morgani</i>	2	0	2
Общо	112 (60.5%)	73 (39.5%)	185

Възрастта на пациентите варираше от 28±89 години (средна възраст 63) с преобладаване на възрастовата група над 65 години, което съответства на демографския профил на лекуваните в онкологията пациенти (Таблица 19).

**Таблица 19.** Разпределение на пациентите с инфекции от продуценти на карбапенемази в зависимост от възрастта и бактериалния причинител

Бактериален вид	Възрастова категория в години	
	20-64	над 65
<i>K. pneumoniae</i>	46	82
<i>P. mirabilis</i>	13	17
<i>E. coli</i>	1	5
<i>E. hormaechei</i>	2	4
<i>S. marcescens</i>	2	4
<i>C. freundii</i>	1	3
<i>P. stuartii</i>	3	0
<i>M. morgani</i>	0	2
Общо	68 (36.8%)	117 (63.2%)

При седем от 172-мата пациенти бяха установени повече от един изолат от CRE, принадлежащи към различни бактериални видове или различни ST. Един пациент (#34) е имал *bla*<sub>KPC-2</sub>-позитивна *K. pneumoniae* KP746 и *bla*<sub>VIM-1</sub>-позитивен *P. mirabilis* PM 746 в една и съща проба урина. Друг пациент (#55) е имал *bla*<sub>NDM-1</sub>-позитивни изолати *E. coli* EC841 и *K. pneumoniae* KP841 в една и съща проба от оперативна рана. В трети случай (пациент #124) са установени *bla*<sub>NDM-5</sub>-позитивна *K. pneumoniae* KP166 и *bla*<sub>NDM-1</sub>-позитивна *M. morgani* MM231 в абдоминална течност. При четвъртия пациент #134 са открити два щама *K. pneumoniae* с различни ST и карбапенемази от различни класове в урини, изследвани в рамките на два месеца (щам KP1442 от ST258 с *bla*<sub>KPC-2</sub>, последван от щам KP1970 ST11 с *bla*<sub>NDM-1</sub>). При двама пациенти (#145 и #156) са установени по два щама *K. pneumoniae* ST6260, носещи различни карбапенемази в материали, изследвани в рамките на едномесечен период (KP3064 и KP571 с *bla*<sub>NDM-5</sub>, последвани съответно от KP3161 и KP834 с *bla*<sub>NDM-1</sub>+*bla*<sub>OXA-232</sub>). При седмия пациент #163 са открити два *bla*<sub>NDM-1</sub>-позитивни щама *K. pneumoniae*, принадлежащи към различни ST в хемокултури, взети при поредни септични епизоди в рамките на едномесечен период (щам KP1817 от ST11 и щам KP1882 от ST231) (Фигури 27 и 28).



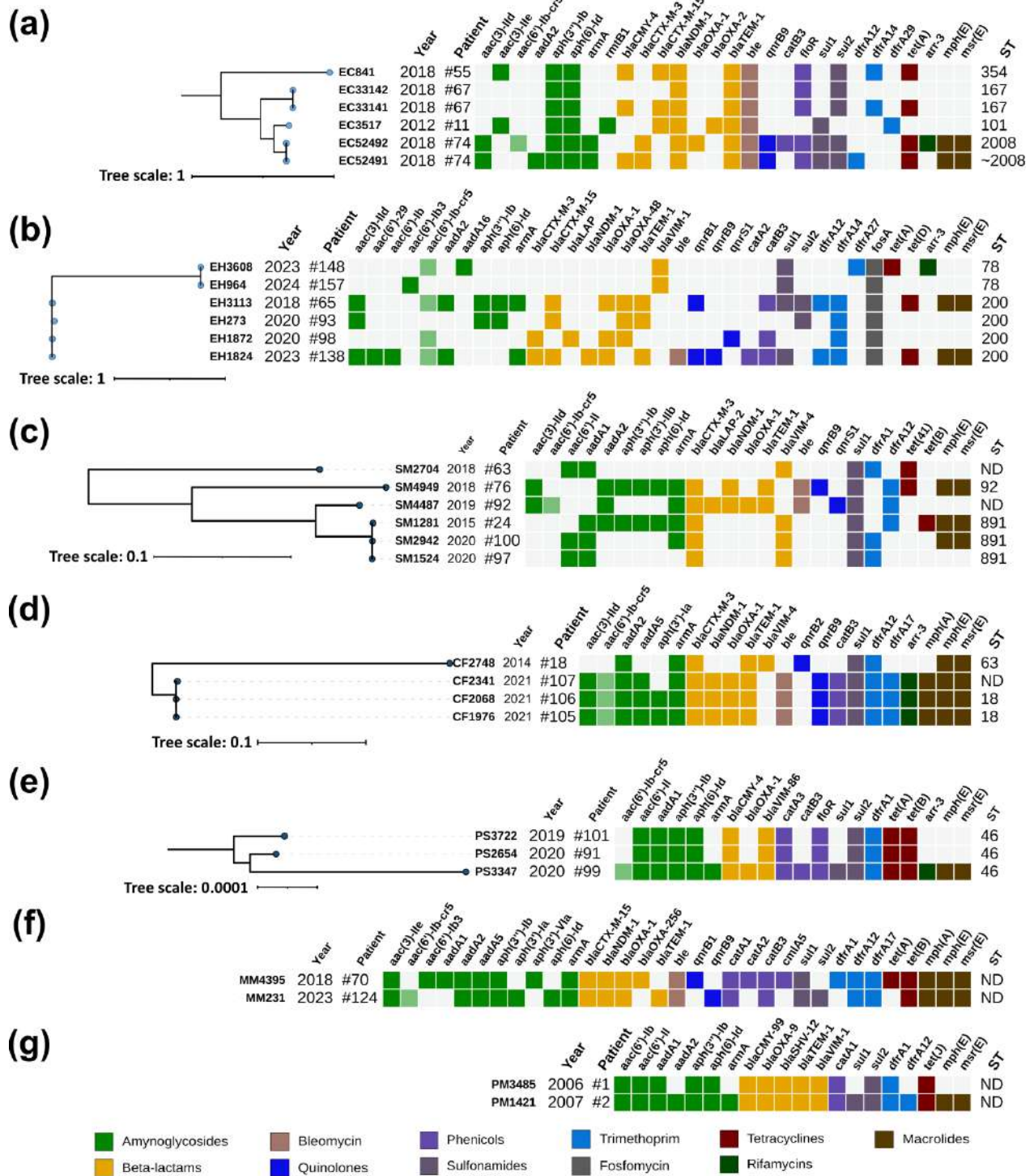
флуорохинолони. Филогенетичното дърво беше свързано със съответната топлинна карта с гени за резистентност и визуализирано с iTOL v6.8.1 (Letunic et al., 2021). Секвенционният тип (ST) е определен по наличната MLST схема. Типовете MLVA (MT) са определени с помощта на MLVA8+ метода на Donchev et al. (Donchev et al. 2023). КР, *Klebsiella pneumoniae*.

### 3.2.2. *Escherichia coli*

При оценка на резистома на изолатите *E. coli* беше установено, че всички са носители на *bla*<sub>NDM-1</sub> и принадлежат към четири секвенционни типа – ST354, ST167, ST101 и ST2008 (Фигура 28а). Изолатите ST2008 бяха свързани с наличието на метилтрансферазния ген *armA*, *bla*<sub>CTX-M-3</sub> и *qnrB9*, който придава резистентност към хинолони. Те бяха изолирани от трахеалния аспират на един пациент (#74), като единият от изолатите (EC52491) носеше и *bla*<sub>CMY-4</sub>, но беше чувствителен на триметоприм поради отсъствието на *dfrA* гени, докато другият изолат (EC52492) носеше *dfrA12*, отговорен за наблюдаваната резистентност към триметоприм и в допълнение *aac(6')-Ib-cr5*. Клъстерът ST167 включваше два изолата, получени от перитонеалната течност на един пациент (#67). Един от изолатите (EC33141) носеше *bla*<sub>CTX-M-15</sub> и *bla*<sub>CMY-4</sub>, докато другият изолат (EC33142) беше чувствителен на aztreonam, тъй като не притежаваше нито ESBL нито придобити AmpC гени. Останалите два щама бяха генетично различни и носеха разнообразни детерминанти на резистентност. При EC3517 от ST101 беше идентифициран и метилтрансферазният ген *rmtB1*.

