



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА**

---

**ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА**

**КАТЕДРА ПО МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ**

**Д-р Виктория Снежанова Снегарова-Тонева**

**Оценка на автоматизираната система HB&L за бърза  
диагностика на инфекции на уринарния тракт**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

На дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

**Научна специалност: „Микробиология“**

**Научен ръководител:  
Проф. д-р Теменуга Стоева, д.м.н.**

**Варна, 2024**

Дисертационният труд съдържа 134 страници и е онагледен с 8 фигури, 19 таблици и едно приложение. Цитирани са 285 литературни източника, от които 5 на кирилица и 280 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедра по микробиология и вирусология на МУ – Варна и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

**Външни членове:**

Проф. д-р Румяна Марковска, д.м.

Доц. д-р Иванка Гергова, д.м.

Проф. д-р Людмила Боянова, д.м.н.

**Вътрешни членове:**

Доц. д-р Милена Божкова, д.м.

Доц. д-р Татина Тодорова, д.б.

Дисертантката е редовен докторант към Катедра по микробиология и вирусология на МУ – Варна и лекар – микробиолог в СМДЛ Лаборекспрес 2000 – Варна.

Експерименталната работа е извършена в микробиологичната лаборатория на СМДЛ Лаборекспрес 2000 – Варна.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 07.03.2025 г. от 13:00 часа в сграда РЗИ, ет.8, каб. 803 и чрез линк на електронната платформа Webex. Материалите по защитата са публикувани на интернет – страницата на Медицински университет „Професор д-р Параскев Стоянов“ - Варна и са на разположение в Научния отдел на Медицински университет – Варна.

## СЪДЪРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....</b>                                                                                                                                                           | <b>4</b>  |
| <b>1. ВЪВЕДЕНИЕ .....</b>                                                                                                                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>                                                                                                                                                                | <b>7</b>  |
| <b>3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....</b>                                                                                                                                                          | <b>8</b>  |
| 3.1. Дизайн на проучването .....                                                                                                                                                            | 8         |
| 3.2. Микробиологични методи .....                                                                                                                                                           | 11        |
| 3.3. Определяне на резидуална (остатъчна) антибиотична<br>активност в проби урина чрез апарат <b>HB&amp;L</b> .....                                                                         | 11        |
| <b>4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....</b>                                                                                                                                                        | <b>12</b> |
| 4.1. Етиологичен спектър на инфекциите на уринарния<br>тракт.....                                                                                                                           | 12        |
| 4.2. Сравнителна оценка на точността на <b>HB&amp;L Uroquattro</b><br>за целите на диагностиката на инфекциите на<br>уринарния тракт.....                                                   | 25        |
| 4.3. Чувствителност към антимикробни лекарствени<br>средства, определена чрез дисково - дифузионния<br>метод на <b>Kirby-Bauer</b> , извършен с бактериални<br>изолати в чиста култура..... | 33        |
| 4.4. Чувствителност към антимикробни лекарствени<br>средства, определена чрез автоматизираната система<br><b>HB&amp;L Uroquattro</b> директно от положителни проби<br>урина.....            | 52        |
| 4.5. Чувствителност към антимикробни лекарствени<br>средства, определена чрез автоматизираната система<br><b>Vitek 2</b> директно от положителни проби<br>урина.....                        | 57        |
| 4.6. Определяне на показателя „Резидуална антибиотична<br>активност” в проби урина.....                                                                                                     | 64        |
| <b>5. ИЗВОДИ.....</b>                                                                                                                                                                       | <b>69</b> |
| <b>6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ<br/>    ТРУД.....</b>                                                                                                                          | <b>72</b> |
| <b>7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ<br/>    ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>                                                                                                      | <b>74</b> |

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

|                  |                                                                                  |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ВБИ</b>       | – вътреболнична инфекция                                                         |
| <b>ВУР</b>       | – везико-уретрален рефлукс                                                       |
| <b>ДДМ</b>       | – дисково – дифузионен метод                                                     |
| <b>ИУТ</b>       | – инфекции на уринарния тракт                                                    |
| <b>МПК</b>       | – минимална потискаща концентрация                                               |
| <b>AST</b>       | – antibiotic susceptibility test                                                 |
| <b>CAUTI</b>     | – Catheter Associated Urinary Tract Infections                                   |
| <b>CFU</b>       | – colony forming units                                                           |
| <b>DDST</b>      | – double - disk synergy test                                                     |
| <b>ESBL</b>      | – extended – spectrum beta – lactamase                                           |
| <b>FISH</b>      | – Fluorescent in situ hybridisation                                              |
| <b>GHLAR</b>     | – gentamycin high level aminoglycoside resistance                                |
| <b>HAI</b>       | – Hospital Acquired Infections                                                   |
| <b>ICU</b>       | – intensive care unit                                                            |
| <b>ME</b>        | – major error                                                                    |
| <b>mE</b>        | – minor error                                                                    |
| <b>MALDI-TOF</b> | – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry |
| <b>MS</b>        |                                                                                  |
| <b>MRSA</b>      | – methicillin – resistant <i>Staphylococcus aureus</i>                           |
| <b>MSSA</b>      | – methicillin – sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>                           |
| <b>NGS</b>       | – Next Generation Sequencing                                                     |
| <b>NPV</b>       | – negative predictive value                                                      |
| <b>PCR</b>       | – Polymerase chain reaction                                                      |
| <b>PPV</b>       | – positive predictive value                                                      |
| <b>RAA</b>       | – residual antibiotic activity                                                   |
| <b>TGS</b>       | – Third generation sequencing                                                    |
| <b>VRE</b>       | – vancomycin- resistant enterococcus                                             |
| <b>VME</b>       | – very mJOR error                                                                |

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Инфекциите на уринарния тракт (ИУТ) засягат огромна група пациенти и могат да бъдат разглеждани като социално значимо заболяване. Те са се превърнали в модел за изучаване на патофизиологията на инфекциите, като например взаимодействието между гостоприемника и патогена и еволюционните механизми на инфекцията, както и за разработване на нови антибиотични препарати (*Öztürk R, 2020*).

Като важен здравен проблем във всички етапи на живота от новороденото до пациенти в старческа възраст, тяхната честота се променя в зависимост от пола и възрастта (*Foxman B, 2003*). Съществуват различни предразполагащи фактори като вродени аномалии, диабет, операции, неврологични нарушения и бременност (*Flores-Mireles AL, 2015*). Тяхното клинично проявление е в широк спектър, вариращ от обикновен цистит до животозастрашаващите уросепсис и септичен шок (*Wagenlehner F, 2015*). Набирането на епидемиологичните данни дава основа за рационални решения за започване на лечение и за осигуряване на превенция и контрол на тези инфекции (*Tandogdu Z, 2016*).

В допълнение към често използваните класификации при уроинфекциите, базирани на препоръки от урологични и нефрологични ръководства, често в ежедневната практика се използват и такива според мястото на инфекцията, епизодите, симптомите и усложняващите фактори (*Kranz J, 2024*). Засягането на уринарния тракт може да бъде и в следствие на друг възпалителен процес и значително да усложни диагностиката и лечението им (*Pietropaolo A, 2023*).

Терапията на неусложнените уроинфекции обикновено е емпирична - основава се на работен алгоритъм от анамнестични данни и подкрепящите ги лабораторни резултати (*Medina M, 2019; Sabih A, 2023*). В много държави, при пациенти с неусложнени уроинфекции, не се извършва културелно изследване, освен в случаите на бременност и рецидиви с висок риск от усложнения (*Lawati H, 2024*).

Повечето скрининг методи на първа линия не определят вида уропатоген и неговия профил на резистентност. От епидемиологична гледна точка не може да се провежда точно наблюдение на етиологичната структура и антимикробната резистентност. Именно тези данни са потребни при лечение на пациенти с тежки уроинфекции или с риск за развитие на сепсис (*Rousham E, 2019*).

Стандартната урокултура е „златен стандарт“ в диагностиката на инфекциите на уринарния тракт. Тя се основава на дългогодишни познания в етиологията и резистентността на най-честите причинители, носи и основния недостатък на микробиологичния метод на изследване – нуждата от време за даване на отговор. Стандартната урокултура е незаменима при болнични и усложнени инфекции на пикочните пътища като такива, рефрактерни на първоначалното лечение, пиелонефрит, атипични организми и т.н. (*Xu R, 2021*). Въпреки това, тъй като медицинските технологии продължават да напредват, по-нови диагностични платформи навлизат все по-успешно в рутинната практика (*Shallcross L, 2020*). Използването на автоматизиран микробиологичен скрининг за урини има предимството да съкрати продължителността на диагностика в рамките на часове. Бързото определяне на антимикробна чувствителност е може би още по-важно за постигане на целта за оптимизиране на подходяща антибиотична терапия (*Roveta S, 2004; Van T, 2017*). Нови диагностични платформи, включително тестове за нуклеинови киселини (мултиплексният PCR, FISH) и маспектрометрия (MALDI-TOF), подобряват скоростта и точността на идентифициране, за да се предотврати развитието на антимикробна резистентност (*Davenport M, 2017; Kaur R, 2020*).

Успешното внедряване и прилагане на тези нови технологии има потенциал да постави началото на ерата на прецизната медицина и подобряване на грижите за пациентите и общественото здраве.

## 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се оцени автоматизираната система HB&L Uroquattro за извършване на бърза диагностика на инфекциите на уринарния тракт.

Във връзка с това си поставихме следните задачи:

1. Да се проучи етиологичния спектър на инфекциите на уринарния тракт в група от 842 амбулаторни пациенти със симптоми на инфекции на уринарния тракт.
2. Да се сравнят резултатите от бързата детекция на бактериален растеж в проби урина, получени с автоматизираната система HB&L Uroquattro и тези, получени с класическия културелен метод, като се изчислят следните показатели: чувствителност, специфичност, положителна предиктивна стойност, отрицателна предиктивна стойност и акуратност.
3. Да се проучи чувствителността към набор от антимикробни лекарствени средства чрез дисково - дифузионния метод на Kirby-Bauer, извършен с изолати в чиста култура.
4. Да се проучи чувствителността към набор от антимикробни лекарствени средства чрез автоматизираната система HB&L Uroquattro като се работи директно с положителни проби урина.
5. Да се проучи чувствителността към набор от антимикробни лекарствени средства чрез автоматизираната система VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) като се работи директно с положителни проби урина.
6. Да се определи показателя „Остатъчната антибиотична активност” във всяка проба урина и да се оцени приноса на този тест за правилната интерпретация на получените резултати от културелното изследване.

### **3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **3.1. ДИЗАЙН НА ПРОУЧВАНЕТО**

Настоящото проучване е с проспективен изследователски дизайн, целящ оценка на автоматизиран метод за бърза диагностика на инфекциите на ИУТ (детекция на микробен растеж, определяне на резидуална антибиотична активност, изпитване на чувствителност към антимикробни лекарствени средства) в група от амбулаторни пациенти за 7 месечен период (октомври 2020 - април 2021 г.) и да сравни този метод с утвърдените микробиологични методики за диагностика на този тип инфекции.

В проучването са включени пациенти с данни за ИУТ, насочени от клиничен лекар, със симптоми на уроинфекция, независимо от тяхната възраст, пол и диагноза. С цел отразяване данните за всеки пациент, беше разработена анкета, попълвана собственоръчно от пациента или неговия настойник при постъпване на пробата (виж приложение 1 на дисертацията). Първоначалният подбор включва пациенти с положителна находка от общото химическо изследване на урина (нитрити, левкоцити, белтък, бактерии в седимент). За съхраняване и анализ на необходимата информация са използвани Лабораторната и апаратни (HB&L; VITEK 2 Compact) информационни системи за изследвания период.

#### **Критерии за набиране на проби урина за целите на проучването:**

- В проучването са включени всички проби урини, които отговарят на следните условия: първа сутрешна урина, взети по метода „mid-stream catch“, след извършен тоалет, при което пациентите са инструктирани да дадат за изследване средната порция урина в стерилен контейнер, без да докосват вътрешността или върха на контейнера. За педиатрични пациенти за целта на проучването са използвани педиатрични стерилни колектори за урина, като родителите бяха инструктирани да прехвърлят директно колектора в стерилния контейнер без да преливат материала. При пациенти с уринарен катетър са приемани проби, взети от порта на катетъра след съответното почистване (Holroyd S, 2019). При

пациенти с нефростомата: урината е взета от връзката между събирателната торбичка и тръбата на нефростомата при спазване правилата на антисептика (Yoo M, 2021).

Всички проби урина са транспортирани и обработени до 2 часа от пробовземането.

- Проби урина, които не могат да бъдат доставени в лабораторията до 2 часа от вземането, са съхранявани в хладилник за период до 24 часа или са пробовземани в контейнер с консервант борова киселина.
- В проучването са включвани само проби урина, за които при провеждане на бързия скрининг с автоматизираната система HB&L Uroquattro се установява бактериален растеж  $> 800$  CFU/ml и се детектира ниво на турбидност на пробата 0.5 чрез McFarland монитор в рамките на 4 часа.

#### **Критерии за изключване на проби урини от проучването:**

- Проби урина, които не отговарят на горепосочените критерии: урината не е първа сутрешна, не е извършен тоалет, пробата е била преливана или не е давана средна струя.
- Неправилно съхранявани и транспортирани проби: проби съхранявани на стайна температура, проби с разлив, проби съхранявани повече от 48 часа в обикновен контейнер, без консервант.
- Пациенти (с изкл. на деца и бременни жени) с вероятна безсимптомна бактериурия: положителна бактериурия, в количество  $> 10^4$  CFU/ml при липса на клинична симптоматика и данни за уроинфекция.
- Турбидни проби: проби урина, при които на бързия скрининг на HB&L, при първоначалния резултат се отчитат стойности по-големи от 20.000 разсейващи единици (scattering units) при 30° сензор или 8.000 при 90° сензор (апаратът обозначава тези проба с флаг „TURBID“). Тези проби не бяха включени в проучването, съгласно препоръка на производителя, поради наличието в пробата на компоненти възпрепятстващи бактериалния скрининг.

- Контаминирани проби при бързия скрининг на HB&L: определянето на проби като „контаминирани“ беше извършвано съгласно препоръките, дадени от производителя. Растежните криви бяха наблюдавани в реално време и всички, които показваха атипичен растеж и не достигаха заложения праг за положителни, бяха изписвани като контаминирани. Атипичните растежни криви се визуализираха по-късно и имаха различен ход, в сравнение с положителните проби, при които апаратът започваше отчитане на растежна крива 45 минути след въвеждане на тестваните урини. Контаминиращата микрофлора демонстрираше по-дълга lag фаза от 4-5 часа инкубация преди да се адаптира към новите условия. Патогенните микроорганизми се определяха от краткото време за репликация, кратка lag фаза и бързо нарастваща експоненциална log фаза. След определяне на пробите като контаминирани, те бяха изключвани от проучването.

### **Проучени пациенти**

Проспективно за периода Октомври 2020 - Април 2021 г., са проучени общо 1600 проби урина от 842 амбулаторни пациенти със съмнение за уроинфекция. В проучването са включени пациенти с клиника и ехографски данни за остра уроинфекция, насочени от специалист, бременни жени с клинична картина на цистит и вероятна бактериурия, деца с вродени аномалии на пикочна система, диспансеризирани болни с хронични заболявания на отделителната система, пациенти след бъбречна трансплантация, подлежащи на периодичен контрол на урината за бактериален растеж, пациенти от старчески домове и хосписи, пациенти с постоянни катетри и нефростоми. На всички уринни проби е извършен първоначален скрининг за микробен растеж чрез използване на автоматизираната система HB&L Uroquattro (скриниращо време от 4 часа) и успоредно с това е проведено и културелно изследване с цел микробна изолация.

В проучването не са включвани лица извън дефинираните групи или отказали изследването. Проучването е одобрено от

Комисията по етика на научните изследвания с протокол No 92/02.04.2020 г.

#### **Дефиниции:**

**Потвърдена уроинфекция:** пациент с клинични данни за уроинфекция, положителен на бърз скрининг с  $> 800$  CFU/ml, със сигнификантна бактериурия по заложените критерии, с микробиологично доказан уропатоген/и.

### **3.2. МИКРОБИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ**

#### **3.2.1. СКРИНИНГ НА УРИННИ ПРОБИ ЗА МИКРОБЕН РАСТЕЖ ЧРЕЗ АПАРАТ HB&L UROQUATTRO**

#### **3.2.2. КЛАСИЧЕСКО КУЛТУРЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ**

#### **3.2.3. МЕТОДИ ЗА МИКРОБНА ИДЕНТИФИКАЦИЯ**

- Идентификация от чиста (свежа) микробна култура
- Микробна идентификация директно от уринна проба, определена като положителна от скриниращата HB&L система

### **3.2.4 МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА**

- Определяне на чувствителност към антимикробни лекарствени средства чрез дисково дифузионен метод на Kirby - Bauer
- Фенотипен метод за детекция на широко-спектърни бета-лактамази (ESBLs)
- Определяне на чувствителност към антимикробни лекарствени средства чрез автоматизирана система VITEK 2 Compact
- Определяне на чувствителност към антимикробни лекарствени средства директно от положителна след скрининг проба урина чрез HB&L Uroquattro AST
- Отчитане и интерпретация на резултати

### **3.3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РЕЗИДУАЛНА (ОСТАТЪЧНА) АНТИБИОТИЧНА АКТИВНОСТ В ПРОБИ УРИНА ЧРЕЗ АПАРАТ HB&L**

### **3.4. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ**

- Корелационен анализ
- Прогностичен анализ

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 4.1. ЕТИОЛОГИЧЕН СПЕКТЪР НА ИНФЕКЦИИТЕ НА УРИНАРНИЯ ТРАКТ.

През проучвания 2 годишен период от време (2020 – 2021 г.) чрез бърз НВ&L скрининг и чрез културелния метод са изследвани общо 1600 проби урина, получени от 842 амбулаторни пациенти със симптоми на инфекции на уринарния тракт (дизурия, полакиурия, температура, наличие на левкоцити/нитрити при общото химическо изследване на уринната проба). Чрез класическия културелен метод бяха изолирани и идентифицирани общо 352 клинично значими, неповтарящи се микробни изолата от 352 пациента (41.8%).

Основните демографски показатели, както и други характеристики на проучените 352 пациенти, свързани с инфекциите на уринарния тракт, са представени на таблица 1.

