

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” –
ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ



Д-р Стефани Димитрова Радева

**Микробиологични проучвания върху механизмите на резистентност
към бета- лактами и вътреболничното разпространение на клинични
изолати *Serratia marcescens***

Автореферат

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
«Доктор»

Научна специалност:
« **Микробиология** »

Научен ръководител:
Доц. д-р Милена Красиминова Божкова, д.м

Варна

2025

Дисертационният труд съдържа 165 страници и е онагледен с 32 фигури и 10 таблици. Цитирани са 364 литературни източника, от които 3 на кирилица и 361 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:

Проф. д-р Теменуга Стоева, д.м.н

Проф. д-р Румяна Марковска- Давидкова, д.м

Проф. д-р Стефана Събчева, д.м

Доц. д-р Калинка Божкова, д.м

Доц. д-р Денис Ниязи, д.м

Дисертантът е работил като асистент в Катедра „Микробиология и вирусология“ на МУ – Варна до 01.09.2025г и работи като лекар в лабораторията по клинична микробиология на МБАЛ „Сърце и мозък“ , гр. Бургас.

Експерименталната работа е извършена в Катедрата по „Микробиология и вирусология“ при МУ – Варна, УМБАЛ „Света Марина“ – Варна.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на..... от часа в

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на МУ – Варна.

Проучването е финансирано по проект № 21010 на тема: „Антибиотична резистентност, епидемиология и мениджмънт на инфекции, асоциирани със *Serratia marcescens*. ” от Фонд Наука, Медицински университет – Варна.

Съдържание

1. Увод	7
2. Цел и задачи на дисертационния труд	9
3. Материали и методи	10
3.1. Дизайн на проучването	10
3.2. Микробиологични методи	12
3.2.1. Хранителни среди и реактиви	12
3.2.2. Методи за видова идентификация на <i>S. marcescens</i>	12
3.2.3. Методи за изпитване на чувствителността на <i>S. marcescens</i> към антимикробни лекарствени средства.	14
3.2.4. Методи за детекция на бета-лактамази	15
3.2.4.1. Фенотипни методи	15
3.2.4.2. Молекулярно – генетични методи	16
3.3. Методи за епидемиологично типизиране на <i>S. marcescens</i>	21
3.4. Статистически методи	24
4. Резултати и обсъждане	26
4.1. Епидемиология на болничните <i>S. marcescens</i>-асоциирани инфекции	28
4.1.1. Честота на изолиране	28
4.1.2. Връзка между честотата на изолиране и консумацията на colistin	30
4.1.3. Разпределение по видове клинични материали	33
4.1.4. Водещи клинични синдроми при хоспитализация	35
4.1.5. Рискови фактори за заболяемост и 30-дневен леталитет	37
4.2. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на всички болнични изолати <i>S. marcescens</i> и основни терапевтични подходи за периода 2016-2023 г.	53
4.3. Микробиологични проучвания върху резистентността към бета-лактамни антибиотици на колекция от 200 клинични изолата <i>S. marcescens</i>.	62
4.3.1. Резистентност към набор от антимикробни лекарствени средства.	62
4.3.2. Механизми на резистентност към β -лактамни антибиотици	68
4.3.2.1. Детекция на широкоспектърни бета-лактамази чрез фенотипни методи	68
4.3.2.2. Детекция на широкоспектърни бета-лактамази чрез молекулярно-генетични методи	74

4.4. Проучване на болничното разпространение на <i>S. marcescens</i> чрез RAPD и ERIC PCR	84
5. Изводи	87
6. Справка за приносите на дисертационния труд	89
7. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд	90

Използвани съкращения

НЦЗПБ – Национален център по заразни и паразитни болести

AmpC – β -лактамази от клас C по Ambler (Ambler class C β -lactamases)

DDST – тест за двойно-дисксова синергия (Double Disk Synergy Test)

ERIC-PCR – ентеробактериален повтарящ се междугенен консенсус – полимеразна верижна реакция (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – PCR)

ESKAPE – група мултирезистентни болнични патогени: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.

ESBLs – широкоспектърни β -лактамази (Extended-Spectrum Beta-Lactamases)

EUCAST – Европейски комитет по тестване на антимикробна чувствителност (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

ECDC – Европейски център за превенция и контрол на заболяванията (European Centre for Disease Prevention and Control)

CLSI – Институт за клинични и лабораторни стандарти (Clinical and Laboratory Standards Institute)

KPC – *Klebsiella pneumoniae* карбапенемаза (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase)

MDR – множествена лекарствена резистентност (Multidrug Resistance)

NDM – метало-бета-лактамаза от Ню Делхи (New Delhi Metallo- β -lactamase)

PCR – полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction)

RAPD-PCR – произволна амплификация на полиморфна ДНК – полимеразна верижна реакция (Random Amplification of Polymorphic DNA – PCR)

PFGE – електрофореза с пулсиращо електрично поле (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

PBP – пеницилин-свързващи протеини (Penicillin-Binding Proteins)

SME – ензим *Serratia marcescens* (*Serratia marcescens* Enzyme)

IMP – имипенемаза (Imipenemase)

VIM – Verona-интегрон кодирана метало-бета-лактамаза (Verona Integron-Encoded Metallo- β -Lactamase)

AK – амикацин (Amikacin)

CAZ – цефтазидим (Ceftazidime)

CRO – цефтриаксон (Ceftriaxone)

CTX-M – цефотаксимаза от Мюнхен (Cefotaximase-Munich)

CIP – ципрофлоксацин (Ciprofloxacin)

IPM – имипенем (Imipenem)

MEM – меропенем (Meropenem)

MBL – метало-бета-лактамаза (Metallo- β -lactamase)

FER – цефепим (Cefepime)

GM – гентамицин (Gentamicin)

LVX – левофлоксацин (Levofloxacin)

SXT – триметоприм/сулфаметоксазол (Trimethoprim/Sulfamethoxazole)

TZP – пиперацилин/тазобактам (Piperacillin/Tazobactam)

MIC (МПК) – минимална потискаща концентрация (Minimum Inhibitory Concentration)

NCBI – Национален център за биотехнологична информация (National Center for Biotechnology Information)

DHFR – дихидрофолат редуктаза (Dihydrofolate Reductase)

DHPS – дихидроптероат синтетаза (Dihydropteroate Synthase)

MLST – многолокусно секвениране (Multilocus Sequence Typing)

WGS – цялостно геномно секвениране (Whole Genome Sequencing)

AFLP – специфична амплификация на полиморфни ДНК рестриктазни фрагменти (Amplified Fragment Length Polymorphism)

IQR – интерквартилен обхват (Interquartile Range)

ВБИ – вътреболнична инфекция (Healthcare-Associated Infection)

ICU – интензивно отделение (Intensive Care Unit)

1. Увод

В световен мащаб етиологичният спектър на предизвикващите вътреболнични инфекции микроорганизми се променя с годините. Повсеместно се наблюдава нарастване на честотата на нозокомиални инфекции, свързани с опортюнистични патогени от групата на Грам-отрицателните бактерии. Особено място в тази голяма и разнородна група заема *Serratia marcescens*. Дълго считан за безвреден сапрофит, днес вече е известно, че *S. marcescens* сравнително рядко причинява придобити в обществото инфекции, но е изключително важен вътреболничен патоген, асоцииран с редица нозокомиални инфекции сред пациенти във всички възрастови групи. Широко разпространен в околната среда и изключително адаптивен, този бактериален вид е отлично приспособим и към условията в болничните екосистеми, където нерядко причинява епидемични взривове.

В научната литература често се съобщава за епидемични взривове, причинени от *S. marcescens*- докладвани са над 100 такива в периода 1968- 2019 г. (Tavares-Carreón F, 2023). Най-често се наблюдават уроинфекции, респираторни и раневи инфекции. Нерядко генерализирането на възпалителния процес клинично се проявява като сепсис. Като най-рискови групи за развитие на *S. marcescens*-асоциирани инфекции се определят пациентите с продължителна антибиотична терапия и дълъг болничен престой, имунокомпрометирани пациенти и тези, претърпели инвазивни диагностични и/или терапевтични интервенции (Tóth A., 2020). Съвременният етиологичен профил на най-честите бактериални патогени, причиняващи животозастрашаващи инфекции, свързани с медицинското обслужване, неизменно отрежда на *Serratia* sp., място сред десетте най-често изолирани видове (ECDC, 2024).

Алармиращи са и данните за повсеместно увеличаващата се антибиотична резистентност- една от най-големите глобални заплахи за общественото здраве и развитие. Установено е, че тя е пряка причина за 1.27 милиона смъртни случая в света през 2019 г. и е допринесла косвено за други 4.95 милиона смъртни случая (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). България е сред държавите в Европа с най-висока консумация на антибиотици и отчетлив тренд към повишаване за периода 2019-2023 г. според актуални данни на ECDC (ECDC, 2024). Бета-

лактамите (вкл. високогенерационни цефалоспорици и карбапенеми) са сред най-широко използваните антибиотични групи в клиничната практика у нас.

Развитието на устойчивост към тях като логично следствие на нерационалната им употреба значително редуцира клиничната им ефективност. Вродената устойчивост на *S. marcescens* към стратегически антобиотици, както и придобиването на нови детерминанти на резистентност в този смисъл се явява потенциално сериозен риск за общественото здраве.

Поради широкото разпространение на *S. marcescens*, както и разнообразните механизми за придобиване на антибиотична резистентност, този бактериален вид е от важно значение за клиничната практика. Високата честота на вътреболнични инфекции, особено сред рискови групи пациенти - имунокомпрометирани, новородени, деца и хоспитализирани в интензивни отделения, подчертава необходимостта от бърза и прецизна микробиологична идентификация и своевременно прилагане на адекватна антимикробна терапия, съобразена с локалните нива на резистентност. Това налага натрупване на достатъчно богата база данни за чувствителността на *S. marcescens* към антибиотични средства, подробно изучаване на конкретните механизми на резистентност към тях, както и детайлен анализ на болничната епидемиология на тези инфекции.

2. Цел и задачи на дисертационния труд

Проблемите, изложени в литературния обзор определиха следната цел на настоящата работа: Да се проучат механизмите на резистентност към бета-лактамни антибиотици и да се анализират основните аспекти на вътреболничното разпространение на клинични изолати *S. marcescens*.

Във връзка с това се поставиха следните задачи:

1. Да се изследва епидемиологията на *S. marcescens*-асоциираните инфекции чрез: определяне на честотата им на изолиране и динамиката във времето; анализ на връзката между честотата на изолиране и консумацията на colistin; разпределение на изолатите според вида на клиничния материал; характеризиране на водещите клинични синдроми при хоспитализация; идентифициране на рисковите фактори за развитие на *S. marcescens*-асоциирани инфекции и оценка на тяхното влияние върху 30-дневния леталитет.
2. Да се анализира динамиката в антибиотична резистентност на 488 клинични изолата *S. marcescens* през проучвания период, и да се оцени връзката на резистентността с леталитета, както и влиянието на различните терапевтични подходи върху клиничния изход.
3. Да се определи и анализира *in vitro* чувствителността на колекция от 200 клинични изолата *S. marcescens* към набор от антибиотични лекарствени средства.
4. Чрез фенотипни и молекулярно-генетични методи да се проучи разпространението на гени, кодиращи широкоспектърни бета-лактамази сред колекциониранияте изолати *S. marcescens*.
5. Да се оцени ефективността на RAPD и ERIC като методи за епидемиологично типизиране на колекциониранияте изолати *S. marcescens*.

3. Материали и методи

3.1. Дизайн на проучването

Проучването е с ретроспективен дизайн, анализиращ данни, свързани с десет различни променливи величини при всички пациенти с клинично проявена *S. marcescens* – асоциирана инфекция, лекувани в УМБАЛ „Света Марина“ – Варна в периода 2016 – 2023 г. Основен критерий за включване в проучването е наличието на поне един епизод на клинично установена и доказана чрез микробиологично изследване *S. marcescens*–асоциирана инфекция в рамките на проучвания период. Повтарящи се изолати от един и същ пациент са изключвани от проучването.

В рамките на целия проучван период е селектирана и проучена детайлно чрез микробиологични методи колекция от 200 недублиращи се клинични изолати *S. marcescens* от различни пациенти, с различни профили на резистентност към бета-лактамни антибиотици и от различни типове клинични материали (урини, кръв, раневи секрети, храчки и др.). Основни критерии при подбора на щамовете от колекцията са: всички инвазивни изолати *S. marcescens* – изолати от кръв, независимо от профила им на резистентност към антибактериални лекарствени средства, изолати от първично стерилни анатомични области – от трахеални секрети, бронхо-алвеоларни лаважи, раневи секрети и пунктати от абсцеси. Изолатите от урини, както и секрети от горните дихателни пътища, уретрални секрети, кожни и лигавични отривки, т.е. от първично нестерилно място, бяха включени в колекцията само в случаите, в които първичните анализи на антибиотичната им чувствителност установи резистентност към широкоспектърни цефалоспорини (ceftriaxone, ceftazidime, cefepime) и/или карбапенеми (imipenem, meropenem).

За целите на епидемиологичното проучване са подробно анализирани медицинските досиета на 488 пациента, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“, Варна в периода 2016-2023 г. Болничната и Лабораторната информационни системи са използвани за събирането на информация, отнасяща се до доказване и анализ на епизодите на клинично значима инфекция, свързана със *S. marcescens* в този период. Проучването има за цел да изследва епидемиологията на *S. marcescens*- асоциираните инфекции чрез: определяне на честотата им на изолиране и динамиката във времето; анализ на връзката между честотата на изолиране на *S. marcescens* и обобщената консумация на антибиотика colistin;

разпределение на изолатите *S. marcescens* според вида на клиничния материал; характеризиране на водещите клинични синдроми при хоспитализация; идентифициране на рисковите фактори за развитие на *S. marcescens*-асоциирани инфекции и оценка на тяхното влияние върху 30-дневния леталитет., Променливите, за които се събра информация са следните:

1. Пол
2. Възраст
3. Продължителност на настоящата хоспитализация
4. Данни за предшестваща хоспитализация
5. Прилагане на оперативно лечение
6. Престой в интензивна клиника
7. Вид на основното заболяване
8. Наличие и вид на придружаващите заболявания
9. Вид на провежданата антибиотична терапия
10. Изход от лечението

С цел изследване на корелацията между експозицията на colistin и честотата на *Serratia*-асоциираните инфекции се анализираха данни за относителната честота на изолиране на *S. marcescens* (изразена като процент от всички бактериални изолати, получени от пациенти в болницата) и консумацията на colistin, представена чрез дефинирана дневна доза (Defined Daily Dose, DDD), в периода 2016–2023 г. Този параметър е използван като приближен индикатор за оценка на експозицията към този антибиотик в болничната среда.

Основни дефиниции:

Бактериемия - наличие на бактерии в кръвта.

Бактериална инфекция на кръвта - изолиране на бактериален патоген, който не е част от резидентната микрофлора, от една или повече хемокултури на фона някой от следните симптоми: повишена температура, втрисане и/или хипотония.

Множествена резистентност - резистентност към 3 или повече от следните антимикробни групи – цефалоспорини от трета генерация, piperacillin/tazobactam, карбапенеми, флуорохинолони, аминогликозиди.

