

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” - ВАРНА
Факултет “Медицина”
Катедра “Микробиология и вирусология”

проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм

АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА
НАЙ-ЧЕСТИТЕ ПРИЧИНИТЕЛИ НА БАКТЕРИЕМИИ
И ЛЕТАЛИТЕТ, СВЪРЗАН С ТЯХ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на научна степен «Доктор на науките»

ВАРНА, 2023

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” - ВАРНА
Факултет “Медицина”
Катедра “Микробиология и вирусология”

проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм

АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА
НАЙ-ЧЕСТИТЕ ПРИЧИНИТЕЛИ НА БАКТЕРИЕМИИ
И ЛЕТАЛИТЕТ, СВЪРЗАН С ТЯХ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на научна степен «Доктор на науките»

Научна специалност:

«Микробиология»

ВАРНА, 2023

Дисертационният труд е написан в обем от 296 стр., съдържа 234 страници текст, 27 фигури, 36 таблици и приложение с 10 таблици. Използвани са общо 655 литературни източника, от които 5 на кирилица и 650 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за публична защита на катедрен съвет на катедра „Микробиология и вирусология“ при МУ „Проф. д-р П. Стоянов“- Варна на 10.08.2023г.

НАУЧНО ЖУРИ

Проф. д-р Ива Христова, дмн

Проф. д-р Людмила Боянова, дмн

Проф. д-р Стефана Събчева, дм

Проф. д-р Румяна Марковска, дм

Доц. д-р Калинка Божкова, дм

Проф. д-р Илина Мичева, дм

Проф. д-р Валерия Калева, дм

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на2023г. от часа в зала на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Медицински Университет „Проф. д-р П. Стоянов“ - Варна.

БЛАГОДАРНОСТИ

Първо бих искала да благодаря на моя съпруг за безрезервната подкрепа, търпение и примера, който беше за мен през всичките години. Благодаря ти!

Изказвам своите сърдечни благодарности за помощта, професионализма и приятелството на Клара Докова, Радка Стоянова, на колективите на Лабораторията по клинична микробиология към УМБАЛ “Света Марина“ и на катедрата по Микробиология и Вирусология към Медицински Университет, Варна!

Благодаря на проф. д-р Иван Митов и на колегите от катедра „Медицинска Микробиология“ на Медицински Университет, София за дългогодишното професионално сътрудничество!

ПОСВЕЩЕНИЕ

Посвеждавам тази работа на моите скъпи родители!

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ОХЗ - онкохематологични заболявания
bla - гени, кодиращи β -лактамази
BCR - Blood Culture Rate
BSIs - Bloodstream Infections (инфекции на кръвния ток / на кръвта)
BG - Bulgaria
CDC - Centre for Disease Prevention and Control
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
CRE - Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*
CR - Carbapenem-Resistant
CVC - Central Venous Catheter
CoNS - Coagulase-Negative Staphylococcus
DDDs - Defined Daily Doses
DALYs - Disability-Adjusted Life-Years (години живот загубени поради болест и/или преждевременна смърт)
EU - European Union
Efm - *Enterococcus faecium*
ESBL - Extended-Spectrum Beta-Lactamase (широкоспектърна бета-лактамаза)
ESKAPE - *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp.
ESCAPE - *E. faecium*, *S. aureus*, *C. difficile*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*
ESKAPEEc - *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *E. coli*
EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control
GVHD - Graft Versus Host Disease (болест на присадката срещу хазяина)
HICs - High Income Countries (страни с висок доход)
HLAR - High Level Aminoglycoside Resistance
ISs - Insertion Sequences (инсерционни последователности)
ICU - Intensive Care Unit (Клиника за интензивно лечение)
LCBI - Laboratory Confirmed Bloodstream Infections (Лабораторно потвърдена инфекция на кръвта)
MBI - LCBI - Mucosal Barrier Injury Laboratory Confirmed Bloodstream Infection (Лабораторно потвърдена инфекция на кръвта, асоциирана с увреждане на лигавична бариера)
LICs - Low Income Countries (страни с нисък доход)
LMICs - Low- and Middle-Income Countries (страни с нисък и среден доход)
MBLs - Metallo-beta lactamases (метало β -лактамази)
MLST - Multi Locus Sequence Typing (Мультилокусно секвениране)
MRCoNS - Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci
MRSA - Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
MIC - Minimal Inhibitory Concentration
MDR - Multidrug Resistant
NA - not applicable
OXA - oxacillinase
PDR - Pan Drug Resistant
PCR - Polymerase Chain Reaction
ST - Sequence Type (секвенциален тип)
TSM - trimethoprim/sulphomethoxazole
UH - University Hospital
VRE - Vancomycin-Resistant *Enterococcus*
VREfm - Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*
VREf - Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*
XDR - Extensively Drug Resistant

ВЪВЕДЕНИЕ

Въпреки изключително големия напредък на медицината от последните десетилетия, инфекциите на кръвта продължават и днес да са сред значимите проблеми, свързани с общественото здраве и водеща причина за заболяемост и смъртност. Честотата на тези инфекции в популационни проучвания в Европа и Северна Америка варира между 113 и 204 на 100 000 човеко-години (Goto M, 2013), а смъртността се оценява между 15% и 30% (Hattori H, 2018). Обширно проучване върху глобалната смъртност, свързана с 33 клинично значими бактериални патогена проведено през 2019г., обхващащо 343 милиона индивидуални записа в 204 страни, съобщава за общо 13.7 милиона смъртни случая, свързани с инфекции. От проучените 11 инфекциозни синдрома, два се свързват с над 2 милиона смъртни случая всеки: инфекциите на долния респираторен тракт - с 4 милиона и инфекциите на кръвта - с 2.91 милиона смъртни случая (Ikuta K, 2022). В допълнение, инфекциите на кръвта са идентифицирани като водещ инфекциозен синдром в два супер-региона на света, а *Staphylococcus aureus* като глобална водеща причина за фатални кръвни инфекции, отговорен за 299 000 смъртни случая през 2019г. (Ikuta K, 2022).

През 2008г. Rice обединява бактериалните видове *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. в група наречена “ESKAPE” като най-честите причинители на животозастрашаващи инфекции, свързани с медицинското обслужване и заради способността си да избягват ефекта на редица антибиотици и заради профила си на множествена резистентност (Rice L, 2008). През 2009г. е предложен по-адекватен акроним **ESCAPE**, като „С“ се отнася за *Clostridioides difficile*, важен вътреболничен патоген, който също може лесно да придобива множествена резистентност, а “Е” - за *Enterobacteriaceae*, отнасящо се до всички Грам отрицателни чревни бактерии, вкл. *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp. и *Enterobacter* spp. (Peterson L, 2009). Именно заради своята изключително проблемна резистентност, някои от тези патогени (vancomycin-резистентни *Enterococcus faecium*, карбапенем-резистентни *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Enterobacteriaceae*) попадат и в списъка на микроорганизми на Световната Здравна Организация (СЗО), които са с приоритет „критичен“ за проучване и създаване на нови, ефективни антибиотици (WHO, 2017).

Редица проучвания демонстрират освен нарастване на товара на бактериалните инфекции на кръвта в световен мащаб, така и устойчива тенденция към бързо увеличаване честота на инфекциите, причинени от ESKAPE групата, представляващи между 50 и 70% от етиологичния им спектър, като често тези инфекции се асоциират с продължителен болничен престой, увеличени икономически разходи и по-лош изход заради неадекватна и забавена антимикробна терапия поради антибиотичната резистентност на причинителите си (De Kraker M, 2013; Founou R, 2017; Marturano J, 2019; Pogue J, 2015; Stewardson A, 2016; Tacconelli E, 2019; Yang S, 2019; Zhen X, 2019).

Медицинският напредък и възможностите за лечение на редица заболявания води до непрекъснато нарастване групата на имунокомпрометираните пациенти (такива с онкохематологични заболявания, трансплантирани, ICU пациенти и др.). В последните години в световен мащаб е налице ясна тенденция за увеличаване честотата на инвазивните, животозастрашаващи инфекции, причинени от множествено-резистентни ESKAPE патогени и в тази специфична група, като тези

микроорганизми са сред водещите причини за смъртност (*Gustinetti G, 2016; Martinez-Nadal G, 2020*).

Понастоящем антибиотичната резистентност е една от най-важните причини за смърт в глобален мащаб, асоциираща се с болестен товар, по-висок от този на HIV или малария (*Ikuta K, 2022*), като през 2050г. се смята, че тя ще бъде причина номер едно за смъртност, изпреварвайки дори онкологичните заболявания (*O'Neill J, 2016*). През 2019г. СЗО обявява „Антибиотичната резистентност“ като една от десетте заплахи за общественото здраве, добавяйки още два индикатора към своята програмата за периода 2019 - 2023г.: инфекциите на кръвта, причинени от *E. coli*, резистентни на цефалоспорини от трета генерация и метицилин-резистентни *S. aureus* (MRSA), както и консумацията на антибиотици на национално ниво (*WHO, 2019*).

В контекста на казаното, инфекциите на кръвта, причинени от резистентни микроорганизми представлява много актуален медицински проблем. Извършването на надзор и анализ на важни микробиологични и епидемиологични аспекти на тези инфекции, касаещи тенденции в етиологичния спектър и антибиотичната чувствителност на патогените, рисковите фактори и леталитета, който ги съпътства, предоставят важна информация на клиничните специалисти и професионалистите по контрол на инфекциите за създаването на адекватни лечебни алгоритми и програми за превенция и контрол на локално ниво. От друга страна, адекватно извършваният надзор на локално ниво, допринася съществено за разширяването на данните и научната информация за антибиотичната резистентност на национално ниво и за извършването на анализ на генерираната информация с цел оценка тежестта на антибиотичната резистентност при различни инфекции, в частност тези на кръвта. Генерирането на висококачествени и сравними данни по тези проблеми, позволяват интегрирането им с данни от Европейски и Глобални мрежи за надзор и подпомагат създаването на политики, насочени към ограничение и контрол на проблема “Антибиотична резистентност” на национално и глобално ниво.

I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се извърши микробиологично и епидемиологично проучване върху антибиотичната резистентност на най-честите причинители на бактериемии за 10 годишен период и леталитета, свързан с тях.

Във връзка с тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се определи и анализира етиологичния спектър на лабораторно потвърдените бактериалните инфекции на кръвта, доказани при хоспитализирани пациенти в УМБАЛ“Света Марина“ в периода 2011 - 2020г. (независимо от възраст, пол, диагноза, клиника) и да се проучи резистентността към антимикробни лекарствени средства на най-честите причинители на бактериемии, асоцииращи се с тези инфекции, като се оцени и тренда в развитие на резистентността във времето.
2. Да се проучат генетичните механизми на резистентност към цефалоспорини от трета генерация и карбапенеми в репрезентативни карбапенем-резистентни *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* complex и *Acinetobacter baumannii* изолати от кръв и да се извърши епидемиологично типизиране.
3. Да се определи и анализира етиологичния спектър на лабораторно потвърдените бактериалните инфекции на кръвта, доказани при хоспитализирани пациенти с онко-хематологични заболявания (независимо от възраст, пол, диагноза) в периода 2010 - 2020г. и да се проучи резистентността към антимикробни

лекарствени средства на най-честите причинители на бактериемии, асоцииращи се с тези инфекции, като се оцени и тренда в развитие на резистентността във времето.

4. За всички болнично лекувани пациенти с инфекции на кръвта, причинени от седем бактериални вида в периода 2016 - 2020г. (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex, *P. aeruginosa*) да се извлече, обобщи и асоциира информация, свързана с 27 променливи.
5. Да се изчисли показателят „30-дневен леталитет“ (общ и специфичен - по възрастови групи, пол, вид на клиниката, място на придобиване, микробен вид, комбинация “микроорганизъм/антибиотик”) в групата на всички болнично лекувани пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта, причинени от 7-те бактериални вида в периода 2016 - 2020г., както и да се идентифицират рисковите факторите, които влияят върху 30-дневния леталитет.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Дизайн на проучването

Настоящото проучване е с ретроспективен описателен дизайн, целящ анализ на честотата на клинично значимите бактериемии, техните микробни причинители и рисковите фактори за смъртен изход при инфекциите на кръвта в пациенти лекувани в УМБАЛ“Света Марина“, Варна за 10 годишен период (2011 - 2020г.).

В проучването са включени всички клинично значими епизоди на бактериемия (свързани с инфекция), доказани при пациенти, лекувани в посочения период, независимо от тяхната възраст, пол, диагноза и клиника. Отделно са проучени всички клинично значими епизоди на бактериемия в болнично лекувани пациенти с онкохематологични заболявания за 11 годишен период (2010 - 2020г.), независимо от техния пол, възраст и диагноза.

Епизодите на фунгемиа, епизодите на бактериемия, отчетени като „контаминация“, дублиращи се бактериални изолати от един и същ пациент, както и еднократно изследвани хемокултури, положителни за представители на нормалната кожна микробна флора са изключени от проучването. Болничната и Лабораторната информационни системи са използвани за събирането на информация, отнасяща се до доказване на епизодите на клинично значими бактериемии в периода 2010 - 2020г., техните етиологични агенти и чувствителността им към антимикробни лекарствени средства. В проучването са включени всички епизоди на бактериемия, които отговарят на следните определения:

- За епизодите на бактериемия, асоциирани с Грам - отрицателни и Грам положителни бактерии, различни от резидентната кожна микрофлора (коагулаза-негативни стафилококи, коринебактерии, *Propionibacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. (различни от *B. anthracis*): всеки епизод, при който е налице микробна изолация от 1 или повече хемокултурелни сета.
- За епизодите на бактериемия, асоциирани с представители на резидентната кожна микрофлора: всеки случай, при които е налице изолация от два или повече хемокултурелни сета на изолати от един същи бактериален вид в рамките на 48 часа, както и при изолация на един и същи бактериален вид от централен венозен катетър и от периферен съд едновременно, при наличие на симптоми на инфекция (фебрилитет (>38⁰C) / втрисане / хипотония).

Датата на вземане на първата положителна хемокултура е приета за дата на настъпване на бактериемията и нейното диагностициране. Положителна хемокултура със същия микроорганизъм (демонстриращ и идентична чувствителност), доказана в рамките на до 30 дни от първата положителна хемокултура при съответния пациент, не е включена в проучването. Полимикробна бактериемия е отчетена, когато са идентифицирани повече от 1 микробен вид в рамките на един епизод. При доказване на полимикробна бактериемия, при която единият изолат е част от нормалната кожна микрофлора, той е изключен от проучването. Когато в хемокултура е идентифициран друг бактериален вид, различен от вида, доказан в първата положителна хемокултура, вторият епизод е отчетен като нов епизод. Хемокултурата е интерпретирана като клинично незначима, когато някой от следните микроорганизми е идентифициран в един хемокултурелен сет, получен от един пациент в един ден: коагулаза-негативни стафилококи, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. (без *B. anthracis*). При изолиране на повече от един микроорганизъм, представител на нормалната кожна микрофлора в една хемокултура, тя е интерпретирана като контаминирана и изключена от проучването.

Един сет хемокултури се състои от една кръвна проба, инокулирана в една аеробна и една анаеробна бутилка, съдържащи бульонна хранителна среда.

При 798 пациента с лабораторно (културелно) потвърдени инфекции на кръвта, причинени от *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii - calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa* в периода 2016 - 2020г., с цел оценка на 30-дневния леталитет и рисковите фактори за това, е събрана информация за общо 27 променливи (демографски, клинични, микробиологични - микробен вид, антибиотична резистентност). С цел отразяване на данните за всеки пациент, свързани с 27-те променливи, беше разработен формуляр за събиране на информация от болничната документация на пациенти лекувани в УМБАЛ „Света Марина“ (приложение 2 от дисертацията).

В допълнение, 30-дневния леталитет, свързан с инфекции на кръвта, причинени от 7 антибиотично - резистентни бактериални вида *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii - calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa* (най-важни, сред които MRSA, резистентни на 3-та генерация цефалоспоринови Грам отрицателни бактерии, карбапенем-резистентни *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *Enterobacteriaceae*) е сравнен с 30-дневния леталитет при кореспондиращите не-антибиотично резистентни инфекции, с цел оценка на антибиотичната резистентност като рисков фактор за 30-дневния леталитет.

Показанията за включване на пациентите са:

1. Хоспитализация в УМБАЛ „Света Марина“ в периода 2016 - 2020г.
2. Доказан епизод на клинично значима бактериемия, причинена от *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii - calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa* в периода 2016 - 2020г.
3. Налична информация за всички 27 променливи.

Проучените общо 798 пациента са стратифицирани на базата на клиничния изход от хоспитализацията на две групи: първа група, която преживява в рамките на поне 30 дни и втора, която умира в рамките на 30 дни от момента на вземането на положителната хемокултура.

Проучването е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания с протокол No92/02.04.2020г.

Дефиниции:

- **Бактериемия:** присъствие на бактерии в кръвта.

- **Бактериална инфекция на кръвта/кръвния ток:** изолиране на бактериален патоген, който не е част от резидентната микрофлора, от една или повече хемокултури. В случая с кожни коменсали като *CoNS*, *Corynebacterium* spp. (без *C. diphtheriae*), *Bacillus* spp. (без *B. anthracis*), *Micrococcus* spp. са необходими поне 2 последователни положителни хемокултури със същия микроорганизъм, взети по различно време в рамките на 48ч. на фона на поне един от следните симптоми: повишена температура, втрисане и хипотония.
- **Инфекция на кръвта, придобита в обществото:** дефинира се, когато първата доказана положителна хемокултура е взета в рамките на ≤ 48 часа от хоспитализацията.
- **Вътреболнична инфекция на кръвта:** дефинира се, когато първата доказана положителна хемокултура е взета след 48 час от хоспитализацията.
- **Лабораторно потвърдена инфекция на кръвта:** използвани са критериите на CDC/National Healthcare Safety Network (NHSN) (*NHSN, 2023*; <https://www.cdc.gov/nhsn/psc/bsi/>)
- **Кумулативна заболяемост от инфекции на кръвта / бактериемии:** показателят е изчислен на 1000 хоспитализации за всяка една година от периода 2011 - 2020г.
- **Метицилин - резистентни стафилококи:** cefoxitin/oxacillin резистентни стафилококи, определени чрез дисково - дифузионния метод или чрез автоматизирана система.
- **Изолати, суспектни за продуценти на широкоспектърни бета-лактамази (ESBLs) от семейство *Enterobacteriaceae*:** изолати, демонстриращи резистентност към ceftazidime/cefotaxime/ceftriaxone.
- **Карбапенем - нечувствителни *Enterobacterales*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*:** изолати с интермедиерна чувствителност или резистентност към един или повече карбапенемни антибиотици според CLSI, използван в периода 2010 - 2015г. и EUCAST, използван в периода 2016 - 2020г.
- **Множествена резистентност (MDR) при *P. aeruginosa*:** резистентност към 3 или повече от следните антимикробни групи: цефалоспорици от трета генерация, piperacillin/tazobactam, карбапенемни, флуорохинолони и аминогликозиди (*Magiorakos A, 2012*).
- **MDR *A. baumannii*:** не-чувствителност към поне един агент в три или повече от следните групи антимикробни лекарствени средства: аминогликозиди (gentamicin, amikacin, tobramycin), антипсевдомонадни карбапенемни (imipenem, meropenem), антипсевдомонадни флуорохинолони (ciprofloxacin, levofloxacin), пеницилини + бета-лактамазен инхибитор (sulbactam), инхибитори на синтеза на фолиева киселина (trimethoprim/sulphamethoxazole), полимиксини (colistin, polymyxin B) и тетрациклини. **XDR *A. baumannii*:** не-чувствителност към поне един агент във всички, с изключение на 2 или 1 от посочените групи (*Magiorakos A, 2012*).

2. Микробиологични методи

2.1. Доказване на микроорганизми в кръв

- автоматизирана система за апаратно инкубиране на хемокултури (ВАСТЕС, BD, USA).

2.2. Видова идентификация

- Конвенционални биохимични методи: мануални биохимични тестове; Crystal (BD, USA); Phoenix (BD, USA)
- *gyr B* PCR за видова идентификация на *A. baumannii* (*Higgins PG, 2007*)

- *hps60* секвениране за идентификация на видовете от *E. cloacae* complex

2.3. Изпитване на чувствителност към антимикробни лекарствени средства

- дисково-дифузионен метод на Бауер-Кърби (CLSI, EUCAST)
- автоматизирана система (Phoenix, BD, USA)
- микродилуционен метод за определяне на МПК (MIKROLATEST, Erba Lachema, Czech Republic)

2.4. Молекулярно-генетични методи за доказване на гени, кодиращи ESBLs и карбапенемази (TEM, SHV, CTX-M, KPC, VIM, IMP, NDM, OXA-23/24/51/58/143/235)

- PCR (*Higgins P, 2010; Higgins P, 2013; Markovska R, 2008; Poirel L, 2006; Poirel L, 2011; Turton J, 2006; Woodford N, 2006*)
- ДНК секвениране

2.5. Епидемиологично типизиране

- ERIC-PCR (*Versalovic J, 1991*)
- RAPD PCR (*Grundmann H, 1997*)
- REP-PCR (*Healy M, 2005*)
- MLST (*Diancourt L, 2005*)

3. Статистически методи

Всички анализи в проучването са извършени със статистическия пакет IBM SPSS version 21.0.

В описателния анализ качествените променливи са представени с абсолютен брой и относителен дял, а количествените, със средна стойност и стандартно отклонение или с медиана и интерквартилен обхват (IQR), в зависимост от вида на разпределението, предварително проверено чрез теста на Колмогоров Смирнов.

Кумулативната заболяемост от инфекции на кръвта / бактериемии за 1 година (на 1000 хоспитализации) е изчислена като броят на новодиагностицираните епизоди на бактериемия е разделен на броя на хоспитализациите за една година x 1000.

Тридесет дневен леталитет, асоцииран с конкретна инфекция на кръвта е изчислен като броят на починалите пациенти с инфекция на кръвта (от даден причинител), починали в интервал от 30 дни от поставяне на диагнозата е разделен на броя на пациентите с инфекция от същия причинител (представен в %). Тридесет дневният леталитет в цялата проучвана група пациенти с инфекции на кръвта е изчислен като броят на пациентите, починали в интервал от 30 дни от поставяне на диагнозата (независимо от конкретния причинител) е разделен на общия брой пациенти с инфекции на кръвта (представен в %).

Всички честотни показатели за леталитет, кумулативна заболяемост, болестност са представени с 95% интервали на доверителност.

При проверката на хипотези за връзка между две качествени променливи (например изход от заболяването и резистентност) е използван тестът хи - квадрат или точен тест на Фишер. При изследване на връзката между две величини, измерени по ординалната скала е използвана рангова корелация на Спирман.

Трендът във времето за развитието на антибиотичната резистентност е тестван с Chi-squared test for trend.

За да се изследва ефекта на рисковите фактори върху риска за умиране е използвана бинарна едно и многофакторна логистична регресия.

Всички статистически тестове са двустранни.

Резултатите са отчитани като статистически значими при допустимо ниво на грешка $\alpha=0.05$.

III. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Етиологичен спектър на бактериалните инфекции на кръвта в болнично лекувани пациенти за 10-годишен период (2011-2020г.)

През проучвания период от време в Лабораторията по микробиология на УМБАЛ“Света Марина“, Варна са изследвани 27 650 хемокултурелни сета, получени от 15 602 хоспитализирани пациенти. Изолирани и идентифицирани са общо 2727 неповтарящи се микробни изолата, свързани с клинично значими епизоди на бактериемия и фунгемия при 2715 пациента (17.4%). Относителният дял на положителните хемокултури средно за 10-годишния период, интерпретирани като клинично значими е 9.9% (таблица 7)¹. Етиологичната структура на инфекциите на кръвта общо за целия десет годишен период е представена на таблици 8, 9 и 11.

Делът на ESKAPEEc изолатите (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *E. coli*) за целия десет годишен период е 66.8%. Делът на изолатите, отнасящи се към осемте бактериални вида, мониториращи от EARS Net (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*) е средно 64.7% във времето от 2011г. до 2020г., като делът им е най-нисък през 2012г. (47.9%) и достига до 71.1% през 2020г. Представителите на микробните видове *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. и *P. aeruginosa* през всички проучвани години попадат сред най-честите бактериални видове, асоцииращи се с инфекции на кръвта.

Таблица 7. Общ брой изследвани пациенти, дял на положителните хемокултури от общия брой хемокултури, BCR и кумулативна заболяемост от инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

Година	Общ брой изследвани пациенти, (n)	Пациенти с клинично значими микробни изолати от кръв , (%)	Положителни хемокултури (%) [*]	Клинично значими положителни хемокултури (%)	BCR ^{**}	Кумулативна заболяемост от инфекции на кръвта
2011	1418	14.4	19.1	12.0	5.6	4.1/1000
2012	1424	15.8	20.0	13.6	5.3	4.4/1000
2013	1462	17.0	21.4	14.2	5.4	4.5/1000
2014	1549	20.1	20.6	14.2	7.0	5.6/1000
2015	1581	17.5	15.9	10.3	8.6	5.2/1000
2016	1541	19.7	20.2	11.4	8.1	5.7/1000
2017	1568	18.9	13.9	8.5	10.6	5.6/1000
2018	1536	18.6	13.4	8.1	10.7	5.1/1000
2019	1754	16.5	11.8	6.9	13.8	5.2/1000
2020	1769	15.4	13.6	7.6	13.9	5.9/1000
2011/2020	15 602	17.4	16.0	9.9	-	-

^{*} вкл. и контаминираните хемокултури; ^{**}BCR, Blood Culture Rate (брой хемокултурелни сетове/1000 легло-дни).

¹ Номерата на таблиците и фигурите в автореферата съответстват на тези в дисертацията.

Таблица 8. Спектър на причинителите на лабораторно потвърдените инфекции на кръвта в болнично лекувани пациенти за 10-годишен период (2011-2020г.).

Микробни причинители, 2011 - 2020г. n (%)	2011 n, (%)	2012 n, (%)	2013 n, (%)	2014 n, (%)	2015 n, (%)	2016 n, (%)	2017 n, (%)	2018 n, (%)	2019 n, (%)	2020 n, (%)	p
Грам отрицателни бактерии 1605 (58.9)	117 (57.4)	146 (64.9)	147 (59.0)	195 (62.5)	175 (63.2)	192 (62.1)	172 (57.9)	164 (57.4)	157 (53.8)	140 (50.7)	0.035
Грам положителни бактерии 972 (35.6)	68 (33.3)	64 (28.4)	89 (35.7)	83 (26.6)	84 (30.3)	104 (33.7)	117 (39.4)	111 (38.8)	126 (43.2)	126 (45.7)	0.006
Гъбички 150 (5.5)	19 (9.3)	15 (6.7)	13 (5.2)	34 (10.9)	18 (6.5)	13 (4.2)	8 (2.7)	11 (3.8)	9 (3.0)	10 (3.6)	0.009
Общо 2727 (100.0)	204 (100)	225 (100)	249 (100)	312 (100)	277 (100)	309 (100)	297 (100)	286 (100)	292 (100)	276 (100)	-

Таблица 9. Детайлизирана етиологична структура на лабораторно потвърдените инфекции на кръвта в болнично лекувани пациенти за 10-годишен период (2011-2020г.).

Етиологичен причинител	n, (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	462 (17.2)
<i>E. coli</i>	399 (14.6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	329 (12.0)
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	218 (8.0)
<i>Enterococcus faecalis</i>	171 (6.3)
<i>Acinetobacter baumannii</i> - <i>calcoaceticus</i> complex	171 (6.3)
<i>Candida</i> spp.	150 (5.5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	120 (4.4)
<i>Streptococcus viridans</i>	86 (3.2)
<i>Enterococcus faecium</i>	72 (2.6)
Коагулаза негативни стафилококи (CoNS)	62 (2.3)
<i>Serratia marcescens</i>	59 (2.2)
<i>Citrobacter</i> spp.	53 (1.9)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	43 (1.6)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	41 (1.5)
<i>Proteus mirabilis</i>	40 (1.47)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35 (1.3)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	28 (1.0)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	27 (0.99)
<i>Pseudomonas</i> spp. (различни от <i>P. aeruginosa</i>)	23 (0.8)
<i>Streptococcus bovis</i>	22 (0.8)
<i>Bacteroides</i> spp.	17 (0.6)
<i>Morganella morganii</i>	15 (0.55)
<i>Salmonella</i> spp.	13 (0.47)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	12 (0.44)
<i>Proteus vulgaris</i>	8 (0.3)
Други*	51 (1.1)
Общо клинично значими микроорганизми от хемокултури	2727 (100.0)

* Бактериални видове, представени с <=5 изолата.