*Таблица 1. Характеристика на 352 амбулаторни пациенти с инфекции на уринарния тракт.*

| Променливи                                               | Общо пациенти,<br>n=352<br>n (%) |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Жени                                                     | 239 (67.9)                       |
| Мъже                                                     | 113 (32.1)                       |
| възраст 65+                                              | 61 (17.3)                        |
| Наличие на подлежащо заболяване / състояние              |                                  |
| извършена бъбречна трансплантация                        | 3 (0.8)                          |
| наличие на уринарен катетър                              | 7 (1.9)                          |
| нефростома                                               | 4 (1.1)                          |
| бременност                                               | 43 (12.2)                        |
| Провеждано антибиотично лечение по време на изследването | 113 (32.1)                       |
|                                                          |                                  |

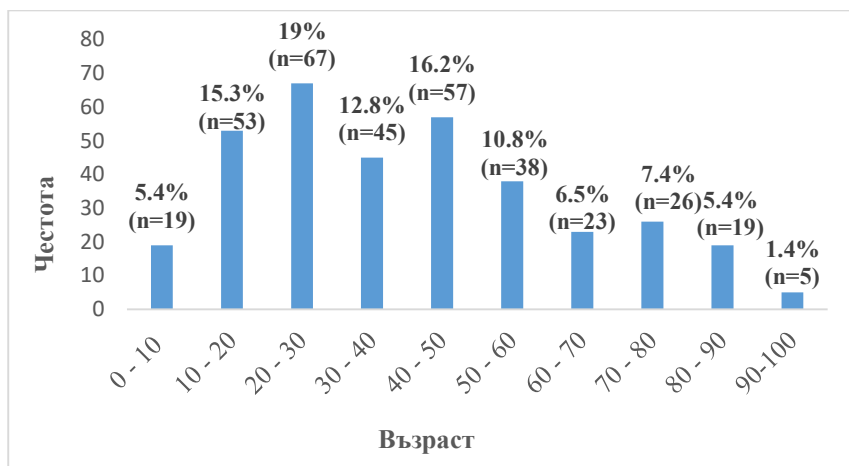
Средната възраст в цялата група проучвани пациенти (независимо от пола) е 41 г., като 50% от пациентите са на възраст

$\leq 38$  г. Най-висок е относителният дял на пациентите във възрастовия диапазон 20 - 30 г. (фигура 1).

Средната възраст на пациентите от женски пол е 35 г., като 50% от тях са  $\leq 29$  г. Най-висок е относителният дял на пациентите във възрастовия диапазон 20 - 30 г.

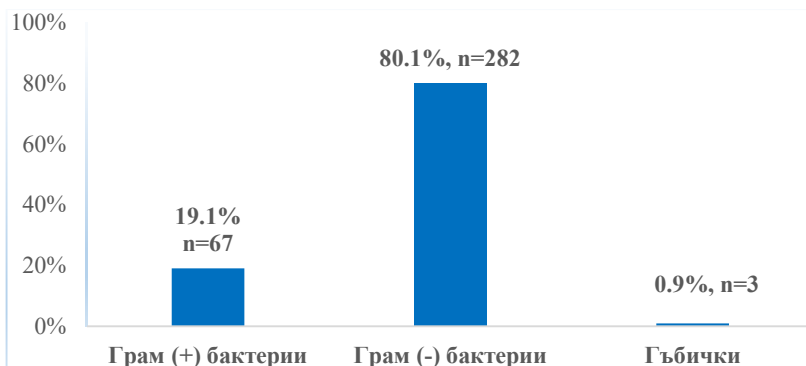
Средната възраст на пациентите от мъжки пол е 55 г., като 50% от тях са  $\leq 55$  г. Най-висок е относителният дял на пациентите във възрастовия диапазон 40 - 50 г.

На фигура 1 са представени обобщени данни за възрастовото разпределение на всички 352 пациента, включени в проучването.



**Фигура 1.** Възрастово разпределение на 352 амбулаторни пациенти с инфекции на уринарния тракт през изследвания период.

В етиологичния спектър на документираните инфекции на уринарния тракт превалират Грам отрицателните бактериални видове, представени с 80.1% ( $p > 0.05$ ). На фигура 2 са показани обобщени данни за причинителите на тези инфекции и техния относителния дял, а детайлизираният етиологичен спектър е представен на таблица 2.



**Фигура 2.** Спектър на причинителите на инфекции на уринарния тракт, документиран при 352 амбулаторни пациенти в периода 2020-2021г. (в брой и %).

**Таблица 2.** Етиологична структура на инфекциите на уринарния тракт сред 352 амбулаторни пациенти в периода 2020-2021 г.

| Етиологичен причинител              | Общо (жени, мъже)<br>n (%) | жени<br>n (%) | мъже<br>n (%) |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------|---------------|
| <b>Общо</b>                         | 352 (100.0)                | 239 (67.9)    | 113 (32.1)    |
| <b>Грам - отрицателни бактерии</b>  | 282 (80.1)                 | 186 (66.0)    | 96 (34.0)     |
| <i>Escherichia coli</i>             | 200 (56.8)                 | 139 (69.5)    | 61 (30.5)     |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | 40 (11.4)                  | 25 (62.5)     | 15 (37.5)     |
| <i>Proteus mirabilis</i>            | 26 (7.4)                   | 15 (57.7)     | 11 (42.3)     |
| <i>Citrobacter complex</i>          | 5 (1.4)                    | 2 (40.0)      | 3 (60.0)      |
| <i>Enterobacter cloacae complex</i> | 5 (1.4)                    | 3 (60.0)      | 2 (40.0)      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | 4 (1.1)                    | 0 (0.0)       | 4 (100)       |
| <i>Serratia marcescens</i>          | 1 (0.3)                    | 1 (100)       | 0 (0.0)       |
| <i>Morganella morganii</i>          | 1 (0.3)                    | 1 (100)       | 0 (0.0)       |
| <b>Грам-положителни бактерии</b>    | 67 (19.1)                  | 51 (76.1)     | 16 (23.9)     |
| <i>Enterococcus faecalis</i>        | 44 (12.5)                  | 30 (68.2)     | 14 (31.8)     |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 20 (5.7)                   | 19 (95.0)     | 1 (5.0)       |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>     | 2 (0.6)                    | 2 (100)       | 0 (0.0)       |
| <i>Aerococcus urinae</i>            | 1 (0.3)                    | 1 (100)       | 0 (0.0)       |
| <b>Гъбички</b>                      | 3 (0.85)                   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)      |
| <i>Candida spp.</i>                 | 3 (0.85)                   | 2 (66.7)      | 1 (33.3)      |

Не беше установена статистическа значима разлика във видовото разпределение на уропатогените между групата на мъжете и тази на жените ( $p>0.05$ ). Етиологичното разпределение по пол е представено на таблица 3.

**Таблица 3.** Етиологична структура на инфекциите на уринарния тракт сред 352 амбулаторни пациенти в периода 2020-2021 г., представена по пол.

| Етиологичен причинител                                               | жени<br>n (%)     | мъже<br>n (%)    | p            |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|--------------|
| <b>Общо клинично значими микроорганизми, изолирани от урокултури</b> | <b>239 (100)</b>  | <b>113 (100)</b> | <b>0.109</b> |
| <b>Грам - отрицателни бактерии</b>                                   | <b>186 (77.8)</b> | <b>96 (84.9)</b> |              |
| <i>Escherichia coli</i>                                              | 139 (58.2)        | 61 (54.0)        |              |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                         | 25 (10.5)         | 15 (13.3)        |              |
| <i>Proteus mirabilis</i>                                             | 15 (6.3)          | 11 (9.7)         |              |
| <i>Citrobacter complex</i>                                           | 2 (0.8)           | 3 (2.65)         |              |
| <i>Enterobacter cloacae complex</i>                                  | 3 (1.2)           | 2 (1.76)         |              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                        | 0 (0.0)           | 4 (3.5)          |              |
| <i>Serratia marcescens</i>                                           | 1 (0.4)           | 0 (0.0)          |              |
| <i>Morganella morganii</i>                                           | 1 (0.4)           | 0 (0.0)          |              |
| <b>Грам - положителни бактерии</b>                                   | <b>51 (21.3)</b>  | <b>16 (14.1)</b> |              |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                                         | 30 (12.5)         | 14 (12.4)        |              |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i>                                  | 19 (7.9)          | 1 (0.8)          |              |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>                                      | 2 (0.8)           | 0 (0.0)          |              |
| <i>Aerococcus urinae</i>                                             | 0 (0.0)           | 1 (0.8)          |              |
| <b>Гъбички</b>                                                       | <b>2 (0.8)</b>    | <b>1 (0.8)</b>   |              |
| <i>Candida spp.</i>                                                  | 2 (0.8)           | 1 (0.8)          |              |

Етиологичното разпределение при пациенти с подлежащо заболяване/състояние е представено на таблица 4.

**Таблица 4.** Етиологична структура на инфекциите на уринарния тракт сред специфични групи пациенти (с подлежащо заболяване / състояние).

| Заболяване / състояние                    | Етиологичен причинител  | n  |
|-------------------------------------------|-------------------------|----|
| Пациенти след бъбречна трансплантация (3) | <i>K. pneumoniae</i>    | 2  |
|                                           | <i>P. aeruginosa</i>    | 1  |
| Пациенти с уринарен катетър (7)           | <i>E. coli</i>          | 3  |
|                                           | <i>E. faecalis</i>      | 2  |
|                                           | <i>K. pneumoniae</i>    | 1  |
|                                           | <i>P. aeruginosa</i>    | 1  |
| Пациенти с нефростома (4)                 | <i>E. cloacae</i>       | 2  |
|                                           | <i>K. pneumoniae</i>    | 1  |
|                                           | <i>E. coli</i>          | 1  |
| Бременност (43)                           | <i>E. coli</i>          | 26 |
|                                           | <i>E. faecalis</i>      | 8  |
|                                           | <i>S. saprophyticus</i> | 5  |
|                                           | <i>K. pneumoniae</i>    | 2  |
|                                           | <i>S. agalactiae</i>    | 1  |
|                                           | <i>P. mirabilis</i>     | 1  |

## Обсъждане

За проучвания двугодишен период от време (2020 – 2021 г.) по-чести и доминиращи причинители на инфекции на уринарния тракт в амбулаторни пациенти са Грам отрицателните бактерии, доказани в 80.1% от случаите, с водещи бактериални видове *E. coli* (56.8%), *K. pneumoniae* (11.4%) и *P. mirabilis* (7.4%), като съотношението Грам отрицателни към Грам положителни бактерии е 80.1% : 19.9%. Значително по-рядко са доказани изолати, представители на родовете *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. и *P. aeruginosa*. Подобни на тези резултати се докладват и в множество други проучвания, проведени в извънболнични и

болнични условия, като всички те потвърждават по-големия относителен дял на Грам отрицателните бактерии, представители основно на разред *Enterobacterales*, с водещ уропатоген *E. coli* (Davenport M, 2017; Bono M, 2023). *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* и *Enterobacter* spp. са сред другите относително често доказвани етиологични агенти на ИУТ, като *K. pneumoniae* е вторият по честота етиологичен причинител на придобити в обществото уроинфекции (Davenport M, 2017; Caneiras C, 2019), което се демонстрира и в това изследване. Полученият много висок относителен дял на *E. coli* (58.6%) в настоящето проучване, потвърждават водещата му роля на уропатоген сред амбулаторната популация пациенти. Подобни проучвания в Европа, Китай и САЩ, установяват над 75% от амбулаторните и хоспитализирани пациенти, диагностицирани с инфекции на уринарния тракт, да се асоциират с *E. coli* (Flores-Mireles A, 2015; Medina M, 2019; Zhou Y, 2023).

Сред Грам отрицателните бактерии, се установи нисък относителен дял на *P. aeruginosa* изолати (1.1%), което може да бъде обяснено с включване в проучването изключително на амбулаторни пациенти, респ. такива с придобити в обществото инфекции. Проучва на Zhou върху най-честите уропатогени на инфекции, придобити в обществото установява, че този бактериален вид причинява приблизително 1% от неусложнените и 2% от усложнените уроинфекции (Zhou Y, 2023). Трябва да се има предвид факта, че *P. aeruginosa* може да бъде и колонизиращ агент на пикочните пътища, а изолирането му от урина трябва да се разглежда с внимание, поради възможността да се касае за пациенти с непълно излекувани придобити в болнични условия уроинфекции, с катетри и други подлежащи състояния (Laupland K, 2007; Gajdács M, 2020).

Получените от нас резултати показват значително по-нисък относителен дял на Грам положителни уропатогени (19.1%) в етиологичния спектър, като *E. faecalis* (12.5%) и *S. saprophyticus*

(5.7%) са водещи. Скорошно проучване също доказва Грам положителните бактерии в много по-нисък относителен дял в етиологичния спектър на уроинфекциите в амбулаторни пациенти: 16% срещу 84% за Грам отрицателните патогени при неусложнени инфекции и 23% срещу 77% при усложнени (Zhou, Y, 2023). Подобно на установеното от нас, проучвания, проведени в САЩ и Канада, доказват водещото значение на *E. faecalis* в групата на Грам положителните уropатогени (4.1%) (Sanchez G, 2016; Codelia-Anjum A, 2023). Проучване на Seitz и кол. докладва много близки до нашите резултати за относителен дял на *E. faecalis* сред амбулаторни пациенти с ИУТ (10.2%) (Seitz M, 2017). По-ранни проучвания, проведени от Laupland установяват в 5.3% от амбулаторните пациенти с ИУТ като етиологични агенти, представителите на род *Enterococcus* (Laupland K, 2007). Подобни са данните на Zhou и кол., които установяват 5% при неусложнени и 11% при усложнени уроинфекции, асоцииращи се тези микроорганизми (Zhou Y, 2023). Други автори съобщават различия в делът на *E. faecalis*-асоциираните ИУТ, свързани с пола: по-висок относителен дял при мъжете (8.8%) в сравнение с този при жените (1.8%) (Codelia-Anjum A, 2023). Обратно, получените от нас резултати показват по - висок относителен дял на *Enterococcus* spp. в женския пол в сравнение с мъжкия (8.9% vs 3.9%).

В настоящото проучване, след ентeрококите, в групата на Грам положителните бактерии, представителите на вида *S. saprophyticus*, са втори по честота на изолируемост (5.7%). В допълнение, този микроорганизъм е сред първите 5 най-често доказвани микробни видове, независимо от Грамовата им принадлежност, като се идентифицира по-често при жени, което се потвърждава и от нашите резултати – 95% от щамовете бяха изолирани от жени с ИУТ. Този факт потвърждава водещото място на *S. saprophyticus* в етиологичния спектър на ИУТ в амбулаторни пациенти, особено в женския пол. Някои автори

идентифицират *S. saprophyticus* като вторият (след *E. coli*) по честота причинител на придобити в обществото инфекции на уринарния тракт (Ehlers S, 2023; Lala V, 2023). Ehlers и сътр. съобщават, че в групата на жените във възрастта 16 - 25г., *S. saprophyticus* причинява до 42% от всички уроинфекции, докато в мъжкия пол относителният дял е значително по-нисък (Ehlers S, 2023; Lala V, 2023). *S. saprophyticus* също се асоциира и с полимикробни инфекции на пикочните пътища, по-често в имунокомпрометирани пациенти, много възрастни, диабетици, пациенти с HIV и/или злокачествени заболявания, катетиризирани (Argemi X, 2019). В нашето проучване, обхващащо предимно амбулаторни пациенти, не бяха доказани полимикробни инфекции. Трябва да се има предвид също, че при пациенти с вътреболнични уроинфекции, възрастни, бременни жени, както и при пациенти с уринарни катетри, *S. saprophyticus* може да е и колонизиращ агент (Ehlers S, 2023; Lala V, 2023). *S. aureus* е Грам положителен бактериален вид, който също може да причини уроинфекции, но предимно по хематогенен път. В настоящата работа не бяха идентифицирани изолати *S. aureus* като етиологични агенти на ИУТ. Този резултат корелират с множество публикации, които съобщават много нисък относителен дял на *S. aureus* в етиологичния спектър на ИУТ (0.2 - 4%), като често засегнатите пациенти са катетиризирани, с урологични аномалии и/или процедури, от мъжки пол, в напреднала възраст и с различни придружаващи заболявания (Stokes W, 2019; Mason C, 2022).

Клиничното значение на стрептококите от група В (*S. agalactiae*) не винаги е лесно да бъде определено, отчасти поради трудностите, свързани с разграничаването на инфекцията от колонизацията. Тук се имат предвид случаите на *S. agalactiae* бактериурия в не-бременни възрастни, при които честотата на колонизация на уретрата може да надхвърли 20% (Mongilardi N, 2022). Според някои автори, *S. agalactiae* не е обичаен агент на

ИУТ, като причинява приблизително 1 до 2% от всички мономикробни инфекции на пикочните пътища (Goel N, 2020; Mohanty S, 2021), което е в унисон с получения от нас резултат за 0.6% относителен дял на *S. agalactiae* в етиологичния спектър на амбулаторни ИУТ. В скорошна публикация на Zhou и сътр., *S. agalactiae* се изолира в 3% от неусложнените и съответно в 2% от усложнените уроинфекции (Zhou Y, 2023). Въпреки това обаче, някои автори докладват *S. agalactiae* като етиологичен агент в 39% от пациентите над 70-годишна възраст с ИУТ, обитавщи старчески домове (Mohanty S, 2021). *S. agalactiae* - асоциирани ИУТ се съобщават често и при бременни жени, диабетици и имунокомпрометирани лица, както и при лица с урологични аномалии, при които съществува по-висок риск от пиелонефрит с възможност за прогресиране до бактериемия и/или уросепсис (Collin S, 2019).

В настоящото проучването като етиологичен агент бе доказан и бактериалния вид *Aerococcus urinae*, но представен в единичен изолат (0.3%). *A. urinae* е Грам-положителен микроорганизъм, който се асоциира със случаи на уроинфекции и в двата пола, а също и в малки деца и възрастни пациенти (Forsvall A, 2019; Hilt E, 2020). Редица автори също съобщават *A. urinae* като причинител на бактериемии, инфекциозен ендокардит и сепсис, инфекции, засягащи мускулите и костите, както и некротизиращи инфекции на меките тъкани (Senneby E, 2016; Yabes J, 2018; Forsvall A, 2019; Hilt E, 2020). Други съобщения свързват този микробен вид с инконтиненция на урината и свръхактивен пикочен мехур (Price T, 2016; Hilt E, 2020).

В етиологичния спектър на проучените от нас ИУТ сред амбулаторни пациенти, в нисък относителен дял бяха доказани и гъбички от род *Candida* (0.9%). Този резултат корелира с други научни съобщения, при които се идентифицира *Candida spp.* в 1% от случаите на неусложнени уроинфекции (Zhou Y, 2023). Макар дрождеподобните гъбички да са по-редки етиологични агенти на

ИУТ, трябва да се има предвид факта, че пациентите с уринарен катетър, диабет или скорошна антибиотична терапия, са с повишен риск от развитие на микотична уроинфекция (*Kauffman C, 2011; Dias V, 2020*). Проучване на *Dias* и сътр. доказва *Candida* spp. и като причинител на ИУТ в случаи на полимикробни инфекции - едновременно с бактериални патогени (*E. coli* и *E. faecalis*), както и в смесени инфекции, причинени от два различни вида *Candida* spp., като делът на тези инфекции е нисък - 4.3 % и 8.3 % в амбулаторни и в хоспитализирани пациенти съответно (*Dias V, 2020*).