### 3.2.3. *Enterobacter hormaechei*

При *E. hormaechei* бяха идентифицирани два различни секвенционни типа – ST78 и ST200 (Фигура 28b). Изолатите ST78 бяха свързани с *bla*<sub>VIM-1</sub>, но нямаха метилтрансферазни гени. Един от тези изолати (EH3608) носеше и *aac(6')-Ib-cr5*, който придава резистентност към определени аминогликозиди и флуорохинолони. За разлика от тях изолатите от ST200 показваха по-голямо генетично разнообразие, като EH1824 беше носител на *bla*<sub>NDM-1</sub>, а останалите три носеха *bla*<sub>OXA-48</sub>. Асоциация на ArgA метилтрансфераза и карбапенемаза беше установена при EH3113 с OXA-48 и при EH1824 с NDM-1. Освен това при три от изолатите ST200 бяха открити *qnr* и *aac(6')-Ib-cr5* гени, а при всички – *bla*<sub>CTX-M-15</sub> и/или *bla*<sub>CTX-M-3</sub>.



**Фигура 28.** Представяне на гените за придобита антимикробна резистентност на: **(a)** *Escherichia coli*; **(b)** *Enterobacter hormaechei*; **(c)** *Serratia marcescens*; **(d)** *Citrobacter freundii*; **(e)** *Providentia stuartii*; **(f)** *Morganella morganii*; **(g)** *Proteus mirabilis*. Филогенетичните дървета за отделните видове **(a–e)** са конструирани с помощта на PhaME v1.0.4 (Shakya M,

2020), като се вземат предвид само SNP в рамките на кодиращите области на основния геном. Гените, свързани с отделните групи антибиотици, са оцветени в съответствие с легендата (вдясно). Единственото изключение от легендата е генът *aac(6')-Ib-cr5*, оцветен в бледозелено, за да покаже наличието на резистентност към аминогликозиди и флуорохинолони. Филогенетичните дървета бяха свързани със съответните топлинни карти с гени за резистентност и визуализирани с iTOL v6.8.1 (Letunic et al., 2021). Секвенционният тип (ST) е определен по наличните MLST схеми за отделните видове. ND, not determined – не е определен поради липсващи алели или непълно съвпадение. EC, *Escherichia coli*; EH, *Enterobacter hormaechei*; SM, *Serratia marcescens*; CF, *Citrobacter freundii*; PS, *Providentia stuartii*; MM, *Morganella morganii*; PM, *Proteus mirabilis*.

#### **3.2.4. *Serratia marcescens***

Разгледаните изолати *S. marcescens* бяха асоциирани с карбапенемазните гени *bla<sub>NDM-1</sub>* и *bla<sub>VIM-4</sub>* (Фигура 28c). Продуцентите на NDM-1 в допълнение имаха метилтрансферазния ген *armA*, *bla<sub>CTX-M-3</sub>* и *qnr* гени. Клъстерът ST891 включваше три изолата, които носеха *bla<sub>VIM-4</sub>* и *bla<sub>CTX-M-3</sub>* в асоциация с *armA* при щамове SM1281 и SM2942. Последният изолат (SM2704) носеше *bla<sub>VIM-4</sub>*, но нямаше *armA* и *bla<sub>CTX-M-3</sub>* и беше отдалечен от VIM-4 клъстера.

#### **3.2.5. *Citrobacter freundii***

Изолатите *C. freundii* бяха разделени в два секвенционни типа – ST18 и ST63 (Фигура 28d). При един от изолатите не беше възможно точното определяне на секвенционен тип, но беше установено високо филогенетично сходство с изолатите от ST18. Изолатите от този секвенционен тип се отличаваха с наличието на *bla<sub>NDM-1</sub>* и *qnrB9*, докато при единствения изолат от ST63 се наблюдаваха *bla<sub>VIM-4</sub>* и *qnrB2*. При всички изолати се установи наличие на *armA* и *bla<sub>CTX-M-3</sub>*.

#### **3.2.6. *Providentia stuartii***

Трите изследвани изолата *P. stuartii* бяха от секвенционен тип ST46 (Фигура 28e). И при трите беше установено наличие на карбапенемаза-кодиращ *bla<sub>VIM-86</sub>* в асоциация с широк набор от гени на резистентност към аминогликозиди (*aac(6')-II*, *aadA1*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*),  $\beta$ -лактами (*bla<sub>CMY-4</sub>*), триметоприм (*dfrA1*) и сулфонамиди (*sul2*). В допълнение

един от изолатите (PS3347) беше носител на метилтрансферазния ген *armA* заедно с *aac(6')-Ib-cr5*.

### 3.2.7. *Morganella morganii*

Двата изолата *M. morganii* се характеризираха с присъствието на *bla<sub>NDM-1</sub>* в асоциация с *armA*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>* и *qnrB* гени (Фигура 28f). Един от изолатите (MM231) носеше и *aac(6')-Ib-cr5*, кодиращ резистентност към аминогликозиди и флуорохинолони.

### 3.2.8. *Proteus mirabilis*

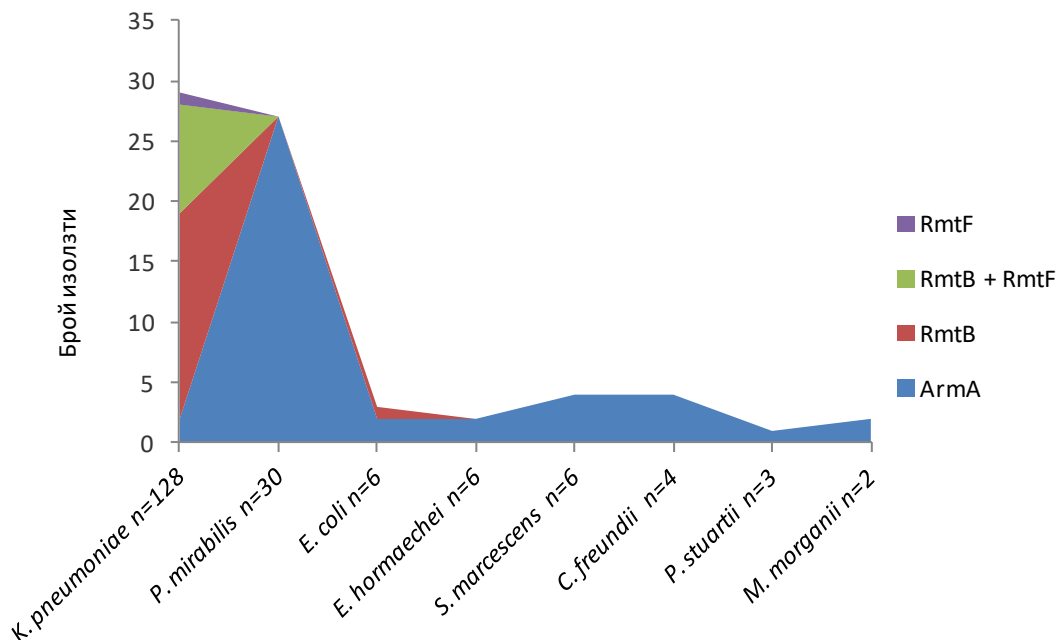
Двата представителни изолата *P. mirabilis*, подложени на WGS бяха носители на *bla<sub>VIM-1</sub>* в асоциация с детерминанти на резистентност към аминогликозиди (*aac(6')-Ib*, *aadA1*, *aadA2*, *aph(3'')-Ib* и *aph(6)-Id*), β-лактами (*bla<sub>CMY-99</sub>*, *bla<sub>SHV-12</sub>*, *bla<sub>OXA-9</sub>* и *bla<sub>TEM-1</sub>*), триметоприм (*dfrA1*, *dfrA12*) и сулфонамиди (*sul1*, *sul2*) (Фигура 28g). При PM1421, първият от поредица от 27 изолата с едентичен PFGE профил, беше идентифициран и *armA* гена.

## 3.3. Идентифициране на асоциирани 16S рРНК метилтрансферазни гени

Метилтрансферазните гени *armA*, *rmtB* и *rmtF* бяха доказани при 38.9% (72/185) от продуцентите на карбапенемази (Таблица 20 и Фигура 29). *ArmA* метилтрансферазата беше идентифицирана в 61% (44/72) от случаите. Тя беше асоциирана най-често с изолати *P. mirabilis* с *bla<sub>VIM-1</sub>* ( $n = 27$ ), следвани от *bla<sub>NDM-1</sub>*-позитивни изолати ( $n = 12$ ) от различни бактериални видове, два изолата *S. marcescens* с *bla<sub>VIM-4</sub>* и единични изолати *P. stuartii*, *C. freundii* и *E. hormaechei* съответно с *bla<sub>VIM-86</sub>*, *bla<sub>VIM-4</sub>* и *bla<sub>OXA-48</sub>*.