Таблица 11. Разпределение по години на 10-те най-често изолирани микробни вида от кръв, причинители на бактериални инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

Бактериален вид	2011-2020 n (%)	2011 n (%)	2012 n (%)	2013 n (%)	2014 n (%)	2015 n (%)	2016 n (%)	2017 n (%)	2018 n (%)	2019 n (%)	2020 n (%)	<i>p</i>
<i>S. aureus</i>	462 (17.2)	32 (15.7)	29 (12.9)	41 (16.5)	28 (9.0)	52 (18.8)	42 (13.6)	50 (16.8)	71 (24.8)	61 (20.9)	56 (20.3)	0.048
<i>E. coli</i>	399 (14.6)	35 (17.1)	29 (12.9)	24 (9.6)	30 (9.6)	38 (13.7)	51 (16.5)	33 (11.1)	50 (17.5)	62 (21.2)	47 (17.0)	0.145
<i>K. pneumoniae</i>	329 (12.0)	26 (12.7)	36 (16.0)	36 (14.4)	52 (16.7)	23 (8.3)	36 (11.7)	35 (11.8)	30 (10.5)	33 (11.3)	22 (8.0)	0.035
<i>E. cloacae</i> complex	218 (8.0)	13 (6.4)	13 (5.8)	16 (6.4)	30 (9.6)	52 (18.8)	31 (10.0)	22 (7.4)	13 (4.5)	12 (4.1)	16 (5.8)	0.618
<i>A. baumannii</i>	171 (6.3)	12 (5.9)	17 (7.6)	22 (8.8)	30 (9.6)	15 (5.4)	19 (6.1)	19 (6.4)	13 (4.5)	8 (2.7)	16 (5.8)	0.067
<i>E. faecalis</i>	171 (6.3)	17 (8.3)	9 (4.0)	18 (7.2)	14 (4.5)	8 (2.9)	20 (6.5)	20 (6.7)	15 (5.2)	17 (5.8)	33 (12.0)	0.351
<i>P. aeruginosa</i>	120 (4.4)	7 (3.4)	13 (5.8)	16 (6.4)	8 (2.6)	15 (5.4)	14 (4.5)	19 (6.4)	11 (3.8)	8 (2.7)	9 (3.3)	0.381
<i>S. viridans</i>	86 (3.2)	2 (1.0)	5 (2.2)	5 (2.0)	12 (3.8)	4 (1.4)	14 (4.5)	9 (3.0)	9 (3.1)	13 (4.5)	13 (4.7)	0.011
<i>E. faecium</i>	72 (2.6)	5 (2.4)	5 (2.2)	10 (4.0)	7 (2.2)	2 (0.7)	3 (1.0)	14 (4.7)	6 (2.0)	9 (3.0)	11 (4.0)	0.486
<i>CoNS</i>	62 (2.3)	6 (2.9)	4 (1.8)	4 (1.6)	6 (1.9)	5 (1.8)	8 (2.6)	7 (2.4)	2 (0.7)	12 (4.1)	8 (2.9)	0.442
Други	637 (23.4)	49 (24.0)	65 (28.9)	57 (22.9)	95 (30.4)	63 (22.7)	71 (23.0)	69 (23.2)	66 (23.0)	57 (19.5)	45 (16.3)	-
Общо	2727 (100.0)	204 (100.0)	225 (100.0)	249 (100.0)	312 (100.0)	277 (100.0)	309 (100.0)	297 (100.0)	286 (100.0)	292 (100.0)	276 (100.0)	-

Задоволителното ниво на детекция на инфекциите на кръвта зависи в много голяма степен от честота на хемокултурелното изследване. В настоящото проучване, обхващащо продължителен десет годишен период, се доказва 2.5 пъти увеличение на показателя „BCR” от 5.6 през 2011г. до 13.9 през 2020г., което корелира с нарастване на показателя „кумулятивната заболяемост от инфекции на кръвта“ в годините от 4.1 на 1000 хоспитализации през 2011г. до 5.9 на 1000 хоспитализации през 2020г. По данни на EARS Net за 2020г., в Европейските страни, участващи в надзора на антибиотичната резистентност на инвазивни бактериални изолати, показателят “BCR” варира в много широки граници: от 3 за Украйна, 5 за Грузия, 6 за Беларус и Косово, 10.4 за България и 11 за Русия, между 17.2 - 37.9 за Унгария, Румъния, Словакия, Чехия, Естония, Малта и Германия, между 54.4 - 109.5 за Франция, Исландия, Италия, Норвегия и Испания, до 202.4 за Дания и 244.2 за Португалия (ECDC, 2022). Въпреки установената положителната тенденция за нарастване в това проучване обаче, драматичните различия, които съществуват по отношение на този показател между България и повечето Европейски държави, показват необходимостта от полагане на усилия за стимулиране на клиничните специалисти за изследване на допълнителни хемокултури с цел по-точна и адекватна диагностика на инфекциите на кръвта.

В настоящото проучване делът на истински положителните (клинично значими) хемокултури за проследявания 10-годишен период е 9.9%. Микроорганизми, интерпретирани като контаминанти, бяха установени в 6.1% от всички изследвани хемокултури. Този резултат значително надвишава общоприетата препоръка за дял на контаминирани хемокултури до 3% (Dargère, S 2018). Доколкото контаминиращите микроорганизми са най-често част от нормалната кожна микрофлора, с цел правилна интерпретация на микробиологичния резултат, за клиничния микробиолог е необходима не само информацията относно демографските показатели на пациента, но и пълноценна клинична информация, тъй като сама по себе си изолацията на микроорганизъм от хемокултура винаги поставя въпроса за необходимост от провеждане на антибиотична терапия.

През последните две декади, етиологията на инфекциите на кръвта претърпява значителни промени, като проучванията, оценяващи голям брой случаи на инфекции на кръвта в не-селектирана популация от пациенти са относително малко. Настоящото изследване доказва, че за целия десет годишен период на проследяването по-чести етиологични агенти на инфекции на кръвта в хоспитализирани пациенти са Грам отрицателните бактерии (58.9%), с водещи патогени *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. При проследяване на етиологичния спектър в годините обаче, се установява статистически значим тренд за намаляващ дял на Грам отрицателните бактерии от 57.4% през 2011г. до 50.7% през 2020г. ($p=0.035$). Делът на Грам положителните бактерии за целия десет-годишен период е 35.6%, като водещите микробни видове са *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. viridans*, *E. faecium* и CoNS. Проучването доказва ясен тренд към трайно увеличаване дела на Грам положителните бактерии от 33.3% през 2011г. до 45.7% през 2020г. ($p=0.006$). Десетте най-чести патогена, доказани в това проучване (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. faecalis*, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex, *P. aeruginosa*, *S. viridans*, *E. faecium*, CoNS), съставляват 76.9% от всички изолати, като статистически значима тенденция за увеличение в периода 2011 - 2020г. се наблюдава за *S. aureus* ($p=0.048$) и *S. viridans* ($p=0.011$), а тренд към намаление - за *K. pneumoniae* ($p=0.035$). Най-честият бактериален вид в целия десет годишен период, независимо от Грамовата принадлежност, е *S. aureus* (17.2%), следван от *E. coli* (14.6%), като двата вида често сменят позицията си в годините. В пет от годините *S. aureus* заема първа позиция (2013г., 2015г., 2017г., 2018г., 2020г.), а *E. coli* - през 2011г., 2016г. и 2019г. съответно.

Бактериалният вид *K. pneumoniae*, заемащ трета позиция в 5 от 10-те години, през 2012г. и 2014г. е първи в етиологичния спектър. Подобно, *E. cloacae*, традиционно заемащ 4 или 5 позиция, през 2014 и 2015г. е на второ и съответно първо място заедно с *A. baumannii* и *S. aureus* в съответната година. През 2020г. *E. faecalis* се измества от обичайното си 4 или 5 място, на по-предната трета позиция след *S. aureus* и *E. coli*, а през 2021г. общо изолатите от видовете *E. faecalis* и *E. faecium* заемат първо място в етиологичния спектър на инфекциите на кръвта (непоказани данни), което е в унисон със съобщеното от EARS Net за 2021г. за Европейския съюз (ECDC, 2022; ECDC, 2022a). По отношение на *S. aureus*, се установява статистически значим тренд на увеличаване дела на този бактериален вид от 15.7% през 2011г. до 20.3% през 2020г. При *E. coli*, вторият по честота вид за проучвания 10-годишен период, наблюдаваме значителни вариации в относителния дял без да се доказват статистически значими разлики в годините ($p > 0.05$): в периода 2011- 2015г. е налице тренд за намаляване от 17.1% до 13.7%, след което се установява тенденция за увеличение и достигане през 2020г. нивата от 2011г., преминавайки през пик от 21.2% през 2019г.

Делът на ESKAPEEs изолатите от общия брой инвазивни изолати за целия 10-годишен период е 66.8%, а този на мониторираните от EARS Net бактериални видове - 64.7%. Получените резултати от настоящото проучване са в съответствие със SENTRY Antimicrobial Resistance Program, която публикува своите данни, отнасящи се до видовата принадлежност на 264 901 бактериални изолати, получени от пациенти с инфекции на кръвта за 20-годишен период (1997-2016), рапортувани от над 200 медицински центъра в 45 държави в Европа, Северна и Южна Америка и Азиатско-тихоокеанския регион (Diekema D, 2019). Подобно на установеното от нас, за целия период на проучването *S. aureus* (20.7%) и *E. coli* (20.5%) се доказват като най-честите етиологични агенти, общо представляващи около 40% от всички инфекции на кръвта, следвани от *K. pneumoniae* (7.7%), *P. aeruginosa* (5.35) и *E. faecalis* (5.2%). В настоящото 10-годишно проучване, *S. pneumoniae* остава извън 10-те най-чести патогени, заемащ 17 позиция с 1.3%. Идентифицирането на серотипове 3 и 19A като най-чести, е в съответствие с резултатите от друга надзорна система (EU-IBD), която рапортува за периода 2014 - 2018г. серотиповете 8, 3, 19A, 22F, 12F, 9N, 15A, 10A, 23B, 6C и 11A като най-чести, отговорни за 70% от всички случаи на инвазивни пневмококови инфекции с известен серотип през 2018г. (ECDC, 2022d). Макар да идентифицира *S. pneumoniae* сред 10-те най-чести етиологични агента, SENTRY Antimicrobial Resistance Program едновременно с това доказва тренд за намаляващ дял на *S. pneumoniae* в периода 1997 - 2016г. (Diekema D, 2019). В синхрон с това, и други автори съобщават за същата тенденция след 2000г. и като цяло за нисък относителен дял на *S. pneumoniae* инфекциите на кръвта (Австралия, Финландия, Швеция, Германия и др.), подобно на установеното в настоящото проучване, което до голяма степен е отражение на имунизационното и серотипово покритие, свързано с наличните пневмококови ваксини

Противоположно на установеното от нас, SENTRY Antimicrobial Resistance Program доказва ръст на дела на Грам отрицателните микроорганизми сред десетте най-чести причинителя (от 33.5% до 43.4%) в периода 1997г. - 2016г. (Diekema D, 2019). Резултатите за доминацията на *S. aureus* и *E. coli* като най-честите етиологични агенти на инфекции на кръвта се потвърждават и от няколко големи популационни и многоцентрови болнични проучвания, проведени след 2010г., макар, че трябва да се подчертае, че съществуващата информация е изключително хетерогенна. Редица проучвания от региони като Япония, Тайланд, Австралия, други страни в Азия, Африка докладват висока честота на *Burkholderia pseudomallei* (8.97%), *Salmonella non-typhi* spp. (67.7%), *Salmonella enterica* serovar Typhi (29.3%), микобактерии (6.1%),

потвърждавайки значението на някои географски, климатични и социално-икономически особености на съответните регион.

2. Антибиотична резистентност на най-честите причинители на бактериемии, асоциирани с инфекции на кръвта в болнично лекувани пациенти за 10-годишен период (2011-2020г.)

2.1. Грам положителни бактерии

Staphylococcus aureus

S. aureus е сред най-честите и важни човешки патогени, отговорен за около 20-30% от инфекциите на кръвта и тези на хирургическото място и до 50% от инфекциите на костите и ставите. В 10 - годишния период на изследването чувствителността към methicillin, gentamicin, флуорохинолони, макролиди, линкозамиди, гликопептиди и linezolid е проучена сред общо 462 кръвни изолата *S. aureus*. За целия период на проучването дялът на MRSA е 15.4%. Резистентността към съответните антибиотични групи в намаляващ ред е както следва: макролиди, 20.6% > gentamicin, 16.5% > methicillin, линкозамиди, 15.4% > флуорохинолони, 12.3% > гликопептиди, linezolid, 0.2% (таблица 12).

Сред най-проблемната и мониторирана резистентност, характерна за *S. aureus*, е метицилиновата (MRSA). Този тип резистентност детерминира не-чувствителност към почти целия спектър бета-лактамни антибиотици, като много от MRSA изолатите са резистентни едновременно и към други групи антибиотични групи, което значително затруднява лечението. За проследявания десет годишен период се установява относителен дял на кръвните изолати MRSA, близък и малко по-нисък от средния за Европа в периода 2011 - 2020г. (15.5 - 18.8%). В този времеви интервал за Европейския съюз се доказва статистически значим тренд за намаляващ дял на MRSA (ECDC, 2012; ECDC, 2022), което като тенденция също се потвърждава от някои многоцентрови и едноцентрови проучвания в различни Европейски и Азиатски държави. Данните от EARS Net за 2020г. показват, че Кипър и Румъния са с най-високи нива на MRSA (49.1% и 47.3% съответно), а най-нисък дял се докладва в Холандия, Дания и Норвегия (1.4 - 1.7%) (ECDC, 2022). В България за периода 2011 - 2020г. относителният дял на MRSA показва трайна тенденция да намалява от 22.4% през 2011г. до 11.8% през 2020г. (ECDC, 2012; ECDC, 2017; ECDC, 2022). В настоящото едноцентрово проучване, се установяват значителни вариации в дела на MRSA в годините (между 32.1% през 2014г. до 12.5% през 2020г.) без да се доказва статистически значим тренд за намаляване ($p=0.973$). Въпреки това обаче, в края на проучвания период (2020г.) дялът на MRSA (12.5%) е по-нисък от средния за Европа (16.7%) и много близък до средния за България (11.8%) за същата година (ECDC, 2022).

Проследена във времето, активността на гликопептидните антибиотици и linezolid остава стабилна, като сред всички 462 изолата тези две антибиотични групи демонстрират най-висока активност (99.8%). Само един изолат *S. aureus*, резистентен едновременно към vancomycin и linezolid, е идентифициран през целия 10-годишния период (2020г.). В този смисъл, в случаите на MRSA инфекции на кръвта, vancomycin или linezolid остават препарати на избор за лечение.

В настоящото проучване беше установена статистически значима тенденция в годините за увеличаване резистентността на *S. aureus* към gentamicin (от 6.3% през 2011г. до 14.3% през 2020г.) ($p=0.045$), макролидите (от 9.4% до 32.1%) ($p=0.001$) и clindamycin (от 6.3% до 28.6%) ($p=0.001$).

Таблица 12. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на изолати *S. aureus* от кръв на пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

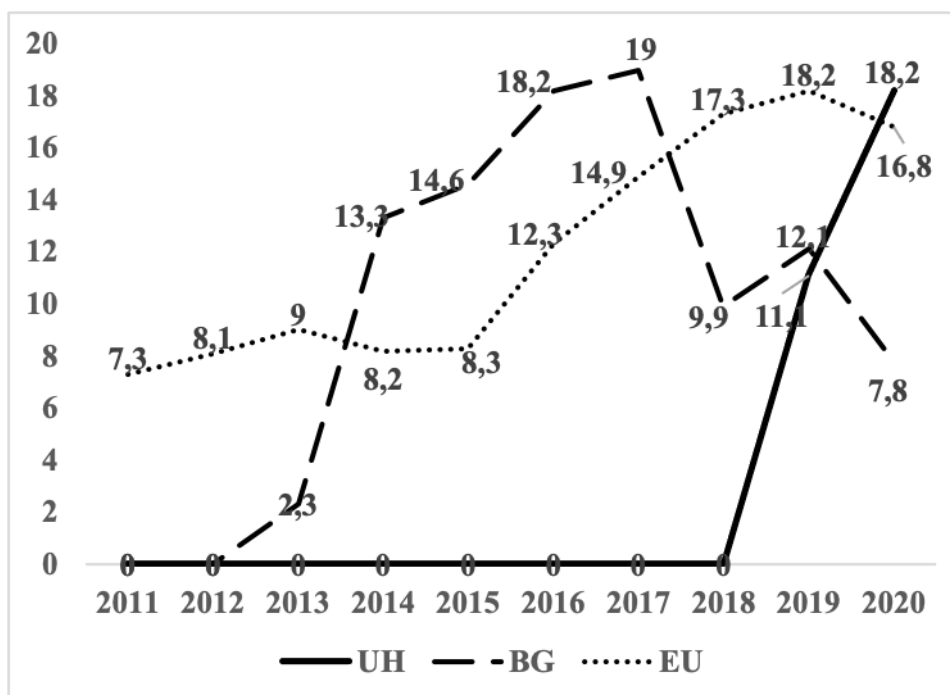
АБ група	2011 - 2020		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		p
	n	% R	n	% R	n	% R	n	% R	n	% R	n	% R	n	% R	n	% R	n	% R	n	% R	n	% R	
MRSA	462	15.4	32	9.4	29	10.3	41	19.5	28	32.1	52	15.4	42	16.7	50	8.0	71	14.0	61	19.7	56	12.5	0.973
gentamicin	462	16.5	32	6.3	29	13.8	41	4.9	28	14.3	52	21.2	42	19.0	50	22.0	71	18.3	61	21.3	56	14.3	0.045
ciprofloxacin	462	12.3	32	9.4	29	13.8	41	17.0	28	17.9	52	21.2	42	9.5	50	12.0	71	7.0	61	11.5	56	8.9	0.251
макролиди	462	20.6	32	9.4	29	10.3	41	7.3	28	17.9	52	23.0	42	23.8	50	16.0	71	23.9	61	26.2	56	32.1	0.001
clindamycin	462	15.4	32	6.3	29	3.4	41	2.4	28	10.7	52	19.2	42	9.5	50	14.0	71	19.7	61	21.3	56	28.6	0.001
гликопептиди	462	0.2	32	0.0	29	0.0	41	0.0	28	0.0	52	0.0	42	0.0	50	0.0	71	0.0	61	0.0	56	1.8	0.122
оксазолидинони	462	0.2	32	0.0	29	0.0	41	0.0	28	0.0	52	0.0	42	0.0	50	0.0	71	0.0	61	0.0	56	1.8	0.122

Enterococcus spp.

Ентерококите са Грам положителни бактерии, които се откриват като част от нормалната микрофлора на гастро-интестиналния тракт при човека и животните, но притежават потенциала да причиняват инвазивни инфекции в условията на дисбиоза. Тези микроорганизми притежават механизми, които им позволяват да колонизират болничната среда и да персистират продължително в нея, което улеснява трансмисията им чрез множество пътища на крос-контаминация, вкл. чрез чужди тела. *E. faecalis* и *E. faecium* са най-често изолираните видове, асоцииращи се с вътреболнични взривове от инфекции на кръвта, инфекции на уринарния тракт и ендокардити. Важна особеност на ентерококите е освен вродената им резистентност към цефалоспорици, така и придобитата им високо ниво резистентност към няколко групи антибактериални препарати: гликопептиди, аминопеницилини и аминогликозиди. Понастоящем най-проблемна е гликопептидната резистентност, медираща се от *van* гени. Често *vancomycin*-резистентните ентерококи демонстрират фенотип на множествена резистентност.

В 10-годишния период на изследването чувствителността към аминопеницилини, аминогликозиди (HLAR), ciprofloxacin, гликопептиди и linezolid е проучена сред общо 171 изолата *E. faecalis* и 72 *E. faecium*. За целия период, делът на *vancomycin* - резистентните *E. faecium* (VREfm) е 4.2%, като тези изолати демонстрират едновременно резистентност и към teicoplanin, аминопеницилини, HLAR, флуорохинолони, но са със съхранена чувствителност към linezolid. Не се доказват *vancomycin*- и *linezolid*-резистентни *E. faecalis*.

Резистентността към съответните антибиотични групи в намаляващ ред за *E. faecalis* е както следва: HLAR, 48.5% > ciprofloxacin, 35.7% > аминопеницилини, 9.4%. Нивата на резистентност за изолатите *E. faecium* са съответно: аминопеницилини, 95.3% > HLAR, 90.3% > ciprofloxacin, 84.7% > гликопептиди, 4.2%. Не се идентифицират *linezolid*-резистентни *E. faecium*. (фигура 4, таблица 14).



Фигура 4. Сравнително представяне на относителния дял на *vancomycin* - резистентните *E. faecium*, изолирани от хемокултури в периода 2011 - 2020г. (източник за EU и BG: <https://atlas.ecdc.europa.eu/>; <https://ecdc.europa.eu>).

Таблица 13. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на изолати *E. faecalis* от кръв на пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

АБ група	2011 – 2020		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		p
	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	
аминопеницилини	171	9.4	17	0.0	9	11.1	18	0.0	14	0.0	8	0.0	20	5.0	20	0.0	15	0.0	17	0.0	33	0.0	0.544
HLAR	171	48.5	17	17.6	9	33.3	18	33.3	14	50.0	8	75.0	20	85.0	20	90.0	15	46.7	17	29.4	33	33.3	0.532
гликопептиди	171	0.0	17	0.0	9	0.0	18	0.0	14	0.0	8	0.0	20	0.0	20	0.0	15	0.0	17	0.0	33	0.0	NA
linezolid	171	0.0	17	0.0	9	0.0	18	0.0	14	0.0	8	0.0	20	0.0	20	0.0	15	0.0	17	0.0	33	0.0	NA
ciprofloxacin	171	35.7	17	23.5	9	33.3	18	22.2	14	0.0	8	37.5	20	65.0	20	45.0	15	13.3	17	41.2	33	48.5	0.268

Таблица 14. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на изолати *E. faecium* от кръв на пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

АБ група	2011 - 2020		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		p
	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	
аминопеницилини	72	95.3	5	100	5	60.0	10	100	7	100	2	100	3	100	14	100	6	100	9	88.9	11	100	0.414
HLAR	72	90.3	5	100	5	80.0	10	100	7	100	2	100	3	66.6	14	100	6	83.3	9	77.8	11	81.8	0.208
гликопептиди	72	4.2	5	0.0	5	0.0	10	0.0	7	0.0	2	0.0	3	0.0	14	0.0	6	0.0	9	11.1	11	18.2	0.026
linezolid	72	0.0	5	0.0	5	0.0	10	0.0	7	0.0	2	0.0	3	0.0	14	0.0	6	0.0	9	0.0	11	0.0	NA
ciprofloxacin	72	84.7	5	100	5	100	10	100	7	85.7	2	100	3	0.0	14	71.4	6	100	9	88.9	11	81.8	0.524

Статистически значим тренд за увеличение на резистентността в годините сред изолатите *Enterococcus* spp. се доказва само за гликопептидната група антибиотици сред представителите на вида *E. faecium*: от 0% в периода 2011 - 2018г. до 11.1% през 2019г. и 18.2% през 2020г. Този резултат потвърждава докладваната от EARS Net особено неблагоприятна тенденция за Европа в периода 2011 - 2020г. за нарастване дела на vancomycin-резистентните *E. faecium* от средно 7.3% през 2011г. до 16.8% през 2020г. (ECDC, 2012; ECDC, 2022), като най-засегнати са Литва (66.4%), Малта (55%) и Кипър (51.2%). За България делът на VRE през 2021г. е 10.1%, като в периода 2011 - 2020г. и у нас се доказва тенденцията за нарастване на този тип резистентност (от 0.0% през 2011г. до 7.8% през 2020г.), с пик в периода 2014 - 2017г. (13.3% - 19%) (ECDC, 2018; ECDC, 2020).

Проучване върху епидемиологичните тенденции и рискови фактори, свързани с резистентността на ентерококите към vancomycin в пациенти с инфекции на кръвта в Европа (общо 30 държави) в периода 2012 - 2018г., също потвърждава като статистически значим тренда за постоянно нарастващ дял на VREfm от 8.1% през 2012г. до 19.0% през 2018г. Авторите отбелязват, че това е тенденция наблюдавана във всички 4 Европейски региона, като са налице значителни регионални различия: по-висок дял на VREfm в Източна и Северна Европа (32% и 28.4%) в сравнение с този в Южна и Западна (15.3% и 18.5%), което е в контраст с типичния градиент Север/Запад - Юг/Изток, характерен за много други бактериални патогени. Отбелязва се и значителна интра-регионална хетерогенност на ниво държава в 4-те Европейски региона, вероятно свързано със специфични локални фактори (Ayobami O, 2020a).

Нарастващият проблем с увеличаване дела на VREfm, причиняващи инфекции на кръвта, също се потвърждава и от самостоятелни проучвания, проведени в отделни Европейски държави (Германия, Испания, Италия, Словакия, Норвегия) и Турция. Трябва да се отбележи, че въпреки увеличението дял на VREfm за Европа (20% през 2021г.), той остава по-нисък от съобщените данни за САЩ (66%) и Австралия (45%) (Armin S, 2019; Coombs G, 2020; Jabbari S, 2019; Mendes R, 2018; Moghimbeigi A, 2018).

В настоящото проучване всички VREfm изолати са и teicoplanin-резистентни, което предполага, че вероятно резистентността в тези изолати се медира от VanA гена. Ко-резистентността във VREfm към всички тествани антибиотични групи, без linezolid, демонстрира изключително ограничените възможности за терапия на инфекции на кръвта, асоциирани с VREfm. Съхранената активност на linezolid в такива случаи го прави препарат на последен избор за терапия, макар вече да има съобщения за възникване в Европа на резистентност към linezolid в ентерококи, вкл. във VREfm.

В настоящото проучване сред цялата колекция от 72 изолата *E. faecium*, установяваме силно редуцирана активност на всички антибиотични групи (над 80%), с изключение на гликопептидите и linezolid, които остават препарати на избор за лечение на инфекции на кръвта, причинени от *E. faecium*.

Докато VREfm са докладват от различни региони по света, *E. faecalis* остава значително по-слабо засегнат вид по отношение на резистентността към гликопептидните антибиотици. В настоящото проучване за 10-годишния период не са идентифицирани кръвни изолати *E. faecalis*, резистентни на vancomycin и teicoplanin. Този резултат потвърждава докладваното от Ayobami et al. за нисък среден дял на vancomycin-резистентни *E. faecalis* (VREf), асоциирани с инфекции на кръвта в Европа в периода 2012 - 2018г. (1.1%), но с ясни регионални различия: по-висок дял на VREf в Северна и Източна Европа (2.2% и 2.3%) спрямо Западна и Южна (0.21% и 1.0%) (Ayobami O, 2020a). Националните данни за България в периода 2011 - 2020г. сочат дял на VREf под 1% през 2011г. до 0% през 2020г., но с пик през 2013г. от 3% (<https://atlas.ecdc.europa.eu/>).

В настоящото проучване, в групата на *E. faecalis* изолатите се установяват високи нива на хинолонова резистентност и HLAR (над 30% и над 48% съответно), при съхранена активност на аминопеницилините (под 10% резистентност) ($p > 0.05$). Средната за Европа HLAR в кръвни изолати *E. faecalis* показва статистически значим тренд за намаление в периода 2011 - 2020г. (от 33.7% до 29%), като варира в широки граници - от 6.7% в Швеция до 55.2% в Полша. За същия период в България делът на HLAR *E. faecalis* нараства от 30.6% през 2011г. до 47.9% през 2021г., което е в съответствие с резултатите от това проучване (ECDC, 2022a).

2.2. Грам отрицателни бактерии

E. coli

E. coli е Грам отрицателен бактериален вид, репрезентативен за семейство *Enterobacteriaceae*. Той е част от нормалната чревна флора, но и причинител на интестинални и екстра-интестинални инфекции, включително тежки инвазивни инфекции като инфекции на кръвта, сепсис и менингит (Bonten M, 2020). Сред най-проблемната резистентност в този бактериален вид е резистентността към цефалоспорини от трета генерация и карбапенеми, като основният генетичен механизъм на тази резистентност е ензимния, медиран от продукцията на различни бета-лактамази (ESBLs; AmpC β -лактамази, карбапенемази) (Bush K, 2020).

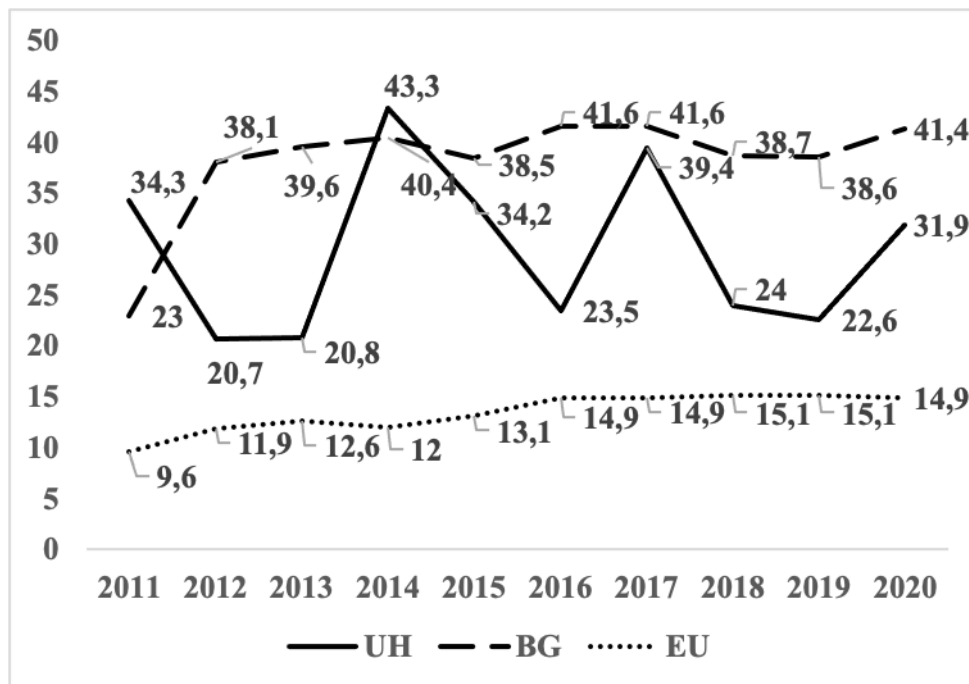
В 10-годишния период на изследването чувствителността към аминопеницилини, цефалоспорини от трета генерация, карбапенеми, аминогликозиди и флуорохинолони е проучена сред общо 399 кръвни изолата *E. coli*. Резистентността към съответните антибиотични групи в намаляващ ред за целия период е както следва: ampicillin, 63.2% > ciprofloxacin, 33.6% > цефалоспорини от трета генерация, 28.8% > gentamicin, 21.3% > amikacin, 3.3% > меропенем, 0.3% (таблица 15, фигура 6).

Установеният относителен дял на резистентни към цефалоспорини 3-та генерация кръвни изолати *E. coli* е значително по-висок от средния за Европа в периода 2011 - 2020г. (между 9.6% - 15.1% - 14.9%) (ECDC, 2017; ECDC, 2022). Трябва да се отбележи положителната тенденция в Европейския съюз във времеви интервал между 2016г. и 2021г. за статистически значимо намаляване дела на тези изолати, като през 2020г. и 2021г. средния дял достига 14.9% и 13.8% (ECDC, 2022). През 2021г. най-голям е броят на страните в EU с резистентност между 5 и 10%, като най-ниско ниво се съобщава за Норвегия (5.5%), а най-високо за България (37.3%). За нашата страна нивата на тази резистентност в периода 2011- 2020г, са между 23% и 41.4% и са най-високи в съюза. Проследен в по-дълъг времеви интервал (2002 - 2020г.), трендът в Европа по отношение резистентността към цефалоспорини 3-та генерация в кръвни изолати *E. coli* е да нараства, особено демонстративно до 2012г. и по-малко изразено след този период (<https://ecdc.europa.eu>). Сходни тенденции за нарастващ дял на резистентните към цефалоспорини 3-та генерация кръвни изолати *E. coli* се съобщават в скорошни проучвания на европейски автори и международни мрежи. За 2019г. Глобалната система за надзор на антибиотичната резистентност и употреба съобщава по-висок среден дял на инфекциите на кръвта, причинени от *E. coli*, резистентни на цефалоспорини от трета генерация (36.6%), но на фона на значими разлики в нивата на резистентност между LMICs (58.3%) и HICs (17.53%) (GLASS, 2021).