Инфекциите на уринарния тракт са най-честата бактериална инфекция при реципиенти на бъбречна трансплантация, засягайки приблизително една трета от пациентите и съставляват 50 - 75 % от посттрансплантационните инфекциозни усложнения (*Cawcutt K, 2019*). В тази група пациенти рискът от уросепсис и отхвърляне на трансплантата е много висок (*Strohaeker J, 2021*). Според различни автори най-честите уропатогени при проследяването на такива пациенти са *E. coli*, *E. faecalis* и *K. pneumoniae* (*Strohaeker J, 2021; Khedr L, 2023*). Според *Cawcutt* и сътр., етиологията на уроинфекциите при трансплантирани пациенти, се определя от факта дали се касае за непосредствена постоперативна, вътреболнична или придобита в обществото инфекция. Най-честите бактериални уропатогени установени от тези автори включват освен представители на ендегенната микрофлора на реципиента (*E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp.), така и някои предимно вътреболнични патогени като *P. aeruginosa* (*Cawcutt K, 2019*). За изследвания двугодишен период ние идентифицирахме трима пациенти с ИУТ в посттрансплантационен период, при които бяха изолирани *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, което корелира и потвърждава данните от публикации, касаещи тази рискова група пациенти.

Катетър - асоциираните уроинфекции представляват почти половината от инфекциите придобити в болнични условия. *E. coli*

(в относителен дял 65-75%), следван от други представители на семейство *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., коагулазо-отрицателни стафилококи (*S. epidermidis*), *P. aeruginosa* и други неферметиращи глюкозата Грам отрицателни бакетрии и *Candida* spp. (Rubi H, 2022; Werneburg G, 2022). Според проучване на Rajaramon и сътр. в случаите на краткосрочна катетеризация, най-честита бактериални видове, които се асоциират с катетър - свързани ИУТ са *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *Enterococcus* spp. и *Candida* spp. (Rajaramon S, 2023). Нашите резултати са за много малка група катетеризирани пациенти (n=7), но въпреки това резултатите, които получихме корелират напълно със съобщеното в научната литература: доминация на Грам отрицателна микрофлора, с водещ етиологичен агент *E. coli*.

Усложненията, свързани с поставянето на нефростомен катетър (нефростома), включват хематурия, инфекции на пикочните пътища, вкл. пиелонефрит, бъбречен абсцес и уросепсис. Нозокомиалната експозиция, инвазивните урологични интервенции и катетеризацията увеличават значително риска от развитие на ИУТ, особено такива, причинени от множествоно резистентни микроорганизми (Scherberich J, 2021). По данни на Mondal и сътр., при пациенти с нефростома, *E. coli* също доминира в етиологичния спектър, но други микроорганизми като *K. pneumoniae*, *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, MRSA, MSSA и *Candida albicans*, също могат да често да се асоциират с уроинфекции при тези пациенти (Mondal U, 2022). В проучваната от нас група амбулаторни пациенти с ИУТ, само трима бяха с поставена нефростома, като доказаните бактериални изолати бяха отнесени към Грам отрицателната микрофлора от разред *Enterobacterales*, без преобладаване на конкретен вид.

Друга специфична група пациенти в настоящото проучване е групата на бременните жени (12.2%). По данни на различни

автори, етиологичните агенти на ИУТ в случаите на бременност, са същите, като тези при небременни пациенти, като най-често изолираният микроорганизъм е *E. coli* (60 - 82.5%) (Balachandran L, 2022; Habak P, 2024). Според 18-годишен ретроспективен анализ, проведен от Habak и сътр., *S. agalactiae* често се изолира от урокултура през третия триместър на бременността и може да бъде в по-голям относителен дял от *E. coli* (Habak P, 2024). Подобни резултати съобщава проучване на Balachandran и сътр., при което *S. agalactiae* се доказва в 32%, *E. coli* - в 28%, а *Enterococcus* spp. и *Klebsiella* spp. - в 15% и 14% от случаите в напреднала бременност (Balachandran L, 2022). В изследваната от нас група бременни пациентки, в по-висок относителен дял е представена Грам отрицателната микрофлора (67.4%), с основен представител *E. coli* (89.6%) и единични изолати от други видове от разред *Enterobacterales*. В групата на Грам положителни изолати (34.8%) се доказани всички по-често асоцииращи се с ИУТ в женския пол уропатогени: *S. agalactiae*, *E. faecalis* и *S. saprophyticus*. Събраните данни в настоящото проучване не позволяват детайлизиране на срока на бременността и конкретния вид на уроинфекцията (цистит или пиелонефрит).

Националните данни за България, отнасящи се до етиологична структура и антибиотична резистентност на микробните агенти, асоцииращи се с уроинфекции за по-ранен 10 годишен период (2004 – 2014 г.) показват като водещи причинители *E. coli* (53%), *Proteus* spp. (10.6%), *Enterococcus* spp. (9.5%), *Klebsiella* spp. (9.5%) и *P. aeruginosa* (4.9%). В по-нисък относителен дял (между 1% и 5%) се идентифицират *Enterobacter* spp., *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia* spp. и *Candida* spp. В този 10-годишен период се установява тренд за намаление дела на изолатите *E. coli* от 55.9% през 2007г. до 48.2% през 2012г., като това най-вече е за сметка на представители на *P. aeruginosa*, но се последва от ново увеличение на *E. coli* до 54.4% през 2014г. (<http://www.bam-bg.net/>). По данни на същата надзорна система,

за периода 2018 - 2021г., *E. coli* се изолира от урина на амбулаторни пациенти в значително по-висок относителен дял в женския пол (71.1%/2018г.; 69.4%/2019г.; 71%/2020г.; 69.1%/2021г.) в сравнение с мъжкия (51.6%; 50.8%; 53. 9%; 57.2%). За същия период се доказва и увеличение в дела на изолатите *Klebsiella* spp. в двата пола, както в амбулаторни, така и в болнични условия, като е налице малко по-висок относителен дял в мъжкия пол в болнични условия – 11-16% срещу 10-12% за женския пол. В амбулаторни условия, в групата на Грам - положителните микроорганизми, най-голям е делът на *Enterococcus* spp. (5% при жени и 8-11% при мъже), а при жени в амбулаторни условия най-висок е относителният дял на *S. saprophyticus* (1.6%) и *S. agalactiae* (2.4%).

По-новите национални данни за периода 2020-2022г., съвпадащи с периода на настоящото проучване, показват, че етиологичният спектър на ИУТ остава непроменен, с водещ уропатоген *E. coli* (69.5%) в амбулаторни условия и при двата пола, следван от *K. pneumoniae* (10.4%), *E. faecalis* (9.4%) и *P. mirabilis* (5.7%), данни много близки до установеното от нас (<http://www.bam-bg.net/>). Нашето проучване не доказва статистически значими разлики в разпределението по пол на Грам отрицателните микроорганизми, като получените резултати потвърждават тренда на националните данни. Изключение правят излатите *P. aeruginosa*, които бяха установени само при пациенти от мъжки пол, както и сравнително по-високия брой изолати *Proteus* spp. пак в мъжки пол. Що се отнася до Грам положителните бактерии, *Enterococcus* spp. са с много близък относителен дял и в двата пола. *S. saprophyticus* и *S. agalactiae* остават бактериални видове, характерни за женски пол.

## 4.2. СРАВНИТЕЛНА ОЦЕНКА НА ТОЧНОСТТА НА HB&L UROQUATTRO ЗА ЦЕЛИТЕ НА ДИАГНОСТИКАТА НА ИНФЕКЦИИТЕ НА УРИНАРНИЯ ТРАКТ.

В настоящото проучване представянето на HB&L Uroquattro инструмента за целите на бързата и точна диагностика на инфекциите на уринарния тракт, беше оценено чрез сравняване с приетия за златен стандарт в микробиологичната диагностика на тези инфекции, културелно-базиран метод.

Сред изследваните общо 1600 проби урина, събрани проспективно от 842 амбулаторни пациенти през седем-месечния период на проучването, автоматизираната система HB&L идентифицира 343 проби урина като положителни (21.4%) и съответно 1257 като отрицателни (78.6%). Чрез класическия културелен метод като отрицателни бяха определени 1248 проби (78%), а като положителни - 352 (22%).

Несъответствия бяха установени за девет проби урина (0.6%), получени от девет пациенти. Тези проби бяха интерпретирани като отрицателни при автоматичния скрининг, но показаха бактериален растеж от  $<10^3$  CFU/ml върху агаровите среди (таблица 5).

**Таблица 5.** Установени несъответствия между HB&L Uroquattro автоматизирания скрининг на 1600 проби урина и класическия културелен метод.

| Микробен вид                        | Брой<br>изолати (n) | Културелно<br>изследване | HB&L        |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|-------------|
| <i>Candida spp.</i>                 | 3                   | <103 CFU/ml              | отрицателен |
| <i>Enterococcus spp.</i>            | 2                   | <103 CFU/ml              | отрицателен |
| <i>Streptococcus<br/>agalactiae</i> | 2                   | <103 CFU/ml              | отрицателен |
| <i>Aerococcus urinae</i>            | 1                   | <103 CFU/ml              | отрицателен |
| <i>Pseudomonas<br/>aeruginosa</i>   | 1                   | <103 CFU/ml              | отрицателен |

***Чувствителност, специфичност, положителна предиктивна стойност (PPV), отрицателна предиктивна стойност (NPV) и точност (Accuracy) на HB&L Uroquattro системата***

В настоящото проучване пробите от урина, определени като положителни с инструмента HB&L и потвърдени като такива и с културелен метод, бяха дефинирани като “истински положителни”. Аналогично, като "истински отрицателни проби" бяха означени онези отрицателните проби урина с HB&L, които бяха потвърдени като отрицателни и с културелен метод. Така в хода на изследването системата HB&L Uroquattro идентифицира правилно 343 проби като положителни (97.4%) (истински положителни) и 1248 проби като отрицателни (100%) (истински отрицателни).

Настоящото проучването установи положителна предиктивна стойност (PPV) за бързия автоматичен скрининг 100%, отрицателната предиктивна стойност (NPV) - 99.3 %, а общата точност на метода е 99.4 %.

**Обсъждане:**

По литературни данни повече от 60% от пробите урина, изпратени за микробиологично изследване при съмнение за инфекция на пикочните пътища, остават стерилни (*Conkar S, 2018*). Поради това извършването на първоначален скрининг на пробите за наличие на микроорганизми с помощта на подходящи методи би съкратило времето за получаване на резултат чрез своевременно идентифициране на отрицателните проби, без да се пропускат положителните за микробен растеж урини (*Davenport M, 2017*). Не на последно място, подходът, при който се използват скринингови методи, би намалил и разходите за лабораторни консумативи (*Conkar S, 2018*).

Скринингови системи за откриване на бактериален растеж, основани на промени в оптичната плътност на пробата, се

използват от 1980г. (*Hale D, 2017*). Тези системи използват малко количество урина и лазерен детектор, за да проследят промяната в оптичната плътност на пробата за определен период от време. Подобряването на интеграцията и автоматизацията на тази технология довежда до разработване на системи, които могат да откриват бактериурия за по-малко от час (*Davenport M, 2017*). Такава система е HB&L Uroquattro апарата (Alifax, Italy). Той извършва бързо тестване на уринни проби в рамките на 3 до 5 часа, като позволява и директно култивиране на анализирания проба. Пробите от урина, които имат високо микробно число, се определят като положителни в рамките на първия час от изследването, а стерилните проби се отчитат от системата като отрицателни до четвъртия час.

Ключов елемент на всяка приемлива система за скрининг е високата чувствителност, която предотвратява пропускането на инфекции, и достатъчната специфичност, която намалява прекомерните последващи изследвания (*Elizabeth D, 2020*). Настоящото проучване установи 97.4% чувствителност и 100% специфичност, PPV и NPV от 100 % и 99.3 % за автоматичния HB&L метод за скрининг, извършен на 1600 проби урина, събрани от 842 амбулаторни пациенти със симптоми на ИУТ. Тези резултати демонстрират отличната ефективност на HB&L апарата за бързо откриване на микробен растеж и много добра корелация с резултатите, получени с класическия културелен метод.

Нашите резултати са в съответствие с други проучвания, които съобщават за подобна чувствителност, варираща между 93% и 99.8%, и специфичност - между 90% и 99.7% (*Ilki A, 2010; Montgomery S, 2017; Harris M, 2021; Lee K, 2022*). Не открихме фалшиво положителни резултати. Апаратът също демонстрира отлична ефективност при прогнозиране на отрицателните проби урина (99.3% NPV), което елиминира в много голяма степен необходимостта от допълнително микробиологично изследване

чрез културелния метод. Подобно, Hassan и Montgomery също съобщават за много висок NPV до 4-ия час - съответно 98.6 % и 98.8 % (*Brubaker L, 2017; Hassan F, 2019*). Проучването на Hassan, проведено в педиатрична популация с идентичен скринингов метод, установява 13% положителни резултати, но поставеният критерии за праг е  $\geq 10^5$  CFU/ml и продължителност от 3 часа. Общата диагностична точност, която посочват авторите е 84%, 92.1% чувствителност, 83% специфичност, а установените несъответствия са 1% (n=4) (*Hassan F, 2019*).

Подобно на нашето проучване, използвайки по-голямата версия на апарата (Alfred 60/AST), Lahanas и кол. потвърждават много добрите му възможности да открива отрицателните проби при зададен праг от 800 CFU/ml, докладвайки 97.5% NPV, което резултира в намаляване на необходимостта от последващо културелно изследване в 72%. В контраст, авторите докладват лошо представяне при идентифицирането на истински положителните проби, като PPV е 47% (*Lahanas S, 2013*). Други автори докладват сравнително ниска специфичност на HB&L (73%) на фона на чувствителност от 93% (*Ilki A, 2009*). По-ниска от установената от нас чувствителност, се съобщава от *Cermák* и сътр. (83%), при 95% специфичност, 85% PPV, 93% NPV и 90.7% точност (*Cermák P, 2009*). Микробен растеж не е доказан в около 17% от пробите, които са били с микробно число  $\leq 10^4$  CFU/ml, докато 74% от пробите с  $\geq 10^5$  CFU/ml са идентифицирани за три часа (*Cermák P, 2009*). Авторите също отбелязват, че удължаване времето на скрининга подобрява проучваните показатели (*Cermák P, 2009*).

В настоящото проучване 9 проби (0.6%) бяха определени като фалшиво отрицателни: т.е те бяха определени като отрицателни при автоматичния скрининг, но демонстрираха бактериален растеж в микробно число от  $< 10^3$  CFU/ml (*Candida spp.*, n=3; *Enterococcus spp.*, n=2; *Streptococcus agalactiae*, n=2; *Aerococcus urinae*, n=1 и *Pseudomonas aeruginosa*, n=1). Това е резултат,

който трябва да се вземе под внимание, тъй като броят на микроорганизмите, открити при ИУТ, причинени от определени бактериални видове или бавноразвиващи се микроорганизми (*Actinotignum schaalii*, *Corynebacterium urealyticum*, *Aerococcus* spp., *Ureaplasma*, *Candida* spp. и др.), както беше установено и в това проучване, често е по-нисък (100 - 100 000) в сравнение с класическите патогени на ИУТ (*Whiteside S*, 2015; *Brubaker L* 2017). Краткият работен протокол, използван от системата (3 – 4 часа), може да се окаже недостатъчен за тяхното откриване. Най-много несъответствия бяха установени за изолати *Candida* spp, за които HB&L не даде положителен резултат в края на скрининга. При стандартното културелно изследване обаче се изолира *Candida* spp. без наличие на друг вид бактерии. В скорошно проучване на Athamna, което комбинира автоматичен скрининг, извършен с Alfred 60 (по-голямата версия на HB&L) и MALDI MS, най-ниска конкордантност (84.6%) се доказва за *Candida* spp., резултати, които показват, че кандидурията трудно се идентифицира адекватно и чрез стандартния метод и чрез по - нови методи на идентификация.

В настоящото проучване беше установен един изолат *Aerococcus urinae*. В зададеното време на апаратния скрининг, пробата беше индицирана като отрицателна (фалшиво отрицателна). Това е бактериален вид, който обичайно се изолира при културелното изследване в количество < 10<sup>3</sup> CFU/ml. Истинската честота на ИУТ, причинени от *A. urinae*, вероятно е силно подценена, тъй като той често може да бъдат погрешно идентифициран като *Staphylococcus*, *Streptococcus* или *Enterococcus*. Рядък етиологичен агент на ИУТ, *A. urinae* се доказва обичайно при възрастни пациенти с множествени коморбидитети, с относителен дял от 0.15 - 0.8% (*Balouch B*, 2022). Инфекциите с *A. urinae* вероятно ще стават все по-чести поради напредъка в лабораторните технологии и застаряването на населението.

Трябва да се подчертае, че установените от нас дискордантни резултати не се отнасят до най-честите причинители на уроинфекции. Стандартните среди, върху които се култивират обичайно уринните проби, са оптимални за изолиране на микроорганизмите, които най-често причиняват ИУТ, а именно *E. coli*, *S. saprophyticus*, *K. pneumoniae* и *P. mirabilis*. Повечето скрининиращи методи се представят добре при диагностицирането на *E. coli* асоциираните ИУТ (80 - 85% от всички инфекции на пикочните пътища). Hooton и сътр. демонстрират, че PPV на конвенционалната урокултура е 93% и 99% за *E. coli* с микробно число от  $10^2$  CFU/ml и  $10^4$  CFU/ml, но при *Enterococcus* spp. е между 10% и 33% и между 8% и 14% за *Streptococcus group B* (Hooton T, 2013).