**Таблица 20.** Разпределение на асоциираните метилтрансферази сред 185 карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales*

Бактериален вид (n)	ArmA	RmtB	RmtB + RmtF	RmtF	Общ брой	Отн. дял в %
<i>K. pneumoniae</i> n=128	2	17	9	1	29	22.7
<i>P. mirabilis</i> n=30	27				27	90.0
<i>E. coli</i> n=6	2	1			3	50.0
<i>E. hormaechei</i> n=6	2				2	33.3
<i>S. marcescens</i> n= 6	4				4	66.7
<i>C. freundii</i> n=4	4				4	100
<i>P. stuartii</i> n=3	1				1	33.3
<i>M. morganii</i> n= 2	2				2	100
Общо (185)	44	18	9	1	72	38.9



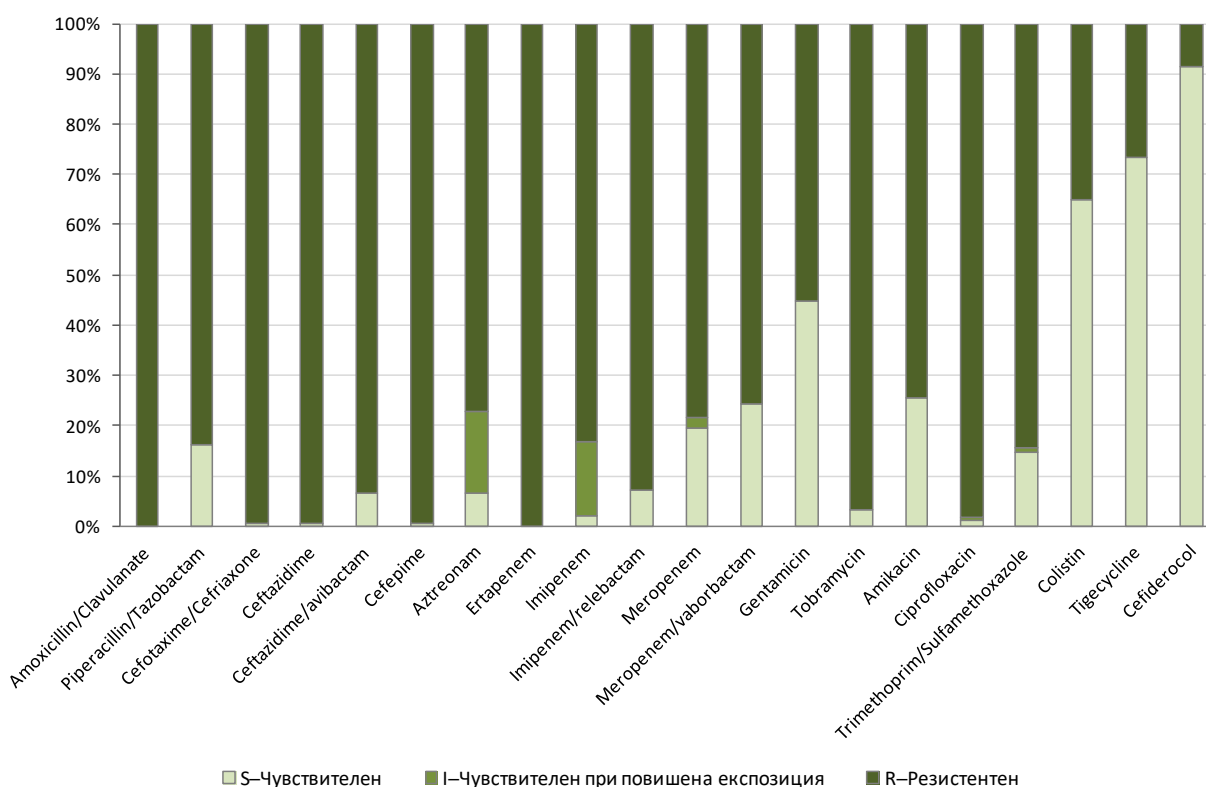
**Фигура 29.** Графично изобразяване на асоциираните 16S рРНК метилтрансферази сред продуцентите на карбапенемази

С изключение на един-единствен изолат – *E. coli* с  $bla_{NDM-1}$ , генът *rmtB* беше асоцииран с изолати *K. pneumoniae* ST6260, притежаващи  $bla_{NDM-5}$  ( $n = 26$ ), като някои изолати носеха също и *rmtF*. Единствената самостоятелна асоциация на *rmtF* беше установена в *K. pneumoniae* ST11 с  $bla_{NDM-1}$ . Метилтрансферазни гени не бяха идентифицирани в  $bla_{KPC}$ -позитивни изолати *K. pneumoniae*,  $bla_{VIM-1}$ -позитивни изолати *E. hormaechei* и  $bla_{OXA-48}$ -позитивния *K. pneumoniae* щам.

### 3.4. Чувствителност към антимикробни средства на карбапенемаза-продуциращите *Enterobacterales*

Обобщените резултати от изпитването на антимикробната чувствителност са показани на Фигура 30. Всички изолати бяха множествено-резистентни (MDR) според дефинициите на Magiorakos et al. (Magiorakos et al. 2012). Като цяло cefiderocol беше най-активният антимикробен агент с 91% чувствителни изолати. Общо 91% (136/150) бяха чувствителните към tigecycline изолати, като се изключат 35-те изолата с вродена резистентност (30 *P. mirabilis*, 3 *P. stuartii* и 2 *M. morganii*) (Leclercq et al. 2013). Само в 32 случая обаче имаше индикации за клиничните му приложения заради абдоминални и мекотъканни инфекции от CRE. След изключване на изолатите с вродена резистентност

към colistin (30 *P. mirabilis*, 6 *S. marcescens*, 3 *P. stuartii* и 2 *M. organii*), 83% (120/144) от изолатите се оказаха colistin-чувствителни. Десет от 24-те colistin-резистентни изолата бяха *K. pneumoniae* ST11 с  $bla_{NDM-1}$  и девет ST6260 с  $bla_{NDM-5}$  ( $n = 6$ ) или  $bla_{NDM-5} + bla_{OXA-232}$  ( $n = 3$ ). Останалите резистентни на colistin изолати включваха *K. pneumoniae* ST258 с  $bla_{KPC-2}$  ( $n = 2$ ), ST307 с  $bla_{KPC-3}$ , ST147 с  $bla_{NDM-1}$  и *E. coli* ST354 с  $bla_{NDM-1}$ . Установените високи нива на резистентност към tobramycin (97%), amikacin (75%) и gentamicin (55%) бяха свързани основно с наличието на 16S рРНК метилтрансферази (39%) и множество аминокликозид-модифициращи ензими.



**Фигура 30.** Антимикробна чувствителност на 185 продуцента на карбапенемази

По отношение на карбапенемите 19 % бяха чувствителни към меропенем и 2 % – към имипенем. Всички изолати бяха резистентни към ертапенем и имаха МПК стойности за меропенем над скрининговите на EUCAST за откриване на карбапенемази ([https://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](https://www.eucast.org/resistance_mechanisms)). Почти всички изолати, с изключение само на един *K. pneumoniae* с  $bla_{OXA-48}$  и ESBL-отрицателен, бяха резистентни към цефалоспорици и цефамицини. Чувствителността към ceftazidime-avibactam беше

ограничена до продуцентите на КРС и ОХА-48, които съставляваха 6% (12/185) от всички изолати, а тази на imipenem/telebactam и meropenem/vaborbactam до – осем случая с КРС-продуциращи *K. pneumoniae*.

### 3.5. Обсъждане

Проведеното ретроспективно геномно проучване за периода 2006-2024 г. в онкологичната болница е първото дългосрочно системно проучване върху карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales* в България. Установената честота на разпространение на CRE (1.7% от 10 738) е относително ниска, но проведенният регресионен анализ показва трайна тенденция за статистически значимо нарастване на случаите с продуценти на карбапенемази с 16.52 средногодишно. Наблюдаваната тенденция за увеличаване на случаите на CRE е в съответствие с докладваните по-рано резултати в други страни (Dortet et al. 2012; Raisanen et al. 2020; Samuelsen et al. 2007; Brolund et al. 2019).

*K. pneumoniae* беше най-често идентифицираният вид (69%) сред CRE. Тази констатация беше наблюдавана и в други европейски държави. (Huang et al. 2017; Dortet et al. 2012; Raisanen et al. 2020; Samuelsen et al. 2007). В същото време установеното разнообразие от карбапенемаза-продуциращи видове (*E. coli*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *E. hormaechei*, *P. stuartii*) и генетични варианти ( $bla_{NDM-1/5}$ ,  $bla_{VIM-1/4/86}$ ,  $bla_{KPC-2/3}$ ,  $bla_{OXA-48/232}$ ) вероятно се дължи на провеждания систематичен скрининг при всички изолати *Enterobacterales* и на статут на болницата, призвана да лекува онкологично болни в напреднал и усложнен стадий на заболяването от цялата страна.

