



**ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**



КАТЕДРА „БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ“

Маринела Красимилова Цанкова

**ГЕНЕТИЧНИ ДЕТЕРМИНАНТИ И ЕКОЛОГИЧНИ ФАКТОРИ
НА ВИРУЛЕНТНОСТТА ПРИ ПАТОГЕННИ ИЗОЛАТИ,
АСОЦИИРАНИ С УРОГЕНИТАЛНИ ИНФЕКЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

В област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3 Биологически науки

Докторска програма „*Микробиология*“

Научни ръководители:

доц. д-р Соня Костадинова

гл. ас. д-р Мариана Мърхова-Косева

Пловдив, 2020

Дисертационният труд съдържа 198 страници на формат А4, 17 таблици и 47 фигури. В библиографската справка са включени 345 заглавия на латиница и 3 на кирилица. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедра „Биохимия и микробиология“ към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“, проведено на 26.11.2019 г. (Протокол № 169 от 26.11.2019 г.) и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед Р33-6904 от 13.12.2019 г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 25.02.2020 г. от 11.00 ч. в зала „Компас“ на ПУ „Паисий Хилендарски“, ул. „Цар Асен“ № 24, Пловдив.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

1. проф. д-р Велизар Костадинов Гочев (рецензент)
2. проф. д-р Пенка Ангелова Мончева (рецензент)
3. проф. д-р Искра Витанова Иванова (становище)
4. доц. д-р Златка Милчева Алексиева (становище)
5. доц. д-р Соня Костадинова Трифонова (становище)

Изказвам искрените си благодарности на научните си ръководители доц. д-р Соня Костадинова и гл. ас. д-р Мариана Мърхова-Косева за доверието и възможността да изпълня тази работа. Изключително много благодаря на целия състав на катедра „Биохимия и микробиология“, секция „Микробиология“ – проф. д-р Велизар Гочев, гл. ас. д-р Иван Илиев и гл. ас. д-р Таня Гирова за подкрепата, съветите и помощта, която ми оказаха. И не на последно място благодаря на моето семейство – без тяхната помощ нямаше да стигна до тук.

Въведение

Инфекциите на урогениталния тракт са едни от най-разпространените сред амбулаторни пациенти в световен мащаб. Разходите за лечението им надхвърлят 6 милиарда долара годишно в световен мащаб (Foxman, 2002). Инфекциите на урогениталния тракт, разглеждани в екологичен аспект, засягат в световен мащаб жени и мъже от всякаква възраст с различна интензивност. Бременните са сред най-рисковите групи пациенти, като при тях инфекциозният процес оказва негативно влияние както върху майката, така и върху плода и новороденото бебе.

На лице е широк спектър от етиологични агенти, които се асоциират с инфекции в урогениталния тракт, главно Грам-отрицателни бактерии, но могат да участват и Грам-положителни патогени, както и гъбички. Повече от 95% от неусложнените уринарни инфекции са монобактериални. Най-често срещан патоген при неусложнени инфекции на уринарния тракт (ИУТ) е *E. coli* (75% – 95%), следван от *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, стрептококи от група В и *Proteus mirabilis* (Sobel, 2013).

Непрекъснато променящият се профил на антибиотична чувствителност поставя локалните модели на антибиотична чувствителност на клинично значимите микроорганизми на централно място в процеса на вземане на решение за оптимален подбор на препарати за лечение. През последните десетилетия лечението на инфекциозни заболявания с антибиотични препарати се увеличи драстично. Появата на множество резистентни щамове и липсата на принципно нови антибиотични средства и алтернативи водят до затруднение в лечението на инфекциозните заболявания и в някои случаи до трайни увреждания на макроорганизма.

Изследвания на вирулентния профил на микроорганизми, свързани с неусложнени инфекции на урогениталния тракт при амбулаторни пациенти в дадена област, успоредно с детайлен анализ на лекарствената им устойчивост са оправдани както с оглед актуализация на лечебните практики, така и в посока откриване на нови терапевтични подходи при лечение на инфекции на урогениталния тракт.

Разпространението на антибиотичната устойчивост в световен мащаб и реалната възможност за поява на щамове, едновременно силно вирулентни и резистентни, определят значението на изследвания в посока изявяване взаимовръзките между резистентността и вирулентността в екологичен аспект. Това провокира разработването на настоящата дисертация и дефинира целта ѝ.

Цел и задачи

Цел на настоящата дисертационна работа е изследване на генетични детерминанти и екологични фактори във вирулентността на патогенни изолати, асоциирани с урогенитални инфекции.

За постигането ѝ са поставени следните задачи:

1. Анализ на етиологичната структура с оглед екологията на инфекциите на урогениталния тракт в гр. Пловдив.
2. Биохимична и молекулярно-биологична характеристика на щамовете.
3. Изследване на вирулентни фактори и биофилм-образуване при изолатите.
4. Определяне на лекарствена чувствителност на изолатите.
5. Анализ на връзката между антибиотичната резистентност и генетичните детерминанти на вирулентност.

Материали и методи

1. Клинични изолати

В настоящата работа са изследвани щамове, любезно предоставени от СМДЛ „Хронолаб“ – Пловдив и депозирани в културалната колекция на катедра „Биохимия и микробиология“ при ПУ „Паисий Хилендарски“. Събраните 546 изолати са от амбулаторни пациенти с различни инфекции на урогениталния тракт – 279 от урина и 267 от генитален тракт.

2. Методи

2.1. Биохимична идентификация съгласно система *Enterotube II (BD)*.

Идентификацията включва изпълнение на 15 биохимични теста, подбрани за представители на сем. *Enterobacteriaceae*: усвояване на глюкоза, производство на газ, лизин декарбоксилаза, орнитин декарбоксилаза, фенилаланин дезаминаза, H₂S, индол, усвояване на адонитол, лактоза, арабиноза, сорбитол, дулцитол, урея и цитрат, реакция на Фогес-Проскауер. Резултатите позволяват съставянето на персонален петцифрен код, използван за идентифициране на представители на сем. *Enterobacteriaceae*.

2.2. PCR за 16S rDNA, пречистване и секвениране. Получените фрагменти от проведения PCR са пречистени посредством GeneGet Extraction Kit (ThermoScientific, USA) и изпратени за секвениране от Macrogen Inc., Холандия. Извършен е нуклеотиден Blast анализ за установяване на сходство със секвенции от база данни 16S Ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea), NCBI.

2.3. Тест за серумна резистентност. Изследването е проведено с модификации както е описано от Verduin и кол. (1995). Нормален човешки серум (НЧС) е събиран от най-малко 5 здрави доброволци в СМДЛ „Хронолаб“, като колективната проба в последствие се разрежда до 50% с VBS²⁺ непосредствено преди анализа.

2.4. Продукция на екстрацелуларни ензими. В среди, съдържащи казеин и желатин се инокулират с 24-часови култури. След 24 часа (48 часа за *Candida spp.*) се отчита размера на зоната на преципитация или просветляване на средата около колонииите и се изчислява Pz стойност. За да се отчетат резултатите от средата, съдържаща желатин, се налага престой на епруветките след култивиране на 4°C за 2 часа. Като положителна реакция се счита втечняването на хранителната среда.

2.5. Тест за определяне на морфотип (Römling et al., 2005). Изследваните щамове се култивират при 37°C и 26°C след повърхностен посев върху CR agar.

2.6. Аглутинация. Образуването на тип 1 пили от щамовете се определи фенотипно по способността им да аглутинират дрождеви клетки (24 часова култура от *Saccharomyces cerevisiae*) в присъствие и отсъствие на D-маноза (Shrembi et al., 2000). Аглутинацията се наблюдава микроскопски в нативни препарати.

2.7. Тест за образуване на биофилм. Скрининг за биофилм-формиращи щамове е проведен в стерилни полистиренови епруветки с различни хранителни среди при 37°C. За детайлно охарактеризиране на биофилм-формирацията капацитет на щамове тестът е проведен в 96-гнездни плаки съгласно Soto и кол. (2006).

2.8. Антибиотична чувствителност. Тестът е проведен и съгласуван спрямо препоръките, заложи в EUCAST v. 7.1 (2017). Като контрола са използвани *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

2.9. Антифунгална чувствителност. Тестът е проведен спрямо изискванията и препоръките в CLSI guidelines (M44-A) (NCCLS, 2009) на Мюлер-Хинтон среда с 0.5 µg/mL метиленово синьо. *C. albicans* ATCC 10231 е използван като контрола.

2.10. Провеждане на multiplex colony PCR. Подготовката на пробите и условията за провеждане на PCR реакцията за щамовете от вида *E. coli* са съобразени с

публикуваните от Johnson и Stell (2000), с модификации. Подбраните праймери за 22 вирулентни гени са разпределени в пет групи съобразно очаквания размер на PCR продукта. За щамовете от род *Klebsiella* са избрани праймери за присъствие на гени специфични за 6 серотипа (K1, K2, K5, K20, K54 и K57), 13 вирулентни гени и видово специфични праймери за 16S-23S спейсърен участък за *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Съставени са четири групи за мултиплекс PCR съобразно очаквания размер на PCR продуктите.

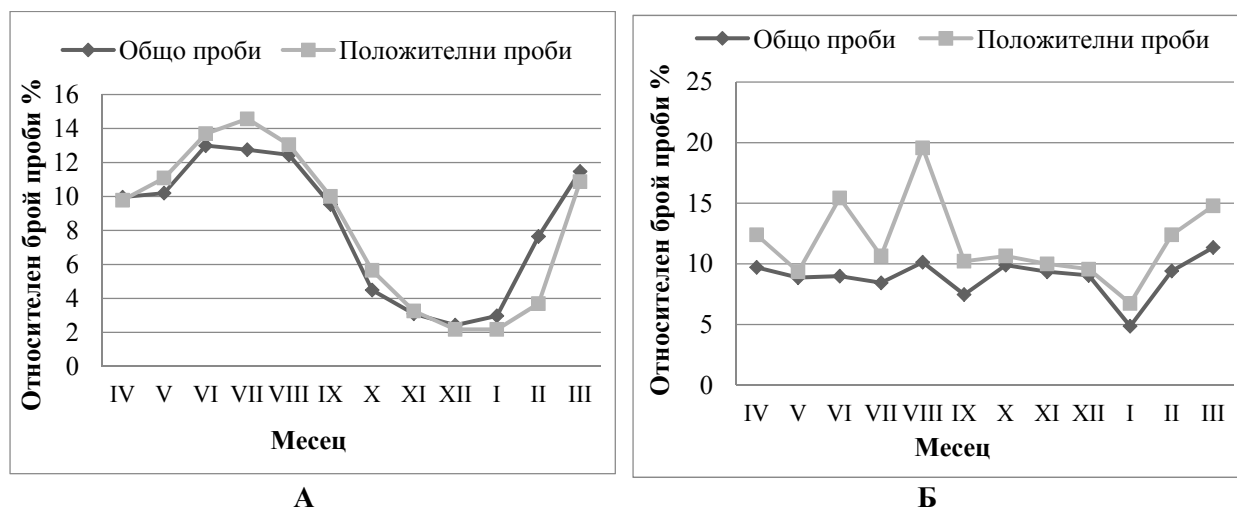
2.11. Статистика. За статистическата обработка и графичното представяне на резултатите са използвани STATISTIKA v.10 (StatSoft) и Microsoft Excel със XLSTAT пакет (Addinsoft).

Резултати и обсъждане

В продължение на една година от април 2016 г. до март 2017 г. в рамките на споразумение със СМДЛ „Хронолаб“ Пловдив (по настоящем СМДЛ „Синево България“ ЕООД) са събрани 546 щам, изолирани от проби на амбулаторни пациенти с инфекции на урогениталния тракт – 279 от урина и 267 от проби от генитален тракт.

1. Честота на изолиране на патогенни микроорганизми, асоциирани с инфекции на урогенитален тракт

Изследването на положителните проби на фона на общия брой изследвани проби в СМДЛ „Хронолаб“ – Пловдив в течение на една година позволи да се изяви сезонното им разпределение. Наблюдава се сезонна вариация с пик през летните месеци (юни, юли и август) и спад през зимните (ноември, декември и януари) с флукутация между 2% и 14% (Фиг. 1А). При пробите от репродуктивната система не се наблюдава никаква сезонност. Пик при положителните проби е отчетен през месец август 2016 г. (20%) и най-малко относителен брой проби през месец януари 2017 г. (6%) (Фиг. 1Б).

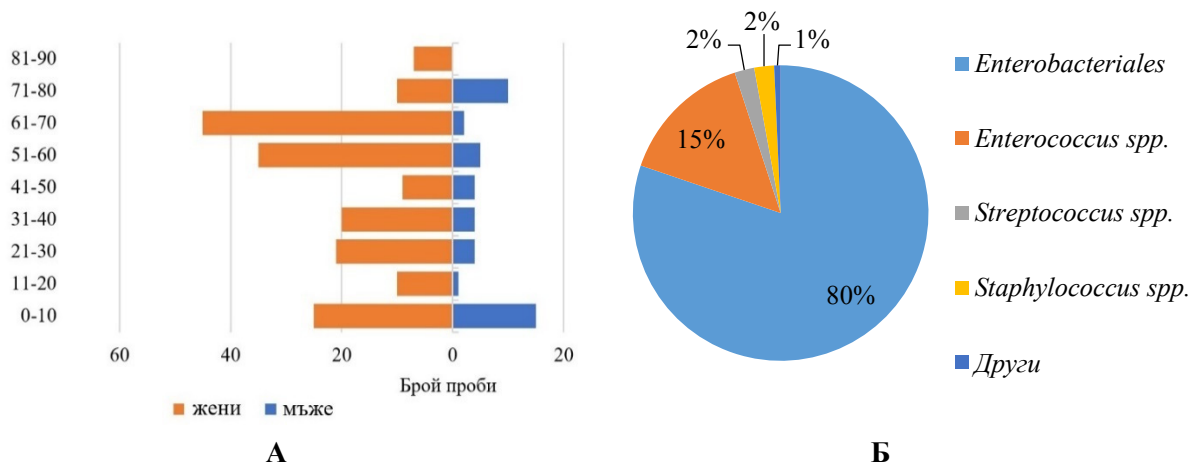


Фиг. 1. Относителен брой общи и положителни уринарни проби (А) и генитални проби (Б) от амбулаторни пациенти на СМДЛ „Хронолаб“ – Пловдив за периода април 2016 г. – март 2017 г.

2. Инфекции на уринарния тракт (ИУТ)

Данните за разпределението по възраст и пол на пациентите за събраните общо 279 изолати от проба урина (Фиг. 2А) показват, че най-засегнати от ИУТ са жените (227 изолата). Сред най-рисковите групи се оказват децата в ранна детска възраст (до 5 години) и възрастни над 60-годишна възраст. Общият брой детски изолати в настоящото изследване е 43: 29 щама от проби на момичета и 14 щама от проби на

момчета (13% и 27% от всички изследвани жени и мъже, респективно). Подобно разпределение на изолати от жени е отчетено при възрастовата група 21 – 30 години, като това най-вероятно е свързано със сексуалната активност и бременност, които значително повишават риска от този тип инфекции. Най-многобройни са изолатите от проби на жени от възрастовата група над 61 години (19% от всички проби от жени), като се наблюдава и повишаване на броя положителни проби при мъже след 71-годишна възраст (Фиг. 2А).



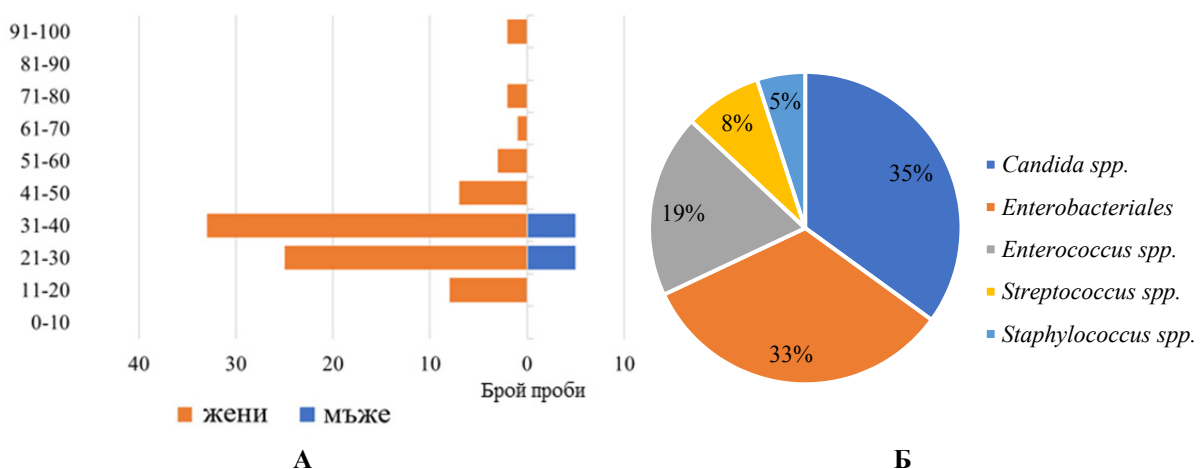
Фиг. 2. Разпределение по възраст и пол (А) и таксономични групи (Б) на щамовете, асоциирани с ИУТ при амбулаторни пациенти

Резултатите от настоящото изследване показват, че най-често етиологичните агенти при инфекция на пикочните пътища са сред представителите на разред *Enterobacteriales* (80%), следвани от *Enterococcus spp.* (15%), като под 3% са видове от родовете *Staphylococcus*, *Streptococcus* и други единични представители (Фиг. 2Б).