Други потенциални източници на грешки при автоматичния скрининг са катетърните проби урина, често съдържащи повече от един бактериален вид, което може да се интерпретира погрешно като контаминация. Освен това при някои специфични групи пациенти (деца под 3 години, бременни жени, пациенти след бъбречна трансплантация, урологична хирургия, катетеризация) по-ниският брой микроорганизми ( $< 10^5$ ) в пробата от урина може да бъде клинично значим и това трябва да се вземе предвид, за да се избегне погрешното интерпретиране на пробите като отрицателни по време на автоматичния скрининг (Roberts A, 2017). В настоящото проучване беше заложен cut off от  $10^3$  CFU/ml поради избраният от нас максимален период на скрининг чрез HB&L от 4 часа. Недостатък на стандартното културелно изследване е различията в микробното число, което различните организации приемат за сигнификантни и респективно клинично значими (Lee K, 2022). Съгласно препоръки на CDC, диагнозата на ИУТ, включва симптоми на уроинфекция и микробен растеж  $> 10^5$  CFU/ml. Прагът за ИУТ в катетеризирана проба е приет за  $10^3$  CFU/ml (Xu R, 2021). Въпреки, че исторически е прието микробно число от  $>10^5$

CFU/ml за сигнификантните бактериурии, все по-често се изказва съмнение, че и по-ниските стойности трябва да бъдат вземани под внимание (Werneburg G, 2023). Извън катетърните урини, прагове от  $10^3$  CFU/ml могат да не успеят да открият някои полово предавани инфекции (Tomas M, 2015). Други автори съобщават, че при 20 - 40% от жените със симптоматични инфекции на пикочните пътища микробното число е в диапазона  $10^2$  -  $10^4$  CFU/ml (Xu R, 2021), поради което се предлага праг от  $10^2$  CFU/ml за пациенти с дизурични заболявания (Desforges J, 1993; Xu R, 2021).

В друго, подобно на нашето, сравнително проучване, се доказва значително по-висок относителен дял на дискордантните резултати - 6.9% (Ilki A, 2009). С цел намаляване на тези несъответствия, се препоръчва предварителна оценка на уринните проби за наличие на левкоцити и/или микроорганизми. Авторите установяват, че само 0.6 % от общо 481 проби урина, в които не са установени предварително микроорганизми и левкоцити, показват положителен растеж (Ilki A, 2009).

Близки до нашите резултати съобщава Sharma и сътр. върху 1220 проби урина, едновременно скринирани с HB&L и изследвани чрез културелния метод, при които се установяват 2.1% проби с несъответствие, които автоматизираната система отчита като фалшиво негативни. Според същите автори, при  $10^2$  -  $10^3$  CFU/ml, HB&L има висока NPV (96.6%) и чувствителност от 92.7% (Sharma B, 2023).

Настоящото проучване, използвайки културелния метод като златен стандарт в микробиологичното изследване, за да оцени автоматизираната скринингова система, доказва 22% относителен дял на положителни урокултури от общо 1600 проби урина, събрани проспективно от 842 амбулаторни пациенти. Според различни проучвания този процент варира в относително широки граници. Например изследване на Werneburg и сътр. съобщава за 41% относителният дял на положителните урини при

културелното изследване. (Werneburg G, 2023). В аналогично проучване от спешен център в Швейцария се установяват близки стойности (40.2%) (Müller M, 2018). Значително по-нисък процент положителни уринни проби (24.6%) се съобщават от Ourani в проспективно проучване в болнични условия. Авторите провеждат културелното изследване само след положителен скрининг метод, при който урини без допълнителни данни за уроинфекция като левкоцити, нитрити не са тествани. Изключение са пробите на деца под 1 година, бременни жени и пациенти след урологични хирургични процедури (Ourani M, 2020). В този смисъл, трябва да се отбележи, че разликите в относителния дял на положителните урини е силно зависима от демографските характеристики на пациентите, използвания метод за диагностика, както и мястото на провеждане на изследването (болнични или амбулаторни условия). В млада възраст и в женския пол културелното изследване има по-малка клинична стойност, поради неудобствата, свързани с времето и разходите за изследването, докато при пациенти в болнични условия с усложнени инфекции на пикочните пътища (рефрактерни на първоначално лечение, пиелонефрит, асимптоматична бактериурия при бременност, атипични микроорганизми и др.), културелното изследване на урина е задължително (Xu R, 2021). За съжаление, недостатък на този класически метод е времето за получаване на микробиологичния резултат, което е минимално между 24 и 48 часа. Това води до забавяне на етиологично ориентирано лечение, което създава възможност за развитие на нежелани усложнения (Xu R, 2021).

#### **4.3. ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА, ОПРЕДЕЛЕНА ЧРЕЗ ДИСКОВО - ДИФУЗИОННИЯ МЕТОД НА KIRBY-BAUER, ИЗВЪРШЕН С БАКТЕРИАЛНИ ИЗОЛАТИ В ЧИСТА КУЛТУРА.**

Чувствителността към набор от антимикробни лекарствени средства на 282 Грам -отрицателни и 67 Грам - положителни бактериални изолата е проучена чрез дисково – дифузионния метод на Kirby-Bauer, а чувствителността към vancomycin в изолатите *S. saprophyticus* е определена чрез автоматизираната система VITEK 2.

##### **Грам отрицателни бактерии**

Чувствителността към набор от антимикробни лекарствени средства на 278 изолата, представители на бактериални видове от разред *Enterobacterales* е представена на таблица 6.

Установената резистентност в тази група в низходящ ред е както следва: ampicillin, 66.9% > ciprofloxacin, 38.5% > levofloxacin, 35.6% > trimethoprim/sulfamethoxazole, 35.2 > amoxicillin/clavulanic acid, 33.4% > cefuroxime, 29.1% > ceftriaxone, 15.8% > ceftazidime, 15.1% > fosfomycin, 11.0% > nitrofurantoin, 8.0% > gentamicin, 6.5% > nitroxoline, 2.0%.

Детайлизираната структура на резистентността към проучените антибиотици във всички изолати, представители на разред *Enterobacterales* по бактериални видове е представена на таблица 7.

Относителният дял на ESBLs продуцентите сред изолатите от бактериалните видове, отнасящи се към разред *Enterobacterales* е представена на таблица 8.

**Таблица 6.** Антибиотична чувствителност на изолати от разред *Enterobacterales* (n=278), асоциирани с инфекции на уринарния тракт, определена чрез дисково - дифузионния метод на Kirby-Bauer.

| Антибиотик                     | Общ брой тествани изолати n (%) | Чувствителност n (%) | Резистентност (R+I) n (%) |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------|
| ampicillin                     | 278 (100.0)                     | 92 (33.1)            | 186 (66.9)                |
| amoxicillin/clavulanic acid    | 278 (100.0)                     | 185 (66.6)           | 93 (33.4)                 |
| cefuroxime                     | 278 (100.0)                     | 197 (70.9)           | 81 (29.1)                 |
| ceftriaxone                    | 278 (100.0)                     | 234 (84.2)           | 44 (15.8)                 |
| ceftazidime                    | 278 (100.0)                     | 236 (84.9)           | 42 (15.1)                 |
| meropenem                      | 278 (100.0)                     | 278 (100.0)          | 0 (0.0)                   |
| ciprofloxacin                  | 278 (100.0)                     | 171 (61.5)           | 107 (38.5)                |
| levofloxacin                   | 278 (100.0)                     | 179 (64.4)           | 99 (35.6)                 |
| trimethoprim/sulphamethoxazole | 278 (100.0)                     | 180 (64.8)           | 98 (35.2)                 |
| gentamicin                     | 278 (100.0)                     | 260 (93.5)           | 18 (6.5)                  |
| amikacin                       | 278 (100.0)                     | 278 (100.0)          | 0 (0.0)                   |
| fosfomycin*                    | 200 (100.0)                     | 178 (89.0)           | 22 (11.0)                 |
| nitroxoline*                   | 200 (100.0)                     | 196 (98.0)           | 4 (2.0)                   |
| nitrofurantoin*                | 200 (100.0)                     | 184 (92.0)           | 16 (8.0)                  |

\* Чувствителността към fosfomycin, nitroxoline и nitrofurantoin е определена само за изолатите *E. coli*.

При изолатите *P. aeruginosa* (n=4), освен характерната за този бактериален вид вродена резистентност към ampicillin, amoxicillin/clavulanate, cefuroxime, се доказва интермедиерна чувствителност към ciprofloxacin и levofloxacin (чувствителност при повишена експозиция) - 100%, 50% резистентност към ceftazidime и напълно съхранена чувствителност към meropenem и amikacin.

**Таблица 7.** Детайлизираната структура на резистентността към проучените антибиотици във всички Грам отрицателни бактерии, представена по бактериални видове.

| Бактериален вид (n)           | AM (%) | AMC (%) | CXM (%) | CAZ (%) | CRO (%) | MEM (%) | G (%) | AK (%) | CIP (%) | LEV (%) | TSM (%) | FF (%) | F (%) | NIT (%) |
|-------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|--------|---------|---------|---------|--------|-------|---------|
| Грам отрицателни бактерии     |        |         |         |         |         |         |       |        |         |         |         |        |       |         |
| <i>E. coli</i> (200)          | 56.5   | 18.5    | 19.5    | 6.5     | 7.5     | 0.0     | 2.5   | 0.0    | 32.5    | 30.5    | 21.0    | 11.0   | 8.0   | 2.0     |
| <i>K. pneumoniae</i> (40)     | 100.0  | 77.5    | 52.5    | 52.5    | 52.5    | 0.0     | 15.0  | 0.0    | 42.5    | 42.5    | 80.0    | NA     | NA    | NA      |
| <i>P. mirabilis</i> (26)      | 65.4   | 50.0    | 34.6    | 19.2    | 19.2    | 0.0     | 40.0  | 0.0    | 30.7    | 23.0    | 57.7    | NA     | NA    | NA      |
| <i>Citrobacter</i> spp. (5)   | 100.0  | 100.0   | 100.0   | 20.0    | 20.0    | 0.0     | 20.0  | 0.0    | 40.0    | 40.0    | 60.0    | NA     | NA    | NA      |
| <i>E. cloacae</i> complex (5) | 100    | 100.0   | 100.0   | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 80.0  | 0.0    | 60.0    | 60.0    | 80.0    | NA     | NA    | NA      |
| <i>P. aeruginosa</i> (4)      | NA     | NA      | NA      | 50.0    | NA      | 0.0     | NA    | 0.0    | 0.0     | 0.0     | NA      | NA     | NA    | NA      |
| <i>M. organii</i> (1)         | 100    | 100     | 100     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0   | 0.0    | 100     | 100     | 100     | NA     | NA    | NA      |
| <i>S. marcescens</i> (1)      | 100    | 100     | 100     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0   | 0.0    | 0.0     | 0.0     | 100     | NA     | NA    | NA      |

**Съкращения:** A, ampicillin; AMC, amoxicillin-clavulanate; CXM, cefuroxime; CAZ, ceftazidime; CRO, ceftriaxone; MEM, meropenem; G, gentamicin; CIP, ciprofloxacin; AK, amikacin; LEV, levofloxacin; TSM, trimethoprim/sulfamethoxazole; FF, fosfomycin, F, nitrofurantoin; NIT, nitroxoline; NA, неприложимо.

**Таблица 8.** Относителен дял на ESBLs продуценти сред изолати от разред *Enterobacterales* (n=278), асоциирани с инфекции на уринарния тракт, доказани чрез DDST тест..

| Бактериален вид (n)         | ESBL продуценти (%) |
|-----------------------------|---------------------|
| <i>E. coli</i> (200)        | 6.5                 |
| <i>K. pneumoniae</i> (40)   | 52.5                |
| <i>P. mirabilis</i> (26)    | 19.2                |
| <i>Citrobacter</i> spp. (5) | 20.0                |

## Грам положителни бактерии

Чувствителността към набор от антимикробни лекарствени средства на 62 изолата, представители на бактериални видове *E. faecalis* (n=42) и *S. saprophyticus* (n=20) е представена на таблица 9. и таблица 10.

Установената резистентност на изолатите *E. faecalis* в намаляващ ред е както следва: gentamicin (GHLAR), 19% > ciprofloxacin, 19% > levofloxacin, 16.7% > nitrofurantoin, 7.1%. Не се доказаха изолати резистентни към гликопептиди (vancomycin, teicoplanin) и ampicillin.

Установената резистентност сред изолатите *S. saprophyticus*, представена в низходящ ред, е както следва: gentamicin, 25% > ciprofloxacin, levofloxacin, nitrofurantoin, trimethoprim/sulfamethoxazole, 10% > cefoxitin, 5%. Не се доказаха изолати резистентни към гликопептиди (vancomycin, teicoplanin).

Напълно запазена чувствителност към изпитаните антимикробни средства (penicillin, levofloxacin, clindamycin, nitrofurantoin, trimethoprim/sulfamethoxazole, vancomycin, teicoplanin) демонстрират изолатите *Streptococcus agalactiae* (n=2).

Единственият изолат *Aerococcus urinae* беше с напълно съхранена чувствителност към всички тествани антибиотици: ciprofloxacin, levofloxacin, ampicillin, meropenem, nitrofurantoin, vancomycin.

**Таблица 9.** Антибиотична чувствителност на изолати *E. faecalis* (n=42), асоциирани с инфекции на уринарния тракт, определена чрез дисково - дифузионния метод на Kirby-Bauer.

| Антибиотик     | Чувствителност<br>n (%) | Резистентност<br>(R+I)<br>n (%) |
|----------------|-------------------------|---------------------------------|
| ampicillin     | 42 (100.0)              | 0 (0.0)                         |
| G-HLAR         | 34 (81.0)               | 8 (19.0)                        |
| ciprofloxacin  | 34 (81.0)               | 8 (19.0)                        |
| levofloxacin   | 35 (83.3)               | 7 (16.7)                        |
| vancomycin     | 42 (100.0)              | 0 (0.0)                         |
| teicoplanin    | 42 (100.0)              | 0 (0.0)                         |
| nitrofurantoin | 39 (92.9)               | 3 (7.1)                         |

**Таблица 10.** Антибиотична чувствителност на изолати *S. saprophyticus* (n=20), асоциирани с инфекции на уринарния тракт, определена чрез дисково - дифузионния метод на Kirby-Bauer.

| Антибиотик                     | Чувствителност<br>n (%) | Резистентност<br>(R+I)<br>n (%) |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| cefoxitin                      | 19 (95.0)               | 1 (5.0)                         |
| ciprofloxacin                  | 18 (90.0)               | 2 (10.0)                        |
| levofloxacin                   | 18 (90.0)               | 2 (10.0)                        |
| gentamicin                     | 15 (75.0)               | 5 (25.0)                        |
| trimethoprim/sulphamethoxazole | 18 (90.0)               | 2 (10.0)                        |
| vancomycin                     | 20 (100.0)              | 0 (0.0)                         |
| nitrofurantoin                 | 18 (90.0)               | 2 (10.0)                        |

## Обсъждане

### Грам отрицателни бактерии

Сред най-проблемната и мониторирана резистентност в представителите на разред *Enterobacterales*, е резистентността към бета-лактамни антибиотици. Настоящото проучване установява

значително намалена активността на аминопеницилините (ampicillin) срещу Грам-отрицателните бактерии, вкл. изолати на *E. coli*, като резистентността достига 66.9%. В сравнение с ampicillin, активността на amoxicillin/clavulanic acid е относително съхранена, но относителният дял на резистентните Грам отрицателни изолати надхвърля 20% (33.4%). Националните данни показват сходни резултати. Според BulStar за периода 2018-2021г. изолатите *E.coli* демонстрират 26 - 27.1% резистентност към amoxicillin/clavulanic acid, а при вторите по честота като етиологични агенти на ИУТ, *K. pneumoniae*, нивата са трайно над > 40% за същия период от време (*Surveillance of antimicrobial resistance in Bulgaria--a synopsis from BulSTAR 2018. Available at: [https:// bam-bg.net/](https://bam-bg.net/)*). При бременни жени, ampicillin и amoxicillin трябва да се избягват като начална терапия поради съществуващата относително висока резистентност на *E. coli* към тези антимикробни лекарствени средства (Habak P, 2024). В различните региони на света, резистентността към amoxicillin/clavulanic acid варира значително, като зависи от популацията на изследваните пациенти и от характера на самата уроинфекция (усложнени или неусложнени) (Kot B, 2019). Подобни на нашите резултати докладва Martínez-Casanova (17.8%) в Испания и Gaspari в педиатрично отделение (27.5%) в САЩ (Gaspari R, 2005; Martínez-Casanova J, 2021). Проучване върху чувствителността на изолати уропатогенни *E. coli* в САЩ през 2017 г., показва 77.9% чувствителност към amoxicillin/clavulanic acid (Critchley I, 2017). Като цяло може да се каже, че повечето публикувани проучвания сочат, че изолатите от последните години, отнасящи се към разред *Enterobacteriales* и причиняващи ИУТ, демонстрират намалена чувствителност към препарата. В Европа за периода 2018 - 2019г. чувствителни са 74% от проучените изолатите *E.coli*, свързани с уроинфекции и само 42% от *K. pneumoniae* (Veeraraghavan B, 2020). Автори от съседни на България държави потвърждават покачващите се нива на резистентност към групата на аминопеницилините: Румъния между 14 и 29.0%, Турция - 24.3%, Босна и Херцеговина - 19.6%, както и автори от географски по-отдалечени страни: Мексико - 23.6%, Йордания - 83% (Kot B, 2019; Petca R, 2020; Şencan İ, 2023).

Въпреки покачващата се резистентност, употребата на amoxicillin/clavulanic acid при възрастни е възможна в случаите на неусложнен пиелонефрит, терапия в случаите на неусложнен цистит при бременност или като периперативна профилактика при урологични интервенции (Kot B, 2019; Kranz J, 2024). В детска възраст, поради добрият им профил на безопасност, аминопеницилините остават средство на избор за лечение и профилактика на инфекциите на пикочните пътища, включително и при новородени (Buettcher M, 2021).

В контекста на бета-лактамна група антибиотици, особено важна е резистентността към цефалоспорините (специално широкоспектрните) и карбапенемните антибиотици. Оновният механизъм на тази резистентност се асоциира с продукцията на различни ензими: TEM, SHV и CTX-M широкоспектрни  $\beta$ -лактамази; плазмидно-кодирани AmpC  $\beta$ -лактамази (CMY, ACC, DHA) и карбапенемази от различни класове (KPC, VIM, IMP, OXA-48, др.) (Bush K, 2020; De Oliveira D, 2020; Markovska R, 2021). Цефалоспориновата група антибиотици с техния широк спектър на действие са сред предпочитаните и често използвани антимикробни средства за лечение на инфекции на пикочните пътища, както придобити в обществото, така и вътреболнични. В настоящото проучване установихме относително висок дял на резистентни към цефалоспорини от втора генерация (cefuroxime) изолати *E. coli* (> 20%). Мархова и сътр. съобщават за подобни нива на резистентност към cefuroxime (25%) в изолати *E. coli* от урина, получени от пациенти с ИУТ в Пловдивска област (Marhova M, 2009). Голямо полско проучване съобщава за 10% резистентност към cefuroxime в *E. coli*, свързани с не-усложнени инфекции на пикочните пътища, и 18% при такива, асоцииращи се с усложнени инфекции (Stefaniuk E, 2016). Скорошно проучване от Румъния доказва 12.6% резистентност към този антимикробен препарат в уринни изолати *E. coli* (Duicu C, 2021). Авторы от други съседни на България, държави съобщават за над 35% резистентност през 2018 г. (Gul A, 2020). Резистентността към cefuroxime според данни на Kot и сътр. за Белгия, Германия и Испания е 5.5%, 12.8 % и 16.6 % съответно (Kot B, 2019).