Гените, кодиращи карбапенемази, бяха локализиращи както в различни конюгативни плазмиди (IncL/M, IncA/C, IncT, IncX3, IncFII, IncFIB, IncR, IncH, ColKP3), така и в хромозомата на изолати от определени бактериални видове (VIM-1 при *P. mirabilis*, NDM-5 при *K. pneumoniae*, VIM-4 при *S. marcescens*). Установеното разнообразие на карбапенемазна гена локализация е доказателство, че разпространението на този тип резистентност се извършва клонално и чрез конюгативни плазмиди, което изисква комплексен противоепидемичен контрол.

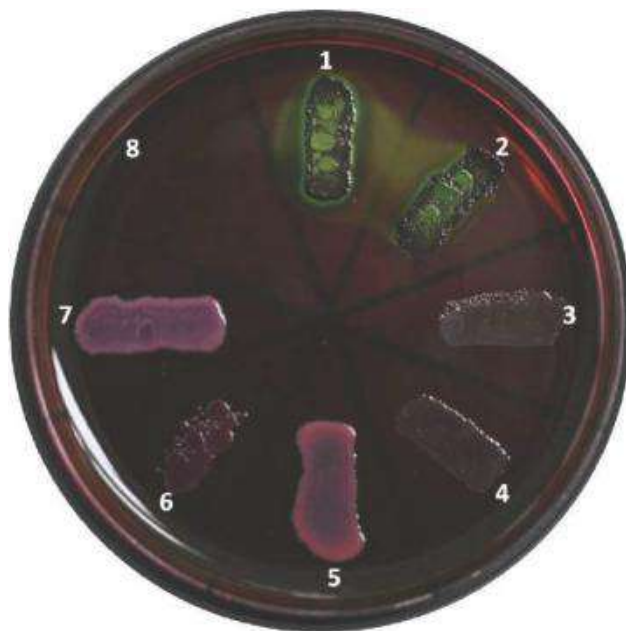
При CRE често се наблюдават MDR или XDR фенотипове, което ограничава възможностите за лечение (Tangden et al. 2015; Perez et al. 2016). Това се наблюдаваше и в нашата колекция от щамове поради асоциацията с други детерминанти на придобита

резистентност, включително гени за 16S рРНК метилтрансфери, придаващи високо ниво на панаминогликозидна резистентност (Wachino et al. 2012). В същото време идентифицирането на карбапенамази от различен молекулярен клас в един изолат (*K. pneumoniae* ST6260 с  $bla_{NDM-5} + bla_{OXA-232}$ ), както и доказването на СРЕ, принадлежащи към различни бактериални видове или различни ST в един пациент, определя необходимостта от геномно насочена антимикробна терапия.

#### 4. Генетични механизми на резистентност и геномни характеристики на colistin-резистентни, *mcr*-позитивни клинични щамове *E. coli*

##### 4.1. Идентифициране на colistin-резистентни, *mcr*-позитивни клинични щамове *E. coli*

Общо 4533 клинични изолата *Enterobacterales*, които не притежават вродена колистинова резистентност, бяха изследвани за резистентност към colistin през периода 2017-2024 г. Те включваха *E. coli* (n = 2669), *K. pneumoniae* (n = 1088), *E. cloacae* complex (n = 298), *K. oxytoca* complex (n = 255), *C. freundii* complex (n = 139), *K. aerogenes* (n = 55), *Citrobacter koseri* (n = 22), *Pantoea agglomerans* (n = 3), *Salmonella* spp. (n = 2) и по един изолат *Escherichia hermannii* и *Rahnella aquatilis*.



**Фигура 31.** Скрининг на colistin-резистентни *Enterobacterales* с помощта на селективната среда DiaPlate™ EMB Agar + Colistin. По посока на часовниковата стрелка: (1), *E. coli* NCTC 13846 *mcr-I*-позитивен, МПК на colistin = 4 mg/L; (2), *E. coli* EQA 4320 *mcr-I*-

позитивен, МПК на colistin = 4 mg/L; (3), *Providencia stuartii*, МПК на colistin >16 mg/L; (4), *Serratia marcescens*, МПК на colistin >16 mg/L; (5), *Klebsiella pneumoniae* PR3759, МПК на colistin >16 mg/L; (6), *K. pneumoniae* PR3760, МПК на colistin = 8 mg/L; (7), *K. pneumoniae* PR3761, МПК на colistin >16 mg/L; (8), *E. coli* ATCC 25922, МПК на colistin = 0.5 mg/L.

Системен фенотипен скрининг за колистинова резистентност беше извършван с помощта на селективна среда (DiaPlate™ EMB Agar + Colistin medium) чрез използване на общ инокулум с рутинната антибиограма, както е показано на Фигура 31 (Sabtcheva 2024).

Общо 44/4533 (1%) щама, изолирани от амбулаторни и хоспитализирани пациенти показаха растеж на селективната среда и МПК стойности > 2 mg/L. Те включваха 35/1088 (3.2%) щама *K. pneumoniae*, 7/2669 (0.3%) *E. coli* и 2/255 (0.8%) *K. oxytoca*. С мултиплексен PCR, *mcr-1* гена беше идентифициран в 3/2669 (0.1% ) colistin-резистентни щама *E. coli* от урини на амбулаторни пациенти. Всички останали colistin-резистентни изолати бяха *mcr*-негативни.

#### 4.2. Геномно разнообразие и резистом на *mcr*-позитивните клинични щамове *E. coli*

Използвайки дълговерижно секвениране, получихме цялостните геноми и на трите изолата, които бяха депозирани в European Nucleotide Archive (ENA accession number PRJEB70793). Първият *mcr*-позитивен щам – EC707, имаше геном с размер 4,9 Mb, носещ три плаزمиди с размери 154 kb (с IncFIB и IncFIC репликони), 110 kb (с IncI1-I(Alpha) репликон) и 64 kb (с IncI2 репликон). Другите два щама – EC1752 и EC2947 имаха геноми с размери съответно ~4,97 Mb и ~4,99 Mb. Всеки от тях притежаваше два почти идентични плазмиди с размери 125 kb (с IncFIB и IncFII репликони) и 6,6 kb (нетипабилен).

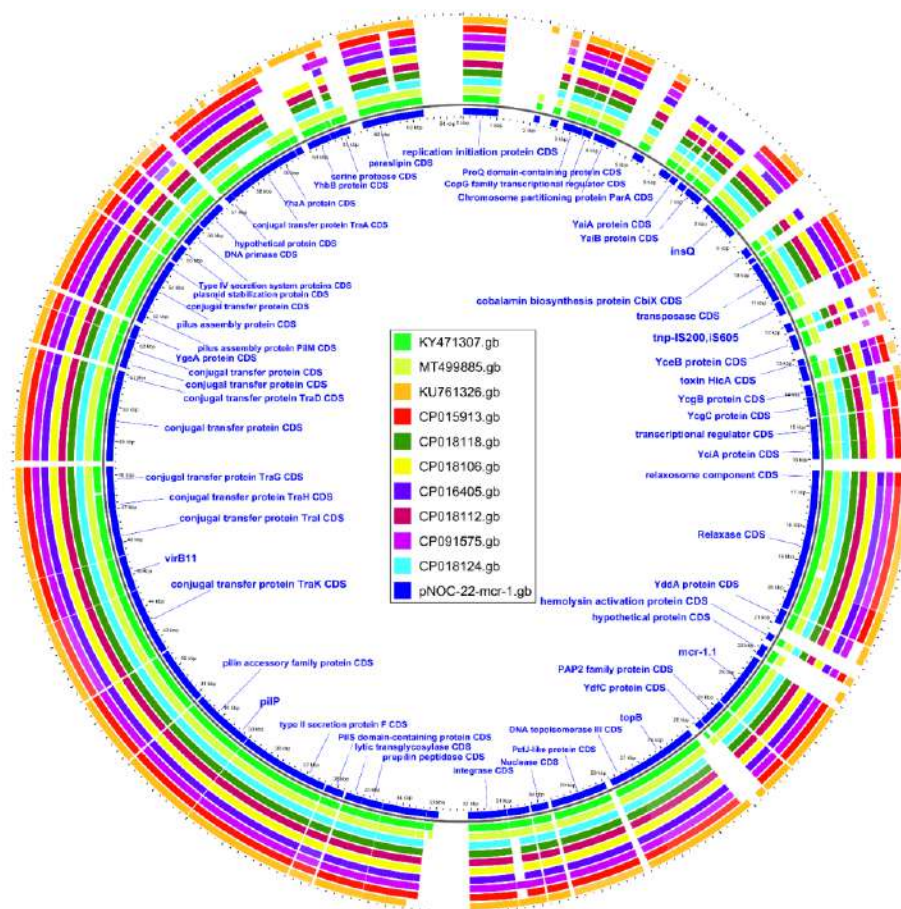
Чрез *in silico* MLST EC707 беше идентифициран като секвенционен тип (ST) 2067, докато EC1752 и EC2947 принадлежаха към ST131.