Предшестваща хоспитализация - лечение в същата или друга болница, установено в медицинските досиета на пациентите до три месеца преди периода на настоящата хоспитализация.

Вътреболнична инфекция (ВБИ) - инфекция, развила се 48 часа или повече след постъпване в болницата, при отсъствие на данни (от анамнеза, статус и проведени преди настоящата хоспитализация клинично-лабораторни тестове) заболяването да е било в инкубационен период към момента на хоспитализацията.

Проучването е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания с протокол № 115/ 31.03.2022 г.

3.2. Микробиологични методи

Клинични изолати *S. marcescens*

В настоящото проучване за целите на микробиологичния анализ е изследвана колекция от общо 200 клинични изолата на *S. marcescens*, получени от 200 различни пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Марина“ в периода 2016 – 2023 г.

В цялостното проучване са включени всички 488 клинично значими изолати *S. marcescens*, получени от пациенти, независимо от тяхната възраст, пол, диагноза и отделение, в което са хоспитализирани. От всеки пациент е анализиран само един изолат, с цел избягване на дублирането. Всички 200, включени в колекцията щамове са изолирани от клинични материали, изпратени за анализ след 48 часа от началото на хоспитализацията, при липса на данни за предшестваща *S. marcescens*-асоциирана инфекция, и са класифицирани като вътреболнични.

3.2.1. Хранителни среди и реактиви

За изолация, биохимична идентификация, тестване на антибиотична чувствителност и съхранение на изолатите са използвани следните хранителни среди: кръвен агар с 5% овнешка кръв, МакКонки агар и Мюлер-Хинтон агар (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, UK).

3.2.2. Методи за видова идентификация на *S. marcescens*

Първоначалната идентификация на всички изолати *S. marcescens* е извършена чрез конвенционални биохимични тестове, включващи: ферментация на глюкоза и лактоза с продукция на киселина и отделяне на газ в среда на Клиглер,

продукция на индол от триптофан, уреазна активност, усвояване на цитрат в средата на Симонс, както и декарбоксилиране на аминокиселините лизин и орнитин (Бул Био - НЦЗПБ).

- **Идентификация чрез автоматизирана система Phoenix 50 (BD)**

Панелите NMIC/ID-76 на Phoenix 50 са предназначени за идентификация на различни клинично значими Грам-отрицателни бактерии, включително стриктно аеробни и факултативно анаеробни видове. Методът на идентификация се основава на анализ на метаболитната активност на изследваните микроорганизми. Всеки панел съдържа 45 микроямки, включващи изсушени и лиофилизирани биохимични субстрати, както и 2 контролни ямки за флуоресценция. В състава на панела са включени: 16 ензимни субстрата, 23 субстрата като източници на въглерод и 5 теста за утилизация и инхибиране на бактериалния растеж.

Съгласно инструкциите на производителя, бактериалната суспензия се приготвя в ID AST бульонна среда до оптична плътност 0.5 по McFarland, след което се инокулира в панела за последващ анализ.

- **Идентификация чрез автоматизирана система Vitek 2 (bioMérieux, France)**

Картите ID-GN на Vitek 2 са предназначени за идентификация на над 150 различни Грам-отрицателни бактериални видове, Всеки панел съдържа 47 биохимични теста и една отрицателна контролна ямка. Отрицателната контролна ямка на декарбоксилазата (ямка 52) служи като базова референтна линия за теста за декарбоксилазна активност.

Съгласно инструкциите на производителя, бактериалната суспензия се приготвя в 3 mL стерилен физиологичен разтвор, като оптичната ѝ плътност трябва да бъде в границите 0.50 – 0.63 по McFarland Standard.

- **Идентификация чрез мас спектрометричен анализ - MALDI Biotyper Sirius (Bruker, Germany)**

Методът се основава на принципа на матрично-асистирана лазерна десорбция/йонизация с анализ „време на полет“ (MALDI-TOF MS), при който се регистрира специфичният протеинов профил на микроорганизмите, предимно рибозомни протеини в диапазона 2–20 kDa. За подготовка на пробата от изолираната бактериална култура се взема отделна колония и се нанася точково върху таргет-пластина, покрива се с 1 µL 70 % мравчена киселина, след което се добавя 1 µL матричен разтвор – α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. След изсъхване, пластината се поставя в апарата, където под въздействие на UV лазер матрицата

абсорбира енергията и предизвиква йонизация на микробните протеини. Получените йони се ускоряват чрез електрическо поле и навлизат в TOF-анализатор, където времето им на полет се измерва в зависимост от съотношението маса/заряд. Генерираният спектрален профил се сравнява с вградената референтна база данни MBT Compass Library, съдържаща над 4000 записа.

3.2.3. Методи за изпитване на чувствителността на *S. marcescens* към антимикробни лекарствени средства.

- **Дисково- дифузионен метод на Bauer-Kirby**

Чувствителността на изолатите *S. marcescens* към 12 антибактериални лекарствени средства се изследва чрез дисково-дифузионния метод на Bauer-Kirby. Тестът се проведе върху стандартни петриеве панички с Мюлер-Хинтон агар, като гъстотата на инокулума беше коригирана до 0.5 по скалата на McFarland. Инкубацията се проведе при температура $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ за 18 ± 2 часа. Диаметрите на зоните на инхибиране се измериха от външната страна на петриевите панички върху тъмен фон с отразена светлина.

Използваха се следните антибиотични дискове:

- Piperacillin/Tazobactam (30/6 μg)
- Amoxicillin/clavulanic acid (30 μg)
- Ceftriaxone (30 μg)
- Ceftazidime (30 μg)
- Cefepime (30 μg)
- Imipenem (10 μg)
- Meropenem (10 μg)
- Amikacin (30 μg)
- Gentamicin (30 μg)
- Ciprofloxacin (5 μg)
- Levofloxacin (5 μg)
- Trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/ 23.75 μg)

За контрола на антибиотичните дискове бяха използвани следните референтни щамове: *E.coli* ATCC 25922. За изпитване и интерпретиране чувствителността към антибиотичните препарати се използваха критериите на European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) за 2023 г. за разред *Enterobacterales* – EUCAST v.13

- **Определяне на МПК на colistin чрез микродилуционния метод на серийните разреждания в бульон.**

Чувствителността към colistin, първоначално определена чрез автоматизираните системи Phoenix и Vitek2, беше потвърждавана чрез микродилуционния метод със серийни разреждания в бульон. За целта бяха използвани SENSITITRE Susceptibility плаки (TREK Diagnostic systems). Плаките са натоварени с двукратно нарастващи концентрации на антибиотика (от 0.25 до 16 µg/ml). Използва се 24-часова чиста култура от Мак Конки агар на изпитвания изолат. Според препоръката на производителя, няколко колонии от чистата култура се суспендираха в стерилна дестилирана вода до гъстота на инокулума 0.5 McFarland. 50µl от тази бульонна суспензия бе прехвърлена в Mueller-Hinton бульон до получаване на инокулум с гъстота 5×10^5 cfu/ml, с който бе инокулирана плаката. След 18-24 часова инкубация на 36°C се отчете при отразена светлина на тъмен фон наличие или отсъствие на бактериален растеж във всяка ямка.

3.2.4. Методи за детекция на бета-лактамази

3.2.4.1. Фенотипни методи

- **Двойно-дисков тест за синергизъм (Double disk synergy test – DDST) по метода на Jarlier за детекция на широкоспектърни бета-лактамази (Jarlier V, 1988)**

При общо 108 изолата, резистентни на трета генерация цефалоспорини, беше проведен двойно-дисков тест за синергизъм с цел скрининг за продукция на широкоспектърни бета-лактамази. За теста се използваха следните антибиотични дискове: amoxicillin/clavulanic acid (30 µg); ceftazidime (30 µg); ceftriaxone (30 µg) и cefepime (30 µg).

Техника: Приложи се комбиниран дисков тест с ceftazidime и cefepime, разположени на 2.5 cm разстояние (от център до център) от диска amoxicillin/clavulanic acid. След инкубиране при 35–37 °C за 18–24 часа, при наличие на разширяване на зоната на инхибиране около цефалоспориновите дискове към диска с amoxicillin/clavulanic acid, се интерпретираше като феномен на синергизъм и се тълкуваше като положителен резултат за ESBL-продукция.

- **Модифициран Hodge тест за доказване на изолати, продуценти на карбапенемази (CLSI, 2010)**

Техника: Приготвя се 0.5 McFarland разреждане на *E. coli* ATCC 25922 в 5 ml физиологичен разтвор. Разреждане 1:10 се инокулира върху петри с Mueller Hinton агар. В центъра на петрито се поставя диск мегорепем 10 µg. Изпитваните щамове се посяват в права линия (по хода на радиуса) от ръба на диска до ръба на петрито и се инкубират на 35-37°C за 16–24 часа. След 16-24 часа, се търси наличие на детелинообразно деформиране на зоната на задържан растеж на *E.coli* около диска по протежение на тествания щам като израз на положителен тест. Отрицателният не показва растеж на *E. coli* 25922 по протежение на тествания щам в зоната на дисковата дифузия.

- **Имунохроматографски тест RESIST-3 O.K.N. (Coris BioConcept, Белгия)**

За бързото фенотипно потвърждение на продукция на карбапенемази от клас А, В и D се използва търговски имунохроматографски тест RESIST-3 O.K.N. (Coris BioConcept, Белгия), предназначен за качествено откриване на следните ензими: карбапенемази от клас А, В и D (KPC, NDM, OXA-48-подобни ензими). Методът се основава на моноклонални антитела, специфични към съответните ензими, фиксирани в тестовото устройство. Резултатите се интерпретират чрез визуализация на цветни линии, съответстващи на специфичните ензими:

- появата на една контролна линия (С) без допълнителни тестови линии се счита за отрицателен резултат;
- появата на контролна линия и специфична тестова линия (К, N или O) се интерпретира като положителен резултат за съответната карбапенемаза.

Изолатите се култивираха върху твърда хранителна среда (MacConkey агар), след което се приготвиха суспензии от колонии в буферен разтвор, предоставен от производителя. По 100 µl от получената суспензия се нанасяше в тестовата ямка на касетата. Резултатите се отчетоха а визуално след 15 минути.

3.2.4.2. Молекулярно – генетични методи

Полимеразно-верижната реакция е метод за размножаване на даден фрагмент ДНК, който служи като матрица. Двойно-верижната ДНК се денатурира термично, възникващите единични вериги се хибридизират с два къси олигонуклеотида, който служат като праймери на синтезата на ДНК и маркират точно интересуващата ни последователност. В резултат на този метод може точно да се определи групата на изследваната бета-лактамаза, използвайки специфични за отделните групи праймери.

Известна е Tris-зависимата активност на ензима ДНК-аза, която допълнително затруднява изолирането на ДНК при *S. marcescens*, тъй като Tris е компонент на стандартните протоколи за екстракция и елуиране на нуклеинови киселини (O'Reilly LC, 2011). Vafina и колектив изследват активността на ензима при различни концентрации и условия на Tris, като установяват, че дори при ниска концентрация (0,08 M Tris-HCl) тя се повишава стократно (Vafina G, 2018). За получаване на ДНК от *S. marcescens* са разработени различни подходи, целящи инактивиране на ДНК-азната активност и предотвратяване на авторазграждането, включително използване на SDS, фенол-хлороформ-изоамилов алкохол, протеиназа К, фиксиране с формалдехид, както и търговски комплекти за екстракция (Polyzou A, 2020). Въпреки че всички тези методи при определени условия водят до успешна изолация на ДНК, те имат съществени ограничения, свързани с продължителност на протоколите, висока цена на реактивите, токсичност и необходимост от специализирано оборудване (Hassanzadeh S, 2016).

Методът, който използвахме е бърз и евтин метод за получаване на ДНК от *S. marcescens*, който може да се използва в малки лаборатории с ограничени ресурси.

Екстракционната процедура включва следните стъпки:

1. 4-5 еднакви колонии се ресуспендираха в 200 µl дестилирана вода.
2. Вортексираха се до хомогенизиране и помътняване напълно на дестилираната вода.
3. Центруфугираха се за 5 минути на 10 000 rpm, на 4°C.
4. Отпипетира се и се изхвърли супернатантата.
5. Ресуспендира се утайката с 200 µl дестилирана вода.
6. Нагрива се за 20 минути на 100°C.
7. Центруфугира се за 5 минути на 10 000 rpm, на 4°C.
8. Супернатантата се отпипетира и се прехвърли в нова епруветка, а утайката се изхвърли.
9. Добави се 600 µl леден етанол 95%.
10. Добави се 20 µl натриев ацетат 3M, pH 5.2-5.5.
11. Вортексира се до пълно смесване на съставките.
12. Постава се във фризер на -20°C за 60 минути.
13. Центруфугира се на 10 000 rpm за 30 min на 4°C.

14. Отпипетира се супернатантата и се изхвърли.
15. Добави се 500 μ l 70% етанол.
16. Центрофугира се на 10 000 rpm на 4°C.
17. Повториха се стъпки 14 – 16.
18. Отпипетира се и се изхвърли етанола.
19. Инкубира се на стайна температура за 1 минута с отворена капачка до изпаряване на остатъчния етанол.
20. Ресуспендира се с дестилирана вода или DNase-free water, 200 μ l.
21. Епруветките с екстрахираната ДНК се съхраняват на -20°C.

След инкубиране на -20°C ДНК преципитира като бяла пелена на дъното на епруветката.

- **Полимеразно – верижна реакция (PCR) за доказване на гени, кодиращи продукцията на бета-лактамази от клас А (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX}, *bla*_{KPC}), клас В (*bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}) и клас D (*bla*_{OXA-48}).**

Групово специфична PCR за детекция на гени, кодиращи продукцията на широкоспектърни бета-лактамази (ESBL) от групите CTX, SHV и TEM беше приложена при всички 200 изолати *S. marcescens* от колекцията, резистентни към трета генерация цефалоспорини.

Апарати:

За амплификация на таргетираните гени се използваха следните PCR термосайклъри: T100™ Thermal Cycler (*Bio-Rad, France*) и SaCycler-96 (*Sacace, Italy*).

Полимеразната верижна реакция се изпълняваше в реакционен обем от 25 μ L, като се използва 1 μ L от получените ДНК екстракти. Реакционната смес съдържа:

- 2.5 μ L от 10 $\times$ reaction buffer, съдържащ 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂
- 0.2 – 0.4 mM от dNTP mix (*dATP, dTTP, dGTP, dCTP; GenetBio, Korea*)
- 3 – 10 pmol/ μ L от всеки праймер
- 0.6 U/ μ L Prime Taq DNA polymerase (*GenetBio Inc, Korea*)
- Останалият обем се допълваше с двойно дестилирана вода.

Използваните праймери, температурите на хибридизация и размерите на амплификационните продукти са представени в Таблица 1. Всички използвани праймери са синтезирани от Metabion, Germany.