В световен мащаб цефалоспорините от трета генерация са една от водещите антибиотични групи (наред с флуорохинолоните, карбапенемите и други бета-лактами), асоцииращи се с повишена смъртност директно дължаща се на антибиотична резистентност към тях (Li X, 2022). Това са стратегически антимикробни лекарствени средства с широк спектър на действие, чиято употреба трябва да бъде ограничена само до усложнени инфекции на пикочните пътища или инфекции на пикочните пътища в болнични условия. Положителен резултат от настоящото проучване е ниският относителен дял на резистентни към цефалоспорины от трета генерация изолати, представителите на разред *Enterobacterales* (15.1%) и специално *E. coli* (6.5%), резултат, който отразява дела на продуцентите на ESBLs сред Грам отрицателните бактерии, потвърден чрез DDST при всички изолати от проучването. Делът на уринните изолати *E. coli* и *K. pneumoniae* от различни проучвания и държави, идентифицирани като ESBLs продуценти, варира значително: 4.2% във Франция (Raphael E, 2021), 10% в САЩ (Gharavi M, 2021) и 35.7% в Иран (Mendelson G, 2004). В допълнение, смята се, че инфекциите на уринарния тракт са отговорни за повече от 50% за всички бактериемични *E. coli* епизоди (Bonten M, 2020). Европейският център по контрол на заболяванията докладва положителната тенденция в EU във времевия интервал между 2016г. и 2021г. за статистически значимо намаляване дела на кръвните изолати *E. coli*, резистентни към цефалоспорины 3-та генерация, като през 2020г. и 2021г. средния дял достига 14.9% и 13.8% (ECDC, 2017a; ECDC, 2022). През 2021г. в Европейския съюз е най-голям делът на страните с резистентност под 10%, но за съжаление в България се доказват най-високите нива сред всички 28 мониториращи държави (37.3%). Проучване на Ерменлиева и кол. при уроинфекции в детска възраст във Варненски регион установява 6 % продуценти на ESBLs в извънболнични условия (Ermenlieva NM, 2016). Тези резултати корелират с установения от нас нисък относителен дял на изолати *E. coli* от урина, резистентни към цефалоспорины 3-та генерация (6.5%).

Понастоящем карбапенемите (meropenem, imipenem) се считат за антибиотици на първи избор за лечение на инфекции, причинени от ESBL-продуциращи Грам отрицателни бактерии (Rupp M, 2003). При

нашите изолати не бяха идентифицирани карбапенем-резистентни *Enterobacterales*. Този резултат би могъл да се обясни с факта, че изследваната групата пациенти в това проучване, са амбулаторни и с придобити в обществото инфекции на уринарния тракт.

Подобно на цефалоспорините, флуорохинолоните са антимикробни лекарствени средства с широк спектър на действие, използвани много продължително като предпочитана емпирична терапия на уроинфекции. С цел избягване индуцирането на бактериална резистентност, по настоящем тези препарати вече не са средство от първа линия за лечение на неусложнен цистит (Chao Y, 2019). Според препоръките на Европейската асоциация по урология, флуорохинолоните не бива да бъдат предписвани в случаите на неусложнени уроинфекции, дори и да се доказва добра чувствителност на патогени в даден регион (Kranz J, 2024). Според същата организация обаче, значението на флуорохинолоните се запазва, тъй като те са перорална алтернатива при неусложнен пиелонефрит, както и в случаи на *Pseudomonas aeruginosa* асоциирани инфекции (Kranz J, 2024). Подобно, според препоръките на Германската асоциация по нефрология, флуорохинолоните също не се препоръчват за лечение на остър неусложнен цистит при иначе здрави жени в предменопауза, освен ако липсва друга алтернатива (Chao Y, 2019).

Според ръководства за лечение на уроинфекции, публикувани от NICE (National Institute for Health and Care Excellence), при катетър-асоциираните инфекции, флуорохинолоните не са препарати на избор за начална терапия, с изключение на ciprofloxacin за i.v. приложение, както и в случаите на рецидивирани инфекции (NICE guideline, 2018). На различно мнение са авторите на канадското ръководство по акушерство и гинекология SOGC (*The Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada*), в което хинолоните все още се препоръчват като един от антибиотиците за ежедневна профилактика при жени с две повтарящи се УИТ в рамките на шест месеца или три в рамките на 12 месеца (Epp A, 2017; Chao Y, 2019).

В нашите резултати бяха установени високи нива на резистентност към флуорохинолони при основния уропатоген *E. coli* (над 25 %). Този резултат е в съответствие с националните резултати, докладвани от BULSTAR за уринни изолати в периода 2015-2021г., които показват

тренд към нарастване от 16.5% през 2015г. до 20.7 % през следващите години (21.4%, 2019; 20.7%, 2020; 19.8%, 2021) (*Surveillance of antimicrobial resistance in Bulgaria--a synopsis from BulSTAR 2018. Available at: <https://bam-bg.net/>*). В много части на света се установяват различни нива на резистентност към флуорохинолони в изолати *E. coli*, асоциирани с различни според клиничния си ход уроинфекции: над 20 % при неусложнени и придобити в обществото инфекции и над 50 % в случаи на усложнени инфекции на пикочните пътища (Kot B, 2019). Проучване от 2019г. докладва в Европа резистентност от 22% в уропатогенни *E. coli*, докато тази сред хоспитализирани пациенти в САЩ е около 31% (Asadi K, 2019). Проучване на Goebel и кол. върху резистентността на *E. coli* към ciprofloxacin в период от 10 години (2003 – 2012 г.) съобщава за увеличение от 3.6% през 2003 г. до 11.8 % през 2012 г. сред цялата популация изследвани пациенти, докато в групата на пациентите над 65 г. нарастване на резистентността е още по-изразена: от 11.8 % до 29.1 % (Goebel M, 2021). Много обширен обзор, отнасящ се до страните от Европейския съюз, също докладва нарастваща резистентност към ciprofloxacin в уропатогенни *E. coli* в периода 2006 - 2016г.: за Обединеното кралство - от 0.5 % до 15.3%, Германия – от 8.7 % до 15.1 % и за Испания - от 22.9 % до 30.8 % (Kot B, 2019). Проучване, проведено в Румъния, установява също редуцирани нива на чувствителност в изолати *E.coli* и *K. pneumoniae* към levofloxacin, с резистентност достигаща 29.6% и съответно 15.6% (Petca R, 2020). Нива на флуорохинолонова резистентност в *E. coli* над 15% се съобщават също за Турция при проследяване на пациенти от спешни отделения и общопрактикуващи лекари (20.4%) (Şencan İ, 2023). Трябва да се отбележи, че в научната литература се съобщават значително по-високи нива на резистентност към флуорохинолони за всички патогени в случаите на нозокомиални инфекции за Европа: 41.9% при цистит; 44.3% - при пиелонефрит, 58.4% при уросепсис, като средно делът на флуорохинолон-резистентните уропатогени е 47.1% (Wagenlehner F, 2020). Сходен тренд за увеличаване на резистентността към ciprofloxacin, се докладва и в Азия. Например за 2008-2014г. тази резистентност нараства от 25% на над 40% (Li X, 2022). Проучване на Prasada и сътр., обхващащо 5 годишен период в Индия демонстрира много високо ниво (над 60%) на

флуорохинолонова резистентност при уропатогенни *E. coli* (Prasada S, 2019). Подобно, в Северна Америка, макар и не толкова значително, резистентността достига от 4% през 2008 г. до 12% през 2017 г. (Kot B, 2019).

В световен мащаб, в почти всички 21 региона на GBD (Global Burden of Diseases), флуорохинолоните, карбапенемите и цефалоспорините от трето поколение са трите водещи антибиотични групи, свързани с най-висока антибиотична резистентност (Li X, 2022, Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). В много страни, емпиричната употреба на хинолони, като първи избор за лечение на инфекции на пикочните пътища, е често срещана, поради което не е изненадващо, че през последните две десетилетия успоредно с прекомерната употреба на хинолони се открива и постоянно нарастваща резистентност към тях (Şencan İ, 2023).

Комбинираният антимикробен препарат trimethoprim/sulphamethoxazole е един от препоръчваните с години препарати на първа линия в случаите на неусложнени инфекции на пикочните пътища, както и за профилактика в хода на хронични инфекции. Необходимо е да се отбележи, че trimethoprim/sulphamethoxazole остава избор за първоначална терапия и при двата пола, но само, когато данните за локалната резистентност на *E. coli* към този агент не надвишава 20 % (Colgan R, 2011). В малката възраст препаратът може да се използва при деца над 30 дни, като перорална терапия на цистит, както и за профилактика (Buettcher M, 2021). Наблюдават се значителни географски и възрастови различия в нивата на резистентност към препарата, като по-висока се отчита при пациенти от мъжки пол, при деца и възрастни над 65г. (Marchand-Austin A, 2022). Проучванията върху активността на trimethoprim/sulphamethoxazole към *E.coli* в различни европейски страни (Белгия, Германия, Полша, Швейцария, Франция, Испания, Босна и Херцеговина и Румъния) показват резистентност между 14.6 % и 60 % (Kot B, 2019). Многоцентрово проучване в САЩ, обхващащо 12 спешни центъра съобщава за резистентност към микробния агент от 25.1% ( Wesolek J, 2022). В периода 2003 г. - 2012 г. нивата на резистентност в *E. coli* към този антибиотик в някои щати се увеличават от 17% до 22.2 % във възрастта 18 - 64 години и от 18.5 %

до 26.7 % в групата на пациентите над 65 г. (Goebel M, 2021). Prasada и кол. съобщават също за тренд на увеличение сред изолати *E. coli* в Индия в периода 2013 - 2017г., но в значително по-високия диапазон – 52% - 59.6% (Prasada, 2019). В настоящото проучване установихме високо ниво (над 20%) на резистентност към trimethoprim/sulphamethoxazole (36%) в групата изолати от водещия бактериален вид *E. coli*, резултат, който е индикация, че препаратът не е подходящ като избор за емпирична терапия на придобитите в обществото инфекции на уринарния тракт в нашия регион. Малко по-ниски, но също над 20% са националните данни (28%) за същия период 2018-2021г. (*Surveillance of antimicrobial resistance in Bulgaria--a synopsis from BulSTAR 2018. Available at: [https:// bam-bg.net/](https://bam-bg.net/)*).

Аминогликозидите gentamicin и amikacin са сред антимикробните лекарствени средства на избор за парентерална и комбинирана терапия в случаите на по-тежки или усложнени инфекции на пикочните пътища или инфекции с ограничени алтернативи за терапия (Barlam T, 2016). Синергистичният ефект между аминогликозидите и  $\beta$ -лактамите е добре документиран. Положителен резултат от това проучване е ниското ниво на резистентност към gentamicin в изследваната колекция изолати (6.5%) и напълно запазената активност на amikacin. В мултицентрово болнично проучване след пациенти от женски пол в Румъния се съобщава за по-ниска от нашите резултати чувствителност към амикацин при *E. coli* (96.0%) и *K. pneumoniae* (88.5%) (Petca R, 2020). Друг авторски колектив от Румъния проучващ изолати от урина, но в педиатрична популация, установява значително по-високи нива на резистентност към gentamicin съответно за *E.coli* (90.3%), *K. pneumoniae* (64.7%) и *P. mirabilis* (92.3%) (Miron V, 2021). Повечето изследователи съобщават сравнително запазена чувствителност към аминогликозиди при *Enterobacterales*, както в болнични, така и в случаите на придобити в обществото инфекции: в Канада при болнични изолати - 73.6% чувствителност и 85.1% - при извънболнични (Marchand-Austin A, 2022); в Турция, Şencan докладва също ниска резистентност към gentamicin в *E.coli* (10.4%) и *K.pneumoniae* (13.2%) в проучване обхващащо амбулаторни случаи на уроинфекции (Şencan İ, 2023). Сравнителни данни от различни проучвания, представени от Kot и колектив за държави извън

Европейски съюз, представят доста по-висока резистентност към gentamicin и amikacin сред амбулаторни пациенти: Пакистан, съответно 29% и 4%, Мексико 28.2 % и 10 % (Kot B, 2019).

В хода на настоящото проучване беше изпитана активността и на препарати като nitrofurantoin, nitroxoline и fosfomycin срещу изолатите *E. coli*.

По литературни данни nitrofurantoin е активен срещу най-често доказваните причинители на инфекции на пикочните пътища, главно *E. coli*, и в по-малка степен *Citrobacter* и *Enterococcus*. *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp. са по-слабо чувствителни. Бактериалните видове, представителни на родове като *Serratia*, *Acinetobacter*, *Morganella*, *Proteus* и *Pseudomonas* са резистентни (Gardiner B, 2019). Трябва да се отбележи, че по настоящем, използвания в България, Европейски стандарт за определяне на чувствителност към антимикробни лекарствени средства (EUCAST) не задава гранични стойности при изпитването на nitrofurantoin, с изключение за изолати *E. coli* ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints)). Поради ниските нива на резистентност и добрия си профил на безопасност, nitrofurantoin е предпочитана алтернатива при пациенти в детска възраст, както и при бременни жени (Habak P, 2024). Европейската асоциация по урология го препоръчва като медикамент на избор при *E. coli*, асоциирана с неусложнен цистит при жени (Kranz J, 2024).

При тестваните изолати се установи запазена активност и респективно ниски нива на резистентност към препарата в групата на *E. coli* (6.5%). Националните данни, рапортувани от BulStar за четири годишния период 2019-2021г. за изолати *E. coli*, получени от болнични и амбулаторни пациенти, са много сходни с получените от нас - 3.9%; 5.1%; 4.9% и 5.7% съответно (*Surveillance of antimicrobial resistance in Bulgaria--a synopsis from BulSTAR 2018. Available at: [https:// bam-bg.net/](https://bam-bg.net/)*). В редица европейските и съседни на България страни (Румъния, Полша, Франция, Турция), дялът на резистентните към nitrofurantoin *E. coli*, изолирани от амбулаторни и хоспитализирани пациенти, е нисък, като варира от 3 % до 3.8 %, 4.9% (Kot B, 2019; Petca R, 2020; Şencan İ, 2023). Проучвания, проведени в Австралия и САЩ сред амбулаторни пациенти, докладват резистентност между 1 и 2% (Gardiner B, 2019; Squadrito F, 2024). В контраст на тези данни, Gautam

и кол. установяват висок относителен дял на nitrofurantoin-резистентни Грам отрицателни бактерии (20.1%) в Индия, като съобщават за 44.6% резистентност сред *Klebsiella spp.* Изолати, но 8.1% за *E. coli* (Gautam G, 2021). Мета-анализ върху резистентността към различни антимикробни лекарствени средства, използвани за лечение на инфекции на уринарния тракт, включващ и проучвания от Европа и Южна Америка, установява, че и двата най-разпространени уропатогени *E. coli* и *Klebsiella sp.* са с много добра чувствителност спрямо nitrofurantoin (Emami A, 2020; Corrales M, 2022). Настоящите данни потвърждават, че nitrofurantoin е адекватен избор за първоначална, емпирична терапия на неусложнени, придобити в обществото инфекции на пикочните пътища или в случаите с ограничени терапевтични алтернативи, обикновено свързани с мултирезистентни изолати.

Fosfomycin е „стар“ антибиотик, който продължава да се препоръчва като първи избор за лечение на неусложнена инфекция на пикочните пътища при жени в много страни. Най-активен е срещу *E. coli*, а към други уропатогени като *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* и *Enterococcus* се съобщават данни за различни нива на чувствителност. *Morganella morganii* и *Acinetobacter spp.* обикновено са резистентни към препарата (Sorlozano-Puerto A, 2020). Fosfomycin остава активен, включително и към изолати, които продуцират  $\beta$ -лактамази с разширен спектър и метало- $\beta$ -лактамази (Kot B, 2019). Ретроспективно кохортно проучване показва, че резултатите от лечението с fosfomycin не са по-лоши в сравнение с интравенозното приложение на cefepime в случаи на амбулаторни УИТ, причинени от ESBL-продуценти (Goebel M, 2021). В сравнение с nitrofurantoin и nitroxoline, дялът на fosfomycin-резистентните изолати *E. coli* в нашето проучване е по-висок (11%) от други български центрове (3.2 - 5%) (*Surveillance of antimicrobial resistance in Bulgaria-- a synopsis from BulSTAR 2018-2021. Available at: [https:// bam-bg.net/](https://bam-bg.net/)*). Автори от Франция установяват дял на fosfomycin-резистентните *E. coli* и *K. pneumoniae* съответно 2.8% и 86.5% (Farfour E, 2020). В изследване, подобно на настоящото, обхващащо изолати *E. coli* от урини на нехоспитализирани жени от 20 европейски центъра (Белгия, Обединеното кралство, Италия, Испания, Русия, др.) се доказва, че най-

активни (в >90%) са nitrofurantoin (98.5 %) и fosfomycin (96.4 %). Тези два препарата остават активни и срещу над 90% от резистентните към цефалоспорици *E. coli* (Tutone M, 2022). Дори след десетилетия употреба на fosfomycin в европейските клиници, скорошни клинични изследвания показват, че изолати *E. coli* от урина запазват ниски нива на резистентност към препарата (3.6%) (Bermudez T, 2023). Въпреки, че употребата на fosfomycin в САЩ остава ниска в сравнение с тези на trimethoprim/sulphamethoxazole, ciprofloxacin или nitrofurantoin, смята се, че тя ще нараства през следващото десетилетие (Bermudez T, 2023). Като се вземат под внимание нивата на резистентност към trimethoprim/sulphamethoxazole в нашия регион (>30%), fosfomycin се очертава като добра алтернатива за перорална терапия на инфекции на уринарния тракт при амбулаторни пациенти, вкл. и в клинични случаи с ограничени възможности за лечение поради множествена резистентност.