WGS анализът на EC707 разкри мутации в гени, свързани с резистентност към хинолони (*gyrA*<sup>D87N</sup>, *gyrA*<sup>S83L</sup>, *parC*<sup>S80I</sup>), fosfomicin (*glpT*<sup>E448K</sup>) и colistin (*pmrB*<sup>Y358N</sup>). Откритите гени за резистентност включваха *mcr-1.1*, *tet(A)*, *aadA1*, *aac(3)-IId* и инхибитор-резистентния β-лактамазен ген *bla*<sub>TEM-30</sub>.

EC1752 и EC2947 имаха сходен набор от детерминанти на резистентност, характеризиращ се с мутации в гени, свързани с резистентността към fosfomicin (*glpT*<sup>E448K</sup>),

*uhpT*<sup>E350Q</sup>), colistin (*pmrB*<sup>E123D</sup>) и хинолони (*parE*<sup>I529L</sup>) заедно с *mcr-1.32* гена. Интересно е, че всички детерминанти на резистентност при тези два щама бяха хромозомно кодирани.

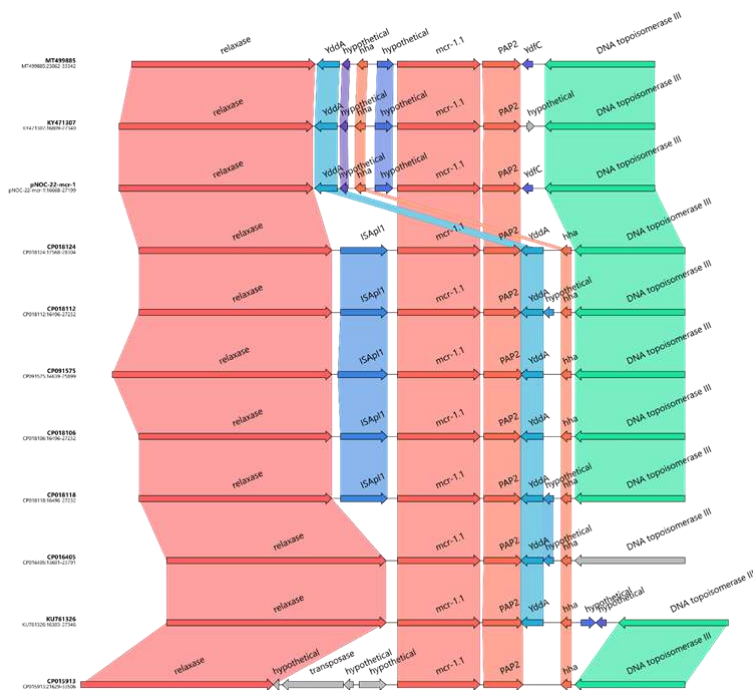
Вариантът *mcr-1.1* в EC707 беше разположен на 64 kb IncI2 плазмид, който нарекохме pNOC-22-mcr-1 (PRJEB70793). Десетте филогенетично най-близки плаزمиди бяха изтеглени от NCBI след BLAST анализ и сравнени с pNOC-22-mcr-1 (Фигура 32). Беше установена 99.9 % идентичност между pNOC-22-mcr-1 и IncI2 плазмид (pMCR-GN775; KY471307) от канадски изолат, принадлежащ към ST624 (Tijet et al. 2017).



**Фигура 32.** Сравнение на pNOC-22-mcr-1 с 10-те филогенетично най-близки плазмиди, получени посредством BLAST анализа.

Анализът на генетичните структури, които заобикалят *mcr-1.1* сегмента, съдържащ и PAP2 гена, разкри отсъствието на инсерционната последователност IS*ApII*, подобно на този на pMCR-GN775 (KY471307), както и на два IncI2 плазмиди, описани по-рано в

изолати от колумбийски болници и принадлежащи към ST58 и ST46 (De la Cadena et al. 2023) (Фигура 33).



**Фигура 33.** Сравнение на *mcr-1* сегмента на pNOC-22-*mcr-1* с този на 10-те филогенетично най-близки плаزمиди, получени посредством BLAST анализа. Съвпадащите гени са показани в един и същи цвят.

При щамовете EC1752 и EC2947 сегментът, съдържащ гените *mcr-1.32* и PAP2, беше хромозомно разположен в рамките на скъсен инсерт IS66. Остатъци от тази инсерционна последователност бяха открити както преди, така и след *mcr* сегмента. Освен остатъка от IS66 след PAP2 регионът съдържа инсерта IS110, последван от ген, кодиращ лактат дехидрогеназа. Регионът преди *mcr-1.32* включваше останалата част от инсерта IS66, последван от два гена – единия кодиращ хипотетичен протеин, а другия – протеин от семейството на гуанозин трифосфатазите. Същата генетична структура е описана преди това в *mcr-1.13*-позитивни изолати *E. coli* от пуйки и прасета в Италия (Alba et al. 2018).

В съответствие с резултатите от WGS, чрез конюгативен пренос на IncI2 плазмида беше получен резистентен към colistin трансконюгант TC-EC707, носещ само *mcr-1* гена.

### 4.3. Чувствителност към антимикробни средства на *mcr*-позитивните клинични щамове *E. coli*

Трите клинични изолата *E. coli*, както и трансконюгантът ТС-ЕС707, показаха резистентност към colistin с МПК = 4 mg/L, обусловена от *mcr* гените (Таблица 21). ЕС1752 и ЕС2947 бяха чувствителни към всички други тествани антимикробни средства, докато ЕС707 показва резистентност към пеницилини и комбинации с β-лактамазни инхибитори, към gentamicin и tobramycin, както и към хинолони, дължаща се съответно на *bla*<sub>TEM-30</sub>, на *aac(3)-IId* и на мутации в *gyrA* и *parC*. Дълговерижното секвениране на ЕС707 показва, че *bla*<sub>TEM-30</sub> е разположен на IncII-I(Alpha) плазмид заедно с *aac(3)-IId* гена.

**Таблица 21.** Антимикробна чувствителност на *mcr-I*-позитивните клинични щамове *Escherichia coli*, трансконюганта ТС-ЕС707 и реципиентния щам *E. coli* J53

Антибиотик (диапазон, mg/L) <sup>a</sup>	EUCAST breakpoints ≤S/>R	Клинични щамове <i>E. coli</i>			Трансконюгант ТС-ЕС707	<i>E. coli</i> J53
		ЕС707	ЕС2947	ЕС1752		
Amikacin (8-16)	≤8/>8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8
Amoxicillin/Clavulanate (4/2-32/16)	≤8/>8	<b>16<sup>c</sup></b>	≤4	≤4	≤4	≤4
Ampicillin (2-8)	≤8/>8	<b>&gt;8<sup>c</sup></b>	≤2	≤2	≤2	≤2
Aztreonam (1-4)	≤1/>4	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Cefepime (1-4)	≤1/>4	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Cefixime (0.5-1)	≤1/>1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Cefotaxime (0.5-32)	≤1/>2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Cefoxitin (8-16)	8 (screen only)	≤8 <sup>d</sup>	≤8 <sup>d</sup>	≤8 <sup>d</sup>	≤8 <sup>d</sup>	NA
Cefpodoxime (1)	≤1/>1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Ceftazidime (0.5-32)	≤1/>4	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Cefuroxime (4-8)	≤8/>8	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Ciprofloxacin (0.25-1)	≤0.25/>0.5	<b>&gt;1<sup>c</sup></b>	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25
Colistin (0.0625-64) <sup>b</sup>	≤2/>2	<b>4<sup>e</sup></b>	<b>4<sup>e</sup></b>	<b>4<sup>e</sup></b>	<b>4<sup>e</sup></b>	1
Ertapenem (0.12, 0.5-1)	≤0.5/>0.5	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12
Gentamicin (2-4)	≤2/>2	<b>&gt;4<sup>c</sup></b>	≤2	≤2	≤2	≤2
Imipenem (1-8)	≤2/>4	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Levofloxacin (0.5-1)	≤0.5/>1	<b>&gt;1<sup>c</sup></b>	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Mecillinam (2, 8)	≤8/>8	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Meropenem (0.12-8)	≤2/>8	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12	≤0.12
Nitrofurantoin (64)	≤64/>64	≤64	≤64	≤64	≤64	≤64
Norfloxacin (0.5-1)	≤0.5/>0.5	<b>&gt;1<sup>c</sup></b>	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Piperacillin (4-16)	≤8/>8	<b>&gt;16<sup>c</sup></b>	≤8	≤8	≤8	≤8
Piperacillin/Tazobactam (4/4-16/4)	≤8/>8	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Tigecycline (0.5-2)	≤0.5/>0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Tobramycin (2-4)	≤2/>2	<b>&gt;4<sup>c</sup></b>	≤2	≤2	≤2	≤2
Trimethoprim (2-4)	≤4/>4	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (2/38-4/76)	≤2/>4	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Fosfomycin <sup>e</sup>	≥24/<24 <sup>e</sup>	27 <sup>e</sup>	29 <sup>e</sup>	28 <sup>e</sup>	30 <sup>e</sup>	30 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Стойностите на МПК бяха определени с помощта на панела MicroScan NM-EN52 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

<sup>b</sup> МПК на colistin беше определена с MIC-strip colistin (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).

