



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ”

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



ЛЕНА РУМЕНОВА ИЛИЕВА

ЛЕКАРСТВЕНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И ФАКТОРИ НА
КОЛОНИЗАЦИЯ И ИНВАЗИВНОСТ ПРИ
НАЗОФАРИНГЕАЛНИ ИЗОЛАТИ *STAPHYLOCOCCUS SPP.*

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

Област на ВО: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3 Биологически науки

Докторска програма: Микробиология

Научен ръководител:

проф. д-р Соня Костадинова Трифонова

Пловдив, 2026

Дисертационният труд е разработен в катедра „Биохимия и микробиология“ при Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд съдържа 207 страници, 33 фигури, 10 таблици и 8 приложения. Библиографската справка включва 377 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на катедра „Биохимия и микробиология“ при Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, проведено на 07.05.2026 г., с Протокол № 217/ 07.05.2026 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на от ч. в пред научно жури, назначено със Заповед №/..... на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Материалите по защитата са на разположение в катедра „Биохимия и микробиология“ при Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и са публикувани на интернет страницата на университета.

Научно жури:

Вътрешни членове:

1. проф. д-р Велизар Костадинов Гочев
2. проф. д-р Илия Николов Илиев

Външни членове:

1. проф. д.б.н. Искра Витанова Иванова
2. проф. д.б.н. Мария Богомилова Дянкова
3. проф. д-р Пенка Ангелова Мончева

ВЪВЕДЕНИЕ

Инфекциите на горните дихателни пътища са сред най-честите причини за микробиологично изследване и антибиотично лечение в доболничната практика. Сред изолираните микроорганизми представителите на род *Staphylococcus* заемат особено място. Те могат да бъдат част от нормалната микробиота, но същевременно включват видове с изразен опортюнистичен и патогенен потенциал. Най-голямо значение има *Staphylococcus aureus*, който съчетава способност за безсимптомна колонизация на носната кухина и назофаринкса с потенциал за развитие на локални, рецидивиращи и инвазивни инфекции.

Клиничното значение на вида се определя от съчетанието между лекарствена устойчивост, способност за персистиране върху лигавични повърхности и наличие на фактори, подпомагащи колонизацията и инвазивното поведение. Особено значение има антимикробната резистентност, тъй като разпространението на метицилин-резистентни и множествено резистентни щамове ограничава възможностите за ефективна терапия и повишава риска от неуспешно повлияване на инфекциозния процес.

Наред с лекарствената устойчивост, съществена роля имат механизмите, които позволяват на *S. aureus* да се прикрепя към епителните повърхности, да избягва локалния имунен отговор и да формира биофилм. Това подпомага продължителното задържане на бактериалните клетки, намалява достъпа на антимикробни средства и създава предпоставки за хронифициране и рецидивиране. Поради това оценката на назофарингеалните изолати следва да обхваща не само профила на антибиотична чувствителност, но и факторите, свързани с колонизацията, инвазивността и биофилмообразуването.

Ограничените възможности за контрол на устойчиви и биофилм-формиращи стафилококови популации обуславят интереса към допълващи биологични подходи. В този контекст млечнокиселите бактерии и техните безклетъчни метаболитни продукти представляват перспективен източник на вещества с потенциално антистафилококово действие. Тяхната оценка е особено уместна, когато е насочена не само към потискане на планктонния растеж, но и към ограничаване на способността на *S. aureus* да формира биофилм. Въз основа на тези предпоставки настоящият дисертационен труд е насочен към изследване на лекарствената чувствителност и факторите на колонизация и инвазивност при назофарингеални изолати *Staphylococcus* spp., с акцент върху *S. aureus*, както и към оценка на възможностите за повлияване на растежа и биофилмообразуването чрез биологично активни продукти на млечнокисели бактерии.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се оцени ролята и значимостта на *Staphylococcus aureus* в етиологичната структура на симптоматичните инфекции на горните дихателни пътища и да се характеризира неговия патобиологичен потенциал във връзка с възможностите за ограничаване на развитието му.

За изпълнение на целта са поставени следните задачи:

1. Да се анализира участието на род *Staphylococcus* в етиологичната структура на симптоматичните инфекции на горните дихателни пътища при пациенти от гр. Пловдив.
2. Да се определи профилът на антибиотична чувствителност и основните модели на устойчивост на клинични изолати *Staphylococcus aureus*.
3. Да се извърши генетична характеристика на вирулентния потенциал на клинични изолати на *Staphylococcus aureus*.
4. Да се оцени биофилм-образуващият капацитет на клинични изолати на *Staphylococcus aureus* в подходящи *in vitro* модели.
5. Да се изследват *in vitro* възможностите за ограничаване на развитието на *Staphylococcus aureus* и инхибиране на биофилм-образуването чрез биологично активни вещества с потенциал за приложение като антистафилококови агенти.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. Материали

1. Място и период на провеждане на изследването. Изследването е проведено в СМДЛ „Синево-България“ ЕООД, гр. Пловдив, през периода 2016–2020 г. Клиничните изолати, включени в дисертационния труд, са предоставени за научна работа въз основа на споразумение за сътрудничество със СМДЛ „Синево-България“ ЕООД.

2. Клиничен материал. В изследването са включени общо 8267 назални и гърлени проби, постъпили за рутинно микробиологично изследване. Пробовземането, съхранението и транспортирането на клиничния материал са извършвани в съответствие с Указание за вземане, съхранение и транспорт на материали за клинични микробиологични изследвания и Наредба № 4 от 25 януари 2010 г. за утвърждаване на медицински стандарт „Микробиология“.

3. Колекция от щамове

3.1. Род *Staphylococcus*. Щамовете, идентифицирани като представители на род *Staphylococcus*, са заведени в колекция към катедра „Биохимия и микробиология“ при Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. За дългосрочно съхранение щамовете са суспендирани в 10% обезмаслено мляко и съхранявани при -80°C. Преди експериментална работа са възстановявани върху соево-казеинова среда.

3.2. Млечнокисели бактерии (МКБ). В изследването са включени щамове МКБ, изолирани от ферментирали храни и млечнокисели продукти. След първичен скрининг за антистафилококова активност са селектирани три щамове за последващ анализ: *Lactiplantibacillus plantarum* IZITR_24, *Lactiplantibacillus paraplantarum* IZITR_13 и *Levilactobacillus brevis* DPL5.

II. Методи

1. Анализ на етиологичната структура. Етиологичната структура на назалните и гърлените изолати е анализирана въз основа на резултатите от рутинната микробиологична диагностика за периода 2016-2020 г. За целите на автореферата са представени обобщените данни за основните бактериални видове, с акцент върху мястото на *Staphylococcus aureus* сред изолатите от горните дихателни пътища.

2. Определяне на антибиотична чувствителност. Антибиотичната чувствителност е определена при 450 назофарингеални изолата *S. aureus* чрез диск-дифузионен метод върху Mueller–Hinton агар. Интерпретацията е извършена съгласно критериите на EUCAST (2019). Анализирана е устойчивостта към 17 антимикробни агента, представящи основни терапевтични класове. Изчислен е MAR индексът според броя антимикробни класове, към които е установена устойчивост.

3. Цялостно геномно секвениране и *in silico* анализ. За цялостно геномно секвениране са подбрани десет назофарингеални изолата *S. aureus*, включващи MRSA и MSSA щамове. Библиотеките са изготвени с Ligation Sequencing Kit SQK-RBK114, а секвенирането е извършено на платформа MinION с R10 flow cell. Първичната обработка на данните е проведена с Guppy v6.5.7, адаптерните последователности са отстранени с Porechop v0.2.4, а геномното асемблиране е извършено de novo с Flye v2.9.2. Последователностите са коригирани с Racon v1.4.21 и Medaka v1.8.1, а качеството на асемблирането е оценено с CheckM v1.1.6. Геномните секвенции на изследваните щамове *S. aureus* са депозирани в GenBank към BioProject PRJNA990680. Получените геномни данни са използвани за *in silico* анализ на резистома и вирулома чрез ABRicate, с бази данни CARD и MEGARes DB за антибиотична устойчивост и VFDB за вирулентно-асоциирани гени; допълнителната функционална анотация е извършена чрез RAST, KEGG и BlastKOALA.

4. PCR анализ на вирулентно-асоциирани гени. PCR анализът е проведен при 40 щамове *S. aureus* от получената колекция с цел установяване на честотата на избрани гени, свързани с вирулентния и колонизационния потенциал на вида. Панелът включва 20 таргетни гена, разпределени в основни функционални групи: адхезия и колонизация (*fnbA*, *fnbB*, *clfB*, *cna*, *fib*, *ebps*), биофилмообразуване (*icaA*, *icaB*, *icaD*), повърхностна адаптация и персистиране (*isdA*, *sdrC*, *sdrD*, *tarS*), цитотоксичност (*hla*, *hlgA*, *psmβ1*) и токсигенност (*tsst-1*, *sea*, *seb*, *sec*). Амплификационните продукти са

анализирани чрез агарозна гел електрофореза, а честотата на срещане на всеки таргетен ген е представена като брой и процент положителни изолати.

5. Оценка на биофилмформирация капацитет. Оценката е извършена чрез микротитърен метод с кристалвиолет. Изолатите са култивирани в 96-ямкови микротитърни плаки при различни условия: TSB, TSB с 2% глюкоза и 2% NaCl (TSBGS) и TSBGS с добавена човешка кръвна плазма. Количествената оценка е извършвана чрез измерване на оптичната плътност след оцветяване с кристалвиолет. Класификацията на изолатите като неформиращи, слаби, умерени и силни биофилмообразуващи е извършена съгласно Stepanović et al. (2007).

6. Скрининг на антагонистична активност на млечнокисели бактерии. Антагонистичната активност на щамове млечнокисели бактерии срещу *S. aureus* е оценена чрез дифузионен метод с агарови блокчета. Агарови блокчета с 24-часови култури на МКБ са поставяни върху повърхностен посев на *S. aureus*, след което е отчитан диаметърът на инхибиторните зони. Въз основа на резултатите са селектирани трите щамове, използвани за получаване на безклетъчни супернатанти.

7. Геномна и *in vitro* характеристика на селектираните МКБ. За селектираните щамове МКБ е извършена геномна характеристика, насочена към потвърждаване на видовата принадлежност, оценка на безопасността и установяване на генетичен потенциал за продукция на антимикробни пептиди и други биоактивни съединения. Геномните секвенции на щамовете са депозираны в GenBank към BioProject PRJNA1113526 и PRJNA1075351. *In vitro* оценката на пробиотичния потенциал включва тестове за киселинна толерантност, устойчивост към жлъчни соли, автоагрегация и коагрегация с тестови патогенни микроорганизми.

8. Получаване на лиофилизирана безклетъчна супернатанта (ЛБС). Щамовете МКБ са култивирани в 200 mL MRS бульон за 48 h в анаеробни условия. След култивиране клетките са отделени чрез центрофугиране при 10 000 rpm за 20 min при 4°C. Получената безклетъчна супернатанта е филтрирана през 0,22 µm нитроцелулозна мембрана, замразена при -80°C и лиофилизирана в система Labconco FreeZone 4.5. След лиофилизация пробите са съхранявани при -20°C и преди приложение са рехидратирани с дейонизирана вода до необходимите концентрации.

9. Мастнокиселинен анализ. Мастнокиселинният състав на безклетъчните супернатанти е определен чрез газова хроматография след трансестерификация с 2% H₂SO₄ в CH₃OH при 50°C по Christie (2003). Получените метилови естери са пречистени чрез тънкослойна хроматография върху силикагелни плаки. Газхроматографският анализ е проведен на Thermo Fisher Scientific TRACE 1610 GC с FID-детектор и TR-FAME колона.

10. Определяне на инхибиторни концентрации на ЛБС. Влиянието на ЛБС върху биофилмообразуването и планктонния растеж на *S. aureus* е

изследвано чрез концентрационни серии. Минималната биофилмпотискаща концентрация (МБПК) е определяна чрез микротитърен модел с кристалвиолет. Минималната потискаща концентрация (МПК) е определяна чрез проследяване на планктонния растеж посредством измерване на оптичната плътност (OD_{610}). Минималната бактерицидна концентрация (МБК) е определяна чрез отчитане на липсата на жизнеспособен бактериален растеж след експозиция.

11. Пречистване на белтъчната фракция на МКБ чрез FPLC, и агар-дифузионен тест. Безклетъчните супернатанти са подложени на предварителна тангенциална поточна филтрация с куховлакнест филтър при дебит 100 mL min^{-1} , с цел отстраняване на частици и компоненти с размер над $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. След филтрацията рН на пробите е коригирано от 4,0 до 7,0, а проводимостта е понижена до $6\text{--}7 \text{ mS cm}^{-1}$. Катионообменното FPLC разделяне е проведено върху силен катионообменник Nuvia S чрез градиентно елюиране, като фракциите са събирани в обем 2 mL . Получените фракции са анализирани за белтъчно съдържание и са използвани за последващо определяне на белтъчния профил чрез SDS-PAGE и за оценка на антимикробната активност чрез агар-дифузионен тест срещу *S. aureus*.

12. SDS-PAGE. Пробите са денатурирани, разделени в полиакриламиден гел, оцветени с Coomassie Brilliant Blue G-250 и визуализирани със система ChemiDoc. Антимикробната активност на получените белтъчни фракции спрямо *S. aureus* е оценена чрез агар-дифузионен тест при стандартизирано натоварване от $10 \text{ }\mu\text{g}$ протеин в ямка.

13. Конфокална лазерна сканираща микроскопия. Ефектът на лиофилизираните безклетъчни супернатанти върху жизнеспособността и организацията на биофилма е изследван чрез конфокална лазерна сканираща микроскопия. Като модел е използван щам *S. aureus* 450Г. Биофилмът е формиран върху стерилни боросиликатни покривни стъкла в присъствие на 25% от МБПК на ЛБС. Жизнеспособността на клетките е оценена чрез Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit, а наблюдението е извършено с конфокален лазерен сканиращ микроскоп Nikon Eclipse Ti-U.

14. Сканираща електронна микроскопия. Сканиращата електронна микроскопия е проведена върху биофилм на *S. aureus* 450Г, формиран върху стерилни полистиренови фрагменти в присъствие на 25% от МБПК на ЛБС. След инкубиране биофилмите са промити, фиксирани с глутаралдехид и осмиев тетраоксид, обезводнени в етанолова серия, монтирани върху метални държачи и покрити със злато. Наблюдението е извършено със сканиращ електронен микроскоп Lyra Tescan.