3. Инфекции на половите пътища.

Сред колекцията от изолати в настоящото изследване, свързани с инфекция на половия тракт, са 267 щамове – 239 от жени и 28 от мъже. Най-засегнати са пациентите между 21 и 40-годишна възраст, като броят на пробите от жени са 7 пъти повече от тези на мъжете. 71% от изолатите от жени и 86% от тези от мъже са в тази възрастова група (Фиг. 3А).

При 35 от жените, за които е установена инфекция, има данни за бременност (15%). При изследването на 12 проби – от 11 жени и 1 мъж, се установи коинфекция (5%). Получените резултати са сходни с тези, получени от други автори (Omoregie et al., 2010).



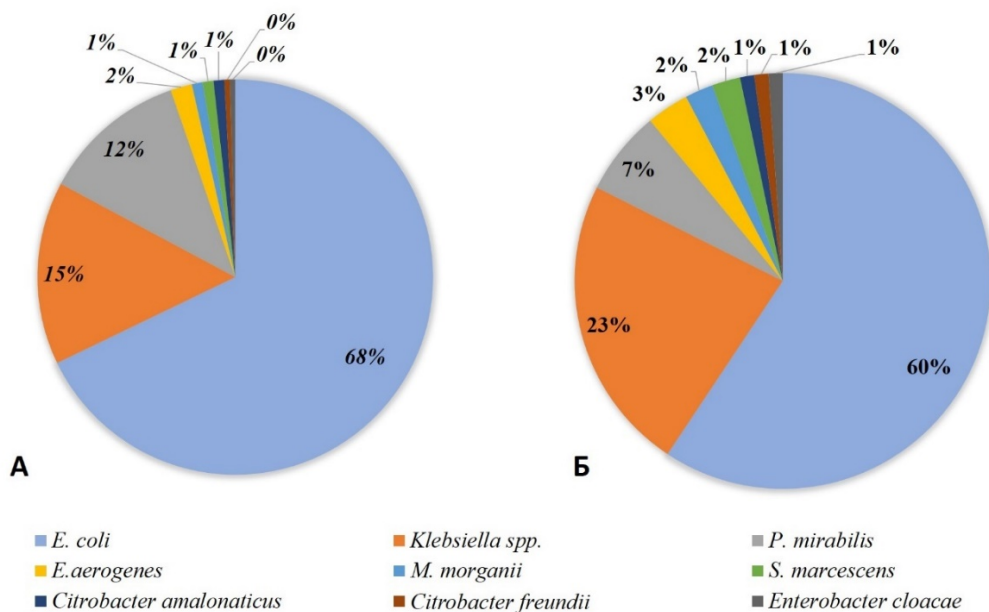
Фиг. 3. Разпределение по възраст и пол (А) и таксономични групи (Б) на щамове, асоциирани с инфекции на гениталния тракт

Гъбични инфекции, причинени от видове от род *Candida* са най-често установяваните (35%) сред обработените генитални проби, като 99% от такива изолати са от жени и само един от уретрален секрет на 23-годишен мъж. Като представители на разред *Enterobacteriales* са определени 33% от изолатите от генитални проби – 81 щама при жени и 10 щама при мъже. 19% се отнасят към *Enterococcus* spp., 8% към *Streptococcus* spp., а най-малък брой са представителите на род *Staphylococcus* (Фиг. 3Б). Не са установени големи различия между нашите данни и резултатите получени от други автори (Omeregje et al., 2010; Mulu et al., 2015).

4. Идентификация на Грам-отрицателни щамове

4.1. Видове от разред *Enterobacteriales*

Биохимичната идентификация на бактериалните щамове, отнесени към този разред, е проведена на основата на конвенционални тестове според системата за биохимична идентификация BBL Enterotube II (BD). Всички изследвани щамове са Грам-отрицателни, каталаза-положителни и оксидаза-отрицателни, като броят им в настоящото изследване е 313 от общо събрани 546 изолата. Получените резултати показват, че доминиращо присъствие има *Escherichia coli* – 206, от които уринарни са 152 щама, а от гениталния тракт са 54 щама (Фиг. 4). Втори по честота сред изследваните асоциирани с инфекции на урогениталния тракт изолати са представители на р. *Klebsiella* (15% от уринарните и 23% от гениталните изолати).



Фиг. 4. Видово разпределение на щамове от разред *Enterobacteriales*; **А** – уринарни изолати, **Б** – генитални изолати

Като представители на *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* са определени 28 уринарни и 21 генитални изолата, а като *Klebsiella oxytoca* – осем уринарни. Като представители на *Proteus mirabilis* (от сем. *Morganellaceae*) в настоящото проучване са идентифицирани общо 33 щама: 27 щама от урина, 4 щама от вагинални и 2 щама от уретрални секрети.

Други представители на *Enterobacteriales* съставляват минорен компонент. Сред уринарните изолати това са *Enterobacter aerogenes* (3 щама), *Morganella organii* (2 щама), *Serratia marcescens* (2 щама) и *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* (1 щам от вид). *Serratia marcescens* е открита в 3 проби вагинален секрет, а *Serratia liquefaciens* (2 щама) в уретрален секрет и еякулат. Като *Enterobacter*

aerogenes са определени 2 щамове (от вагинален секрет и еякулат). *Citrobacter diversus* (1 щам) е изолиран от проба от вагинален секрет, а *Morganella morganii* (1 щам) от еякулат.

С цел по-пълно биохимично охарактеризиране и потвърждение на първоначалната идентификация е използвана полуавтоматизирана система Merlin MICRONAUT (MERLIN Diagnostika GmbH, Germany). Видовата принадлежност на *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. mirabilis*, *Enterobacter aerogenes* и *Enterobacter cloacae* е доказана с над 95% вероятност.

4.2. Други Грам-отрицателни щамове

Другите Грам-отрицателни, оксидаза-положителни щамове, изолирани от проби на амбулаторни пациенти, са култивирани на Cetrimide Agar (HiMedia, India) и определени до вид като *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* (по 2 щамове от вид) с помощта на системата за бърза идентификация Merlin MICRONAUT и плаки MICRONAUT-NF с над 94% вероятност.

5. Идентификация на Грам-положителни щамове

5.1. Грам-положителни, каталаза-отрицателни

Общо 31 щамове (8 уринарни, 22 вагинални и 1 цервикален) са определени като Грам-положителни и каталаза-отрицателни. Щамове проявиха β -хемолитична активност върху кръвен агар, като е отчетен положителен CAMP тест и бацитрацин резистентност за всички изолати. Всички щамове са отнесени към *Streptococcus* група В. За потвърждение принадлежността на изолатите са използвани плаки MICRONAUT-RPO с 44 биохимични реакции. Подбраните щамове са идентифицирани като *Streptococcus agalactiae* с процент на вероятност вариращ между 75 – 95%, по-малък в сравнение с този, получен при определяне на видовата принадлежност на изолати към *Enterobacteriales*.

Сред изследваните Грам-положителни, каталаза-отрицателни щамове са 70 γ -хемолитични щамове, изолирани както следва: от урина – 27 щамове; от вагинален и цервикален секрет – 30 щамове; от уретрален и еякулат – 13 щамове. След култивиране на жлъчка-ескулин агар за доказване на принадлежността им към род *Enterococcus*, е тествано усвояването на захари, което показва, че всички щамове усвояват сорбитол, но не и арабиноза. В резултат всички щамове са определени като *Enterococcus faecalis*.

В настоящата работа *Enterococcus faecalis* заемат първа позиция сред Грам-положителните изолати (15% при ИУТ и 18% при инфекции на гениталния тракт). *Enterococcus faecalis* е най-често изолиран от амбулаторни пациенти с ИУТ след *Proteus mirabilis*, което се доказва от редица независими изследвания (Kahlmeter, 2000; Goel et al., 2016).

5.2. Грам-положителни каталаза-положителни щамове

Като Грам-положителни, каталаза-положителни са определени 6 щамове *Staphylococcus aureus* (от 4 вагинални и 1 уретрален секрет, 1 от еякулат) и 16 щамове *Staphylococcus saprophyticus* (9 от урина, 5 от вагинални секрети и 2 от еякулат). Продукция на свободна коагулаза е доказана при 6-те щамове *S. aureus*. Видовата им принадлежност е потвърдена с култивиране в плаки MICRONAUT-IDS и полуавтоматизирана система Merlin MICRONAUT (MERLIN Diagnostika GmbH, Germany). Получената степен на надеждност е над 97%.

В настоящата работа не са изолирани представители на *S. aureus* от уринарни инфекции, като процентът на коагулаза-отрицателни стафилококи е около 2%. Изолирането на *S. aureus* при инфекции на уринарния тракт се отчита между 0.5% до 6% от случаите, описани от други автори (George et al., 2015).

6. Молекулярно-биологична идентификация на бактериалните изолати

За потвърждаване на видовата принадлежност на бактериалните изолати, е проведена PCR за амплификация на 16S региона в геномната ДНК, като получените фрагменти са изпратени за секвениране от Macrogen Inc. (Холандия). Получените резултати потвърждават резултатите от проведената биохимична идентификация и са описани в Таблица 1.

Таблица 1. Резултати, получени след BLAST в базата NCBI и проведената биохимична идентификация

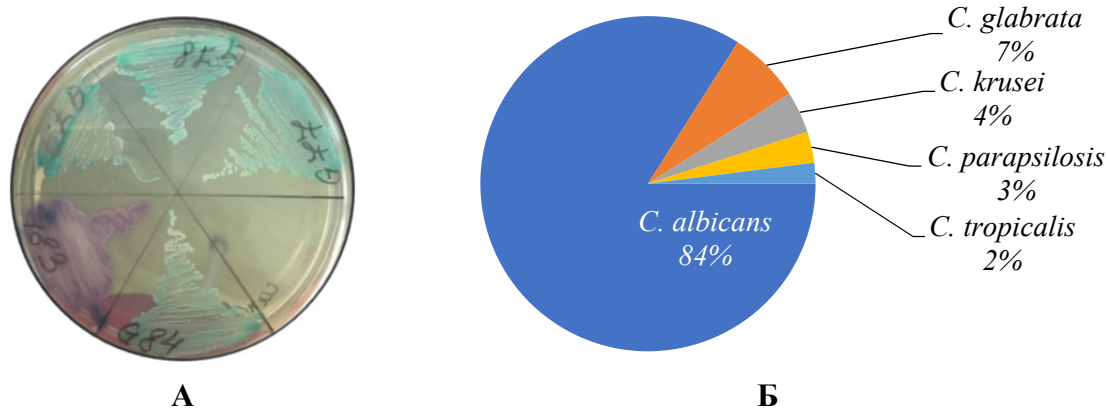
Щам №	Молекулярно-биоинформатична идентификация	% на идентичност	Биохимична идентификация
G-172	<i>Enterobacter cloacae</i> strain ATCC 13047 16S ribosomal RNA, partial sequence	93.1%	<i>Enterobacter cloacae</i>
G+25	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.2%	<i>Enterococcus faecalis</i>
G-47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain DSM 50071 16S ribosomal RNA, complete sequence	96.8%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
U-127	<i>Proteus mirabilis</i> strain JCM 1669 16S ribosomal RNA, partial sequence	94.9%	<i>Proteus mirabilis</i>
US-10	<i>Serratia liquefaciens</i> strain JCM1245 16S ribosomal RNA, partial sequence	97.4%	<i>Serratia liquefaciens</i>
U-230	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104 16S ribosomal RNA, partial sequence	99,1%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
G+37	<i>Staphylococcus aureus</i> strain S33 R 16S ribosomal RNA, complete sequence	95.7%	<i>Staphylococcus aureus</i>
G+1	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 strain JCM 5671 16S ribosomal RNA, partial sequence	96.6%	<i>Streptococcus agalactiae</i>
U-20	<i>Escherichia coli</i> strain NBRC 102203 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.5%	<i>Escherichia coli</i>
U+36	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305 16S ribosomal RNA, complete sequence	97.2%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>
U-231	<i>Citrobacter freundii</i> strain NBRC 12681 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.3%	<i>Citrobacter freundii</i>
E-1	<i>Klebsiella aerogenes</i> KCTC 2190 16S ribosomal RNA, complete sequence	97.3%	<i>Enterobacter aerogenes</i>
U-276	<i>Morganella morganii</i> strain M11 16S ribosomal RNA, partial sequence	96.9%	<i>Morganella morganii</i>
U-222	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 1239	98.9%	<i>Serratia marcescens</i>
U-40	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain ATCC 13182 16S ribosomal RNA, partial sequence	97.7%	<i>Klebsiella oxytoca</i>

Единственото несъответствие е за вида *Enterobacter aerogenes*, който е определен като *Klebsiella aerogenes* с 97.7% сходство в нуклеотидната секвенция. Тази разлика се дължи на настъпилите промени в таксономията на сем. *Enterobacteriaceae*. Прекласифицирането на вида в *Klebsiella aerogenes*, съответно и в друг род, но в същото семейство *Enterobacteriaceae*, се случва през 2017 г. (Tindall et al., 2017).

7. Идентификация на гъбичните изолати

Гъбички са изолирани от 97 проби от гениталния тракт – 95 щамове от вагинален секрет, 1 от цервикален и 1 от уретрален секрет. 24% от пробите са на бременни жени, а при 8% от пробите е установена коинфекция. Бактериалните видове в тези коинфекции най-често се оказаха *E. coli* (3 проби) и *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (3 проби). Други две смесени инфекции при жените са с участие на *E. faecalis* и *S. agalactiae* съответно. При проба от уретрален секрет, освен *Candida* spp. е изолиран и *E. faecalis*.

За първоначалното отдиференциране на *albicans* и non-*albicans* видовете е използвана селективна среда *Candida* Chrome Agar. Сред изследваните 97 изолата към *C. albicans* са отнесени 81 щамове (84%), а 16 щамове са определени като non-*albicans* *Candida* (16%) (Фиг. 5А).



Фиг. 5. Щамове *C. albicans* и *C. krusei* на *Candida* Chrome agar (HiMedia, India) (А) и видова принадлежност на дрождеви щамове, изолирани от гениталния тракт на амбулаторни пациенти (Б)

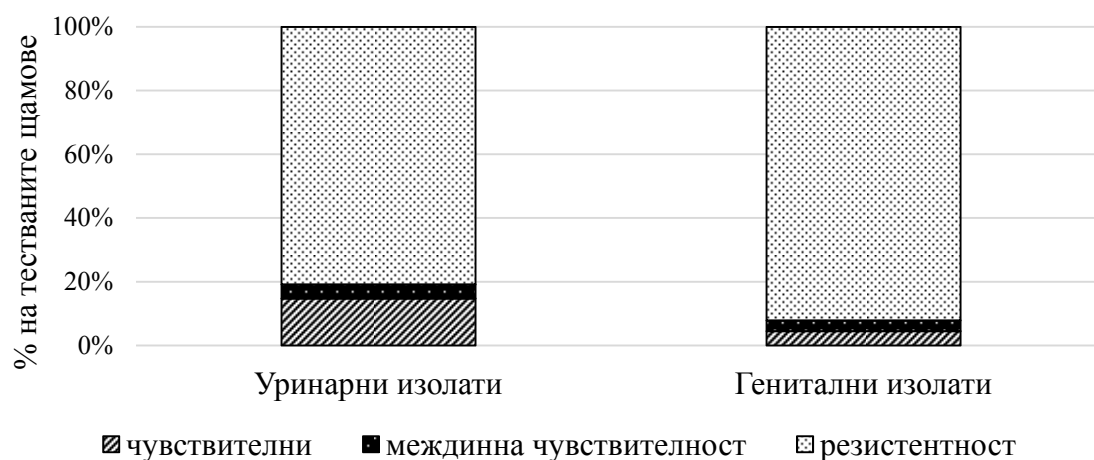
За по-точно и пълно охарактеризиране до вид са използвани плаки MICRONAUT-Candida и полуавтоматична система Merlin MICRONAUT (MERLIN Diagnostika GmbH, Germany). Получените резултати показаха, че 84% от изолатите са *C. albicans*, 7 се отнасят към *C. glabrata* (7%), 4 щамове към *C. krusei* (7%), 3 – към *C. parapsilosis* (3%) и 2 изолата към *C. tropicalis* (2%) (Фиг. 5Б). По един изолат от цервикален и уретрален секрет са отнесени към вида *C. albicans*.