<sup>c</sup> Стойностите на МПК в удебелен шрифт показват категоризация „резистентен“.

<sup>d</sup> Получената стойност от  $\leq 8$  mg/L показва отрицателен скринингов тест за продукция на AmpC в клиничните изолати и трансконюганта съответно; Тестът не е приложим (NA) за реципиентния щам *E. coli* J53, което е обозначено по съответния начин.

<sup>e</sup> Чувствителността към fosfomycin е определена по дисково-дифузионния метод. Получените резултати в диаметър на зоната (mm) показват категоризация „чувствителен“.

#### 4.4. Обсъждане

Настоящото проучване описва първите *mcr*-позитивни изолати *E. coli* от човешки произход в България. За разлика от повечето публикации (Zhang et al. 2021), резистентните към colistin изолати в това проучване бяха изолирани само от амбулаторни пациенти. Забележително е, че при два от изолатите беше установена хромозомна локализация на *mcr-1.32* гена, която изглежда по-рядко срещана в сравнение с плазмидната. Тези изолати принадлежаха към високорисковия клон на *E. coli* ST131, който често се свързва с продукцията на CTX-M-15 и резистентност към флуорохинолони. Флуорохинолон/цефалоспорин-резистентните изолати *E. coli* от този клон често съдържат допълнителни детерминанти на резистентност и гени на вирулентност и са причинители на множество инфекции (Pitout et DeVinney 2017). Освен *mcr-1.32* беше идентифициран и *mcr-1.1* гена в EC707 (ST2067) на конюгативен IncI2 плазмид, който е с доказана значимост в разпространението на *mcr-1* гена (Tijet et al. 2017).

Предишни проучвания свързват мутациите *pmrB*<sup>Y358N</sup> и *pmrB*<sup>E123D</sup> с резистентност към colistin. Тяхното значение обаче остава неясно (Choi et al. 2020). В това проучване наличието на *mcr* гени прикриваше приноса им за наблюдаваната МПК на colistin.

Откриването на *mcr* гени сред амбулаторни пациенти предизвиква безпокойство, като се има предвид, че чувствителността към colistin не се изследва рутинно в амбулаторни условия. Следователно истинската честотата на разпространение на *mcr* в България може да се окаже подценена, особено след като зоонозното разпространение на *mcr* гените все още не е изяснено. Ние успяхме да идентифицираме *mcr*-позитивни изолати чрез рутинен скрининг за резистентност към colistin, извършван на всички изолати в нашата лаборатория. Това подчертава значението на системния надзор и включването на целенасочен скрининг за резистентност към colistin при всички изолати, за да се предотврати разпространението на колистиновата резистентност.

## V. ИЗВОДИ

Резултатите от представените изследвания през периода 2000-2024 година с онкологично болни пациенти дават основание да се направят следните изводи:

1. Системният надзор на механизмите на резистентност при 14 254 щама *Enterobacterales*, изолирани от онкологично болни установява:
  - 1.1. Статистически значимо нарастване ( $p < 0.001$ ) на фенотиповете на придобита  $\beta$ -лактамна резистентност и появата на нов фенотип „карбапенемаза”.
  - 1.2. Възникването на „панаминогликозиден” фенотип и „colistin-резистентен” фенотип при бактериални видовете, които нямат вродена колистинова резистентност.
2. Системният фенотипен скрининг за резистентност към аминогликозиди при 12 048 щама *Enterobacterales* селектира 195 (1.6%) случая с продуценти на 16S рРНК метилтрансферази при трайна тенденция за статистически значимо нарастване на техния брой с 9.99 средногодишно.
3. Идентифицирани са *armA*, *rmtB* и *rmtF* гени, кодиращи 16S рРНК метилтрансферази при 13 бактериални вида (*K. pneumoniae*, *E. hormaechei*, *E. asburiae*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *C. freundii*, *C. portucalensis*, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *M. morgani*, *K. aerogenes* и *P. stuartii*), като *rmtF* е идентифициран за първи път в страната. Доказва се доминация на *armA* гена (83.1%), който е открит при всички бактериални видове, за разлика от *rmtB* – открит само при *E. coli* и *K. pneumoniae*, чиито щамове единствено кумулират и трите метилтрансферазни гена самостоятелно или в комбинацията *rmtB+rmtF*.
4. Метилтрансферазните гени са открити в различни конюгативни плазмиди (IncL/M, IncA/C, IncR, IncT, IncFIB и IncFII), което предполага множество източници на придобиване чрез хоризонтален трансфер на гените. Генът *armA* е трансфериран съвместно с  $\beta$ -лактамазни гени (*bla*<sub>CTX-M-3/15</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1/4/86</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>CMY-4</sub>, *bla*<sub>OXA-1/10</sub>), и гени за хинолонова резистентност (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrB*, *qnrS*), докато *rmtF1* е трансфериран съвместно с *bla*<sub>SFO-1</sub>, *bla*<sub>OXA-9</sub> и *aac(6')-Ib*, което доказва мултирезистентни детерминанти, носени от тези плазмиди.
5. Открита е нова асоциация от гени за резистентност, които кодират метилтрансферази, карбапенемази и други  $\beta$ -лактамази в изолати *K. pneumoniae* от секвенционен тип (ST)

- 6260, която включва *rmtB1* и *bla*<sub>NDM-5</sub> в хромозомата, *bla*<sub>OXA-232</sub> в конюгативния ColKP3 плазмид и *rmtF1* с *bla*<sub>SFO-1</sub> и *bla*<sub>OXA-9</sub> в конюгативните плазмиди IncFIB и IncFII.
6. Установени са няколко високорискови клона, свързани с гена *armA*, включващи *K. pneumoniae* ST147, *C. freundii* ST18 и ендемичен за България клон на *P. mirabilis*, както и изобилие от второстепенни STs. Въз основа на клоналното разнообразие може да се предположи, че персистирането на метилтрансферазните гени в онкологичната болница се дължи по-скоро на плазмидно предаване, отколкото на клонално разпространение.
  7. Системният фенотипен скрининг при 10 275 щама *Enterobacterales* доказва 185 (1.7%) случая с карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales* при трайна тенденция за статистически значимо нарастване на случаите с 16.52 средногодишно.
  8. Идентифицирани са гени, кодиращи KPC, OXA-28-like, VIM и NDM карбапенемази в 8 бактериални вида (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *E. hormaechei* и *P. stuartii*). Доказва се доминация на металокарбапенемазите (90.5%), представени от NDM-1/5 и VIM-1/4/86. В седем случая (3.8%) се идентифицират едновременно NDM-5 и OXA-232. NDM-1, карбапенемазата е дисеминирана сред 6/8 бактериални вида, докато VIM-86 е доказана само при *P. stuartii*, а NDM-5 само при *K. pneumoniae* самостоятелно или в комбинация с OXA-232.
  9. Карбапенемазните гени са локализиращи както в различни конюгативни плазмиди (IncL/M, IncA/C, IncT, IncX3, IncFII, IncFIB, IncR, IncH, ColKP3), така и в хромозомата на изолати от определени бактериални видове (VIM-1 при *P. mirabilis*, VIM-4 при *S. marcescens*, NDM-5 при *K. pneumoniae*). Установеното разнообразие на карбапенемазна генна локализация е доказателство, че разпространението на този тип резистентност се извършва клонално и чрез конюгативни плазмиди.
  10. Системният фенотипен скрининг при 4533 щама *Enterobacterales*, установява ниско ниво на придобита резистентност към colistin сред изолатите *K. pneumoniae* (3.2%, 35/1088), *K. oxytoca* (0.8%, 2/255) и *E. coli* (0.3%, 7/2669).
  11. Идентифициран е *mcr-1* гена в 3/2669 (0.1%) colistin-резистентни щама *E. coli*, изолирани от урини на амбулаторни пациенти, който е локализиран в конюгативен

IncI2 плазмид при EC707 от секвенционен тип (ST) 2067 и хромозомно – при останалите два изолата, принадлежащи към високорисковия клон *E. coli* ST131.