15. Статистическа обработка. Данните са обработени със Statistica v.12 и SPSS Statistics v.26. За определяне на МБПК, МПК и МБК е използван PROBIT анализ. Статистическата значимост е приемана при $\alpha = 0,05$.

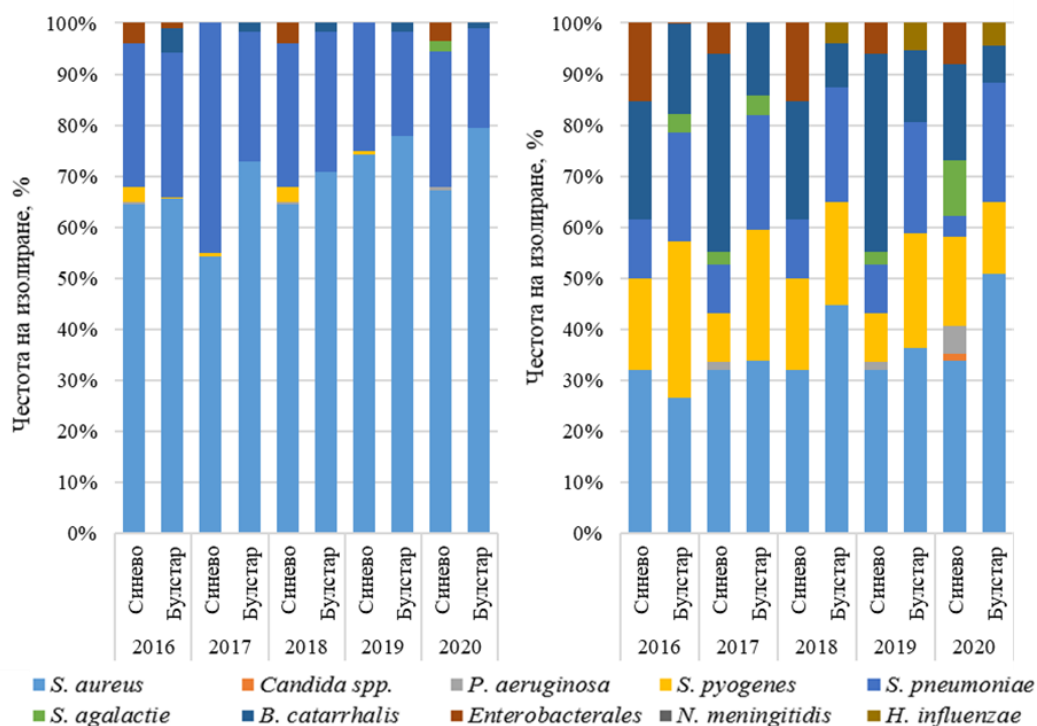
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Етиологична структура на назални и гърлени изолати

С цел определяне на мястото на *Staphylococcus aureus* сред бактериалните причинители от горните дихателни пътища е анализирана етиологичната структура на назалните и гърлените изолати при доболнични пациенти за периода 2016–2020 г. За петгодишния период са регистрирани най-високи абсолютни стойности за *S. aureus* в назалните проби – общо 574 изолата, последван от *Streptococcus pneumoniae* с 256 изолата. В гърлените проби най-често се изолират *Moraxella catarrhalis* – 211 изолата, *S. aureus* – 184 изолата, и *Streptococcus pyogenes* – 89 изолата.

Графичното и процентното разпределение на изолираните микроорганизми показва, че в назалните проби доминираща позиция заема *S. aureus*, докато в орофаринкса се установява по-разнообразен етиологичен спектър, в който *S. aureus* запазва съществено участие заедно с други класически патогени на горните дихателни пътища.

Различното позициониране на *S. aureus* в двете анатомични локализации съответства на утвърденото разбиране, че носната кухина е основен резервоар за носителство на вида, докато орофаринксът представлява по-динамична и полимикробна ниша. В този смисъл установеното високо участие на *S. aureus*, особено сред назалните изолати, обосновава последващото фокусиране върху лекарствената чувствителност, резистентния профил, факторите на колонизация и инвазивност и биофилмообразуващия капацитет на този вид.



Фигура 1: Сравнение на етиологична структура установена от СМДЛ „Синево-България“ ЕООД, гр. Пловдив и данните получени по BulSTAR в периода 2016-2020 г.: а) назални изолати; б) гърлени изолати

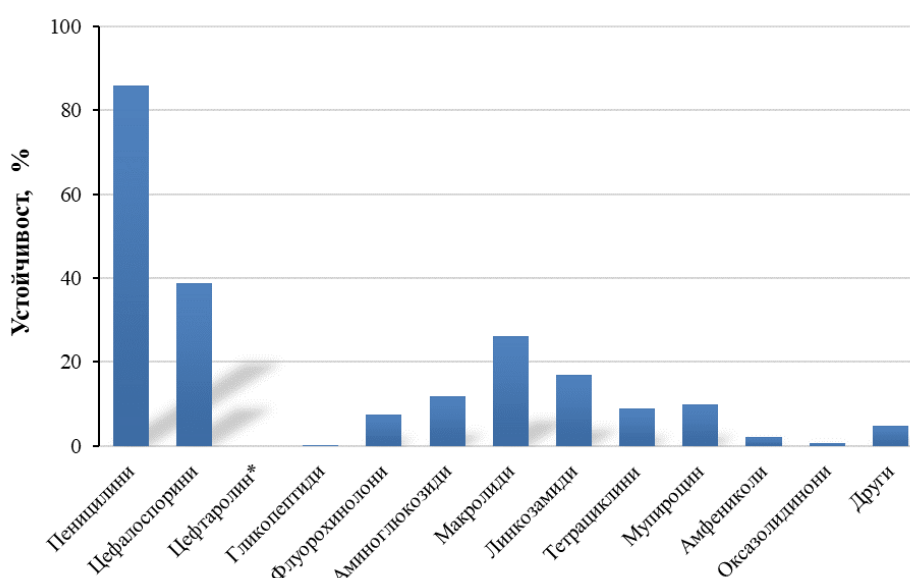
Антибиотичната устойчивост при *S. aureus* има пряко клинично значение, тъй като терапевтичният избор в амбулаторната практика често се основава на емпиричен подход, а резистентността при този вид показва съществени регионални и времеви вариации. Поради това локалното проследяване на фенотипния профил на чувствителност е необходимо както за оценка на актуалната резистентна ситуация, така и за преценка на надеждността на често прилаганите терапевтични режими.

2. Антибиотична устойчивост на назофарингеални изолати *Staphylococcus aureus*

Антибиотичната устойчивост при *Staphylococcus aureus* има пряко клинично значение, тъй като терапевтичният избор в амбулаторната практика често се основава на емпиричен подход, а резистентността при този вид показва съществени регионални и времеви вариации. Поради това изследването на фенотипния и генотипния профил на устойчивост при доболнични назофарингеални изолати е необходимо за оценка на локалната резистентна ситуация и за по-точна интерпретация на терапевтичния риск.

2.1. *In vitro* анализ на антибиотичната устойчивост

Извършен е анализ на лекарствената устойчивост на представителна извадка от 450 назофарингеални изолата *S. aureus* от създадената колекция спрямо 17 антимикробни агента, подбрани съгласно EUCAST (2019). Получените резултати очертават доминиране на устойчивостта към β -лактамните антибиотици, умерени, но клинично значими нива на устойчивост към макролиди, линкозамиди, флуорохинолони и аминогликозиди, както и запазена активност на антимикробни агенти, представляващи красен терапевтичен избор, включително оксазолидинони, амфениколи и гликопептиди.

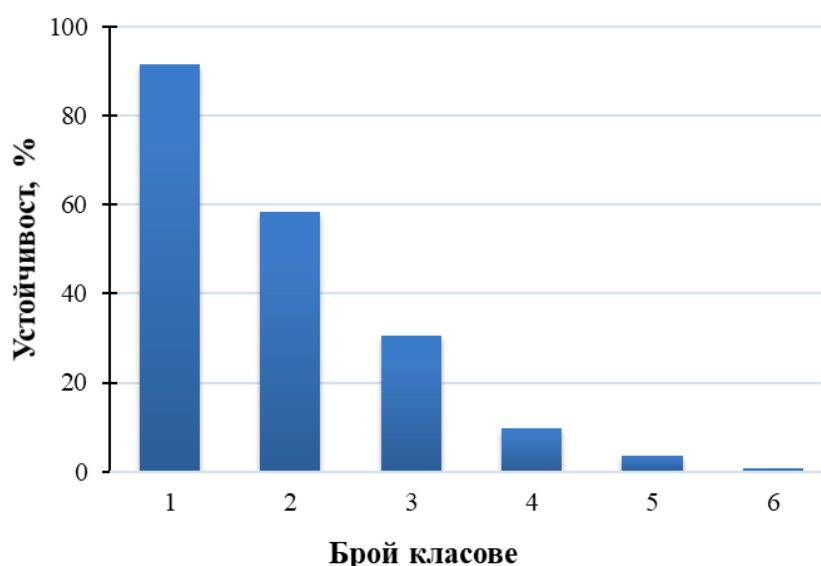


Фигура 2. Разпределение на устойчивостта на назални и гърлени изолати *Staphylococcus aureus* по антибиотични класове.

Водещо значение има високият дял на метицилинова устойчивост, оценена чрез цефокситин, който достига 38,88%. Тази стойност е значително по-висока от националните данни на BulSTAR за същия период и от средноевропейските стойности, което показва по-силно представяне на MRSA фенотипа в изследваната назофарингеална популация (BulSTAR, 2021; ECDC, 2024). Наред с това се установяват умерени нива на устойчивост към макролиди и линкозамиди, съответно 20,14% и 15,97%, както и към аминогликозиди – 11,75%. Устойчивостта към флуорохинолони остава под 10% за отделните представители, но запазва клинично значение поради възможността за селекция на устойчиви варианти при *S. aureus*.

Особено важно е, че фенотипният профил не се изчерпва с единична устойчивост към отделни антибиотици, а включва натрупване на резистентност към повече от един антимикробен клас. Разпределението на изолатите според броя класове, към които е установена устойчивост, показва преобладаване на щамове с ограничено до умерено натрупване на резистентност, но същевременно и отчетливо присъствие на MDR компонент. Средната стойност на MAR индекса е $0,166 \pm 0,151$, което показва, че назофарингеалната популация включва не само единично резистентни варианти, но и щамове с акумулирана класова устойчивост.

При прилагане на дефиницията на Magiorakos и съавт. (2012), изолатите с устойчивост към три и повече антимикробни класа могат да бъдат разглеждани като MDR фенотипи. В този смисъл установената множествена устойчивост увеличава клиничната значимост на изследваните назофарингеални изолати и ги определя като потенциален резервоар на детерминанти, свързани с антимикробна резистентност.

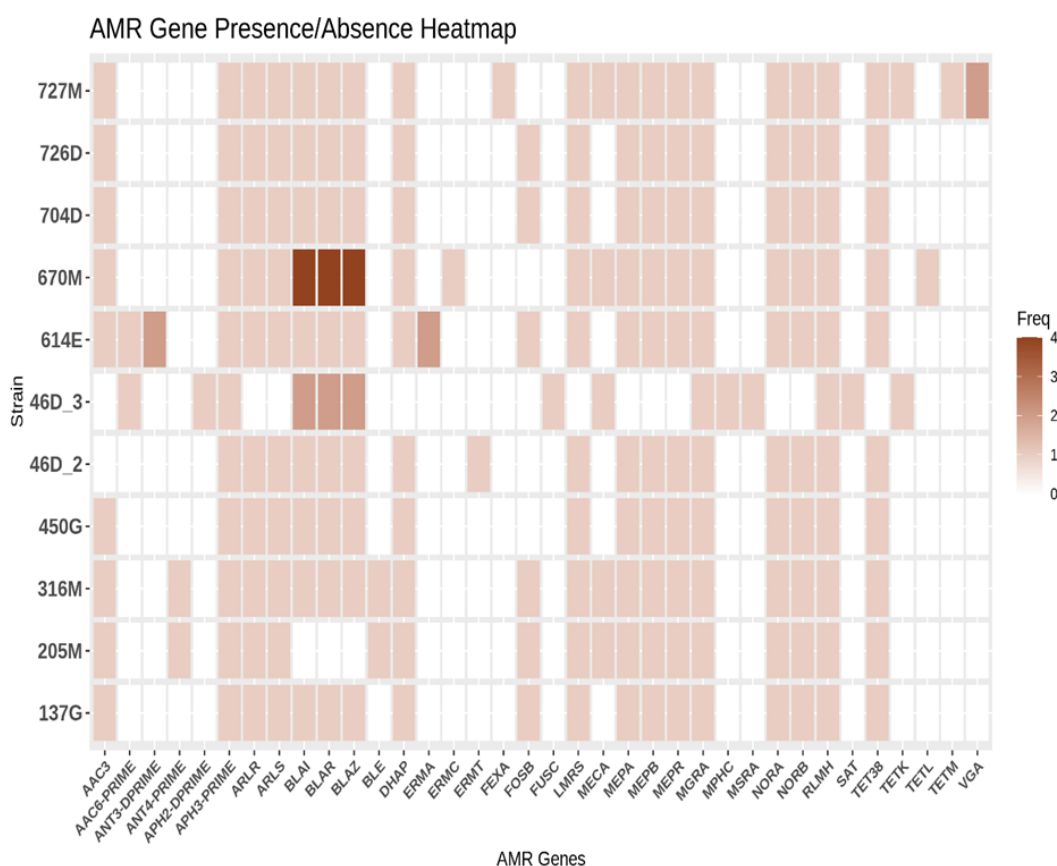


Фигура 3. Процентно разпределение на назофарингеалните изолати *Staphylococcus aureus* според броя антибиотични класове, към които е установена устойчивост.

Независимо от неблагоприятното представяне на β -лактамна и MRSA-асоциираната устойчивост, част от терапевтично значимите антимикробни средства запазват добра активност. Ниски стойности на устойчивост са установени към хлорамфеникол и ко-тримоксазол, а оксазолидиноните и гликопептидите запазват активността си спрямо почти всички изолати. Това показва, че антибиотичният профил на изследваната популация е неблагоприятен главно по отношение на β -лактамна и множествената устойчивост, но не е равномерно компрометиран спрямо всички основни антистафилококови средства.