Таблица 1. Праймери, използвани в PCR реакциите за доказване на бета-лактамази

Праймери		t° на хибридизация	Очакван размер	Литература
TEM	TEM-F: ata aaa ttc ttg aag ac TEM-R: tta cca atg ctt aat ca	43 °C	1075 bp	Markovska R, 2008
SHV	SHV-F: act gaa tga ggc gct tcc SHV-R: tcc cgc aga taa atc acc	61 °C	297 bp	
CTX-M	CTX-M-F: cva tgt gca gya cca gta a CTX-M-R: arg tsa cca gaa yma gcg g	61 °C	585 bp	
KPC	F: cgt cta gtt ctg ctg tct tg R: ctt gtc atc ctt gtt agg cg	57 °C	798 bp	Poirel L, 2011
VIM	F: gat ggt gtt tgg tcg cat a R: cga atg cgc agc acc ag	54 °C	390 bp	
OXA-48	F: gcg tgg tta agg atg aac ac R: cat caa gtt caa ccc aac cg	57 °C	438 bp	
NDM	F: ggt ttg gcg atc tgg ttt tc R: cgg att ggc tca tca cga tc	57 °C	621 bp	
IMP	F: gga ata gag tgg ctt aay tct c R: ggt tta aya aaa caa cca cc	54 °C	270 bp	

Всички PCR реакции включват начална денатурация на 94°C или 95°C за 5 минути, както и финална елонгация на 72°C за 5 минути.

PCR TEM: амплификация в 35 цикъла:

- денатурация на 94°C за 30 секунди
- хибридизация на 43°C за 30 секунди
- елонгация на 72°C за 1 минута

Multiplex PCR SHV/CTX-M: амплификация в 30 цикъла:

- денатурация на 95°C за 45 секунди
- хибридизация на 61°C за 45 секунди
- елонгация на 72°C за 45 секунди

Multiplex PCR VIM/IMP: амплификация в 35 цикъла:

- денатурация на 95°C за 30 секунди
- хибридизация на 54°C за 30 секунди
- елонгация на 72°C за 45 секунди

Multiplex PCR KPC/NDM/OXA-48: амплификация в 35 цикъла:

- денатурация на 95°C за 30 секунди
- хибридизация на 57°C за 30 секунди
- елонгация на 72°C за 1 минута

След амплификацията всички PCR продукти са подложени на електрофореза в 1.5% агарозен гел, което се случва в следните стъпки:

- Агароза Standard EEO (SeaKem LE Agarose, LONZA, Rockland, ME) се разтопява в 160 ml 1x TAE буфер (40 mM Tris, 20 mM оцетна киселина, 1 mM EDTA) със магнитна бъркалка на загряване за 5 мин. до достигане на хомогенна смес.
- Добавя се етидиев бромид до крайна концентрация 0.5 µg/ml.
- Агарозата се излива във ваничка за хоризонтална електрофореза и се поставя гребен за електрофореза.
- След полимеризиране на гела в електрофоретичната вана се налива 1x TAE буфер, гребенът се отстранява и се накапват пробите.
- Предварително 10 µl PCR продукт се смесва с 2 µl 6x Gel Loading Dye (New England BioLabs, USA). Във всяка електрофореза се оставя един старт, в който се накапва молекулен маркер Quickload 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs, USA).
- Електрофорезата се провежда за 60 минути при 400 mA и 120 V.

Амплификационните продукти са визуализирани чрез система UVP BioDoc-ITTM Imaging System (Analytik Jena, Germany).

Real-time PCR MM GRAM NEG RES (Alifax S.r.l., Italy) се приложи за доказване на гените, кодиращи карбапенемази, в двата карбапенем-резистентни

изолата. Методът използва предварително заредени „lab-on-chip“ касети с лиофилизирани реагенти, позволяващи едновременно провеждане на шест мултиплексни PCR реакции. **Техника:** Колония от изолата се суспендира в 1 ml стерилен физиологичен разтвор (0.9% NaCl), като от получената суспензия се пипетира 1–2 µl, които се зареждат в касетата за последващо изследване. Панелът е насочен към най-честите гени за продукция на карбапенемази: *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{SHV/SHV-ESBL}, *bla*_{CTX-M-1/9}, *bla*_{CTX-M-2/8}, *bla*_{CMY-2}, *mcr-1* и *mcr-2*. Резултатите се интерпретират качествено (наличие/липса на таргетния ген) чрез софтуера на системата.

3.3. Методи за епидемиологично типизиране на *S. marcescens*

За целите на епидемиологичното типизиране на изолати *S. marcescens* се използва автоматизиран кит за ДНК екстракция SaMag Bacterial DNA Extraction Kit (Sacace, Italy). Методът за епидемиологично типизиране, който бе приложен в настоящия труд, е PCR- базираната техника RAPD и ERIC. Използваните при RAPD праймери са показани в таблица 2.

Таблица 2. Използвани праймери за RAPD

RAPD вариант	Праймери	Цикл и	Хибридиза ция (°C)	Време на елонгаци я (мин)	PCR обем (µl)	Праймер конц. (pmol/µl)	Taq конц.(U/µl)	ДНК (µl)	Източник
RAPD2	1254 (5'- CCGCAGCCAA-3') и 1283 (5'- GCGATCCCAA-3')	35	32	3	25	2.5	0.36	2	Hejazi A, 1997
RAPD3	1254 (3'- CCGCACCCAA-5') и HLWL74 (3'- ACGTATCTGC-5')	35	32	3	25	2.5	0.36	2	Hejazi A, 1997
RAPD5	5'-AACGCGCAAC- 3'	45	36	2	25	2.5	0.36	2	Park SB, 2022
RAPD AB106	AB106 (5'-TGC TCT GCC C-3')	35	32	3	25	15.0	1.0	3	van den Braak N, 2000
RAPD AB111	AB111 (5'-GTA GAC CCG T-3')	35	32	3	25	15.0	1.0	3	van den Braak N, 2000
RAPD AP4	AP4 (5'-TCA CGC TGC A-3')	35	32	3	25	15.0	1.0	3	Dimov SG, 2015/2016

PCR реакциите са изпълнявани в обем 25 µl. Реакционната смес включва:

- 2.5 µl от 10x reaction buffer 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂
- 1 mM dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (GenetBio, Korea)
- 15 pmol/µl от всеки праймер
- 1 U/µl Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea)
- 3 µl от получените ДНК екстракти.

Амплификацията се състои от начална денатурация на 94°C за 5 мин, финална елонгация на 72°C за 5 мин, както и от 35 (или 45 при RAPD 5) цикъла:

- денатурация на 94°C за 1 мин.
- хибридизация на 32°C за 1 мин.
- елонгация на 72°C за 3 минути (2 при RAPD 5)

За ERIC-PCR се използваха: (Bakhshi B, 2018)

ERIC 1R: ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C

ERIC 2: AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC

Реакционната смес включва:

- 2.5 µl от 10x reaction buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂
- 1 mM dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (GenetBio, Korea)
- 15 pmol/µl от всеки праймер
- 2.5 U/µl Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea)
- 1.5 µl от получените ДНК екстракти.

Амплификацията се състои от начална денатурация на 94°C за 5 мин., елонгация на 72°C за 10 мин, както и от 35 цикъла:

- денатурация на 94°C за 1 мин.
- хибридизация на 54°C за 1 мин.
- елонгация на 72°C за 5 мин.

След амплификация 10 µl от всеки продукт, предварително смесени с 2 µl 6x Gel Loading Dye (New England BioLabs, USA) се подложи на електрофореза в 1.5% агаров гел при 120 V, 400 mA за 75 мин. Продуктите са визуализирани с помощта на видеодокументална UV система и 0.5 µg/ml етидиев бромид. Размерът

на продуктите е определен чрез сравняване с ДНК маркер: Quickload 100bp DNA Ladder (New England Biolabs, USA).

3.4. Статистически методи

Избраните статистически методи са съобразени с характера на изследваните задачи, типа на анализирания променливи и скалите, по които те са измервани. При описателния анализ качествените променливи са представени чрез абсолютни и относителни честоти, докато количествените променливи са описани чрез средна стойност и стандартно отклонение или чрез медиана и интерквартилен обхват (IQR). Изборът между тези показатели зависи от разпределението на данните, което е предварително проверено с теста на Колмогоров-Смирнов.

За целите на проучването, дефинирането на инфекциите като вътрешболнични се прие в случаите, в които изолирането на *S. marcescens* е извършено след 48 час от момента на хоспитализацията. Изолирането на *S. marcescens* в рамките на първите 48 часа от момента на хоспитализацията бе интерпретирано като инфекция, придобита в обществото при липса на данни за хоспитализиране в рамките на предходните 3 месеца.

Тридесетдневния леталитет в цялата проучвана група пациенти е изчислен като броят на пациентите, починали в интервал от 30 дни от поставяне на диагнозата е разделен на общия брой пациенти с инфекции асоциирани със *S. marcescens* (представен в %).

Всички честотни показатели за леталитет, кумулативна заболяемост и болестност са представени заедно с 95% доверителни интервали, осигуряващи статистическа прецизност на оценките. За проверка на хипотези, свързани с връзката между две качествени променливи (например между изхода от заболяването и антимикробната резистентност), са използвани хи-квадрат тестът и точният тест на Фишер, в зависимост от очакваните честоти в клетките на контингентната таблица.

Динамиката на антибиотичната резистентност във времето е анализирана чрез хи-квадрат тест за тренд (Chi-squared test for trend), който позволява да се оцени дали има статистически значима тенденция в измененията на резистентността през различни периоди.

Използваха се корелационни тестове (Пиърсън и Спирман), лагова регресия и коефициент на детерминация (R^2), за да изследва връзката между консумацията на colistin и честотата на изолирането на *S. marcescens*.

Приложиха се еднофакторна и многофакторна логистични регресии за прогнозиране на вероятността за летален изход. Критерият на Валд бе приложен за оценка на значимостта на независимите променливи (като възраст, вид на клиниката, предшестваща хоспитализация, клиничен синдром, проведено хирургично или интензивно лечение) в регресионните модели. Бета-коефициентът (β) в логистичната регресия отразява посоката и силата на връзката между независимата променлива и вероятността за настъпване на изследвания изход. Положителните стойности на β показват повишен риск, а отрицателните – понижен риск. Експоненцирането на β (e^{β}) дава отношението на шансовете (Odds Ratio), което позволява интерпретация на резултатите в практически контекст.

При проверка на хипотези нивото на значимост на нулевата хипотеза беше определено според установената практика ($\alpha = 0.05$) чрез прилагане на t- теста.

Резултатите са представени в обобщен вид в многомерни таблици и са илюстрирани с подходящи графики: стълбовидни и линейни. Всички анализи са извършени със статистическия пакет IBM SPSS, а графиките са построени с Python.

4. Резултати и обсъждане

4.1 Епидемиология на болничните *S. marcescens* – асоциирани инфекции

Епидемиологията на инфекциозните заболявания се формира под въздействието на редица фактори, включително характеристиките на пациентската популация, болничната среда и качеството на предоставяните здравни грижи. В настоящото ретроспективно проучване са анализирани медицински досиета на 488 пациенти с микробиологично потвърдена инфекция, причинена от *S. marcescens*, хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна в периода 2016-2023 г., както и систематизираните данни за дейността на Лабораторията по микробиология и вирусология към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.

Основните характеристики на пациентите с доказана *S. marcescens* – асоциирана инфекция са представени на таблица 3.

Таблица 3. Основни характеристики на проучените пациенти.

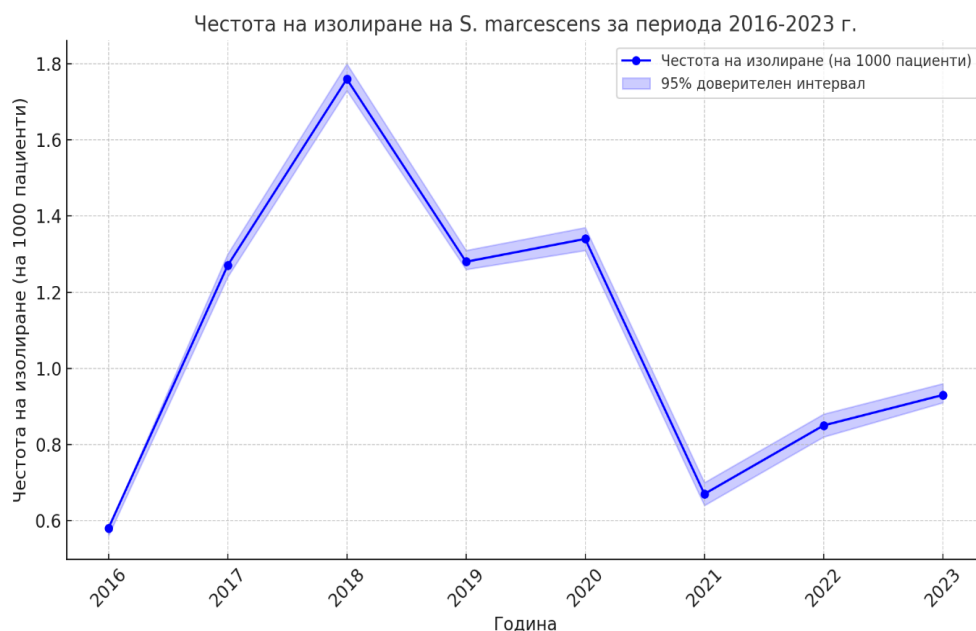
Променливи	Общо n=488 n (%)	Починали n (%)	Благоприятен изход n (%)	P
Брой n (%)	488 (100%)	51 (10.5%)	437 (89.5%)	
Възраст, median (IQR)	66 (49-75)	74 (60 – 77)	65 (48-74)	0.012
Предхождаща хоспитализация				
Не	241 (49.3%)	26 (5.3%)	215 (44.1%)	0.73
Да	247 (50.6%)	23 (4.7%)	224 (45.9%)	
Вид на клиниката, в която е хоспитализиран пациентът				
Терапевтични клиники	188 (38.5%)	10 (2.1%)	178 (36.5%)	

Интензивни клиники	90 (18.4%)	30(6.14%)	60 (12.3%)	0.002
Хирургически клиники	161 (32.9%)	8 (1.6%)	153 (31.3%)	
Педиатрични клиники	24 (4.9%)	0	24 (4.9%)	
Други (унг, психиатрия, инфекциозни болести, дерматология, дневен стационар, наркология)	25 (5.1%)	3 (0.6%)	22 (4.5%)	
Водещ клиничен синдром				
Респираторен	141 (28.9%)	15 (3.1%)	126 (25.9%)	0.015
Кардиологичен	19 (3.9%)	3 (0.6%)	16 (3.3%)	
Гастроинтестинал ен	51 (10.5%)	5 (1%)	46 (9.4%)	
Урологичен	43 (8.8%)	10 (2.1%)	33 (6.8%)	
Токсико- инфекциозен	193 (39.5%)	19 (3.9%)	174 (35.7%)	
ЦНС	52 (10.7%)	16 (3.3%)	36 (7.4%)	
Кожен	103 (21.1%)	9 (1.9%)	94 (19.3%)	
Придружаващи заболявания				
Кардиологично	321 (65.8%)	31 (6.3%)	290 (59.4%)	0.13
Респираторно	48 (9.8%)	6 (1.2%)	42 (8.6%)	
Урологично	68 (13.9%)	8 (1.6%)	60 (12.3%)	
Ендокринологичн о	154 (31.6%)	12 (2.5%)	142 (29.1%)	

Гастроинтестинално	63 (12.9%)	14 (2.9%)	49 (10%)	
ЦНС	60 (12.3%)	11 (2.3%)	49 (10%)	
Други	45 (9.2%)	6 (1.2%)	39 (8%)	
Място на придобиване на инфекцията				
Придобита в обществото	12 (2.5%)	1 (0.2%)	5 (1%)	0.485
Вътреболнична инфекция	476 (97.5%)	50(10.3%)	433 (88.7%)	
Вид провеждано лечение				
Хирургическо лечение	152 (31.1%)	5 (1%)	147 (30.1%)	0.003
Лечение в интензивен сектор	62 (12.7%)	25 (5.1%)	37 (7.6%)	
Хирургическо и интензивно лечение	34 (6.9%)	8 (1.6%)	26 (5.3%)	
Консервативно лечение	239 (48.9%)	12 (2.5%)	237 (48.6%)	

4.1.1. Честота на изолиране

Честотата на изолиране на *S. marcescens* за периода 2016-2023 г. в УМБАЛ „Света Марина“ Варна е представен на фигура 1.