За изпълнение на поставените задачи на следващ етап е проведено изследване на различни вирулентни характеристики и анализ на разпределението на генетични детерминанти, осигуряващи успех в колонизацията и установяването на успешна инфекция в урогениталния тракт.

8. Серумна чувствителност

Една от първите защитни бариери при инвазия на микроорганизми в урогениталния тракт се осигурява от бактерицидния ефект на серума, който се дължи главно на белтъчните компоненти на комплемента. Чувствителността към нормален човешки серум е тествана само за събраните 317 Грам-отрицателни щамове, тъй като Грам-положителните имат вродена устойчивост към системата на комплемента.

Изследваните щамове показаха изключително висока резистентност – над 84% като 81% от изолатите от урина и 92% от изолираните от проби от гениталния тракт проявяват устойчивост в тест *in vitro*. Само 13 от всички тествани изолати показват междинна чувствителност (Фиг. 6).



Фиг. 6. Серумна чувствителност на Грам-отрицателните изолати, отнесени към разред *Enterobacteriales*

Щамовете отнесени към видовете *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* също са тествани. Резултатите показаха, че само един щам *P. aeruginosa* проявява междинна чувствителност, което корелира с данните на други автори (Deslouches et al., 2005).

9. Хидролитична активност

Въпреки че продукцията на бактериални протеази от микроорганизмите е с цел да се осигурят пептидни нутриенти на самата клетка, те могат също така да допринесат за успешна патогенеза при човека и животните. При изследването на желатиназа при изолираните 72 щама *E. faecalis* резултатите показват, че при 22 щама (31%) се отчита положителна реакция. Щамовете, проявили желатиназна активност, са приблизително по равно разпределени сред уринарните и генитални изолати (Таблица 2).

Таблица 2. Активност на желатиназа и казеиназа при щамове *Enterococcus faecalis*

	Урина (27 щама) n/%	Генитален тракт (45 щама) n/%	Общ брой (72 щама) n/%
Хидролиза на желатин	10/37%	12/27%	22/31%
Хидролиза на казеин	25/93%	30/67%	55/76%
Pz = 1.00	2/7%	15/33%	17/24%
Pz < 0.999 – 0.700	8/30%	5/11%	13/18%
Pz < 0.699 – 0.400	5/19%	18/40%	23/32%
Pz < 0.399	12/44%	7/16%	19/26%

Щамовете *E. faecalis* са тествани за способността им да хидролизират казеин. Получените резултати показват 2,5 пъти по-висока активност в сравнение с хидролизата на желатин – при 93% и 67% от уринарните и генитални изолати *E. faecalis* съответно се отчита тази характеристика (Таблица 2).

Сходно изследване е проведено и за изолатите от род *Candida* (Таблица 3). Хидролитична активност е установена при 8% от 81 щама *C. albicans*, като шест изолата хидролизират казеин и желатин за по-малко от 48 часа. Два от тях са добри

продуценти ($Pz < 0.699 - 0.400$), а четири – слаби продуценти ($Pz < 0.999 - 0.700$) на ензима казеиназа. Само два щамове *C. parapsilosis* показват слаба желатиназна активност. При изследване за продукция на фосфолипази 10% от щамове *C. albicans* показват такава активност. Два от тях са отлични продуценти ($Pz < 0.399$), при останалите е установена слаба активност ($Pz < 0.999 - 0.700$). Естеразна активност е отчетена при 5 щамове *C. albicans* (6%) с Pz стойност > 0.700 , което ги определя като слаби продуценти.

Нито един от изолатите *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. tropicalis* не продуцира изследваните хидролитични ензими.

Таблица 3. Хидролитични ензими при изолати от род *Candida*

<i>Candida</i> изолати (n*)	Хидролиза на желатин n/%	Хидролиза на казеин n/%	Фосфолипазна активност n/%	Естеразна активност n/%
<i>C. albicans</i> (81)	6/7%	6/7%	8/10%	5/6%
<i>C. glabrata</i> (7)	0	0	0	0
<i>C. krusei</i> (4)	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (3)	2/67%	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> (2)	0	0	0	0
Общо (97)	8/8%	6/6%	8/8%	5/5%

* n – брой щамове

10. Изследване на биофилм-формиращ капацитет

Събраните в колекция 546 щамове, асоциирани с инфекции на урогениталния тракт, са тествани за способността им да образуват биофилм *in vitro*. Тестовите са проведени при 37°C и култивиране в различни хранителни среди в зависимост от видовата принадлежност в течение на 24 ч. за бактериалните и 48 ч за гъбичните изолати. За качествено и количествено определяне на биофилм-формирация капацитет на изолатите е използвана техника с кристалвиолет (Soto et al., 2006).

10.1. разред *Enterobacteriales*

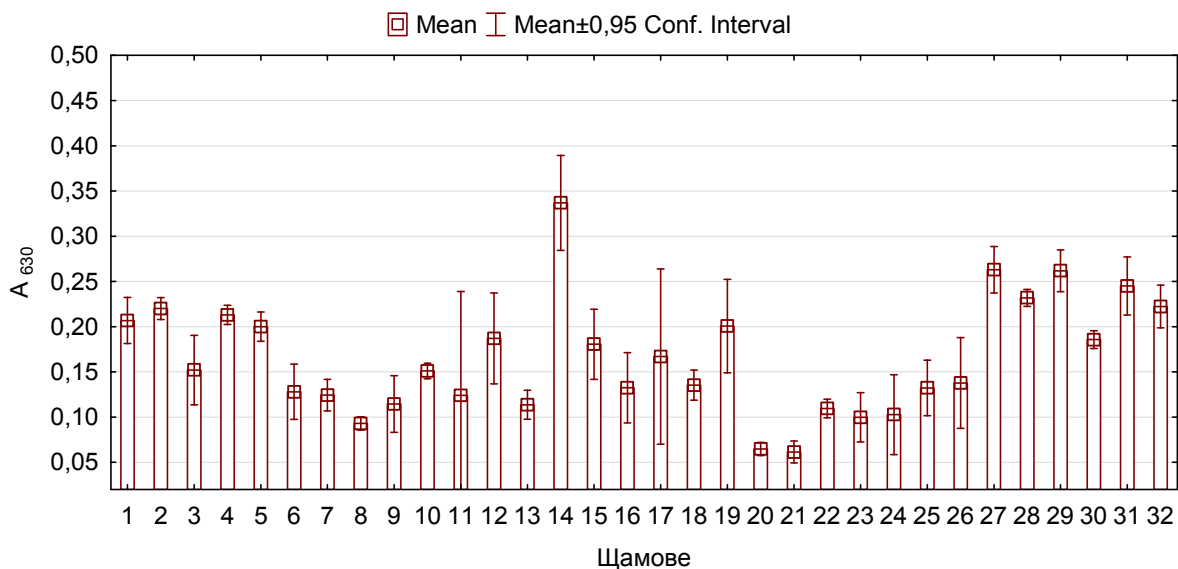
Сред тестваните 313 изолати *Enterobacteriales* само 66 щамове образуват биофилм (21%), като 41 от щамове са изолирани от урина. Само 10% от изследваните щамове *E. coli* образуват биофилм, докато биофилм – образувачи щамове от род *Klebsiella* са 32 от общо 55 изолирани щамове (58%), по-голямата част от които са също уринарни изолати. *Proteus mirabilis* е третия най-често изолиран вид при инфекции на урогениталните пътища, но при изследваните от нас щамове не се доказва свойство да образуват биофилм *in vitro*. От щамове, обединени в сборна група ентеробактерии 68% проявяват тази способност, но тя обединява малко на брой щамове от различните видове и е трудно да се установи някаква зависимост (Таблица 4).

Таблица 4. Щамове от разред *Enterobacteriales*, формиращи биофилм *in vitro*

Изолати / Проба	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>P. mirabilis</i>	Други ентеробактерии	Общо биофилм обр./ общ бр. /%
Урина	12	22	0	7	41 / 223 / 18%
Вагинален секрет	9	10	0	4	24 / 79 / 30%
Уретрален секрет	0	0	0	1	1 / 4 / 25%
Еякулат	1	0	0	1	3 / 8 / 38%
Общо биофилм обр. / общ бр. /%	22/206/10%	32/55/58%	0/33/0%	13/19/68%	66 / 313 / 21%

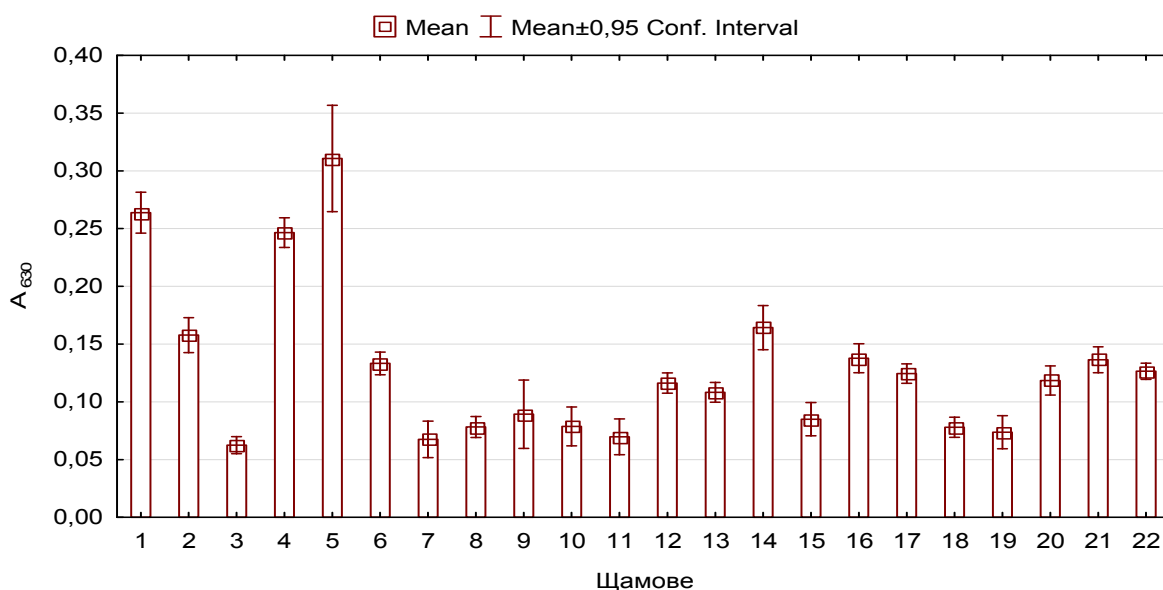
По-голямата част от изолатите от род *Klebsiella* имат способност да образуват биофилм. Повечето от тях се характеризират с умерена биофилм-формираща активност

($OD \leq 0,200 \geq 0,100$) – 59%, следвани от 8 изолата (25%) с висок биофилм-формиращ капацитет ($OD \geq 0,200$). Изолатът *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* U-230, който е XDR щам, е сред щамовете с висок капацитет (№ 27 на Фиг. 7). Най-висока е отчетената стойност за формирания биофилм *in vitro* от щам *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* G-180 (№ 14 на Фиг. 7), изолиран от генитален тракт на жена.



Фиг. 7. Биофилм-формиращ капацитет на 32 щамове от род *Klebsiella* в 96-гнездови полистиренови плаки на минимална среда М63 при 37°C за 24 ч. (1-6 *Klebsiella oxytoca*, 7-32 *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*)

Освен 58% от щамовете *Klebsiella* spp., 22 щамове от изследваните от нас 206 щамове *E. coli*, асоциирани с инфекции на урогениталния тракт, формират биофилми, като 10 (45%) от тях имат умерен биофилм-формиращ капацитет ($OD \leq 0,200 \geq 0,100$), но само 3 щамове (14%) образуват биофилм с високи стойности върху полистиренова повърхност. Слаби биофилм-формиращи щамове са 9 (41%) от щамовете (Фиг. 8). Редица автори съобщават за доста по-висок процент на изолирани от ИУТ биофилм-формиращи щамове *E. coli* (между 70% и 85%) (Karam et al., 2018). В настоящото изследване само 10% имат тази способност.



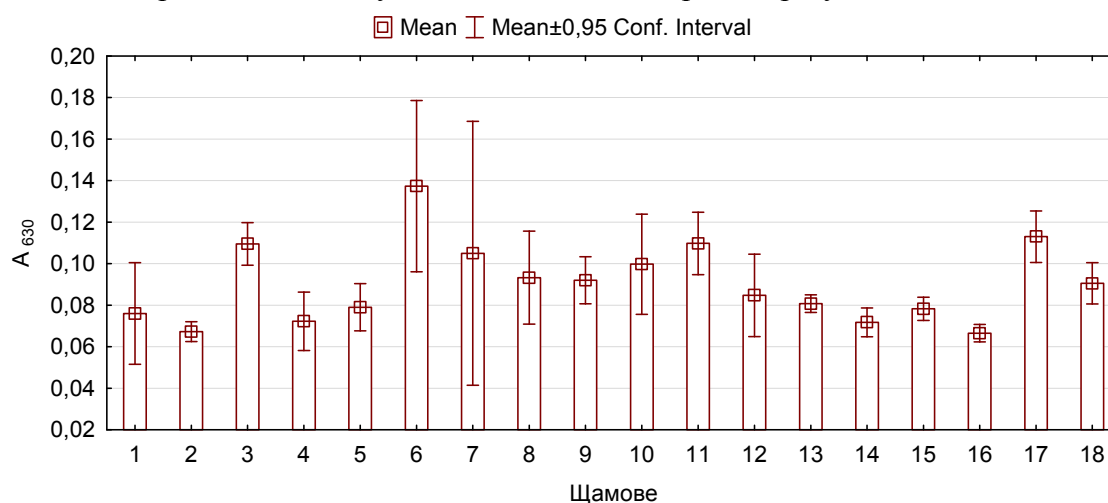
Фиг. 8. Биофилм-формиращ капацитет на 22 щамове *E. coli* в 96-гнездови полистиренови плаки на минимална среда М63 при 37°C за 24 ч. (1-9 изолати от генитален тракт, 10-22 изолати от урина)

10. 2. *Enterococcus faecalis*

В настоящата работа ентерококи са изолирани от инфекции на урогениталния тракт като втори по честота след представителите на разред *Enterobacteriales*. След първоначалния скрийнинг се доказва формиране на биофилм с различна степен на интензивност при 18 (25%) от тестваните 72 изолати. По-голямата част от биофилм-формиращите *E. faecalis* са изолати от проби от гениталния тракт на жени – 13 щамове, а 2 щамове са от уретрален секрет. Замътването на бульонните култури при култивирането за определяне на биофилм-формиране *in vitro* е в дълбочина, където в последствие се установи и формирането на биофилм.

Способността на щамове *E. faecalis* да образуват биофилм е тествана количествено в стерилни 96-гнездови плаки с СКС с добавена глюкоза (0.25%) за 24 часа при 37°C (Фиг. 9). По-голяма част от изолатите проявяват слаб биофилм-формиращ капацитет (67%), а останалите щамове – умерен (33%).

Според Shridhar и Dhanashree (2019) количеството биофилм-формиращи щамове *E. faecalis* сред изолати от урогенитални инфекции е сравнително ниско – около 22%, което се потвърждава и от получените в настоящата работа резултати.

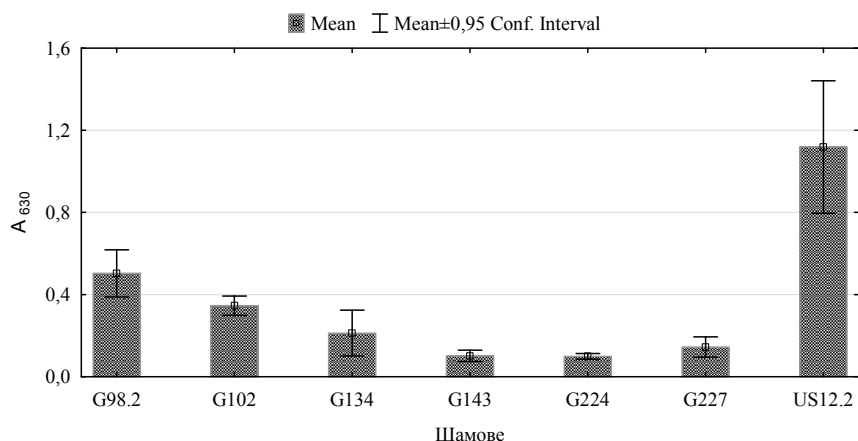


Фиг. 9. Биофилм-формиращ капацитет на 18 щамове *Enterococcus faecalis* в 96-гнездови полистиренови плаки на СКС+0,25% глюкоза при 37°C за 24 ч.

10.3. *Candida spp.*

Изследване на капацитета за формиране на биофилм е проведено и за щамове *Candida spp.*, изолирани от проби на амбулаторни пациенти с инфекции на гениталния тракт. Данните показват, че само 7 щамове от 97 изолата (7%) имат тази вирулентна характеристика (Фиг. 10).