Сред проучваните общо 399 кръвни изолата *E. coli*, бе идентифициран само един, резистентен на карбапенеми (0.3%), което прави карбапенемната група антибиотици с най-висока и съхранена активност към *E. coli* понастоящем.

Таблица 15. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на изолати *E. coli* от кръв на пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

АБ група	2011-2020		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		p
	n	% R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	
аминопеницилини	399	63.2	35	68.6	29	69.0	24	75.0	30	80.0	38	60.5	51	56.9	33	60.6	50	62.0	62	51.6	47	65.9	0.1
3 генерация цефалоспорици	399	28.8	35	34.3	29	20.7	24	20.8	30	43.3	38	34.2	51	23.5	33	39.4	50	24.0	62	22.6	47	31.9	0.9
карбапенеми (меропенем)	399	0.3	35	0.0	29	0.0	24	0.0	30	0.0	38	0.0	51	0.0	33	3.0	50	0.0	62	0.0	47	0.0	0.6
gentamicin	399	21.3	35	22.8	29	20.7	24	29.2	30	26.7	38	26.3	51	19.6	33	30.3	50	20.0	62	16.1	47	12.8	0.9
amikacin	399	3.3	35	0.0	29	0.0	24	4.2	30	3.3	38	7.9	51	5.9	33	0.0	50	4.0	62	0.0	47	6.4	0.4
флуорохинолони	399	33.6	35	40.0	29	31.0	24	29.2	30	40.0	38	26.3	51	37.3	33	39.4	50	20.0	62	38.7	47	34.0	0.8



Фигура 6. Сравнително представяне на относителния дял на резистентните към цефалоспоринови от трета генерация *E. coli*, изолирани от хемокултури в периода 2011 - 2020г. (в %) (източник за EU и BG: <https://atlas.ecdc.europa.eu/>; <https://ecdc.europa.eu>)

Макар да остава нисък в Европа, в последния 5 годишен период (2017 - 2021г.) се установява сигнификантна тенденция за увеличение дела на карбапенем-резистентните *E. coli*, като най-висок е този дял в Гърция (1.1%) и Кипър (1%), следвани от Италия, Румъния и България с дял по 0.4%. Това е единственият тип резистентност в *E. coli* в EU, за който се установява статистически значим тренд за нарастване в периода 2017 - 2021г. (ECDC, 2022a).

Настоящото проучване установява и висок дял на резистентните към аминопеницилини *E. coli* (средно за периода 63.2%) - от 68.6% през 2011г. до 65.9% през 2020г. Тези резултати са в съответствие с националните данни за България, като в същия период те варират от 60.5% през 2011г. до 66.7% за 2020г., като във втория пет годишен период се установява сигнификантен тренд за намаляване. Такава е и общата Европейска тенденция, макар тя да е в по-ниския диапазон: от 57.6% през 2011г. до 54.6% през 2020г. (ECDC, 2012; ECDC, 2017; ECDC, 2022).

След аминопеницилините, в групата на изолатите *E. coli*, най-сериозно е засегната чувствителността към флуорохинолони - над 30% резистентност. Макар да се отбелязва спад в дела на флуорохинолон-резистентните изолати - от 40% през 2011г. до 34%, той е без статистическа значимост. В същия период, нивата на средната флуорохинолонова резистентност в този бактериален вид за Европа е по-нисък - между 22% и 23.8% с флукуации в отделните години, а за България те са близки до установените от нас - между 30% и 42.95 (ECDC, 2012; ECDC, 2022).

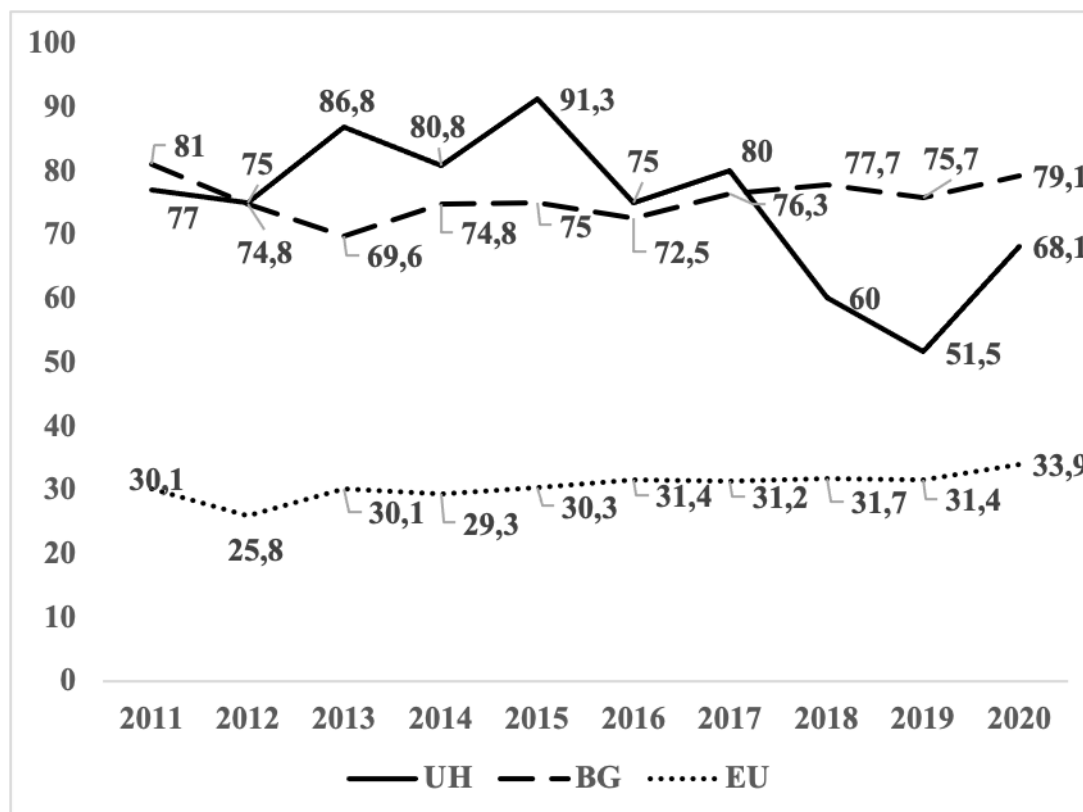
Средната резистентност към gentamicin в *E. coli* за десет годишния период е 21.3%, като макар и статистически незначим, се доказва спад от 22.8% през 2011г. до 12.8% през 2020г. Възможно обяснение на този тренд е в рестриктираната консумация на gentamicin в болницата в този период.

След карбапенемите, amikacin е антибактериалният препарат с най-висока активност и доказани най-ниски средни нива на резистентност (3.3%), въпреки тенденцията в годините тя да нараства - от 0% през 2011г. до 6.4% през 2020г. (p>0.05).

Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae е Грам отрицателен опортюнистичен патоген. Сред членовете на семейство *Enterobacteriaceae*, този бактериален вид най-често се асоциира с вътреболнични инфекции, като има способността бързо да се разпространява и засяга пациентите (Di Franco S, 2021). Най-проблемният аспект при този бактериален вид обаче е свързан с продукцията на няколко вида бета-лактамази (ESBLs и карбапенемази), медиращи резистентността към бета-лактамни антибиотици. Документираната висока резистентност към стратегически бета-лактамни антибиотици в *K. pneumoniae*, се асоциира и с дисеминация на глобални, високо-рискови клонове, носещи мобилни елементи (плазмиди, интегрони), които медираат от една страна повсеместното разпространение на ESBLs и/или карбапенемази, а от друга - възникването на резистентност и към множество различни антибиотични групи (хинолони, аминогликозиди, тетрациклини, trimethoprim/sulfamethoxazole, др.), превръщайки изолатите в множествено- и дори пан-драг резистентни.

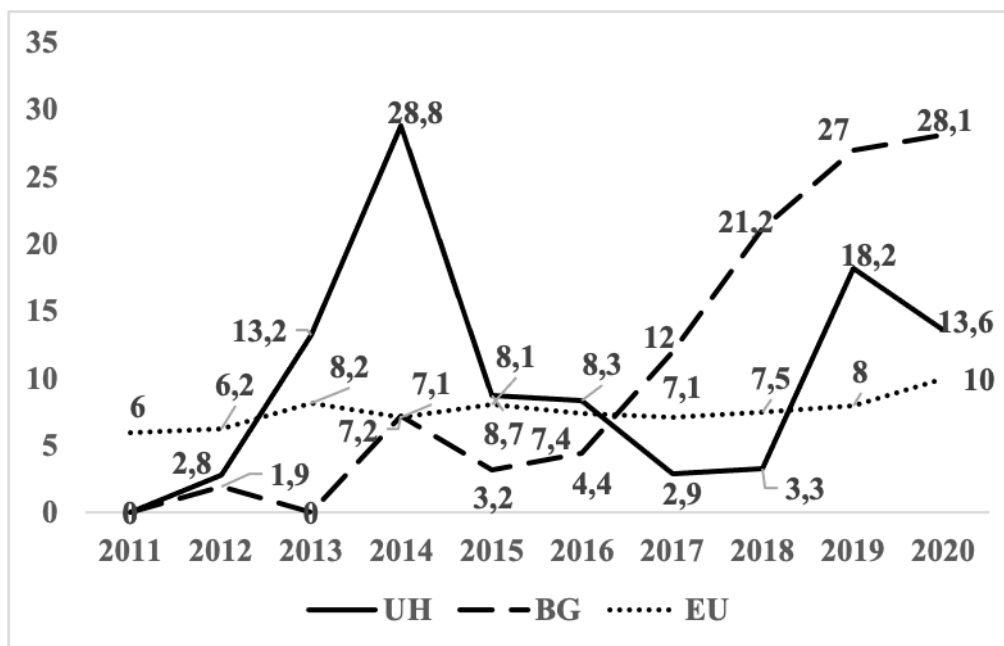
В 10-годишния период на изследването чувствителността към цефалоспорици от трета генерация, карбапенеми, аминогликозиди и флуорохинолони е проучена сред общо 331 кръвни изолата *K. pneumoniae*. Резистентността към съответните антибиотични групи е представена на таблица 16 и фигури 11 и 12. Резистентността в групата на карбапенем-резистентните изолати (11.8%) към основни групи антимикробни лекарствени средства е както следва: amoxicillin/clavulanic acid, 100%; ceftriaxone, ceftazidime, 100%; piperacillin/tazobactam, 92.3%; tobramycin, 89.7%; gentamicin, 76.9%; amikacin, 17.9%; ciprofloxacin, 100%; levofloxacin, 97.4%; trimethoprim/sulphomethoxazole, 51.3%; colistin, 6%.



Фигура 11. Сравнително представяне на относителния дял на резистентните към цефалоспорици от трета генерация *K. pneumoniae*, изолирани от хемокултури в периода 2011 - 2020г. (в %) (източник за EU и BG: <https://atlas.ecdc.europa.eu/>; <https://ecdc.europa.eu/>).

Таблица 16. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на изолати *K. pneumoniae* от кръв на пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

АБ група	2011-2020		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		p
	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	
3 генерация цефалоспорици	331	74.9	26	77.0	36	75.0	38	86.8	52	80.8	23	91.3	36	75.0	35	80.0	30	60.0	33	51.5	22	68.1	0.063
карбапенеми (meropenem)	331	11.8	26	0.0	36	2.8	38	13.2	52	32.7	23	8.7	36	8.3	35	2.9	30	3.3	33	18.2	22	13.6	0.554
gentamicin	331	58.6	26	73.0	36	55.5	38	71.0	52	77.0	23	60.8	36	52.8	35	62.9	30	43.3	33	33.3	22	40.9	0.006
amikacin	331	13.9	26	15.4	36	19.4	38	13.2	52	9.6	23	21.7	36	2.8	35	17.1	30	20.0	33	6.0	22	22.7	0.940
флуорохинолони	331	61.0	26	61.5	36	50.0	38	76.3	52	55.	23	69.6	36	63.9	35	68.6	30	60.0	33	45.5	22	63.6	0.736



Фигура 12. Сравнително представяне на относителния дял на резистентните към карбапенеми *K. pneumoniae*, изолирани от хемокултури в периода 2011 - 2020г. (в %) (източник за EU и BG: <https://atlas.ecdc.europa.eu/>; <https://ecdc.europa.eu>).

Генетични механизми на резистентност към цефалоспоринови от трета генерация и карбапенеми в карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, изолирани от кръв

С цел установяване на генетичните механизми на резистентност към β -лактамни антибиотици в групата на най-проблемните, карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* беше използван PCR и метода на нуклеотидно секвениране за доказване на най-често срещаните гени, кодиращи ESBLs (CTX-M, SHV и TEM ESBLs), AmpC ензими (DHA, FOX, EBC, MOX, ACC, CMY) и карбапенемази от класовете A, B и D. Бяха проучени общо 29 (74.4%) от всички 39 карбапенем-резистентни (CR) *K. pneumoniae*, изолирани в периода януари 2011 - декември 2020г. При 93.1% от CR изолати (n=27) се доказва наличие на *bla*CTX-M-15. При два CR изолата не бе идентифициран ген, кодираща ESBL от клас A. *bla*KPC-2 беше доказан в 27 CR изолата (93.1%), от които 25 положителни и за *bla*CTX-M-15 (92.6%). Генът кодиращ NDM-1 метало-карбапенемаза бе детектиран само в два CR изолата (6.9%), едновременно носители и на *bla*CTX-M-15 и *bla*CMY-4 (таблица 17).

Епидемиологично типизиране на карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* изолати

Генетичната връзка между 28 CR *K. pneumoniae* изолата, чиято β -лактамазна продукция беше проучена, бе определена чрез ERIC PCR и MLST. С цел сравнение, в епидемиологичния анализ бяха включени и 20 карбапенем-чувствителни кръвни изолата *K. pneumoniae*, изолирани в същия времеви период, както и един изолат от ръце на медицински персонал. Проучването установи единадесет различни ERIC типа (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K), всички кореспондиращи много добре на 11 MLST типа - ST15, ST76, ST11, ST340, ST1350, ST151, ST902, ST70, ST359, ST37 и ST35 съответно (таблица 17). Епидемиологичното типизиране доказа 3 основни MDR клона *K. pneumoniae* сред всички 49 изолата: ST15 (59.2%), ST76 (10.2%) и ST11 (8.2%). ST15 е доминиращия клон, представен от 29 изолата, получени от пациенти, хоспитализирани в 12 клиници на болницата и един изолат от ръце на медицински персонал от КАИЛ.

Таблица 17. Разпределение на 49 изолата *K. pneumoniae*, получени от хемокултури според MLST типа, годината на изолиране, клиниката, и носителството на гени, кодиращи ESBLs и карбапенемази.

MLST (n)	ESBL (n) / карбапенемаза (n)	Година на изолиране (n)	Клиника (n)
ST15 (n=29**)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=12)	2014 _{n=2} , 2016 _{n=3} 2017 _{n=7}	КАИЛ _{n=1} , ИНО _{n=2} , Неврология _{n=1} , ИДО _{n=1} , Хемодиализа _{n=1} , Педиатрия _{n=1} , Хематология _{n=2} , Гастроентерология _{n=1} , Клиника по вътрешни болести _{n=1} , Ендокринология _{n=1}
	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{KPC-2} (n=17)*	2013 _{n=5} , 2014 _{n=9} 2015 _{n=1} , 2016 _{n=2}	КАИЛ _{n=5} , ИНО _{n=5} , Неврология _{n=3} , ИДО _{n=1} , Кардиохирургия _{n=1} , ИКО _{n=1} , Клиника по вътрешни болести _{n=1}
ST76 (n=5)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{KPC-2} (n=5)*	2014 _{n=4} , 2015 _{n=1}	ИКО _{n=1} , ИНО _{n=1} , КАИЛ _{n=1} , Неврология _{n=1} , ИДО _{n=1}
ST11 (n=4)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{CMY-4} + <i>bla</i> _{NDM-1} (n=2)*	2016 _{n=1} , 2017 _{n=1}	Хематология _{n=1} , ИКО _{n=1}
	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=2)	2016 _{n=1} , 2017 _{n=1}	Хемодиализа _{n=1} , Онкология _{n=1}
ST340 (n=2)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=2)	2017 _{n=2}	КАИЛ _{n=2}
ST1350 (n=2)	<i>bla</i> _{KPC-2} (n=2)*	2014 _{n=2}	ИКО _{n=1} , ИНО _{n=1}
ST151 (n=2)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{KPC-2} (n=2)*	2014 _{n=2}	ИНО _{n=2}
ST902 (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=1)	2014 _{n=1}	Нефрология _{n=1}
ST70 (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=1)	2014 _{n=1}	Педиатрия _{n=1}
ST359 (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{SHV-12} (n=1)	2014 _{n=1}	Кардиохирургия _{n=1}
ST37 (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=1)	2016 _{n=1}	Педиатрия _{n=1}
ST35 (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=1)	2016 _{n=1}	Хематология _{n=1}

Съкращения: *CR изолати, **включен един изолат от ръце на медицински персонал; ИКО, Интензивно Кардиологично Отделение; ИНО, Интензивни Нервно Отделение; КАИЛ, Клиника по Анестезиология и Интензивно Лечение; ИДО, Интензивно Детско Отделение.

По-голям дял от ST15 изолатите бяха получени от пациенти, хоспитализирани в Интензивно Неврологично отделение (ИНО) (n=7) между Ноември 2013г. и май 2017г.; в Неврологичната клиника (n=4) - доминиращо през декември 2017г. (представени като клъстер) и като единичен изолат през юни 2017г. ST15 също беше идентифициран в КАИЛ (n=6) в периода януари - май 2013г. и март - май 2015г., както и в Интензивно Детско Отделение (ИДО) (n=2) - през януари и юни 2014г. Представен като единични изолати, ST15 беше идентифициран в още 8 клиници на болницата в периода април 2014г. - декември 2017г. Най-висока честота на изолируемост бе установена през 2014г. и 2017г., а най-ниска - през 2015г. (1 изолат през февруари 2015г. в клиниката по Кардиохирургия). Всички 29 ST15 *K. pneumoniae* изолати са положителни за *bla*_{CTX-M-15}, а седемнадесет са и КРС-2 продуценти (58.6%) (таблица 17).

Типът ST76 беше представен като клъстер от пет КРС-2 и СТХ-М-15 продуциращи *K. pneumoniae* изолати от кръв на пациенти, хоспитализирани в ИНО, КАИЛ, ИДО и Неврологична клиника в периода Декември 2014г. - Януари 2015г. Първият ST76 CR КРС-2 продуциращ изолат беше идентифициран по-рано през март 2014г. в Интензивното Кардиологично Отделение (ИКО).

ST11 беше доказан в 4 MDR изолата, получени от кръв на пациенти, хоспитализирани в Клиника по Хематология, Хемодиализа, Онкология и ИКО през 2016г. (март, юни) и 2017г. (януари, декември). Не бяха доказани клъстери от случаи. ST11 се асоциира с СТХ-М-15 продукция във всички изолати и с NDM-1 металокарбапенемаза - в два CR *K. pneumoniae*, изолирани през март 2016г. и декември 2017г. съответно.

Два CR *K. pneumoniae*, изолирани в периода Ноември - Декември 2014г. от кръв на пациенти, хоспитализирани в ИНО, ко-продуциращи КРС-2 карбапенемазата и СТХ-М-15 ESBL бяха отнесени към ST151 типа.

Типът ST1350, представен от два CR КРС-2 продуциращи *K. pneumoniae* изолата, беше идентифициран през ноември 2014г. в ИНО и ИКО на болницата.

Типове ST35, ST37, ST70, ST359 и ST902 бяха доказани само в единични изолати и интерпретирани като спорадични. ST37 и ST70 се асоциират с изолати, продуценти само на СТХ-М-3 ESBL, а ST35, ST359 и ST902 - със СТХ-М-15 ESBL.

Общо, CR изолатите (n=28) бяха представени от 5 секвенциални типа: ST15 (60.7%), ST76 (17.9%), ST11 (7.1%) ST1350 (7.1%), ST151 (7.1%). Разпределението на изолатите според вида на клиниката, от която произхождат, MLST типа и тяхната β-лактамазна продукция са показани на таблица 17.

Настоящото проучване доказва много високо ниво на резистентност към цефалоспорини от трета генерация (74.9%) в проучваната колекция от 331 инвазивни изолата *K. pneumoniae* за десет-годишния период на изследването, значително надвишавайки дела на резистентните към същата антибиотична група *E. coli* (28.8%) и по-високо от това сред *Enterobacter* spp. изолатите (68.5%) (виж. стр. 34). От всички мониториращи антибиотици, цефалоспорините от трета генерация са групата с най-драматично редуцирана активност спрямо *K. pneumoniae*. Много високи нива на резистентност бяха отчетени също към флуорохинолони и gentamicin, макар за последния да се установява положителен, статистически значим тренд да намалява резистентността от 73% през 2011г. до 40.9% през 2020г. Макар с нива на резистентност над 10%, meropenem (11.8%) и amikacin (13.9%) се доказаха като антимикробните препарати с най-висока активност спрямо *K. pneumoniae*. Трябва да се отбележи, че сред всички мониториращи антибиотични групи, най-големи флукутации на резистентността в годините се отбелязва за карбапенемните антибиотици: ако през 2011г. практически тази резистентност е 0%, през 2012г. е доказан само един резистентен изолат, то през 2014г. се отбелязва пик (32.7%), последван от значителен

спад до 2.9% през 2017г. и отново подем през 2019 - 2020г. (18.2 - 13.6%). Групата на карбапенем-резистентните изолати в това проучване демонстрира много високи нива на резистентност спрямо всички изпитвани антиминокробни средства с изключение на amikacin и colistin, които се явяват препарати на избор за лечение на инфекции, асоциирани с карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*.

Получените резултати в това изследване са в пълно съответствие със съобщеното от EARS Net за периода 2011 - 2020г.: средната резистентност на инвазивните изолати *K. pneumoniae* за Европа бележи тенденция за увеличение както към трета-генерация цефалоспорини (30% - 33.9%), така и към флуорохинолони (25% - 33.8%) и карбапенеми (6% - 10%) (ECDC, 2015; ECDC, 2018; ECDC, 2022). В България се установяват аналогични тенденции, но в значително по-високи нива от средните за Европа: трета-генерация цефалоспорини, 81%-79.1% (най-висока за Европа); флуорохинолони, 51%-67.1% и карбапенеми, от <1 през 2011г. до 28.1% през 2020г., като за флуорохинолоните и карбапенемите този тренд на нарастване е статистически значим (ECDC, 2015; ECDC, 2018; ECDC, 2022). Подобно на установеното в настоящото проучване, в Европа в периода 2016 - 2020г. също се установява статистически значимо намаляване на резистентността към аминогликозиди – от 24.4% през 2016г. до 23.7% през 2020г. (ECDC, 2022). Сред всички антибиотици статистически значим тренд към увеличение в периода 2011 - 2020г. за Европа се доказва само за групата на карбапенемите - от 6% през 2011г. до 10% през 2020г. Нещо повече, за лабораториите, които попадат в групата на „постоянно рапортуващи“ към EARS Net в периода 2017 - 2021г., годишната промяна в дела на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae* е драматична (0%, 8%, 31% и 20% за 2018 - 2021) (ECDC, 2022a). Характерно за всички мониторирувани групи антибиотици са големите различия в нивата на резистентност между отделните Европейски държави. Например по отношение на резистентността към цефалоспорини трета генерация: макар за 2021г. най-високата средна резистентност да е тази към цефалоспорини трета генерация (34.3%), тя варира между 3.4% за Исландия, 5.1% в Дания, 7% Швеция до 81.4% за България (ECDC, 2022a). Аналогично по отношение резистентността към карбапенеми през 2021г.: доказва се 0% резистентност в Исландия и Холандия до 46.3% в България, 54.5% в Румъния и 73.7% за Гърция. В 12 страни нивата на карбапенемна резистентност са под 1%. По отношение на този тип резистентност сред особено засегнатите страни са тези от Южна и Югоизточна Европа (Гърция, 73.7%; Румъния, 54.5%; България, 46.3%; Хърватия, 32.9%; Италия, 26.7%, Кипър, 26.2%) (ECDC, 2022a). Тези вариации в нивата на резистентност се потвърждават и от различни многоцентрови проучвания върху антиминокробния профил на главните етиологични агенти на инфекции на кръвта (De Socio G, 2019; Holmbom M, 2020; Pérez-Crespo PM, 202; Schönneweck F, 2021).

Тенденциите за нарастващ дял на резистентни към цефалоспорини от трета генерация и към карбапенеми *K. pneumoniae* от кръв (над 30% и над 3% съответно) в периода 1997- 2016г. се потвърждават и от SENTRY програмата (Diekema DJ, 2019) Същата програма отчита и по-висока честота на инвазивни ESBL продуциращи *Klebsiella* spp. и CRE в Европа в сравнение със Северна Америка (24.1% и 10.9% срещу 12.5% и 2.3%) (Pfaller M, 2020). Данните от SENTRY за по-късен период (2013 - 2019г.) показват по-високи нива на резистентност сред над 6800 изолата *K. pneumoniae* от кръв към ciprofloxacin, 30.7%; gentamicin, 19.0%; цефалоспорини от трета генерация, 29.7 - 30.6% и карбапенеми, 8%-8.4%; резистентността към amikacin е 8.7% (Di Franco S, 2021). По-високи нива на резистентност към цефалоспорини от трета генерация за 2019г. в *K. pneumoniae* (40-50%) и ниски към средни нива на резистентност към

карбапенеми в същия бактериален вид, асоцииран с инфекции на кръвта, се съобщава от GLASS (GLASS 2021).

Една от задачите на настоящото проучване е да идентифицира *bla* гените, медиращи резистентността към бета-лактамни антибиотици (цефалоспорици от трета генерация и карбапенеми) в карбапенем-резистентните изолати *K. pneumoniae* и тяхната асоциацията с определени ST типове.

CTX-M-15 бета-лактамазата беше идентифицирана като напълно доминиращата ESBL, както в групата на карбапенем-резистентните изолати, така и сред карбапенем-чувствителните *K. pneumoniae*, включени с цел сравнителен епидемиологичен анализ. От карбапенем-чувствителните изолати само два продуцираха CTX-M-3 ESBL. Ко-продукция на CTX-M-15 и KPC-2 карбапенемаза беше детектирана в 92.6% от CR *K. pneumoniae*. В световен мащаб *bla*_{CTX-M-15} е доказан като най-честият ген асоцииран с резистентност към цефалоспорици от трета генерация в клинично значими Грам отрицателни бактерии и по-специално *E. coli* и *K. pneumoniae*. В съответствие с настоящото проучване, широка дисеминация на *bla*_{CTX-M-15} се доказва в Обединеното Кралство, Холандия, Германия, Гърция, Чехия, Франция и Дания (Bevan E, 2017). Резултатите от SENTRY 2016 демонстрират, че 60.3% от изолатите *K. pneumoniae* в САЩ носят *bla*_{CTX-M}, като 52.7% са CTX-M-15 (Mendes R, 2019). Проучване в България от 2017г. върху *K. pneumoniae* изолати, колекционирани от 6 болници, идентифицира CTX-M-15 и CTX-M-3 продуценти в 87% и 9% съответно, както и SHV-12 и SHV-2 продуциращи *K. pneumoniae*, но само в 2% и CTX-M-14 в 1% (Markovska R, 2017). Висок относителен дял на ESBLs продуциращи инвазивни изолати *K. pneumoniae*, асоциирани с инфекции на кръвта и превалиране на CTX-M ESBLs се съобщават в подобни проучвания от автори в Италия (32.6%), Русия (60.8%), САЩ (51.8%), Корея (52.9%) и Китай (27.5%) (Xiao S, 2017). В настоящото проучване плазмидно-кодиранията AmpC цефалоспориноза - CMY-4 бе идентифицирана в два карбапенем-резистентни изолата *K. pneumoniae*, и двата ко-продуциращи CTX-M-15 ESBL и NDM-1 метало-карбапенемазата. Скорошно проучване върху фекално носителство на високо-рискови клонове *Enterobacteriales* сред пациенти, хоспитализирани в 6 болници в периода 2017 - 2019г. в България, доказва разнообразие от ESBLs, като сред изолатите *K. pneumoniae* водеща е CTX-M-3 (41%), следвана от CTX-M-15 (33%) и CTX-M-14 ESBLs (1.4%), а идентифицираните карбапенемази са NDM-1 (14.8%) и KPC-2 (1.4%), като NDM-1 изолати са ко-продуценти на CTX-M-15/-3 ESBLs и/или CMY-4 β-лактамази (Markovska R, 2022).

Интернационалните високо-рискови клонове *K. pneumoniae* са едни от най-честите и клинично значими болнични патогени. *Bla* гени, обикновено с плазмидна локализация, често са асоциирани с „успешни“ *K. pneumoniae* ST типове. В настоящата работа всички проучени карбапенем-резистентни изолати (с две изключения) са KPC-2 продуценти, като първият KPC-2 продуцент от кръв беше идентифициран през април 2012г. Понастоящем *bla*_{KPC} е ендемичен в много страни по света: в Европа, специално в Австрия, Германия, Русия и Обединеното Кралство; в Латинска Америка, вкл. Бразилия и Мексико; в Азия - Китай, Япония, Тайван, както и в Израел и САЩ. Доминиращият ST сред 49-те изолата *K. pneumoniae* в това проучване е ST15, като този тип се установява в различни клиници на болницата през проучвания период. Подобно на ST258 и ST11, ST15 *K. pneumoniae* също е известен като „успешен“ интернационален клон. Често носи *bla*_{CTX-M-15}, но също KPC, NDM, VIM и OXA-48 гени. Това е в съответствие с резултатите от настоящото проучване, които демонстрират, че всички ST15 изолати носят *bla*_{CTX-M-15}. В този смисъл високият дял на CTX-M-15 ESBL и широката им дисеминация се асоциират най-вече с епидемичния интернационален клон ST15, който също ко-продуцира KPC-2 карбапенемаза. В това проучване *bla*_{CTX-M}

15 дисеминацията също се медира и от други, не толкова широко разпространени ST типове: ST11, ST340, ST76, ST902, ST359, ST35. Проучване в България върху клинични изолати ESBL продуциращи *K. pneumoniae*, също установява, че CTX-M-15 изолатите се отнасят предимно към ST15 (34.1%) и в по-малка степен към CC17 (ST16, ST17, ST336), докато CTX-M-3 продуциращите *K. pneumoniae* - към ST29, ST70, ST432, ST542 и ST15 (Markovska R, 2017). В настоящото проучване *bla*_{CTX-M-3} и *bla*_{CTX-M-12} гените, доказани само в два и един изолата съответно, се асоциират с ST70, ST37 и ST359, последният докладван като широко разпространен MDR клон, свързан с продукцията на CTX-M-15 и KPC-2 (Aires-de-Sousa M, 2020; Markovska R, 2017; Woodford N, 2011).