Фигура 1. Честота на изолиране на *S. marcescens* 2016-2023 г., n (%)

Анализът на относителната честота на изолиране на *S. marcescens* спрямо общия брой хоспитализирани пациенти, установява определени трендове в проучвания период. От 0.58 през 2016 г. честотата се увеличава значително през 2017 г. до 1.27 на 1000 пациенти, достигайки максимална стойност през 2018 г. – 1.76 на 1000 пациенти. През периода 2019-2021 г. се наблюдава значително намаляване – до 1.28 (2019 г.) и 0.67 (2021 г.), докато в периода 2022–2023 г. се отчита умерено покачване – до 0.85 (2022 г.) и 0.93 (2023 г.) на 1000 пациенти.

Обсъждане

През периода 2019–2021 г. честотата на изолиране на *S. marcescens* намалява значително, което може да се обясни с ограниченията по време на пандемията от COVID-19- като намаляване на плановите хоспитализации и ограничаване на достъпа на посетители. В периода 2022–2023 г. се отчита умерено покачване – до 0.85 (2022 г.) и 0.93 (2023 г.) на 1000 пациенти, което съвпада с възстановяването на нормалната болнична дейност и повишената циркулация на *S. marcescens* в болничните структури. Важно е да се отбележи, че засенчената зона около линията в графичното представяне на честотата изобразява 95% доверителен интервал, който е особено тесен при пиковите стойности, което свидетелства за висока прецизност на отчетените оценки.

Анализ на динамиката на честотата на *Serratia* sp. в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна (2016–2023) показва, че *Serratia* sp. заема 11-то място от всички материали

(1.6%) през 2017 г., а през 2018 г. заема 9-то място (2.1%). Същата година достига и 5-то място сред всички изолати от кръв – най-високата ѝ позиция за целия период. В следващите години честотата постепенно намалява – през 2019 г. до 1.5%, а през 2020 г. до 1.4%. През 2023 г. се отчита стойност от 1.3% и 11-то място сред всички материали, с персистиращо присъствие и в кръв и урини (12-то и 11-то място съответно) (непубликувани данни, Болничен журнал 2016-2023 г.). В етиологичната структура на бактерииемиите, не само за изследвания период, но и в десет годишен времеви прозорец – от 2011-2021 г., *S. marcescens* е сред десетте най-чести причинители на бактериемии (Стоева Т, 2023).

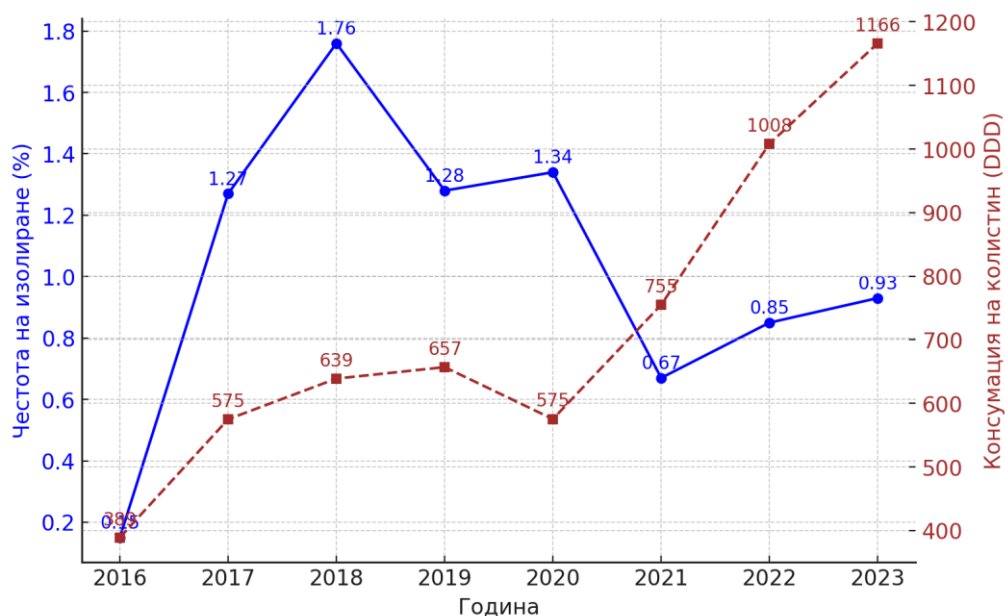
Данните от ECDC показват, че общата честота на вътреболничните инфекции в Европа варира значително в този период, и подобно на нашите резултати се наблюдава тенденция към временно потискане вследствие на пандемичните мерки, следвано от рязко нарастване при връщане към нормалната дейност на болничните заведения (ECDC, 2024).

Заключение

Честотата на изолиране на *S. marcescens* варира значително през периода, като достига най-високи стойности през 2018 г., последван от отчетливо намаляване през 2021 г., което съвпада с периода на ограничаване на плановата хоспитализация по време на пандемията от COVID-19, и умерено покачване през 2022–2023 г., което съвпада с възстановяване на нормалната болничната дейност.

4.1.2. Връзка между честотата на изолиране и консумацията на colistin

Предвид вродената устойчивост на бактериите от род *Serratia* към полимиксини, анализирахме потенциалната връзка между честотата на изолиране на *S. marcescens* и консумацията на colistin, изразена в DDD (Defined Daily Doses), през проучвания период (фигура 2).



Фигура 2. Честота на изолиране на *S. marcescens* и консумация на colistin (DDD), 2016- 2023 г.

Корелационният коефициент на Пийърсън между консумацията на colistin и честотата на изолиране на *S. marcescens* е -0.16 ($p = 0.697$), което показва слаба и статистически незначима отрицателна връзка. Корелацията на Спийрман е -0.07 ($p = 0.867$), което потвърждава липсата на статистически значима нелинейна зависимост между двете променливи. Лагова регресия беше проведена с 1-, 2- и 3-годишно изместване на консумацията на colistin, но нито една от тези променливи не показва статистически значимо влияние върху честотата на изолиране на *S. marcescens*. Най-силна (но все още незначима) беше отрицателната връзка при 2- и 3-годишно закъснение ($r = -0.73$, $p = 0.096$ и $r = -0.69$, $p = 0.190$, съответно). Общото обяснително ниво на модела (R-squared) беше 0.497 , което показва, че моделът не успява да обясни напълно вариациите в честотата на изолиране. Анализът не установи статистически значима връзка между консумация на colistin, изразена в DDD, и честотата на изолиране на *S. marcescens*. Въпреки липсата на корелация между употребата на colistin и честотата на изолиране на *S. marcescens* през целия анализиран осемгодишен период, прави впечатление отчетливия тренд за конкордантност на тези две променливи в последните три години от проучването (2021 – 2023г).

Обсъждане

В УМБАЛ „Света Марина“ colistin се прилага за лечение на тежки животозастрашаващи инфекции, причинени от MDR Грам-отрицателни бактерии от 2016-2020 г. colistin се употребява рядко с незначителни вариации на годишна база, а след 2021 г. употребата му се повишава с над 100 %. до края на анализирания период. Считаме, че това налага този миниторинг да бъде продължен във времето, тъй като с голяма вероятност времевия интервал е недостатъчен за обективизирането на тези потенциални зависимости. За по-точни изводи са необходими допълнителни изследвания с по-дълъг времеви обхват, включване на други антимикробни агенти и анализ на други фактори, свързани с инфекциозния контрол.

Употребата на colistin в хуманната медицина първоначално е била ограничена до локално приложение поради неговите нефротоксични и невротоксични свойства при системното му приложение (European Medicines Agency, 2016). Употребата му във ветеринарната практика остава най-често за лечението на инфекции, причинени от *Enterobacterales* в животновъдството, но и там се откриват все повече случаи на резистентни изолати при третирани с colistin животни в сравнение с нетретирани (Burow E, 2019). Colistin се използва като медикамент на последен избор при инфекции, причинени от мултирезистентни патогени, включително *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales*. Световната здравна организация (СЗО) и други правителствени агенции като Health Canada прекласифицират colistin в категорията „с много голямо значение за хуманната медицина“ (WHO, 2018; CIPARS, 2014). Към момента интерес представлява повече плазмидно-медирана, трансмисивна резистентност към colistin (главно свързвана с гени *mcr*), тъй като за разлика от хромозомно-медираната резистентност, тя може лесно да се разпространи сред различни ентеробактериални родове, което се среща предимно в животновъдния сектор. Може да се предположи, че с непрекъснатите усилия за намаляване на потреблението на colistin във ветеринарната медицина съгласно подхода One Health, разпространението на *mcr*-носеци плазмиди ще намалее до ниско, но стабилно ниво в бъдеще. При липса на colistin като селективен натиск, се очаква бактериите да премахнат своите излишни *mcr*-плазмиди поради енергоемкия им механизъм на репликация. От друга страна, хромозомно медираната резистентност към colistin се наблюдава в клинични изолати на *Enterobacterales*

(вкл. *Serratia* sp.) и тяхното разпространение се увеличава особено в хуманната медицина, където colistin все повече се използва като последен избор за лечение на MDR патогени.

Наред с драматичното глобално нарастване на придобитата колистинова резистентност сред някои бактериални видове, особено в ESKAPE групата, в редица проучвания се установява, че поради изразения селективен натиск в следствие от употребата му, съществуват сериозни рискове от нарастване на честотата на инфекции, дължащи се на първично резистентни на colistin бактерии, като *S. marcescens*, *M. morganii*, *P. mirabilis*, и *Burkholderia* spp (Poirel L, 2017; Olaitan AO, 2014; Carroll LM, 2019). Към настоящия момент обаче липсва системен мониторинг на тези процеси.

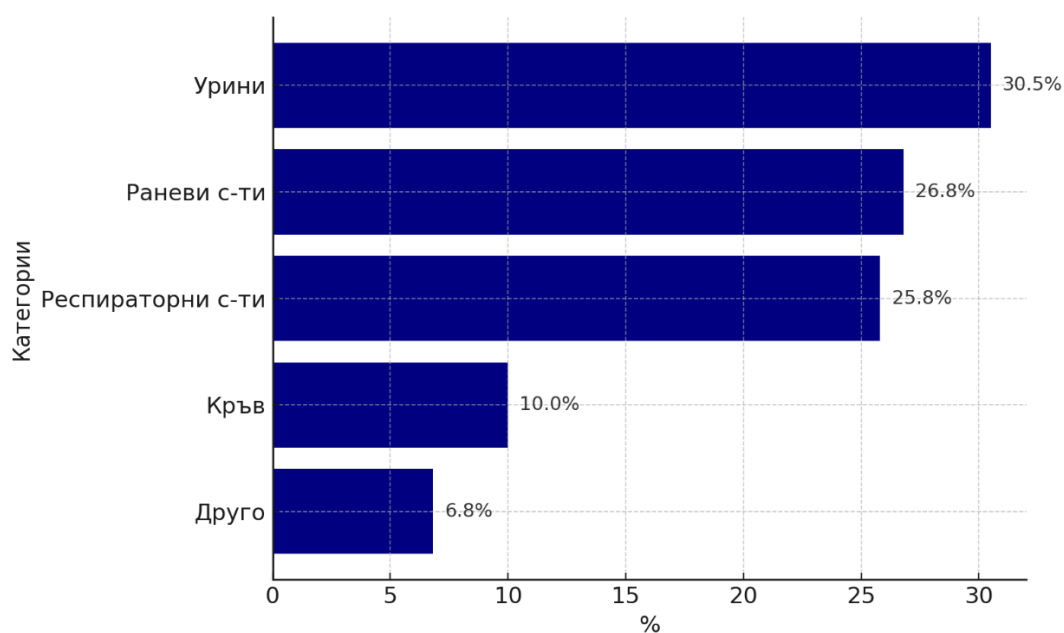
Заключение

В проведеното изследване не се установи статистически значима връзка между консумацията на colistin, изразена в DDD, и честотата на изолиране на *S. marcescens* за периода 2016–2023 г. Въпреки липсата на доказана корелация, наблюдаваният паралелен тренд на нарастване на двете променливи в последните три години от проучването (2021–2023 г.) предполага потенциална зависимост, която изисква по-нататъшен мониторинг и анализ в по-дългосрочен времеви период.

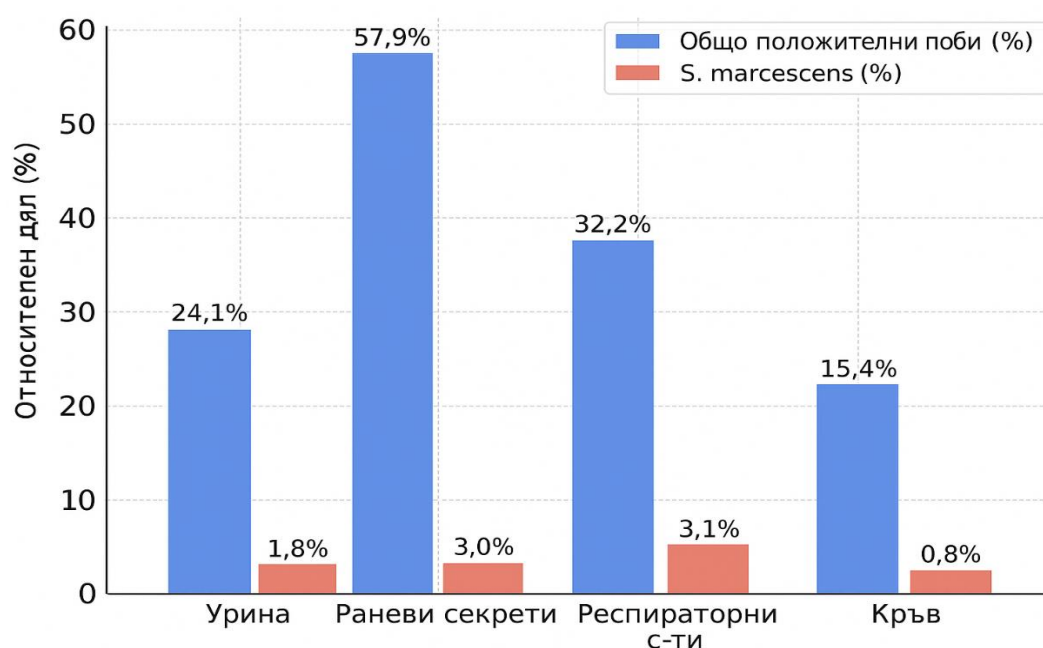
4.1.3 Разпределение по видове клинични материали

В настоящото проучване най-висок относителен дял на изолати *S. marcescens* се установява в урини – 30.5% (n=149), следвани от раневи секрети – 26.8% (n=131) и респираторни секрети – 25.8% (n=126). Изолатите от кръв са 10.0% (n=45), а пробите от други клинични материали (кожни секрети, очни секрети, пунктати, фецес) – 6.8% (фигура 3).