2.2. *In silico* анализ на резистомата при *Staphylococcus aureus*

Фигурата позволява да се проследи както общият резистентен фон на секвенираните изолати, така и различията между MRSA и MSSA щамове. Полученият профил показва, че резистомът включва няколко основни групи детерминанти – гени, свързани с β -лактамна устойчивост, ефлукс-свързани механизми, регулаторни елементи и детерминанти с по-широко значение за толерантността към антимикробни вещества. Това позволява да се проследи както общият резистентен фон, така и различията между MRSA и MSSA изолатите.



Фигура 4: Heatmap на установените гени за антибиотична устойчивост при 10-те секвенирани щамове *Staphylococcus aureus*.

Полученият профил показва, че резистомът на изследваните изолати включва няколко основни групи детерминанти – гени, свързани с β -лактамна

устойчивост, ефлукс-свързани механизми, регулаторни елементи и детерминанти с по-широко значение за толерантността към антимикробни вещества. Подобна организация съответства на съвременните геномни данни за *S. aureus*, според които част от резистентните детерминанти принадлежат към базовия хромозомен фон, докато други се придобиват чрез мобилни генетични елементи и отразяват по-динамични процеси на селекция и хоризонтален трансфер (Contarin et al., 2024).

Сред най-съществените резултати е установяването на *mecA* в пет от десетте анализирани щамове, което съответства на предварителното им разпределение в групите MRSA и MSSA. Биологичното значение на *mecA* е свързано с кодирането на PBP2a с нисък афинитет към β -лактамните антибиотици, поради което генът остава основен диагностичен маркер за метицилинова устойчивост при *S. aureus* (Lade et al., 2023). Успоредно с това β -лактамазният модул *blaI/blaR/blaZ* се установява в девет от десетте щамове, което показва почти универсално разпространение на генетичен потенциал за пеницилиназно обусловена устойчивост.

Съпоставката с фенотипните резултати показва най-високо съответствие именно при основните β -лактамни маркери. Всички *mecA*-позитивни изолати са фенотипно устойчиви на цефокситин, докато *mecA*-негативните изолати запазват чувствителност към този антибиотик. Аналогично, присъствието на *blaZ* съответства на широко установената устойчивост към пеницилин и ампицилин. Това показва, че при основните придобити механизми на β -лактамна устойчивост геномните данни дават надеждна основа за интерпретация на фенотипния профил.

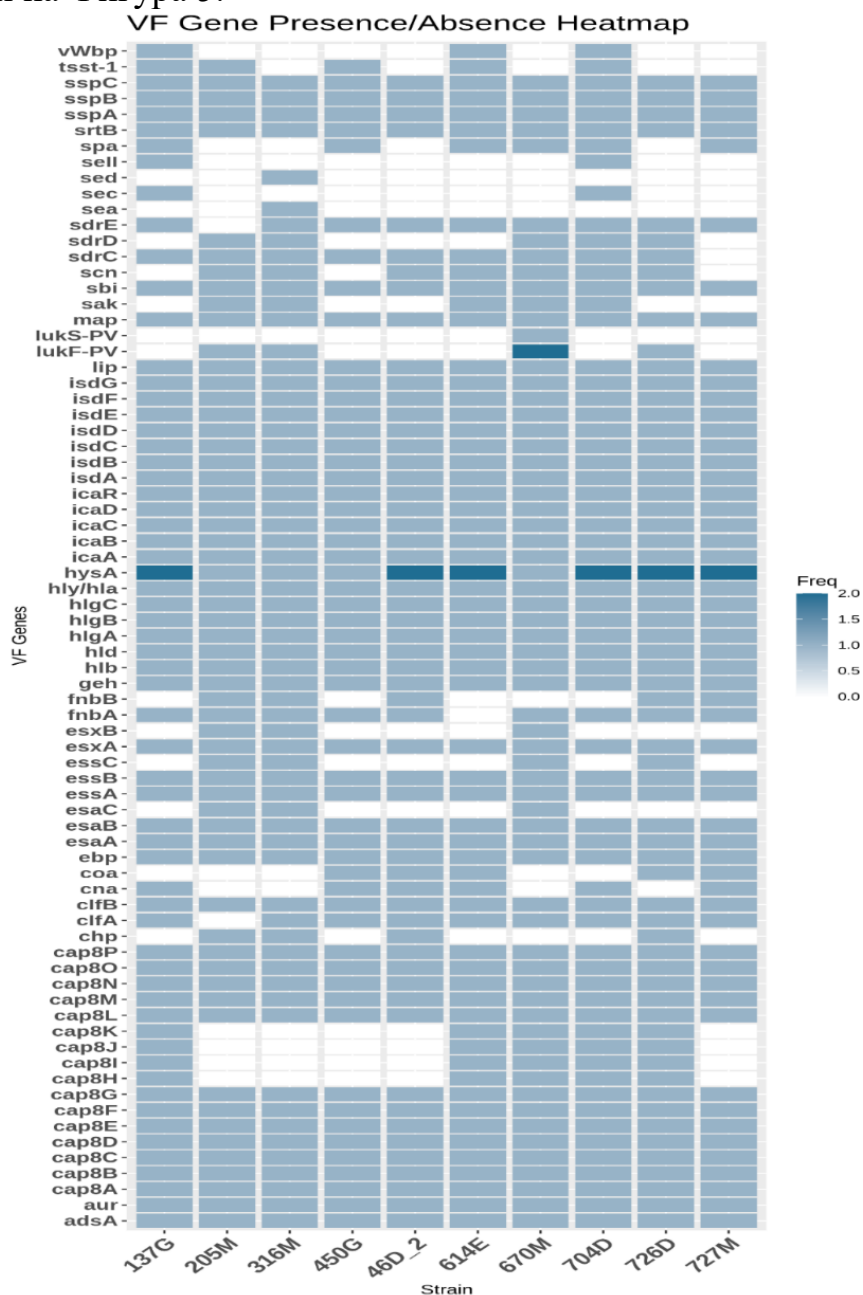
По-сложна е интерпретацията на ефлукс-свързаните и регулаторните детерминанти. Наличието на гени като *norA*, *norB*, *mepA*, *lmrS*, *mgrA*, *arlRS* и *tet38* очертава генетичен потенциал за участие в намалена чувствителност към различни антимикробни вещества, но само по себе си не е достатъчно за приемане на клинично изразен резистентен фенотип. При тези механизми фенотипната изява зависи от нивото на експресия, генетичния фон, наличието на съпътстващи мутации и условията на средата. Поради това те следва да се тълкуват не като самостоятелни маркери за резистентност, а като част от по-широкия адаптационен потенциал на щамове.

Общата картина показва, WGS анализът разширява информацията за устойчивостта, като позволява едновременно откриване на основни придобити гени, регулаторни елементи и потенциални ефлукс-свързани механизми. В същото време получените данни потвърждават необходимостта резистомът да се интерпретира в съпоставка с фенотипния тест за антибиотична чувствителност. При изследваните назофарингеални изолати връзката между генотип и фенотип е най-пряка при *mecA* и *blaZ*, докато при ефлуксните и регулаторните детерминанти има степенуван и функционално зависим характер.

3. Генетична характеристика на вирулентния потенциал на назофарингеални изолати *Staphylococcus aureus*

3.1. *In silico* анализ на общия вирулентен потенциал при *Staphylococcus aureus*

Въз основа на геномните данни от десетте секвенирани назофарингеални изолата *S. aureus* е извършен анализ на гените, свързани с патогенезата, колонизацията и инвазивното поведение на вида. Установени са общо 74 гена, като отделните щамове носят между 55 и 65 детерминанти. Най-богат генен набор се установява при щамове 670М и 704Д, а най-ограничен – при 727М и 450Г. Обобщеният профил на вирулентно-асоциираните гени е представен на Фигура 5.



Фигура 5. Профил на вирулентно-асоциираните гени при 10 секвенирани назофарингеални изолата *Staphylococcus aureus*.

Секвенираните изолати не формират напълно хомогенна група, а популация с общ консервативен фон и различна по обем променлива надстройка. Най-постоянно представени са детерминантите, свързани с назофарингеална адаптация, първично прикрепване, стабилизиране на биофилмната структура, усвояване на желязо и взаимодействие с имунната система. В тази група попадат гени за повърхностни адхезини, компоненти на *ica*-оперона, *Isd* системата, фактори за взаимодействие с комплемента и имуноглобулините, както и основни цитолитични белтъци. По-променливо е разпределението на токсинните, секреторните и подвижно придобитите детерминанти, което съответства на характерната за *S. aureus* организация на вирулома – съхранено ядро от гени за колонизация и базова инвазивност, комбинирано с по-вариабилни допълнителни фактори.

Установеният адхезионен профил е сходен при MRSA и MSSA щамове. Това показва, че различията между двата типа се открояват по-ясно при гените за устойчивост, отколкото в общия набор от основни адхезионни и колонизационни фактори. Този резултат има значение за интерпретацията на назофарингеалните MRSA изолати, тъй като метицилиновата устойчивост не е съпроводена с редукция на основния колонизационен потенциал. Подобна зависимост е описана и в други геномни изследвания, при които MRSA и MSSA често споделят значителна част от адхезионния и имуномодулиращия репертоар, докато основните различия се концентрират в резистентните детерминанти и мобилните генетични елементи (Zhou et al., 2021).

Най-консервативен в изследваната серия е блокът от гени, свързани с установяването и поддържането на колонизацията в назофарингеалната ниша. Универсалното присъствие на *clfB*, *icaABCD*, *isdA–isdG*, *adsA*, *sbi* и основните хемолизини очертава щамове, генетично пригодени не само за преходно присъствие, но и за продължително задържане в назофарингеалната и орофарингеалната система. Това съответства на разбирането, че *S. aureus* заема междинно място между коменсал и опортюнистичен патоген, като назофарингеалната колонизация може да бъде изходна точка за последващо локално или инвазивно заболяване (Sakr et al., 2018).

Геномният профил показва, че назофарингеалните изолати съхраняват както детерминанти, необходими за лигавично персистирание, така и набор от гени, които при подходящи условия могат да подпомогнат тъканно увреждане и по-инвазивно поведение. В този смисъл вируломът на изследваните щамове не следва да се интерпретира само като каталог от налични гени, а като функционално разслоена система, в която консервативното колонизационно ядро се комбинира с променливи токсинни и секреторни елементи. Тези данни отразяват генетичен потенциал, а не пряко доказана експресия или фенотипна активност на

съответните детерминанти, поради което разпространението на избрани гени е проследено и в по-широка група клинични изолати.

3.2. *In vitro* анализ на вирулентния потенциал при *Staphylococcus aureus*

За експериментална проверка на данните от *in silico* анализа е разработен PCR панел, включващ гени, участващи в различни етапи на инфекциозния процес: начално прикрепване и колонизация (*fnbA*, *fnbB*, *clfB*, *cna*, *fib*, *ebps*), биофилмообразуване (*icaA*, *icaB*, *icaD*), приспособяване към лигавичната среда и взаимодействие с гостоприемника (*isdA*, *sdrC*, *sdrD*, *tarS*), цитотоксичен потенциал и увреждане на тъканите (*hla*, *hlgA*, *psm β 1*), както и токсигенност (*tsst-1*, *sea*, *seb*, *sec*). Подборът позволява да се оцени не само наличието на отделни вирулентно-асоциирани гени, но и тяхното разпределение в по-широка колекция от щамове, така че да се прецени доколко очертаният чрез WGS профил се потвърждава при разширен набор от изолати.

PCR анализът е проведен при 40 щамове *S. aureus* от получената колекция. Първоначално е приложен мултиплексен PCR за едновременно доказване на видово-специфичния маркер *Staur*, на гена за метицилинова устойчивост *mecA* и на гена *tsst-1*. При всички щамове се установява фрагмент с размер 1250 bp, получен вследствие на амплификация на участък от гена за 23S рРНК с видовоспецифичната за *S. aureus* праймерна двойка *Staur4/Staur6* (Straub et al., 1999). Това потвърждава видовата принадлежност на изследваните изолати и осигурява надеждна основа за последващия анализ на таргетните гени.

Честотата на срещане на отделните гени в изследваната група е обобщена в Таблица 1, а получените профили спрямо 20-те таргетни гена са представени на Фигура 6. Резултатите показват широко разпространение на гени, свързани с адхезия, биофилмообразуване и повърхностна адаптация. В групата на адхезионните и колонизационните детерминанти *clfB* е установен при всички изолати, *fnbA* – при 77,5%, *cna* и *ebps* – при 62,5%, а *fnbB* и *fib* – при 42,5%. Този профил показва, че изследваните щамове притежават набор от детерминанти, насочени към взаимодействие с епителни структури, компоненти на екстрацелуларния матрикс и плазмени белтъци.

Гените, свързани с биофилмообразуването, също са представени с висока честота. *icaA* е установен при всички щамове, а *icaB* и *icaD* – при 92,5%. Това показва широко разпространен генетичен потенциал за синтез на полизахариден междуклетъчен адхезин и за стабилизиране на биофилмната структура. В контекста на назофарингеалните изолати този резултат има особено значение, тъй като биофилмообразуването може да подпомогне персистирането върху лигавични повърхности и да затрудни елиминирането на бактериалната популация.

Сред факторите за повърхностна адаптация и персистиране *isdA* и *tarS* се откриват при всички изолати, докато *sdrC* и *sdrD* са установени съответно при 72,5% и 57,5%. Тази група гени допълва профила на щамове, пригодени към лигавична среда, в която успешното задържане зависи от съчетанието между прикрепване, повърхностна модификация, усвояване на ограничени хранителни ресурси и взаимодействие с локалните защитни механизми.

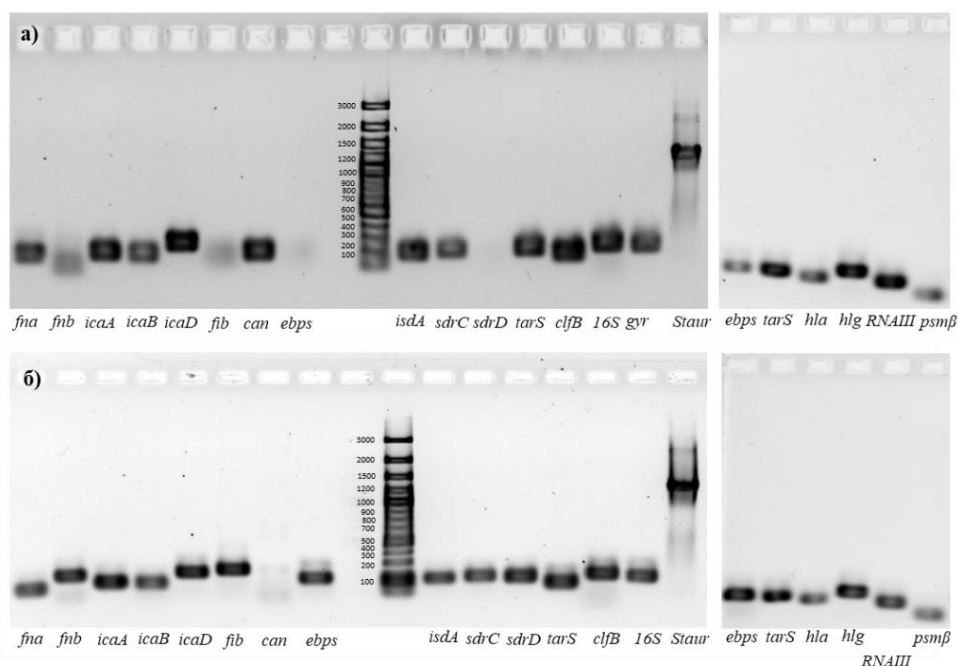
Таблица 1: Честота на срещане на таргетните гени при 40 изолата *Staphylococcus aureus*.