Доминиращият ST15 клон в това проучване, доказан за първи път в началото на 2013г., персистира в периода 2014 - 2017г., като е установен в 12 болнични клиники, включително в 4 интензивни структури. ST15 доминира като клъстерни случаи на инфекции на кръвта в ИНО и Неврологична клиника през декември 2014, Хемодиализа, ИКО и ИНО през юли 2016г. съответно. Като единични изолати, ST15 *K. pneumoniae* се доказва в още 8 клиники през целия период, но главно през 2014г. и 2017г. Детекцията на изолати с идентични ST типове, получени от пациенти, хоспитализирани в различни клиники на болницата и разпределението във времето на случаите за 5-те години на проследяването, е индикация за вътреболнична интермитентна крос-трансмисия от човешки източник или такъв в околната среда. Очевидно, тази епидемична линия *K. pneumoniae*, представена от ST15 изолати, повечето, от които карбапенем-резистентни и *bla*_{KPC-2} положителни, изглежда добре адаптирана за продължителна трансмисия в условията на болничната среда, което се потвърждава от дългия период от време, в който тя се доказва и персистира. Идентификацията на *K. pneumoniae* ST15 от ръцете на медицински персонал в една от клиниките на болницата, демонстрира, че медицинският персонал е важен фактор за вътреболнична дисеминация на нозокомиалния патоген. Вътреболнично придобиване и дисеминация чрез ръце на медицински персонал е едно от възможните обяснения на болничния епидемичен процес, асоцииран с този конкретен ST тип. Микробиологичното изследване не успя да идентифицира *K. pneumoniae* от обекти в болничната среда.

Настоящото проучване демонстрира ST15 като доминиращия тип, асоцииран с карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, а KPC-2 карбапенемазата като най-честата карбапенемаза, медираща резистентността към карбапенеми. В съответствие с множество подобни проучвания, показващи *K. pneumoniae* ST15 широко разпространен в Европа и асоцииран с различни карбапенемази (KPC-2, OXA-48, VIM-1) (Rodrigues C, 2014), резултатите от настоящото проучване доказват висок относителен дял на ST15 (60.7%) в групата на проучените карбапенем-нечувствителни инвазивни изолати, следван от ST76 (17.9%) и ST11, ST 151 и ST1350 (по 7.1%). ST76, вариант на *K. pneumoniae* ST495, е идентифициран в Гърция в периода 2009-2010г. и асоцииран с KPC-2 продукцията (Giakkoupi P, 2011). През 2018г. Gong *et al.* рапортуват вътреболничен взрив (вкл. случаи на инфекции на кръвта), причинен от *bla*_{KPC-2} положителен *K. pneumoniae* ST76 тип в Китай (Gong X, 2018). През 2014г. Zhu съобщава също за вътреболничен взрив сред новородени в Шанхай, причинен от карбапенем-резистентен *K. pneumoniae* ST76, но продуциращ NDM-1 карбапенемаза (Zhu J, 2016).

В настоящото проучване *K. pneumoniae* ST11 типът е третият най-често доказван ST, като се асоциира с *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{NDM-1} гени. Този тип е идентифициран през май и юни 2016г., и по-късно през януари и декември 2017г., засягайки пациенти в четири различни клиники на болницата. *K. pneumoniae* ST11 е известен като един от важните

патогенни клонове *K. pneumoniae*, широко разпространен в страни от Азия (особено Китай), Латинска Америка, САЩ и Европа. ST11 клонът се асоциира и с продукцията на различни карбапенемази (NDM-1, NDM-5, KPC-2, OXA-48), както в клинични, така и във фекални изолати. Този секвенциален тип се свързва с разнообразни вътреболнични инфекции, като инфекции на уринарния тракт, на кръвта, инфекции на долен респираторен дял и др. В скорошни проучвания от Китай, ST11 е идентифициран като доминиращ ST сред KPC-продуциращи *K. pneumoniae*, асоциирани с инфекции на кръвта (Fu P, 2019; Xiao S, 2017). В подобно проучване върху разпространението на различни MLSTs в бактериални видове от семейство *Enterobacteriaceae*, Teo et al. съобщават MDR (вкл. colistin резистентни) *K. pneumoniae* ST11 и ST20 като доминиращи типове (Teo J, 2019). Подобно на доказаното от нас, ST11 *bla*_{NDM-1}/*bla*_{CTX-M-15/3}/*bla*_{SMU-4} положителни изолати са идентифицирани и в Чехия (Studentova V, 2015).

В настоящата работа, доминиращият *bla*_{KPC-2} ген се асоциира с четири различни типа: ST15, ST1350, ST151 и ST76. Известно е, че трансмисията на *bla*_{KPC-2} се свързва предимно с IncFIIAs плаزمиди. В този смисъл, дисеминацията на *bla*_{KPC-2} съдържащ плазмид между различни клонове *K. pneumoniae* и внасяне на нови CR ST типове с епидемичен потенциал може да обясни развитието на епидемични процес в болницата. Високият селективен натиск в българските болници значително допринася за понататъшната експанзия на нови клонове. Сред всички мониторирани Европейски държави, консумацията на стратегически антибиотици в болничния сектор в България е най-висока (ECDC, 2022b). Настоящото проучване идентифицира само два карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* продуциращи NDM-1, и двата с принадлежност към ST11. *bla*_{NDM-1} генът е доказан в изолати *K. pneumoniae* от Африка, Европа, Австралия, САЩ и Азия, специално Турция, Алжир, Франция, Италия, Гърция, Нова Зеландия, Мексико и Китай (Gong X, 2018; Markovska R, 2022; Pitout J, 2015; Savov E, 2018; Todorova B, 2016). Основна причина за това е бързата дисеминация на ST11, ST15, ST70, ST258 и ST1883, всички асоциирани с NDM-1 метало-карбапенемазата.

***Enterobacter* spp.**

Представителите на род *Enterobacter* са факултативно - анаеробни Грам отрицателни бактерии, които се отнасят към 22 вида. Откриват се както във фактори на околната среда, така и като част от нормалната чревна флора на животни и хора. Понастоящем видовете *Enterobacter aerogenes* и тези, отнасящи се към *E. cloacae* complex се представят като класически опортюнистични патогени, причиняващи най-често нозокомиални инфекции (инфекции на кръвта, пневмонии, уроинфекции, пост-оперативни перитонити, менингити), вкл. вътреболнични взривове, засягайки предимно имунокомпрометирани пациенти. В наши дни голяма част от изолатите *Enterobacter* spp. демонстрират резистентност към бета-лактамни антибиотици (вкл. цефалоспорини от трета генерация и карбапенеми), хинолони и аминогликозиди. В семейство *Enterobacteriaceae*, след *E. coli* и *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex са третите най-чести чревни бактерии, резистентни на цефалоспорини от трета генерация, като тази резистентност се асоциира най-вече със свръхекспресия на хромозомно кодираната AmpC цефалоспориназа, ESBLs от класовете TEM, SHV, CTX-M и VEB, както и с мембранно асоциирани механизми и ефлуксни помпи. В последните години все повече са съобщенията за поява и нарастване дела на клиничните CR изолати *E. aerogenes* и *E. cloacae* complex в Европа, Азия и Америка, асоцииращи се с продукцията на карбапенемази от различни класове.

В 10-годишния период на настоящото изследване чувствителността към цефалоспорини от трета генерация, карбапенеми, аминогликозиди и флуорохинолони е проучена сред общо 260 кръвни изолата *Enterobacter* spp. (таблица 18).

Таблица 18. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на изолати *Enterobacter* spp. (*E. cloacae*, n=218; *E. aerogenes*, n=39; *E. agglomerans*, n=3) от кръв на пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

АБ група	2011-2020		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		p
	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	N	%R	
3 генерация цефалоспорини	260	68.5	18	72.2	20	50.0	16	87.5	39	41.0	54	85.1	33	48.5	28	85.7	19	68.4	16	56.3	17	52.9	0.709
карбапенеми (меропенем)	260	0.4	18	0.0	20	0.0	16	0.0	39	0.0	54	0.0	33	0.0	28	3.6	19	0.0	16	0.0	17	0.0	0.312
gentamicin	260	61.5	18	61.1	20	45.0	16	81.3	39	33.3	54	77.7	33	42.4	28	85.7	19	52.6	16	43.8	17	47.0	0.667
amikacin	260	5.0	18	22.2	20	5.0	16	0.0	39	5.1	54	0.0	33	0.0	28	14.3	19	0.0	16	12.5	17	0.0	0.434
флуорохинолони	260	45.8	18	16.7	20	10.0	16	50.0	39	25.6	54	66.6	33	48.5	28	67.9	19	52.6	16	43.8	17	47.0	0.072

Генетични механизми на резистентност в карбапенем-резистентни *Enterobacter* spp.

Сред всички тествани 260 инвазивни изолата *Enterobacter* spp. бе доказан само един изолат, идентифициран като *Enterobacter asburiae*, демонстриращ резистентност към карбапенеми (MIC_{imipenem, meropenem}>8mg/L) и множествена резистентност (резистентност към всички цефалоспорици, piperacillin/tazobactam, всички аминогликозиди, ciprofloxacin и colistin). Съхранена чувствителност бе установена единствено към levofloxacin (MIC=0.25mg/L), fosfomycin (MIC<16mg/L), nitrofurantoin (MIC<16mg/L) и tigecycline (MIC=0.38mg/L). Изолатът беше идентифициран като продуцент на NDM-1 метало-карбапенемаза, CTX-M-3 ESBL и ACT-68 AmpC и отнесен към *E. cloacae* MLST type ST23.

За 10-годишния период на проучването се доказва високо ниво на резистентност към цефалоспорици от трета генерация в *Enterobacter* spp. (68.5%), много близко до установеното за *K. pneumoniae* и значително надвишавайки дела на резистентните към същата антибиотична група *E. coli*. Много високи нива на резистентност бяха отчетени също към gentamicin (61.5%) и флуорохинолони (45.8%). Карбапенемите (0.4% резистентност) и amikacin (5%) се доказаха като антимикробните препарати с най-висока активност. По-ниски нива на резистентност в *Enterobacter* spp., изолирани от кръв на пациенти с инфекции на кръвта, се съобщават от S. De Franco и M. A. Pfaller на база информация от SENTRY Antimicrobial Surveillance Program: резистентност към ceftriaxone, 26.1 - 31.6%; към ciprofloxacin, 14.3%; gentamicin, 8.3%, но близки нива на установените от нас към meropenem (0.4 - 0.7%) и amikacin (2.1%) (Di Franco S, 2021; Pfaller M, 2020). По-високи нива на карбапенемна резистентност в *Enterobacter* spp. (9.47%), докладват в голямо Китайско проучване от периода 2012 - 2017г. (Yang S, 2019). Авторите рапортуват резистентност към цефалоспорици от трета генерация около 40%, към gentamicin - 20-25%, ciprofloxacin и amikacin - под 20%, без да се установяват сигнификантни промени в нивата на резистентност през годините. Също автори от Китай, докладват за периода 2010-2019г. сигнификантна тенденция за намаляване дела на инвазивните изолати *E. cloacae*, резистентни към цефалоспорици от трета генерация (от 53.8% до 34.3%), към gentamicin (от 38.5% до 17.1%), ceferime (38.5% до 15.7%) и piperacillin/tazobactam (от 23.1% до 8.6%). Макар и без сигнификантен тренд, meropenem (от 7.7% до 10%) и amikacin (от 7.7% до 5.7%) са сред най-активните антибиотици през 10-годишния период (Liu C, 2022).

Противоположно на установеното от нас, в испанско проучване, J. Robledo докладва за увеличаване, макар и несигнификантно, на дела на ceftazidime (от 58.5% до 78%), ceferime (от 75.5% до 82.9%) и imipenem-чувствителните *E. cloacae* (от 88.7 до 89.2%) от кръв, изолирани също в периода 2010 - 2019г. Делът на карбапенем - резистентните изолати е по-висок от установения от нас и варира между 10.8 и 11.3% за imipenem и между 7.3% и 9.6% за meropenem (Robledo J, 2022). Висок относителен дял на резистентни *Enterobacter* spp. към различни антибиотици се съобщава и в обширно Иранско проучване, обхващащо периода 1996 - 2021г.: ceftriaxone, 49.3%; ceferime, 43.6%; ciprofloxacin, 35.3%; gentamicin, 42.1%; amikacin, 30.3% и meropenem, 16.2% (Khademi F, 2022).

Резултатите от настоящото проучване показват, че карбапенемите все още са препарати на избор за лечение на инфекции на кръвта, причинени от ESBL-продуциращи и MDR *Enterobacter* spp. В десет годишния период бе идентифициран само един карбапенем-резистентен изолат *E. asburiae*, изолиран през 2017г., продуцент на NDM-1 метало-карбапенемазата. По литературни данни този вид сравнително рядко се доказва като вид с клинично значение, като предимно се асоциира с хемокултури, макар след 2017г. Florio et al. да установяват неговото постепенно увеличаване (De

Florio, 2018). Изолатът от настоящото проучване демонстрира множествена резистентност. Възникването на такива MDR изолати е особено притеснителен факт заради потенциалния риск от вътреболнична дисеминация. В периода юли 2017г. - до края на 2021г. в УМБАЛ“Света Марина“, Варна, са изолирани четири карбапенем-резистентни *E. cloacae* complex изолата (3 от урина и 1 от фекална проба), идентифицирани като продуценти на VIM метало-карбапенемаза (Ниязи Д, 2022; Savova D, 2023). Въпреки, че видовете *Escherichia* и *Klebsiella* са двата най-проблемни вида по отношение на карбапенемазната и ESBL-продукция в семейство *Enterobacteriaceae*, в САЩ например карбапенем-резистентните *Enterobacter* spp. са вторите най-чести карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae* (Chavda KD, 2016). Според CDC от 2019г., увеличеното превалиране на карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae*, специално *Enterobacter cloacae* complex, е вече сериозен проблем, свързан с общественото здраве в САЩ (<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>).

Относително малко са съобщенията, описващи MLST типове сред *Enterobacter cloacae* complex. Първото проучване върху карбапенемаза-продуциращи *E. cloacae* клонове, е извършено от Izdebski върху 173 цефалоспорин-резистентни изолати *E. cloacae* от Израел и няколко Европейски държави. Авторите идентифицират ST78, ST114, ST108 и ST66 като най-чести, а доказаните в проучването KPC-2 и VIM-1 карбапенемази са асоциирани с ST78 и ST114 съответно (Izdebski R, 2015). В контраст на това, CR *E. asburiae* изолат от кръв в настоящото проучване, бе идентифициран като ST23. Резултатите от голямо проучване върху карбапенемаза-продуциращи *Enterobacter* spp. от периода 2008-2014г. идентифицира 4 глобални клона - ST114, ST93, ST90, ST78 и докладва VIM карбапенемазата като най-честа, следвана от NDM, KPC, OXA-48 и IMP ензимите (Peirano G, 2018). Макар колекцията от изолати да е представена предимно от *E. xiangfangensis* и *E. hormaechei*, проучването също докладва NDM-продуциращ *E. asburiae* изолат, но от ST435 типа. (Peirano G, 2018). Карбапенем-резистентният изолат *E. asburiae* в настоящото проучване продуцира и AmpC цефалоспориноза от EBS семейството (ACT-68). Високите нива на резистентност в този изолат могат да се обяснят с ко-продукцията на трите различни бета-лактамази - NDM-1 карбапенемаза, CTX-M-3 ESBL и ACT-68. В допълнение, изолатът демонстрира резистентност и към colistin, антимикробен агент смятан за един от малкото антибиотици, последно средство на избор за терапия на инфекции, причинени от такива проблемни MDR щамове. Този резултат е в съответствие с проучването на P. Iglesias, публикувано през 2023г. и обхващащо периода 2014 - 2019г., което съобщава за 12% дял на карбапенем - резистентни *Enterobacter* spp. от кръв (*E. xiangfangensis*, *E. hoffmannii*), всички продуценти на OXA-48 карбапенемазата и отнасящи се към високо рисковите и глобално разпространени типове ST 66, 171, 78, отговорни за дисеминиране както на гени, кодиращи резистентност към карбапенем и широкоспектърни цефалоспорини, така и към colistin (Lumbreras-Iglesias P, 2023). В това проучване Iglesias съобщава за резистентност на някои от OXA-48 продуцентите *Enterobacter* spp. и към colistin, медирана от носителството на mcr-9 гена. Няколко проучвания съобщават за по-високо превалиране на колистиновата резистентност в клинични изолати *Enterobacter* spp., отколкото в *E. coli* и *Klebsiella* spp., достигащо 0.7% в глобални проучвания (Binsker U, 2022). В този смисъл разпространението на карбапенамаза продуциращи *E. cloacae* complex, носещи гени, кодиращи резистентност и към colistin, е сериозен проблем, тъй като това са изолати, асоцииращи се често с инвазивни инфекции. От изключителна важност е извършването на адекватен болничен контрол и проучване на тези проблемни за лечение бактерии поради сериозния им потенциал за епидемично разпространение,

причиняване на трудни за контрол вътреболнични епидемии и асоциация с висока смъртност (Girlich D, 2021)

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa е един от биохимично най-адаптивните бактериални видове, разпространен широко в околната и често в болнична среда (респиратори, басейни, мивки, дезинфекционни разтвори, почистващи предмети). Може да бъде открит и по човешката кожа, орална мукоза и гастро-интестинален тракт, особено в продължително хоспитализирани и лекувани с антибиотици пациенти. Заради богатия си арсенал от фактори на вирулентност, *P. aeruginosa*, може да причини много тежки, живото-застрашаващи остри и хронични инфекции, особено при имунокомпрометирани пациенти, водещ етиологичен агент е на инфекции на кръвта и сепсис в неутропенични пациенти и на вътреболнични пневмонии, асоциирани с изкуствена вентилация (Wood S, 2023). *P. aeruginosa* е сред четирите най-чести бактериални патогени в европейските болници, като се асоциира с различни ICU инфекции (уроинфекции, пневмонии и инфекции на кръвта) (Qin S, 2022). В допълнение към тежкия ход на псевдомонадните инфекции, второто предизвикателство е етиологичното лечение на тези инфекции, което понастоящем често е изключително затруднено не само заради вродената, но и придобитата антибиотична резистентност на *P. aeruginosa*, вкл. придобиване на резистентност още в хода на провежданата антимикробна химиотерапия (Qin S, 2022; Wood S, 2023)

Карбапенемите са сред антибиотичните групи с изразен антипсевдомонаден ефект, приети като стратегически препарати за лечение, но за съжаление вече с компрометиран ефект и спрямо *P. aeruginosa*. Резистентността на този микроорганизъм към карбапенемни антибиотици се асоциира най-често с ензимния механизъм, свързан с придобиването на *bla* гени, кодиращи карбапенемази от различни класове, както и с механизми, водещи до намалена пенетрация или натрупване на антибиотика в бактериалната клетка или е в резултат на комбинация от механизми. Скорошни проучвания върху карбапенем-резистентни изолати *Pseudomonas* spp. (вкл. *P. aeruginosa*), получени от пациенти след костно-мозъчна трансплантация в УМБАЛ“Света Марина“, Варна, идентифицират *bla*_{VIM-2} генът като основен механизъм, медиращ резистентността към тази група антибиотици (Ниязи Д, 2022; Niyazi D, 2023). В проучване от 2022г. върху карбапенем-резистентни изолати *P. aeruginosa*, получени от различни клинични материали на пациенти, хоспитализирани в COVID-19 клиника на болницата в периода 2019 - 2021г. не се установяват *bla* гените, асоцииращи се най-често с карбапенемна резистентност в този микробен вид, което предполага вероятно наличие на механизми, различни от ензимния (Savova D, 2023).

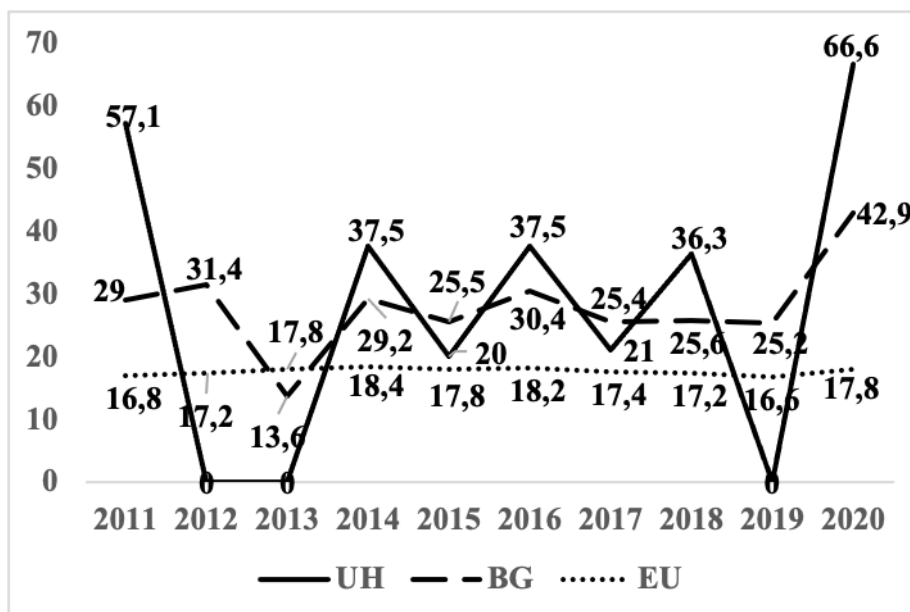
В 10-годишния период на изследването чувствителността към следните антипсевдомонадни средства: piperacillin/tazobactam, ceftazidime, карбапенеми, аминогликозиди и флуорохинолони е проучена сред общо 120 кръвни изолата *P. aeruginosa* (таблица 19, фигура 17).

В настоящото проучване дялът на CR изолати за 10-годишния период (2011-2020г.) е 24.2%, като проследен в отделните години той е силно вариращ и се движи между 0% през 2012г. и 2013г. до 66.6% през 2020г. без да се установява статистически значим тренд. За същия период националните данни сочат, че дялът на CR изолати *P. aeruginosa* нараства от 29% през 2011г. до 42.9% през 2020г., надхвърляйки значително средния дял за Европа, като през 2020г. само Румъния (43.9%) и Словакия (48.9%) докладват по-високи нива от тези в България (ECDC, 2012; ECDC, 2017; ECDC, 2022).

Таблица 19. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на изолати *P. aeruginosa* от кръв на пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

АБ група	2011-2020		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		p
	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	
piperacillin/tazobactam	120	30.8	7	57.1	13	23.0	16	12,5	8	25.0	15	26.7	14	35.7	19	31.6	11	36.3	8	12.5	9	66.6	0.645
ceftazidime	120	36.0	7	71.4	13	30.7	16	0.0	8	37.5	15	26.7	14	35.7	19	36.3	11	36.3	8	0.0	9	66.6	0.828
карбапенеми (meropenem)	120	24.2	7	57.1	13	0.0	16	0.0	8	37.5	15	20.0	14	37.5	19	21.0	11	36.3	8	0.0	9	66.6	0.616
gentamicin *	111	35.1	7	42.8	13	30.7	16	43.8	8	37.5	15	26.7	14	50.0	19	31.6	11	36.3	8	12.5	-	-	0.854
amikacin	120	23.3	7	28.6	13	23.0	16	6.3	8	12.5	15	20.0	14	35.7	19	36.3	11	36.3	8	0.0	9	44.4	0.491
флуорохинолони	120	40.0	7	42.8	13	30.7	16	43.8	8	37.5	15	40.0	14	50.0	19	31.6	11	36.3	8	12.5	9	77.7	0.666

*чувствителността към gentamicin е определяна до 2019г.



Фигура 17. Сравнително представяне на относителния дял на резистентните към карбапеними *P. aeruginosa*, изолирани от хемокултури в периода 2011-2020г. (в %) (източник за EU и BG: <https://atlas.ecdc.europa.eu/>; <https://ecdc.europa.eu>).

В същия период, средните нива на резистентност към карбапеними сред инвазивни изолати *P. aeruginosa* в Европа флукутират слабо - между 16.8 и 17.8%, като в периода 2016 - 2020г. се доказва дори статистически значимо намаляване дела на карбапенем-резистентните изолати, тенденция, която продължава и през 2021г. (ECDC, 2022a). През 2020г. най-голям е броят на държавите (n=12), в които се установяват нива на карбапенемна резистентност в диапазона 20-30%, а в 8 държави нивата са под 10% (ECDC, 2022). Като цяло в Европа за периода 2016 - 2021г., EARS Net съобщава тренд за стабилизиране нивата на антибиотична резистентност в *P. aeruginosa* към основните антипсевдомонадни средства, вкл. и към карбапеними (ECDC, 2022; ECDC, 2022a). Подобни резултати за намаляващ дял на карбапенем-резистентни изолати *P. aeruginosa*, асоцииращи се с инфекции на кръвта, се съобщават и от други проучвания върху кръвни инфекции в периода 2007- 2019г. (De Angelis G, 2018; Liu C, 2022; Rothe K, 2019).

В настоящото проучване се установява над 25% резистентност към всички останали антипсевдомонадни агенти с изключение на amikacin, като най-силно е редуцирана активността на флуорохинолоните, следвани от gentamicin, ceftazidime и piperacillin/tazobactam. В периода 2011 - 2020г. в EU средните нива на резистентност към флуорохинолони и аминогликозиди са по-ниски от установените от нас, като се движат между 22.1% и 19.6% за флуорохинолоните и между 16.7% и 9.4% за аминогликозидите със сигнификантен тренд да намаляват в годините. В същия период за България делът на флуорохинолон-, аминогликозид-, piperacillin/tazobactam- и ceftazidime-резистентните инвазивни изолати *P. aeruginosa* е близък до установения в това проучване, движи се във високите диапазони на резистентността спрямо по-голямата част от мониторираните Европейски държави, като статистически значим тренд за увеличаване се доказва в периода 2016 - 2020г. за piperacillin/tazobactam (от 40% до 64.3%) (ECDC, 2022). В EU средните нива на резистентност към ceftazidime също са по-ниски от установените от нас, като варират между 12.8% през 2011г. до 15.5% през 2020г. без сигнификантен тренд за увеличение или намаление в годините (ECDC, 2012; ECDC, 2017; ECDC, 2022). Резултатите докладвани от EARS Net за 2020г. отреждат на България първа позиция по дял на ceftazidime- (42.1%) и

флуорохинолони - резистентни (52.9%) инвазивни изолати *P. aeruginosa*, втора и трета позиция по дял на piperacillin/tazobactam (42.1%) и аминогликозид-резистентни изолати (32%) (ECDC, 2022).

***Acinetobacter baumannii* - *calcoaceticus* complex**

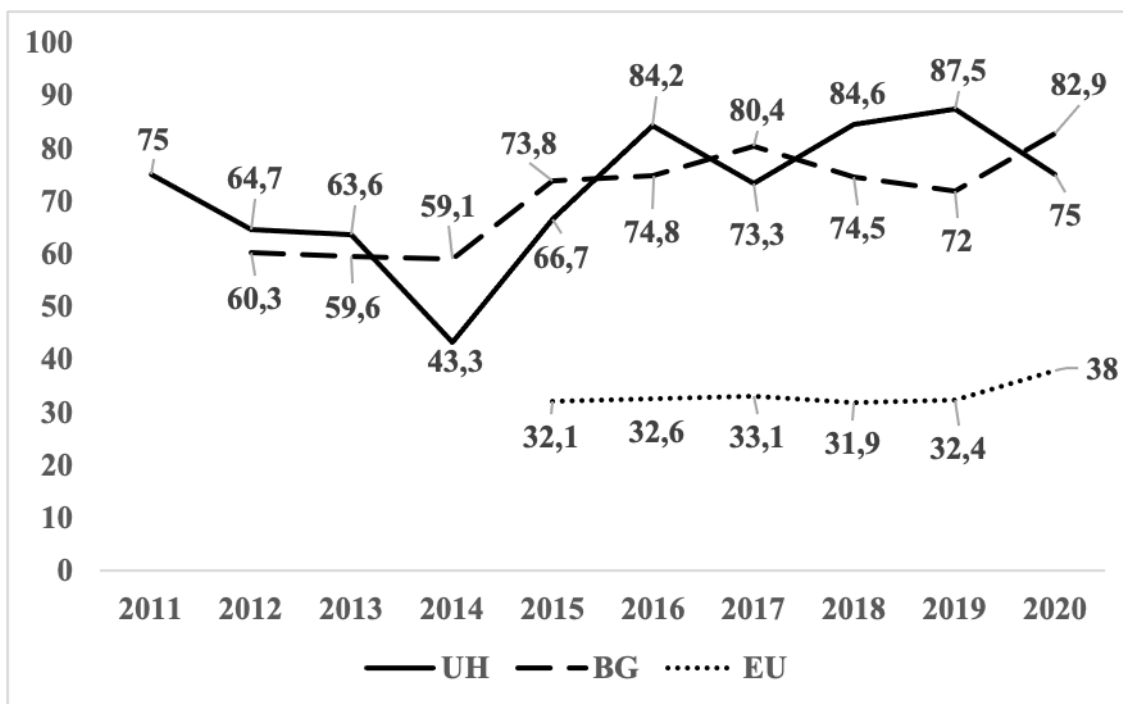
Представителите на род *Acinetobacter* са Грам отрицателни, неферментиращи глюкозата опортюнистични микроорганизми, широко разпространени в природата. Понастоящем към рода се отнасят 59 вида, като с най-голямо клинично значение е *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* complex, който включва близките и трудно разграничими с фенотипни методи видове *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* и *A. dijkshoorniae*. От представителите на рода, видът *A. baumannii* е отговорен за около 90% от всички *Acinetobacter* асоциирани инфекции в човешката популация. Този вид може да бъде открит в околната среда, но неговото естествено местообитание остава все още неизвестно. По-често се изолира от клинични материали и болнична среда, отколкото от естествени източници (Karah M, 2023; Nguyen M, 2021). *A. baumannii* е MDR опортюнистичен патоген със склонност към клонално разпространение, причиняващ разнообразие от остри нозокомиални инфекции и взривове, сред които най-чести са VAP пневмонии, инфекции на кръвта, но също и уроинфекции, мекотъканны и инфекции на хирургическата рана. Сред най-важните рискови фактори за развитие на *A. baumannii* асоциирани инфекции са престой в ICU, продължителен болничен престой, хирургически интервенции или други травми, много възрастни пациенти, предшестваща антибиотична терапия (особено цефалоспорини от трета генерация и карбапенеми) и процедури, при които се налага използване на „чужди тела“. Макар делът на *A. baumannii* инфекциите да е по-нисък от този на другите ESKAPEc видове, глобално над 45% от изолатите *A. baumannii* са MDR, с нива надхвърлящи 60% в САЩ, Латинска Америка и Средния Изток и над 90% в Гърция и Турция. Тези MDR нива са над 4 пъти по-високи от нивата в *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* (De Oliveira D, 2020). Аспект във физиологията на *A. baumannii* е способността му да развива много бързо резистентност. Само от 2011г. до 2016г. делът на карбапенем-резистентните *A. baumannii* се увеличава с над 30% глобално (Xie R, 2018). Така понастоящем *A. baumannii* - инфекциите, обичайно се причиняват от MDR-, XDR или PDR - щамове, феномен, опосредстван от различни ензимни и не-ензимни механизми. През 2019г. CDC определя карбапенем-резистентните *A. baumannii* като непосредствена заплаха за общественото здраве (<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>).