Слаб биофилм-формиращ капацитет имат *C. albicans* G143 и *C. tropicalis* G224 ($OD_{620nm} \leq 0.200$), а *C. glabrata* G227 и *C. albicans* G102 имат умерен биофилм-формиращ капацитет ($OD_{620nm} \leq 0.400$), два щамове *C. albicans* G98.2 и US12.2 имат висок биофилм-формиращ капацитет. Интерес представлява фактът, че щамове са изолирани от пациенти с коинфекции – първият с *E. coli*, а вторият с *E. faecalis*. И двата коинфектиращи щамове могат да образуват биофилм *in vitro*. За щамове *C. parapsilosis* и *C. krusei* се доказва, че не са биофилм-формиращи. Други автори при сходни изследвания съобщават за доста по-висок процент на щамове, образуващи биофилм, както сред *C. albicans*, така и non-*albicans* видовете (Benzaid et al., 2019).



Фиг. 10. Биофилм-формиращ капацитет на щамове *Candida* spp. в 96-гнездови полистиренови плаки на Saburo+0,25% глюкоза при 37°C за 48 часа

За щамовете от останалите минорни групи изолирани микроорганизми като *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *Streptococcus* група В както и определените като *Staphylococcus* не се доказа способност да образуват биофилм *in vitro* при култивиране в различни хранителни среди при 37°C за 24 часа. Те са определени като неформиращи биофилм *in vitro* изолати.

11. Продукция на фимбри и целулоза

Биофилм-формиращите щамове от род *Klebsiella* и *E. coli* са тествани за морфотип след култивиране на CR агар за 24 часа при 37°C (Römling et al., 2005). Морфотип *saw* определя отсъствие на целулоза и фимбри; *pdar* – наличие на целулоза и отсъствие на фимбри; *rdar* морфотип – наличие на целулоза и фимбри (Таблица 5).

Таблица 5. Морфотип на биофилм-формиращи *in vitro* щамове (CR агаров тест)

Щам	Морфотип n /%		
	<i>pdar</i>	<i>rdar</i>	<i>saw</i>
<i>Klebsiella</i> spp.	4/ 12%	0/0%	28/88%
<i>E. coli</i>	12/55%	8/36%	2/9%

След проведеното изследване се установи, че най-застъпен морфотип при изследваните щамове *Klebsiella* е *saw* – 88%, последван от *pdar* – 12%. Едновременно присъствие на целулоза и фимбри не е отчетено при нито един от тестваните щамове.

Експресията на фимбри и целулоза са свързани с биофилм образуването при *E. coli*, като 55% от биофилмформиращите щамове в настоящото изследване продуцират целулоза, докато фимбри се откриват при една трета от тях (36%).

12. Аглутинация на дрождеви клетки

Тази вирулентна характеристика е изследвана за биофилм-формиращите щамове от род *Klebsiella* и *E. coli*. MSA е отчетена при 14 щамове *Klebsiella* spp. (44%) и 19 щамове *E. coli* (86%), а MRA само при общо 4 изолата. Половината от тестваните изолати *Klebsiella* spp. не проявиха нито MSA нито MRA (50%) (Таблица 6).

Таблица 6. Аглутинация на дрождеви клетки от биофилм-формиращи щамове *Klebsiella* spp. в присъствие или отсъствие на маноза

Щам	MSA	MRA	Липса на аглутинация
<i>Klebsiella</i> spp.	14 / 44%	2 / 6%	16 / 50%
<i>E. coli</i>	19 / 86%	2 / 9%	1 / 5%

MSA – маноза-чувствителна аглутинация; MRA – маноза-резистентна аглутинация

13. Изследване на вирулентни детерминанти чрез мултиплекс колония PCR при биофилм-формиращи изолати от разред *Enterobacteriales*

13.1. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*

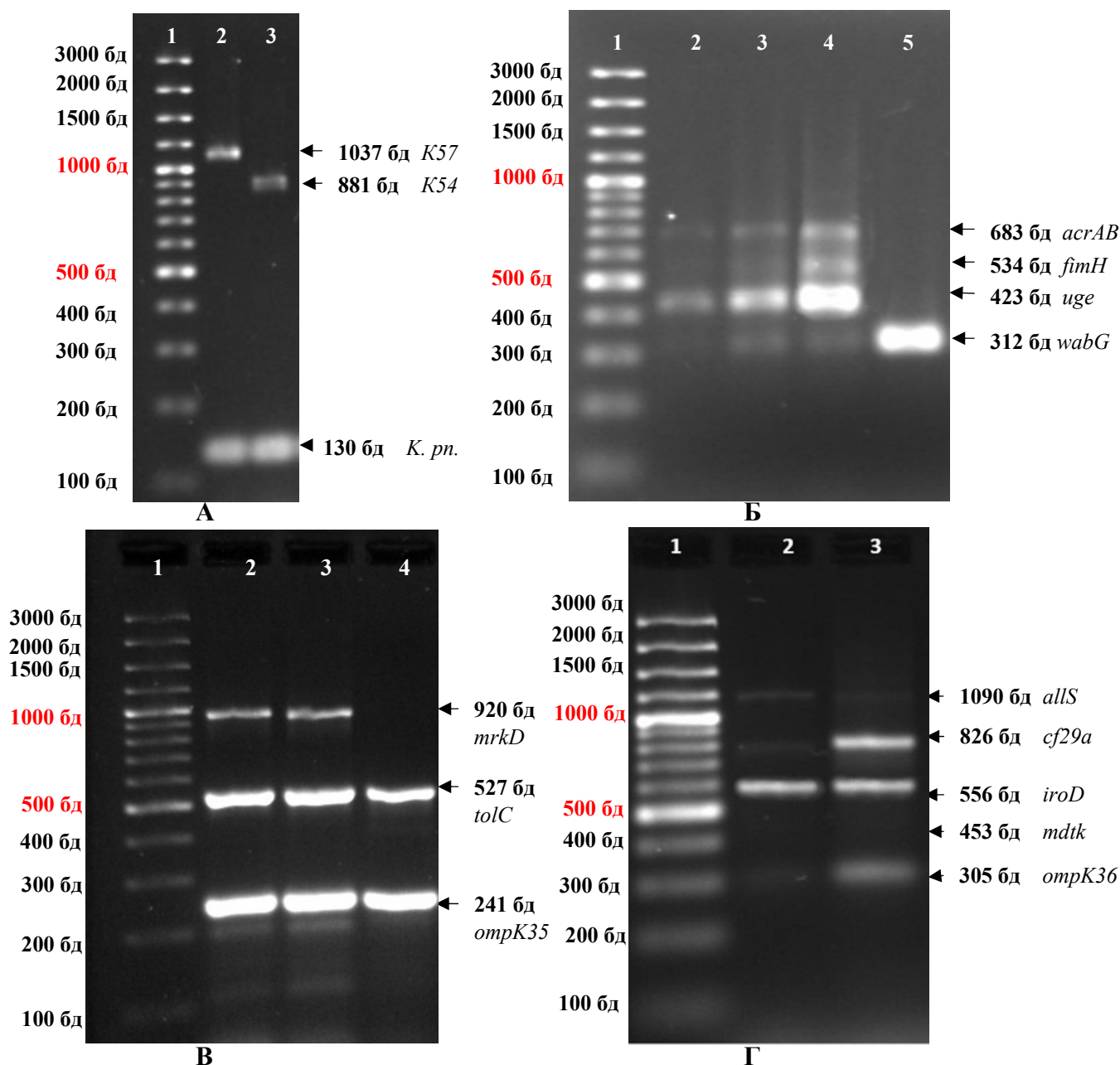
Праимерите за PCR идентификация на подбрани вирулентни фактори са групирани в няколко системи за мултиплексни реакции според големината, температурата на анилинг и това дали даденият ген е хромозомно или плазмидно кодиран. Получените комбинации са описани като система I, II, III и IV (Таблица 7).

Таблица 7. Системи за multiplex-colony PCR при биофилм-формиращи щамове *Klebsiella* spp.

	ген	Големина на фрагмента (бд)	Проби (n) +/n
Система I	<i>wzy</i> K1	1283	0/32
	<i>wzx</i> K57	1037	0/32
	<i>wzx</i> K54	881	1/32
	<i>wzx</i> K20	741	0/32
	<i>wzy</i> K2	641	0/32
	<i>wzx</i> K5	280	0/32
	<i>K. pn.</i> 16S-23S ITS	130	26/32
Система II	<i>acrAB</i>	683	28/32
	<i>fimH</i>	534	26/32
	<i>uge</i>	423	20/32
	<i>wabG</i>	312	20/32
Система III	<i>mrkD</i>	920	20/32
	<i>tolC</i>	527	24/32
	<i>ompK35</i>	241	32/32
Система IV	<i>allS</i>	1090	11/32
	<i>cf29a</i>	826	17/32
	<i>iroD</i>	556	11/32
	<i>mdtk</i>	453	20/32
	<i>ompK36</i>	305	25/32

Система I включва гените за шест серотипа (K1, K2, K5, K20, K54 и K57), както и видовоспецифична двойка праймери за *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Сред биофилмобразуващите щамове, изолирани от урогениталния тракт на амбулаторни пациенти се доказва наличието само на 1 серотип капсула (K54) при уринарния изолат U-96 (Фиг. 11А). Липсата на фрагмент с големина 130 бд на Фиг. 28 позиция 7, 10, 12 и 14 доказва, че щамовете не са от вида *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Биохимичната и молекулярно-генетичната идентификация, осъществена от нас потвърди, че изолатите се отнасят към вида *Klebsiella oxytoca*.

Генът *fimH* кодира тип 1 пили. Самият ген е широко разпространен сред клиничните изолати и е от изключително важно значение за успешната патогенеза при *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Тестваните от нас изолати също доказват високата честота на срещане на *fimH* (76%) (Таблица 7; Фиг. 11Б), като при 14 от тях се доказва и фенотипната му изява при проведения експеримент за аглутинация на дрождеви клетки (Таблица 6).



Фиг. 11. Електрофоретично разделяне на продукти на multiplex colony PCR: системи I (А), II (Б), III (В) и IV (Г)

Проба 1 – DNA ladder 100bp, Проби от 2 до 5 – изолати *Klebsiella* spp.

Изследваните *uge* и *wabG* гени се откриват при над половината от тестваните изолати в настоящата работа – общо 20 от 32 щама (56%) (Таблица 7; Фиг. 11Б). Присъствието в *K. pneumoniae* на гена *uge* е от есенциално значение за вирулентността на щамата. Генът *wabG* кодира гликозилтрансфераза, която играе ключова роля в синтезата на LPS.

Една от системите за множествена резистентност с изпомпване е AcrAB, която се кодира в *acrAB* оперона при *K. pneumoniae*. В 28 от изследваните 32 щамата (88%) се открива наличието на този оперон (Фиг. 11Б). При изследване на лекарствената устойчивост на същите щамове е установена увеличена резистентност към β -лактамни антибиотици (22 изолата), като за 4 изолата е установен XDR фенотип.

TolC е протеин, който се свързва с AcrAB, и играе съществена роля при изпомпването на антибиотичните молекули. Резултатите от проведената мултиплекс PCR показват, че при 24 щамата се открива гена за този протеин (Таблица 7; Фиг. 11В).

Тип 3 пили при ентеробактериите медираат аглутинацията с еритроцити, могат да се свързват с колаген и имат пряка връзка със способността на щамовете да се развиват и образуват биофилм, основно върху абиотични повърхности (Schurtz et al., 1994). Ген за този тип фимбрии се откри при 20 от тестваните 32 щама (63%) (Таблица 7; Фиг. 11В), като фенотипна експресия се детектира едва при 2 (6%) от тях (MRA аглутинация).

Klebsiella pneumoniae продуцира два основни порина – OmpK35 и OmpK36. Повечето непродуциращи широкоспектърни β -лактамази клинични изолати синтезират и двата вида порини. Липсата на *ompK36* установена при 7 от тестваните 32 щама, е допълнена с устойчивост към цефокситин и увеличена резистентност към флуорохинолони (Таблица 7, Фиг. 11Г).

Всички тествани биофилм-формиращи изолати съдържат в генома си гена за *ompK35* (Таблица 7, Фиг. 11В). Предишни изследвания показват, че OmpK35 позволява цефокситин, цефотаксим и карбапенеми ефективно да навлязат в клетката, в сравнение със щамове, които експресират само OmpK36.

Системата *mdtK* е част от семейството на Multi Antimicrobial Extrusion (МАТЕ) помпите и заедно с *acrAB-tolC* гените са много силно застъпени при множество резистентните щамове (MDR). Доказано е наличие на *mdtK* при 59% от тестваните щамове, което корелира с отчетената висока антибиотична резистентност (Таблица 7, Фиг. 11Г).

Нефимбриален протеин с големина 29kDa е кодиран от ген *cf29a*. Локализиран е в 185кб конюгативен R плазмид. Установено е, че тази вирулентна детерминанта присъства при 53% от тестваните изолати (Таблица 7; Фиг. 11Г).

Асоцираният с метаболизма на алантоин *allS* ген, кодира ензим, който е част от последната фаза в синтеза на пурины от пикочна киселина, когато източникът на азот е лимитиращ фактор. Сред всички изследвани от нас гени, детектирани в биофилм-формиращите щамове *Klebsiella* в настоящата работа този ген заедно с аеробактин (*iroD*) се срещат при 11 от 32 изолата (34%) (Таблица 7; Фиг. 11Г).

Проведен е корелационен анализ (Pearson) за тестване на хипотезата, че вирулентните фактори се характеризират с по-висока честота на срещане при чувствителни на антимикуробни препарати биофилм-формиращи щамове от род *Klebsiella* (Таблица 8). Резултатите потвърждават формулираната хипотеза, като доказват по-висока концентрация на изследваните генетични детерминанти при чувствителни на антибиотици щамове. Най-високи нива на корелация се установяват между *fimH* (адхезивната молекула на тип 1 пили), *acrAB*, *ompK35* и *ompK36*. Други комбинации с високи нива на корелация включват *allS*, *aer* и *cf29a*. Обратна зависимост се наблюдава при щамове с висока резистентност и XDR фенотип.

Таблица 8. Корелация между вирулентни фактори (Pearson) при биофилм-формиращите изолати от род *Klebsiella*.

	<i>K54</i>	<i>wabG</i>	<i>uge</i>	<i>fimH</i>	<i>acrAB</i>	<i>mrkD</i>	<i>tolC</i>	<i>ompK35</i>	<i>ompK36</i>	<i>mdtK</i>	<i>aer</i>	<i>cf29a</i>	<i>allS</i>
<i>K54</i>	1												
<i>wabG</i>	0.133	1											
<i>uge</i>	0.100	0.727	1										
<i>fimH</i>	0.077	0.667	0.818	1									
<i>acrAB</i>	0.069	0.667	0.809	0.906	1								
<i>mrkD</i>	0.095	0.588	0.615	0.667	0.708	1							
<i>tolC</i>	0.080	0.632	0.651	0.816	0.808	0.636	1						
<i>ompK35</i>	0.061	0.609	0.745	0.877	0.933	0.769	0.857	1					
<i>ompK36</i>	0.080	0.737	0.791	0.898	0.885	0.682	0.833	0.857	1				
<i>mdtK</i>	0.100	0.424	0.421	0.636	0.723	0.615	0.698	0.745	0.698	1			
<i>aer</i>	0.167	0.480	0.467	0.444	0.513	0.581	0.629	0.512	0.571	0.533	1		
<i>cf29a</i>	0.118	0.533	0.514	0.537	0.636	0.667	0.750	0.667	0.600	0.629	0.815	1	
<i>allS</i>	0.167	0.480	0.467	0.500	0.462	0.581	0.629	0.512	0.571	0.400	0.818	0.741	1

***bold** – корелацията е значима при $\alpha = 0.05$

13.2. *Escherichia coli*

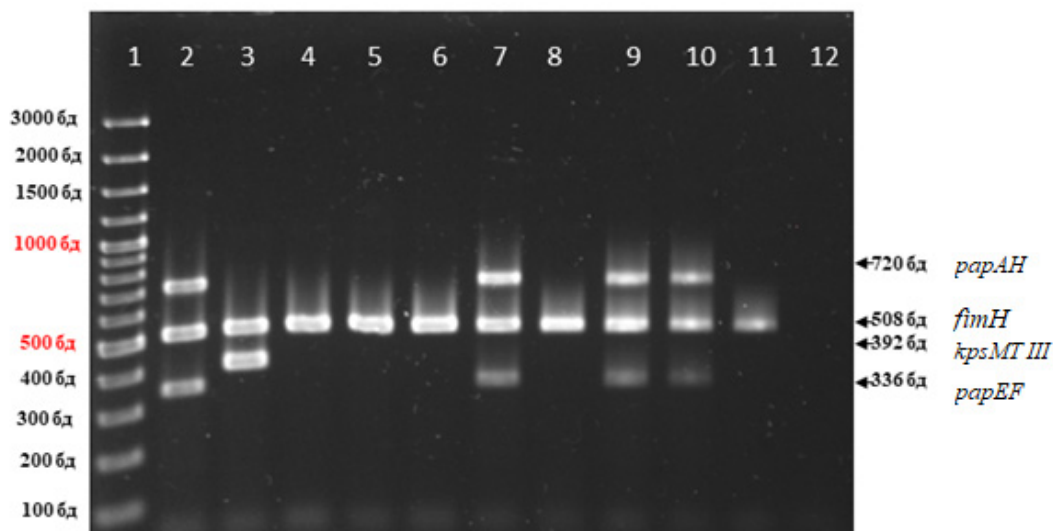
За изследването на вирулентните характеристики при щамовете *E. coli* са избрани праймери за 22 гени: участъци от *pap* оперона (*papAH*, *papC*, *papEF*, *papG* алел I и алел II/III), гени за токсини – *hlyA* (α -хемолизин) и *cnf1* (цитотоксин-некротизиращ фактор 1), *cvaC* (колицин V), *traT* и *iss* (серумна устойчивост), гени за капсулни белтъци (*kpsMT II*, *kpsMT III*, *kpsMT K1*, *kpsMT K5*), *fimH*, кодиращ маноза-чувствителния адхезин на тип 1 пилите, гени за нефимбриални адхезини *bmaE* и *nfaE*, адхезините *sfaS*, *sfa/focDE* и *afa/draBC*, *flu* (повърхностен адхезин – антиген 43), *fyuA*, кодиращ рецептора за сидерофора йерсиниябактин (*yersiniabactin*) и *iutA* (аеробактин).