Функционална категория	Ген	n (%)	Ген	n (%)
Адхезия и колонизация	<i>fnbA</i>	31 (77.5%)	<i>fnbB</i>	17 (42.5%)
	<i>clfB</i>	40 (100%)	<i>cna</i>	25(62.5%)
	<i>fib</i>	17 (42.5%)	<i>ebps</i>	25(62.5%)
Биофилм	<i>icaA</i>	40 (100%)	<i>icaB</i>	37 (92.5%)
	<i>icaD</i>	37 (92.5%)		
Повърхностна адаптация и персистиране	<i>isdA</i>	40 (100%)	<i>sdrC</i>	29 (72.5%)
	<i>sdrD</i>	23 (57.5%)	<i>tarS</i>	40 (100%)
Регулация и цитотоксичност	<i>hla</i>	40 (100%)	<i>hlgA</i>	40 (100%)
	<i>psmβ1</i>	40 (100%)		
Суперантигени и ентеротоксини	<i>tsst-1</i>	12 (30%)	<i>sea</i>	9 (22.5%)
	<i>seb</i>	6(15%)	<i>sec</i>	40 (100%)

Гените *hla*, *hlgA* и *psm β 1* са доказани във всички изолати, което показва почти пълна съхраненост на детерминанти, свързани с цитотоксичен потенциал. Този резултат изисква предпазлива интерпретация. PCR анализът върху геномна ДНК доказва наличието на съответните гени, но не дава информация за степента на тяхната експресия в условията на мукозно носителство. Това има особено значение при *S. aureus*, тъй като продукцията на хемолизини и други секретирани ефекторни молекули се определя от сложна регулаторна мрежа и от конкретните условия в гостоприемника. Въпреки това универсалното присъствие на тези гени показва, че дори изолатите, адаптирани към задържане върху лигавицата, съхраняват потенциал за тъканно увреждане при подходящи условия.

По-променливо е разпределението на суперантигените и ентеротоксините. Генът *tsst-1* е установен при 30% от изследваните щамове, *sea* – при 22,5%, *seb* – при 15%, докато *sec* е открит при всички изолати. Това показва, че част от назофарингеалните щамове носят генетични детерминанти, свързани с продукция на токсини с потенциално системно значение. Присъствието на *tsst-1* при част от изолатите предполага наличие

на генетична предпоставка за синтез на токсина, причиняващ синдром на токсичния шок, но не може да се интерпретира като доказателство за реална продукция на токсина при конкретни условия.



Фигура 6: PCR профили на 20 таргетни гена, свързани с вирулентния и колонизационния потенциал при изолати *Staphylococcus aureus*.

Съпоставянето на отделните функционални групи показва, че при изследваните изолати най-силно съхранен е блокът от гени, свързани с адхезия, биофилмообразуване и повърхностна адаптация. Честотата на *clfB*, *icaA*, *icaB*, *icaD*, *isdA* и *tarS* очертава стабилно съхранено функционално ядро, а честотата на *fnbA*, *sdrC*, *sdrD*, *cna* и *ebps* показва, че към него се добавя променлива периферия от допълнителни адхезионни детерминанти. Тази организация е особено значима за назалните и гърлените изолати, тъй като при тях способността за прикрепване, задържане и лигавично персистиране вероятно има по-съществено значение от непосредствената тъканна инвазивност.

PCR анализът потвърждава, че основните тенденции, установени чрез WGS, се възпроизвеждат и в по-широка клинична извадка. Амбулаторните назални и орофарингеални изолати *S. aureus* съчетават съхранен набор от гени, подпомагащи прикрепването, задържането и биофилмообразуването, с по-променливо разпределение на суперантигенни и ентеротоксинни детерминанти. Така получените резултати очертават изследваната популация като генетично пригодена за лигавично персистиране, като при част от щамовете се добавя и токсин-асоцииран потенциал.

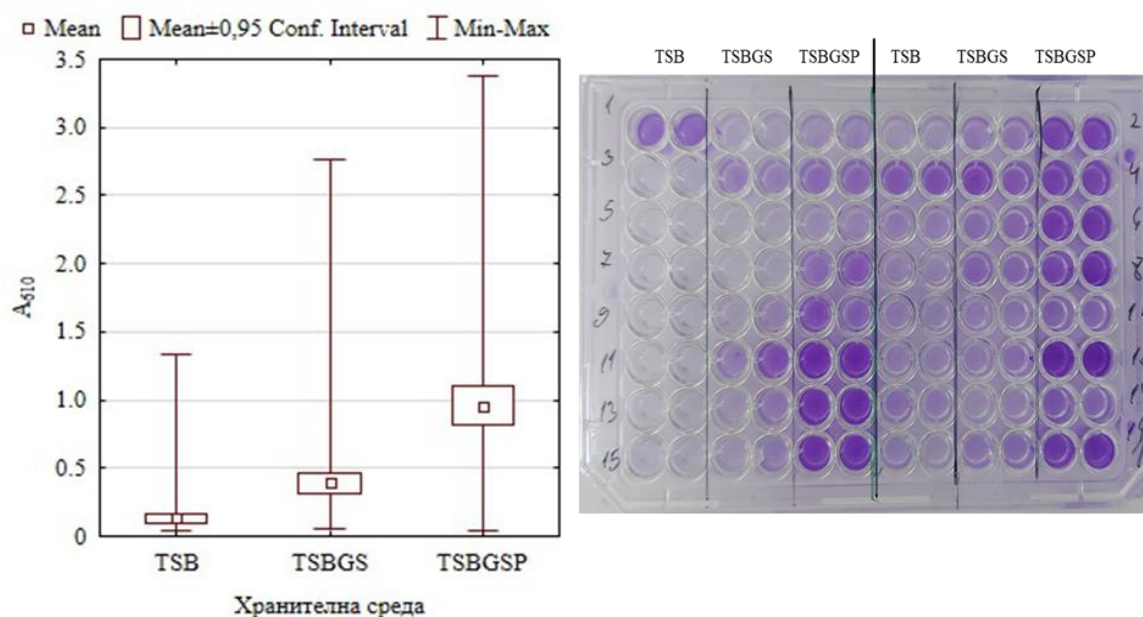
4. Биофилмформиращ капацитет на клиничните изолати *Staphylococcus aureus*

Изследваната колекция от назофарингеални изолати *S. aureus* показва отчетлива фенотипна хетерогенност по отношение на

биофилмообразуването. Съгласно класификацията на Stepanović et al. (2007), щамовете се разпределят в четири групи – неформиращи, слаби, умерени и силни биофилмообразуващи изолати. Резултатите показват, че биофилмът при изследваните щамове не представлява бинарен белег, а количествено вариращ фенотип, чиято изява зависи както от особеностите на отделния щам, така и от условията на средата.

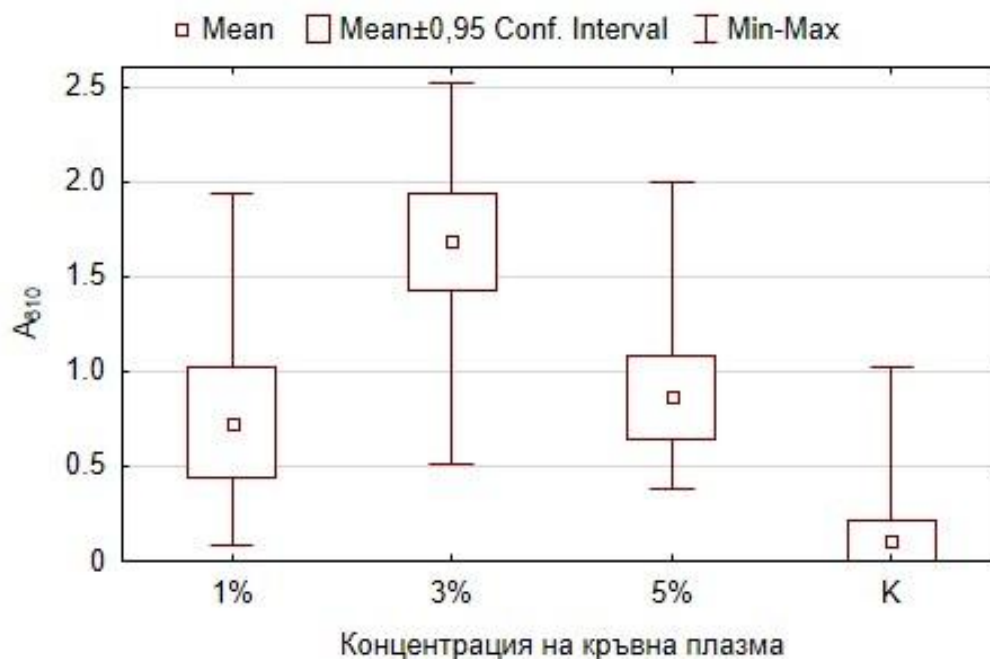
С цел изясняване на влиянието на хранителната среда върху биофилмформирания потенциал е проведен сравнителен анализ при култивиране в стандартен соево-казеинов бульон (TSB), в среда TSB с добавени 2% глюкоза и 2% NaCl (TSBGS), както и в TSBGS с добавена 1% човешка кръвна плазма (TSBGSP). Резултатите, представени на Фигура 7, показват минимално биофилмообразуване в стандартна TSB среда, докато добавянето на глюкоза и натриев хлорид значително стимулира процеса ($p = 0,0007$). Най-силно изразено биофилмообразуване се отчита при култивиране в TSBGSP, което показва, че присъствието на плазмени компоненти допълнително усилва фенотипната изява на този белег.

При стандартни условия част от изолатите се категоризират като слаби или неформиращи биофилм, но след обогатяване на средата с глюкоза, NaCl и плазма се отчита преминаване към по-високи категории на биофилмообразуване. Това показва, че оценката на биофилмформирания капацитет зависи съществено от използвания модел и че стандартната хранителна среда може да подцени потенциала на част от клиничните изолати. Този резултат е в съгласуваност с генетичния профил на изолатите, при които са установени широко разпространени *ica*-свързани гени и повърхностни адхезини.



Фигура 7. Биофилм, формиран след 24-часово култивиране на щамове от род *Staphylococcus* в 96-ямкови микротитърни плаки. TSB – соево-казеинов бульон; TSBGS – TSB с добавени 2% глюкоза и 2% NaCl; TSBGSP – TSBGS с добавена 1% човешка кръвна плазма.

За по-прецизна оценка на влиянието на плазмените компоненти е анализирано биофилмообразуването при добавяне на човешка кръвна плазма в концентрации 1%, 3% и 5%. Резултатите, представени на Фигура 8, показват, че всички тествани концентрации статистически достоверно стимулират биофилмообразуването ($p < 0,01$), като ефектът се установява дори при щамове, първоначално категоризирани като неформиращи биофилм. Най-високи стойности се отчитат при 3% плазма, докато при 1% и 5% също се регистрира биофилмообразуване, но с по-ниска интензивност.



Фигура 8. Биофилмообразуване при различните щамове *S. aureus* в присъствието на различни концентрации човешка кръвна плазма.

Така получените резултати показват, че човешката плазма действа като силен стимулатор на биофилмообразуването при назофарингеални изолати *S. aureus*, като най-изразен ефект се наблюдава при 3%. Наличието на оптимален диапазон на плазма-индуцирана стимулация показва, че този ефект не е просто резултат от общо обогатяване на средата, а от специфично взаимодействие между бактериалните повърхностни структури и плазмените компоненти. В този смисъл използваният модел позволява по-точно разкриване на биофилмформирания потенциал в условия, близки до взаимодействието с гостоприемника.

5. Млечнокисели бактерии като стратегия за контрол на *Staphylococcus aureus*

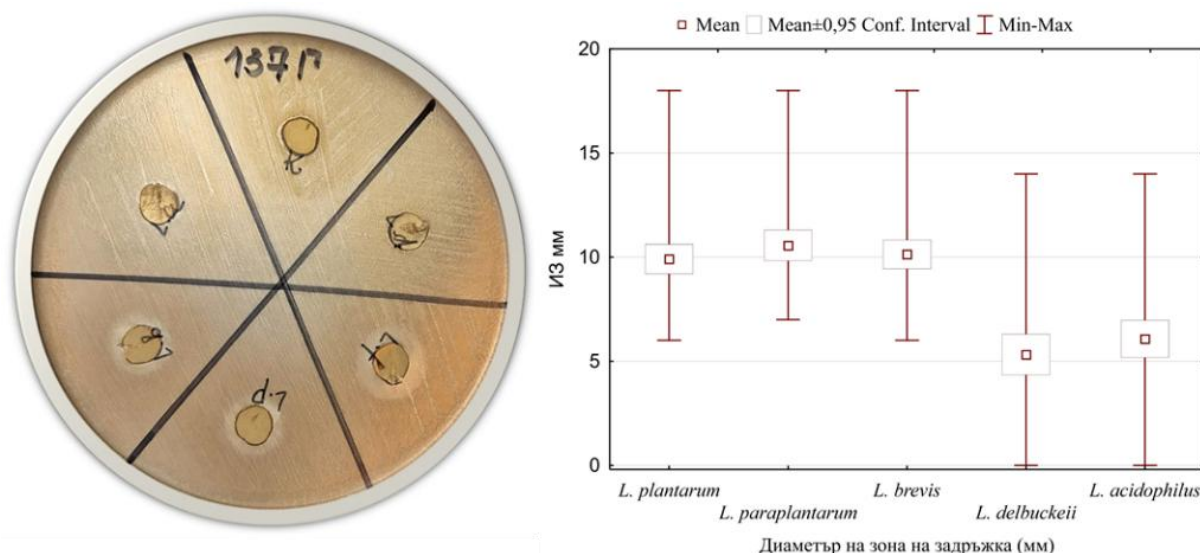
5.1. Скрининг на антагонистична активност на млечнокисели бактерии срещу *Staphylococcus aureus*

С цел подбор на щамове млечнокисели бактерии с потенциал за антистафилококово приложение е извършен първичен скрининг на антагонистичната активност спрямо клинични изолати *S. aureus*. Използван

е дифузионен метод с агарови блокчета, който позволява да се оцени инхибирането на растежа на патогена при директно взаимодействие с 24-часови култури на изследваните млечнокисели бактерии.