Карбапенемната резистентност в *A. baumannii* се асоциира предимно с продукцията на карбапенемази, като най-чести са тези от клас D и много по-рядко от класовете A и B. В 10 - годишния период на настоящото изследване чувствителността към карбапенеми, аминогликозиди, флуорохинолони и trimethoprim/sulphomethoxazole е проучена сред общо 171 кръвни изолати *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex (табл. 20, фиг. 19). Резистентността към основни антибиотици в групата на карбапенем-резистентните (CR) *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex, изолирани в периода 2016 - 2020г. (n=60), представляваща 80% от всички изолирани инвазивни *A. baumannii* в този период е както следва: sulbactam, 50%; amikacin, 78.3%; gentamicin, 96.6%; tobramycin, 61.7%; ciprofloxacin, 100%; levofloxacin, 97.2%; trimethoprim/sulphomethoxazole, 85%; colistin, 0%. Пет % от тези изолати са резистентни едновременно към 3 от 6 антибиотични групи (карбапенеми, аминогликозиди, хинолони, colistin, sulbactam, trimethoprim/sulphomethoxazole), 31.7% (n=19) - на 4, а 60% (36) - към пет групи.

Таблица 20. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на изолати *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex от кръв на пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периода 2011 - 2020г.

АБ група	2011 - 2020		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		p
	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	n	%R	
карбапенеми (меропенем)	171	68.4	12	75.0	17	64.7	22	63.6	30	43.3	15	66.7	19	84.2	19	73.7	13	84.6	8	87.5	16	75.0	0.121
gentamicin	171	82.5	12	83.3	17	88.2	22	59.0	30	76.7	15	73.3	19	84.2	19	100	13	100	8	75.0	16	93.8	0.241
amikacin	171	76.6	12	91.7	17	88.2	22	54.5	30	76.7	15	53.3	19	78.9	19	84.2	13	92.3	8	75.0	16	81.3	0.853
флуорохинолони	171	88.3	12	91.7	17	100	22	68.2	30	90.0	15	73.3	19	84.2	19	100	13	100	8	87.5	16	93.8	0.545
TSM	171	67.3	12	50.0	17	94.1	22	59.0	30	66.7	15	60.0	19	68.4	19	78.9	13	92.3	8	75.0	16	31.3	0.809
colistin	75*	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	0.0	19	0.0	13	0.0	8	0.0	16	0.0	NA

* изпитване на чувствителността към colistin е извършвано за всички изолати сред 2015г.; **NA**, неприложимо; **TSM**, trimethoprim/sulphomethoxazole.



Фигура 19. Сравнително представяне на относителния дял на резистентните към карбапенеми *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex, изолирани от хемокултури в периода 2011 - 2020г. (в %) (източник за EU и BG: <https://atlas.ecdc.europa.eu/>; <https://ecdc.europa.eu> (показаните данни за EU и BG са за изолати *Acinetobacter* spp.)

Генетични механизми на резистентност към карбапенемни антибиотици в карбапенем-резистентни *A. baumannii*

Генетичните механизми на карбапенемна резистентност бяха проучени при общо 71 *A. baumannii*, изолирани в периода 2010-2016г., от които, дванадесет изолата от хемокултури и асоциирани с инфекции на кръвта ($n_{2012}=3$, $n_{2015}=3$, $n_{2016}=6$). Видовата идентификация на изолатите, включени в този анализ, беше потвърдена чрез *gyrB* PCR.

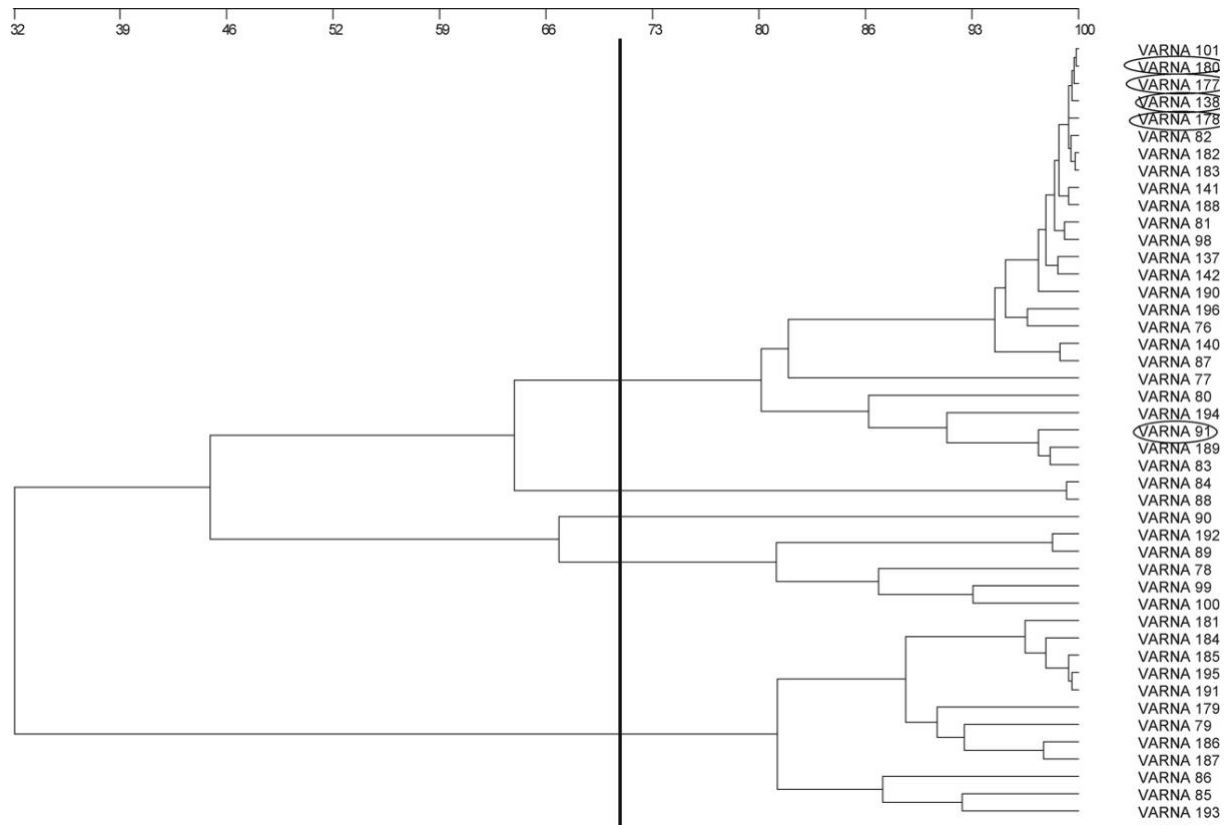
За доказване на най-честите ОХА карбапенемази в *A. baumannii* беше използван Multiplex PCR. Всички тествани CR изолати бяха положителни за *bla*_{ОХА-51-like} гена, 35 (49.3%) - за *bla*_{ОХА-23-like} гена (от тези - 74.3% ($n=26$) само за *bla*_{ОХА-23-like} и 25.7% ($n=9$) - едновременно и за *bla*_{ОХА-40/24-like}) и 42 изолата (59.2%) - за *bla*_{ОХА-40/24-like} (от тях - 78.6% ($n=33$) само за *bla*_{ОХА-40/24-like}, а 21.4% ($n=9$) - и за *bla*_{ОХА-23-like}). Не бяха детектирани гени, кодиращи други ОХА-карбапенемази, както и метало-карбапенемази. При три CR изолата не бяха доказани други гени, кодиращи карбапенемази, освен intrinsic *bla*_{ОХА-51-like}. В групата на 12-те CR изолата *A. baumannii* от кръв, делът на ОХА-карбапенемазите е както следва: ОХА-51-like, 100% ($n=12$); ОХА-40/23-like, 75% ($n=9$); ОХА-23-like, 41.7% ($n=5$), като ко-продукция на ОХА-23 и ОХА-40/23 бе доказана в 16.7% ($n=2$). *ISAbal* се установи пред *bla*_{ОХА-23} гена при всички ОХА-23 продуценти.

Епидемиологично типизиране на карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii*

Епидемиологичното типизиране на 67 недублиращи се, CR изолата *A. baumannii*, получени в периода 2010 - 2016г., осем, от които, изолирани от хемокултури, беше извършено чрез *ger*PCR за изолатите от 2010г. и 2012г. ($n_{2010}=1$; $n_{2012}=21$) и RAPD PCR - за изолатите от периода 2014 - 2016г. ($n_{2014}=8$; $n_{2015}=18$; $n_{2016}=19$). Видовата идентификация на всички изолати в този анализ, беше потвърдена

чрез *gyrB* PCR. С цел сравнение, в епидемиологичния анализ на изолатите, получени от пациенти през 2010г. и 2012г., бяха включени щамове, репрезентативни за главните интернационални клонове *A. baumannii* (IC 1-8). Изолатът от 2010г. и всички 21 изолата от 2012г., получени от пациенти на КАИЛ (вкл. три от хемокултури) формираха клъстер, демонстрирайки идентичен или близък *gyrB* профил и принадлежност към IC2 (таблица 21).

Сред останалите 45 CR изолата от периода 2014 - 2016г. (пет от кръв) чрез RAPD PCR бяха идентифицирани 4 клъстера, както следва: Клъстер I (25 изолата, 80% генетично родство); Клъстер II (2 изолата, 80% родство); Клъстер III (5 изолата, 81% родство), Клъстер IV (12 изолата, 98% родство). Един изолат беше интерпретиран като спорадичен, демонстрирайки уникален RAPD профил. Всички пет CR изолата, получени от кръв на пациенти, хоспитализирани в три клиници на болницата (КАИЛ, ИНО, Кардиохирургия) в периода 2015 - 2016г. бяха отнесени към клъстер I (фигура 24, таблица 21).



Фигура 24. Дендрограма, показваща степента на сходство между карбапенем-резистентни *A. baumannii*, изолирани от клинични материали (вкл. кръв) на пациенти от УМБАЛ“Света Марина“, Варна в периода 2014 - 2016г. на база на RAPD профили*.

* *A. baumannii* с номера 91, 138, 177, 178 и 180 са изолати от кръв.

Таблица 21. Разпределение на карбапенем-резистентни *A. baumannii*, изолирани от кръв според RAPD/repPCR профила, годината на изолиране, клиника, и носителство на гени, кодиращи карбапенемази.

RAPD/repPCR профил	Принадлежност към IC	Карбапенемаза (n)	Година на изолиране (n)	Клиника (n)
A (repPCR) (n=3)	IC2	<i>bla</i> _{OXA-23-like} (n=3)	2012 _{n=3}	КАИЛ _{n=3}
Клъстър I (RAPD PCR) (n=5)	ND	<i>bla</i> _{OXA-40/23-like} + <i>bla</i> _{OXA-23-like} (n=2)	2015 _{n=1} , 2016 _{n=1}	Кардиохирургия _{n=1} ИНО _{n=1}
	ND	<i>bla</i> _{OXA-40/24-like} (n=3)	2015 _{n=1} , 2016 _{n=2}	КАИЛ _{n=3}

Съкращения: ND, неопределен; IC, International Clone; ИНО, Интензивно Нервно Отделение; КАИЛ, Клиника по Анестезиология и Интензивно Лечение.

В последната декада, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex е сред най-често изолираните MDR микроорганизми от клинични материали на пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ“Света Марина“, като първите CR изолати в болницата са доказани през 2009г. от раневи секрети, но представени само като единични изолати (непоказани данни). В настоящото проучване върху 171 изолата *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex от кръв, за проследявания десет-годишен период се установяват много високи нива на резистентност (над 60%) практически към всички антибиотични групи, като особено засегнати са флуорхинолоните (88.3%) и аминогликозидите (76.6 - 82.5%), следвани от карбапенемите (68.4%). Нещо повече, 100% от CR изолати от периода 2016-2020г. са с характеристика на MDR, а 60% от тях са XDR (чувствителни единствено на colistin), което потвърждава факта, че карбапенемната резистентност в *A. baumannii* сама по себе си се асоциира с изключително проблемно лечение на съответната инфекция поради липсата на терапевтични алтернативи.

По данни на EARS Net макар за периода 2016 - 2020г. в Европа да не се установяват статистически значими тенденции, свързани с резистентността към мониторираните антибиотични групи в *Acinetobacter* spp., през 2020г. е налице увеличение на средната за Европа карбапенемната резистентност до 38% в сравнение с предходните четири години (2016 - 2019г.), а за 2021г. тези нива достигат 39.9%, което резултира в статистически значим тренд за увеличение в периода 2017 - 2021г. (ECDC, 2022a). В продължение на тенденциите от предходни години, през 2021г. най-високи нива на резистентност към карбапенемите се доказват в страни от Южна и Източна Европа (Хърватия, 99.5%; Гърция, 96.9%; Латвия, 96.1%; Румъния, 93.5%; Кипър, 92.1%; Италия, 86.9%; Унгария, 83%; Полша, 82.7%; България, 77.9%), докато тези в страните от Западна и Северна Европа остават под 10% (ECDC, 2022a). Освен много голямото нарастване в броя на рапортуваните изолати *Acinetobacter* spp., както през 2020г., така и през 2021г., за 2021г. EARS Net съобщава и удвояване (+121%) на инвазивните изолати *Acinetobacter* spp., резистентни към всяка от трите антибиотични групи (карбапенемите, аминогликозиди, флуорохинолони) в сравнение със средното за периода 2018 - 2019г., като най-голямо е увеличението на CR изолати (48%). В допълнение, най-голям ръст на резистентността се установява за страните, които традиционно са съобщавали висока нива на резистентност преди 2020г., което

потвърждава трайно влошаващата се ситуация с *Acinetobacter* spp. в последните две години, явяваща се и резултат от COVID-19 пандемията (ECDC, 2022a). В съответствие с установеното от настоящото локално проучване, в периода 2012 - 2020г. за България се докладват повишаващи се нива на резистентност в много високите диапазони едновременно към флуорохинолони (от 69.2% до 82.9%), аминогликозиди (от 58.5% до 76%) и карбапенеми (от 60.3% до 82.9%) (ECDC, 2015; ECDC, 2018; ECDC, 2022). В синхрон с установените локални тенденции в това проучване, в Европа също много често доказван фенотип на резистентност в *Acinetobacter* spp. е комбинираната резистентност едновременно към флуорохинолони, аминогликозиди и карбапенеми - средно 36.8% за 2021г., като е налице сигнификантен тренд за увеличаването ѝ в периода 2017-2021г. (ECDC, 2022a). В България през 2020г. относителният дял на MDR *Acinetobacter* spp. с резистентност едновременно към трите антибиотични групи значително надвишава средния за Европа (34%), като достига 72.9% (ECDC, 2022).

През 2020г. и 2021г. България е страната с една от най-високите тотални антибиотични консумации (болнична и в обществото) в Европа (22.7 - 24.4 DDD/1000 население на ден срещу средно 16.4 DDD/1000 за Европа), като в болничния сектор това е страната с най-висока консумация на стратегически антимикробни средства (62.6 - 70 DDD/1000 население на ден срещу средно 38.6 - 40.3 DDD/1000 за Европа) (ECDC, 2022a). Тези факти естествено корелират с много високите нива на резистентност сред мониторираните от EARS Net микробни видове в България, вкл. *Acinetobacter* spp., най-високи за някои комбинации „бактериален вид-антибиотична група“ сред всички Европейските държави. Връзката между болничната карбапенемна консумация и нивата на карбапенемна резистентност в *Acinetobacter* spp. е доказана в множество проучвания. Извън антибиотичната употреба обаче, и други потенциални фактори като неефективната организация на мероприятията по контрола на инфекциите и предоставянето на здравни грижи, както и климатични и социално-икономически условия също са от значение (Ayobami O, 2020).

Подобно на установеното в това проучване и в потвърждение на данните от EARS Net, GLASS също съобщава висок дял на инфекции на кръвта, причинени от CR *Acinetobacter* spp. за 2019г. на база изолати от 70 държави в целия свят - 65.5% (GLASS, 2021) Базата данни на SENTRY Antimicrobial Surveillance Program дава информация за сходен дял на CR *A. baumannii* изолати от инфекции на кръвта - между 57.5% и 59.6%, както и висок дял на резистентни към хинолони (62%), аминогликозиди (43.8 - 55.3%) и colistin (7.9%) (Di Franco, S, 2021). Скорошно глобално проучване, включващо инвазивни и не-инвазивни карбапенем-нечувствителни изолати *Acinetobacter baumannii* complex, доказва значително по-висок дял на тези изолати в азиатско-тихоокеанския регион (~ 79%), Латинска Америка (~ 85%) и Северна Америка (~ 45%) в сравнение със средните за Европа (Gales A, 2019).

Изключително неблагоприятната тенденция за нарастващ дял на карбапенем -, MDR и XDR инвазивни изолати *A. baumannii* в последната декада се установява и от множество едноцентрови, многоцентрови, ретро- и проспективни проучвания в различни държави (Италия, Гърция, Турция, Китай, Южна Корея, Южна и Югоизточна Азия) (De Angelis G, 2018; De Socio G, 2019; Hsu L, 2017; Jarlier V, 2019; Liu C, 2019; Liu C, 2022; Yardimci A, 2022).

По настоящем шест основни групи карбапенемази, отнасящи се към клас D, се асоциират с възникването и разпространението на карбапенемна резистентност в *A. baumannii* - вродената OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-235-like и OXA-143-like (Abouelfetouh A, 2019). В настоящото проучване, OXA-24/40-like и OXA-23-like карбапенемазите (100% асоциирани с ISAbal), бяха доказани като

основен механизъм на карбапенемна резистентност. Логично, *bla*_{OXA-51-like} беше идентифициран във всички тествани изолати. В синхрон с получените резултати, *bla*_{OXA-23-like} генът е докладван като повсеместно разпространен и най-чест (Северна Америка, Индия, страните от азиатско-тихоокеанския регион, Южна Корея, Европа) (Al-Hassan L, 2021; Evans B, 2014; Hamidian M, 2019; Hammoudi D, 2015; Nguyen M, 2021; Moubareck C, 2020; Mugnier P, 2010; Nordmann P, 2019; Ramirez M, 2020; Santimaleeworagun W, 2016; Valcek A, 2022; Wibberg D, 2018). Продукцията на OXA-23-like е най-честият механизъм, медиращ карбапенемната резистентност в изолати *A. baumannii* и в няколко проучвания от Балканския регион (Хърватия, Гърция, Румъния, Турция, България), както и в EURECA проучването (67.7%), обхващащо изолати от 10 страни (Албания, Хърватия, Косово, Гърция, Италия, Черна гора, Румъния, Сърбия, Испания и Турция) в периода 2016 - 2018г. (Bonnin R, 2011; D'Onofrio V, 2020; Karampatakis T, 2017; Kostyanev T, 2021; Palmieri M, 2020; Petrova A, 2017; Pfeifer Y, 2017; Strateva T, 2012; Zeka A, 2014). OXA-23 карбапенемаза е идентифицирана като водещ механизъм на резистентност (96.4%) и сред голяма колекция от карбапенем-резистентни изолати от Средиземноморския регион (Израел, Гърция и Италия) (Frenk S, 2022).

Трябва да се отбележи, че в редица географски региони OXA-23 карбапенемазата е идентифицирана едновременно продуцирана с други карбапемази в клинични изолати *A. baumannii*: OXA-23 и GES-11 (Ливан, Кувейт, Судан); OXA-23 и NDM-1 (Индия, Судан); OXA-23 и OXA-58 (Тунис, Судан); OXA-23, OXA-58 и NDM-1 (Судан); OXA-23, VIM-2 и NDM-1 (Тайланд) (Al-Hassan L, 2021; Hammoudi D, 2015; Kumar S, 2019; Mathlouthi N, 2018; Santimaleeworagun W, 2016; Zhu L, 2019). Проучване на Ниязи от 2022г. върху бактериални инфекциозни усложнения при пациенти след хематопоетична стволово-клетъчна трансплантация, идентифицира карбапенем-резистентен изолат *A. baumannii* от кръв, притежаващ едновременно *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA24/40}, *bla*_{OXA48-like} и *bla*_{VIM-like} гени, резултат, който потвърждава генетичната пластичност на този бактериален вид, даваща му възможност да се възползва от многообразието на механизмите на резистентност в условията на висок селективен антибиотичен натиск (Ниязи Д, 2022; Fournier P, 2006). В синхрон с тези съобщения, настоящото проучване също идентифицира в 12.7% ко-продукция на OXA-23-like и OXA-24/40-like. В допълнение на това, *bla*_{OXA-24/40-like} беше идентифициран в 59.2% от карбапенем-резистентните изолати. Понастоящем *bla*_{OXA-24/40-like} CR *A. baumannii* са идентифицирани повсеместно, включително свързани с вътреболнични взривове (Afzal-Shah M, 2001; Chen Y, 2018; Huang L, 2013; Kostyanev T, 2021; Kuo S, 2018; Nasiri M, 2020; Pailhories H, 2016; Pfeifer Y, 2016; Pfeifer Y, 2017; Poirel L, 2010; Sari A, 2013; Todorova B, 2014; Valcek A, 2022). Сходни на получените резултати от настоящото локално проучване, се съобщават и от Lukovic et al. в първото многоцентрово проучване върху 237 карбапенем-резистентни *A. baumannii* в Сърбия (43 изолата, асоциирани с инфекции на кръвта) (Lukovic B, 2020). В проучване от Полша, OXA-24-like (OXA-72) също се доказва като основен механизъм на карбапенемна резистентност (64%), следван от OXA-23 (23%) и OXA-58 (10.2%) (Słoczyńska A, 2021).

Освен плазмидно кодираните оксацилинази с карбапенемазна активност от групата на OXA-23-like и OXA24/40-like, в *A. baumannii* са идентифицирани и карбапенемази от групите OXA-58-like, OXA-143-like и OXA-235-like (Higgins P, 2013; Mathlouthi N, 2018; Sarikhani Z, 2017). В настоящото проучване не бяха доказани *bla*_{OXA-58-like} положителни изолати, което е в синхрон с други проучвания, доказващи шифт от OXA-58-like към OXA-23-like и OXA-24/40-like продукция в *A. baumannii* (Adams-Haduch J, 2011; Djahmi N, 2014; Liakopoulus A, 2012; Pournas S, 2017; Rosales-

Reyes R, 2017; Schleicher X, 2013; Wang T, 2018). OXA-143-like и OXA-235-like карбапенемазите също са докладвани като асоциирани с вътреболнични взривове в няколко държави, но понастоящем те не се смятат за водещи причини за карбапенемна резистентност в *A. baumannii* (Hamidian M, 2019; Rodriguez C, 2018), което се потвърждава и от получените от нас резултати.

Макар и рядко карбапенемната-резистентност в *A. baumannii* се медира и от продукцията на карбапенемази от клас А (GES-11, KPC-2, KPC-3, KPC-3) и метало-карбапенемази (NDM-1, NDM-6, VIM, GIM, SIM, IMP). В настоящото локално проучване не бяха доказани CR изолати, продуценти на карбапенемази от тези класове.

Разпространението на MDR *A. baumannii* е широко асоциирано със специфичната му склонност за клонално разпространение, като днес са известни девет интернационални клона (IC 1-9), циркулиращи глобално, от които IC2 е широко разпространен на различните континенти (Bansal G, 2020; Brito B, 2022; Graña-Miraglia L, 2020; Higgins P, 2010; Jones C, 2015; Mateo-Estrada V, 2021; Pournas S, 2017; Seifert H, 2020 Tomaschek F, 2016). В допълнение, MDR и карбапенем-резистентните *A. baumannii* са известни и със склонността си да причиняват трудно контролируеми вътреболнични взривове, като такива са доказвани в САЩ, Канада, Южна Америка, Европа, Африка, Средния Изток, Югоизточна Азия и Австралия (Dandachi I, 2019; Hamidian M, 2019; Valencia-Martín, R, 2019; Wareth G, 2020).

Доказването на много висок относителен дял на карбапенем - и MDR - *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex в УМБАЛ“Света Марина“ в периода 2011-2020г. поставя въпроса доколко изолатите са генетично свързани. С цел изясняване на молекулярната епидемиология на репрезентативни изолати *A. baumannii* (сред които и такива, асоциирани с инфекции на кръвта), бяха използвани *rep*PCR и RAPD PCR. Получените резултати ясно демонстрират вътреболнична дисеминация в периода 2014-2016г. на клонално-свързани OXA-карбапенамаза продуциращи MDR изолати, групирани в 4 клъстера, два, от които доминиращи и персистиращи в рамките на три години (2014 - 2016г.), като в клъстер I попадат 55.6% от изолатите, вкл. изолатите от кръв на пациенти, хоспитализирани в три различни клиники на болницата. Получените резултати демонстрират способността на *A. baumannii* веднъж попаднал в болничната среда, да персистира продължително време в нея, причинявайки вътреболнични инфекции и взривове. Изключителната устойчивост на изсушаване и дезинфектанти, заедно с комплекс от фактори на вирулентност (биофилм продукция, AbOmpA протеин, др.) позволяват на този микроорганизъм да персистира жизнеспособен продължително време върху сухи повърхности (до 4 месеца) и в болничната среда (Ngyuen M, 2021). Именно тази особеност допринася в огромна степен за клоналното разпространение на изолатите и предразполага трансмисията от човек на човек и контаминацията на околната среда (Higgins P, 2010). Получените резултати подкрепят предишни и скорошни проучвания, демонстриращи успешна дисеминация и ендемичност на определени CR клонове *A. baumannii*, продуциращи OXA-23, OXA-40/24 и OXA-58 карбапенемази (вкл. IC2), асоциирани с вътреболнични инфекции и взривове (инфекции на кръвта, VAP и др.) и в други български болници (Stoeva T, 2008; Stoeva T, 2009; Pfeifer Y, 2017; Stratev A, 2020). Може да се предположи, че внасянето и разпространението на няколко клона води до паралелно протичащи взривове и поликлонална ендемичност в болницата, подобно на съобщено от други автори (Marchaim, D, 2007; Mateo-Estrada V, 2021).

Резултатите от епидемиологичното типизиране на 21 изолата от 2012г. и един от 2010г., всички от КАИЛ, получени от пациенти с инфекции с различна анатомична локализация, включително инфекции на кръвта, доказва продължителен вътреболничен взрив, асоцииран с OXA-23 продуциращ IC2 и неговото трайно

персистиране с характеристика на ендемичност в тази болнична структура. Понастоящем IC2 е най-широко разпространения международен клон, глобално доказван сред всички секвенирани *A. baumannii* геноми (Levy-Blitchtein S, 2018; Seifert H, 2020; Valcek A, 2022). Редица проучвания доказват дисеминацията на ОХА-23 продуциращи CR *A. baumannii*, принадлежащи към IC2 в различни страни (Al Atrouni A, 2016; Castanheira M, 2014; Cherubini S, 2022; Dandachi I, 2019; Eigenbrod T, 2019; Hamidian M, 2019; Higgins P, 2010a; Kostyanov T, 2021; Müller C, 2019; Tomaschek F, 2019; Zarrilli R, 2013). Подобно на получените от нас резултати, автори от Балканския и Средиземноморския региони (Гърция, Италия, Израел, Ливан и Турция), Полша и Перу съобщават IC2, свързан с ОХА-23 или ОХА-24 продукция, като ендемичен и асоцииран с множество вътреболнични инфекции и взривове (вкл. инфекции на кръвта), както и с широка междуболнична дисеминация (Di Popolo A, 2011; Frenk S, 2022; Gogou V, 2011; Levy-Blitchtein S, 2018; Lukovic B, 2020; Palmieri M, 2020; Pournas S, 2017; Słoczyńska A, 2021; Stratev A, 2020).

3. Етиологичен спектър на бактериалните инфекции на кръвта в хоспитализирани пациенти с онкохематологични заболявания в периода 2010-2020г.

През проучвания период от време в Лабораторията по микробиология на УМБАЛ "Св. Марина" - Варна, са изследвани общо 3954 хемокултури на пациенти с онкохематологични заболявания и съмнение за инфекциозно усложнение, хоспитализирани в Клиниката по клинична хематология и Клиниката по детска онкохематология на болницата. Изолирани и идентифицирани са общо 457 неповтарящи се, клинично значими изолата от хемокултури на 442 пациента (вкл. 17 пациента след хематопоетична стволоро-клетъчна трансплантация). Етиологичният спектър на бактериите, асоциирани с инфекции на кръвта, е представен в таблица 22. Съотношението Грам отрицателни към Грам положителни бактерии спрямо общия брой бактериални изолати за периода 2010 - 2020г. е 58.8% : 41.2%, като през първия пет годишен период (2010 - 2014г.) това съотношение е 57.7% : 42.3%, а през втория (2015 - 2020г.) - 59.2% : 40.8% съответно.

Таблица 22. Етиологичен спектър на инфекциите на кръвта в хоспитализирани пациенти с онкохематологични заболявания в периода 2010-2020г. (сравнително представяне).