Nitroxoline е антимикробно лекарствено средство с широк спектър на действие срещу различни Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии, както и гъбички (Cherdtrakulkiat R, 2019). Скорошни проучвания, доказват, че nitroxoline и негови деривати демонстрират много висока активност срещу всички представители на *Enterobacteriaceae*, включително карбапенемаза-продуциращи бактерии, по-специално *E. coli* и *Klebsiella* spp., изолирани от различни клинични материали (Cherdtrakulkiat R, 2019; Fuchs F, 2021). Различни автори докладват широкоспектрната активност на препарата срещу микробни видове като *A. baumannii*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* (Dobrindt U, 2022). В допълнение, nitroxoline има способност да потиска продукцията на биофилм, като е по-активен срещу биофилм-продуциращи *A. baumannii* и *E. coli*, отколкото срещу биофилма, образуван от други бактериални видове като например *P. aeruginosa* (Dobrindt U, 2022; Wykowski R, 2022). По настоящем препаратът не е сред медикаментите на първи избор за терапия на неусложнени инфекции на пикочните пътища, но е сред алтернативите в случаите на усложнени, хронични инфекции, както и за дълготрайна профилактика на рецидивирани инфекции на пикочните пътища, асоциирани с биофилм продукция (Wagenlehner F, 2017). Във Варненски регион nitroxoline се използва в амбулаторната практика

най-вече при *E.coli* инфекции като препарат за комбинирано лечение и step down терапия. В настоящото проучване установихме много нисък относителен дял на nitroxoline-резистентни *E. coli* (2%). Тези резултати подкрепят употребата на препарата като важно терапевтично средство при пациенти с назначено по-продължително лечение. По данни на BulStar, в национален мащаб в периода 2018 – 2021 г. също се установяват нисък относителен дял на nitroxoline-резистентни *E. coli* (< 10%) (6.0%; 9.2%; 6.5%; 9.2%) (*Surveillance of antimicrobial resistance in Bulgaria--a synopsis from BulSTAR 2018-2021. Available at: [https:// bam-bg.net/](https://bam-bg.net/)*). В актуализирано немско интердисциплинарно ръководство, nitroxoline се препоръчва при не-тежки случаи на неусложнена инфекция на пикочните пътища при възрастни пациенти, като авторите съобщават за чувствителност от над 90% сред тестваните Грам-отрицателни, Грам-положителни изолати и дрожди (Sobke A, 2018). Подобно, Dobrindt и сътр. докладват за резистентността от 0.5% към nitroxoline в изолати *E. coli*, включително MDR *E. coli*, както и за 5% резистентност в *K. pneumoniae* и 32% сред MDR изолати *K. pneumoniae* (Dobrindt U, 2022).

### Грам положителни бактерии

В последната декада представителите на *Enterococcus* spp. се сред водещите причинители на инфекции (вкл. свързани с медицинското обслужване) - от инфекции на уринарния тракт до животозастрашаващи инфекциозни ендокардити (Codelia-Anjum A, 2023). Сред най-важните фактори на вирулентност на тези микроорганизми са способността им да продуцират биофилм, благоприятстващ колонизацията (вкл. полимикробна), както и тяхната антибиотичната резистентност (Codelia-Anjum A, 2023).

Нашите резултати демонстрират напълно запазена чувствителност на изолатите *E. faecalis* към ampicillin, който остава важен агент в случаите на неусложнени и усложнени уроинфекции, асоциирани с ентерококи. Автори от различни географски региони съобщават за резистентност на ентерококите към ampicillin, варираща в много широк диапазон: 8.4% в Канада (Marchand-Austin A, 2022), 14.6% - за Румъния за амбулаторни изолати (Petca R, 2020) до 50% за болнични

(Miron V, 2021), 46% в Саудитска Арабия (Khalil M, 2022) до 52% в Турция (Şencan İ, 2023).

Негативен резултат, установен в нашето проучване е високият относителен дял на HLAR ентерококи (>20%). Аминогликозидите (gentamicin, amikacin) са медикаменти, показани за тежки/усложнени уроинфекции, обичайно в комбинация с ampicillin и детекцията на този тип резистентност, предполага търсене на други синергистична комбинация или надеждна монотерапия. Високо ниво на резистентност към gentamicin (HLAR) е открито сред изолати ентерококи в хода на проучвания в Иран (50%) (Haghi F, 2019), Саудитска Арабия (50%) (Khalil M, 2022), както и Румъния (52%) (Miron V, 2021). По-често такива изолати се доказват в болнични условия, но значението на тази проблемна резистентност нараства, тъй като много от хоспитализираните пациенти стават обект и на продължителни амбулаторни грижи (старчески домове, наличие на следоперативни катетри, постоянни катетри). Marchand-Austin и сътр., проследявайки кохорта от пациенти с уринарни инфекции в извънболнични и болнични условия в Канада, докладва > 90 % HLAR (Marchand-Austin A, 2022).

Макар и в под 20%, нашите изолати бяха с редуцирана активност на представителите на флуорохинолоновата група препарати (17 - 19% резистентност). По данни на BulStar, в национален мащаб в периода 2018 - 2021г. също се установява висок относителен дял на флуорохинолон-резистентни *E. faecalis*, като за ciprofloxacin резистентността в този 4-годишен период е съответно 30.8%; 30.5%; 30.7% и 29.8%), а за levofloxacin - 31.5%; 31.0%; 32.8% и 27.2% (Surveillance of antimicrobial resistance in Bulgaria--a synopsis from BulSTAR 2018-2021. Available at: [https:// bam-bg.net/](https://bam-bg.net/)). Вероятно поради разлики в антибиотичните политика и подходи, в научната литература данните, свързани с този тип резистентност доста се различават. Например, Haghi и кол. съобщават за хинолонова резистентност около 27% за изолати в Иран (Haghi F, 2019). Още по-високи нива докладва Marchand-Austin A и сътр. - 26.7% за *E. faecalis* и 48% в групата на всички ентерококови изолати (независимо от конкретния вид) (Marchand-Austin A, 2022). В Румънско кохортно проучване сред жени с уроинфекции се установяват 30.2 % резистентност към levofloxacin

(Petca R, 2020), а в Турция при пациенти от двата пола, но с вътреболнични инфекции, резистентността към ciprofloxacin достига от 40.5% (Şencan İ, 2023). Според автори като Khalil и сътр., хинолоните са неприложима терапия при ентерококови инфекции в Саудитска Арабия и Египет, където резистентността е 77% (Khalil M, 2022).

Подобно на Грам отрицателните бактерии, настоящото проучване демонстрира съхранена чувствителност на *E. faecalis* към nitrofurantoin (93%), което прави този антимикробен агент добър емпиричен избор за Варненски регион. Petca и сътр. докладват дори по-добра активност на препарата, съобщавайки за резистентност от само 3.3% сред тестваните ентерококови изолати в Румънско проучване (Petca R, 2020), а едва 1.1% е този тип резистентност според Канадско проучване (Marchand-Austin A, 2022). Противоположно на тези данни, резултатите от други географски региони са за резистентност към nitrofurantoin сред ентерококи от 13.3% (Турция) (Şencan İ, 2023) до 18.8% за Саудитска Арабия (Khalil M, 2022).

Сред проучените изолати *E. faecalis* не бяха доказани резистентни към гликопептидната група антибиотици (vancomycin, teicoplanin). Vancomycin-резистентните ентерококи (VRE) често се асоциират по-често с вътреболнични инфекции, като най-често доказваният вид е *E. faecium*, следван от *E. faecalis* (Levitus M, 2024). Поради ограничените възможности за терапия на VRE, разпространението им извън болничните заведения представлява значителен риск за общественото здраве (Codelia-Anjum A, 2023).

По отношение за изолатите *S. saprophyticus*, ние установихме много добра чувствителност към два от основно емпирично изписваните антимикробни лекарствени препарати за пероорална употреба (Ehlers S, 2024) - nitrofurantoin (95%) и trimethoprim/sulphamethoxazole (90%). За разлика от цялата групата на коагулаза-негативните стафилококи, за които са характерни много високи нива на метицилинова резистентност (надхвърлящи 80%), това проучване доказва метицилинова резистентност само в 5%, резултат, който позволява използване на по-широк набор от антимикробни средства за лечение в случаите на *S. saprophyticus* инфекции. За много близък относителен дял на метицилин-резистентни *S. saprophyticus* (5.6%) съобщава

проучване на Chua и сътр., върху амбулаторна група пациенти с уроинфекции. Същите автори рапортуват и много ниски нива на резистентност към не бета-лактамни антибиотици (2% trimethoprim/sulphamethoxazole, 0% към nitrofurantoin и ciprofloxacin (Chua K, 2023).

Според нашите резултати, хиолоновата резистентност (10%) в групата на изолатите *S. saprophyticus* е най-ниско спрямо всички останали изпитвани уропатогени. Значително по-висока хиолонова резистентност сред изолати *S. saprophyticus* е отчетена в Румъния (27.2%) (Petca R, 2020) и Турция (59.3%) (Şencan İ, 2023).

Трябва да се отбележи, че макар и да не влизат в съображение като емпирична терапия за лечение на уроинфекции в амбулаторни пациенти, аминогликозидите (gentamicin), са препаратите, за които установихме най-силно компрометираната активност спрямо *S. saprophyticus* (25% резистентност).

В това проучване беше демонстриран съхранен профил на чувствителност на единствения изолат *Aerococcus urinae*, който доказахме. Считан преди за контаминат, понастоящем *A. urinae* е признат за уропатоген в гериатричната популация, а в педиатричната популация той се свързва предимно с по-тежки прояви, предимно на фона на вече съществуващи урогенитални нарушения (Rast D, 2022). Данните за чувствителността на *Aerococcus* spp. са все още оскъдни, като са докладвани предимно данни за съществуващите към момента перорални антимикробни средства (флуорохинолони, nitrofurantoin) (Carkaci D, 2017). Изолираният от нас *A. urinae* е от уринна проба, получена от възрастен пациент, а изолатът беше със съхранена чувствителност към флуорохинолони, nitrofurantoin и ampicillin. Проучване с фокус върху *A. urinae*, проведено в старчески домове в САЩ, установява също много добра чувствителност към nitrofurantoin, ampicillin, penicillin, linezolid и vancomycin, но намалена към levofloxacin (63.6%) и ciprofloxacin (44.5%) (Saad A, 2023). Rast и сътр., проучвайки пациенти в детска възраст, съобщава, че подходяща терапия в случаи на *A. urinae* асоциирани уроинфекции, са amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefpodoxime или интравенозно приложени цефалоспоринови от трето поколение (ceftriaxone) (Rast D, 2022).

В групата на изолатите *E. faecalis*, вторият най-чест уропатоген, не се установява резистентност към ampicillin, а тази към nitrofurantoin е под 10%, което прави двете групи препарати подходящ избор за терапия на *E. faecalis* асоциираните инфекции. Активността на флуорохинолоните и аминогликозидите (HLAR) е редуцирана, като резистентността е в диапазона около 20%. Проучването не установява VRE изолати. Спрямо *S. saprophyticus*, всички антибиотични групи (с изключение на аминогликозидите), запазват добра активност, като делът на не-чувствителните изолати е  $\leq 10\%$ .

Резултатите от изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства в това проучване, подчертават значението на периодичното мониториране на резистентността на локално ниво към най-често използваните антибиотици в извънболнични условия, с цел даване на препоръките за емпирично лечение. Добрата медицинска практика обаче винаги трябва да включва микробиологично изследване на урина от пациент със съмнение за инфекция на уринарния тракт с цел идентифициране на уропатогена и точно определяне на чувствителността му към антимикробни лекарствени средства.

#### **4.4. ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА, ОПРЕДЕЛЕНА ЧРЕЗ АВТОМАТИЗИРАНАТА СИСТЕМА HB&L UROQUATTRO ДИРЕКТНО ОТ ПОЛОЖИТЕЛНИ ПРОБИ УРИНА**

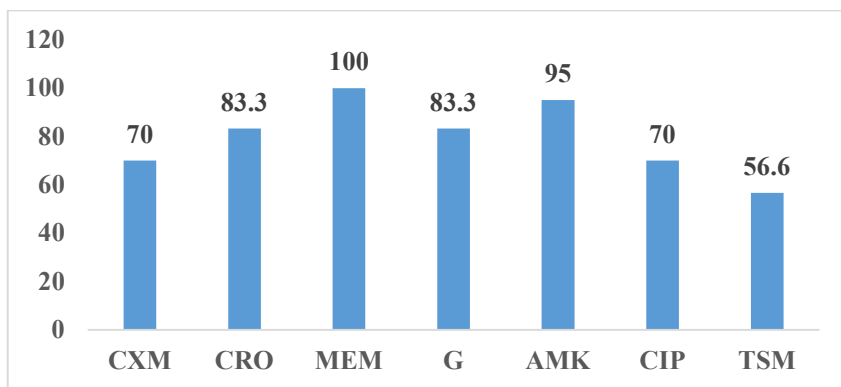
От всички 122 проби урина, определени като положителни чрез скринирането, извършено с HB&L апарата, бяха изолирани и видово идентифицирани чрез автоматизираната VITEK 2 система общо 60 Грам отрицателни и 62 Грам положителни бактериални изолата. Не бяха установени несъответствия във видовата идентификация, когато тя беше проведена чрез VITEK 2 апарата първоначално директно от положителната проба урина и по-късно с изолираната чиста бактериална култура.

На таблица 11 е представен микробният спектър на получените изолати.

**Таблица 11.** Видов спектър на бактериалните изолати, чиято чувствителност е определена чрез апарат HB&L.

| Бактериален вид                     | n (%)              |
|-------------------------------------|--------------------|
| <b>Грам - отрицателни бактерии</b>  | <b>60 (49.2)</b>   |
| <i>E. coli</i>                      | 46 (76.6)          |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | 4 (6.6)            |
| <i>Enterobacter cloacae complex</i> | 4 (6.6)            |
| <i>Proteus mirabilis</i>            | 3 (5.0)            |
| <i>Morganella morganii</i>          | 1 (1.6)            |
| <i>Citrobacter koseri</i>           | 1 (1.6)            |
| <i>Serratia marcescens</i>          | 1 (1.6)            |
| <b>Грам - положителни бактерии</b>  | <b>62 (50.8)</b>   |
| <i>Enterococcus faecalis</i>        | 42 (67.7)          |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 20 (32.2)          |
| <b>Общо бактериални изолати</b>     | <b>122 (100.0)</b> |

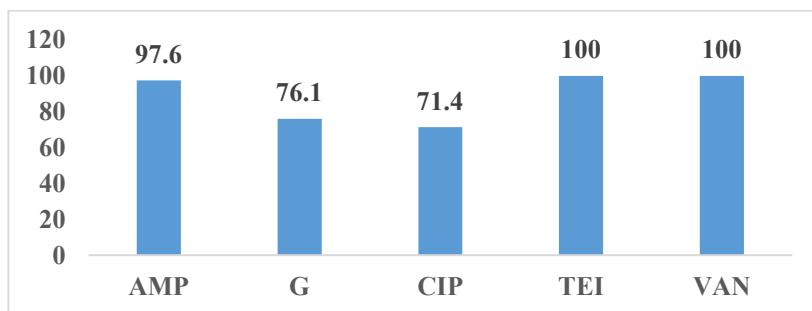
На фигура 3 е показана чувствителността към шест антимикробни лекарствени препарата, определена чрез HB&L AST Uroquattro на 60 изолата *Enterobacterales*.



**Фигура 3.** Антибиотична чувствителност на 60 изолата, представители на разред *Enterobacterales*, определена чрез HB&L AST Uroquattro (%).

**Съкращения:** CXM, cefuroxime; CRO, ceftriaxone; MEM, meropenem; G, gentamicin; AK, amikacin; CIP, ciprofloxacin; TSM, trimethoprim/sulfamethoxazole.

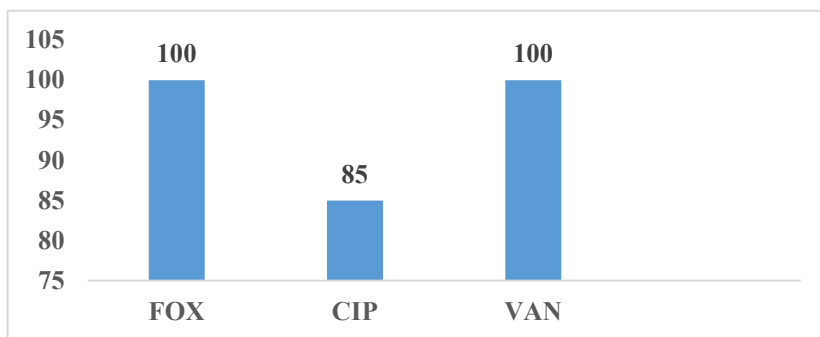
Фигура 4 отразява чувствителността към пет антимикробни лекарствени препарата, определена чрез HB&L AST Uroquattro на 42 изолата *E. faecalis*.



**Фигура 4.** Антибиотична чувствителност на 42 изолата *E. faecalis*, определена чрез HB&L AST Uroquattro (%).

**Съкращения:** AMP, ampicillin; G, gentamicin (high level aminoglycoside resistance, HLAR); CIP, ciprofloxacin; VAN, vancomycin; TEI, teicoplanin.

Чувствителността на изолатите *S. saprophyticus* (n=20) към три антимикробни лекарствени препарата, определена чрез HB&L AST Uroquattro е представена на фигура 5.



**Фигура 5.** Антибиотична чувствителност на 20 изолата *S. saprophyticus*, определена чрез HB&L AST Uroquattro (%).

**Съкращения:** FOX, ceftiofur, CIP, ciprofloxacin; VAN, vancomycin

### **Корелация между резултатите за чувствителност към антибиотици, получени чрез HB&L AST и дисково-дифузионния метод на Kirby-Bauer**

В проучването бяха извършени общо 690 определяния на чувствителност към антибиотици (HB&L AST директно от положителни проби урина спрямо дисково-дифузионния метод на Kirby-Bauer от изолати в чиста култура).

Получено беше категорийно съответствие от 94.8% спрямо стандартния метод. Установени бяха общо 36 грешки (5.2%). От тях, 5 бяха идентифицирани като много големи грешки (very major errors, VME) (13.9%), 24 като големи (major errors, ME), (66.7%) и 7 (19.4%) - като малки грешки (minor errors, mE). Таблицы 12, 13 и 14 показват резултатите от корелацията между двата метода за определяне на чувствителността за различните групи бактерии.

За *Enterobacteriales* (n=60) категорийното съответствие беше 93.3% с 18 големи грешки, 5 малки грешки и само 1 много голяма грешка за trimethoprim/sulfamethoxazole. Най-ниските корелации в тази група бяха определени за gentamicin и ciprofloxacin (91.7%). За всички останали антимикробни средства корелациите бяха по-големи от 93%. Пълно съответствие бе установено за чувствителността към meropenem (100 %) (таблица 12).

Категорийното съответствие за *E. faecalis* (n=42) беше 95.2% с 6 големи, 1 малка и 3 много големи грешки. Големите грешки засягаха определянето на чувствителността към gentamicin (HLAR) (n=2) и ciprofloxacin (n=4), а много големите - бяха свързани с gentamicin (n=1) и гликопептидната група агенти (n=2) (таблица 13).