Анализът на относителния дял спрямо всички положителни проби от съответния вид показва, че честотата на изолиране на *S. marcescens* е най-висока от респираторни секрети – 3.1%, следвани от раневи секрети – 3.0% и урини – 1.8%. Най-ниска е честотата на изолати от кръв – 0.8% (фигура 4).



Фигура 3. Разпределение на изолатите *S. marcescens* според анатомичното място на изолация, % ; (други- кожен секрет, очен, фецес, пунктати)



Фигура 4. Относителен дял на положителните клинични проби по видове материали и дял на положителните за *S. marcescens* материали, %;

Обсъждане

В контраст на нашите резултати, в систематичният обзор на Zivkovic Zaric и колектив през 2023 г. се съобщава, че *S. marcescens* се изолира най-често от кръв (45.0%), урини (14.0%) и цереброспинална течност (12.0%). В проучването са

включени 57 случая на инвазивни инфекции, като най-чести клинични прояви са сепсис, ендокардит и менингит, а леталитетът достига 31.6% (Zivkovic Zaric R, 2023). В проучване от 2024 г. се установява, че *S. marcescens* се изолира най-често от кръв (24.2%), раневи секрет (23.3%), урина (20.7%) и ендотрахеални аспирати (12.8%) (Sannathimappa MB, 2024). Друго проучване от 2015–2022 г., включващо 396 изолата *S. marcescens*, съобщава, че най-често патогенът се изолира от бронхиални аспирати и храчки (31.6%), следвани от кръв (21.5%) (Cosimato I, 2024). Изследване от Турция, включващо 158 клинични изолата *S. marcescens*, съобщава, че водещи са изолатите от кръв (35.4%) и храчки (24.6%) (Şimşek M, 2019). По данни на ECDC в Европа за 2020 г. *S. marcescens* е сред 10-те най-чести причинители на инфекции в уринарния тракт, респираторни инфекции, инфекции на кръвта, придобити в отделенията по интензивна грижа и причинява 3% от всички бактериемии в Европа (ECDC, 2023). Тези данни ясно показват, че разпределението на *S. marcescens* по клинични материали варира съществено в зависимост от географския регион, пациентската популация и лечебните заведения. В този контекст нашите резултати очертават локалната епидемиологична тенденция и допълват наличната информация.

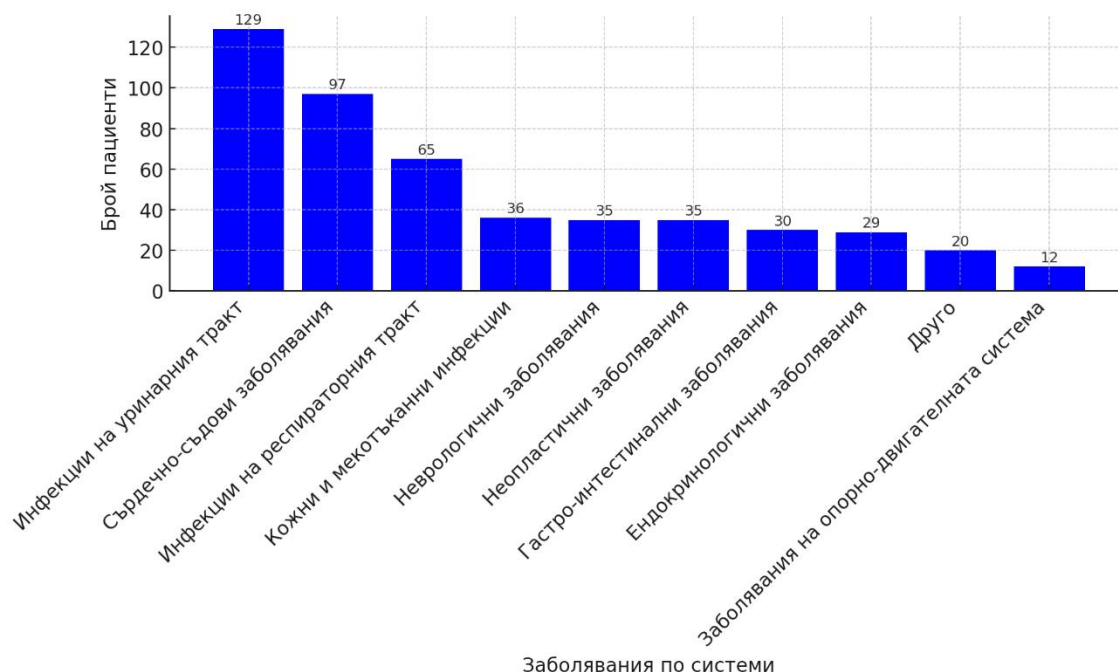
Заклучение

Най-висок относителен дял на изолати *S. marcescens* се установява в урини – 30.5%, следвани от раневи секрети – 26.8% и респираторни секрети – 25.8%, докато изолирането от кръв е значително по-рядко – 10.0%. Изолатите от други клинични материали (кожни секрети, очни секрети, пунктати, фецес) е 6.8%. Относителният дял спрямо всички положителни проби от съответния вид показва, че честотата на изолиране на *S. marcescens* е най-висока от респираторни секрети – 3.1%, раневи секрети – 3.0% и урини – 1.8%. Най-ниска е честотата на изолати от кръв – 0.8%.

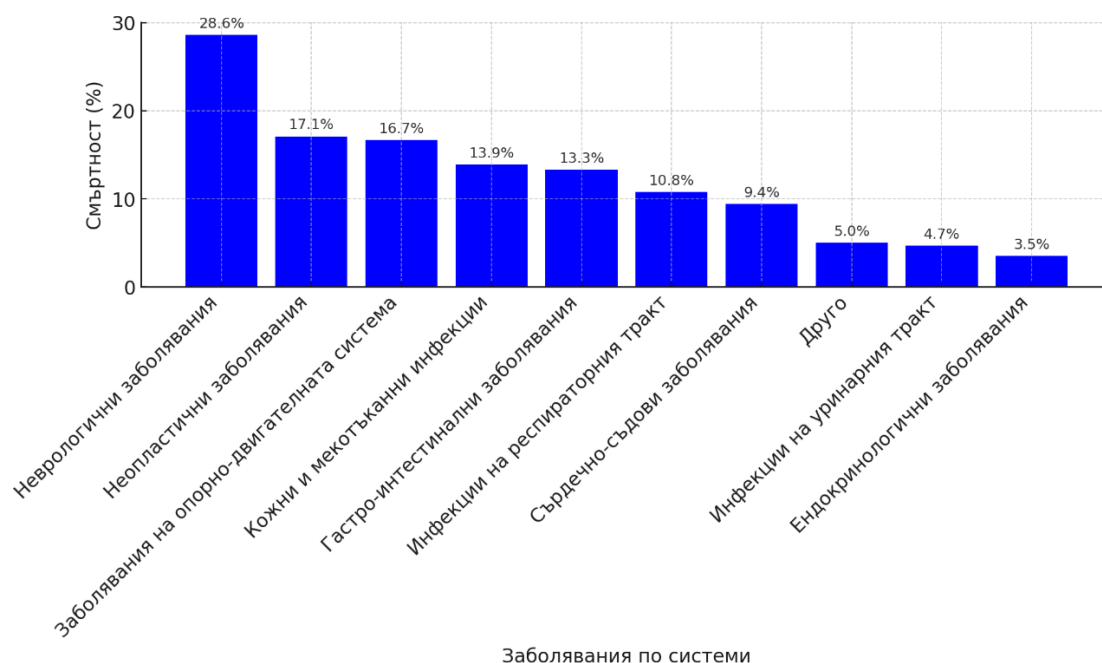
4.1.4 Водещи клинични синдроми при хоспитализация

Най-голям брой пациенти със *S. marcescens*-асоциирани инфекции са хоспитализирани по повод инфекции на уринарния тракт (n=129; 26.4%), сърдечно-съдовите заболявания (n=97; 19.9%) и респираторни инфекции (n=65; 13.3%) (Фигура 5). Въпреки това, най-висок леталитет се наблюдава при пациенти,

хоспитализирани по повод неврологични заболявания (28.6%) и злокачествени процеси (17.1%) (Фигура 6).



Фигура 5. Разпределение на пациентите със *S. marcescens*-асоциирани инфекции според водещото подлежащо заболяване (по системи).



Фигура 6. Леталитет при пациенти със *S. marcescens*-асоциирани инфекции в зависимост от заболяването-повода за хоспитализация (по системи).

Разликата между групите и изходът от заболяването е статистически значима (χ^2 : 44.20, р-стойност: 0.0197), което посочва неврологичните заболявания

и злокачествените процеси като водещи диагнози, при които най-често се наблюдава летален изход, свързан със *S. marcescens*.

Обсъждане

Трябва да се отбележи, че в групата на пациентите с тежко неврологично заболяване (основно остри мозъчно-съдови инциденти), често се изисква интензивно лечение, продължителна катетъризация и механична вентилация – фактори, които създават условия за развитие на вътреболнични инфекции и утежняват прогнозата.

При онкологичните пациенти високата смъртност е свързана с имуносупресия вследствие както на самото заболяване, така и на проведената терапия, което прави контрола на инфекцията значително по-труден.

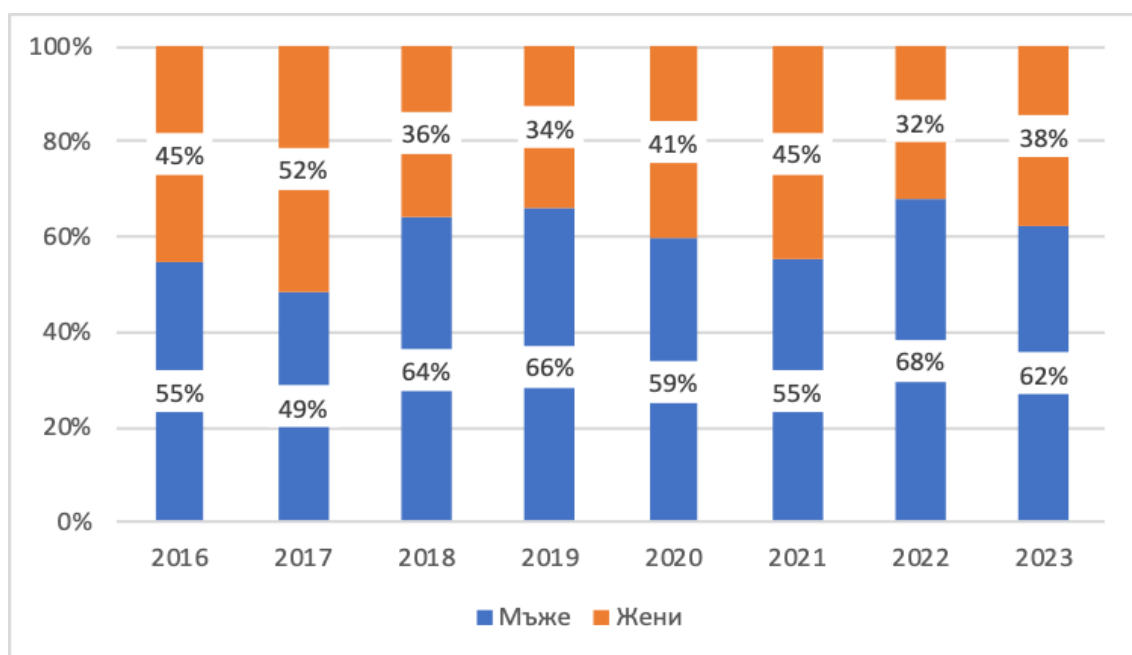
Заклучение

Нашите данни показват, че най-голям брой пациенти със *S. marcescens*-асоциирани инфекции са хоспитализирани по повод заболявания на отделителната (26.4%), сърдечно-съдовата (19.9%) и дихателната система (13.3%). Най-висока смъртност се установява сред болните с подлежащи неврологични заболявания (28.6%) и при пациенти със злокачествени заболявания (17.1%).

4.1.5. Рискови фактори за заболяемост и 30-дневен леталитет

Влияние на демографски фактори – пол и възраст

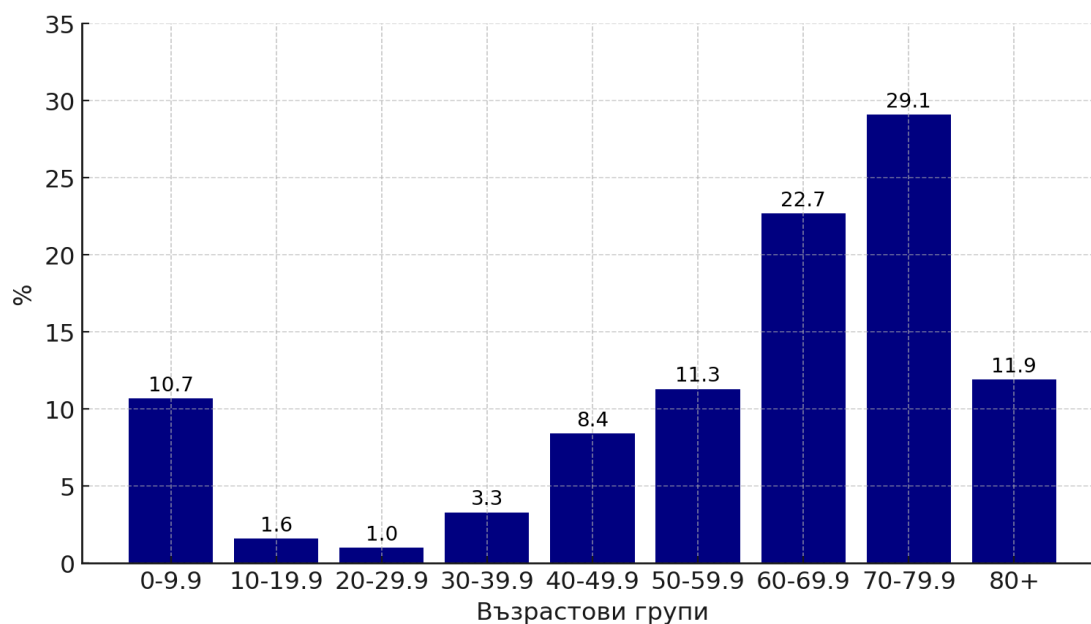
Разпределението по пол на пациентите с доказана инфекция, асоциирана със *S. marcescens*, е в съотношение 60.0 % към 40.0 % в полза на мъжете, като това се наблюдава устойчиво в годините на проучването (фигура 7).



Фигура 7. Разпределение по пол на пациенти със *S. marcescens*-асоциирана инфекция през проучвания период

Анализът не демонстрира статистически значима разлика в половото разпределение между отделните години от периода на наблюдение (хи-квадрат = 10.448, $p = 0.315$), нито се доказва връзка между пола и риска от развитие на *S. marcescens*-асоциирана инфекция или летален изход.