Етиологичен спектър	Общо за периода	Първи период	Втори период	p
	2010 – 2020г. n (%)	2010 - 2014г. n (%)	2015 – 2020г. n (%)	
Грам отрицателни бактерии	248 (54.3)	75 (53.2)	173 (54.7)	0.764
Грам положителни бактерии	174 (38.0)	55 (39.0)	119 (37.7)	0.794
Гъбички	35 (7.7)	11 (7.8)	24 (7.6)	0.944
Разпределение на изолатите по микробни видове				
<i>Staphylococcus aureus</i>	79 (17.3)	38 (27.0)	41 (13.0)	0.0002

<i>E. coli</i>	73 (16.0)	27 (19.1)	46 (14.5)	0.215
<i>Enterobacter</i> spp.	50 (10.9)	12 (8.5)	38 (12.0)	0.267
<i>Klebsiella</i> spp.	47 (10.3)	15 (10.6)	32 (10.1)	0.865
<i>Enterococcus</i> spp. (<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>)	40 (8.8)	10 (7.0)	30 (9.5)	0.4
<i>Candida</i> spp.; <i>Cryptococcus</i> spp.	35 (7.6)	11 (7.8)	24 (7.5)	0.936
CoNS	32 (7.0)	3 (2.1)	29 (9.2)	0.006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27 (5.9)	10 (7.0)	17 (5.4)	0.471
<i>Acinetobacter baumannii</i>	18 (3.9)	4 (2.8)	14 (4.4)	0.418
<i>Serratia marcescens</i>	8 (1.8)	3 (2.1)	5 (1.6)	0.682
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6 (1.3)	1 (0.7)	5 (1.6)	0.447
<i>Streptococcus viridans</i>	6 (1.3)	-	6 (1.9)	-
<i>Salmonella</i> spp.	5 (1.0)	2 (1.4)	3 (0.9)	0.659
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5 (1.1)	2 (1.4)	3 (0.9)	0.659
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4 (0.9)	-	4 (1.3)	-
<i>Bacteroides</i> spp.	3 (0.7)	1 (0.7)	2 (0.6)	0.928
<i>Corynebacterium</i> spp.	3 (0.7)	-	3 (0.9)	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	3 (0.7)	2 (1.4)	1 (0.3)	0.18
<i>Proteus mirabilis</i>	2 (0.4)	-	2 (0.6)	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2 (0.4)	-	2 (0.6)	-
<i>Citrobacter koseri</i>	1 (0.2)	-	1 (0.3)	-
<i>Morganella morganii</i>	1 (0.2)	-	1 (0.3)	-
<i>Aeromonas veronii</i>	1 (0.2)	-	1 (0.3)	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1 (0.2)	-	1 (0.3)	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 (0.2)	-	1 (0.3)	-
<i>Pasteurella multocida</i>	1 (0.2)	-	1 (0.3)	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	1 (0.2)	-	1 (0.3)	-
<i>Streptococcus group D</i>	1 (0.2)	-	1 (0.3)	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1 (0.2)	-	1 (0.3)	-
Общо	457 (100.0)	141 (100.0)	316 (100.0)	-

Пациентите с онкохематологични заболявания (ОХЗ) са с повишен риск за развитие на инфекциозни усложнения, като неутропенията е най-значимият рисков фактор за това. Инфекциите на кръвта са сред най-тежките, животозастрашаващи усложнения с нива на смъртност между 18 и 42% (*Wisplinghoff H, 2003*). Според проучване на Pagano и колектив честотата на микробиологично доказаните инфекции сред пациенти с ОХЗ е 9.4%, като 85% от тях са бактериални инфекции на кръвта (*Pagano L, 2012*). Проследено в исторически план, в хода на последните пет десетилетия се установяват значителни промени в етиологичния спектър на микроорганизмите, изолирани от хемокултури на пациенти с ОХЗ. През 60-те и 70-те

години на миналия век Грам - отрицателните бактерии са сред най-честите причинители на инфекции на кръвта в тази група пациенти. В следващите 30 години, делът на Грам - положителните микроорганизми (коагулаза - негативни стафилококи, стрептококи вириданс, ентерококи, *S. aureus*) значително нараства. Сред факторите, свързани с тази промяна, са увеличената употреба на някои химиотерапевтици и свързаното с това развитие на орални мукозити, тежката и продължителна неутропения, увеличената употреба на венозни катетри, флуорохинолоновата профилактика и др.

В последните години множество проучвания съобщават за промяна в етиологичния спектър на тези инфекции: от Грам положителни към Грам отрицателни бактерии, успоредно с увеличаването и успешното дисеминиране на MDR и дори пан-драг резистентни Грам отрицателни бактерии (*Kokkayil, 2018; Paul M, 2020*). Промяната в съотношението Грам положителни към Грам отрицателни бактериемии е от 60:40% в началото към 55:45% в полза на Грам отрицателните бактерии понастоящем (*Secreto C, 2020*). Сред причините за очертаващата се тенденция на превалиране на Грам - отрицателни микроорганизми се идентифицират няколко основни фактора, като най-важният сред тях е използването и продължителността на антибиотичната профилактика. В унисон с тази тенденция, за проучвания период от време (2010 - 2020г.) в нашия център по-чести причинители на инфекции на кръвта са Грам отрицателните бактерии, с водещи бактериални видове *E. coli* (16.0%), *Enterobacter* spp. (10.2%), *Klebsiella* spp. (10.3%), *P. aeruginosa* (5.9%) и *A. baumannii* (3.9%), като съотношението Грам отрицателни към Грам положителни бактерии е 58.2% : 41.2%. В подобни на настоящото проучвания сред пациенти с ОХЗ след 2000г. от Италия, Испания и Южна Корея се съобщават сходни резултати за съотношението Грам отрицателни към Грам положителни бактериемии: Cattaneo et al., 57.3% срещу 33.6%; Trecarichi et al., 52.8% за Грам отрицателните бактериемии; Gudiol et al., 49% срещу 41%; Kang et al., 55.6% срещу 32.7% (*Cattaneo C, 2012; Gudiol C, 2013a; Kang C, 2012; Trecarichi E, 2015*). В проучване на Калева и колектив върху микробиологичния спектър на инфекциозните усложнения при онкологично болни деца в България, обхващащо два по-ранни периода: 1990 - 1994 г. и 1995 - 2003г., се установява превалиране на Грам - положителните бактериемии (53.2%) пред Грам - отрицателните (40.3%) и фунгемии (6.5%), като най-често са изолирани коагулаза - негативни стафилококи, следвани от *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli* и *P. aeruginosa* (*Калева В, 2006*). В същото проучване, съотношението между Грам - положителните и Грам - отрицателните изолати от кръв не се променя през двата изследвани периода, но през по-късния период сигнификантно се повишава относителният дял на *E. coli*, а делът на α -хемолитичните стрептококи се понижава (*Калева В, 2006*).

В настоящето проучване Грам положителните бактерии се установяват в 38% от случаите, като стафилококите (*S. aureus*, 17.3%; *CoNS*, 7.0%) и ентерококите (8.8%) са най-честите Грам положителни бактерии, асоцииращи се с инфекции на кръвта при нашите пациенти.

Най-често изолираният бактериален вид сред всички бактериални видове, независимо от тяхната Грамова принадлежност, е *S. aureus* (17.3%), следван от *E. coli* (16.0%) и *Enterobacter* spp. (10.9%). Сравнявайки двата периода на настоящото проучване, установяваме статистически значима тенденция за намаляване дела на *S. aureus* през втория период ($p=0.002$), на фона на ясна тенденция за увеличаване дела на *CoNS* ($p=0.006$), най-често асоцииращи се с катетър-свързани инфекции на кръвта (непоказани данни) и на ентерококите (9.5% срещу 6.9%) ($p=0.4$) в периода 2015 - 2020г. За подобно водещо значение на стафилококите, но за сметка на *CoNS* се съобщава от S. Haddad, A. Amanati, D. Mert, M. Paul и др. (*Amanati A, 2021; Haddad S,*

2021; Mert D, 2019; Paul M, 2020; Secreto C, 2020). С. Secreto et al. докладват CoNS отговорни за около 25% от Грам положителни бактериемии, а *S. aureus* - за около 5% от случаите (Secreto C, 2020). Други проучвания също съобщават по-високи нива на изолируемост на CoNS като етиологични агенти на инфекции на кръвта: 8.3% (Kang C, 2012a), 14.7% (Kjellander C, 2012), 23.1% (Chong Y, 2011), 24.8% (Trecarichi E, 2009), 43% (Irfan S, 2008), 55.2% (Saghir, S, 2009). По отношение на *S. aureus*, в различни проучвания делът им варира значително - между 1.3%, 6.9%, 9.5% и 12%, като този бактериален вид не е сред първите три доминиращи патогени в съответните проучвания (Cattaneo C, 2012; Chong Y, 2011; Gudiol C, 2010; Irfan S, 2008; Kang C, 2012a, Kjellander C, 2012). Trecarichi и колектив съобщават, че *S. aureus* е на едно от последните места по честота на изолируемост (1.6%), което е в контраст с нашите резултати (Trecarichi E, 2015). По-близко до данните, които са представени в настоящето проучване е работата на Kang и колектив, които установяват *S. aureus* (9.8%) и *Enterococcus* spp. (9.2%) като най-честите Грам - положителни бактериални видове, причиняващи инфекции на кръвта в пациенти с ОХЗ (Kang C, 2012a).

Сравнявайки резултатите от двата периода на настоящото проучване, се установява запазване във времето на тенденцията за превалиране на Грам отрицателните бактерии в цялостния спектър на инфекциите. Във втория период се доказва увеличен дял на *Enterobacter* spp. (от 8.5% до 12%), намаляващ на *E. coli* (от 19.1% до 14.5%) и *P. aeruginosa* (от 7.0% до 5.4%) ($p > 0.05$). Подобни резултати за превалиране на Грам отрицателните бактерии в етиологичния спектър на инфекциите на кръвта при пациенти с ОХЗ, с водещи патогени *E. coli*, следвани от *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* и *A. baumannii* се съобщават и от много други автори (Amanati A, 2021; Govind Babu K, 2016; Haddad S, 2021; Islas-Munoz, 2018; Kokkayli P, 2018; Mert D, 2019; Paul M, 2020; Tang Y, 2021). В контраст с нашите резултати, A. Carvahlo et al. съобщават най-висок процент на *Streptococcus viridans* (24.1%) и ентерококи (13.3%) в целия етиологичен спектър и подобен относителен дял на *E. coli* (14.9%) (Carvahlo A, 2020).

Макар и много по-рядко изолирани в сравнение с доминиращите причинители на инфекции на кръвта, в настоящото проучване бяха доказани изолати, отнасящи се към видовете *Listeria monocytogenes* и *Salmonella* spp. Листерийната инфекция засяга определени контингенти, сред които новородени, много възрастни пациенти, бременни, както и имунокомпрометирани индивиди с дефицит в клетъчно-медиацията на имунитет. Една от най-рисковите групи за листерийен сепсис са индивидите, подложени на имunosупресивна терапия (онкологично болни пациенти, трансплантирани). Генерализацията на инфекциозния процес в случаите на *Salmonella* spp., след преодоляване на локалната бариера на лимфните възли в чревния тракт, също е характерна за имunosупресивните пациенти и тези с имунни дефицити. Изолатите от тези бактериални видове, макар и доказани в единична хемокултура при съответните пациенти, винаги трябва се интерпретират като клинично значими.

4. Антибиотична резистентност на най-честите причинители на бактериемии, асоциирани с инфекции на кръвта в хоспитализирани пациенти с онкохематологични заболявания в периода 2010-2020г.

Резистентността на най-честите Грам отрицателни (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex) и Грам положителни бактериални видове (*S. aureus*, *Enterococcus* spp.), причинители на бактериемии, асоциирани с инфекции на кръвта в пациенти с онкохематологични заболявания в периода 2010 - 2020г. към основни групи антимикробни лекарствени средства е

представена на таблици 23, 24, 25, 26, 27, 28 и 29.

Таблица 23. Резистентност към набор от антимикробни лекарствени средства на изолати *S. aureus* от кръв на пациенти с онкохематологични заболявания с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периодите 2010 - 2014г. и 2015 - 2020г.

АБ група	2010 - 2020		2010-2014		2015-2020		P
	n	%R (n)	n	%R (n)	n	%R (n)	
methicillin	79	11.4 (9)	38	10.5 (4)	41	12.2 (5)	0,818
аминогликозиди	79	13.9 (11)	38	7.9 (3)	41	19.5 (8)	0,136
флуорохинолони	79	8.9 (7)	38	7.9 (3)	41	9.7 (4)	0,771
гликопептиди	79	0.0 (0)	38	0.0 (0)	41	0.0 (0)	NA
оксазолидинони	79	0.0 (0)	38	0.0 (0)	41	0.0 (0)	NA

Таблица 24. Резистентност към набор от антимикробни лекарствени средства на изолати *E. faecalis* и *E. faecium* от кръв на пациенти с онкохематологични заболявания с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периодите 2010 - 2014г. и 2015 - 2020г.

АБ група	2010 - 2020		2010-2014		2015-2020		p
	n	%R (n)	n	%R (n)	n	%R (n)	
<i>E. faecalis</i>							
аминопеницилини	23	8.7 (2)	6	16.6 (1)	17	5.8 (1)	0,418
HLAR	23	69.6 (16)	6	66.6 (4)	17	70.5 (12)	0,857
гликопептиди	23	0.0 (0)	6	0.0 (0)	17	0.0 (0)	NA
оксазолидинони	23	0.0 (0)	6	0.0 (0)	17	0.0 (0)	NA
флуорохинолони	23	82.6 (19)	6	66.6 (4)	17	88.0 (15)	0,230
<i>E. faecium</i>							
аминопеницилини	17	94.1 (16)	4	100 (4)	13	92.3 (12)	0,568
HLAR	17	94.1 (16)	4	100 (4)	13	92.3 (12)	0,568
гликопептиди	17	0.0 (0)	4	0.0 (0)	13	0.0 (0)	NA
оксазолидинони	17	0.0 (0)	4	0.0 (0)	13	0.0 (0)	NA
флуорхинолони	17	100 (0)	4	100 (4)	13	100 (13)	NA

Таблица 25. Резистентност към набор от антимикробни лекарствени средства на изолати *E. coli* от кръв на пациенти с онкохематологични заболявания с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периодите 2010 - 2014г. и 2015 - 2020г.

АБ група	2010-2020		2010-2014		2015-2020		p
	n	%R (n)	n	%R (n)	n	%R (n)	
3-та генерация цефалоспорини	73	39.7 (29)	27	74.0 (20)	46	19.6 (9)	0,0001
карбапенеми (meropenem)	73	1.4 (1)	27	0.0 (0)	46	2.2 (1)	0,443
gentamicin	73	30.1 (22)	27	40.7 (11)	46	23.9 (11)	0,131
amikacin	73	2.7 (2)	27	3.7 (1)	46	2.2 (1)	0,697
флуорохинолони	73	45.2 (33)	27	48.1 (13)	46	43.5 (20)	0,697
colistin	46	2.2 (1)	-	-	46	2.2 (1)	NA

Таблица 26. Резистентност към набор от антимикробни лекарствени средства на изолати *K. pneumoniae* от кръв на пациенти с онкохематологични заболявания с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периодите 2010 - 2014г. и 2015 - 2020г.

АБ група	2010 - 2020		2010 - 2014		2015 - 2020		p
	n	%R (n)	n	%R (n)	n	%R (n)	
3-та генерация цефалоспорини	45	57.8 (26)	15	67.0 (10)	30	53.3 (16)	0,395
карбапенеми (meropenem)	45	6.7 (3)	15	0.0 (0)	30	10.0 (3)	0,204
gentamicin	45	77.8 (35)	15	80.0 (12)	30	71.8 (23)	0,802
amikacin	45	11.1 (5)	15	6.6 (1)	30	13.3 (4)	0,503
флуорохинолони	45	51.1 (23)	15	67.0 (10)	30	43.3 (13)	0,134
colistin	30	0.0 (0)	-	-	30	0.0 (0)	NA

Таблица 27. Резистентност към набор от антимикробни лекарствени средства на изолати *E. cloacae* complex от кръв на пациенти с онкохематологични заболявания с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периодите 2010 - 2014г. и 2015 - 2020г.

АБ група	2010 - 2020		2010 - 2014		2015 - 2020		p
	n	%R (n)	n	%R (n)	n	%R (n)	
3 генерация цефалоспорини	44	46.8 (25)	12	25.0 (3)	32	68.8 (22)	0,009
карбапенеми (meropenem)	44	2.3 (1)	12	0.0 (0)	32	3.1 (1)	0,535
gentamicin	44	59.0 (26)	12	25.0 (3)	32	71.8 (23)	0,005
amikacin	44	0.0 (0)	12	0.0 (0)	32	0.0 (0)	NA
флуорохинолони	44	34.0 (15)	12	0.0 (0)	32	46.8 (15)	0,004
colistin	32	0.0 (0)	-	-	32	0.0 (0)	NA

Таблица 28. Резистентност към набор от антимикробни лекарствени средства на изолати *P. aeruginosa* от кръв на пациенти с онкохематологични заболявания с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периодите 2010 - 2014г. и 2015 - 2020г.

АБ група	2010 - 2020		2010 - 2014		2015 - 2020		p
	n	%R (n)	n	%R (n)	n	%R (n)	
pipercillin/tazobactam	27	11.1 (3)	10	20.0 (2)	17	5.9 (1)	0,258
ceftazidime	27	14.8 (4)	10	20.0 (2)	17	11.8 (2)	0,562
карбапенеми	27	7.4 (2)	10	0.0 (0)	17	11.8 (2)	0,258
gentamicin*	25	0.0 (0)	10	0.0 (0)	15	0.0 (0)	NA
amikacin	27	3.7 (1)	10	0.0 (0)	17	5.9 (1)	0,435
флуорхинолони	27	7.4 (2)	10	0.0 (0)	17	11.8 (2)	0,258
colistin	17	0.0 (0)	-	-	17	0.0 (0)	NA

*чувствителността към gentamicin е определяна до 2019г.

Таблица 29. Резистентност към набор от антимикробни лекарствени средства на изолати *A. baumannii - calcoaceticus* complex от кръв на пациенти с онкохематологични заболявания с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта в периодите 2010 - 2014г. и 2015 - 2020г.

АБ група	2010 - 2020		2010 - 2014		2015-2020		p
	n	%R (n)	n	%R (n)	n	%R (n)	
карбапенеми	18	72.2 (13)	4	25.0 (1)	14	85.7 (12)	0,017
gentamicin	18	94.4 (17)	4	100 (4)	14	93.0 (13)	0,582
amikacin	18	88.9 (16)	4	75.0 (3)	14	93.0 (13)	0,317
флуорохинолони	18	94.4 (17)	4	100.0 (4)	14	93.0 (13)	0,582
colistin	14	0.0 (0)	-	-	14	0.0 (0)	NA

Макар някои проучвания да отчитат значително намаляване на смъртността, свързана с инфекции на кръвта в пациенти с ОХЗ от 25% през 70-те години до 6% в последните години поради употребата на широкоспектърни антибиотици, една неблагоприятна последица от това обаче е съвременната тенденция за стабилно увеличаване дела на инфекциите, причинени от MDR бактерии, включително инфекции на кръвта. От своя страна заради ограничения избор на активни антибиотици, инфекциите, причинени от MDR патогени, често се асоциират с неуспешно лечение и висока смъртност (*Secreto C, 2020; Tang Y, 2021*). Понастоящем спектърът на MDR патогени в пациенти с ОХЗ е ограничен предимно (но не единствено) до Грам отрицателните бактерии (*Secreto C, 2020*). Сред множествено резистентните Грам отрицателни бактерии, представителите на семейство *Enterobacteriaceae*, демонстриращи фенотип на ESBL продуценти, карбапенем- и colistin-резистентните изолати от същото семейство, както и карбапенем- и colistin-резистентните *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, са все по-нарастващ проблем в съвременната инфекциозна патология и в тази специфична група пациенти. Пациентите с ОХЗ, които са имunosупресирани заради основното си заболяване и повтаряща се във времето, продължителна експозиция на широкоспектърни

антибиотици, са с особено висок риск за развитие на инфекции на кръвта. Множество проучания през последните години сочат, че епидемиологията на инфекциите на кръвта в пациенти със злокачествени кръвни заболявания се асоциира все повече с MDR патогени, като тези микроорганизми се очертават доминиращите агенти при този вид инфекции (*Amanati A, 2021; Kokkayil P, 2018*). В контекста на това, трябва да се отбележи, че е задължително да се акумулира и анализира непрекъснато информацията за локално преваляращите патогени с техния профил на резистентност с цел подпомагане на емпиричния антибиотичен избор. Сред основните рискови фактори за развитие на инфекции, причинени от MDR бактерии, са наличие на предишна или настояща колонизация (чревен тракт, нос, гърло) с MDR бактерии, предишна инфекция с MDR патоген, скорошна експозиция на широкоспектърни антибиотици, удължен болничен престой или престой в ICU и състоянието на локалната болнична резистентност. В контекста на онкохематологичните заболявания, необходимо е да се оцени кои пациенти са високо рискови по отношение на тези фактори, за да бъде иницирана именно при тях антимикробна терапия, таргетираща тези патогени.

В проследявания 11-годишен период от време се установи висок относителен дял на резистентни към трета генерация цефалоспорини ентеробактерии [49.4% (80 от 162 изолата)], като най-висок е този дял в групата на изолатите *K. pneumoniae* (57.8%), следвани от *E. cloacae* complex (46.8%) и *E. coli* (39.7%). Настоящото проучване доказва резистентните към трета генерация цефалоспорини чревни бактерии сред най-честите причинители на инфекции на кръвта при пациенти с ОХЗ, което се потвърждава и от други подобни проучвания (*Martin M, 2015*). В допълнение, сравнявайки периодите 2010 - 2014г. и 2015 - 2020г., се установява статистически значим тренд към намаляване дела на изолатите *E. coli*, резистентни на трета генерация цефалоспорини ($p=0.0001$) и увеличаване този на *E. cloacae*, резистентни към трета генерация цефалоспорини ($p=0.009$) през втория период. Редица автори съобщават подобен и по-висок дял за Грам отрицателни бактерии, причинители на инфекции на кръвта в онкохематологични пациенти, демонстриращи профил на резистентност към трета генерация цефалоспорини (50.5%, 52.4%, 64%, 79.5%) (*Amanati A, 2021; Haddad S, 2021; Mert D, 2019; Tang Y, 2021*).

Сред изолатите от семейство *Enterobacteriaceae* бяха установени и високи нива на резистентност към флуорохинолони (между 34% и 51%), като за *E. cloacae* complex беше доказан статистически значим тренд на увеличение дела на хинолон-резистентните изолати от 25% до 68.8% през втория период (2015-2020г.). Подобно на тези резултати, редица автори, проучвали онкологично болни пациенти, също докладват хинолонова резистентност сред представителите на семейство *Enterobacteriaceae* между 45 и 91% (*Bhusal Y, 2011; Chong Y, 2011; Irfan S, 2008; Mihu C, 2010; Trecarichi E, 2009; Trecarichi E, 2015*). Понастоящем се смята, че профилактичната употреба на хинолони играе важна роля за възникването на този тип резистентност. Нещо повече, широката профилактична употреба на хинолонови препарати има значителен принос не само за селектирането на хинолон-резистентни бактерии в гастро-интестиналния тракт, но и за селектиране на чревни бактерии, продуценти на ESBLs и MRSA (*Montassier E, 2013*). В допълнение, циркулацията на хинолон-резистентни щамове от семейство *Enterobacteriaceae* в обществото може да обясни изолирането на хинолон-резистентни чревни бактерии от хемокултури на онкологично болни, при които не е била провеждана хинолонова профилактика.

И срещу трите бактериални вида *E. coli*, *K. pneumoniae* и *E. cloacae* complex, amikacin демонстрира много добра активност (0% - 11.1% резистентност), за разлика от тази на gentamicin (30.1% - 77.8% резистентност). Подобно на резистентността към трета генерация цефалоспорини и флуорохинолони в *E. cloacae*, статистически значим

тренд на увеличаване е доказан и за дела на gentamicin-резистентните *E. cloacae* ($p=0.005$) в проследявания 11-годишен период от време.

Резистентността към стратегическия препарат colistin в цялата група Грам отрицателни бактерии е много ниска, като е идентифицирана само в един изолат *E. coli*. Тези резултати правят amikacin и colistin препарати на избор при терапия на инфекции на кръвта, причинени от MDR чревни бактерии, като трябва обаче да се вземе под внимание потенциалната нефротоксичност на тези антимикробни средства, особено в случаите на критично болни пациенти, получаващи химиотерапия.

Друга ключова група антимикробни препарати, чиято активност е мониторирана, са карбапенемите (meropenem). В настоящото проучване бе установен много висок относителен дял на CR *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex (72.2%), като проследен в годините, се доказва статистически значим тренд на увеличение ($p=0.017$). Значително по-ниски нива на резистентност към meropenem бяха доказани в *P. aeruginosa* (7.4%), *K. pneumoniae* (6.7%), *E. cloacae* (2.3%) и *E. coli* (1.4%). Карбапенемната резистентност в цялата група Грам отрицателни бактерии е 9.7% (20 от 207 изолата), като този тип резистентност бе доказан само сред кръвни изолати, получени от пациенти след 2014г. Близки до нашите резултати за карбапенемна резистентност сред Грам отрицателни бактерии съобщават и други автори (12%, 11.5%) (Haddad S, 2021; Kedzior S, 2021). В контраст, Amanati et al. докладват 39.3% карбапенемна резистентност сред представители на семейство *Enterobacteriaceae* и неферметиращи бактерии, 87.5% в *A. baumannii* и 71.6% в *P. aeruginosa* (Amanati A, 2021). Обширен обзор, публикуван през 2017г. и включващ проучвания от 21 страни, заключава, че резистентността към карбапенеми в семейство *Enterobacteriaceae* (особено *K. pneumoniae*), *P. aeruginosa* и в *A. baumannii* е сериозна заплаха за пациентите с ОХЗ в световен мащаб и се асоциира с високи нива на смъртност (Righi E, 2017). В научната литература има публикувани редица съобщения за възникване на карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae*, специално *K. pneumoniae* и *Enterobacter* spp., причиняващи инфекции в пациенти с онкологични заболявания, вкл. вътреболнични епидемии и смърт (Micozzi A, 2017; Satlin M, 2013; Satlin M, 2014). В допълнение, Y. Tang et al. съобщават, че наличието на карбапенемна резистентност в бактериалния причинител значимо въздейства върху прогнозата при пациенти с ОХЗ и инфекции на кръвта, като това особено се отнася за CR *K. pneumoniae*, вероятно поради високо резистентния профил на тези бактериални патогени (Tang Y, 2021). В синхрон със световните и Европейски тенденции, в периода 2011 - 2020г. за България се съобщава трайна тенденция за постепенно увеличаващо се ниво на карбапенемна резистентност (<1% до 28.1%) сред най-честите представителите на семейство *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *E. coli*), изолирани от кръв (ECDC, 2022), което напълно съответства на получените от нас резултати за meropenem в периода 2010 - 2020г. за инфекции на кръвта в пациенти с ОХЗ, което е отражение на националните и локални резултати сред не-селектираната популация пациенти.

P. aeruginosa е един микроорганизъм, който се асоциира с особено висока смъртност при пациенти с ОХЗ и остава важна мишена за начална емпирична терапия (Kedzior S, 2021). В проучваните от нас изолати в периода 2010 - 2020г. се установиха относително ниски нива на резистентност към всички мониторирани антипсевдомонасни антибиотици (под 15%), при напълно съхранена активност на gentamicin и colistin.

В настоящото проучване прави впечатление много високата резистентност на изолатите *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex към почти всички антибактериални препарати, вкл. карбапенеми, което потвърждава резултатите изнесени от EARS-Net, особено за страни като България, Италия, Латвия, Литва, Кипър, Румъния, Гърция и

Хърватска (ECDC, 2022; ECDC, 2022a). Единствено colistin демонстрира напълно съхранена активност към този бактериален вид, като често е единственият препарат с активност срещу *A. baumannii*, което изключително затруднява избора на адекватна антимикробна терапия в пациенти с ОХЗ.

Относително съхранената чувствителност към meropenem в настоящото проучване на изолатите *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* и *P. aeruginosa* и високите нива на резистентност към цефалоспорици от трета генерация, показват, че карбапенемите продължават да са препарати на първи избор в случаите на резистентни към цефалоспорици от трета генерация бактерии, асоцииращи се с инфекции на кръвта в тази особено рискова група пациенти.

Staphylococcus aureus и инфекциите на кръвта, които този бактериален вид причинява, също са сериозен клиничен проблем при пациентите с ОХЗ. *S. aureus* се асоциира с по-голяма вирулентност, отколкото коагулаза - негативните стафилококи, ако демонстрира метицилинова резистентност (Secreto C, 2020). В настоящото проучване се установяват относително ниски нива на MRSA (11.4%), близки до съобщените от други автори (Haddad S, 2021; Mert D, 2019), макар много подобни проучвания да докладват по-висок дял на MRSA: 18% за Индия, 30.2% за Пакистан, 36% за Италия и 48.4% за Южна Корея (Irfan S, 2008; Kang C, 2012a; Prabhash K, 2010; Treccarichi E, 2015). В настоящото 11-годишно проучване не бяха идентифицирани vancomycin, teicoplanin и linezolid резистентни щамове, което прави гликопептидите и оксазолидиноните с най-висока активност спрямо *S. aureus*, вкл. MRSA.

Ентерококите са коменсали в гастроинтестиналния тракт, като най-честите причинители на инфекции на кръвта са *E. faecalis*, следван от *E. faecium*. Честата употреба на vancomycin като емпирична терапия при пациенти с ОХЗ, особено и в контекста на COVID-19, води до силен селективен натиск върху ентерококите, като част от нормалната чревна микрофлора, и респективно до сериозен риск от поява на резистентни изолати в тази анатомична област, тенденция, която установяваме в последните години и в нашия болничен център (непубликувани данни). Колонизацията на чревния тракт с vancomycin-резистентни ентерококи (VRE) в тази група пациенти е важен потенциален източник за инфекции на кръвта. И за двата най-чести ентерококови вида (*E. faecalis*, *E. faecium*) в литература се съобщават данни за увеличаваща се резистентност към vancomycin, увеличаваща се честота на тези инфекции, както и за по-висока смъртност от VRE - асоциирани инфекции на кръвта при пациенти с ОХЗ (Secreto C, 2020). Проучвания върху септични състояния при онкологични пациенти с неутропения установяват различни нива на резистентност към vancomycin в ентерококи: 1% в Швеция; 7.5% в Италия; 13% в Пакистан (Irfan S, 2008; Kjellander C, 2012; Treccarichi E, 2015). В настоящото проучване не бяха идентифицирани изолати ентерококи, резистентни на vancomycin, teicoplanin и linezolid. Негативен резултат, който беше установен е персистиращата в годините множествена резистентност при изолатите *E. faecium*: резистентността към аминопеницилини, флуорохинолони и аминогликозиди (HLAR) е 94.1%, 100% и 94.1% съответно. Високо ниво на хинолонова резистентност се доказва и при *E. faecalis* (82.6%), варираща между 66.6% и 88% в двата периода на проучването. Изразената MDR, особено в изолатите *E. faecium*, прави vancomycin, teicoplanin и linezolid препарати на избор за лечение.

5. Тридесет дневен леталитет при инфекции на кръвта, причинени от *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa* в болнично лекувани пациенти в периода 2016 - 2020г.