За провеждането на multiplex PCR праймерите са групирани според очаквания размер на PCR продуктите както и температурата на анилинг. Формираните системи, големината на очакваните продукти и честотата на срещане при изследваните биофилм-формиращи щамове *E. coli* са описани в Таблица 9.

Таблица 9. Системи за multiplex-colony PCR при биофилм-формиращи щамове *E. coli*

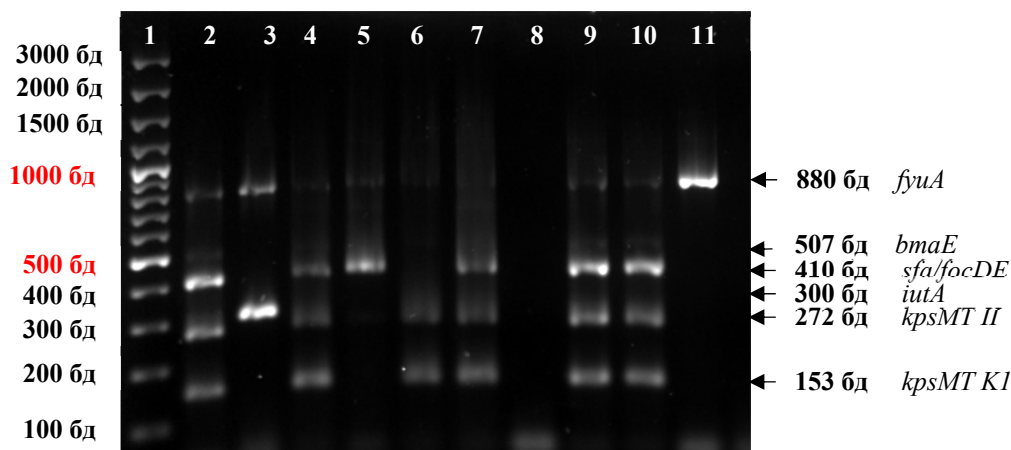
	ген	Големина на фрагмента (бд)	Проби (n) +/n
Система I	<i>papAH</i>	720	9/22
	<i>fimH</i>	508	22/22
	<i>kpsMT III</i>	392	3/22
	<i>papEF</i>	336	9/22
Система II	<i>fyuA</i>	880	19/22
	<i>bmaE</i>	507	8/22
	<i>sfa/focDE</i>	410	10/22
	<i>iutA</i>	300	3/22
	<i>kpsMT II</i>	272	13/22
	<i>kpsMT K1</i>	153	13/22
Система III	<i>hlyA</i>	1177	16/22
	<i>iss</i>	760	12/22
	<i>nfaE</i>	559	0/22
	<i>flu</i>	520	14/22
	<i>papC</i>	200	9/22
Система IV	<i>cvaC</i>	680	11/22
	<i>cnf1</i>	498	6/22
	<i>traT</i>	290	7/22
	<i>kpsMT K5</i>	159	0/22
Система V	<i>papG</i>	1070	12/22
	<i>papG1</i>	1190	12/22
	<i>afa/draBC</i>	559	3/22
	<i>sfaS</i>	240	10/22

Наличие на гена, кодиращ *fimH* се установи при всички тествани биофилм-формиращи изолати *E. coli* (Таблица 9; Фиг. 12)



Фиг. 12. Електрофореза на продукти на multiplex colony PCR по система I
1 – DNA ladder 100bp, от 2 до 11 – изолати *E. coli*, 12 – контрола

Гените за адхезини *sfaS* и *afa/draBC* присъстват съответно в 10 и 3 биофилм-формиращи щама *E. coli*. Ген *bmaE* за нефимбриални адхезини е открит в 8 щама, а *sfa/focDE* е установен в 10 изолата (Фиг. 13). Генът *nfaE* не е детектиран при изследваните щамове (Таблица 9).



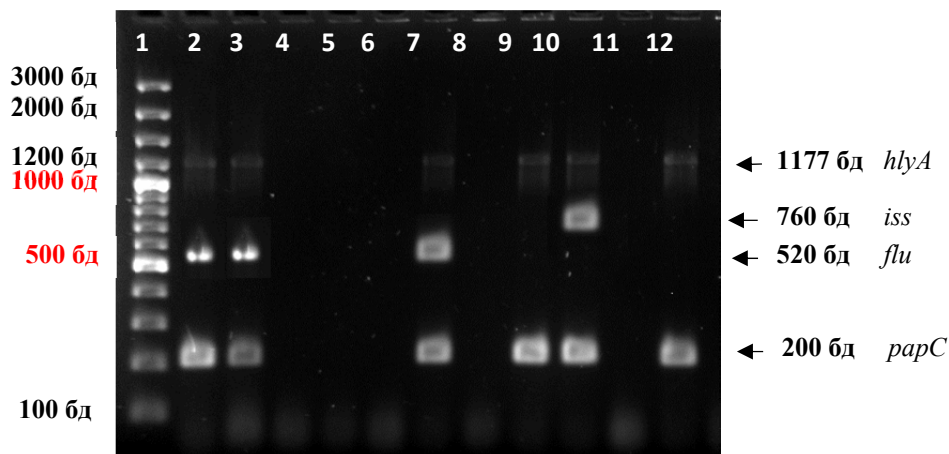
Фиг. 13. Електрофореза на продукти на multiplex colony PCR по система II
1 – DNA ladder 100bp, от 2 до 14 – изолати *E. coli*, 8 и 11 – контрола

Ген за K5 капсула не е открит в нито един от изследваните щамове, докато за K1 и *kpsMT II* са установени в 13 щама (Фиг. 13). Ген за *kpsMT III* е установен при три изолата (Фиг. 12).

Гени, кодиращи сидерофор *fyuA* са установени при 19 (86%) биофилм-формиращи щамове *E. coli* (Фиг. 13). Друг ген, кодиращ рецептор за аеробактин и участващ в транспорта на желязо е *iutA*. Той се детектира само при три от биофилм-формиращите *E. coli*.

Ген за α -хемолизин е детектиран в генома на 16 от изследваните 22 щама (73%) (Фиг. 14).

Ген *flu*, кодиращ повърхностен транспортен протеин (Ag43) е представен в 14 (64%) от изследваните биофилм-формиращи *E. coli* щамове (Фиг. 14). Антиген 43 (Ag43) медира агрегацията на клетките и повлиява формирането на биофилм.

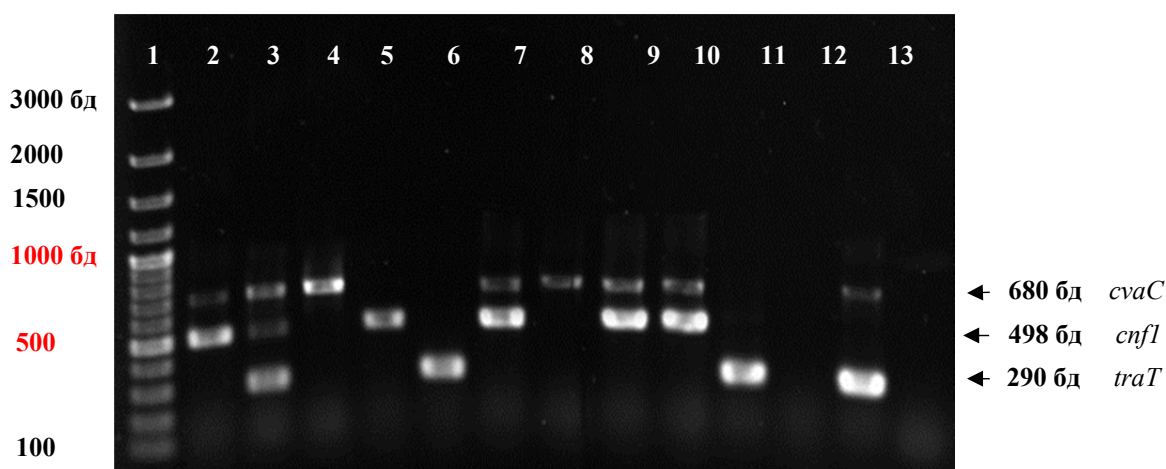


Фиг. 14. Електрофореза на продукти на multiplex colony PCR по система III
1 – DNA ladder 100bp, от 2 до 10 и 12 – изолати *E. coli*, 11 – контрола

Генът *iss* е открит в 12 от тестваните 22 биофилм-формиращи щамове (55%) (Фиг. 14). Присъствието на *iss* е документирано в състава на голям вирулентен плазмид CoIV при щамове *E. coli*, свързани с различни екстраинтестинални инфекции при птици (Jonhson et al., 2008). Jonhson и кол. коментират еволюцията на *iss* гена с оглед установеното му интегриране в бактериалната хромозома на патогенни екстраинтестинални *E. coli* при птици (Jonhson et al., 2008). Aslam и кол. (2014) съобщават за присъствие на *iss* и редица други вирулентни гени в изолати *E. coli* от замразено птиче месо. По-късно е открит в инвазивни екстраинтестинални *E. coli* щамове, свързани с неонатални менингити и септицемии, но не и в UPEC при човека (Sarowska et al., 2019). Данните в настоящето изследване свидетелстват за значимо разпространение на *iss* сред биофилм-формиращите щамове *Escherichia coli*, асоциирани с неусложнени ИУТ при човека.

Генът *cvaC*, кодиращ колицин, е използван като маркер за присъствие на голям плазмид CoIV и често се открива в птичи вирулентни *E. coli* щамове. Открит е при 50% от изследваните биофилм – формиращи изолати (Фиг. 15).

При 7 от изследваните биофилм-формиращи щамове (32%) е установено присъствие на *traT* (Фиг. 15). TraT е също плазмидно кодиран повърхностен протеин, осигуряващ устойчивост срещу действието на комплемента при *E. coli*.

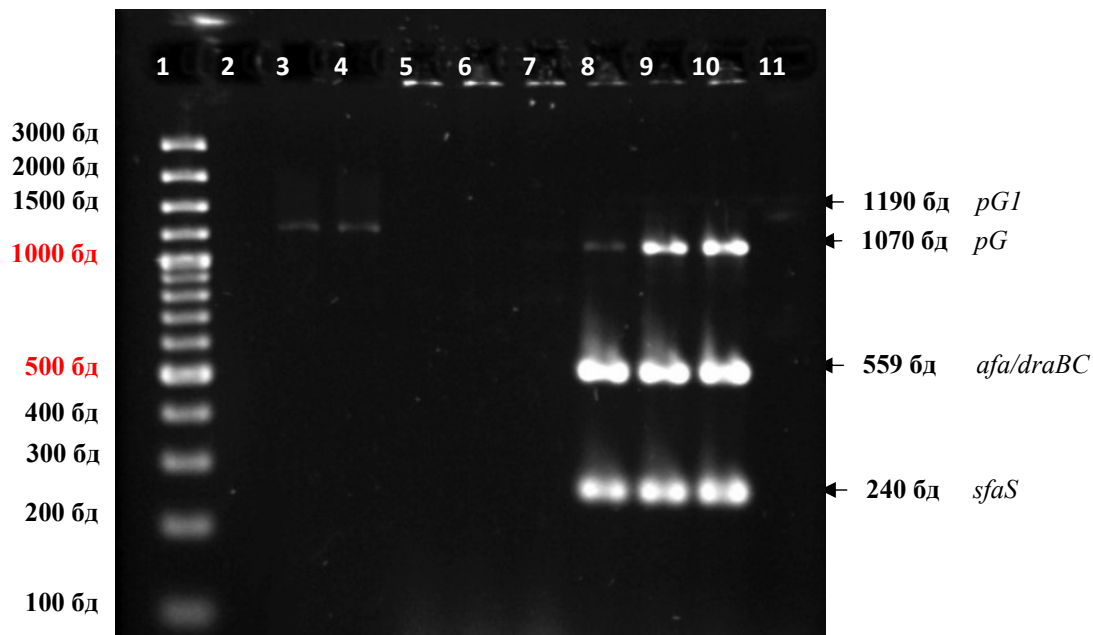


Фиг. 15. Електрофореза на продукти на multiplex-colony PCR по система IV
1 – DNA ladder 100bp, от 2 до 11 и 13 – изолати *E. coli*, 12 и 14 – контрола

Цитотоксин-некротизиращ фактор 1 (CNF-1) катализира деамидирането на малките ГТФ-свързващи протеини и води до апоптоза на клетките на пикочния мехур

(Rippere-Lampre, 2001). Ген за тази вирулентната детерминанта е отчетен при 27% от биофилм-формиращите *E. coli* изолати (Фиг. 15).

Тип Р пилите се кодират от 11 гена в *rap* оперона. Експресията се регулира от регион, намиращ се upstream от гена *rapA*. След проведения multiplex colony PCR е установено, че девет щамове (41%) кодират в генома си всички гени за субединиците, изграждащи маноза-резистентните тип Р пили (*rapG*, *rapA*, *rapH*, *rapE*, *rapF* и *rapC*) (Фиг. 12.; Фиг. 14; Фиг. 16). Три от изследваните щамове кодират и двата алела за *rapG* гена (Фиг. 16).



Фиг. 16. Електрофореза на продукти на multiplex-colony PCR по система V
1 – DNA ladder 100bp, от 3 до 11 – изолати *E. coli*, 12, 2 – контрола

В настоящата работа е установена щамова специфика в разпределението на изследваните вирулентни детерминанти сред биофилм-формиращите изолати. Генът за адхезивната молекула на тип 1 пилите (*fimH*) *Escherichia coli* се очертава като задължителен елемент за успех при колонизацията на урогениталния тракт. Изявено е значимо присъствие на често откриваните в патогенни изолати при птици гени *iss* (55%) и *traT* (32%), осигуряващи серумна устойчивост.