Разпределението на пациентите по възрастови групи е представено на фигура 8.

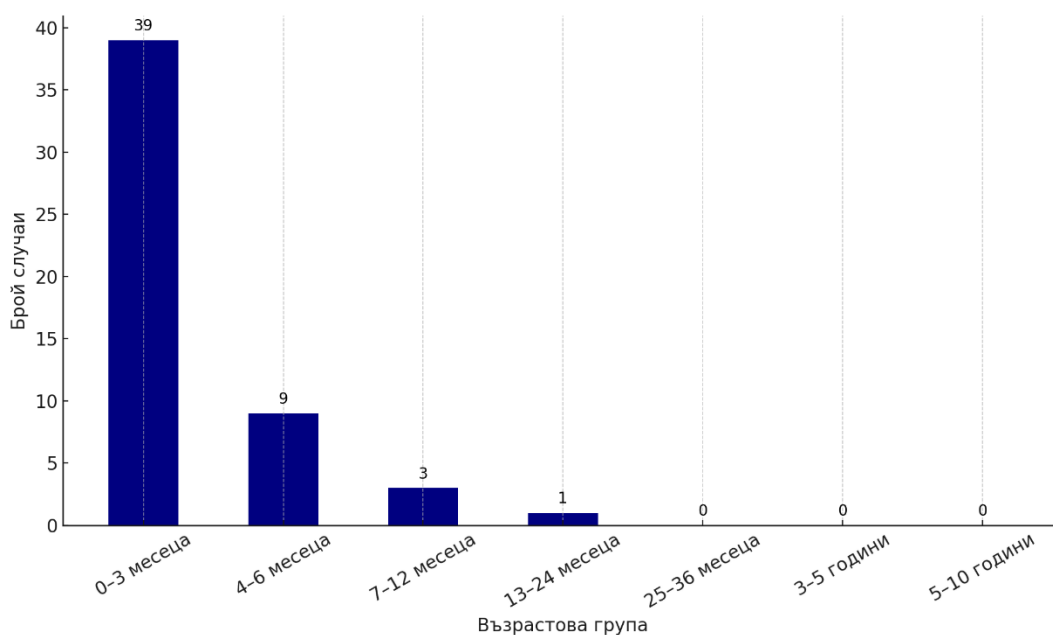


Фигура 8. Разпределение на пациентите по възрастови групи

Медианната възраст на пациентите е 58 години (интерквартилен обхват 49-75г.). Не се установи статистически значима разлика във възрастта между половете: 58.4г.(SD 24.0) за жените и 57.8г. (24.8) за мъжете (Student t =-0.309, p=0.757).

Възрастовата група 70-79г. е с най-висока заболяемост (29.1%), а с най-ниска е групата 20-29г.(1%). Разликата е статистически значима, което определя възрастта като значим рисков фактор за придобиване на инфекция ($p < 0.042$).

Висок е делът и на случаите в детска възраст – до 10г. възраст случаите са 10.7%. Прави впечатление, че най-голям относителен дял от на *S. marcescens* – асоциираните инфекции е концентриран във възрастовата група 0–3 месеца, като хи-квадрат анализът демонстрира висока статистическа значимост на разликите между възрастовите подгрупи ($\chi^2=72.0$, $p < 0.001$). По-детайлно разпределение на тази възрастова група е представено на фигура 9.



Фигура 9. Разпределение на заболяемостта във възрастова подгрупа 0-10г.

Разпределението на починалите пациенти по възрастови групи е представено в Таблица 5. Най-висок леталитет се наблюдава във възрастовата група 60-79 години (12.6%), докато най-нисък е в групата 20-39 години (4.8%). Средната възраст на починалите пациенти е с 6.2 години по-висока (63.6г.) в сравнение с преживелите (57.4г.), но разликата не достига статистическа значимост ($p = 0.086$). Разликата в леталитета между мъжете и жените също не е статистически значима ($p > 0.05$).

Таблица 4. Разпределение на 30 дневния леталитет по възрастови групи и пол (% , 95%ДИ)

	Мъже		Жени		Общо	
Възраст	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ
0-19	13.5	2.5 -24.5	4.3	0.0-12.6	10.0	3.8-20.5
20-39	0		9.1	2.3-41.3	4.8	0.1-23.8
40-59	5.3	1.1-14.6	5.1	0.6-17.3	5.2	0.2-11.7
60-79	10.1	5.9-15.9	16.8	9.9-25.9	12.6	8.8-17.4
80+	13.3	3.8-30.7	10.7	2.3-28.2	12.1	4.9-23.3
Общо	9.6	6.5-13.6	11.7	7.6-17.1	10.5	7.9-13.5

Обсъждане

В настоящото проучване не бе установена статистически значима връзка между пола и риска от развитие на *Serratia*-асоциирана инфекция и леталитет. Счита се, че мъжкият пол е по-предразположен към развитие на бактериални и вирусни инфекции, което се дължи на редица фактори. Тестостеронът има имуносупресивен ефект, потискайки продукцията на проинфламаторни цитокини и активността на макрофаги и неутрофили, които играят ключова роля в първичния отговор към бактериални патогени. От друга страна, естрогените засилват експресията на Toll-подобни рецептори (напр. TLR4 и TLR7) и подпомагат по-бърза и ефективна активация на вродения имунитет. Освен това, голяма част от гените, отговорни за имунната регулация, са локализирани на X-хромозомата, което дава предимство на жените при експресията на тези гени. Епидемиологични проучвания потвърждават, че мъжете са с по-висок риск от тежко протичане на бактериални инфекции, включително пневмония, уроинфекции и бактериемии (Dias SP, 2022). Въпреки отчетливия превес на мъжката популация през анализирания период обаче, настоящото проучване не установява статистически значимо влияние на фактора пол при заболяемостта.

При получените от нас данни прави впечатление, че най-голям относителен дял от на *S. marcescens* – асоциираните инфекции е концентриран във възрастовата група 0–3 месеца. Това потвърждава известната клинична зависимост между незрелостта на имунната система в кърмаческа възраст и повишената податливост

към бактериални и вирусни агенти. След третия месец се наблюдава постепенно намаляване на честотата на инфекциите, като броят на случаите значително спада след първата година от живота. Това е отражение както на постепенното съзряване на вродения и придобития имунитет, така и на подобрената реактивност към екзогенни антигени и фактори на средата. Налице е ясно изразена епидемиологична тенденция, според която ранната детска възраст представлява критичен прозорец на уязвимост, изискващ засилен клиничен надзор и превантивни мерки в първите месеци от живота. Тези резултати са в съответствие с редица публикувани епидемиологични данни за вътреболнични взривове на инфекции, причинени от *S. marcescens* в неонатологични и педиатрични отделения. В литературата са подробно описани множество огнища, като основни рискови фактори последователно се открояват: незрялостта на имунната система, ниското тегло при раждане (под 1500 g), продължителният болничен престой и широкоспектърната антибиотична експозиция (Cristina ML, 2019). В различни държави са документирани сериозни взривове, някои от които с летален изход, при новородени, изложени на замърсени антисептици, медицински изделия и вследствие на недостатъчна хигиена на ръцете и повърхностна дезинфекция (Morillo A, 2018; Madani TA, 2021; Muyldermans A, 2021; Ministry of Health, 2007). Най-тежките усложнения включват сепсис, менингит и пневмония, с отчетени смъртни случаи още в първите 24 часа от началото на инфекцията (Casolari C, 2005; Redondo-Bravo L, 2019).

Трябва да се отбележи, че очакваната продължителност на живота в България към 2020 г. е 73.6г, като това е най-ниската продължителност в Европа (Eurostat Database, 2021). Доклад на Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ) представя епидемиологични показатели за разпространението на остри заразни болести в България през 2020г., който показва, че възрастните хора са по-податливи на тежки инфекции и свързаната с тях смъртност, особено в контекста на пандемията от COVID-19 (НЦЗПБ, 2020). Подобни данни са представяни и от чуждестранни проучвания. Обширен анализ на пациенти с инфекции на кръвта, обхващащо 14 годишен период, установява, че възрастта, е значим предиктор за неблагоприятен изход (Kontula KSK, 2021). Друго проучване, анализиращо данни от над 1 милион пациенти със сепсис, също установява, че смъртността значително нараства с възрастта. Пациентите на възраст над 85 години имат значително по-висок риск от летален изход в сравнение с по-младите

(Seymour CW, 2017). Нашите данни не доказват тази зависимост, т.е независимо че възрастта е предиктор за инфекция, тя не е такава за летален изход, свързан с нея.

Заклучение

В настоящото изследване не се демонстрира статистически значима разлика в половото разпределение между отделните години от периода на наблюдение, нито се доказва връзка между пола и риска от развитие на *S. marcescens*-асоциирана инфекция или летален изход. Медианната възраст на пациентите е 58 години като не се установи статистически значима разлика във възрастта между половете. Възрастовата група 70-79г. е с най-висока заболяемост, а с най-ниска е групата 20-29г. Разликата е статистически значима, което определя възрастта като значим рисков фактор за придобиване на инфекция. Висок е делът и на случаите в детска възраст – до 10г. като най-голям относителен дял е концентриран във възрастовата подгрупа 0–3 месеца. Разликата в различните подгрупи е статистически значима. Най-висок леталитет се наблюдава във възрастовата група 60-79 години, докато най-нисък е в групата 20-39 години. Средната възраст на починалите пациенти е с 6.2 години по-висока в сравнение с преживелите, но разликата не достига статистическа значимост.

- **Предшестваща хоспитализация**

От всички 488 пациента, тези с докладвана предхождаща хоспитализация са 247, а тези без 241, което не определя наличието на предхождаща хоспитализация като рисков фактор за придобиване на инфекция.

От общо 51 пациенти с летален изход, 24 (47.1%) са с предшестваща хоспитализация, а 27 (52.9%) – без такава. Проведеният статистически анализ не установи статистически значима асоциация между наличието на предходна хоспитализация и леталния изход ($p > 0.05$ за всички приложени тестове – Pearson Chi-Square и Fisher's Exact Test) и не доказва предшестващата хоспитализация като независим рисков фактор за летален изход. Този резултат остава валиден и в групата на пациентите в напреднала възраст (>75 г.), която е съществен дял от изследваната популация.

Обсъждане

Наличието на предшестваща хоспитализация е установен значим рисков фактор както за придобиване на нозокомиална инфекция, така и за летален изход (Zeng Q, 2014). В друго изследване тя е идентифицирана като независим рисков фактор за развитие на инфекция, причинена от ESBL-продуциращи бактерии

(Colodner, 2004). Проспективно проучване върху 789 недублиращи се епизода на бактериемии в рамките на една година демонстрира, че предшестващата хоспитализация оказва съществено влияние върху риска от развитие на бактериемия, причинена от резистентни щамове. Най-висок риск е отчетен при пациенти, хоспитализирани 3–90 дни преди инфекцията (14.6%), като той прогресивно намалява с времето след изписването (OR 0.83 на месец). Освен това, предходно носителство на антимикробно резистентни бактерии и престой в интензивно отделение са идентифицирани като независими предиктори за развитие на бактериемия, причинена от резистентни щамове (Chen SY, 2008).

Заключение

В нашето проучване наличието на предхождаща хоспитализация не се доказва като рисков фактор за придобиване на инфекция, нито като самостоятелен рисков фактор за смъртност.

- **Място на придобиване на инфекцията**

Нашите данни категорично доказват, че преобладаващата част от *S. marcescens*-асоциираните инфекции са ВБИ (97.5%), което потвърждава, че хоспитализацията е най-значимият рисков фактор за развитието на инфекция, причинена от този патоген. ($p < 0.001$). Въпреки че 50 пациента с ВБИ, свързани със *S. marcescens* са починали (в сравнение с едва 1 извънболничен случай), не се доказва статистически значима разлика поради твърде малката извадка на извънболнични инфекции.

Обсъждане

В множество изследвания се установява, че хоспитализацията представлява ключов рисков фактор за придобиване на ВБИ, особено при наличието на инвазивни процедури и интензивни грижи. В проучване от 2023г. хоспитализацията е идентифицирана като основен фактор, който значително увеличава риска от развитие на ВБИ, особено при пациенти, подложени на инвазивни интервенции (Isigi S, 2023). Обширно кохортно проучване от 2021 г. установява, че предшестващи хоспитализации при възрастни пациенти над 75 години са значим предиктор за повторно болнично лечение и смърт след изписване, като пациенти с повече от една предходна хоспитализация имат значително по-висок риск от смърт в рамките на 3 месеца след изписването (Visade F, 2021).

Според данните на ECDC за България най-честите причинители на ВБИ от групата на Грам-отрицателните микроорганизми са *A. baumannii* и *K. pneumoniae* (по 15.1%), следвани от *P. aeruginosa* (11.1%) и *E. coli* (6.0 %). Относителният дял на *S. marcescens*- асоциираните ВБИ в България е нисък – 1.0 %, а на европейско ниво е 1.4% (ECDC, 2024). Между отделните държави се наблюдават отчетливи вариации: под 1% в Швеция и Хърватия, около 1% във Франция, Италия и България, и до 2.5% в Испания (ECDC, 2024). Комплексният анализ на данните подчертава необходимостта от унифициране на стандартите за превенция, контрол и диагностика в европейски мащаб с цел минимизиране на тежестта на инфекциите, причинени от *S. marcescens* (ECDC, 2024).

Заключение

Настоящото проучване доказва, че преобладаващата част от *S. marcescens*- асоциираните инфекции са ВБИ (97.5%), което определя хоспитализацията като най-значимият рисков фактор за развитието на инфекция, причинена от този патоген. Леталитетът се наблюдава основно при вътреболничните инфекции (50 случая срещу 1 извънболничен), но разликата не достига статистическа значимост поради малкия брой извънболнични случаи.

• Придружаващи заболявания

В настоящото проучване придружаващите заболявания, които са значими допълнителни рискови фактори за придобиване на *S. marcescens*- асоциирана инфекция са: сърдечно-съдово заболяване (n=321, 65.8%), ендокринологично (n=154, 31.6%) и урологично (n=68, 13.9%), като се установи статистически значима връзка между вида на придружаващото заболяване и риска за придобиване на инфекция ($p<0.001$), което кореспондира и с резултата, че най-високият относителен дял на пациенти с доказана *S. marcescens*- асоциирана инфекция е от терапевтичните клиники. Не се установи статистически значима връзка на придружаващото заболяване със смъртността ($p=0.653$).