В периода 2016 - 2020г. бяха проучени 798 пациента с лабораторно потвърдени

инфекции на кръвта, причинени от видовете *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*. *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii – calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa*, които отговаряха на включващите критерии, посочени в „Материали и методи“. Тези пациенти съставляват 90.2% от всички пациенти с доказани епизоди на бактериемия, причинена от 7-те микробни вида в периода 2016 - 2020г. и 54.7% от всички пациенти с инфекции на кръвта, свързани с различни микробни агенти през същия период. Анализиранията група беше разделена на две подгрупи: първа подгрупа: преживели (n=590) в рамките на поне 30 дни и втора подгрупа: починали (n=208) в рамките на до 30 дни от момента на вземането на положителната хемокултура (табл. 30).

Таблица 30. Характеристика на пациентите с инфекции на кръвта, стратифицирани по показател „30-дневен леталитет“.

Променливи	Общо n=798 n (%)	Починали до 30 ден n=208 n (%)	Благоприятен изход n=590 n (%)	p
Мъже	442 (55.4)	119 (57.2)	323 (54.7)	0,538
Етническа принадлежност				
Български	663 (83.1)	173 (83.2)	490 (83.1)	0,684
турски	88 (11.0)	20 (9.6)	68 (11.5)	
ромски	33 (4.1)	10 (4.8)	10 (3.9)	
друг	-	-	-	
Възраст 65+	389 (48.7)	91 (43.8)	298 (50.5)	0,094
Средна възраст	59.5 (20.9)	62.0 (19.5)	58.6 (21.3)	0,045
Среден болничен престой	20.3 (25.81)	20.4 (34.72)	20.2 (21.82)	0,934
Вид на клиниката, в която е хоспитализран пациента				
Клиники с профил "Вътрешни болести"	273 (34.2)	55 (26.4)	218 (36.9)	0,001
Хематологични клиники	183 (22.9)	50 (24.0)	133 (22.5)	
Интензивни клиники	201 (25.2)	72 (34.6)	129 (21.9)	
Други	141 (17.7)	31 (14.9)	110 (18.6)	
Място на придобиване на инфекцията				
придобита в обществото	395 (49.5)	82 (39.4)	313 (53.1)	0,001
вътреболнична инфекции	403 (50.5)	126 (60.6)	277 (46.6)	
Вид провеждана терапия				
хирургично лечение	135 (17.0)	13 (6.3)	122 (20.7)	<0,001
лечение в интензивно отделение	148 (18.6)	85 (41.1)	63 (10.7)	
хирургично и ICU лечение	57 (7.2)	34 (16.4)	23 (3.9)	
нищо едно от посочените	456 (57.3)	75 (36.2)	381 (64.7)	
Предхождаща хоспитализация				
не	492 (61.7)	107 (51.4)	385 (65.3)	<0,001
да (в същата клиника)	112 (14.0)	24 (11.5)	88 (14.9)	
да (в същата болница, но в друга клиника)	132 (16.5)	48 (23.1)	84 (14.2)	
да (в друга болница)	62 (7.8)	29 (13.9)	33 (5.6)	

Най- висок относителен дял на инфекции на кръвта се доказва във възрастовата група 61-70г. (26.2%), следвана от 71-80г. (24.2%), 51-60г. (14.7%) и над 80г. (9.9%).

Всички 21 клиники, в които са хоспитализирани проучваните пациенти са разделени в четири групи според профила им: интензивни клиники (I група), клиники с профил „Вътрешни болести“ (II група), Хематологични клиники (III група) и други (IV група). С най-висок относителен дял на пациенти с инфекции на кръвта, причинени от 7-те бактериални вида, се представя Клиниката по хематология (21.4%), следвана от Клиника по нефрология (11.7%), Интензивно отделение към Клиника по кардиохирургия (10%) и Клиника по Вътрешни болести (9.6%) (таблица 31).

Таблица 31. Разпределение на пациентите с инфекции на кръвта според вида на клиниката и стратифицирани по показател „30-дневен леталитет“.

Вид на клиниката	Брой пациенти n (%)	Починали пациенти до 30-я ден n (%)
Група I		
Интензивни клиники	201 (25.2)	72 (34.6)
<i>Интензивно отделение към Клиника по кардиохирургия</i>	80 (10.0)	27 (13.0)
<i>Клиника по Анестезиология и Интензивно Лечение</i>	27 (3.4)	17 (8.2)
<i>Интензивно Нервно Отделение</i>	46 (5.8)	13 (6.3)
<i>Интензивно Детско Отделение</i>	36 (4.5)	10 (4.8)
<i>Интензивно Респираторно Отделение</i>	10 (1.3)	4 (1.9)
<i>Интензивно Кардиологично Отделение</i>	2 (0.3)	1 (0.5)
Група II		
Клиники с профил “Вътрешни болести”	273 (34.2)	55 (26.4)
<i>Нефрология</i>	93 (11.7)	14 (6.7)
<i>Гастроентерология</i>	26 (3.3)	14 (6.7)
<i>Вътрешни болести</i>	77 (9.6)	13 (6.3)
<i>Ендокринология</i>	29 (3.6)	1 (0.5)
<i>Кардиология</i>	23 (2.9)	10 (4.8)
<i>Ревматология</i>	20 (2.5)	3 (1.4)
<i>Пулмология</i>	5 (0.6)	0 (0.0)
Група III		
Хематологични клиники	183 (22.9)	50 (24.0)
<i>Клиника по клинична хематология</i>	171 (21.4)	50 (24.0)
<i>Клиника по Детска хематология</i>	12 (1.5)	0 (0.0)
Група IV		
Други клиники	132 (16.5)	31 (14.9)
<i>Хирургични клиники</i>	54 (6.8)	10 (4.8)
<i>Неврологични клиники</i>	42 (5.3)	18 (8.7)
<i>Инфекциозни клиники</i>	21 (2.6)	2 (1.0)
<i>Клиника по онкология</i>	15 (1.9)	1 (0.5)
<i>Педиатрични клиники</i>	6 (0.8)	0 (0.0)
<i>Психиатрични клиники</i>	3 (0.4)	0 (0.0)
Общо	798 (100)	208 (100)

Тридесет дневният леталитет сред всички 798 пациенти е 26% (208/798), като в групата на пациентите с инфекции, придобити в обществото, този показател е 20.8% (82/395), а при тези с вътреболнични инфекции - 31.3% (126/403) (p=0,001).

В групата на починалите пациенти (n=208), с най-висок относителен дял са представени пациентите от Клиниката по хематология (24%), следвани от тези в ICU към Клиника по кардиохирургия (13.0%), Неврологичните клиници (8.7%), КАИЛ (8.2%), Клиници по Нефрология (6.7%) и Гастроентерология (6.7%) (табл. 31).

Тридесет дневният леталитет, изчислен за вида на клиниката, в която е хоспитализиран пациента, е както следва: Интензивни клиници - 35.8%; Вътрешни клиници - 20.1%, Хематологични клиници - 27.3% и други клиници - 23.5% (таблица 32).

Най-висок дял починали пациенти от мъжки пол има във възрастта над 80г. (35.7%), докато при жените - във възрастовата група 20-39г. (30.4%).

Таблица 32. Тридесет дневен леталитет при инфекциите на кръвта, причинени от *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa* в периода 2016 - 2020г. според вида на клиниката, в която е хоспитализиран пациентът.

Вид на клиниката	Брой пациенти с инфекция на кръвта	Брой починали пациенти до 30-я ден	30- дневен леталитет % (95% CI)
Група I			
Интензивни клиници	201	72	35.8 (29,2 – 42,9)
<i>Интензивно отделение към Клиника по кардиохирургия</i>	80	27	33.8 (23,5 - 45,2)
<i>Клиника по Анестезиология и Интензивно Лечение</i>	27	17	63.0 (42,4 - 86,7)
<i>Интензивно Нервно Отделение</i>	46	13	28.3 (16 - 43,4)
<i>Интензивно Детско Отделение</i>	36	10	27.8 (14,2 - 45,2)
<i>Интензивно Респираторно Отделение</i>	10	4	40.0 (12,2 - 73,2)
<i>Интензивно Кардиологично Отделение</i>	2	1	50 (1,3 - 98,7)
Група II			
Клиници с профил "Вътрешни болести"	273	55	20.1 (15,6 – 25,4)
<i>Нефрология</i>	93	14	15.0 (8,5 - 24)
<i>Гастроентерология</i>	26	14	53.8 (33,4 - 73,4)
<i>Вътрешни болести</i>	77	13	16.9 (9,3 - 27,1)
<i>Ендокринология</i>	29	1	3.4 (0,1 - 17,8)
<i>Кардиология</i>	23	10	43.5 (23,1 - 65,5)
<i>Ревматология</i>	20	3	15.0 (3,21 - 37,9)
<i>Пулмология</i>	5	0	0.0 (0,00 - 52,2)
Група III			
Хематологични клиници	183	50	27.3 (21,01 – 34,4)
<i>Клиника по клинична хематология</i>	171	50	29.2 (22,5 - 36,7)
<i>Клиника по Детска хематология</i>	12	0	0.0 (0,00 - 26,5)
Група IV			

Други клиници	132	31	23.5 (16,6 – 31,7)
<i>Хирургични клиници</i>	54	10	18.5 (9,25 - 31,4)
<i>Неврологични клиници</i>	42	18	42.9 (27,7 - 59)
<i>Инфекциозни клиници</i>	21	2	9.5 (0,12 - 23,8)
<i>Клиника по онкология</i>	15	1	6.7 (0,17 - 32)
<i>Педиатрични клиници</i>	6	0	0.0 (0,00 – 45,9)
<i>Психиатрични клиници</i>	3	0	0.0 (0,00 - 70,8)
Общо	798	208	26.0

Таблица 33 показва леталитета до 30-я ден в групите пациенти, разделени според бактериалния вид, причинител на инфекцията на кръвта в периода 2016 - 2020г. С най-висок 30-дневен леталитет се съпътстват инфекциите, причинени от *A. baumannii* (56.3% [43-68]), като се установява статистически значима разлика при сравнение на този показател в случаите на инфекции, причинени от *A. baumannii* от една страна и тези, причинени от *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* ($p=0.026$).

Таблица 33. Тридесет-дневен леталитет в пациенти с инфекции на кръвта в периода 2016-2020г., групирани спрямо бактериалния вид, причинил инфекцията.

Бактериален вид	Общ брой пациенти с инфекция на кръвта	Брой починали до 30-я ден	30-дневен леталитет % (95% CI)
<i>S. aureus</i>	235	43	18.3 (14-24)
<i>E. coli</i>	210	49	23.3 (18-30)
<i>K. pneumoniae</i>	139	40	28.8 (21-37)
<i>E. cloacae</i>	83	18	21.7 (13-32)
<i>A. baumannii</i>	64	36	56.3 (43-68)
<i>P. aeruginosa</i>	53	19	35.8 (23-50)
<i>S. pneumoniae</i>	14	3	21.4 (5-51)

Сред всички проучвани пациенти с инфекции на кръвта ($n=798$), *S. aureus* е най-честият етиологичен агент (29.4%), следван от *E. coli* (26.3%) и *K. pneumoniae* (17.4%), а най-често изолираните антибиотично - резистентни микроорганизми са ampicillin-резистентните *E. coli* (126/798) и резистентните към 3-та генерация цефалоспоринони *K. pneumoniae* (91/798). *E. coli* (23.6%; 49/208), *S. aureus* (20.7%; 43/208) и *K. pneumoniae* (19.2%; 40/208) се асоциират с най-голям брой смъртни случаи.

При оценка на 30-дневния леталитет спрямо комбинацията „бактериален вид/антибиотик“, аминогликозид, хинолон и меропенем-резистентните *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex се асоциират с най-голям брой смъртни случаи (15.9-16.3%; 34/208; 33/208), следвани от ampicillin-резистентните *E. coli* (15.9%; 33/208) и резистентните на цефалоспоринони от трета генерация *K. pneumoniae* (14.9%; 31/208)

(таблица 34). Инфекциите на кръвта, причинена от *E. coli*, резистентни на 3-та генерация цефалоспорици се асоциират със статистически значим по-висок риск от летален изход ($p=0.006$), както и инфекциите, причинени от *P. aeruginosa*, резистентни на ceftazidime, piperacillin/tazobactam, meropenem и аминогликозиди ($p<0.05$)

Таблица 34. *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa* - асоциирани инфекции на кръвта при 798 хоспитализирани пациенти в периода 2016 - 2020г., стратифицирани по показател „30-дневен леталитет“ и антибиотична резистентност.

	Общ брой пациенти n (%)	Починали до 30-я ден n (%)	Благоприятен изход n (%)	p
Бактериален вид				<0.001
<i>Staphylococcus aureus</i>	235 (29.4)	43 (20.7)	192 (32.5)	0.77
MRSA	31 (13.2)	6 (2.9)	25 (4.2)	0.870
erythromycin резистентни	59 (25.1)	13 (6.3)	46 (7.8)	0.437
clindamycin резистентни	48 (20.4)	13 (6.3)	35 (5.9)	0.094
аминогликозиди резистентни	42 (17.9)	7 (3.4)	35 (5.9)	0.830
флуорхинолони резистентни	17 (7.2)	4 (1.9)	13 (2.2)	0.523
<i>E. coli</i>	210 (26.3)	49 (23.6)	161 (27.3)	0.983
ampicillin резистентни	126 (60.0)	33 (15.9)	93 (15.8)	0.248
трета генерация цефалоспорици резистентни	57 (27.1)	21 (10.1)	36 (6.1)	0.006
piperacillin/tazobactam резистентни	20 (9.5)	7 (3.4)	13 (2.2)	0.263
аминогликозиди резистентни	42 (20.0)	13 (6.3)	29 (4.9)	0.222
флуорхинолони резистентни	78 (37.1)	23 (11.1)	55 (9.3)	0.129
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	139 (17.4)	40 (19.2)	99 (16.8)	0.562
трета генерация цефалоспорици резистентни	91 (65.5)	31 (14.9)	60 (10.2)	0.076
piperacillin/tazobactam резистентни	78 (56.1)	24 (11.5)	54 (9.2)	0.577
meropenem резистентни	9 (6.5)	1 (0.5)	8 (1.4)	0.446
аминогликозиди резистентни	63 (45.3)	21 (10.1)	42 (7.1)	0.347
флуорхинолони резистентни	84 (60.4)	27 (13.0)	57 (9.7)	0.340
<i>Enterobacter cloacae</i> <i>complex</i>	83 (10.4)	18 (8.7)	65 (11.0)	0.983
трета генерация цефалоспорици резистентни	55 (66.3)	14 (6.7)	41 (6.9)	0.277
piperacillin/tazobactam резистентни	48 (57.8)	13 (6.3)	35 (5.9)	0.188
meropenem резистентни	1 (1.2)	1 (0.5)	0 (0.0)	0.217
аминогликозиди резистентни	47 (56.6)	12 (5.8)	35 (5.9)	0.424
флуорхинолони резистентни	47 (56.6)	13 (6.3)	34 (5.8)	0.181
<i>Acinetobacter baumannii</i> - <i>calcoaceticus</i> complex	64 (8.0)	36 (17.3)	28 (4.7)	0.026
meropenem резистентни	54 (84.4)	33 (15.9)	21 (3.6)	0.90

аминогликозиди резистентни	61 (95.3)	34 (16.3)	27 (4.6)	1
флуорхинолони резистентни	61 (95.3)	34 (16.3)	27 (4.6)	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53 (6.6)	19 (9.1)	34 (5.8)	0.313
ceftazidime резистентни	18 (34.0)	10 (4.8)	8 (1.4)	0.04
piperacillin/tazobactam резистентни	20 (37.7)	11 (5.3)	9 (1.5)	0.038
мегренем резистентни	18 (34.0)	10 (4.8)	8 (1.4)	0.04
аминогликозид резистентни	20 (37.7)	11 (5.3)	9 (1.5)	0.038
флуорхинолони резистентни	21 (39.6)	11 (5.3)	10 (1.7)	0.077
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14 (1.8)	3 (1.4)	11 (1.9)	0.670
penicillin резистентни	5 (35.7)	1 (0.5)	4 (0.7)	1.000
Общо	798 (100)	208 (100)	590 (100)	

Приложеният еднофакторен регресионен анализ установи, че съществува статистически значима връзка между вероятността за преживяване до 30-я ден и следните фактори: възраст, вид на клиниката, в която е хоспитализиран пациента, място на придобиване на инфекцията (болнична или в обществото), предшестваща хоспитализация, вид на провежданата терапия, бактериален вид и инфекциозен синдром. Всички демографски показатели без възраст (пол, етническа принадлежност, образование, социален статус) нямат връзка с риска за умиране до 30-я ден и не са значими рискови фактори за леталитет в проучваната група пациенти.

Конструиран беше модел, в който бяха включени всички 7 фактора самостоятелно оказващи значим ефект върху вероятността за умиране / преживяване, а именно: възраст, вид на клиниката, бактериален вид, инфекция придобита в болница или в обществото, предхождаща хоспитализация, вид на инфекциозния синдром, проведено хирургическо и/или лечение в интензивна клиника. От всички седем независими променливи, само възрастта е количествена променлива. Отчетени едновременно, тези променливи статистически значимо прогнозира вероятността за преживяване до и след 30 ден: хи квадрат тест = 296.026, $df=48$, $p<0.00001$. Съгласно критерия на Валд, една от тези независими променливи - „инфекция придобита в болница или в обществото“, беше отчетена като статистически незначима и поради това изключена от регресионния модел, като бе конструиран редуциран регресионен модел с шест независими променливи:

- възраст, $p=0.001$
- вид на клиниката, $p=0.007$
- бактериален вид, $p = 0.001$
- предхождаща хоспитализация, $p=0.029$
- клиничен (инфекциозен) синдром, $p = 0.001$
- проведено хирургично и/или интензивно лечение, $p<0.00001$

Анализът доказва редуцирания регресионен модел като статистически значим: моделът обяснява между 31.1% (Cox & Snell) и 45.5% (Nagelkerke) от дисперсията на зависимата променлива починал/жив и коректно класифицира 81.9% от наблюденията (106 от 208 починали и 546 от 590 живи са точно предвидени и класифицирани). Критерият на Валд показва, че и шестте независими променливи, влияят съществено на прогнозата за преживяемост до 30-ден. т.е те са фактори, самостоятелно оказващи значим ефект върху вероятността за умиране / преживяване (предсказващи фактори за смърт). Стойностите на регресионните коефициенти и отношенията на шансовете са

представени в таблица 35. С увеличаване на възрастта вероятността за благоприятен изход от болестта намалява ($p=0.001$).

Таблица 35. Многофакторен регресионен анализ прогнозиращ вероятността за 30-дневен леталитет при пациенти с инфекции на кръвта, причинени от *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa*, 2016 - 2020г.

Променлива	B	p value	Odds ratio Exp B	95% CI for EXP(B)
Възраст	-0,027	0,001	0,973	0,958 - 0,989
Клиника		0,005		
Нефрология	-0,975	0,366	0,377	0,045 - 3,131
Онкология	0,002	0,999	1,002	0,056 - 18,051
Вътрешна Клиника	-1,418	0,188	0,242	0,029 - 1,997
Пулмология	18,098	0,999	72401648	0
ИРО	-0,457	0,725	0,633	0,05 - 8,051
Кардиология	-2,354	0,043	0,095	0,0 - 0,9241
ИКО	-4,031	0,027	0,018	0,001 - 0,629
Ревматология	-1,299	0,345	0,273	0,018 - 4,053
Хематология	-1,878	0,079	0,153	0,019 - 1,239
Ендокринология	1,366	0,364	3,921	0,205 - 75,061
Гастроентерология	-2,811	0,012	0,06	0,007 - 0,545
Неврология	-1,242	0,26	0,289	0,033 - 2,503
ИНО	0,277	0,803	1,319	0,15 - 11,594
Педриатрия	16,679	0,999	17526341	0
ИДО	-1,924	0,119	0,146	0,013 - 1,644
Детска Онкохематология	16,848	0,999	20739139	0
Хирургия	-1,202	0,311	0,301	0,029 - 3,079
КАИЛ	-1,383	0,233	0,251	0,026 - 2,433
ИКХ	-2,077	0,102	0,125	0,01 - 1,511
Психиатрия	18,331	0,999	91448497	0
Бактериален вид		0		
<i>K. pneumoniae</i>	-1,052	0,196	0,349	0,071 - 1,719
<i>A. baumannii-calcoaceticus</i> complex	-2,39	0,005	0,092	0,017 - 0,495
<i>E. coli</i>	-1,332	0,099	0,264	0,054 - 1,283
<i>E. cloacae</i> complex	-0,77	0,366	0,463	0,087 - 2,459
<i>P. aeruginosa</i>	-1,675	0,052	0,187	0,035 - 1,013
<i>S. aureus</i>	-0,531	0,511	0,588	0,121 - 2,862
Предхождаща хоспитализация		0,03		
Няма	0,916	0,01	2,5	1,239 - 5,043
Предхождаща	0,808	0,09	2,244	0,881 - 5,716

хоспитализация в същата клиника				
Предхождаща хоспитализация в същата болница, но в друга клиника	0,353	0,405	1,423	0,62 - 3,265
Клиничен синдром		0,001		
респираторен	-0,938	0,353	0,391	0,054 - 2,829
гастроинтестинален	-1,792	0,056	0,167	0,027 - 1,045
урологичен	-0,33	0,723	0,719	0,116 - 4,465
ЦНС	-1,583	0,095	0,205	0,032 - 1,316
токси-инфекциозен	-1,772	0,047	0,17	0,029 - 0,98
кожен	0,207	0,869	1,23	0,105 - 14, 41
кардиологичен	-0,69	0,494	0,501	0,07 - 3,617
Провеждано лечение в ICU и/или хирургическо лечение		0		
Няма провеждано лечение в ICU и/или хирургическо лечение	2,399	0	11,009	3,983 - 30, 433
Хирургическо лечение	2,746	0	15,578	5,892 - 41, 185
Лечение в ICU	-0,19	0,705	0,827	0,31 - 2,208
Constant	3,936	0,019	51,218	

Съкращения: ИДО, Интензивно Детско Отделение; ИКО, Интензивно Кардиологично Отделение; ИКХ, Интензивно отделение към Кардио-хирургична клиника; ИНО, Интензивно Нервно Отделение; ИРО, Интензивно Респираторно Отделение; КАИЛ, Клиника по анестезиология и интензивно лечение; ICU, интензивна клиника.

В следващ етап е проведен еднофакторен регресионен анализ с цел определяне на факторите обуславящи вероятността за умирање до 30-ден за всяка от 7-те групи пациенти, групирани според бактериалния вид, причиняващ инфекция на кръвта. Идентифицирани са следните променливи като статистически значими, самостоятелни предиктивни фактори за леталитет както следва: инфекции, причинени от *E. coli* - „предхождаща хоспитализация“, „хирургично и ICU лечение“, „резистентност към цефалоспорини от трета генерация“; инфекции, причинени от *S. aureus* - „възраст“ и „ICU/хирургическо лечение“; инфекции, причинени от *K. pneumoniae*: „хирургично/ICU лечение“; инфекции, причинени от *P. aeruginosa*: „хирургично лечение“ и „резистентност към gentamicin, ceftazidime, ciprofloxacin и meropenem“; инфекции, причинени от *A. baumannii - calcoaceticus complex*: „хирургично лечение“

За случаите на инфекции причинени от *S. pneumoniae* и *E. cloacae*, не се установиха самостоятелно значими предиктори на риска за умирање до 30-я ден.

В конструиран модел, включващ едновременно и трите променливи, самостоятелно свързани с риска за умирање в случаите на *E. coli* инфекции, тези фактори остават значимо свързани с риска за умирање ($p < 0.0001$). Аналогично и за *S. aureus* инфекциите - в модел включващ едновременно променливите „възраст“ и „ICU/хирургическо лечение“, тези фактори остават значимо свързани с риска за умирање ($p < 0.0001$). В случаите на *P. aeruginosa* обаче, от поставените в общ модел показатели „хирургическо лечение“ и „резистентност към gentamicin, ceftazidime, ciprofloxacin и meropenem“, статистически значим рисков фактор остава само вида на лечението (таблица 36).

Таблица 36. Рискови фактори за 30-дневен леталитет при пациентите, групирани според бактериалния вид, причиняващ инфекцията на кръвта.

Променлива	B	p value	Odd Ratio Exp(B)	95% CI for EXP(B)	
				Lower	Upper
<i>K. pneumoniae</i>					
без хирургично/интензивно лечение	1.546	.002	4.692	1.727	12.747
хирургично лечение	21.203	.998	1615474842.851	.000	.
интензивно лечение	-.405	.483	.667	.215	2.067
Constant	.000	1.000	1.000		
<i>E. coli</i>					
предхождаща хоспитализация		.036			
липса на предхождаща хоспитализация	1.282	.127	3.604	.695	18.688
провеждане на ICU / хирургично лечение		.000			
без хирургично/ICU лечение	2.632	.026	13.897	1.366	141.422
резистентност към цефалоспоринови трета генерация	-1.088	.023	.337	.132	.862
Constant	-1.658	.243	.191		
<i>S. aureus</i>					
без хирургично/ICU лечение	2.666	.000	14.386	3.309	62.539
хирургично лечение	21.873	.997	3158788063.095	.000	.
интензивно лечение	.447	.565	1.564	.341	7.175
Възраст	-.038	.000	.962	.943	.982
Constant	1.727	.059	5.624		
<i>P. aeruginosa</i>					
без хирургично/интензивно лечение	2.238	.087	9.377	.720	122.035
хирургично лечение	3.616	.019	37.180	1.827	756.508
интензивно лечение	.786	.585	2.194	.131	36.700
резистентност към аминогликозиди	-21.523	1.000	.000	.000	.
резистентност към ceftazidime	-1.773	.246	.170	.008	3.406
резистентност към флуорохинолони	22.338	1.000	5028474008.979	.000	.
резистентност към piperacillin/tazobactam	-.798	.567	.450	.029	6.900
Constant	-.803	.500	.448		
<i>A. baumannii - calcoaceticus complex</i>					
без хирургично/интензивно лечение	1.030	.325	2.800	.361	21.727
хирургично лечение	1.946	.033	7.000	1.173	41.759
интензивно лечение	.272	.771	1.312	.210	8.184
Constant	-1.253	.118	.286		

Съкращения: ICU, интензивна клиника.

Настоящото проучване доказва висок 30-дневен леталитет (26%) в неселектирана популация от хоспитализирани пациенти с инфекции на кръвта, причинени от *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* complex, *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa*. При сравняването на получените резултати с тези в научната литература, се установяват силно вариабилни данни, вероятно повлияни от дизайна на проучването, мястото на придобиване на инфекцията, различното разпределение на патогените в етиологичния спектър, разлики в превалирането на антибиотичната резистентност, както и разлики в предоставянето на здравни грижи в съответната държава, като смъртността варира между 10% и 19% за инфекциите на кръвта, придобити в обществото, между 17% и 28% за нозокомиалните и достигат до 35-60% в интензивните клиники (Alonso-Menchén D, 2022; Bassetti M, 2016; Pérez-Crespo P, 2021; Pérez-Crespo P, 2021a; Verway M, 2022). Настоящото проучване също установява по-висок 30-дневен леталитет в случаите на нозокомиални инфекции (31.3%) спрямо този при инфекции, придобити в обществото (20.75%) ($p=0.001$), като относителният дял на починалите пациенти с нозокомиални инфекции достига 60.6% в цялата група починали, а 30-дневния леталитет в интензивните клиники средно е 35.8%, достигайки 63% в КАИЛ. От клиниките с профил „не-интензивни“, най-висок 30-дневен леталитет се доказва в Хематологичните клиники (27.3%). Резултатите от проучвания върху смъртността при пациенти с онкохематологични заболявания с инфекции на кръвта, са много вариращи, като се движат между 12 и 42%, като често този показател е по-висок в случаите на Грам отрицателни инфекции в сравнение с Грам положителните (Garcia-Vidal C, 2018; Nørgaard M, 2006; Treacarichi E, 2014, Treacarichi E, 2015; Tumbarello M, 2009; Wisplinghoff H, 2003).

По отношение на проучваните бактериални видове, 30-дневния леталитет се свързва с най-голям брой инфекции, причинени от *E. coli*, следвани от *S. aureus* и *K. pneumoniae*. Подобно, популационно проучване в Канада върху смъртността, свързана с инфекции на кръвта установява, че от групата на ESKAPEЕс патогените, *S. aureus*, *E. coli* и *K. pneumoniae* се асоциират с най-голям брой смъртни случаи на 30-я ден (Verway M, 2022). Получените резултати са много близки до докладваните данни през 2022г. от голямо проучване върху смъртността на глобално, регионално и национално ниво, свързана с 33 патогена (вкл. ESKAPEЕс) и 11 инфекциозно синдрома (вкл. инфекции на кръвта) (Ikuta K, 2022). Проучването установява, че независимо от географския регион, *S. aureus* е водеща причина за фатални инфекции на кръвта (смъртност 3.9/100 000), като се асоциира с 23% от умираанията от инфекции на кръвта в HICs-супер региона през 2019г. Освен *S. aureus*, още 4 бактериални вида глобално се асоциират с най-високи нива на смъртност като причинители на инфекции кръвта - *K. pneumoniae* (3.42/100 000), *A. baumannii* (3.20/100 000), *E. coli* (3.13/100 000) и *P. aeruginosa* (2.10/100 000). В съответствие с резултатите от настоящото проучване, данните за България сочат, че най-високите нива на смъртността при инфекции на кръвта са свързани с *E. coli* (20.37 / 100 000), *S. aureus* (9.15 / 100 000) и *K. pneumoniae* (7.63/100 000) и те са сред най-високите глобално (<https://vizhub.healthdata.org/microbe/>). Трябва да отбележим и установения висок дял на починали, свързани с *K. pneumoniae* (19.2%) в настоящата работа, което е в съответствие с други проучвания, демонстриращи този патоген като най-бързо растящата заплаха в Европа по отношение на заболяемост и смъртност, бактериален вид, предимно свързан с вътре- и междуболнична трансмисия (David S, 2019).