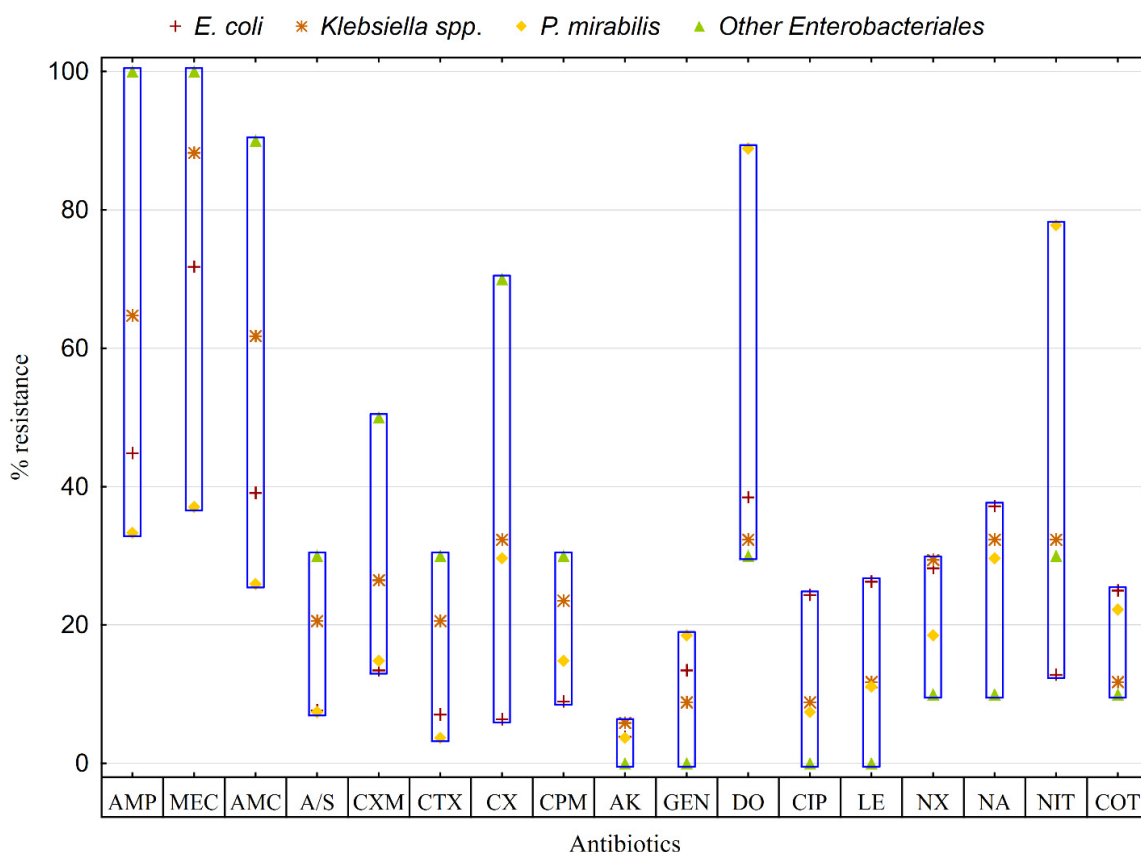
14. Лекарствена устойчивост

14.1. разред *Enterobacteriales*

За определянето на чувствителността на представителите на това семейство са избрани антибиотични препарати от различни класове съгласно EUCAST v.7.1 (2017). За скрийнинг на широкоспектърни β -лактамази (ESBL) е проведен двойно синергичен тест с амоксицилин/клавулонова киселина, цефотаксим и цефуросим.

14.1.1. Уринарни изолати

Сред изследваните 223 изолати най-висока устойчивост е отчетена срещу мецилинам (MEC) (100%, 88% и 72% за други представители на разред *Enterobacteriales*, *Klebsiella* spp. и *E. coli* съответно), ампицилин (100%, 65% и 45% за други ентеробактерии, *Klebsiella* spp. и *E. coli*, съответно) и доксицилин (89%, 38% и 32% за *P. mirabilis*, *E. coli* и *Klebsiella* spp.) (Фиг. 17).

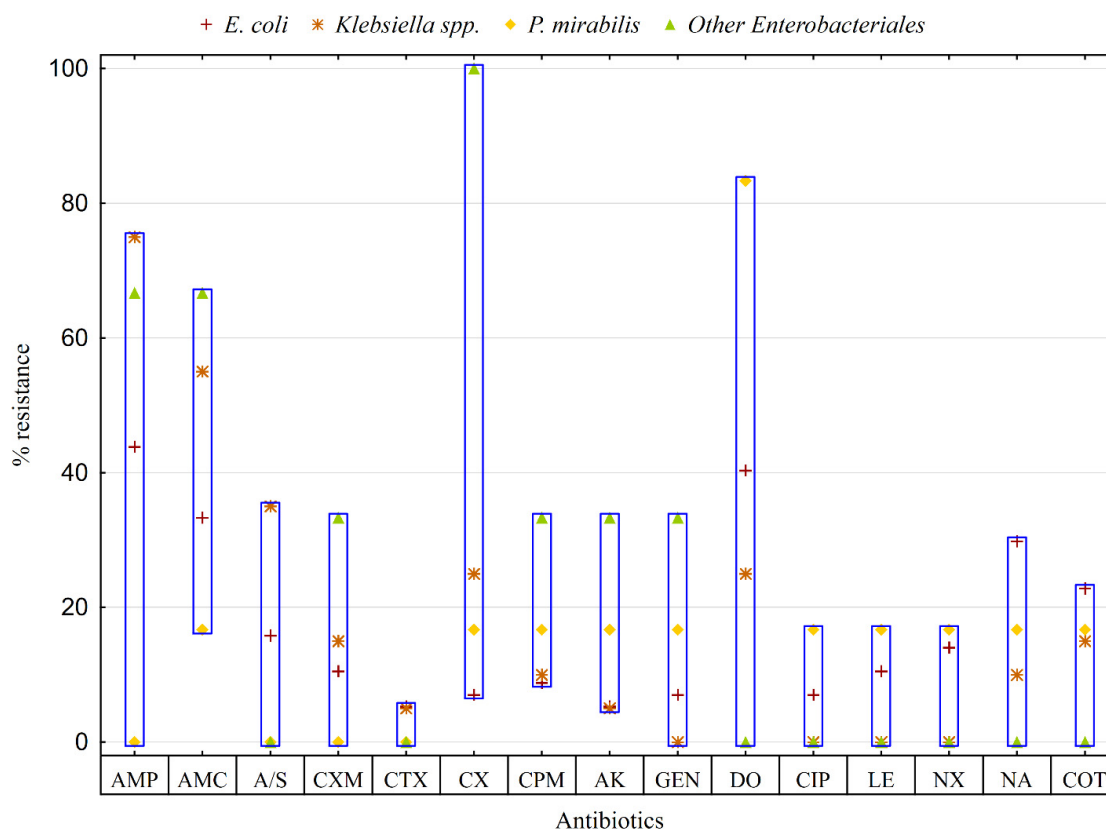


Фиг. 17. Антибиотична резистентност на уринарни изолати от разред *Enterobacteriales*. AMP – ампицилин, MEC – мецилинам, AMC – амоксицилин/клавулонова киселина, A/S – ампицилин/сулбактам, CXM – цефуроксим, CTX – цефотаксим, CX – цефокситин, CPM – цефепим, АК – амикацин, GEN – гентамицин; DO – доксициклин, CIP – ципрофлоксацин, NX – норфлоксацин, LE – левофлоксацин, NIT – нитрофурантоин, COT – триметоприм/сулфаметоксазол

При комбинирането на пеницилинов препарат с инхибитор на β -лактамази чувствителността се променя от 26% (*P. mirabilis*) до 90% (други ентеробактерии) към амоксилин/клавулоновата киселина и значително повече към ампицилин/сулбактам, към когото е установена между 70% (*Klebsiella spp.*) и 92% (*E. coli*) чувствителност. Представителите на групата, обединяваща останалите идентифицирани ентеробактерии, са с вродена резистентност към ампицилин (както и *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. oxytoca*) и към комбинацията му с β -лактамни инхибитори (само за други ентеробактерии). Поради слабата чувствителност тези препарати се считат за неефективни *in vivo* (EUCAST, 2017). Най-ниска устойчивост е отчетена срещу аминогликозидните препарати амикацин и гентамицин – около 4% и 13% съответно. Резистентността срещу флуорохинолоните е 22% и 27% срещу левофлоксацин и норфлоксацин, а 19% срещу ципрофлоксацин. От изследваните антибиотични препарати от клас цефалоспорици най-ефективен срещу изследваните щамове се оказва цефотаксим (III^{то} поколение) – регистрирана е < 10% устойчивост, като за изолатите от рода *Klebsiella* тя е 21%. Значима се оказва регистрираната устойчивост спрямо триметоприм/сулфаметоксазол при около 23% от изследваните щамове (Фиг. 17).

14.1.2. Генитални изолати

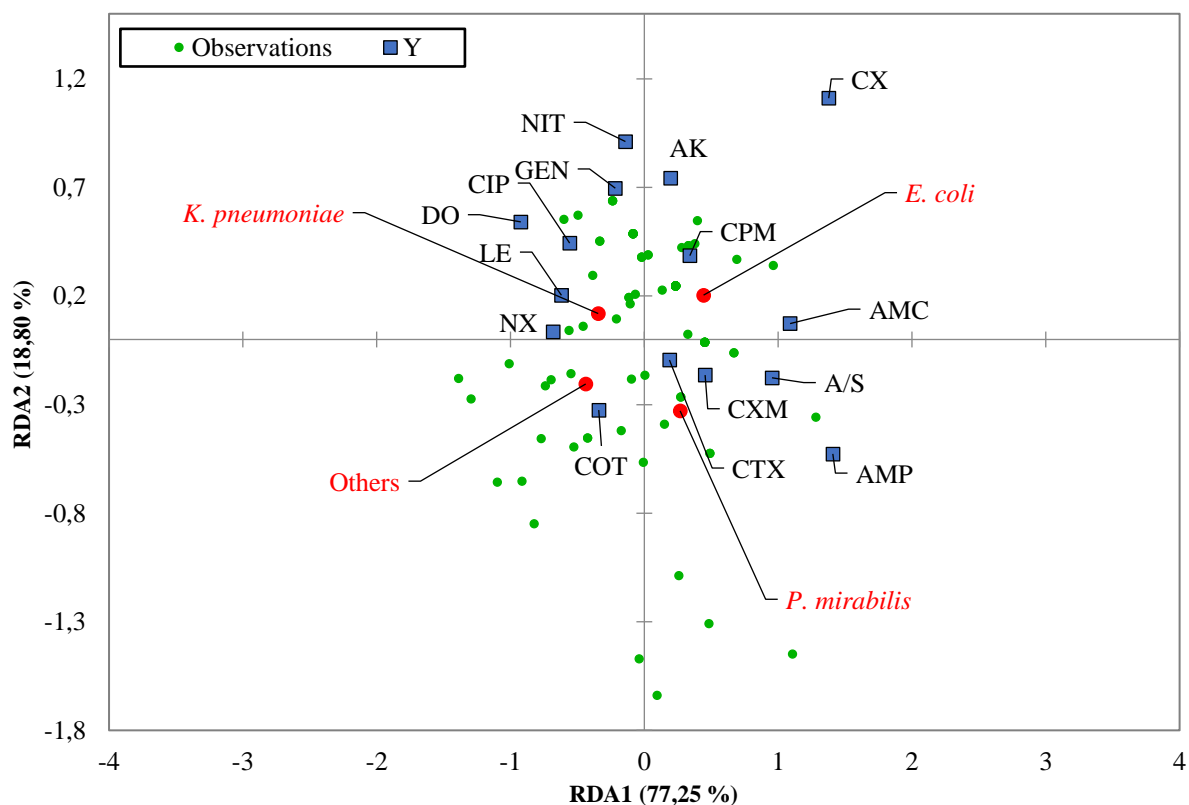
Щамовете в настоящото изследване, изолирани от проби на амбулаторни пациенти с инфекции на гениталния тракт, показват най-висока устойчивост към ампицилин (43% за *E. coli*), амоксицилин/клавулонова киселина (33% за *E. coli*) и доксициклин (40% и 25% за *E. coli* и *Klebsiella* spp.) (Фиг. 18).



Фиг. 18. Антибиотична резистентност на изолати от гениталния тракт, отнесени към разред *Enterobacteriales*. AMP – ампицилин, AMC – амоксицилин/клавулонова киселина, A/S – ампицилин/сулбактам, CXM – цефуроксим, CTX – цефотаксим, CX – цефокситин, CPM – цефепим, АК – амикацин, GEN – гентамицин; DO – доксициклин, CIP – ципрофлоксацин, NX – норфлоксацин, LE – левофлоксацин, COT – триметоприм/сулфаметоксазол

Отчитат се два пъти по-ниски нива на резистентност при флуорхинолоните спрямо уринарните изолати (12%), като увеличена чувствителност се наблюдава както при изолатите *E. coli* (89%) и *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, така и при другите ентеробактерии (100%). Въпреки ниската резистентност към амикацин (7%) и гентамицин (7%) при тези щамове се отчита обратна тенденция спрямо щамовете, асоциирани с ИУТ, за увеличаване на устойчивостта към този клас антибиотици. Към цефотаксим са резистентни 5% от тестваните щамове, като щамовете *P. mirabilis* и групата на други ентеробактерии са 100% чувствителни. Процентът на устойчиви спрямо триметоприм/сулфаметоксазол щамове, асоциирани с инфекции на гениталния тракт е приблизително един и същ с този при изолатите от урина – 20% (Фиг. 18).

Проведеният многофакторен анализ за установяване на видовата принадлежност и антибиотичната чувствителност генерира модел, който обяснява 96,05% от общото вариране на резистентността при изолатите от разред *Enterobacteriales*. С най-голямо ($r \geq 0.75$) положително факторно тегло в RDA1 са AMC, AMP, A/S и CXM, а с отрицателно NX, LE. RDA2 се формира от АК, NIT, GEN, CPM и COT. Щамовете са разпределени в 4 основни квадранта спрямо тяхната чувствителност към антимикуробни агенти (Фиг. 19).



Фиг. 19. Връзка (многофакторен анализ) между антибиотичната резистентност и таксономичния състав на етиологични агенти, причиняващи инфекции на урогениталния тракт

14.1.3. Широкоспектрни β -лактамази (ESBLs), множествена и кръстосана резистентност при тестваните ентеробактерии

Тестването и доказването на широкоспектрните β -лактамази е от важно значение, както за клиничната практика, така и за мониторинг на разпространението и изолирането на такъв тип резистентност. В настоящото изследване е използван фенотипен тест за синергизъм между два или повече антибиотични препарата (амоксцилин/клавулонова киселина, цефотаксим, цефуроксим и цефепим) като така се доказва наличието на ESBLs.

Сред всичките тествани в настоящото изследване 313 щамове от разред *Enterobacteriales*, асоциирани с инфекции на урогениталния тракт, 9% продуцират ESBLs – 22 щамове от урина и 5 от проби от гениталния тракт. Най-често срещаният бактериален вид, при който се установи продукция на тези ензими е *Escherichia coli* – общо 15 щамове, като 13 са от урина и 2 от проби от генитален тракт (Таблица 10).

Таблица 10. Широкоспектрни β -лактамази при щамове от проби на амбулаторни пациенти с инфекции на урогениталния тракт.

Бактериален вид	От урина (n/% от 223 щамове)	От генитален тракт (n/% от 90 щамове)	Общо (n/% от 313 щамове)
<i>Escherichia coli</i>	13 / 6%	2 / 2%	15 / 5%
<i>Proteus mirabilis</i>	3 / 1%	0 / 0%	3 / 1%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 / 1%	1 / 1%	4 / 1,3%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2 / 0,9%	1 / 1%	3 / 1%
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1 / 0,4%	0 / 0%	1 / 0,3%
<i>Morganella morganii</i>	0 / 0%	1 / 1%	1 / 0,3%
Общо	22 / 10%	5 / 6%	27 / 9%

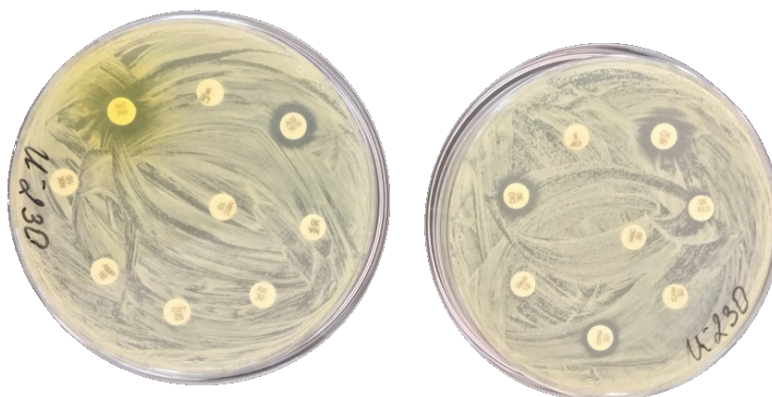
Множествена резистентност (MDR) се отчита при наличието на устойчивост към поне един антибиотичен агент от поне три различни антибиотични класа (Magiorakos et al., 2011). Сред изследваните от нас бактериални щамове са установени 62 (28%) уринарни и 29 (32%) генитални изолати с MDR фенотип, като най-голям брой са представители на вида *Escherichia coli* (Таблица 11).

Таблица 11. Видово разпределение на щамове с MDR и XDR фенотип

Вид	Брой щамове, устойчиви към <i>n</i> антибиотични класове					Общо (n/% от 313)
	MDR			XDR		
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 7	
<i>Escherichia coli</i>	25	19	17	7	3	71 / 23%
<i>Klebsiella spp.</i>	12	3	3	4	1	23 / 7%
<i>Proteus mirabilis</i>	3	1	0	4	1	9 / 3%
Други <i>Enterobacteriales</i>	4	3	1	0	0	8 / 2.6%
Общо (n/% от 313)	44 / 14%	26 / 8%	21 / 7%	15 / 5%	5 / 2%	111 / 35%

Най-често срещаната комбинация на едновременно проявена устойчивост е към пеницилини, тетрациклини и флуорохинолони – общо 60 щамове (54%), последвана от комбинация на устойчивост срещу пеницилини, тетрациклини и триметоприм/сулфаметоксазол, наблюдавана при 43 изолата (39%). Kahlmeter и Poulsen (2012) считат, че най-вероятно има такъв пул на MDR *E. coli* в обществото, но за да се докаже това е необходимо да се изследват различни генетични мобилни елементи и детерминанти.