Резултатите показват ясно изразена щамова специфичност на антагонистичната активност. Наблюдава се широк диапазон в степента на инхибиране между отделните МКБ щамове, както и вариабилност в чувствителността на различните изолати *S. aureus*. Това показва, че антистафилококовият ефект не може да се разглежда като общо свойство на всички млечнокисели бактерии, а зависи от конкретния щам и от състава на продуцираните от него антимикробни вещества.

Антагонистичната активност на изследваните щамове е представена на Фигура 9. Най-изразени и възпроизводими зони на инхибиране са установени при щамовете *Lactiplantibacillus plantarum* IZITR_24, *Lactiplantibacillus paraplantarum* IZITR_13 и *Levilactobacillus brevis* DPL5, което обосновава включването им в последващите геномни и функционални анализи.



Фигура 9. Антагонистична активност на щамове млечнокисели бактерии срещу *Staphylococcus aureus*, определена чрез „plug diffusion“ тест.

Установената вариабилност в диаметъра на инхибиторните зони следва да се разглежда не само като характеристика на МКБ антагонистите, но и като отражение на хетерогенността на изследваната група *S. aureus*. Подобна щамова специфичност е очаквана, тъй като *S. aureus* проявява значителна фенотипна пластичност, включително различия в чувствителността към киселинен стрес, в активността на защитни системи и в експресията на повърхностни и регулаторни механизми.

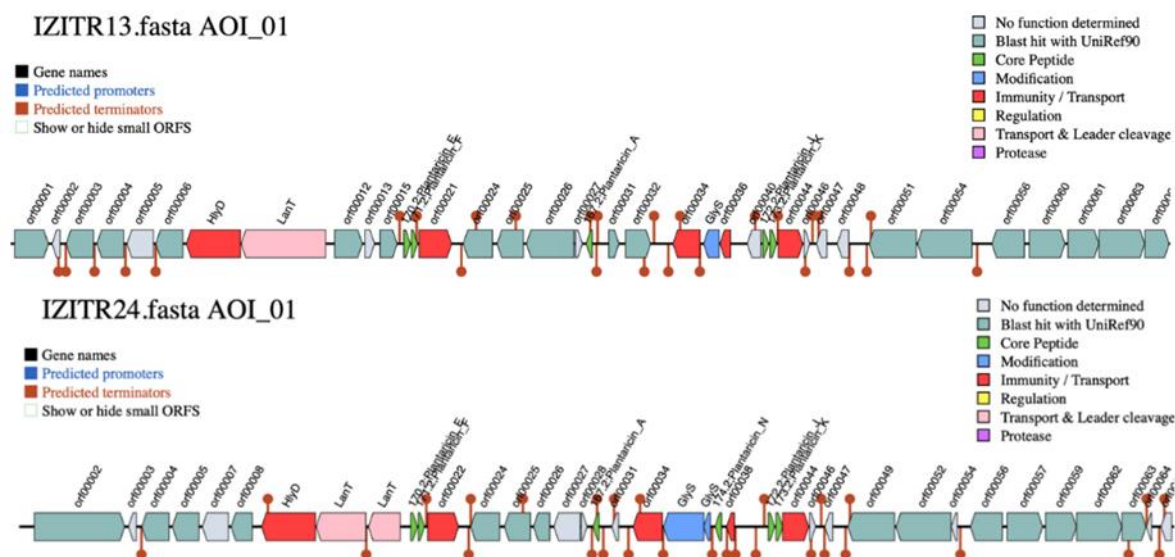
5.2. Геномна характеристика на млечнокисели бактерии

За трите селектирани щамове е извършена геномна характеристика, насочена към видова идентификация, оценка на безопасността и анализ на генетичния потенциал за продукция на антимикробни пептиди и други

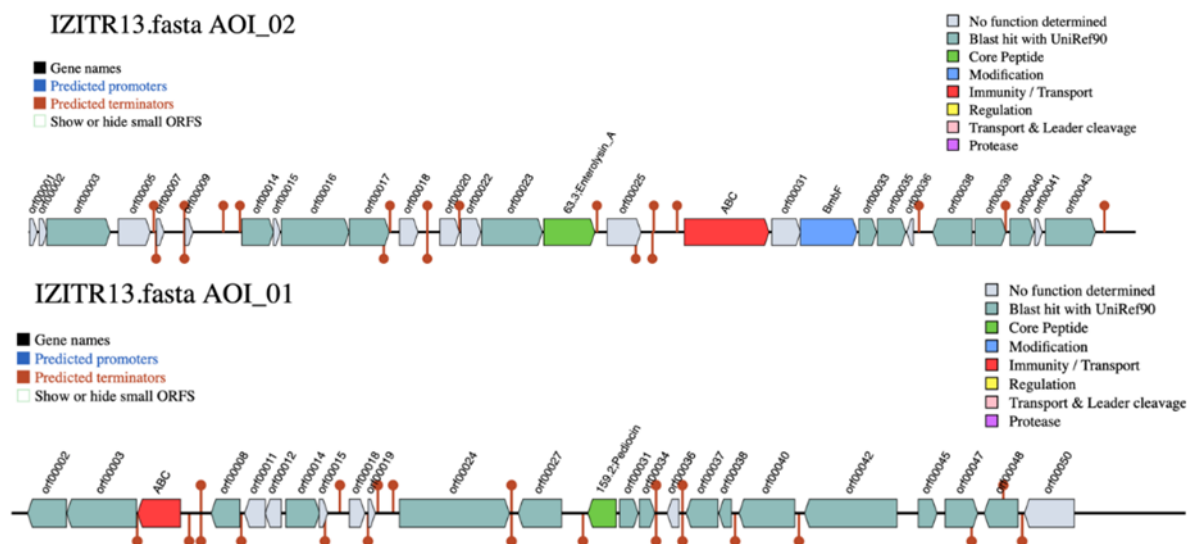
биоактивни съединения. Геномният анализ потвърждава принадлежността на щамовете към *Lactiplantibacillus plantarum* IZITR_24, *Lactiplantibacillus paraplantarum* IZITR_13 и *Levilactobacillus brevis* DPL5 и показва наличие на генетични детерминанти, свързани с антистафилококов потенциал.

При щамовете от комплекса *L. Plantarum* – IZITR_13 и IZITR_24 – се установяват типични за този таксон бактериоцидни системи от клас II. При *L. paraplantarum* IZITR_13 е установен най-комплексен профил, включващ *plnEF* и *plnJK*, гени, кодиращи ABC транспортери (Фигура 10), педиоцин-кодиращ клъстер и ген за ентеролизин А (Фигура 11).

Това очертава антимикробен потенциал с различни механизми на действие, включително мембранно насочени механизми и механизми, насочени към клетъчната стена. При *L. plantarum* IZITR_24 се наблюдава сходна, но по-консервативна организация, която съответства на класическия модел на плантарицин-свързани бактериоцидни системи, характерни за представители на групата *L. plantarum* (Perez et al., 2014). Особен интерес представлява *Levilactobacillus brevis* DPL5, при който липсват типични плантарицин-подобни клъстери, но се установяват гени, свързани със синтеза на лантибиотични пептиди, RiPP-подобни съединения и регион, кодиращ поликетид-синтаза от тип III (Фигура 12). Този профил насочва към алтернативен антимикробен потенциал, основан на по-сложно модифицирани пептиди и вторични метаболити, които могат да се отличават с по-висока структурна стабилност и по-широк спектър на действие (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

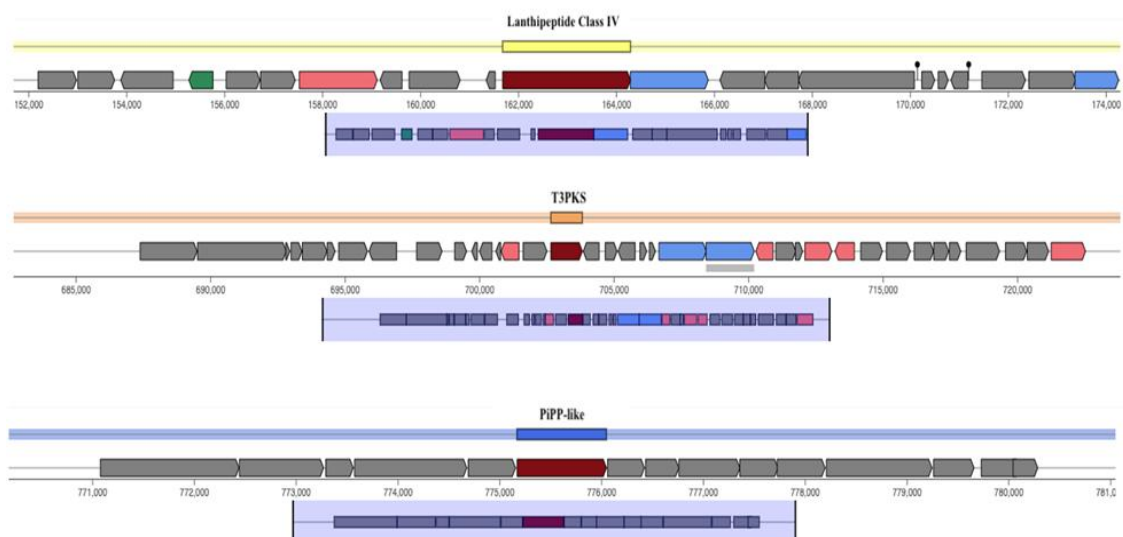


Фигура 10. Геномна организация на клъстерите, кодиращи плантарицин/бактериоцини клас II при *Lactiplantibacillus paraplantarum* IZITR_13 и *Lactiplantibacillus plantarum* IZITR_24.



Фигура 11. Геномна организация на клъстерите при *Lactiplantibacillus paraplantarum* IZITR_13 за региони кодиращи ентеролизин А (бактериолизин) и педиоцин (бактериоцин клас IIa).

Получените резултати показват, че селектираните щамове не разчитат на единен тип бактериоцинна система, а притежават структурно и функционално различни комплекси от антимикробни детерминанти. Тази разлика е съществена за последващото изследване на безклетъчните супернатанти, тъй като предполага, че наблюдаваната антистафилококова активност може да се дължи на различни молекулни механизми при отделните щамове.



Фигура 12. Геномна организация на клъстерите, кодиращи лантипептиди клас IV, T3PKS регион и RiPP-подобни съединения при *Levilactobacillus brevis* DPL5.

5.3. *In vitro* оценка на пробиотичния потенциал на селектираните щамове млечнокисели бактерии

In vitro оценката на *L. plantarum* IZITR_24, *L. paraplantarum* IZITR_13 и *L. brevis* DPL5 показва, че трите щама демонстрират различна степен на

устойчивост към условия, имитиращи гастроинтестинален стрес, както и щамово-специфични различия в агрегационното поведение и взаимодействието с тестови патогенни микроорганизми. Тези резултати очертават функционална хетерогенност между селектираните щамове, като същевременно потвърждават запазването на ключови свойства, свързани с преживяемост, автоагрегация и коагрегация.

При тестовете за киселинна толерантност и устойчивост към жлъчни соли се установяват различия между отделните щамове, което показва, че функционалният им профил не е еднороден. Същевременно всички селектирани щамове запазват жизнеспособност при част от изпитаните стресови условия, което ги характеризира като устойчиви в различна степен към фактори, свързани с гастроинтестиналната среда. Агрегационните тестове показват способност за автоагрегация и коагрегация, като стойностите варират между отделните щамове и използваните тестови микроорганизми.

В съвкупност, *in vitro* резултатите показват, че трите селектирани щамове МКБ притежават различен, но функционално изразен профил по отношение на устойчивост към стресови фактори, агрегационно поведение и взаимодействие с патогенни бактерии. Тези характеристики допълват данните от антагонистичния скрининг и геномната характеристика на щамовете.

6. Инхибиторна активност на лиофилизирана безклетъчна супернатанта

За оценка на антимикробната активност на *L. brevis* DPL5, *L. plantarum* IZITR_24 и *L. paraplantarum* IZITR_13 спрямо щамове *S. aureus* са използвани лиофилизирани безклетъчни супернатанти в качеството им на постбиотични препарати. Този подход насочва анализа към екстрацелуларните биоактивни молекули, отделяни в културалната среда, и позволява да се оцени тяхното въздействие върху два основни фенотипа на *S. aureus* – формиране на биофилм и планктонен растеж.

6.1. Маснокиселинен състав на безклетъчните супернатанти

Маснокиселинният състав на безклетъчната супернатанта е анализиран с оглед на възможния принос на липидната фракция към установяваната антистафилококова активност. Резултатите показват, че при трите изследвани щамове масните киселини са представени в много нисък общ дял, като липидната фракция остава под 0.1% от пробата. И при трите супернатанти относителният състав е доминиран от олеинова киселина, докато палмитиновата, линоловата и стеариновата киселини са представени в значително по-ниски количества. Наред с това се установяват и малки количества късоверижни мастни киселини, като *L. paraplantarum* показва относително по-висок дял на маслена и капролова киселина, както и по-изразено участие на линолова киселина, докато при *L. brevis* каприлова

киселина не се открива. Независимо от тези междушамови различия, общата картина остава еднаква – мастнокиселинният профил е количествено слабо представен и не очертава липидна фракция с доминиращо химично присъствие в безклетъчната супернатанта (Таблица 2).

Таблица 2. Мастнокиселинен състав на лиофилизирани безклетъчни супернатанти от изследваните щамове млечнокисели бактерии.