Обсъждане

Подобно на нашите резултати, тези придружаващи заболявания заемат първите места и при проучване от 2023 г. в Централна Америка, при което най-честите придружаващи заболявания на пациенти с доказана и микробиологично потвърдена инфекция, причинена от *S. marcescens* са диабет (74.3%) и хипертония (58.5%) (Mayorga DM, 2023). Друго проучване идентифицира злокачествените заболявания, сърдечносъдови заболявания и диабет като най-честите

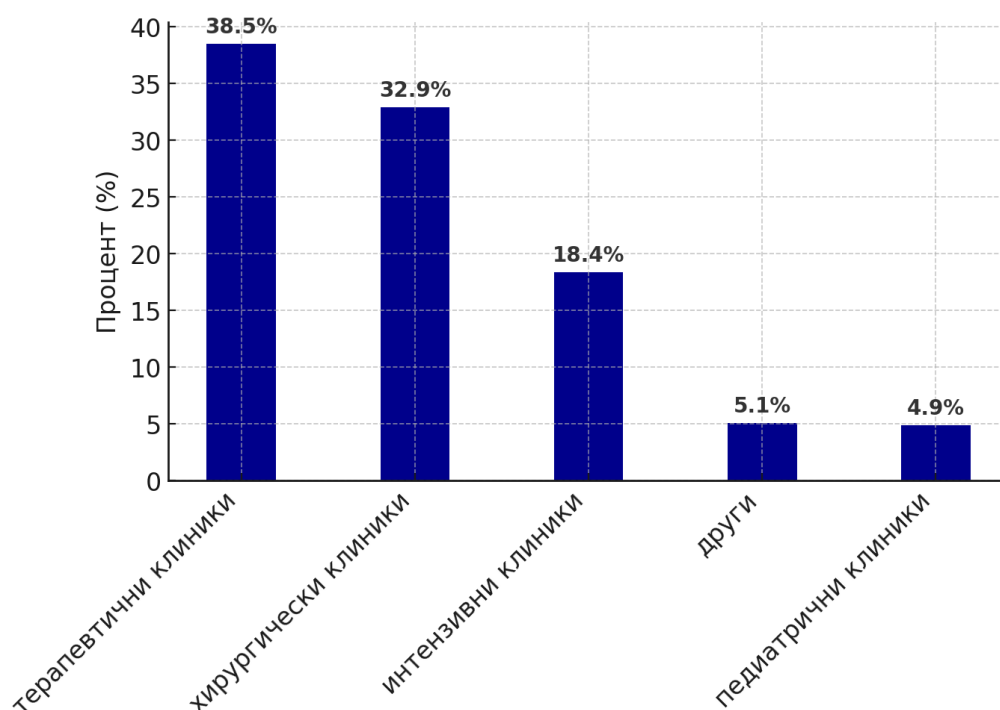
коморбидности при пациенти със *S. marcescens*-асоциирана бактериемия, при които честотата на септичните усложнения достига 58.7 %, а смъртността- 34.8 % (Jacot A, 2024).

Заклучение

Сърдечно-съдовите (65.8%), ендокринологичните (31.6%) и урологичните (13.9%) придружаващи заболявания се доказаха като значими допълнителни рискови фактори за придобиване на *S. marcescens*-асоциирана инфекция, като не се установи връзка между придружаващото заболяване и леталитета.

- **Разпределение на пациентите по клиники**

Всички 35 клиники, в които са хоспитализирани проучваните пациенти, са разделени в пет основни групи според профила им - Интензивни клиники, Хирургически клиники, Терапевтични клиники, Педиатрични клиники и други (УНГ, психиатрия с дневен стационар, клиники по инфекциозни болести и дерматология)(фигура 10).



Фигура 10. Разпределение на пациентите според вида на клиниката, в която са хоспитализирани, %

Най-високият относителен дял на пациенти с доказана *S. marcescens*-асоциирана инфекция е от терапевтичните клиники (38.5%), следвана от хирургическите клиники (32.9%) и интензивни клиники (18.4%). Разликата между

различните отделения е статистически значима ($p < 0.001$), което определя хоспитализацията в терапевтични клиники като рисков фактор за придобиване на инфекция, асоциирана със *S. marcescens*.

Обсъждане

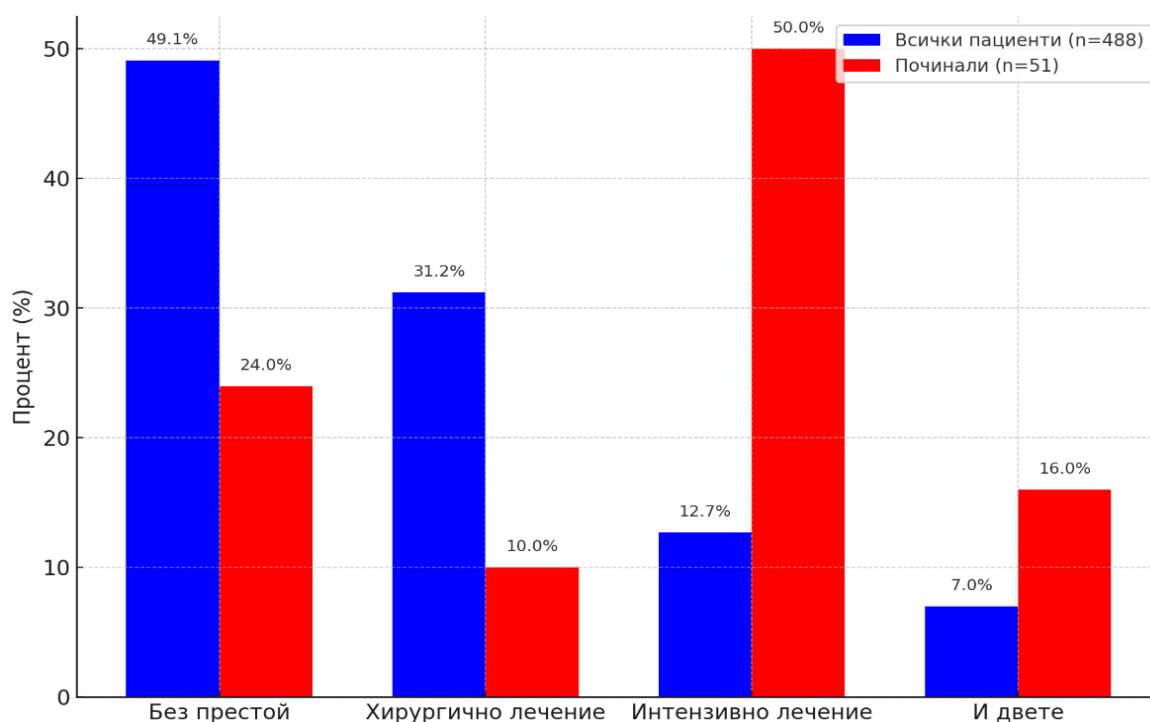
По-високата честота на инфекции, причинени от *S. marcescens*, при пациентите от терапевтичните клиники може да бъде обяснена с факта, че тези пациенти често са коморбидни, с хронични и/или декомпенсирани състояния (сърдечно-съдови, белодробни, бъбречни и др.), което увеличава риска от бързо влошаване и нужда от преминаване към интензивно лечение. Това създава епидемиологична връзка между двете звена – инфекцията може да се развие или да бъде регистрирана като започнала в терапевтичната клиника, но реално да е резултат от престоя в интензивно отделение. Поради това престоят в интензивно отделение следва да бъде разглеждан като самостоятелен рисков фактор за придобиване на инфекция.

Заклучение

Най-висок дял пациенти със *S. marcescens*-асоциирана инфекция се установява в терапевтичните клиники (38.5%), следвани от хирургичните (32.9%) и интензивните (18.4%), което определя хоспитализацията в терапевтични клиники като рисков фактор за придобиване на инфекция.

• Престой в интензивно отделение/ хирургическо лечение

С цел оценка на влиянието на хирургичното лечение и интензивните грижи върху леталитета бе проведен статистически анализ. Пациентите бяха категоризирани в четири групи: 1. пациенти, лекувани консервативно - без хирургично лечение и интензивни грижи (51.9%), 2. пациенти, претърпели само хирургична интервенция (33.6%), 3. пациенти, преминали лечение в интензивно отделение (ICU) (8.5%), и 4. пациенти с комбинирано лечение – както хирургия, така и интензивни грижи (5.9%). В настоящото проучване престоят в интензивно отделение се установи като значим рисков фактор, както за придобиване на *S. marcescens*-асоциирана инфекция, така и за неблагоприятен изход. Най-висок леталитет бе отчетен именно сред пациентите, хоспитализирани в интензивно отделение (50.0%) (фигура 11).



Фигура 11. Разпределение на всички пациенти (n=488) и на починалите (n=51) според вида на проведеното лечение (%)

Статистическият анализ демонстрира значима зависимост между категорията на лечение и леталитета ($\chi^2 = 82.456$, $df = 3$, $p < 0.001$), което потвърждава, че начинът на лечение има съществено влияние върху прогнозата на пациентите. Анализът на вероятностните съотношения (Likelihood Ratio = 62.429, $p < 0.001$) също подкрепя тази зависимост. Допълнителният тест за линейна асоциация (*Linear-by-Linear Association* = 42.407, $p < 0.001$) показва, че вероятността за летален изход значително нараства с преминаването от стандартна грижа към интензивно лечение и хирургични интервенции.

Обсъждане

В страните от Европейския съюз относителният дял на *S. marcescens*-асоциираните ВБИ общо е 1.4% като от тях най-много случаи са докладвани от отделенията по интензивно лечение - 20.5%, следвани от хематология - 15.5%, нефрология - 10.2%, хирургия - 7.3% и педиатрия - 2.4% (ECDC, HAI-Net data 2020). Различни проучвания показват, че честотата на вътреболничните инфекции в интензивното отделение е 5 до 10 пъти по-висока, отколкото в други болнични отделения (Rejeb MB, 2016). Високата честота на ВБИ в интензивните отделения води до увеличаване на заболяемостта и смъртността сред хоспитализираните

пациенти. Освен това, увеличава икономическото натоварване, води до по-висока антибиотична консумация и по-дълъг болничен престой (Singer M, 2009).

Подобно на нашите резултати, в проучване, обхващащо 355 пациента се установява, че престоят в интензивно отделение е самостоятелен рисков фактор за смъртност, както при пациенти с установена инфекция при прием, така и при такива без, като средният болничен престой е значително по-дълъг при пациенти с инфекции, придобити в интензивното отделение (Ylipalosaari P, 2006). Van Vught и съавт. установяват че придобитата в интензивно отделение инфекция значително увеличава риска от летален изход, причинен от сепсис (van Vught, 2016 ;van Vught, 2017). Пациентите, хоспитализирани в интензивни клиники, са изложени на значително по-висок риск от придобиване на инфекция поради честите инвазивни процедури и имунокомпроментираното им състояние (Blot S, 2022).

Заключение

Престоят в интензивно отделение се установи като съществен предиктор, както за възникване на инфекция, така и за неблагоприятен изход.

- **Рискови фактори, свързани с медицински интервенции**

Настоящото проучване показва, че най-голям брой пациенти са с поставено чуждо тяло (централен венозен катетър, периферен венозен катетър, уретрален катетър, дрен, стоми, сонди) (n= 392; 80.3%), следван от провеждането на инвазивна процедура (ендоскопии, хирургични интервенции, трансплантация, биопсия) (n= 78, 15.9%) и на последно място е интубация / механична вентилация (n=43, 8.8%). Разликата между групите е статистически значима, което определя наличието на чуждо тяло като водещ фактор за придобиване на инфекция ($p < 0.05$).

Анализът на получените в настоящото проучване данни показва, че катетъризацията е основен рисков фактор за развитие на *S. marcescens* асоциирана уроинфекция в 92.8% от случаите. Също така се доказва, че сепсис в следствие на уроинфекция се е развил при 11.1% от всички случаи на бактериемии и 6.7% след първична респираторна инфекция, а 28.8% от бактериемиите са асоциирани с наличието на централен венозен катетър. Броят на пациентите с вентилатор-асоциирана пневмония (VAP), причинена от *S. marcescens*, е твърде нисък, за да се извърши надежден статистически анализ.

Обсъждане

Данни от интензивни отделения в лечебни заведения в страните от ЕС, показват, че главният рисков фактор за развитие на пневмония в тази група пациенти е интубацията - от 6 699 случая на пневмония - 70.8% са били свързани с интубация- VAP. При пациентите, хоспитализирани в интензивно отделение (ICU) повече от два дни, 7.7% са засегнати от поне един епизод на пневмония. Средната честотата на пневмония на ICU е 7.3 епизода на 1 000 пациент-дни, варираща от 4.1 в ICU с по-малко от 30% интубирани пациенти до 6.2 в ICU с 30–59% интубирани пациенти и 8.5 в ICU с повече от 60% интубирани пациенти (ECDC, HAI-Net data 2020). Честотата, коригирана спрямо използваните устройства за механична вентилация в интензивно отделение е 10.2 епизода на VAP на 1 000 дни интубация. Стойностите варират от 3.4 в Австрия до 16.6 на 1 000 дни интубация в Италия (ECDC, HAI-Net patient-based data 2020).

Според скорошни данни на ECDC, придобитите в интензивни отделения инфекции на пикочните пътища се срещат при 3.2% от пациентите, пребиваващи в интензивно отделение за повече от два дни, като 95.2% от епизодите на инфекции на пикочните пътища са свързани с използването на уринарен катетър. Средната честота на инфекциите на пикочните пътища в интензивните отделения е 3.0 епизода на инфекции на пикочните пътища на 1 000 пациент-дни (HAI-Net patient-based data 2020).

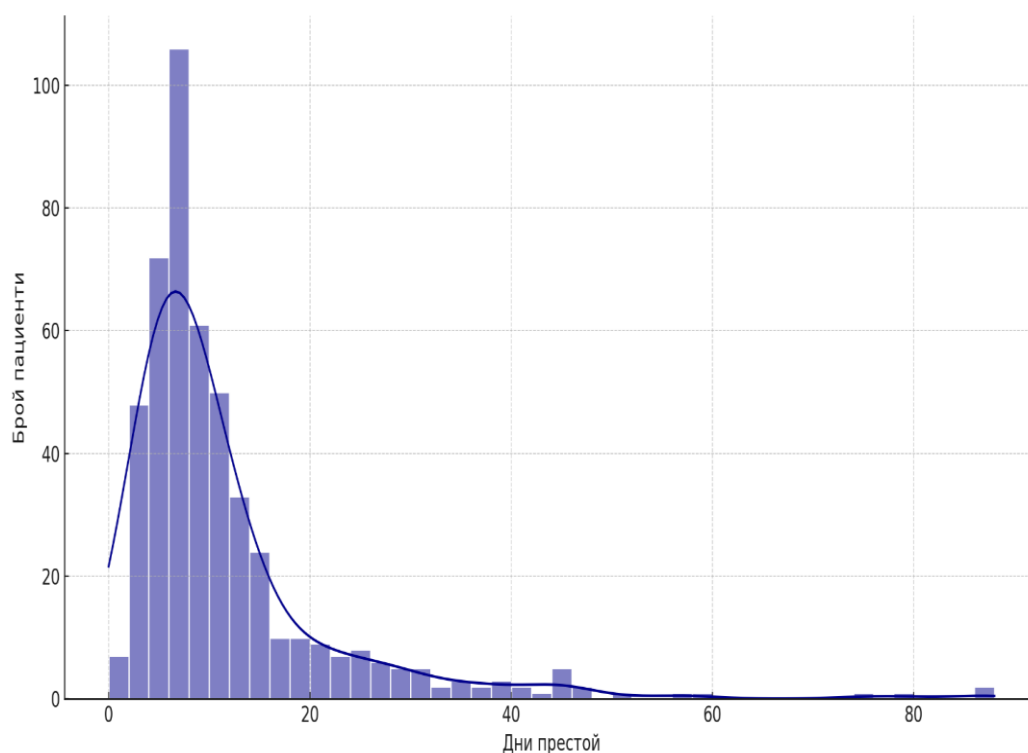
Получените от нас данни потвърждават тези на ECDC, които установяват, че почти половината от инфекциите на кръвта са катетър - асоциирани. Важно е да се отбележи, че продължителната хоспитализация и антибиотично лечение, инвазивните диагностични и/или терапевтични медицински интервенции са сред основните рискови фактори за инфекции на кръвта, свързани със *Serratia* sp., като те обикновено се развиват вторично след първични инфекции на пикочните или дихателните пътища (Tóth A, 2020; Cullen MM, 2005; Pursell KL, 2001; Mendes JC, 2022). Най-често изолираните микроорганизми при инфекции на кръвта (включително микробиологично потвърдени катетър-асоциирани инфекции) са: коагулаза-отрицателни стафилококи, *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, а *Serratia* sp. заема девето място, следвана от *Acinetobacter* spp (ECDC, HAI-Net patient-based and unit-based data 2020).