12. EC707 притежава също мутации за резистентност към хинолони (*gyrA*<sup>D87N</sup>, *gyrA*<sup>S83L</sup>, *parC*<sup>S80I</sup>) гени за резистентност към β-лактами (*bla*<sub>TEM-30</sub>) и към аминогликозиди (*aadA1*, *aac(3)-IId*). Щамове EC1752 и EC2947 имаха сходен набор от хромозомно кодирани детерминанти на резистентност, който включва мутации в гени, свързани с резистентността към fosfomycin (*glpT*<sup>E448K</sup>, *uhpT*<sup>E350Q</sup>), към colistin (*pmrB*<sup>E123D</sup>) и хинолони (*parE*<sup>I529L</sup>) заедно с *mcr-1.32* гена.

## VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Приноси с оригинален характер

1. За първи път в страната е направено дългосрочно системно проучване (2000-2024) на механизмите на резистентност към  $\beta$ -лактами, аминогликозиди и полимиксини чрез фенотипни и молекулярно-генетични методи в клинично значими *Enterobacterales*, изолирани от онкологично болни.
2. Проведено е първото в страната геномно проучване върху панаминогликозидната резистентност, медирана от 16S рРНК метилтрансферази в изолати *Enterobacterales* от онкологично болни.
3. Метилтрансферазните гени *armA*, *rmtB* и *rmtF* са открити в изолати от 13 бактериални вида (*K. pneumoniae*, *E. hormaechei*, *E. asburiae*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *C. freundii*, *C. portucalensis*, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *M. morgani*, *K. aerogenes* и *P. stuartii*), като *rmtF* е идентифициран за първи път в страната.
4. Доказано е, че метилтрансферазните гени са локализирани в конюгативни плаزمиди от различни групи на несъвместимост (IncL/M, IncA/C, IncR, IncT, IncFIB и IncFII), които кодират резистентност и към  $\beta$ -лактами, хинолони, сулфонамиди, триметоприм и други антибиотици и са отговорни за дисеминацията на панаминогликозидната резистентност при онкологично болните.
5. Открита е нова асоциация от гени на резистентност, които кодират метилтрансферази, карбапенемази и други  $\beta$ -лактамази в изолати *K. pneumoniae* от секвенционен тип (ST) 6260, която включва *rmtB1* и *bla<sub>NDM-5</sub>* в хромозомата, *bla<sub>OXA-232</sub>* в конюгативния ColKP3 плазмид, както и *rmtF1* с *bla<sub>SFO-1</sub>* и/или *bla<sub>OXA-9</sub>* в конюгативните плазмиди IncFIB и IncFII.
6. Проведено е първото в страната геномно проучване върху карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales* от онкологично болни.
7. Резистентността към карбапеними при 8 бактериални вида (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *E. hormaechei* и *P. stuartii*) е свързана с *bla<sub>KPC-2/3</sub>*, *bla<sub>OXA-48/232</sub>*, *bla<sub>VIM-1/4/86</sub>* и *bla<sub>NDM-1/5</sub>* гени.
8. Доказано е, че карбапенемазните гени са локализирани както в различни конюгативни плазмиди (IncL/M, IncA/C, IncT, IncX3, IncFII, IncFIB, IncR, IncX3, IncH), така и в хромозомата на изолати от определени бактериални видове (*bla<sub>VIM-1</sub>* при *P. mirabilis*,

*bla*<sub>VIM-4</sub> при *S. marcescens*, *bla*<sub>NDM-5</sub> при *K. pneumoniae*). Получените данни за локализацията на карбапенемазните гени предполагат клинично значимо клонално дисеминиране в допълнение към конюгативния пренос на гените.

9. Характеризирани са първите *mcr*-позитивни изолати *E. coli* от човешки произход в България. Доказан е плазмидно кодиран *mcr-1.1* в *E. coli* ST2067 и хромозомно разположен *mcr-1.32* във високорискови щамове *E. coli* от ST131 при амбулаторни пациенти.

### **Приноси с потвърдителен характер**

1. Потвърдена е честата асоциация на гени, кодиращи карбапенемази и 16S рРНК метилтрансферази с детерминанти на резистентност към хинолони и други антибиотици в клинични щамове *Enterobacterales*.
2. Потвърдено е значението на конюгативните IncI2 плаزمиди в разпространението на *mcr* гените. Потвърдено е, че макар и рядко, *mcr-1* гена може да бъде хромозомно локализиран.

### **Приноси с научноприложен характер**

1. Създадени са фенотипни методи за скрининг на характеризираните механизми на резистентност:
  - 1.1. Дисков метод за откриване на високо ниво на аминокликозидна резистентност като част от рутинната антибиограма.
  - 1.2. Алгоритъм за потвърждаване на карбапенемази с имунохроматографски метод чрез използване на инокулум селектиран от карбапенеми в рутинната антибиограма.
  - 1.3. Културелен метод за скрининг на резистентни към colistin изолати, съвместим с рутинната антибиограма.
2. Разработени са терапевтични схеми за лечение на инфекции от карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales*, обосновани с данните от генетичните анализи.

## ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Събчева С.**, Б. Тодорова, Г. Чакалова, Ц. Дянкова, П. Костова, К. Ангелов, Р. Стоянов, В. Меламед. Сравнителен анализ на етиологичната структура на микроорганизмите, изолирани в Клиниката по гинекология на УСБАЛ по онкология (2015-2016). Онкология. **2017**;46(4):29-32.
2. Тодорова Б., **Събчева**, К. Нейков, В. Табаков, Б. Цингилев, Р. Симеонов, М. Тахчиев, Н. Кондов, Ж. Сироматов, Б. Тасев. Сравнителен анализ на етиологичната структура на микроорганизмите, изолирани в Клиниката по урология на УСБАЛ по онкология (2015-2016). Онкология. **2017**;46(4):33-36.
3. Ivanov I. N., **S. Sabtcheva**, T. Saga, Y. Ishii, M. Kaku, T. Kantardjiev. A rapid and versatile assay for screening of *aac(6')-Ib-cr* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Probi Inf Parasit Dis. **2018**;46(1):5-8.
4. **Събчева С.**, М. Тахчиев, К. Нейков, И. Н. Иванов, Т. Кантарджиев. Успешно лечение на бактериурия от мултирезистентен *Klebsiella pneumoniae* щам, продуциращ NDM карбапенемаза. Онкология. **2019**;47(2):13-17.
5. Brolund A., N. Lagerqvist, S. Byfors, M. J. Struelens, D. L. Monnet, B. Albiger, A. Kohlenberg, European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network (EURGen-Net) capacity survey group: **S. Sabtcheva**. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, assessment by national experts from 37 countries. Eurosurveillance. **2019**;24(9):17-24. **IF 6.454**
6. Peñalva G., L.D. Högberg, K. Weist, V. Vlahović-Palčevski, O. Heuer, D.L. Monnet; ESAC-Net study group; EARS-Net study group: **S. Sabtcheva**. Decreasing and stabilising trends of antimicrobial consumption and resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in segmented regression analysis, European Union/European Economic Area, 2001 to 2018. Eurosurveillance. **2019**;24(46):2-8. **IF 6.454**
7. Lötsch F., B. Albiger, D.L. Monnet, M.J. Struelens, H. Seifert, A. Kohlenberg and European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network (EURGen-Net) carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* capacity survey group: **S. Sabtcheva**. Epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness for carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Europe, 2019. Eurosurveillance. **2020**;25(45):17-27. **IF 6.307**
8. Stoikov I., I.N. Ivanov, **S. Sabtcheva**. *In silico* development of high-resolution mlva typing scheme for *Enterococcus faecium*. Probi Inf Parasit Dis. **2020**;48(1):5-14.
9. Versporten A, Bruyndonckx R, Adriaenssens N, Hens N, Monnet DL, Molenberghs G, Goossens H, Weist K, Coenen S; ESAC-Net study group: **S. Sabtcheva**. Consumption of tetracyclines, sulphonamides and trimethoprim, and other antibacterials in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. J Antimicrob Chemother. **2021**;76(12 Suppl 2):ii45-ii59. **IF 5.758**
10. Bruyndonckx R, Hoxha A, Quinten C, Ayele GM, Coenen S, Versporten A, Adriaenssens N, Muller A, Heuer O, Monnet DL, Goossens H, Molenberghs G, Weist K, Hens N; ESAC-Net study group: **S. Sabtcheva**. Change-points in antibiotic consumption in the community, European Union/European Economic Area 1997-2017. J Antimicrob Chemother. **2021**;76(12 Suppl 2):ii68-ii78. **IF 5.758**
11. Versporten A, Bruyndonckx R, Adriaenssens N, Hens N, Monnet DL, Molenberghs G, Goossens H, Weist K, Coenen S; ESAC-Net study: **S. Sabtcheva**. Consumption of