Екстремно устойчивите щамове (extensively drug-resistant [XDR]) са изолати, които са устойчиви към поне 1 или повече агенти от различни класове, но чувствителни към поне 2 или по-малко (Magiorakos et al., 2012). XDR фенотип бе доказан при 10 изолата *E. coli*, пет щамове *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* и пет щамове *Proteus mirabilis*, съответно резистентни към 6 и 7 класа антибиотични агенти (общо 7% от всички изолати от разред *Enterobacteriales*). Сред изследваните изолати е установен щам *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* U-230, изолиран от урина на 8-месечно момченце (Фиг. 20), който се оказва резистентен към всички тествани антибиотици от различните класове.

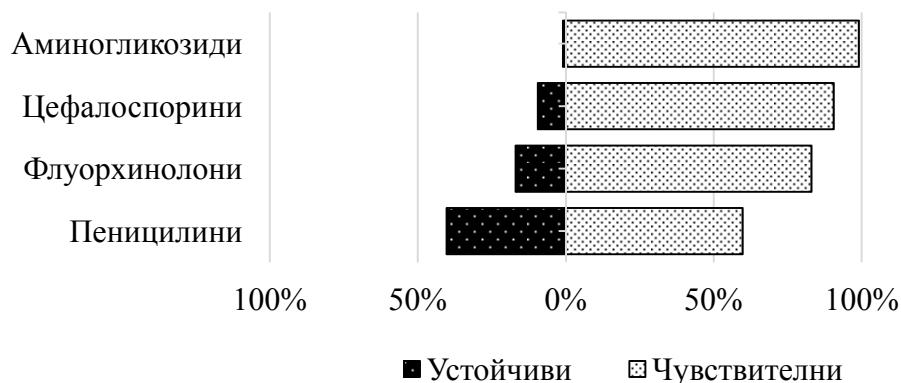


Фиг. 20. Антибиограми на *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* U-230, изолиран от урина на 8-месечно бебе (момче)

За потвърждаване на нашите данни щам *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* U-230 е изследван в Националната референтна лаборатория „Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност“ към НЦЗПБ – София. Резултатите показаха, че

изолатът е чувствителен единствено към карбапенеми (имипенем и меропенем). Въпреки чувствителността към този клас антибиотици щамът *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* U-230 е с доказана XDR резистентност към 7 класа антибиотични препарати, което го прави особено опасен и труден за лечение уропатоген като се има в предвид и възрастта на пациента.

Кръстосана резистентност се отчита, когато е на лице устойчивост към два или повече антибиотични агента в рамките на един и същи клас, което се дължи на общ генетичен механизъм на резистентност. В настоящата работа се наблюдава кръстоса устойчивост към пеницилини (40%), флуорохинолони (17%), цефалоспорини (10%) и аминогликозиди (<1%) (Фиг. 21).



Фиг. 21. Отчетена кръстосана резистентност на урогенитални изолати от разред *Enterobacteriales* към четири класа антибиотици

14.2. Други Грам-отрицателни щамове

Щамовете от видовете *Pseudomonas aeruginosa* (2 щама) и *Burkholderia cepacia* (2 щама) са напълно чувствителни към тестваните за тези микроорганизми съответни антибиотични препарати. Това са цефепим (CPM), амикацин (AK), гентамицин (GEN), ципрофлоксацин (CIP), левофлоксацин (LE).

14.3. *Enterococcus faecalis*

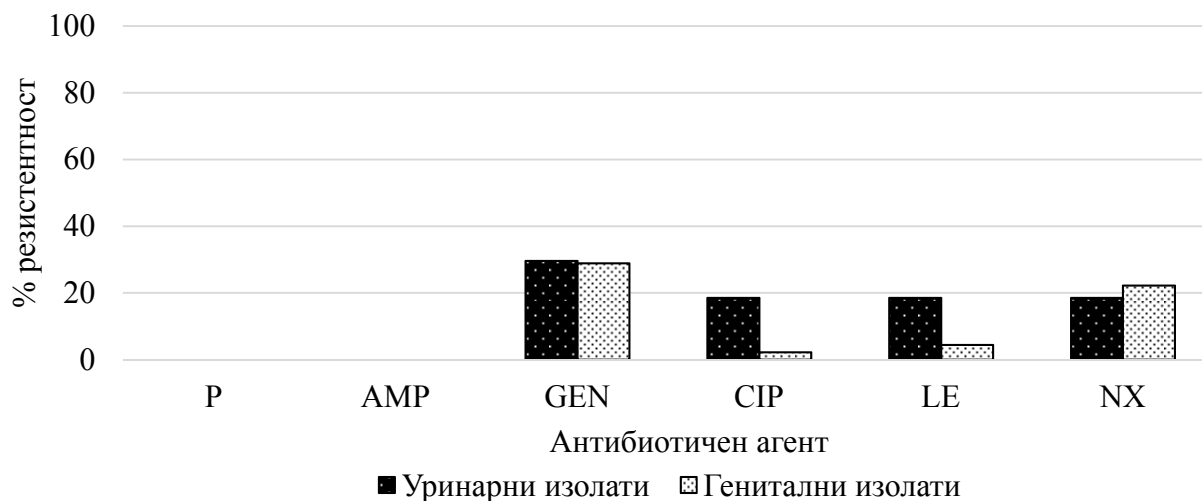
Сред изследваните от нас щамове, изолирани от проби на амбулаторни пациенти с инфекции на урогениталния тракт, втори след разред *Enterobacteriales* най-често изолирани са бактериални щамове *Enterococcus* spp. Общо 70 изолати са идентифицирани като *Enterococcus faecalis* – 27 от урина и 43 от проби от гениталния тракт.

Резултатите показват 100% чувствителност към пеницилинови препарати (ампицилин и пеницилин). Отчетена е < 30% резистентност към амигликозидния препарат гентамицин (Фиг. 22).

Най-често в практиката се използва комбинация на пеницилин с гентамицин/амикацин, но ако се отчете резистентност към някой от двата препарата, няма да има синергизъм между двата препарата. Резултатите, получени от скрининга за високорезистентни към гентамицин ентерококи на Dadfarma и кол. (2013) корелират с получените резултати с настоящата работа (30% устойчивост).

За изследваните генитални изолати се отчита най-висока устойчивост към норфлоксацин (второ поколение флуорохинолони) – 22%, и сравнително по-ниски стойности за левофлоксацин (трето поколение) и ципрофлоксацин (второ поколение) – съответно 4% и 2% (Фиг. 22).

Едновременна устойчивост към аминогликозиди и флуорохинолони се отчита при 10% от изолатите – 5 от урина, 1 от цервикален секрет и 1 от еякулат.

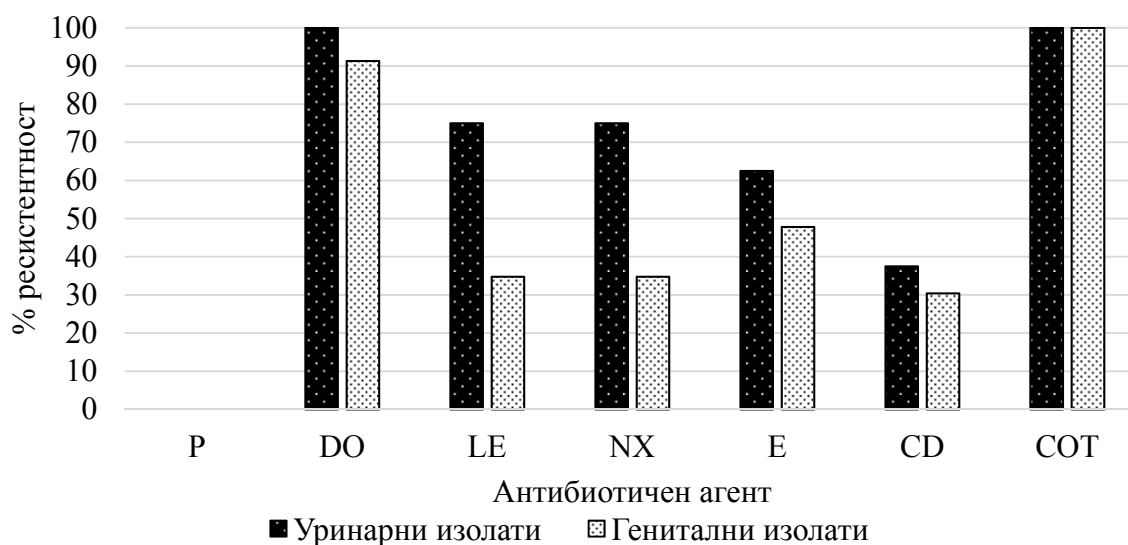


Фиг. 22. Антибиотична резистентност на 70 щаме *Enterococcus faecalis*, асоциирани с инфекции на урогениталния тракт.

P – пеницилин, AMP – ампицилин, GEN – гентамицин, CIP – ципрофлоксацин, LE – левофлоксацин, NX – норфлоксацин.

14.4. *Streptococcus* група В

Установена е 100% чувствителност към пеницилин и съответно към останалите пеницилинови препарати (Фиг. 23). В практиката рядко се изолират пеницилин-резистентни стрептококи като получените положителни резултати трябва да се повторят и потвърдят.



Фиг. 23. Антибиотична резистентност на щамове *Streptococcus* от група В, изолирани от инфекции на урогениталния тракт

P – пеницилин, DO – доксициклин, LE – левофлоксацин, NX – норфлоксацин, E – еритромицин, CD – клиндамицин, COT – триметоприм/сулфаметоксазол

Индубилната клиндамицинова резистентност може да бъде открита чрез антагонизъм на клиндамициновата активност от макролиден агент или така наречената D-зона. Сред тестваните 31 щаме такава зона се наблюдава при шест (19%). Това трябва да се има в предвид при лечение с клиндамицин като дори при отчетена чувствителност след краткосрочно лечение може да се развие конститутивна резистентност (EUCAST, 2017).

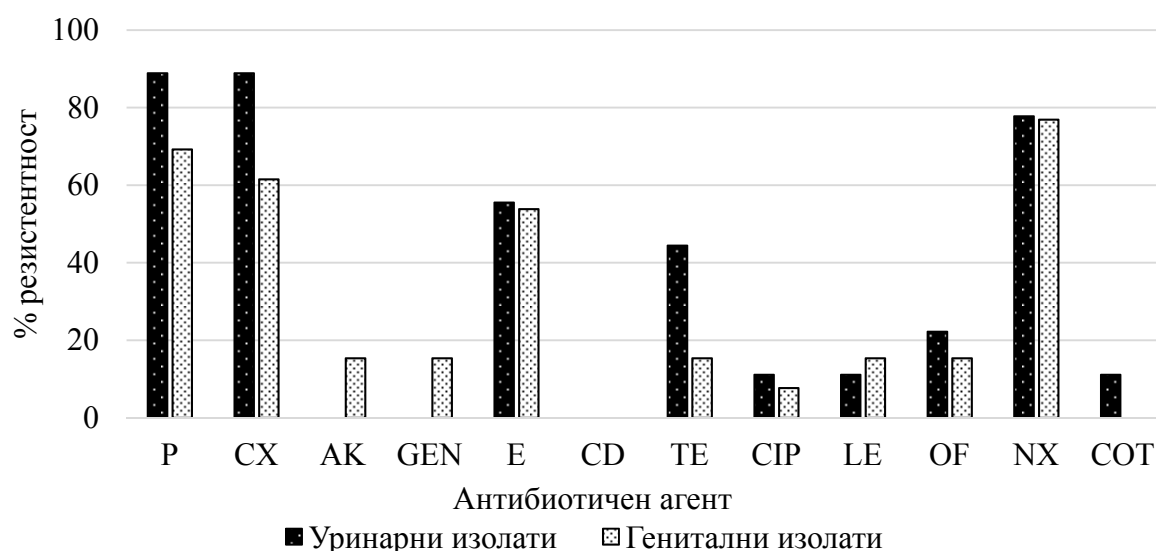
Към клас флуорохинолони се наблюдава завишена резистентност (75% за уринарните и 35% за гениталните изолати). Кръстосана резистентност към флуорохинолони се установи при всички 14 изолата *Streptococcus* група В.

Отчита се изключително висока резистентност към тетрациклини (над 90%) и към химиотерапевтика триметоприм/сулфаметоксазол – 100%. Абсолютната нечувствителност към триметоприм/сулфаметоксазол е напълно очаквана, като двата препарата заедно с пеницилин се използват за доказване на група В стрептококи в клиничната практика.

MDR фенотип проявиха 48% от изследваните стрептококи като най-често срещаната комбинация на устойчивост е към препарати от класовете тетрациклини, флуорохинолони и макролиди, открита при 10 изолата (32%).

14.5. *Staphylococcus* spp.

Повечето стафилококи продуцират пеницилази и са резистентни към пеницилина, като диск-дифузионният метод е по-добър от минималната потискаща концентрация (МПК) за установяването на пеницилаза (EUCAST, 2017). При 89% от уринарните и 69% от гениталните изолати се доказва продукцията на този ензим (Фиг. 24).



Фиг. 24. Антибиотична резистентност на *Staphylococcus* spp., изолирани от инфекции на урогениталния тракт

P – пеницилин, CX – цефокситин, AK – амикацин, GEN – гентамицин, E – еритромицин, CD – клиндамицин, TE – тетрацилин, CIP – ципрофлоксацин, LE – левофлоксацин, OF – офлоксацин, NX – норфлоксацин, COT – триметоприм/сулфаметоксазол

Висока резистентност е отчетена към макролидни препарати – над 50% към еритромицин, докато към клиндамицин е установена 100% чувствителност. Щамовете, които са еритромицин-резистентни и клиндамицин-чувствителни, могат да развият резистентност към линкозамидния препарат. При четири щамове от род *Staphylococcus* се установява такъв тип резистентност и употребата на клиндамицин не би била препоръчителна при лечението на инфекции, причинени от тези изолати – 3 щамове от урина и 1 щам, изолиран от гениталния тракт на жена.

За аминогликозидните препарати се доказва една от най-ниските отчетени стойности на резистентност на тестваните изолати (15%) като всички устойчиви щамове са изолирани от гениталния тракт.

Норфлоксацинът е неефективен при 70% от всички изолати. Доказана е по-висока чувствителност към ципрофлоксацин и левофлоксацин като устойчиви са само 9% и 13% от изследваните щамове съответно. Кръстосана резистентност се наблюдава

само при 3 от щамовете. Спрямо сулфаметоксазол/триметоприм е отчетена най-висока чувствителност – 100% за гениталните *Staphylococcus* изолати и 11% за уринарните.

14.6. *Candida* spp.

Антифунгална чувствителност е определена за всичките 97 изолата от род *Candida* – 96 от женска и 1 от мъжка репродуктивна система. Всички изолати *C. albicans*, с изключение на един, показаха чувствителност към амфотерицин В, флуконазол и вориконазол. Само един щам *C. albicans* е чувствителен спрямо дозата (S-DD) за итраконазол. S-DD чувствителност към итраконазол се установи при 7 изолата (57%), а към вориконазол – при 2 изолата (29%) от вида *C. glabrata*. Към амфотерицин В и флуконазол устойчивост се отчете само при съответно 3 и 4 изолата *C. glabrata*. Нито един от изолатите от видовете *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* и *Candida tropicalis* не показва пълна устойчивост към тестваните противогъбични препарата (Таблица 12).

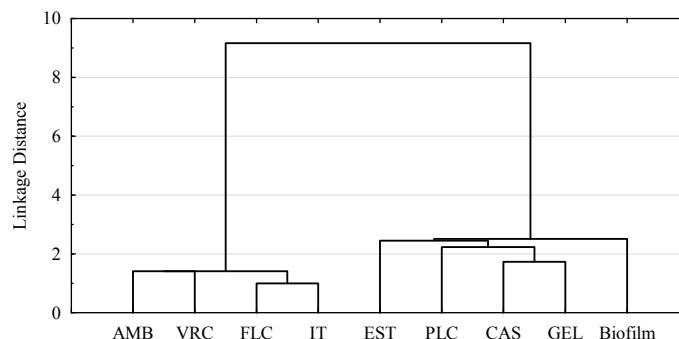
Таблица 12. Антифунгална устойчивост на щамове *Candida* spp.