***Таблица 12. Корелация (%) между антибиотичната чувствителност, получена чрез HB&L AST системата и референтния дисково-дифузионен метод на Kirby-Bauer за 60 изолати Enterobacteriales.***

| <i><b>Enterobacteriales (n=60)</b></i> | <b>CXM</b> | <b>CRO</b> | <b>MEM</b> | <b>G</b> | <b>AK</b> | <b>CIP</b> | <b>TSM</b> |
|----------------------------------------|------------|------------|------------|----------|-----------|------------|------------|
| <b>Брой сравнения</b>                  | 60         | 60         | 60         | 60       | 60        | 60         | 60         |
| <b>Корелация (%)</b>                   | 93.3       | 93.3       | 100        | 91.7     | 95.0      | 91.7       | 95.0       |

**Съкращения:** **CXM**, cefuroxime; **CRO**, ceftriaxone; **MEM**, meropenem; **G**, gentamicin; **AK**, amikacin, **CIP**, ciprofloxacin; **TSM**, trimethoprim/sulfamethoxazole.

**Таблица 13.** Корелация (%) между антибиотичната чувствителност, получена чрез HB&L AST системата и референтния дисково-дифузионен метод на Kirby-Bauer за 42 изолата *Enterococcus faecalis*.

| <i>E. faecalis</i> (n=42) | AMP  | CIP  | G    | VAN  | TEI  |
|---------------------------|------|------|------|------|------|
| Брой сравнения            | 42   | 42   | 42   | 42   | 42   |
| Корелация (%)             | 97.6 | 90.5 | 92.9 | 95.2 | 95.2 |

**Съкращения:** AMP, ampicillin; CIP, ciprofloxacin; G, gentamicin (high level aminoglycoside resistance, HLAR); VAN, vancomycin; TEI, teicoplanin.

Категорийното съответствие за *S. saprophyticus* беше 96.7%. Установена бе една много голяма грешка за ceftioxin и една малка - за ciprofloxacin. Доказахме пълно съответствие за чувствителността към vancomycin (100 %) (таблица 14).

**Таблица 14.** Корелация (%) между антибиотичната чувствителност, получена чрез HB&L AST системата и референтния дисково-дифузионен метод на Kirby-Bauer за 20 изолата *S. saprophyticus*.

| <i>S. saprophyticus</i> (n=20) | FOX  | CIP  | VAN* |
|--------------------------------|------|------|------|
| Брой сравнения                 | 20   | 20   | 20   |
| Корелация (%)                  | 95.0 | 95.0 | 100  |

**Съкращения:** FOX, ceftioxin, CIP, ciprofloxacin; VAN, vancomycin; \* чувствителността е определена чрез VITEK 2 автоматизираната система.

Времето за определяне на чувствителността към антимикробни лекарствени средства директно от положителни проби урина чрез HB&L инструмента беше между 3 и 5 часа, в сравнение с 48 часа при работа със стандартния дисково-дифузионен метод от изолирани колонии.

#### **4.5. ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА, ОПРЕДЕЛЕНА ЧРЕЗ АВТОМАТИЗИРАНАТА СИСТЕМА VITEK 2 ДИРЕКТНО ОТ ПОЛОЖИТЕЛНИ ПРОБИ УРИНА.**

При всички 122 проби урина, определени като положителни чрез HB&L скринирането, чувствителността към набор от антимикробни лекарствени средства паралелно беше определена и чрез автоматизираната VITEK 2, като се работеше директно с положителните виалки от HB&L апарата при достигане на мътнина от 0,5 Mc Farland. Извършени бяха общо 690 определяния на чувствителност към антибиотици чрез VITEK 2 апарата директно от положителни проби урина и резултатите също бяха оценени спрямо резултатите от дисково-дифузионния метод на Kirby-Bauer, приложен с изолати в чиста култура.

Получено беше категорийно съответствие от 97% спрямо стандартния метод, като бяха установени общо 21 грешки (3%). От тях, 3 бяха идентифицирани като VME (14.3%), 11 като ME (52.4%) и 7 (33.3%) - като mE. Таблицы 15, 16, 17 показват резултатите от корелацията между двата метода за определяне на чувствителността за различните групи бактерии.

За *Enterobacteriales* (n=60) категорийното съответствие беше 97.6% с 4 ME, 5 mE и само 1 VME за gentamicin. Най-ниските корелации в тази група бяха определени за gentamicin и ciprofloxacin (91.7%). За всички останали антимикробни средства корелациите бяха по-големи от 93%. Пълно съответствие бе установено за чувствителността към meropenem (100 %) (таблица 15).

Категорийното съответствие за *E. faecalis* (n=42) беше 95.2% с 7 ME, 1 mE и 2 VME. Големите грешки засягаха определянето на чувствителността към gentamicin (HLAR) (n=2) и ciprofloxacin (n=4), а много големите - с vancomycin (n=2) (таблица 16).

За *S. saprophyticus* беше определено категорийно съответствие от 98.3% с една mE за ciprofloxacin. Доказахме пълно съответствие за чувствителността към vancomycin и ceftiofloxacin (100 %) (таблица 17).

**Таблица 15.** Корелация (%) между антибиотичната чувствителност, получена чрез VITEK 2 системата директно от положителна проба урина и референтния дисково-дифузионен метод на Kirby-Bauer за 60 изолата *Enterobacteriales*.

| <i>Enterobacteriales</i> (n=60) | CXM | CRO | MEM | G  | AK  | CIP  | TSM  |
|---------------------------------|-----|-----|-----|----|-----|------|------|
| Брой сравнения                  | 60  | 60  | 60  | 60 | 60  | 60   | 60   |
| Корелация (%)                   | 100 | 100 | 100 | 95 | 100 | 91.7 | 96.7 |

**Съкращения:** CXM, cefuroxime; CRO, ceftriaxone; MEM, meropenem; G, gentamicin; AK, amikacin, CIP, ciprofloxacin; TSM, trimethoprim/sulfamethoxazole.

**Таблица 16.** Корелация (%) между антибиотичната чувствителност, получена чрез VITEK 2 системата директно от положителна проба урина и референтния дисково-дифузионен метод на Kirby-Bauer за 42 изолата *Enterococcus faecalis*.

| <i>E. faecalis</i> (n=42) | AMP  | CIP  | G    | VAN  | TEI |
|---------------------------|------|------|------|------|-----|
| Брой сравнения            | 42   | 42   | 42   | 42   | 42  |
| Корелация (%)             | 97.6 | 90.5 | 95.2 | 92.8 | 100 |

**Съкращения:** AMP, ampicillin; CIP, ciprofloxacin; G, gentamicin (high level aminoglycoside resistance, HLAR); VAN, vancomycin; TEI, teicoplanin.

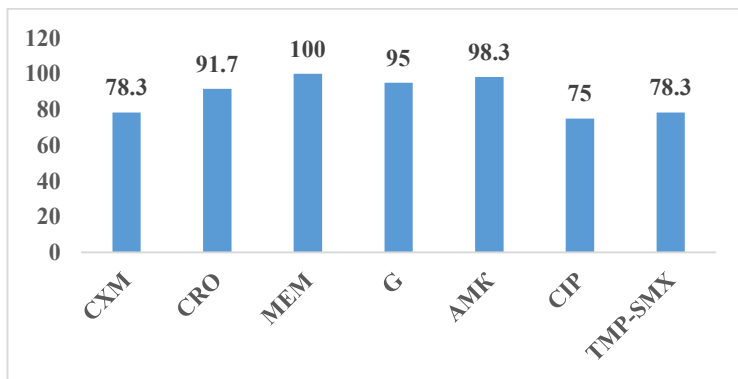
**Таблица 17.** Корелация (%) между антибиотичната чувствителност, получена чрез VITEK 2 системата директно от положителна проба урина и референтния дисково-дифузионен метод на Kirby-Bauer за 20 изолата *S. saprophyticus*.

| <i>S. saprophyticus</i> (n=20) | FOX | CIP  | VAN* |
|--------------------------------|-----|------|------|
| Брой сравнения                 | 20  | 20   | 20   |
| Корелация (%)                  | 100 | 95.0 | 100  |

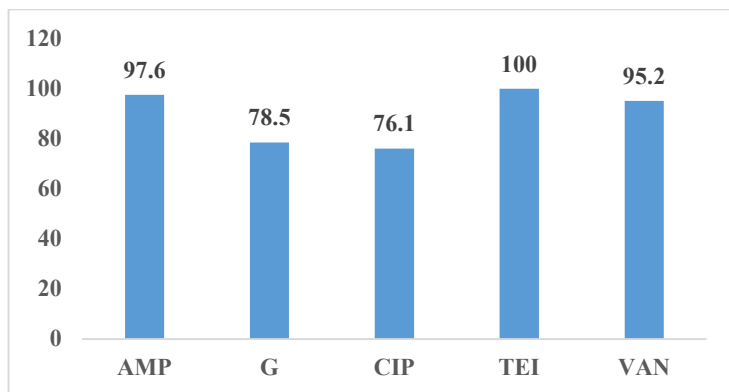
**Съкращения:** FOX, ceftiofloxacin; CIP, ciprofloxacin; VAN, vancomycin; \* чувствителността е определена чрез VITEK 2 автоматизираната система.

Времето за определяне на антибиотичната чувствителност директно от положителни проби урина чрез VITEK 2 инструмента беше между 12-18 часа, в сравнение с 48 ч. при работа със стандартния дисково-дифузионен метод от изолирани колонии.

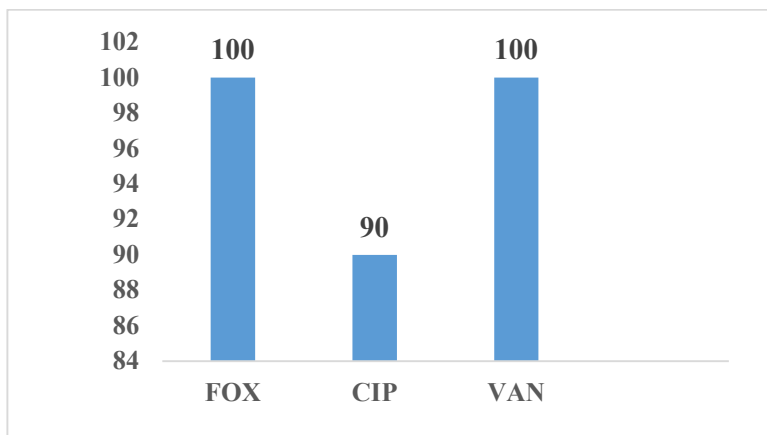
На фигури 6, 7, 8 са показани резултатите от изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства, определена чрез автоматизираната система VITEK 2 директно от положителни проби урина.



**Фигура 6.** Антибиотична чувствителност на 60 изолата, представители на разред *Enterobacteriales*, определена чрез VITEK 2 системата директно от положителни проби урина (%).



**Фигура 7.** Антибиотична чувствителност на 42 изолата *E. faecalis*, определена чрез VITEK 2 системата директно от положителни проби урина (%).



**Фигура 8.** Антибиотична чувствителност на 20 изолата *S. saprophyticus*, определена чрез VITEK 2 системата директно от положителни проби урина (%).

## Обсъждане

В настоящия труд се сравняват резултатите получени чрез автоматизираната скринингова система HB&L, с резултатите за антибиотична чувствителност, получени чрез класическия дисково-дифузионен метод. Установена е много добра категорийна корелация (94.8 %) с референтния метод. Това е в съответствие с проучвания, които съобщават за подобни или дори по-високи нива на корелация (93.4%; 94.9%; 95%; 97.1%) (*Anton-Vazquez V, 2019; Sánchez-Carrillo C, 2019; Van den Poel B, 2020; Cipaiolo R, 2022*). Получените данни показват, че внедряването на апарата HB&L за директно изследване на антибиотична чувствителност в рутинната лабораторна практика би могло да бъде от голяма полза, за да се постигне драматично съкращаване на времето до крайния микробиологичен резултат.

В това проучване бяха установени общо 36 грешки. Най-чести бяха големите грешки (ME) (66.7 %), при които HB&L апаратът категоризира изолата като резистентен, докато референтният метод го определя като чувствителен. Това не е критичен

диагностичен проблем, тъй като лечението може да се коригира при необходимост и не представлява риск за пациента. Разбира се, ако грешката е свързана с антибиотици, които се определят като първи избор за лечение на инфекции на пикочните пътища, това може да доведе до избор на медикамент с по-нисък профил на ефективност, по-висока честота на рецидиви или повече странични ефекти.

По-тревожни са много големите грешки (VME), тъй като могат да доведат до започване на неправилна антибиотична терапия и неуспех на лечението, а в случаи като повтарящи се инфекции или уросепсис могат да доведат до сериозни усложнения (*Gajic I, 2022*). Установихме 5 много големи грешки (1 при *Enterobacteriales*, 3 при *Enterococcus* spp. и 1 при *Staphylococcus* spp.). Единствената много голяма грешка сред *Enterobacteriales* беше тази за trimethoprim/sulfamethoxazole. Това трябва да се вземе под внимание, тъй като trimethoprim/sulfamethoxazole е едно от средствата на първи избор при лечението на неусложнени инфекции на пикочните пътища в региони, където резистентността е под 20 %.

Сред представителите на разред *Enterobacteriales* най-ниска степен на корелация е установена за хинолоните (ciprofloxacin) и аминогликозидите (gentamicin), но е свързана с предимно малки грешки (mE). От изследваните  $\beta$ -лактамни антибиотици (cefuroxime, ceftriaxone), корелация с културелния метод е установена в 93.3%, а доказаните несъответствия са свързани предимно с големи грешки. Групата на  $\beta$ -лактамните антибиотици е чест избор при амбулаторно лечение на уринарни инфекции на пациенти от различни възрастови групи. Установеният процент на корелация е сравнително висок в сравнение с други проучвания, които съобщават за повече несъответствия (*Boland L, 2019*). Например, в проучване, проведено от *Boland* и колектив, се съобщава за 85.3% степен на корелация при изпитване на ceftazidime (*Boland L, 2019*). Поради субтерапевтичните плазмени концентрации, пероралните  $\beta$ -лактами не се препоръчват като

първи избор в случаите на неусложнени инфекции на пикочните пътища, освен в детска възраст и при бременни жени (*Hooton T, 2012*).

В групата на ентерококовите изолати най-ниско категорийно съответствие се установи за ciprofloxacin (90.5%), следван от gentamicin (HLAR) (92.9%) и гликопептидни антибиотици (95.2%). В тази група изолати бяха открити 3 много големи грешки: една за gentamicin (HLAR) и 2 за гликопептидите (vancomycin, teicoplanin). Други автори съобщават за още по-ниска корелация при аминогликозидните антибиотици (HLAR) (87.5%), но за по-висока степен на корелация по отношение на vancomycin (100 %) (*Sánchez-Carrillo C, 2019*). В изследването на *Anton-Vazquez* и кол., съответствията за teicoplanin (92%) и vancomycin (90%) са по-ниски от нашия резултат (*Anton-Vazquez V, 2019*). Получихме отлично категорийно съответствие за ampicillin (97.6%). Този резултат е подобен на докладвания от *Sánchez-Carrillo*, който рапортува пълно съответствие между двата използвани метода (100%) (*Sanches-Carrillo C, 2019*).

Сред проучените стафилококови изолати, ние установихме висока корелация за ciprofloxacin (95%) и vancomycin (100%). В контраст, други автори съобщават за значителни разлики при сравняване на резистентността към гликопептиди с различни методи, включително откриване на много големи грешки (*Rybak M, 2013; Sánchez-Carrillo C, 2019*). По отношение на ceftiofur, въпреки категорийното съответствие от 95%, открихме една много голяма грешка и това трябва да бъде взето под внимание. В подобно проучване, най-високо съвпадение е наблюдавано за ceftiofur и teicoplanin (92%), а най-ниско - за vancomycin (80%) (*Anton-Vazquez V, 2019*). Подобно на нашия резултат, авторите съобщават и за много големи грешки, свързани с чувствителността към ceftiofur (*Anton-Vazquez V, 2019*). Друго проучване върху коагулазо-отрицателни стафилококи (включително *S. saprophyticus*) установява предимно големи грешки при тестването на тази чувствителност (*Boland L, 2019*).

Важно е да се отбележи, че в настоящото проучване не бяха открити несъответствия във видовата идентификация на изолатите, когато тя бе извършена чрез VITEK 2 апарата директно от положителната проба урина от една страна, и от друга - при работа с прясно изолирани колонии. В този смисъл, комбинирането на HB&L Uroquattro и VITEK 2 системите може да постигне едновременно бърза микробна идентификация и антибиотична чувствителност чрез директна инокулация от положителна проба урина, като по този начин се получава резултат още в деня на приемане на клиничния материал за изследване в лабораторията.

Друго важно предимство на системата HB&L е възможността за изпитване на чувствителността към голям брой антимикробни лекарствени средства, както и за подбор на антибиотичните средства в зависимост от спецификите на изолата и на конкретния пациент (Sánchez-Carrillo C, 2019).

Сравнението, което извършихме между определянето на чувствителността към антимикробни лекарствени средства чрез автоматизираната HB&L Uroquattro система директно от положителна проба урина и чрез VITEK 2, също директно от положителна проба, показва много близки резултати на категорийно съответствие на двата подхода спрямо референтния метод. Не бяха установено и големи различия при различните групи бактериални изолати: за *Enterobacteriales* - 93.3% и 97.6% съответно, за *S. saprophyticus* - 96.7% и 98.3%, а за *E. faecalis* двата апарата показаха еднакъв резултат (95.2%). При VITEK 2 се доказах по-малък брой грешки (3% vs 5.2%). И при двата метода най-малък беше броя на VME: с HB&L VME бяха установени и в трите категории (1 при *Enterobacteriales*, 3 при *Enterococcus* spp. и 1 при *Staphylococcus* spp.), докато с Vitek 2, VME бяха само в групата на *Enterobacteriales* (1 VME) и тази на *E. faecalis* (2 VME). Сред *Enterobacteriales*, VME с Vitek2 се отнасят за gentamicin, докато с HB&L - за trimethoprim/sulfamethoxazole. И при двете системи, в групата на ентерококовите изолати, VME засягаха

гликопептидните антибиотици. За разлика от HB&L, с VITEK 2 не бяха доказани VME при изпитване чувствителността на стафилококовите изолати.