Мастна киселина	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. brevis</i>
Маслена киселина/Butyric acid C _{4:0}	0.31	1.87	0.35
Капролова киселина/Caprolic acid C _{6:0}	0.5	2.04	0.43
Каприлова киселина/Caprilic acid C _{8:0}	2.69	1.02	n. d
Миристинова киселина/ Myristic acid C _{14:0}	0.48	n. d	0.58
Палмитинова киселина/Palmitic acid C _{16:0}	5.17	7.51	6.47
Стеаринова киселина/Stearic acid C _{18:0}	2.13	3.36	2.58
Олеинова киселина/Oleic acid C _{18:1}	68.65	57.28	74.49
Линолова киселина/Linoleic acid C _{18:2}	3.23	8.53	3.11
Арахидинова киселина/Arachidic acid C _{20:0}	0.24	n. d	0.20

6.2. Ограничаване на способността на *Staphylococcus aureus* да формира биофилм

В настоящото изследване се установява отчетливо дозозависимо ограничаване на биофилмообразуването на *S. aureus* под въздействие на ЛБС от трите щама, но с различна сила и различен профил на преход между пълно, частично и минимално инхибиране. Най-интензивно инхибиране на формирането на биофилм е установено при ЛБС от *L. brevis* DPL5, следван по активност от *L. plantarum* IZITR_24, и *L. paraplantarum* IZITR_13. Наблюдаваната зависимост не се определя единствено от крайната концентрация, при която се достига пълно потискане, а и от характера на отговора в междинния концентрационен диапазон, отразяващ ширината и плавността на дозовия преход.

При ЛБС от *L. brevis* DPL5 се отчита съществено ограничаване на биофилмообразуването при 5-10 mg mL⁻¹, а при 20 mg mL⁻¹ се достига пълно потискане в целия изследван панел (Фигура 13а). При *L. plantarum* IZITR_24 също се установява отчетлив дозозависим ефект, но пълно потискане се достига при по-висока концентрация – 40 mg mL⁻¹ (Фигура 13б). Под този праг ограничаването на биофилмообразуването се запазва в широк интервал от по-ниски концентрации, което показва по-постепенен преход към пълна инхибиция. ЛБС от *L. paraplantarum* IZITR_13 показва по-слаба активност, като инхибиторният ефект се проявява по-отчетливо при по-високи концентрации (Фигура 13в). Резултатите от тестовете с ЛБС след дългосрочно хладилно съхранение показват запазване на способността да ограничават способността на *S. aureus* да формират биофилм, но при по-слабо изразен ефект и с изместване на активността към по-високи концентрации (Фигура 13г-е).

Съпоставката между инхибирането на биофилмообразуването и установените генетични детерминанти за бактериоцини показва, че силата на фенотипния отговор не е пряка функция на броя открити бактериоцидни локуси. И двата щама от комплекса *Lactiplantibacillus* носят консервативни клас IIb плантарицинови системи *plnE/F* и *plnJ/K*, а при IZITR_13 са налице и допълнителни детерминанти, свързани с педиоцин- и ентеролизин-подобни молекули. Въпреки това по-изразено ограничаване на биофилмообразуването се установява при IZITR_24. Това показва, че генетичната осигуреност на бактериоцидни системи сама по себе си не е достатъчна, за да обясни интензивността на наблюдавания ефект.

При *L. brevis* DPL5 липсват типични плантарицин-подобни системи, но пълногеномният анализ установява клъстери, свързани с RiPP/лантипептидни и други вторично-метаболитни продукти. Именно този щам показва най-силен фенотипен ефект върху биофилмообразуването на *S. aureus*, което насочва към участие на различен тип екстрацелуларни биоактивни компоненти.

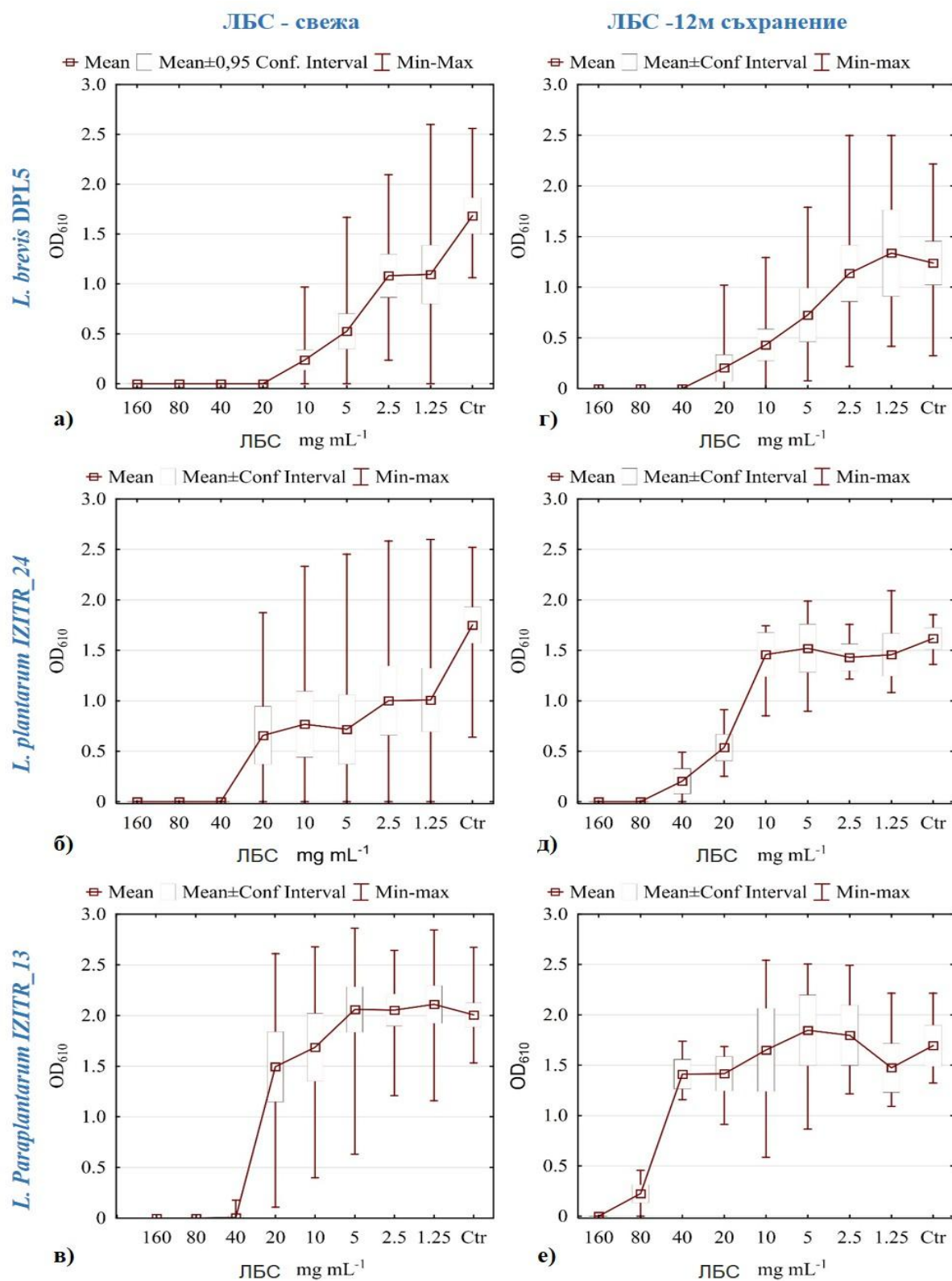
6.3. Потискане на планктонния растеж

При проследяване на растежа чрез измерване на оптичната плътност (OD) се установява, че и трите ЛБС действат дозозависимо и спрямо планктонните клетки на *S. aureus*. За ясно изразено потискане на растежа обаче са необходими по-високи концентрации от тези, при които вече се ограничава биофилмообразуването. Това показва по-ранно повлияване на процесите, свързани с формирането на биофилм, докато ефектът върху планктонната популация се проявява при по-висока експозиция.

ЛБС от *L. brevis* DPL5 се откроява с най-висока активност, като инхибиторен ефект се наблюдава още при 10 mg mL⁻¹. Пълно потискане на растежа се постига при 20 mg mL⁻¹. Междинна позиция заема ЛБС от *L. plantarum* IZITR_24, при който пълният ефект се достига при по-високи концентрации – 40 и 80 mg mL⁻¹. При 5–20 mg mL⁻¹ се наблюдава частично, но отчетливо ограничаване на растежа. Най-слабо изразено е действието на ЛБС от *L. paraplantarum* IZITR_13, при която убедителен инхибиторен ефект се установява при > 40 mg mL⁻¹, докато при 5 и 2,5 mg mL⁻¹ растежът е достоверно сходен с контролните стойности.

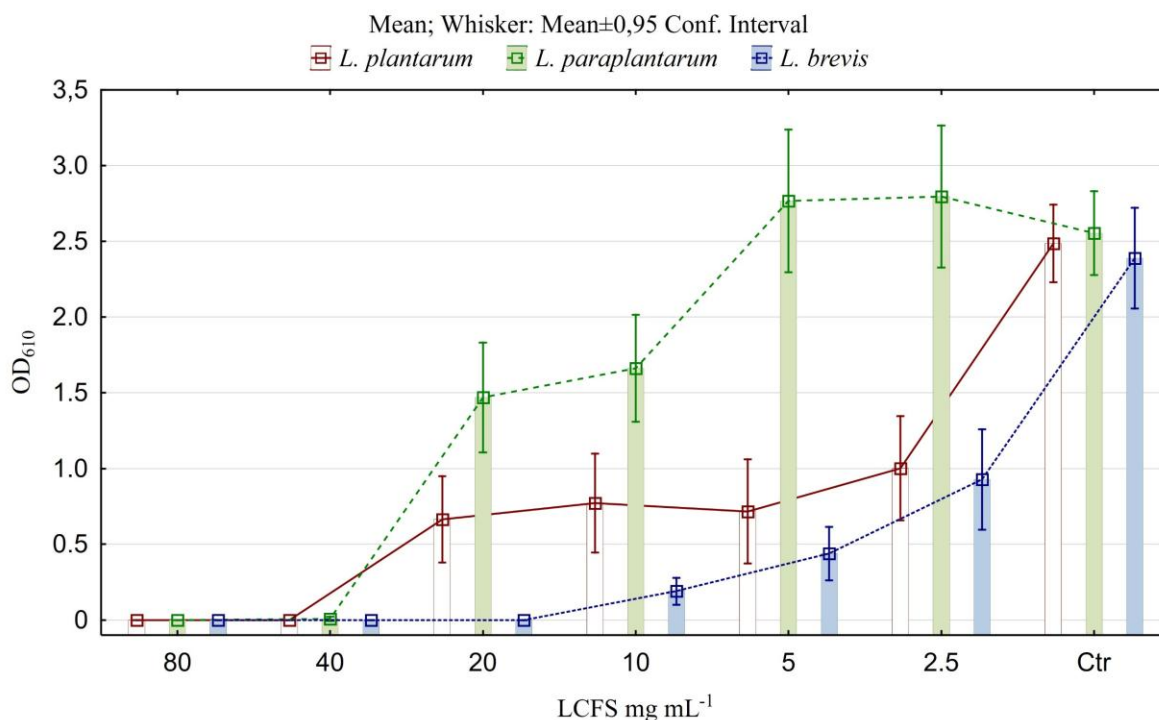
Количествената оценка на разликите между влиянието върху биофилмообразуването и планктонния растеж е извършена чрез PROBIT анализ. Въз основа на него са изчислени минималната биофилмпотискаща концентрация (МБПК), минималната потискаща концентрация (МПК) и минималната бактерицидна концентрация (МБК). При всички изследвани варианти стойностите на МБПК са достоверно по-ниски от съответните МПК ($p < 0,001$), което показва, че процесите, свързани с формирането на биофилм, се повлияват при по-ниска експозиция от тази, необходима за ясно изразено потискане на планктонния растеж. Доказано бактерицидно действие се установява само за ЛБС от *L. brevis* DPL5 и *L. plantarum*

IZITR_24, докато при *L. paraplantarum* IZITR_13 МБК не се определя в рамките на изследвания концентрационен диапазон.



Фигура 13. Инхибиторен ефект на лиофилизирани безклетъчни супернатанти от млечнокисели бактерии върху биофилмообразуването при 50 клинични изолата *Staphylococcus aureus*, оценен непосредствено след лиофилизацията и след 12-месечно съхранение на лиофилизата при 2–8°C.

Съпоставката между трите ЛБС показва еднаква йерархия на активност и при двата изследвани фенотипа на *S. aureus*. Най-силен ефект се установява при *L. brevis* DPL5, следван от *L. plantarum* IZITR_24, а най-слаба активност се отчита при *L. paraplantarum* IZITR_13. Разликата между МБПК и МПК показва, че ограничаването на биофилмообразуването не е просто следствие от общо потискане на растежа, а самостоятелно и по-рано проявяващо се действие на ЛБС върху процесите, свързани с прикрепване, натрупване и стабилизиране на структурата на биофилма.



Фигура 14. Дозозависимо потискане на планктонния растеж на *S. aureus* под действие на лиофилизирани безклетъчни супернатанти от *L. brevis* DPL5, *L. plantarum* IZITR_24 и *L. paraplantarum* IZITR_13.

6.4. Антимикробна активност на нискомолекулната белтъчна фракция от безклетъчни супернатанти

За доказване на белтъчната природа на антистафилококовата активност, безклетъчните супернатанти са подложени на катионообменна FPLC. Пречистването е насочено към обогатяване и концентриране на нискомолекулната белтъчна фракция, без да се цели пълно аналитично разделяне на отделни молекули. При подготовката на пробите, супернатантите първоначално са подложени на тангенциална поточна филтрация за отстраняване на частици с размер над 0.22 μm , след което рН е коригирано от 4 до 7, а проводимостта – до 6-7 mS cm⁻¹. Разделянето е проведено върху силен катионообменник Nuvia S с градиентно елюиране и събиране на фракции по 2 mL. При използваната схема е получен единичен елуционен пик с обем 32 mL, започващ при проводимост 7.5 mS cm⁻¹, с максимум при 38.7 mS cm⁻¹ и край при 55 mS cm⁻¹, като елуционният

профил съвпада с разпределението на белтъчната концентрация във фракциите. Това показва, че методът осигурява концентриране на ограничен набор от заредени белтъчни компоненти в сравнително тесен прозорец на елуиране, без въвеждане на допълнителни стъпки на утаяване, сушене, рехидратация и последващо доочистване. При *L. plantarum* IZITR_24 и *L. paraplantarum* IZITR_13, протеините са концентрирани в ограничен набор от съседни фракции (Таблица 3).