При оценяване на показателя „30-дневен леталитет“ спрямо комбинацията микроорганизъм/антибиотик, се установява, че с най-висок дял в групата на починалите са тези с инфекции на кръвта, причинени от аминогликозид, хинолон и мегорепем-резистентни *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex (15.9 - 16.3%), следвани от

ampicillin-резистентни *E. coli* (15.9%) и *K. pneumoniae*, резистентни на цефалоспорици от трета генерация (14.9%). Противно на тези резултати, по-горе цитираното проучване докладва, че с най-висока смъртност в световен мащаб се асоциират MRSA (1.56/100 000) и резистентните на цефалоспорици от трета генерация *E. coli* (0.77/100 000) и на следващи позиции - CR *A. baumannii* (0.75/100 000) и CR *K. pneumoniae* (0.72/100 000) (Ikuta K, 2022). Смъртността в България при инфекции на кръвта, причинени от резистентни на цефалоспорици трета генерация *E. coli* (2.37 / 100 000), резистентни на цефалоспорици трета генерация *K. pneumoniae* (1.66 / 100 000), CR *K. pneumoniae* (1.13 / 100 000) и CR *A. baumannii* (0.71 / 100 000) е сред най-високите (<https://vizhub.healthdata.org/microbe/>). Проучване на ECDC в периода 2016 - 2020г., установява, че *E. coli* продължава да е най-често съобщавания патоген в EARS-Net и съответно асоцииран с най-високия болестен товар за този период, като най-голям принос за това имат инфекциите, причинени от *E. coli*, резистентни на цефалоспорици от трета генерация, следвани от MRSA и *K. pneumoniae*, резистентни на цефалоспорици от трета генерация, като заедно генерират 58.2% от общия DALYs., макар в този период в много страни CR *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* да са сред антибиотично резистентните бактерии със сравнително висок DALYs, особено през 2020г. (ECDC, 2022c). Настоящото проучване доказва нисък дял на MRSA (2.9%) и CR *K. pneumoniae* инфекции на кръвта (0.5%) в групата на починалите пациенти изобщо, както и нисък дял на починалите с MRSA и CR *K. pneumoniae* съответно в групите пациенти със *S. aureus* (6 от 235) и *K. pneumoniae*, асоциирани инфекции (1 от 139). Особено висока смъртност, свързана с MRSA инфекции на кръвта се доказва в НИС (2.52/100 000), САЩ (2.66/100 000), Гърция (3.58/100 000) и Италия (2.18/100 000), като за Гърция се установява и висока смъртност при инфекции на кръвта, свързана с CR *K. pneumoniae* (1.56/100 000) (Ikuta K, 2022; <https://vizhub.healthdata.org/microbe/>).

В хода на това проучване бяха оценени демографски, клинични и микробиологични показатели с цел установяване на предикторите за летален изход. Приложеният многофакторен регресионен анализ установи, че шест променливи - възраст, вид на клиниката, предшестваща хоспитализация, вид на провежданата терапия (ICU и/или хирургично лечение), бактериален вид и инфекциозен синдром са независими предсказващи фактори за смърт. Различни проучвания съобщават множество клинични фактори (подлежащи заболявания, предшестваща антибиотична терапия, тежест на бактериемията) и фактори, отнасящи се до пациента (възраст, пол, предшестваща хоспитализация) като показатели, независимо свързани с фатален изход в случаите на инфекции на кръвта, макар по-често това да са проучвания с фокус върху специфични субпопулации от пациенти, а не върху общата популация (Babich T, 2020; Diallo K, 2018; Rac H, 2020). Подобно на установеното от нас, Jin et al. доказват възрастта, престоя в ICU и клиничните симптоми (също и онкологично заболяване и продължителност на болничния престой) като независими предиктори за смърт в общата популация (Jin L, 2021).

Настоящото проучване доказва, че с най-висок 30-дневен леталитет се съпътстват инфекциите, причинени от *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex (53.6%) и *P. aeruginosa* (35.8%), а тези, причинени от *E. coli*, резистентни на 3-та генерация цефалоспорици и *P. aeruginosa*, резистентни на ceftazidime, piperacillin/tazobactam, meropenem и аминогликозиди се асоциират със статистически значим по-висок риск от летален изход. Тези резултати са в унисон със съобщеното и от други автори в едноцентрови и многоцентрови болнични проучвания (Hattori H, 2021; Jin L, 2021). Wisplinghoff et al. рапортуват смъртност от 40% в случаите на нозокомиални инфекции на кръвта, причинени от *A. baumannii* (Wisplinghoff H, 2012), а Wong et al. - около 60% при

инфекции на кръвта и вътреболнични пневмонии, причинени на CR *A. baumannii* (Wong D, 2017). Сред ESKAPEЕс патогените, в мащабно популационно проучване M. Verway рапортува най-висока 30-дневна смъртност за инфекции на кръвта, причинени от *Pseudomonas* spp. (24.7%), *S. aureus* (22.8%) и *Klebsiella* spp. (17.6%) и значително по-ниска от установената от нас - за *Acinetobacter* spp. (15.5%) (Verway M, 2022). По-нисък 30-дневен леталитет (30%) при *Acinetobacter* - инфекции на кръвта се доказва и в проучване на R. Patel (Patel R, 2019). В настоящото проучване *K. pneumoniae* е бактериалният вид, при който след *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, се отчита най-висок 30-дневен леталитет (28.8%). Близки до тези стойности се съобщават от T. Xiao (25.6%), но този автор доказва много по-висок 28-дневен леталитет в случаите на инфекции на кръвта, причинени от CR *K. pneumoniae* (55.8%) в сравнение с тези, асоциирани с карбапенем-чувствителни изолати (13.9%) (Xiao T, 2020). Китайско проучване върху *K. pneumoniae* асоциираните инфекции на кръвта, докладва нарастваща в годините смъртност, асоциирана с тези инфекции - от 14% през 2014г. до 44% през 2019г., също и по отношение на CR *K. pneumoniae* инфекции на кръвта - от 38% през 2014г. до 74% през 2019г. (Li Y, 2020). В настоящото проучване е доказан само един случай, причинен от CR *K. pneumoniae* изолат, завършил с летален изход до 30-я ден, но в цялата група на починалите пациенти, след ампицилин-резистентните *E. coli* и CR *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex, резистентните към цефалоспорици от трета генерация *K. pneumoniae* (14.9%) са най-често доказвани. За разлика от *E. coli* обаче, в *K. pneumoniae*, резистентността към нито една от антибиотичните групи не се асоциира с по-висок риск от летален изход. В литературата също има подобни проучвания рапортуващи, че резистентността в *K. pneumoniae* (специално към карбапенеми) не е идентифицирана като рисков фактор за смъртен изход при инфекции, асоциирани с този бактериален вид, като някои автори съобщават за повишена смъртност в резултат на хипервирулентни щамове *K. pneumoniae*, които иначе са чувствителни на всички антибиотици с изключение на ампицилин (Li Y, 2020; Wang X, 2018). Подобно, проучване на X. Peng върху рисковите фактори и изхода на инфекции на кръвта, причинени от ESKAPEЕс патогени при хоспитализирани деца, установява 14.4% смъртност, без да се доказва статистически значима разлика в смъртността между MDR ESKAPEЕс и non-MDR ESKAPEЕс инфекциите, което дава основание на авторите да заключат, че в тази проучвана група MDR ESKAPEЕс не са били рисков фактор за неблагоприятен изход. Като такива фактори са били идентифицирани хирургично лечение, престой в ICU, провеждана механична вентилация и тромбоцитопения (Peng X, 2021), някои, от които потвърдени и в настоящото проучване.

При оценка на 30-дневния леталитет, отнесен към конкретен етиологичния агент, многофакторният регресионен анализ идентифицира в случаите на *E. coli* инфекции, променливите „предхождаща хоспитализация“, провеждано „хирургично / ICU лечение“ и „резистентност към цефалоспорици от трета генерация“ като самостоятелни предиктивни фактори за умирање; за *S. aureus* инфекциите - такива променливи са „възраст“ и „ICU/хирургическото лечение“, а в случаите на *P. aeruginosa* и *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex - самостоятелни предиктивни фактори са само провеждане на хирургическо лечение. Изобщо, статистическият анализ показва, че отсъствието на хирургическо и/или ICU лечение и липсата на предшествваща хоспитализация се асоциират с по-висок шанс за благоприятен изход във всички случаи, независимо от бактериалния вид, т.е. сигнификантно намаляват риска за умирање. Подобно на установеното от нас за *E. coli*, по-ранно проучване, проведено в 10 Европейски болници, демонстрира, че при пациенти с инфекции на кръвта, причинени от представители на *Enterobacterales*, резистентността към цефалоспорици

от трета генерация сигнификантно увеличава шанса за смъртен изход (*Stewardson A, 2016*).

Анализът в настоящото проучване не доказва статистически значима връзка между метицилиновата резистентност в *S. aureus* и смъртността в случаите на MRSA инфекция на кръвта, което е в съответствие с докладваното и от други автори, макар да има и проучвания, които рапортуват метицилиновата резистентност при *S. aureus* инфекциите, като рисков фактор за смъртен изход (*Stewardson A, 2016*).

В настоящото проучване 60.3% от инфекциите на кръвта са доказани в пациенти над 60г., като най-високият относителен дял е във възрастовата група 61-70 години. Подобно на тези данни, други автори също установяват над 50% от инфекциите на кръвта в пациенти над 65г. и по-възрастни, което се свързва със съществуващи сериозни подлежащи заболявания и намален потенциал на механизмите на естествената резистентност и имунитета (*Leibovici L, 1993; Skogberg K, 2012; Uslan D, 2007*). В настоящото проучване над 50% от смъртните случаи са във възрастта над 60г., а средната възраст сред починалите до 30-я ден е по-висока от тази на преживелите. Еднофакторният и многофакторен регресионен анализ доказват наличието на статистически значима връзка между вероятността за преживяване до 30-я ден и променливата „възраст“, определяйки я като независим предиктивен фактор за смъртен изход, което се доказва и от други автори (*Kontula K, 2021*). В повечето проучвания смъртността, свързана с инфекции на кръвта във възрастната популация от населението (над 65г.) е по-висока в сравнение с групата на по-младите пациенти, като това се отнася както за 30-дневната (между 16-50%), така и за 90-дневната (20-85%), така и 1 година след инфекцията (30-31%) (*Laupland K, 2021; Yahav D, 2016*). Скорошно популационно проучване на Cassini доказва, че болестният товар, свързан с инфекции на кръвта, е най-голям при деца под 1 година, както и при хора над 65 годишна възраст, като се отбелязва тренд за увеличаване в периода 2007 - 2015г. както на честотата (от 239 238 до 602 609), така и на смъртността, свързана с тези инфекции (от 11 144 до 27 249) (*Cassini A, 2019*). Този тренд продължава и в периода 2016-2020г., като във възрастовата група над 65 години, инфекциите, причинени от *E. coli*, резистентни на цефалоспорини от трета генерация, се асоциират с най-високия болестен товар (*ECDC, 2022c*). В настоящото проучване 30-дневния леталитет нараства с възрастта, като това важи за мъжкия пол, докато за женския пол най-висок е леталитетът във възрастта 20-39г. Във възрастта след 60г. случаите с летален изход са по-чести сред мъжкия пол, но разликата е статистически незначима.

IV. ИЗВОДИ

На базата на получените резултати от комплексните микробиологични и епидемиологични проучвания върху антибиотичната резистентност на най-честите причинители на бактериемии, асоциирани с инфекции на кръвта в УМБАЛ“Света Марина“ за 10-годишен период и леталитета, свързан с тях и след извършения анализ, могат да се направят следните по-важни изводи:

1. Делът на положителните хемокултури през проучвания десет годишен период е 16%, като този на истински положителните (клинично значими) хемокултури е 9.9%.
2. В периода 2011-2020г. етиологичният спектър на лабораторно потвърдените бактериални инфекции на кръвта в неселектираната популация от пациенти се доминира от Грам отрицателните бактерии (58.9%), но се доказва статистически значим тренд за увеличаване в годините на дела на Грам положителните бактерии и намаляване този на Грам отрицателните бактерии и гъбичките. Най-често изолирания бактериален вид от хемокултури за целия период е *S. aureus* (17.2%), следван от *E. coli* (14.6%), *K. pneumoniae* (12.0%), *E. cloacae* complex (8.0%), *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex (6.3%) и *E. faecalis* (6.3%). Делът на ESKAPEEs патогените в етиологичния спектър е много висок, като достига 66.8%, а този на мониторираните от EARS Net бактериални видове - 64.7%. В хода на 10-годишното проследяване се доказва статистически значим тренд за увеличаване относителния дял на *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus viridans* изолатите и намаляване дела на *Klebsiella pneumoniae*.
3. Проучването, обхващащо една декада, демонстрира възникването, дисеминацията и персистирането във времето на проблемни за лечение MDR Грам отрицателни бактерии, асоцииращи се с инфекции на кръвта и в много по-малка степен на Грам положителни микроорганизми, потвърждавайки Европейските и световните тенденции от последните години.
4. Относителният дял на резистентните към цефалоспорино трета генерация и флуорохинолони *E. coli* от кръв е висок (над 25%), но без сигнификантен тренд за увеличаване или намаляване в годините. Активността на аминопеницилините спрямо *E. coli* е силно редицирана, като резистентността към тази антибиотична група е най-висока (63.2%). Карбапенемите и амикасин са със съхранена активност спрямо *E. coli* (резистентност <1% и <5% съответно), което ги прави подходящ избор за емпирична терапия в случаите на инфекции на кръвта, асоциирани с този бактериален вид.
5. Доказва се много високо ниво на резистентност към цефалоспорино от трета генерация сред изолатите *Klebsiella pneumoniae* (74.9%), значително надвишавайки дела на резистентните към същата антибиотична група *E. coli* и по-високо от това сред *Enterobacter* spp. Цефалоспорините от трета генерация са групата с най-силно редуцирана активност спрямо *K. pneumoniae*. Много високи нива на резистентност (над 50%) се отчитат също към флуорохинолони и gentamicin, макар за последния да се установява статистически значим тренд за намаляване на резистентността от 73% през 2011г. до 40.9% през 2020г. Карбапенемите и амикасин са антимикуробните препарати с най-висока активност спрямо *K. pneumoniae* (11.8% и 13.9% резистентност съответно). За 10-годишния период на проучването най-динамични и драматични промени се доказват по отношение резистентността към карбапенемни антибиотици, която от 0% през 2011г. достига 32.7% през 2014г. и 18.2% и 13.6% през 2019г. и 2020г. В групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, colistin и амикасин демонстрират най-добра *in vitro* активност (6% и 17.9% резистентност), което ги прави препарати на избор за лечение в случай на инфекция, причинена от карбапенем-резистентни изолати.
6. *bla*STX-M-15 се идентифицира като главен механизъм на резистентност към

цефалоспорини от трета генерация в карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* от кръв, а *bla_{KPC-2}* и в много по-малка степен *bla_{NDM-1}* медираат ензимния механизъм на карбапенемна резистентност в тези изолати. Карбапенем-резистентните *K. pneumoniae* се асоциират с 5 различни ST типа: ST15, ST76, ST151 и ST1350 за KPC-2 продуцентите и ST11 - за NDM-1 продуциращите изолати. Доказва се широка вътреболнична дисеминация на KPC-2 и/или CTX-M-15 продуциращи ST15 *K. pneumoniae*. Този клон персистира няколко години, демонстрирайки висок крос-трансмисивен, епидемичен и инвазивен потенциал. В допълнение към ST15, резистентността към цефалоспорини от трета генерация и карбапенем се асоциира с вътреболнична дисеминация и на други ST типове, съществуващи едновременно с доминиращия ST15. В този смисъл, въпреки, че клоналното разпространение на ST15 допринася значително за дисеминирането на карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, не-ST15 щамове също се появяват и имат принос.

7. Доказва се много висок относителен дял на изолатите *Enterobacter* spp. от кръв, резистентни към цефалоспорини от трета генерация (над 65%), както и високи нива на резистентност към флуорохинолони и gentamicin (над 45%). Делът на amikacin- и карбапенем-резистентните *Enterobacter* spp. остава много нисък, което прави тези антимикробни средства подходящ избор за лечение на инвазивни инфекции, причинени от *Enterobacter* spp. NDM-1 метало-карбапенемаза е механизъмът, медиращ резистентността към карбапенем в единствения карбапенем-резистентен изolat *Enterobacter* spp. (*E. asburiae*) за този период.

8. В групата на кръвните изолати *Pseudomonas aeruginosa*, се доказва резистентност над 20% към всички антипсевдомонадни групи препарати, като най-силно е редуцирана активността на флуорохинолоните (40%). Не се установяват статистически значими тенденции към понижаване или повишаване на резистентността в различните години за нито една от изследваните групи антимикробни препарати. Карбапенемите и amikacin са най-активните агенти сред проучваните антипсевдомонадни средства, макар резистентността да е в диапазона 20-30%, което предполага внимателно приложение на тези антибиотици в случаите, в които се подозира *P. aeruginosa* асоциирана инфекция.

9. В целия 10-годишен период на проучването, кръвните изолати *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex трайно демонстрират много високи нива на резистентност спрямо всички изпитвани антимикробни средства (над 60%), с изключение на colistin. В сравнение с всички други Грам отрицателни бактериални видове, делът на карбапенем-резистентните *A. baumannii* - *calcoaceticus* complex е най-висок (68.4%), като 60% от изолатите са с фенотип на XDR. Резистентността към карбапенем се асоциира с присъствието на *bla_{OXA-24/40-like}* и/или *bla_{OXA-23-like}* гени в асоциация с IS*Aba1*. Високият относителен дял на карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* се свързва с вътреболнична дисеминация и трайно присъствие на няколко OXA-продуциращи MDR клона *A. baumannii* с характеристика на ендемични, сред които и IC2.

10. В периода 2011- 2020г. е установено относително ниско ниво на MRSA инвазивни изолати, като през 2020г. делът им е по-нисък от средния за Европа и много близък до средния за България. С изключение на макролидите, всички останали антибиотични групи запазват добра активност, с дял на не-чувствителните изолати под 20%.

11. Установява се сигнификантен тренд за увеличаване дела на vancomycin-резистентните *Enterococcus faecium* от кръв - от 0% в периода 2011 - 2018г. до 11.1% през 2019г. и 18.2% през 2020г. Изолатите *E. faecium* демонстрират много високо ниво на резистентност към аминопеницилини (95.3%), флуорохинолони (84.7%) и HLAR (90.3%). За разлика от *E. faecium*, делът на ampicillin - резистентните *E. faecalis* остава нисък (9.4%), което прави групата на аминопеницилините подходящ избор за терапия

на *E. faecalis* асоциираните инфекции. Активността на флуорохинолоните за същия период сред *E. faecalis* е значително редуцирана (над 35%), при висок дял на HLAR (над 45%). Въпреки сигнификантния тренд за увеличаване на резистентността към vancomycin, гликопептидите и linezolid все още са антибиотиците с най-добра активност спрямо изолати *Enterococcus* spp.

12. В периода 2011-2020г. в етиологичния спектър на бактериемите, асоциирани с инфекции на кръвта в пациенти с онкохематологични заболявания преобладават Грам отрицателните над Грам положителните бактерии (54.3% срещу 38.0%), като най-честите бактериални патогени са *S. aureus* (17.3%), *E. coli* (16.0%), *Enterobacter* spp. (10.9%), *Klebsiella* spp. (10.3%) и *Enterococcus* spp. (8.8%). Доказва се статистически значим тренд за намаляване относителния дял на *S. aureus* и увеличаване този на коагулаза-негативните стафилококи в етиологичния спектър на инфекциите на кръвта в тази група пациенти.

13. Проучването, извършено в групата на пациентите с онкохематологични заболявания, демонстрира възникването и персистирането в годините на проблемни за лечение MDR микроорганизми, предимно Грам отрицателни бактерии, асоцииращи се с инфекции на кръвта в тази популация от пациенти, феномен, който е отражение на увеличаващата се антибиотична резистентност в обществото и следва тренда в неселектираната популация болнични пациенти с инфекции на кръвта. Установява се персистираща във времето тенденция за високо ниво на резистентност към трета генерация цефалоспорини сред представителите на семейство *Enterobacteriaceae* (49.4%) и появата след 2014г. на инвазивни карбапенем-резистентни изолати от същото семейство, като най-засегнатият вид по отношение и на двата типа резистентност е *K. pneumoniae* (57.8% и 6.7% съответно). Доказва се статистически значим тренд за увеличаване резистентността към трета генерация цефалоспорини, аминогликозиди и флуорохинолони в групата на изолатите от вида *Enterobacter cloacae* complex; персистиране на висок относителен дял на карбапенем-резистентни *A. baumannii - calcoaceticus* complex на фона на статистически значим тренд за увеличаване на тази резистентност, както и увеличаване дела на MDR *Enterococcus faecium*. Подобно на общата популация пациенти, положителен резултат е установеният нисък относителен дял на MRSA кръвни изолати. В периода на проучването не са идентифицирани изолати *Staphylococcus* spp. и *Enterococcus* spp., резистентни на гликопептидни антибиотици и оксазолидинони, което прави тези антибиотици препарати на избор за начално лечение в случаите на съмнение за стафилококова или ентерококова инфекция на кръвта или фебрилна неутропения до поставяне на етиологичната диагноза.

14. Установен е висок 30-дневен леталитет (26%) в групата на проучваните 798 пациенти с инфекции на кръвта, причинени от *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *A. baumannii - calcoaceticus* complex и *P. aeruginosa*, като този показател е по-висок в случаите на вътреболнични инфекции, в сравнение с тези, придобити в обществото (31.3% срещу 20.8%). С изключение на възрастта, всички останали демографските показатели не се доказват като значими рискови фактори за леталитет в проучваната група пациенти. Най-висок 30-дневен леталитет се доказва в интензивните структури на болницата (35.8%), следвани от Хематологичните клиники (27.3%).

15. *E. coli* (23.6%), *S. aureus* (20.7%) и *K. pneumoniae* (19.2%) се асоциират с най-голям брой смъртни случаи. При сравнение между бактериалните видове, най-висок 30-дневен леталитет се доказва при инфекциите, причинени от *A. baumannii - calcoaceticus* complex (53.6%). При оценка на 30-дневния леталитет спрямо комбинацията „бактериален вид/антибиотик“, аминогликозид, хинолон и меропенем-резистентните *A. baumannii - calcoaceticus* complex (15.9-16.3%) се асоциират с най-голям брой смъртни

случаи, следвани от ampicillin-резистентните *E. coli* (15.9%) и резистентните на цефалоспоринови трета генерация *K. pneumoniae* (14.9%).

16. Показателите „възраст“, „вид на клиника“, „предшестваща хоспитализация“, „вид на провеждана терапия (ICU и/или хирургическо лечение)“, „бактериален вид“ и „инфекциозен синдром“ са идентифицирани като независими фактори, които влияят съществено на прогнозата за преживяемост до 30-ден (предсказващи фактори за смърт). Групирано според бактериалния вид, в случаите на *E. coli* инфекции, факторите „резистентност към цефалоспоринови от трета генерация“, „предхождаща хоспитализация“, „хирургично/ICU лечение“ са значимо свързани с риска за умирање, а при *S. aureus* инфекциите - такива са „възраст“ и „хирургическо/ICU лечение“. За *P. aeruginosa* и *A. baumannii - calcoaceticus complex* инфекциите, статистически значим предиктивен фактор за смърт е променливата „хирургическо лечение“, а в случаите на инфекции на кръвта, причинени от *K. pneumoniae* - „хирургическо/ICU лечение“.

V. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. Извършен е детайлен анализ на етиологичния спектър на бактериемите и антибиотичната резистентност на ESKAPEEs патогените, свързани с тях в не-селектирана група хоспитализирани пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта за една декада, като са оценени трендовете във времето и са сравнени с Европейските и световни тенденции.
2. Извършен е детайлен анализ на етиологичния спектър на бактериемите и антибиотичната резистентност на ESKAPEEs патогените, свързани с тях в групата на онкохематологични пациенти с лабораторно потвърдени инфекции на кръвта за 11-годишен период и са оценени трендовете във времето. Получените резултати са основа, върху която да се дефинират препоръките за емпирично антибиотично лечение в случаите на фебрилна неутропения или при съмнение за инфекциозни усложнения в тази група имунокомпрометирани пациенти.
3. Проучен е 30-дневния леталитет (общ и специфичен) и рисковите фактори за фатален изход при инфекции на кръвта, причинени от 7 бактериални вида (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae complex*, *A. baumannii - calcoaceticus complex* и *P. aeruginosa*) сред 798 хоспитализирани пациенти за 5-годишен период и е демонстриран сериозният товар, с който тези заболявания се асоциират.
4. Извършеното проучване разширява наличните данни и научна информация за антибиотичната резистентност сред водещи причинители на инфекции на кръвта и товара на тези инфекции за България и може да послужи като основа при създаването на политики, насочени към ограничение и контрол на проблема на локално и национално ниво.
5. Извършеното проучване доведе до генериране на висококачествени и сравними данни и тяхното интегриране в много широка международна база данни, чиято цел е оценка на товара на антибиотичната резистентност при различни инфекции, вкл. инфекции на кръвта.

Приноси с потвърдителен характер

1. Проучени са молекулярно-генетичните механизми на карбапенемна резистентност сред най-важните и проблемни патогени (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*), асоцииращи се с клинично значими бактериемии, като е доказана тяхната широка вътреболнична дисеминация и асоциация с определени секвенциални типове и международни клонове.

Приноси с научно - приложен характер

1. Демонстрираната дълбочината на проблема „Антибиотична резистентност“ и „Леталитет“, съпътстващи инфекциите на кръвта в хоспитализирани пациенти, вкл. в тежко имунокомпрометирани, ясно показва необходимостта от въвеждане в лабораторната диагностика на тези живото-застрашаващи инфекции на съвременни методи за експресна микробна идентификация и определяне на чувствителност към антимикробни лекарствени средства. Преки резултати от това ще са намаляване на смъртността от инфекции, причинени от мултирезистентни бактерии и увеличаване броя на провежданите микробиологични изследвания и в частност на тези за определяне на антибиотична чувствителност.

VI. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Antimicrobial Resistance Collaborators.** Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet** **2022**; 399: 629–55 Published Online January 20, 2022 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0). **IF 202.731**
2. **European Antimicrobial Resistance Collaborators.** The burden of antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis. **Lancet Public Health** **2022**; 7: e897–913 Published Online October 13, 2022 [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(22\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(22)00225-0). **IF 72.427**
3. **Temenuga Stoeva**, Romyana Markovska, Ivan Mitov. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* blood isolates resistant to 3rd generation cephalosporins and/or carbapenems collected from patients in a Bulgaria University Hospital. **Доклади на Българската академия на науките**, **2021**, vol 74, No 10, 1469-1478. **IF 0.326**
4. R. Markovska, **T. Stoeva**, P. Stankova, L. Boyanova, D. Dimitrova, R. Gergova, I. Mitov. First report of *Enterobacter asburiae* isolate, producing NDM-1 and a novel ACT-68 enzyme in Bulgaria. **Infectious Diseases**, **2019**, 51(8). **IF 2.191**
5. R. Markovska, **T. Stoeva**, L. Boyanova, P. Stankova, E. Keuleyan, M. Murdjeva, M. Lesseva, G. Nedelcheva, A. Petrova, D. Ivanova, K. Mihova, R. Kaneva, I. Mitov. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Bulgarian hospitals–Interregional spread of ST11 NDM-1-producing *K. pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, **2019**, 69: 61-67. **IF 2.26**
6. T. Strateva, I. Sirakov, **T. Stoeva**, A. Stratev, S. Dimov, E. Savov, I. Mitov. Carbapenem - resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014–2016). **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, **2019**, 16: 266-73. **IF 2.022**
7. L. Setchanova, M. Murdjeva, A. Alexandrova, M. Sredkova, **T. Stoeva**, M. Yoneva, A. Kurchatova, I. Mitov. Serotype changes and antimicrobial nonsusceptibility rate of invasive and non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates after implementation of 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate

- vaccine (PHiD-CV) in Bulgaria. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** 2017, 21, 4: 433-440. **IF 1.468**
8. R. Markovska, **T. Stoeva**, I. Schneider, L. Boyanova, V. Popova, D. Dacheva, R. Kaneva, A. Bauernfeind, V. Mitev, I. Mitov. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. **APMIS** 2015, 123, 10:887-94. **IF 1.933**.
 9. R. Markovska, I. Schneider, **T. Stoeva**, K. Bojkova, L. Boyanova, A. Bauernfeind, I. Mitov. First identification of KPC-2 and VIM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease** 2013, 77, № 3, 252-253. **IP 2.568**
 10. **Т. Стоева**, Д. Ниязи, И. Мичева. Инфекции на кръвта при пациенти с онкохематологични заболявания: етиологичен спектър и профил на антибиотична резистентност (2015 - 2020). **Хематология**, 2022, VOL. LVIII 2022 № 1-2; 38-44. **SJR₂₀₂₂ 0.101, Q4**.
 11. Д. Ниязи, И. Мичева, **Т. Стоева**. Бактериални и микотични усложнения при пациенти след хематопоеична стволково-клетъчна трансплантация. **Хематология** 2020, vol. LVI, № 1-2; 26-31. **SJR₂₀₂₀ 0.101, Q4**.
 12. Г. Неделчева, **Т. Стоева**, Р. Марковска, Д. Димитрова, П. Станкова, И. Митов. Антибиотична чувствителност на клинично значими изолати *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ - Варна за периода 2014-2017г. **Обща медицина**, 2019, брой 3; 9-16. **SJR₂₀₁₉ 0.113, Q4**.
 13. D. Niyazi, I. Micheva, D. Savova, M. Georgieva, E. Ismail, **T. Stoeva**. Species diversity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolates associated with catheter – related bloodstream infections in patients after hematopoietic stem cell transplantation. **Scripta Scientifica Medica**, 2022;54(2):13-17.
 14. **Т. Стоева**, М. Божкова, Р. Марковска, К. Божкова. Етиологичен спектър и антимикробна лекарствена резистентност на най-честите причинители на инфекции на кръвта при пациенти с онкохематологични заболявания. **Медицински преглед** 2016, 52, №2:38-45.
 15. **Т. Стоева**, М. Божкова, Р. Марковска, В. Каменова, К. Божкова. Проблемна антибиотична резистентност сред най-важните причинители на бактериемии в Университетска болница. **Medicart** 2016, 1:24-33.
 16. **Т. Stoeva**, P. Higgins, K. Vojova, H. Seifert. Molecular epidemiology of Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from two Bulgarian hospitals. **Scripta Scientifica Medica** 2014, 46, No3: 47-50.
 17. **Т. Стоева**, К. Божкова, М. Божкова. „Тенденции в развитието на проблемната антибиотична резистентност сред най - важните причинители на бактериемии в УМБАЛ”Света Марина” – Варна за периода 2007 – 2011г. като част от Европейската мрежа за надзор над антибиотичната резистентност (EARS-Net)”. **Медицински Преглед** 2013, 49, №1: 41-9.
 18. **Т. Стоева**, К. Божкова, М. Божкова. Проучване на фунгемиите в Университетска Болница: етиологичен спектър и антимикотична чувствителност. **Български Медицински Журнал** 2013, No2:65-71.