Безспорното предимство на HB&L системата е много краткия период от време от постъпване на пробата в лабораторията до получаване на резултат от изпитването на чувствителност към антибиотици (средно 5 часа за Грам отрицателните и 7 часа за Грам положителните изолати). Този период включва времето за скрининг (приблизително 60 - 120 мин. до положителен за бактериален растеж резултат, микроскопиране за установяване на Грамовата принадлежност) и залагане на виалките за изпитване на антибиотичната чувствителност във HB&L апарата (3 часа за Грам отрицателни и 5 часа за Грам положителни). За разлика от този подход, при VITEK 2 средното време до получаване на резултат беше по-дълъг, средно между 12 - 18 часа, като включваше времето, необходимо за скрининг чрез HB&L (60-120 мин.), последвано от определяне на видовата принадлежност и антибиотична чувствителност на изолата, при работи директно с положителната проба урина.

#### **4.6. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПОКАЗАТЕЛЯ „РЕЗИДУАЛНА АНТИБИОТИЧНА АКТИВНОСТ“ В ПРОБИ УРИНА**

За целите на определянето на показателя „резидуална антибиотична активност“ (Residual antibiotic activity, RAA) бяха изследвани всички 1600 проби урина.

Общият дял на положителните за RAA проби беше 5.7%. Положителен RAA тест беше доказан при 91 пациента, всички със симптоми на инфекции на пикочните пътища и скорошна антибиотична терапия и/или прием на добавки с антимикробна активност.

В цялата група изследвани пациенти (n=842), общо 113 пациента (13.4%) съобщават за наскоро проведено антибиотично лечение и/или прием на добавки с антимикробна активност (таблица 18). Културелният метод доказва микробен растеж при 63-

ма пациенти с положителен RAA резултат. При 28 пациенти с положителен RAA тест от урина, културелното изследване остана негативно (таблица 18).

**Таблица 18.** *Резултати от RAA теста и класическия културелен метод, приложени при изследване на уринни проби на 113 пациента, провеждали скорошно антибактериално лечение или приемали добавки с антимикробна активност.*

| Брой пациенти (n)       | Резултат от RAA теста | Резултат от културелния метод | %            |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------|
| n=63                    | положителен           | положителен                   | 55.8 %       |
| n=28                    | положителен           | отрицателен                   | 24.8 %       |
| n=9                     | отрицателен           | положителен                   | 8 %          |
| n=13                    | отрицателен           | отрицателен                   | 11.5 %       |
| <b>Общо брой, n=113</b> |                       |                               | <b>100.0</b> |

Според предоставената от пациентите информация, сред пациентите демонстрирали едновременно положителни RAA тест и културелно изследване (n=63), общо двадесет и шест (41.3%) са провеждали лечение с антибактериални средства в последните 10 дни преди изследването поради инфекции, различни от инфекции на пикочните пътища (предимно респираторни), двадесет и седем пациента (42.9%) са били лекувани емпирично за инфекции на пикочните пътища с антимикробни средства, назначени от техния общопрактикуващ лекар, а десет (15.8%) са приемали антимикробни средства без лекарско предписание. Двама пациенти съобщават, че едновременно с антибиотичното лечение, са провеждали и имунотерапия с препарати, съдържащи бактериални лизати.

На таблица 19 е показано разпределението на всички 113 пациента, които в хода на проведената анкета преди провеждане на микробиологичното изследване, са съобщили информация за

прием на скорошна антибиотична терапия или добавки, съдържащи уро-антисептични съставки.

**Таблица 19.** *Разпределение на 113 пациента, съобщили информация за прием на скорошна антибиотична терапия или добавки, съдържащи уро-антисептични съставки.*

| <b>Провеждана терапия</b>                                                                          | <b>n, %</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Прием на фитопрепарати                                                                             | 48 (42.5)   |
| Антибиотично лечение в последните 10 дни заради инфекция, различна от инфекция на уринарния тракт* | 26 (23.0)   |
| Емпирично назначено антибиотично лечение от общопрактикуващ лекар                                  | 27 (23.9)   |
| Самоназначена антибиотична терапия                                                                 | 10 (8.8)    |
| Общ брой пациенти                                                                                  | 113 (100.0) |

\* двама пациенти са провеждали и имунотерапия с препарати, съдържащи бактериални лизати

## Обсъждане

Определянето на показателя „резидуална антибиотична активност“ в пробите от урина е особено важно за правилното интерпретиране на резултатите от микробиологичното изследване в случаите, в които пациентът не е съобщил за провеждана антибиотична терапия, с цел да се избегнат фалшиво отрицателни резултати или назначаване на неподходящо лечение (*Mantzana P, 2021*). Нашето проучване установява 5.7 % от изследваните уринни проби положителни за резидуална антибиотична активност. Съобщените в научната литература данни за този показател са вариращи и силно зависят от приложението на метода. Например, използвайки модифициран тест за определяне на антибактериални субстанции в урината, Wilson и сътр. откриват много по-нисък относителен дял на RAA положителни проби (2.6%) сред общо изследвани 14 680 проби урина, получени от амбулаторни и хоспитализирани пациенти в Катар (*Wilson G, 2011*). Проучване, проведено в болнични условия в Шри Ланка,

съобщава за 19.2% дял на RAA положителните урини, като се доказва, че около 20% от пробите съдържат антибиотици, които повлияват силно резултата от културелното изследване (*Basnayake, 2020*). И двамата изследователи са използвали мануални техники за измерване на RAA. Проучване, проведено от Kussen и кол., сравнява мануален метод и автоматичния скриниращ апарат Alfred-60 (Alifax, Italy) за откриване на RAA в проби от урина на хоспитализирани пациенти (*Kussen, 2012*). Авторите съобщават за 71.4 % чувствителност на мануалния метод и съответно 92.8 % на автоматизирания подход (*Kussen, 2012*). По-ниската чувствителност на мануалния метод се обясняват с малкия обем на пробата, който се използва при при дифузионния агаров метод (*Kussen, 2012*).

Диагностиката на инфекциите на уринарния тракт може да се усложни от наличието на антибиотични субстанции в пробите урина, подлежащи на културелно изследване и това особено важи за страни, в които тези лекарствени средства се купуват без рецепта (*Wilson G, 2011*). Що се отнася до изследването на RAA, извършено в нашето проучване, в групата пациенти, които съобщават едновременно за клинични симптоми на инфекция на уринарния тракт и провеждано скорошно антибиотично лечение, беше установен много висок относителен дял на такива, които са с положителен RAA тест и положителен резултат от културелното изследване. Такъв резултат винаги налага по-нататъшна оценка на клиничното състояние на пациента (вкл. назначаване на допълнителни лабораторни тестове), едновременно с преоценка на текущата антибактериална терапия, за да се прецени нейната адекватност. Това е така, защото бактериалният растеж в уринната проба може временно да бъде потиснат от антибиотиците, което води до преходна ремисия на клиничните симптоми, но може да причини и усложнения каквито са хроничните или повтарящите се безсимптомни инфекции (*Wilson G, 2011*).

В настоящото проучване идентифицирахме неочаквано висок процент културелно негативни, но позитивни за RAA проби урина в амбулаторни пациенти с уроинфекция. Този резултат е значително по-висок от докладваното от G. Wilson G (0.04%) (*Wilson G, 2011*), Botão

(1%) (*Kussen, 2012*), Cardozo (7.45%) (*Cardozo, 2014*) и A. Suresh (15%) (*Suresh A, 2017*). Значителните разлики в относителния дял на пробите урина, които са RAA (+) / културелно (-) в гореспоменатите проучвания могат да се обяснят с произхода на пробите (хоспитализирани или амбулаторни пациенти), с използвания лабораторен метод, както и с разликите в някои здравни практики (*Wilson G, 2011; Flores-Mireles A, 2019*). Анализирайки предоставената от пациентите медицинска информация, нашите резултати потвърждават констатациите на Wilson и сътр., които установяват, че предварителният прием на антибиотици за инфекции, различни от инфекции на пикочните пътища, е сред основните причини за положителен RAA тест (*Flores-Mireles A, 2019*). Този факт показва важността на процеса на снемане на анамнеза, особено при амбулаторни пациенти, който може да окаже сериозно влияние върху качеството на лабораторния резултат, последващите грижи за пациента и върху нерационалната употреба на антибиотици (*Wilson G, 2011*). Този резултат отразява и ситуацията в България по отношение на потреблението на антимикробни лекарствени средства в обществото и в болничния сектор през последните години. Трябва да отбележим също, че нашето проучване беше проведено по време на COVID-19 пандемията. Според доклада на ECDC (Европейски център за превенция и контрол на заболяванията) за 2020 г. и 2021 г. България е сред европейските страни с най-високо общо потребление на антимикробни средства в региона за този период (22.7 – 24.4 DDD/1000 души население на ден) (*European Centre for Disease Prevention and Control, 2022*).

## 5. ИЗВОДИ

След анализ на получените резултати, могат да се направят следните изводи:

1. Етиологичният спектър на инфекциите на уринарния тракт в амбулаторни пациенти за периода на проучването се доминира от Грам отрицателни бактерии (80.1%). Най-често доказваният бактериален вид е *E. coli* (56.8%), следван от *E. faecalis* (12.5%) и *K. pneumoniae* (11.4%). Грам - положителните бактерии са основно представени от *E. faecalis* (65.6%) и *S. saprophyticus* (29.8%).
2. Не се установява статистически значими разлика в разпределението на уропатогените в етиологичния спектър на ИУТ между групата на мъжете и тази на жените.
3. От общо 1600 проби урина, получени от 842 амбулаторни пациенти със симптоми на ИУТ, автоматизираната система HB&L установи 21.4% относителен дял на положителни проби, а класическото микробиологично изследване - 22%. Несъответствията между двата метода (0.6%) се асоциират предимно с по-редки причинители, доказани в ниско микробно число ( $<10^3$  CFU/ml) и/или с по-бавно растящи микроорганизми, като най-големият брой дискордантни резултати са определени за изолати *Candida* spp.
4. Скриниращата автоматизирана система HB&L демонстрира отлични чувствителност (100%), специфичност (99.3%), PPV (100%), NPV (99.3%) и точност (99.4%), както и значително по-кратко време до получаване на резултат в сравнение със стандартното изследване (4ч. срещу 24 ч.).
5. Установяват се високи нива на резистентност към ampicillin, trimethoprim/sulphamethoxazole и флуорохинолони (над 35%) в групата на представителите на разред *Enterobacterales*, но под 20% резистентност към цефалоспорини от трета генерация. Доказва се силно редуцирана активност на аминокеницилините спрямо *E. coli* (66.8%). Карбапенемите, аминогликозидите и nitroxoline са със съхранена активност спрямо *E. coli* (резистентност  $< 1\%$ ,  $< 6.5 \%$  и  $< 2\%$

съответно), а тази към nitrofurantoin и fosfomycin е в диапазона 15-20%. Nitroxoline, следван от nitrofurantoin и fosfomycin, могат да бъдат препоръчани като препарати на избор за емпирично лечение на неусложнени, придобити в обществото инфекции на пикочните пътища или на инфекции на пикочните пътища, когато липсват други алтернативи поради множествена резистентност на изолатите.

6. Сред изолатите *E. faecalis*, не се установява резистентност към ampicillin, а тази към nitrofurantoin е под 10%, което прави двете групи препарати подходящ избор за терапия на *E. faecalis* асоциираните инфекции. Активността на флуорохинолоните и аминогликозидите (HLAR) е редуцирана в диапазона около 20%. Проучването не установява VRE изолати.
7. Спрямо *S. saprophyticus*, без аминогликозидите, всички антибиотични групи запазват добра активност, с дял на нечувствителните изолати  $\leq 10\%$ .
8. HB&L апаратът демонстрира много добра категорийна корелация (94.8%) със стандартния дисково-дифузионен метод за определяне на чувствителност към антимикробни лекарствени средства. От доказните 5.2% грешки, 13.9% бяха идентифицирани като много големи грешки, свързани с определянето чувствителността към trimethoprim/sulfamethoxazole сред *Enterobacterales* (n=1), към гликопептиди (n=2) и HLAR сред ентерококите (n=1) и към ceftioxin сред изолатите стафилококи (n=1). Най-висок е относителният дял на големите грешки (66.7%), а този на малките е 19.4%.
9. Времето за определяне на антибиотичната чувствителност директно от положителни проби урина чрез HB&L AST апарата е много по-кратко (между 3 и 5 часа) в сравнение с 48 часа при стандартния дисково-дифузионен метод от изолирани колонии и 12-18ч. при работа директно с положителна проба урина чрез автоматизираната VITEK 2 система.

10. Проучването доказва висок относителен дял на пробите урина с RAA (5.7%). Установен е висок относителен дял на пациентите в групата на провеждащите скорошно антибиотично лечение, при които едновременно се установява RAA и положителен културелен резултат (55.8%), като над 40% от тези пациенти са приемали антибиотици по повод инфекции, различни от инфекциите на уринарния тракт.

## **6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **Приноси с оригинален характер**

1. Оценени са възможностите на автоматизираната система HB&L Uroquattro за бърза диагностика на инфекциите на уринарния тракт в амбулаторни условия.
2. Оценени са възможностите на автоматизираната система HB&L Uroquattro за бързо изпитване на чувствителност към антимикробни лекарствени средства.
3. Проучен е етиологичният спектър на инфекциите на уринарния тракт в голям брой амбулаторни пациенти във Варненски регион, както и локалната чувствителност към антимикробни лекарствени средства (вкл. nitroxoline, nitrofurantoin и fosfomycin), като са направени препоръки за емпирично лечение на неусложнени, придобити в обществото инфекции на пикочните пътища.
4. Оценени са възможностите на теста за резидуална антимикробна активност за коректно интерпретиране на резултата от културелното микробиологично изследване и мониториране ефективността на терапията в случаите на инфекции на уринарния тракт.

### **Приноси с потвърдителен характер**

1. Потвърдена е водещата роля на Грам - отрицателните бактерии, доминирани от *E. coli*, като етиологични агенти на инфекции на уринарния тракт в амбулаторни пациенти. В групата на Грам положителните уропатогени, водещи са *E. faecalis*, *S. saprophyticus* и *S. agalactiae*.
2. В унисон с националните данни, потвърдени са високи локални нива на резистентност към аминопеницилини, trimethoprim/sulphamethoxazole и флуорохинолони, което е

основание за ограничаване на емпирична им употреба в случаите на инфекции на уринарния тракт, придобити в обществото.

3. Автоматизиране на целия процес на микробиологичното изследване или на отделни негови етапи, значително съкращава времето до получаване на резултат.

### **Приноси с научно - приложен характер**

1. Представен и оценен е лабораторен алгоритъм, включващ скрининг на уринната проба, последван от микроскопско изследване и бързо изследване на антибиотичната чувствителност директно от клинична проба, съкращаващи времето на диагностичния процес с 24 - 48 часа и напълно съвместими с други утвърдени методики.
2. Отличните показатели, демонстрирани от системата, определят потенциала ѝ за широко приложение в рутинната лабораторна практика и позволяват въвеждането ѝ за работа и с други биологични материали, получени от първично стерилни анатомични области в случаите на инвазивни инфекции, за които е от критична важност бързината на микробиологичното изследване.
3. Въвеждането на RAA теста като част от уринния анализ за диагностика на инфекции на уринарния тракт, е достъпен и много полезен допълнителен инструмент, особено при пациенти с доказана бактериурия и провеждащи антибиотична терапия (както и в случаите на не-съобщена такава), като подпомага интерпретацията на културелното изследване и има потенциала да предотврати получаването на фалшиво отрицателни резултати.

## 7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Публикации в научни списания

1. **В. Снегарова-Тонева, Д. Ниязи, Т. Стоева.** Лабораторна диагностика на уринарния тракт. *Обща медицина*, 2023, 25 (1), 55-64. (SJR 2023, 0.124, Q4)
2. **Snegarova-Toneva V, Niyazi D, Stoeva T.** Automated Urine Screening and Residual Antimicrobial Activity Test for Rapid Diagnosis of Urinary Tract Infections in Ambulatory Patients: A Laboratory Evaluation of HB&L Uroquattro Instrument. *Acta Medica Bulgarica*. 2024;51(s2):29-34. doi:10.2478/amb-2024-0050 (SJR 2023, 0.120, Q4)
3. **Snegarova-Toneva V, Niyazi DS, Stoeva T.** Evaluation of HB&L Uroquattro System for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Directly from Positive Urine Samples. *Acta Microbiologica Bulgarica*. 2024;40(2):199-204. doi:10.59393/amb24400207 (SJR 2024, 0.136, Q4)
4. **Snegarova-Toneva, V., Ermenlieva, N., Niyazi, D., Miroshnikova, M., Stoyanov, S., & Stoeva, T. (2022).** Etiological spectrum and antimicrobial resistance of the most frequently isolated pathogens, associated with urinary tract infections in ambulatory patients. *Scripta Scientifica Medica*, 54(3), 34-39. doi:http://dx.doi.org/10.14748/ssm.v54i2.8475

### Съобщения изнесени на научни форуми

1. **Snegarova, V.; Ermenlieva, N.; Nyazi, D.; Miroshnikova, M.; Stoyanov, S.; Stoeva, T.** Etiological Spectrum and Antimicrobial Resistance of Most Frequently Isolated Pathogens, Associated with Urinary Tract Infections in Ambulatory Patients. *Med. Sci. Forum* 2022, 12, 25. <https://doi.org/10.3390/eca2022-12703> (постер)

2. **Snegarova, V.;** Ermenlieva, N.; Miroshnikova, M.; Stoyanov, S.; Stoeva, T. Experience with HB&L Uroquattro Instrument for Rapid Diagnosis of Urinary Tract Infections in Ambulatory Patients. *Med. Sci.Forum* 2022, 12, 26. <https://doi.org/10.3390/eca2022-12704> (постер)
3. **В. Снегарова-Тонева,** Т. Стоева, Н. Ерменлиева, М. Мирошникова.

Изпитване на антибиотичната чувствителност чрез HB&L Uroquattro апарат на бактериални изолати, асоциирани с уроинфекции в амбулаторни пациенти. XX юбилеен национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, 16.09 –18.09.2022 г., Пловдив, България (орална презентация).

## **Проекти и финансиране**

1. Оценка на автоматизираната система HB&L Uroquattro за бърза диагностика на инфекциите на уринарния тракт. Фонд Наука, Медицински университет - Варна, №19006, 2019 - 2023 г.

## БЛАГОДАРНОСТИ

**Сърдечно благодаря за подкрепата и помощта на:**

- Моят научен ръководител – **проф. д-р Теменуга Стоева, д.м.н.**
- Състава на Катедрата по микробиология и вирусология към Медицински университет – Варна
- Целият екип на лаборатория по микробиология на СМДЛ Лаборекспрес 2000 – Варна
- Г-н Г. Ралчев и екипа на фирма „IVD“