SDS-PAGE анализът потвърждава наличието на протеин в тези проби и при двата щама, като показва преобладаване на компоненти в нискомолекулния диапазон (Фигура 15). При *L. plantarum* IZITR_24 се наблюдава по-компактна нискомолекулна зона, докато при *L. paraplantarum* IZITR_13, протеините са равномерно разпределени между отделните елуирани фракции.

Таблица 3. Инхибиторна активност на белтъчни фракции, получени след FPLC пречистване на безклетъчна супернатанта.

<i>L. paraplantarum</i> IZTR_13			<i>L. plantarum</i> IZTR_24		
Фракция №	C (mg mL ⁻¹)	ИЗ* (мм)	Фракция №	C (mg mL ⁻¹)	ИЗ* (мм)
E6	0.169	0	E6	0	
E7	0.238	0	E7	0	
E8	0.308	0	E8	1.096	21
E9	0.37	0	E9	1.112	20
E10	0.466	7	E12	0	
E11	0.501	16	E13	0	
E12	0.476	16	E14	0	
E13	0.456	19	E15	0.058	0
E14	0.418	17	E16	0.067	0
E15	0.349	16	E17	0.094	0
E16	0.299	0			

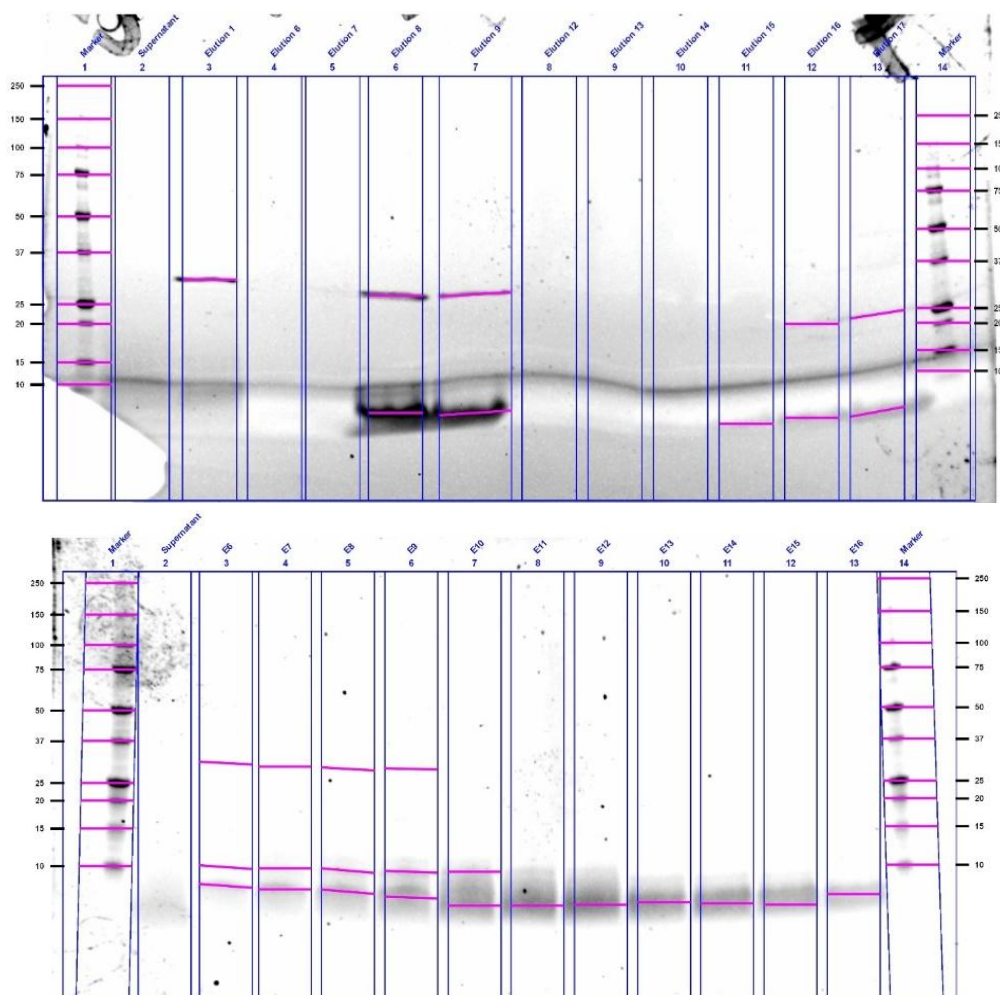
За установяване на потенциална антимикробна активност на получените белтъчни фракции спрямо *S. aureus* е проведен агар-дифузионен тест. Изпитването е извършено при стандартизирано натоварване от 10 µg протеин в ямка, което позволява сравнението да се основава на действителната активност на белтъчното съдържание, а не на различия в общия белтъчен добив (Фигура 16). При *L. plantarum* IZITR_24, зони на инхибиране се отчитат във фракции E8 и E9 – съответно 21 и 20 mm, докато в E14 до E16 активност не се установява въпреки наличието на измерим белтък. При *L. paraplantarum* IZITR_13, активност не се установява в E6-E10, а се появява едва от E11 нататък, като зоната на инхибиране е 7 mm в

E10, 16 mm в E11 и E12 и достига 19 mm в E13. Тези резултати показват, че антимикробната активност не съвпада пряко с общото количество протеин, а е локализирана в определени нискомолекулни белтъчни фракции.

7. Визуализация на биофилма

7.1. Конфокална лазерна сканираща микроскопия

За визуализиране на ефекта на лиофилизираните безклетъчни супернатанти върху жизнеспособността на клетките и пространствената организация на биофилма е приложена конфокална лазерна сканираща микроскопия (CLSM) с флуоресцентно оцветяване. Жизнеспособните клетки се визуализират в зелено, а нежизнеспособните – в червено. Използвана е концентрация, равна на 25% от МБПК, за да се проследи структурното въздействие върху биофилма при наличие на остатъчна биофилмна маса.

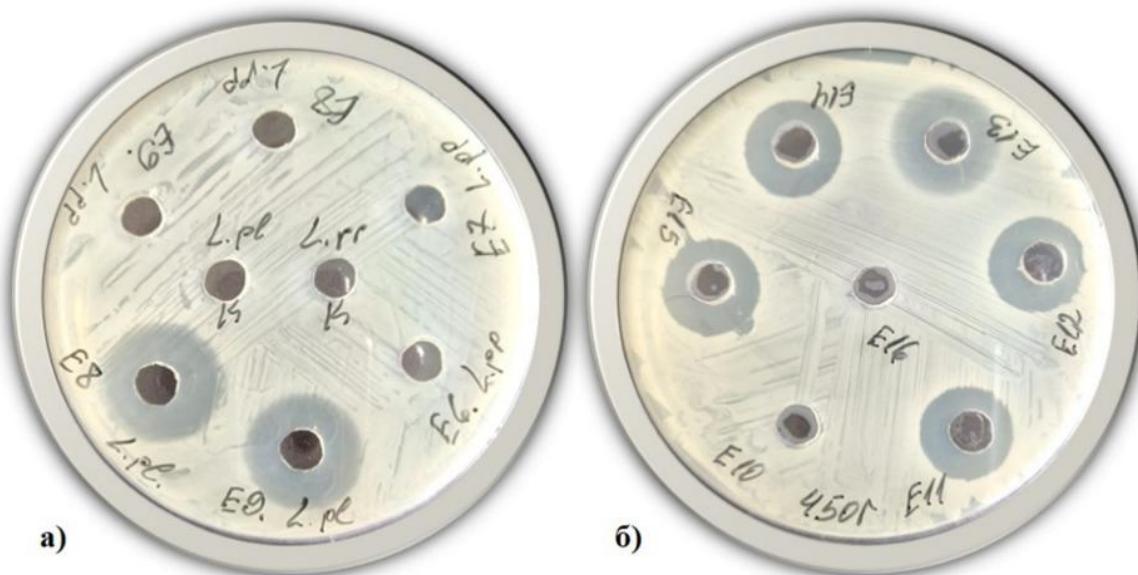


Фигура 15. SDS-PAGE анализ на протеиновите фракции, получени след FPLC пречистване на безклетъчната супернатанта от *L. plantarum* IZITR_24 (a) и *L. paraplantarum* IZITR_13 (б).

В контролната, нетретирана проба се наблюдава добре развит биофилм с преобладаване на жизнеспособни, метаболитно активни клетки и

ограничено присъствие на нежизнеспособни клетки. Биомасата е плътна, с ясно наслагване на клетъчни слоеве и изразен вертикален растеж, характерен за зрял стафилококов биофилм. В сравнение с контролата, третираните проби изглеждат предимно еднослойни, с по-рехаво разпределение на клетките и нарушено наслагване на клетъчни слоеве. При ЛБС от *L. brevis* DPL5 и *L. plantarum* IZITR_24 клетките са по-рядко разположени и формират малки агрегати, съставени предимно от нежизнеспособни клетки. При всички третираны проби се установяват увеличени по размер клетки (Фигура 17).

CLSM находките показват, че изследваните ЛБС не само редуцират количеството на формирания биофилм, но са свързани и с понижаване на жизнеспособността на клетките в рамките на остатъчната биофилмна структура. Редуцирането на вертикалния растеж и преминаването към еднослойни структури насочват към нарушаване на процесите, осигуряващи натрупване на биофилмна маса и стабилизиране на триизмерната организация.



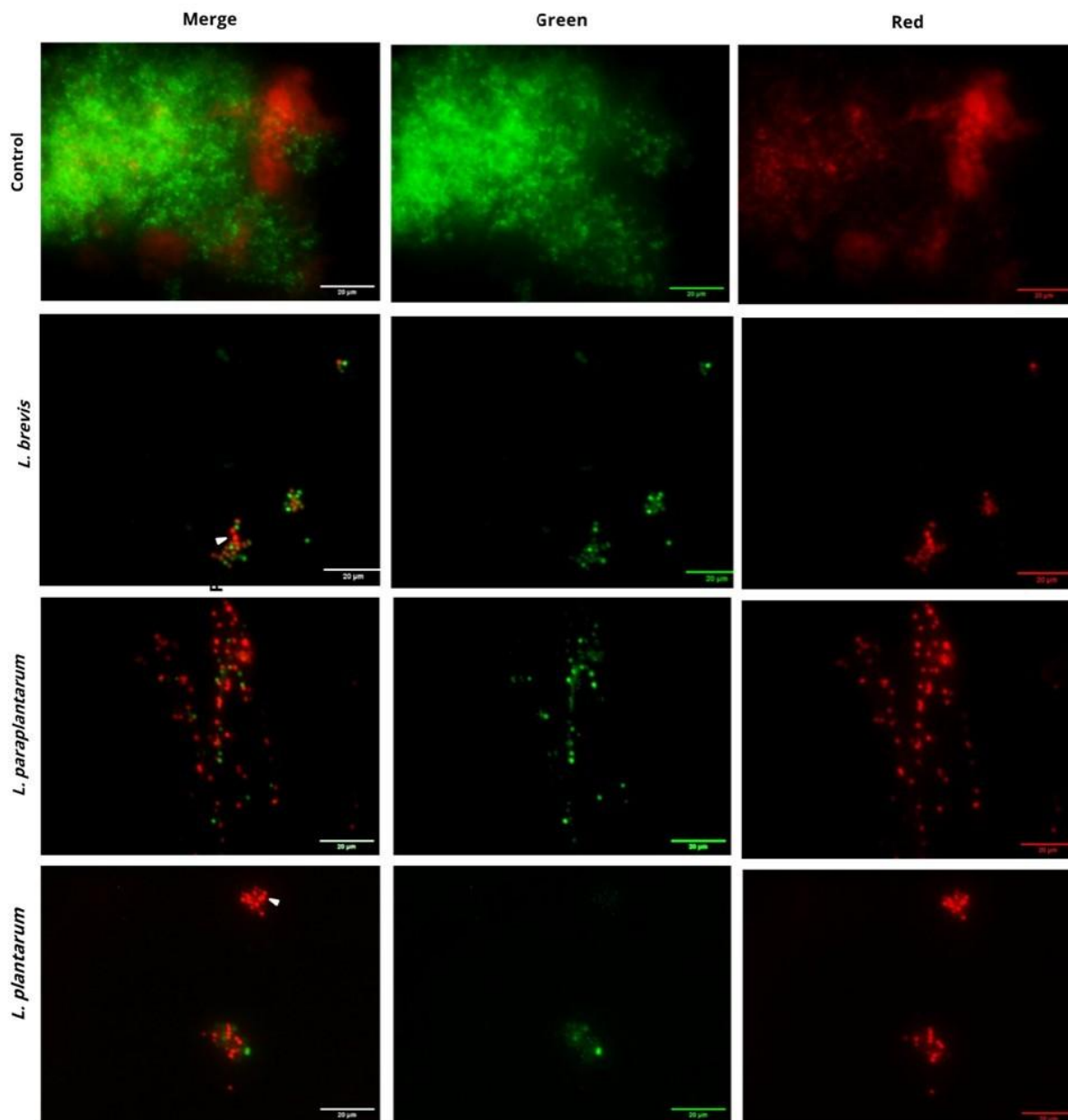
Фигура 16. Агар-дифузионен тест за антимикробна активност срещу *S. aureus* на протеиновите фракции, получени след FPLC пречистване на безклетъчни супернатанти: а) фракции E8 и E9 от *L. plantarum* IZITR_24 и фракции E6-E9 от *L. paraplantarum* IZITR_13. В средата - контроли за двата щам; б) Фракции E10-E16 от *L. paraplantarum* IZITR_13.