Видове	Itraconazole (n/%)		Voriconazole (n/%)		Fluconazole (n/%)		Amphotericin B (n/%)	
	S-DD*	R	S-DD	R	S-DD	R	S-DD	R
<i>C. albicans</i>	1 / 1%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%
<i>C. glabrata</i>	4 / 57%	0 / 0%	2 / 29%	0 / 0%	0 / 0%	4 / 57%	1 / 14%	3 / 43%
<i>C. krusei</i>	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%
<i>C. parapsilosis</i>	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%
<i>C. tropicalis</i>	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%
Общо	5 / 5%	0 / 0%	2 / 2%	0 / 0%	0 / 0%	4 / 4%	1 / 1%	3 / 3%

* S-DD – чувствителен спрямо дозата

В настоящата работа се отчита положителна корелация между устойчивостта към азолните препарати и амфотерицин В (57%). Ellis (2002) също доказват подобна връзка, като отчетената резистентност към азолните препарати предполага и висока МПК на амфотерицин В.

Клъстерният анализ генерира два отделни клъстера с голяма дистанция, които показват, че чувствителността към противогъбични препарати няма отношение към експресирани вирулентни фактори. Също така анализът показва, че биофилм формирането е по-близко свързано със способността на щамовете да продуцират различни хидролитични ензими, отколкото с антифунгалната чувствителност (Фиг. 25).



Фиг. 25. Клъстерен анализ между антифунгална чувствителност и различните експресирани вирулентни характеристики

AMB – амфотерицин В, VRC – вориконазол, FLC – флуконазол, IT – итраконазол, EST – естераза, PLC – фосфолипаза С, CAS – казеиназа, GEL – желатиназа

Заклучение

Инфекциите на урогениталния тракт засягат най-често жени, като в най-висок риск са жените в репродуктивна възраст. Възрастните и малките деца са сред най-засегнатите амбулаторни пациенти от инфекции на уринарния тракт. При мъжете инфекциите на уринарния тракт са сравнително по-рядко срещани, като най-често това са пациенти над 60-годишна възраст.

Най-често изолираните етиологични агенти при инфекции на уринарния тракт са на първо място *E. coli* (68%), следвани от *Klebsiella* spp. и *Proteus mirabilis* от разред *Enterobacteriales*. Кандидозите са най-често срещаните инфекции на репродуктивната система, следвани от бактериални вагинози, причинени от представители на разред *Enterobacteriales* и *Enterococcus faecalis*.

Образуването на биофилм е от важно значение за патогенните микроорганизми, поради неблагоприятни условия, които предлага урогениталния тракт. Формиране на биофилм *in vitro* е доказано при щамове *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterococcus faecalis* и *Candida* spp. Фенотипно е доказана висока устойчивост към системата на комплемента *in vitro* при редица урогенитални изолати, както и продукцията на различни протеолитични, липолитични ензими и адхезини, което доказва участието на тези вирулентни детерминанти в успешния инфекциозен процес. Присъствието на генетични детерминанти, като гени за синтез на адхезини, капсулни полизахариди, сидерофори в генома на биофилм-формиращите щамове от разред *Enterobacteriales* им дава преимущество пред коменсалните видове в колонизацията на гостоприемника.

Съществена част от решаването на проблема с урогениталните инфекции е правилната диагностика и оценка на антимикробната активност на лекарствени препарати. Лекарства на пръв избор за лечение на инфекции на уринарния тракт, като ципрофлоксацина и други флуорохинолони, поради високата отчетена резистентност са вече неефективни. Антибиотични препарати, като нитрофурантоин и фосфомицин не се натрупват в достатъчно високи нива в бъбречната тъкан. Получените от нас данни показват сериозно стеснение на спектъра на възможните перорални препарати и повишен риск за хоспитализация и лечение с парентерални антибиотични средства.

Изводи

На основа на проведените изследвания могат да бъдат направени следните изводи:

1. При инфекции на уринарния тракт (ИУТ) най-рискови възрастови групи са децата под 5 години и възрастните над 50-годишна възраст. Най-засегнати от инфекции на гениталния тракт са предимно жените в репродуктивна възраст.
2. Ясно изразена сезонна динамика се наблюдава при ИУТ, но не и при инфекции на гениталния тракт, като относителния брой положителни проби се запазва през цялата година.
3. Най-чести етиологични агенти на ИУТ при амбулаторни пациенти са представители на разред *Enterobacteriales*, с доминиращ вид *E. coli*. Следващи по честота са *Enterococcus faecalis* и минорно представени *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*.
4. Преобладаващи етиологични агенти при амбулаторни пациенти с инфекции на гениталния тракт са *Candida albicans*, като доминиращи при бактериални вагинози са представители на разред *Enterobacteriales* и *Enterococcus faecalis*.
5. Отчетената устойчивост спрямо действието на комплемента при 80% от Грам-отрицателните изолати определя изследването на този вирулентен фактор като актуално направление за профилактични и терапевтични разработки.

6. Доказаната при голям процент от щамовете *E. faecalis* положителна хидролазна активност свидетелства за значението ѝ като вирулентен фактор при колонизацията на урогениталния тракт.
7. Способност да образуват биофилм като вирулентен фактор е установена най-често при щамове *Klebsiella* spp. (> 50%), независимо от относително по-ниската честота на изолиране при инфекции в урогениталния тракт.
8. Най-често при биофилм-формиращите щамове от разред *Enterobacteriales* се установяват гени за вирулентни детерминанти, свързани със адхезията (фимбри и адхезини), сидерофори, както и гени, свързани със активното изпомпване на антибиотични препарати извън клетката.
9. Доказано е значимо присъствие на нетипичен за екстраинтестинални човешки изолати *E. coli* ген *iss*, осигуряващ серумна устойчивост, при изследваните биофилм-формиращи щамове *E. coli*.
10. Отчетена е увеличена антибиотична устойчивост към клас флуорохинолони при всички бактериални щамове и висока устойчивост към нитрофурантоин при тестваните щамове от разред *Enterobacteriales*. Най-често множествена резистентност е отчетена към пеницилини, тетрациклини и флуорохинолони или триметоприм/сулфаметоксазол.
11. Сред изследваните изолати *Enterobacteriales* 29% проявяват MDR, а 6% – XDR фенотип. Изолиран е изключително устойчив щам *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* U-230, чувствителен единствено към карбапенеми.
12. Установено е, че гъбичните изолати се отличават с изразена лекарствена чувствителност въпреки честотата си на срещане сред амбулаторните пациенти.

Научни приноси

Научни приноси с оригинален характер:

1. Доказано е значимо присъствие на MDR и XDR изолати, циркулиращи сред амбулаторни пациенти на територията на град Пловдив.
2. Доказано е, че резултатите от диск-дифузионния тест за антибиотична чувствителност при щамове, формиращи биофилм, могат да доведат до компрометиран терапевтичен избор.
3. Доказано е увеличено присъствие сред изследваните урогенитални изолати на генетични детерминанти, характерни за патогенни *Escherichia coli* при птици.
4. Доказано е отсъствие на корелационна връзка между изследваните вирулентни детерминанти и лекарствената устойчивост, което категорично определя необходимост от персонални терапевтични подходи.
5. Адаптиран е удобен и евтин culture-and-spot тест за изследване на устойчивостта на бактериални щамове към бактерицидното действие на нормален серум, подходящ за профилактични и терапевтични разработки.

Научни приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдена е демографска разлика в етиологичната структура на инфекции на гениталния тракт, което налага терапевтичните политики да се актуализират на регионално ниво.
2. Потвърдена е доминиращата роля на *Escherichia coli* като етиологичен агент в инфекциите на урогениталния тракт при амбулаторни пациенти.
3. Потвърдена е необходимостта от ограничаване емпиричното приложение на ципрофлоксацин, което следва да утвърди назначаването му само след провеждане на тест за антимикробна чувствителност.

Използвана литература в автореферата

1. Foxman B. 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.*, 113(Suppl 1A): 5S–13S.
2. Sobel J. D., Subramanian C., Foxman B., Fairfa, M., Gygax S.E. 2013. Mixed Vaginitis – More Than Coinfection and With Therapeutic Implications. *Emerging Infect. Dis.*, 15(2): 104–108.
3. Verduin C., Hol C., Dijke E., Faber J., Jansze M., Verhoef J., Van Dijk H. 1995. Assessment of complement-mediated killing of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* isolated by a simple method. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 2(3): 365–368.
4. Römling U., Gomelsky M., Galperin M.Y. 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system, *Mol Microbiol.*, 57: 629–639.
5. Schembri M. A., Sokurenko E. V., Klemm P. 2000. Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. *Infect Immun.*, 68(5): 2638–2646.
6. Soto S. M., Smithson A., Horcajada J. P., Martinez J.A., Mensa J. P., Vila J. 2006. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Infect.*, 12(10): 1034–1036.
7. Johnson J., Stell A. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.*, 181: 261–272.
8. Omoregie R., Egbe C. A., Igbarumah I. O., Ogefere H., Okorie E. 2010. Prevalence and etiologic agents of female reproductive tract infection among in-patients and out-patients of a tertiary hospital in Benin city, Nigeria. *N Am J Med Sci.*, 2(10): 473–477.
9. Mulu W., Yimer M., Zenebe Y., Abera B. 2015. Common causes of vaginal infections and antibiotic susceptibility of aerobic bacterial isolates in women of reproductive age attending at Felegehiwot Referral Hospital, Ethiopia: a cross sectional study. *BMC Womens Health*, 15: 42.
10. Kahlmeter G. 2000. The ECO.SENS Project: A prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens – interim report. *J. Antimicrob. Chemother.*, 46(A): 15-22.
11. Goel V., Kumar D., Kumar R., Mathur P., Singh S. 2016. Community Acquired Enterococcal Urinary Tract Infections and Antibiotic Resistance Profile in North India. *J Lab Physicians.*, 8(1): 50–54.
12. Sanchez G.V., Babiker A., Master R.N., Luu T., Mathur A., Bordon J. 2016. Antibiotic Resistance among Urinary Isolates from Female Outpatients in the United States in 2003 and 2012. *Antimicrob Agents Chemother.*, 60(5): 2680–2683.
13. George C. E., Norman G., Ramana G.V., Mukherjee D., Rao T. 2015. Treatment of uncomplicated symptomatic urinary tract infections: Resistance patterns and misuse of antibiotics. *J Family Med Prim Care*, 4(3): 416–421. doi:10.4103/2249-4863.161342.
14. Tindall B. J., Sutton G., Garrity G. M. 2017. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 67(2): 502–504.
15. Deslouches B., Islam K., Craig J. K., Paranjape S. M., Montelaro R. C., Mietzner T. A. 2005. Activity of the De Novo Engineered Antimicrobial Peptide WLBU2 against *Pseudomonas aeruginosa* in Human Serum and Whole Blood: Implications for Systemic Applications. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(8): 3208-3216.

16. Karam M. R. A., Habibi M., Bouzari S. 2018. Relationships between Virulence Factors and Antimicrobial Resistance among *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections and Commensal Isolates in Tehran, Iran. *Osong Public Health Res Perspect.*, 9(5): 217–224.
17. Shridhar S., Dhanashree B. 2019. Antibiotic Susceptibility Pattern and Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Enterococcus* spp., *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2019: 7854968.
18. Benzaid Ch., Belmadani A., Djeribi R., Rouabhia M. 2019. The Effects of Mentha piperita Essential Oil on *C. albicans* Growth, Transition, Biofilm Formation, and the Expression of Secreted Aspartyl Proteinases Genes,“ *Antibiotics*, 8(1): 10.
19. Zogaj X., Bokranz W., Nimtz M., Römling U. 2003. Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family *Enterobacteriaceae* Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. *Infect Immun.*, 71(7): 4151-4158.
20. Johnson T. J., Wannemuehler Y.M., Nolan L.K. 2008. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*, 74(8): 2360–2369.
21. Aslam M., Toufeer M., Narvaez Bravo C., Lai V., Rempel H., Manges A., Diarra MS. 2014. Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol.*, 177:49–56.
22. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, et al. 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog.*;11:10.
23. Rippere-Lampe K., O'Brien A., Conran R., Lockman H. 2001. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf(1)*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 69(6): 3954–3964.
24. Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hinndler J.F. et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18: 268–281.
25. Kahlmeter G., Poulsen H.O. 2012. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO·SENS study revisited. *Int. J. Antimicrob. Agen.*, 39: 45-51.
26. Dadfarma N., Fooladi A. A. I., Oskoui M., Hosseini H. M. 2013. High level of gentamicin resistance (HLGR) among *Enterococcus* strains isolated from clinical specimens, *J Infect Public Heal.*, 6(3): 202–208.
27. Ellis D. 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.*, 49 (S1): 7–10.

Публикации във връзка с дисертацията

1. **Tsankova M.**, S. Kostadinova, I. Iliev, M. Marhova. 2018. Antibiotic and Serum Resistance of *Enterobacteriaceae* Strains Isolated from Outpatients with Infections of Urogenital Tract. *J. BioSci. Biotechnol*, vol. 7, issue 2/3, 109 – 116.
2. **Tsankova M.**, M. Marhova, S. Kostadinova, I. Iliev. 2019. Antimicrobial susceptibility and biofilm-forming ability of *Enterococcus faecalis* strains isolated from the urogenital tract of outpatients, *J. BioSci. Biotechnol*, vol. 8, issue 2, in press.

Участия в национални научни форуми

1. Участие с постер в **ПЪРВА НАЦИОНАЛНА ДОКТОРАНТСКА КОНФЕРЕНЦИЯ ПО БИОЛОГИЯ**, 1 Ноември 2016, Пловдив, България. **Tsankova M.**, Kostadinova S., Iliev I., Marhova M. 2016. Antibiotic resistance and serum resistance of bacterial strains isolated from outpatients with infections of urogenital tract. *Book of Abstracts*, p. 88.
2. Участие с постер в **IV BALCAN SCIENTIFIC CONFERENCE ON BIOLOGY (BalkanBio)** – 1 – 3.11.2017 г. **Tsankova M.**, Iliev I., Kostadinova S., Marhova M. 2017. Antimicrobial Susceptibility, Serum Resistance and Biofilm Forming Capabilities of *Klebsiella* Isolates from Urogenital Tract of Outpatients. *Book of Abstracts*, p. 196.
3. Участие с постер в **МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ КЛИМЕНТОВИ ДНИ 2018** – 8 – 9 ноември, София, България. **Tsankova M.**, I. Iliev, S. Kostadinova, M. Marhova. 2018. Multiplex PCR based detection of virulence genes among biofilm-forming *Klebsiella* spp. isolated from outpatients with urogenital infections. *Book of Abstracts*, p. 144.
4. Участие с постер в **XVII НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС ПО КЛИНИЧНА МИКРОБИОЛОГИЯ И ИНФЕКЦИИ НА БАМ** – 9 – 11.05.2019 г. **Tsankova M.**, I. Iliev, S. Kostadinova, L. Ilieva, M. Marhova. 2019. Increasing antibiotic resistance among urogenital isolates from outpatients.

Genetic determinants and ecological factors in the virulence of pathogens associated with urogenital infections

Marinela Tsankova

Urogenital tract infections (UTIs) are one of the most common among outpatients worldwide, with women being thought to be more prone to developing UTIs than men. The excessive and unregulated use of antimicrobial agents has led to increasing resistance and the emergence of multidrug-resistant strains (MDRs) worldwide.

The present work aimed to determine the main genetic determinants and ecological factors in the virulence of pathogenic isolates of outpatients with UTIs. The total of 546 strains were collected from positive samples of the outpatients with urogenital infections from April 2016 to March 2017 at IMDL „Chronolab-Plovdiv“. There was a pronounced seasonal variation in the urinal tract infections, while genital infections were established evenly through the study. The children up to five years and adults over 50 years old were at most risk for urinary infections. *Escherichia coli* was the most common etiological agent causing urinary tract infections, while primarily yeasts infected the genital tract.

Resistance against bactericidal activity of normal human serum *in vitro* for 80% of the Gram-negative isolates was reported. The positive hydrolase activity demonstrated in a large percentage of *E. faecalis* strains testifies to its importance as a virulence factor in the colonization of the urogenital tract. Biofilm-formation was typical for the majority of the *Klebsiella* (58%), *Enterococcus faecalis* (25%), *E. coli* (10%) and *Candida* strains (6%). Genetic determinants for adhesion (fimbriae and adhesins), siderophores, as well as genes related to the active excretion of antimicrobial agents outside the cell were found amongst biofilm-forming strains of the order *Enterobacteriales*. The presence of non typical *iss* gene associated with serum resistance has been demonstrated in biofilm forming strains *E. coli*

The analysis of the antibiotic susceptibility revealed an increased resistance to fluoroquinolones among all studied strains and high resistance to nitrofurantoin in these of order *Enterobacteriales*. The MDR phenotype was detected at 29% and the XDR at 6% of the tested *Enterobacteriales* strains. A XDR strain *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* U-230 was isolated sensitive to carbapenems only. Most frequently multidrug resistance was established to penicillins, tetracyclines and fluoroquinolones or trimethoprim/sulfamethoxazole. The study proved significant presence of MDR and XDR isolates, circulating among outpatients on the territory of the city of Plovdiv. Fungal isolates have been found to exhibit a marked drug sensitivity, despite the frequency of isolation from outpatient's samples.