- cephalosporins in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. *J Antimicrob Chemother.* **2021**;76(12 Suppl 2):ii22-ii29. **IF 5.758**
12. Bruyndonckx R, Adriaenssens N, Hens N, Versporten A, Monnet DL, Molenberghs G, Goossens H, Weist K, Coenen S; ESAC-Net study group: **S. Sabtcheva**. Consumption of penicillins in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. *J Antimicrob Chemother.* **2021**;76 (12 Suppl 2):ii14-ii21. **IF 5.758**
  13. Adriaenssens N, Bruyndonckx R, Versporten A, Hens N, Monnet DL, Molenberghs G, Goossens H, Weist K, Coenen S; ESAC-Net study group: **S. Sabtcheva**. Quality appraisal of antibiotic consumption in the community, European Union/European Economic Area, 2009 and 2017. *J Antimicrob Chemother.* **2021**;76(12 Suppl 2):ii60-ii67. **IF 5.758**
  14. Bruyndonckx R, Coenen S, Adriaenssens N, Versporten A, Monnet DL, Goossens H, Molenberghs G, Weist K, Hens N; ESAC-Net study group: **S. Sabtcheva**. Analysing the trend over time of antibiotic consumption in the community: a tutorial on the detection of commonchange-points. *J Antimicrob Chemother.* **2021**;76(12 Suppl 2):ii79-ii85. **IF 5.758**
  15. Bruyndonckx R, Adriaenssens N, Versporten A, Hens N, Monnet DL, Molenberghs G, Goossens H, Weist K, Coenen S; ESAC-Net study group: **S. Sabtcheva**. Consumption of antibiotics in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. *J Antimicrob Chemother.* **2021**;76(12 Suppl 2):ii7-ii13. **IF 5.758**
  16. Adriaenssens N, Bruyndonckx R, Versporten A, Hens N, Monnet DL, Molenberghs G, Goossens H, Weist K, Coenen S; ESAC-Net study group: **S. Sabtcheva**. Consumption of macrolides, lincosamides and streptogramins in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. *J Antimicrob Chemother.* **2021**;76(12 Suppl 2):ii30-ii36. **IF 5.758**
  17. Adriaenssens N, Bruyndonckx R, Versporten A, Hens N, Monnet DL, Molenberghs G, Goossens H, Weist K, Coenen S; ESAC-Net study group: **S. Sabtcheva**. Consumption of quinolones in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. *J Antimicrob Chemother.* **2021**;76(12 Suppl 2):ii37-ii44. **IF 5.758**
  18. Bruyndonckx R, Adriaenssens N, Versporten A, Hens N, Monnet DL, Molenberghs G, Goossens H, Weist K, Coenen S; ESAC-Net study group: **S. Sabtcheva**. Consumption of antibiotics in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017: data collection, management and analysis. *J Antimicrob Chemother.* **2021**;76(12 Suppl 2):ii2-ii6. **IF 5.758**
  19. Benkő R, Matuz M, Pető Z, Weist K, Heuer O, Vlahović-Palčevski V, Monnet DL, Galistiani GF, Blix HS, Soós G, Hajdú E; Members of the ESAC-Net AWaRe studygroup; ESAC-Net AWaRe study group: **S. Sabtcheva**. Trends in the hospital-sector consumption of the WHO AWaRe Reserve group antibiotics in EU/EEA countries and the United Kingdom, 2010 to 2018. *Eurosurveillance.* **2022**;27(41):12-22. **IF 19.0**
  20. Kinross P, Gagliotti C, Merk H, Plachouras D, Monnet DL, Högberg LD; EARS-Net Study Group; EARS-Net Study Group participants: **S. Sabtcheva**. Large increase in bloodstream infections with carbapenem-resistant *Acinetobacter* species during the first 2 years of the COVID-19 pandemic, EU/EEA, 2020 and 2021. *Eurosurveillance.* **2022**;27(46):25-31. **IF 19.0**
  21. Dobrova E., I. Ivanov, D. Donchev, K. Ivanova, R. Hristova, V. Dobrinov, **S. Sabtcheva**, T. Kantardjiev. In vitro investigation of antibiotic combinations against multi- and extensively

- drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. **2022**;10(B):1308-1314. SJR 0.257, Q 3.
22. Stoikov I., I. N. Ivanov, D. Donchev, D. Teneva, E. Dobрева, R. Hristova, **S. Sabtcheva**. Genomic characterization of IMP-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Bulgaria reveals the emergence of IMP-100, a novel plasmid-mediated variant coexisting with a chromosomal VIM-4. *Microorganisms* **2023**;11(9):2270. **IF=4.1**
  23. Donchev D., I. N. Ivanov, I. Stoikov, **S. Sabtcheva**, Y. Kalchev, M. Murdjeva, E. Dobрева, R. Hristova. Improvement and Validation of a Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA8+) for *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *Microorganisms* **2023**;11(2):444. **IF 4.1**
  24. Stoikov I., I. N. Ivanov, D. Donchev, E. Dobрева, R. Hristova, **S. Sabtcheva**. High-quality RNA extraction from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria with a novel rapid and cost-effective method. *Biotechnol & Biotechnol Eq.* **2023**;37(1):2234502. **IF 1.5**
  25. **Sabtcheva S.**, I. Stoikov, S. Georgieva, D. Donchev, E. Dobрева, I. N. Ivanov. Incidence and characterization of carbapenem resistance mediated by acquired beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Bulgarian cancer hospital. *Acta Microbiol Bulg.* **2023**;39(4):418-422.
  26. Stoikov I., I. N. Ivanov, E. Dobрева, D. Donchev, **S. Sabtcheva**, R. Hristova. Development and pilot validation of a novel PCR-based replicon typing scheme for plasmid families associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. *Probl Inf Parasit Dis.* **2023**;51(1):37-45.
  27. **Sabtcheva S.**, I. Stoikov, I.N. Ivanov, D. Donchev, M. Lesseva, **S. Georgieva**, D. Teneva, E. Dobрева, I. Christova. Genomic characterization of carbapenemase-producing *Enterobacter hormaechei*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii*, and *Morganella morganii* clinical isolates from Bulgaria. *Antibiotics* **2024**;13(5):455. **IF 4.3**
  28. **Sabtcheva S.**, I. Stoikov, S. Georgieva, D. Donchev, Y. Hodzhev, E. Dobрева, I. Christova, I.N. Ivanov. Genomic characterization of 16S rRNA methyltransferase-producing *Enterobacteriales* reveals the emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST6260 harboring *rmtF*, *rmtB*, *bla<sub>NDM-5</sub>*, *bla<sub>OXA-232</sub>* and *bla<sub>SFO-1</sub>* genes in a cancer hospital in Bulgaria. *Antibiotics* **2024**;13(10):950. **IF 4.3**
  29. **Sabtcheva S.** Laboratory detection of colistin-resistant *Enterobacteriales* in tandem with routine antibiogram. *Probl Inf Parasit Dis.* **2024**;52(2):17-19.
  30. **Sabtcheva S.**, S. Georgieva. Evaluation of the applicability of the O.K.N.V.I. RESIST-5 and the KPC&MBL&OXA-48 disk tests in a routine microbiology laboratory. *Probl Inf Parasit Dis.* **2024**;52(3):5-12.
  31. **Sabtcheva S.**, I. Stoikov, D. Donchev, S. Georgieva, E. Dobрева, I.N. Ivanov. Complete genome characterization of *mcr-1*-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* from outpatients in Bulgaria, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* **2025**;43:97-101. **IF 2.6**
  32. Иванов И.Н., **С. Събчева**, К. Иванова. Модифициран бърз CARBA NP тест (MCNPV3) за фенотипно откриване на карбапенемази при Грам-негативни микроорганизми, 182-186. В: Клинично значими *Escherichia coli*. Диагностика и разпространение в България, под ред. на М. Павлова, В. Велев, Е. Александрова, Й. Калчев, П. Станкова, И. Н. Иванов, изд. БЪЛГАРИ, София **2022**. ISBN 978-619-7656-21-1.