*Контрола – пропорционална смес от всички активни фракции, обработена с пепсин

7.2. Сканираща електронна микроскопия

За изследване на триизмерната организация на биофилма и възможните морфологични отклонения в бактериалните клетки е приложена сканираща електронна микроскопия (SEM). Щам *S. aureus* е култивиран в TSBGSP за 48 h в присъствие на субинхибиторна доза (25% от МБПК), ЛБС от *L. brevis* DPL5, *L. plantarum* IZITR_24 и *L. paraplantarum* IZITR_13. В контролната проба биофилмът е добре развит и структуриран, с многослойни клетъчни

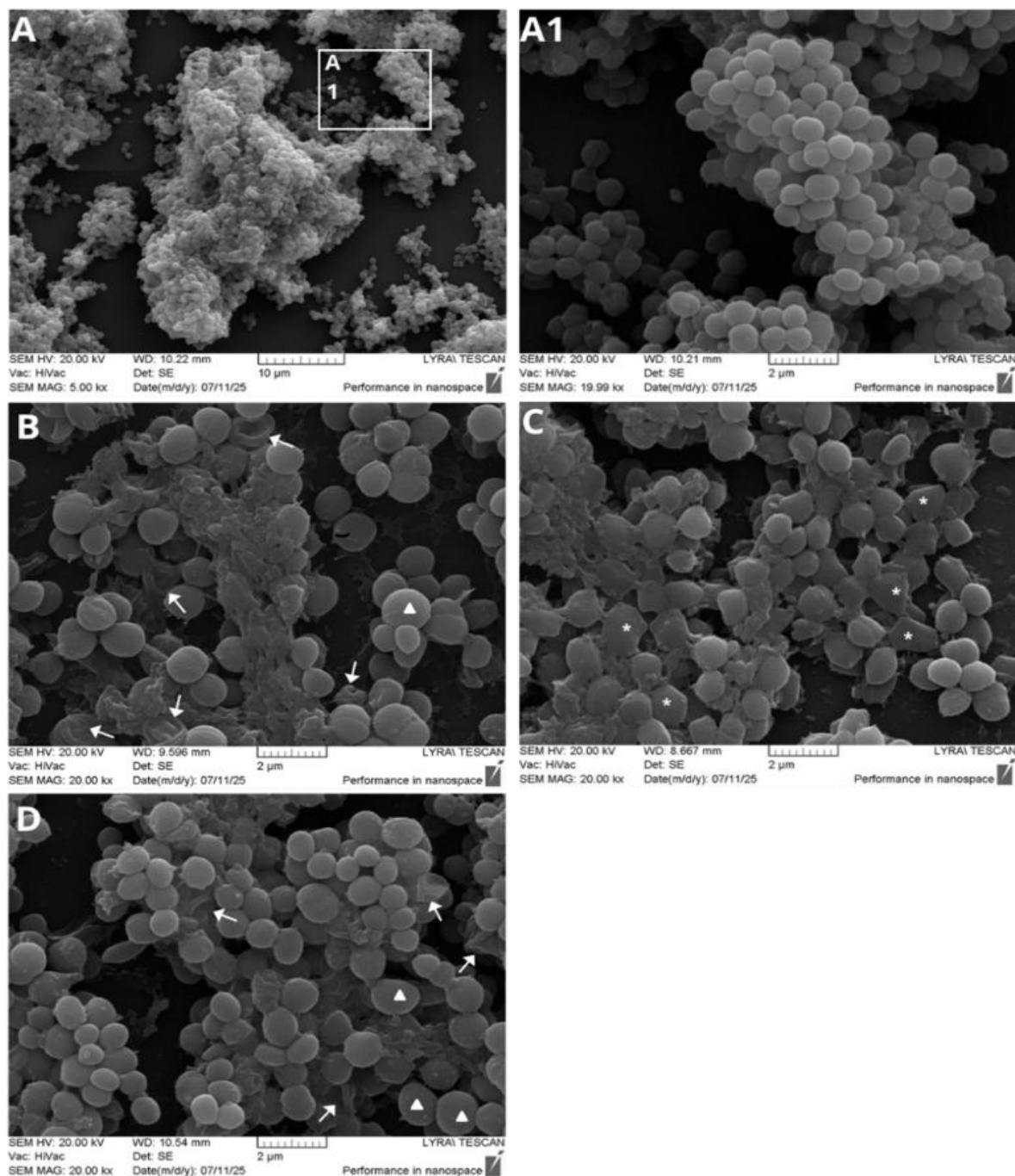
консорциуми и ясно изразена триизмерна организация. Наблюдават се видими отвори в интерстициалните кухини, а на клетъчно ниво се установяват клетки със сферична форма, размери, типични за вида – приблизително 0,5-1,0 μm , гладка повърхност, ясно очертани граници (Фигура 18А и 18А1).



Фигура 17. Определяне на жизнеспособността на бактериалните клетки в биофилма на *S. aureus*, култивиран в присъствие на различни лиофилизирани безклетъчни супернатанти, чрез конфокална лазерна сканираща микроскопия. Жизнеспособните клетки са оцветени в зелено, а нежизнеспособните – в червено. Бар = 20 μm .

В третираните проби се установяват отчетливи морфологични промени. В биофилмите, култивирани в присъствие на ЛБС от *L. plantarum* IZITR_24, се наблюдават увредени клетки със значителни инвагинации, включително радиални вдлъбвания по дължината на клетките, с картина, съвместима с изтичане на клетъчно съдържимо (Фигура 18В). При третиране с ЛБС от *L.*

paraplantarum IZITR_13 се установяват атипични клетки, които вместо характерната сферична форма показват сплескани и полигонални очертания (Фигура 18C). В пробите, култивирани в присъствие на ЛБС от *L. brevis* DPL5, отново се наблюдават клетки с необичайни вдлъбвания, както и клетки с размери, надвишаващи стандартните за вида (Фигура 18D).



Фигура 18. Сканираща електронна микроскопия на биофилми от *S. aureus*, култивирани в присъствие на: А) контрола – нетретирана проба; А1) увеличен изглед на избрано поле от контролната проба; В) ЛБС от *L. plantarum* IZITR_24; С) ЛБС от *L. paraplantarum* IZITR_13; D) ЛБС от *L. brevis* DPL5; Бяла стрелка – клетъчни инвагинации; бяла звезда – клетки с абнормна форма; бял триъгълник – клетки с увеличени размери. Ленти = 2 μm.

Паралелно с клетъчните изменения архитектурата на биофилма е чувствително редуцирана. В сравнение с контролата, третираните проби показват по-тънки, едно- или двуслойни структури, лишени от характерната многослойна сложност. SEM резултатите потвърждават CLSM находките и показват, че въздействието на ЛБС не се изчерпва с количествено ограничаване на биофилма, а включва промени в триизмерната му организация и морфологичната цялост на бактериалните клетки.

ИЗВОДИ

1. *Staphylococcus aureus* заема стабилно и съществено място в етиологичната структура на симптоматичните инфекции на горните дихателни пътища в установената в СМДЛ „Синево-България“ ЕООД популация.
2. Фенотипната идентификация на *Staphylococcus aureus* в доболничната практика е свързана с потенциал за грешки и отклонения от типичния профил, поради което самостоятелното ѝ прилагане не осигурява достатъчна надеждност, а подкрепата с молекулярно-биологични методи съществено повишава точността и намалява риска от неправилна интерпретация на клиничните изолати
3. Щамовете *Staphylococcus aureus*, изолирани в рамките на изследването, формират популация с висок резистентен товар, характеризираща се с доминираща устойчивост към β -лактамни антибиотици, повишена метицилинова устойчивост и практически значими нива на устойчивост към макролиди, линкозамиди, флуорохинолони и аминогликозиди, при установени генетични детерминанти, които в значителна степен обясняват наблюдавания фенотип.
4. *In silico* анализът показва, че клиничните изолати на *Staphylococcus aureus* притежават устойчив набор от гени, свързани с адхезия, персистиране и взаимодействие с имунната система на гостоприемника. Суперантигенните и част от ентеротоксинните детерминанти имат по-ограничено и неравномерно разпределение.
5. Повечето изолати *Staphylococcus aureus* демонстрират способност за формиране на биофилм, като интензитетът на биофилмообразуването варира значително между щамовете и се усилва при условия, наподобяващи средата на гостоприемника.
6. Скринингът на млечнокиселите бактерии показва ясно изразена щамова специфичност на антагонистичната активност спрямо *Staphylococcus aureus*, с широк диапазон от степени на инхибиране на растежа и биофилмообразуването между отделните изолати.
7. Химичният анализ, в съчетание с фракционирането чрез FPLC, показва, че основните антистафилококови ефекти на безклетъчните супернатанти млечнокиселите бактерии са свързани с нискомолекулни белтъчни

бактериоциноподобни фракции, докато липидната компонента не проявява самостоятелна инхибиторна активност спрямо растежа и биофилмообразуването на *Staphylococcus aureus*.

8. Проведеният геномен анализ на избраните млечнокисели бактерии потвърждава наличието на генни клъстери, свързани с потенциал за синтез на антимикробни пептиди, при отсъствие на генетични детерминанти, които биха поставили под съмнение пробиотичния им потенциал и тяхната безопасност.

9. Лиофилизираните безклетъчни супернатанти от *Levilactobacillus brevis* DPL5, *Lactiplantibacillus paraplantarum* IZITR_13 и *Lactiplantibacillus plantarum* IZITR_24 проявяват изразена дозозависима антистафилококова активност, като за всички щамове са определени минимални потискащи концентрации спрямо биофилмообразуването и планктонния растеж на *Staphylococcus aureus*.

10. Данните от проведената сканираща електронна микроскопия, показват че безклетъчните супернатанти на трите щама модифицират биофилм-асоциираното поведение на *Staphylococcus aureus* – редуцират количествено биофилмообразуването, променят архитектурата на зрелия биофилм и водят до отчетливи изменения в структурата на биофилма, клетъчната повърхност и морфологията на бактериалните клетки.

ПРИНОСИ

Приноси с научен характер

1. Доказана е клиничната значимост на *Staphylococcus aureus* като етиологичен агент в назофарингеалната ниша, базирайки се на интегрирана епидемиологична, фенотипна и генетична характеристика на доболнични изолати.

2. Направена е детайлна оценка на структурата на резистома на локална популация на *Staphylococcus aureus*, като са установени основните генетични детерминанти, свързани с устойчивостта към β -лактамни антибиотици, макролиди и линкозамиди.

3. Установен е комплексен профил на вирулентността на щамове *Staphylococcus aureus*, който демонстрира преобладаване на адхезионни и персистиращи детерминанти при относително ограничено разпределение на суперантигени и ентеротоксини.

4. Доказано е, че геномният анализ отразява функционалния потенциал, но не и задължително неговата фенотипна реализация, като е установено, че връзката генотип-фенотип при изследваните щамове има степенуван характер и зависи от условията на средата.

5. Характеризирани са особеностите на биофилмообразуването при клинични изолати на *Staphylococcus aureus* в условия, наподобяващи средата на гостоприемника, като е показано, че обогатяването на средата с глюкоза,

натриев хлорид и човешка кръвна плазма води до съществено усилване на формирания биофилм.

6. Изследван е пълният геном на новоизолирани щамове млечнокисели бактерии с антистафилококова активност и е доказана продукцията на антимикробни пептиди и липса на детерминанти, компрометиращи безопасността им.

Приноси с приложен характер

1. Създадена е актуална локална база данни за антимикробната чувствителност и генетичните детерминанти на резистентност при *Staphylococcus aureus* от горни дихателни пътища, с непосредствена приложимост при оптимизиране на емпиричната терапия и стратегиите за деколонизация.

2. Разработен е авторски комплексен модел за комбинирано прилагане на фенотипни, биохимични, молекулярни и пълногеномни подходи при рутинната и разширената характеристика на клинични изолати на *Staphylococcus aureus* в микробиологична лаборатория

3. За първи път е доказана приложимостта на whole-genome секвениране с платформа Oxford Nanopore Technologies за диагностични и епидемиологични цели.

4. Експериментално е демонстрирана възможността продукти от безклетъчна супернатанта от млечнокисели бактерии да модифицират растежа и биофилмообразуването на *Staphylococcus aureus*, което открива път за бъдещо разработване

Публикации във връзка с дисертацията

1. **Ilieva, L.**; Baev, V.; Marhova, M.; Yahubyan, G.; Apostolova, E.; Gozmanova, M.; Gochev, V.; Paunova-Krasteva, T.; Damyanova, T.; Kostadinova, S.; Gocheva, M.; Iliev, I. Potential of Fermented Food-Derived *Lactiplantibacillus* Cell-Free Supernatants to Control *Staphylococcus aureus* Growth and Biofilm Development. Int. J. Mol. Sci. 2026, 27, 760. <https://doi.org/10.3390/ijms27020760>
2. Iliev, I.; Yahubyan, G.; Apostolova-Kuzova, E.; Gozmanova, M.; Mollova, D.; Iliev, I.; **Ilieva, L.**; Marhova, M.; Gochev, V.; Baev, V. Characterization and Probiotic Potential of *Levilactobacillus brevis* DPL5: A Novel Strain Isolated from Human Breast Milk with Antimicrobial Properties Against Biofilm-Forming *Staphylococcus aureus*. Microorganisms 2025, 13, 160. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010160>

ЛИТЕРАТУРА

1. Alvarez-Sieiro, P.; Montalbán-López, M.; Mu, D.; Kuipers, O.P. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Extending the Family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 2939–2951.
2. BulSTAR. Антибиотична резистентност на Грам+ бактерии 2018-2021; Българска асоциация на микробиолозите (БАМ): София, България, 2021.
3. Christie, W.W. *Lipid Analysis*; 3rd ed.; The Oily Press, PJ Barnes & Associates: Bridgewater, UK, 2003; pp. 207–209.
4. Contarin, R.; Drapeau, A.; François, P.; Madec, J.-Y.; Haenni, M.; Dordet-Frisoni, E. The Interplay between Mobilome and Resistome in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 2024, 15, e02428-24.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net)–Annual Epidemiological Report 2023; ECDC: Stockholm, Sweden, 2024.
6. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 9.0; EUCAST: Växjö, Sweden, 2019.
7. Lade, H.; Kim, J.-S. Molecular Determinants of β -Lactam Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): An Updated Review. *Antibiotics* 2023, 12, 1362.
8. Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D.L.; Rice, L.B.; Stelling, J.; Struelens, M.J.; Vatopoulos, A.; Weber, J.T.; Monnet, D.L. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, 18, 268–281.
9. Perez, R.H.; Zendo, T.; Sonomoto, K. Novel Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria (LAB): Various Structures and Applications. *Microb. Cell Fact.* 2014, 13, S3.; Maldonado-Barragán, A.; Caballero-Guerrero, B.; Lucena-Padrós, H.; Ruiz-Barba, J.L. Induction of Bacteriocin Production by Coculture Is Widespread among Plantaricin-Producing *Lactobacillus plantarum* Strains with Different Regulatory Operons. *Food Microbiol.* 2013, 33, 40–47.
10. Sakr, A.; Brégeon, F.; Mège, J.-L.; Rolain, J.-M.; Blin, O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2419.
11. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007, 115, 891–899.
12. Straub, J.A.; Hertel, C.; Hammes, W.P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Prot.* 1999, 62, 1150–1156.
13. Zhou, W.; Jin, Y.; Zhou, Y.; Wang, Y.; Xiong, L.; Luo, Q.; Xiao, Y. Comparative genomic analysis provides insights into the evolution and genetic diversity of community-genotype sequence type 72 *Staphylococcus aureus* isolates. *mSystems* 2021, 6, e00986-21.