Заклучение

Наличието на чуждо тяло е водещ рисков фактор за *S. marcescens*-асоциирани инфекции (80%), следвано от проведени инвазивни процедури (16%) и интубация / механична вентилация (7.9%). При 92.8% от анализиранияте случаи катетъризацията е свързана с уроинфекция, причинена от *S. marcescens*, а почти една трета от свързаните с този бактериален вид бактериемии (28.8%) са асоциирани с наличието на централен венозен катетър.

• Среден болничен престой

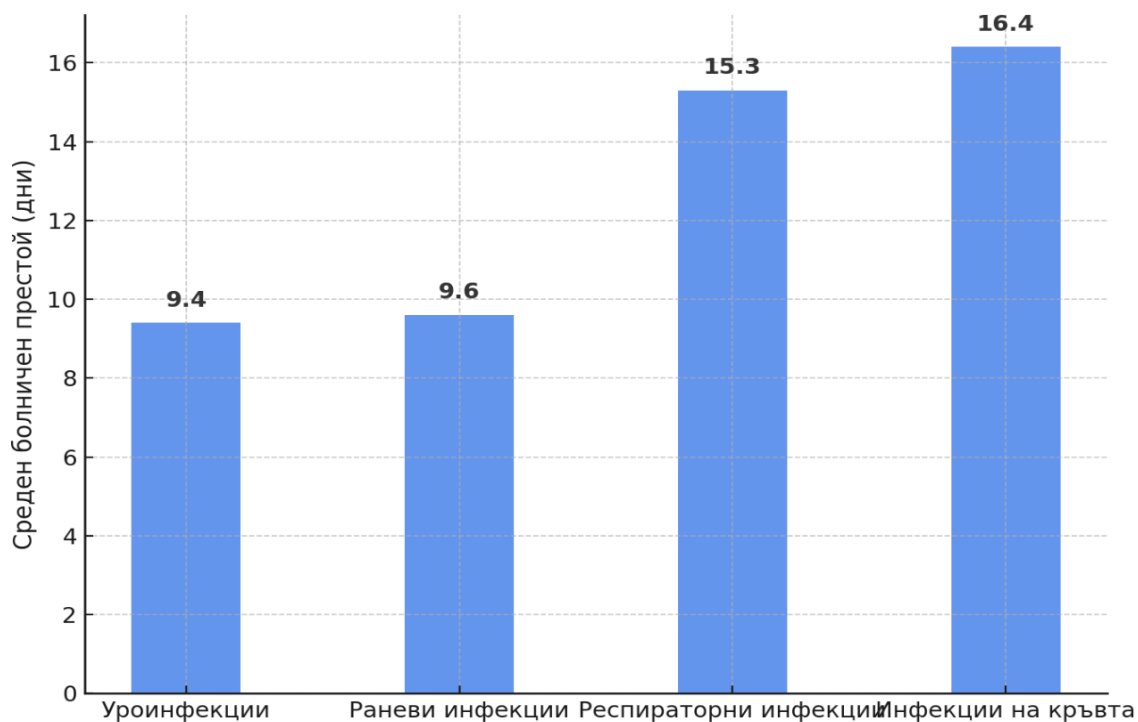
През анализирания период средният период на хоспитализация на пациентите с установена *S. marcescens* асоциирана инфекция е 11.9 дни (SD 12.2) (фигура 12) като не се доказва разлика по пол и възраст ($p=0.649$).



Фигура 12. Разпределение на болничния престой при пациенти с *S. marcescens*-асоциирани инфекции

Разпределението на болничния престой е асиметрично, повечето пациенти са с кратък болничен престой (4-12 дни) и малко са с продължителен (над 18-20 дни).

Средният болничен престой на пациентите спрямо вида на инфекцията, свързана със *S. marcescens*, е представен на фигура 13.



Фигура 13. Средната продължителност на болничния престой според вида инфекция, причинена от *S. marcescens*.

В нашето проучване инфекциите на кръвта се доказаха като основна причина за най-продължителен болничен престой (средно 16.4 дни), следвани от респираторните инфекции и раневите инфекции, а най-кратък среден престой се наблюдава при уринарните инфекции (9.4 дни). Разликата между групите е статистически значима ($p < 0.001$), което определя вида на инфекцията като прогнозиращ фактор за по-продължителен болничен престой, което само по себе си увеличава риска от леталитет.

Обсъждане

Нашите резултати са в съответствие с представените от Barnett A и съавтори данни, които установяват, че инфекциите на кръвта са свързани с удължен болничен престой и повишен риск от смъртност (Barnett AG, 2013). Според други автори, инфекциите са с най-дълъг болничен престой респираторните, следвани от инфекциите на кръвта и раневите инфекции (Del Giudice A, 2021). Въпреки различията в отделните проучвания, като цяло се налага схващането, че по-продължителният болничен престой е свързан с по-висок риск от придобиване на ВБИ, което от своя страна увеличава и риска от летален изход (Jeon CY, 2012; Fierce Healthcare, 2025).

Заключение

Средната продължителност на хоспитализацията е 11.9 дни, без статистически значими различия по пол и възраст. Видът на инфекцията се установи като независим прогностичен фактор за продължителността на болничния престой, като най-дълга хоспитализация се наблюдава при инфекциите на кръвта и респираторните инфекции, а най-кратка – при инфекциите на уринарния тракт.

4.2. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на всички болнични изолати *S. marcescens* за периода 2016-2023 г. и основни терапевтични подходи.

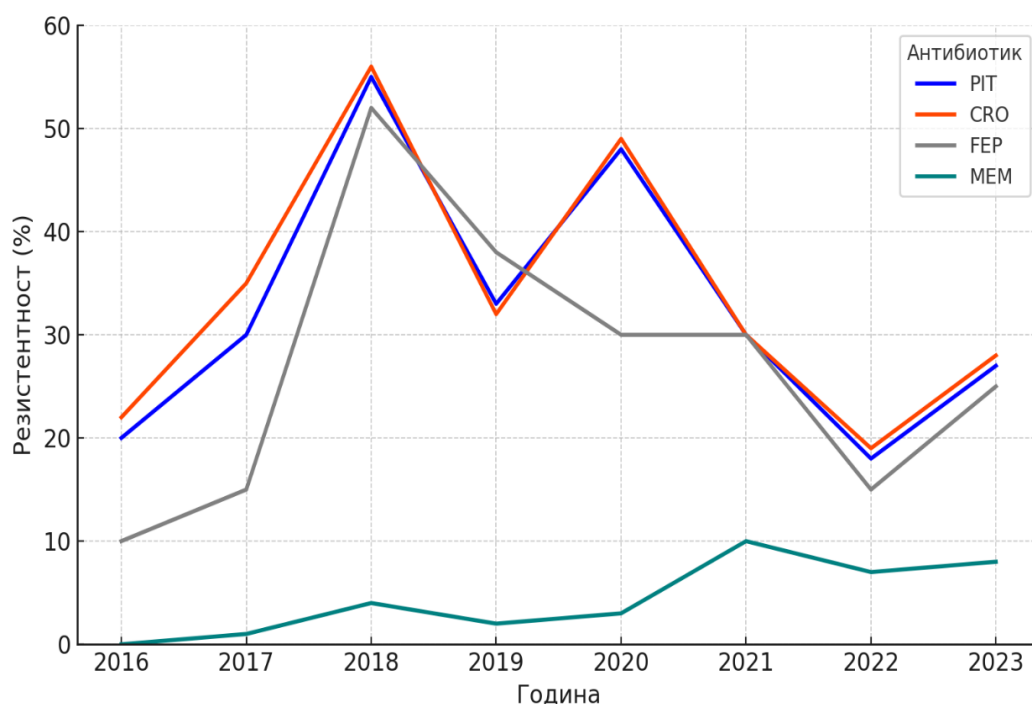
Резистентността към антимикробни лекарствени средства на 488 изолата *S. marcescens* от пациентите в периода 2016-2023 г. е представена на таблица 5.

Таблица 5. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на изолатите *S. marcescens* в периода 2016-2023 г.

Аб група	2016-2023		2016		2017		2018		2019		2020		2021		2022		2023	
	Общ брой	n, R %	Общ брой	N, (r %)	Общ брой	N, (r %)	Общ брой	N, (r %)	Общ брой	N, (r %)	Общ брой	N, (r %)	Общ брой	N, (r %)	Общ брой	N, (r %)	Общ брой	N, (r %)
PIT	488	152 (31.2)	30	3 (10)	67	23 (34.3)	93	49 (52.7)	78	23 (37.2)	66	29 (29.3)	27	27 (29.6)	45	5 (11.1)	62	14 (22.3)
CRO	488	175 (35.9)	30	6 (20)	67	23 (34.3)	93	52 (56)	78	25 (32.1)	66	32 (48.5)	27	9 (33.3)	45	8 (17.8)	62	17 (27.4)
FEP	488	164 (33.6)	30	4(13.3)	67	20 (30)	93	52 (56)	78	24 (30.8)	66	31 (47)	27	8 (29.6)	45	8 (17.8)	62	16 (25.8)
IPM	488	10 (2)	30	0	67	0	93	0	78	2 (2.6)	66	1 (1.5)	27	3 (11.1)	45	3 (6.7)	62	1 (1.6)
MEM	488	10 (2)	30	0	67	0	93	0	78	2 (2.6)	66	1 (1.5)	27	3 (11.1)	45	3 (6.7)	62	1 (1.6)
CIP	488	153 (31.3)	30	3 (10)	67	21(31.3)	93	49 (52.7)	78	23 (29.5)	66	32 (48.5)	27	8 (29.6)	45	2 (4.5)	62	19 (30.6)
LVX	488	150 (31.8)	30	3 (10)	67	21 (31.3)	93	49 (52.7)	78	22 (28.2)	66	32 (48.5)	27	8 (29.6)	45	2 (4.5)	62	18 (29.1)
GEN	488	164 (33.6)	30	5 (16.7)	67	21 (31.3)	93	53 (57)	78	25 (32.1)	66	29 (43.9)	27	7 (25.9)	45	4 (9)	62	17 (27.4)
AK	488	108 (22.2)	30	3 (10)	67	24 (35.8)	93	29 (31.2)	78	11 (8.6)	66	19 (28.8)	27	7 (25.9)	45	4 (9)	62	17 (27.4)
SXT	488	163 (33.4)	30	6 (20)	67	22 (32.8)	93	54 (58)	78	20 (25.6)	66	29 (43.9)	27	7 (25.9)	45	6(13.3)	62	17 (27.4)

Данните демонстрират динамиката на резистентността на *S. marcescens* към набор от 10 антимикробни агента през годините. От представените данни се вижда, че 2018г. е ключова, с най-висока резистентност към повечето анализирани антибактериални препарати.

Динамиката в резистентността към бета-лактамни препарати за изучавания период може да се проследи на фигура 14:



Фигура 14. Резистентност към бета-лактамни препарати в периода 2016-2023 г., в %.

Резистентността към цефалоспоринови от трето и четвърто поколение демонстрира високи стойности, с върхове през 2018 г. и 2020 г., последвани от спад през 2022 г. До 2018 г. не са установени изолати, резистентни към карбапенеми, но след този период такива случаи започват да се регистрират, достигайки максимални стойности през 2021 г.

В нашето проучване от общо 51 регистрирани смъртни случая, 20 (39.2%) са свързани с ESBL-продуциращи изолати, един от които е и карбапенем-резистентен. За да се оцени връзката между продукцията на ESBLs и леталния изход, се извършен сравнителен анализ, включващ всички пациенти (n=488) (таблица 6). Леталитетът при инфекциите, причинени от ESBL-продуциращи изолати, е 12.1% (20/165), докато при ESBL-негативните изолати е 9.6% (31/323). Въпреки тези различия, не се доказва статистически значима връзка между ESBL-продукцията и

леталитета ($\chi^2 = 0.50$, $p = 0.480$; Fisher exact test $p = 0.435$). Изчислените показатели също потвърждават липсата на съществена асоциация – Odds ratio (OR) = 1.30 и относителен риск (RR) = 1.26, 95% CI 0.74–2.15.

Таблица 6. Връзка между ESBL-продукция и летален изход при пациенти със *S. marcescens*-асоциирани инфекции

Характеристика на изолата	Починали (n=50) , n (%)	Преживели, n (%)	Общо, n	Леталитет (%)
ESBL- позитивни	20 (12.1%)	145 (87.9%)	165	12.1%
ESBL- негативни	31 (9.6%)	292 (90.4%)	323	9.6%
Общо	51 (10.4%)	437 (89.6%)	488	10.4%

Обсъждане

Нашите резултати, показващи, че по-голямата част от случаите с неблагоприятен изход са свързани с чувствителни към изпитваните антибиотици изолати *S. marcescens*, акцентира върху факта, че антибиотичната резистентност, макар и ключов фактор, не е единственият определящ показател за неблагоприятен клиничен изход. Това може да бъде обяснено с високата степен на вирулентност на определени щамове *S. marcescens*, свързана с експресията на ензими (протеази, липази), хемолизини, фимбрии, биофилмообразуваща способност и системи за секреция, които улесняват адхезията, инвазията и избягването на имунния отговор. Освен това, индивидуалните характеристики на пациентите — включително имунен статус, наличие на тежки съпътстващи заболявания, възраст, продължителна хоспитализация и използване на инвазивни устройства — представляват независими рискови фактори за летален изход. Не на последно място, несъответствията между *in vitro* чувствителност и *in vivo* ефективност (напр. при наличие на биофилм или високо бактериално натоварване), могат допълнително да влошат прогнозата, независимо от лабораторно установената чувствителност.

Според данни на ECDC от 2018 г., около 33 000 души умират ежегодно в държавите от Европейския съюз и Европейското икономическо пространство (ЕС/ЕИП) в резултат на инфекции, причинени от антибиотикорезистентни бактерии. (ECDC, 2018). По-скорошен доклад от 2021 г. оценява, че между 2016 и

2020 г. броят на инфекциите с антибиотикорезистентни бактерии в ЕС/ЕИП е нараснал от приблизително 685 000 през 2016 г. до около 866 000 през 2019 г., с леко намаление до 841 000 през 2020 г. Броят на смъртните случаи, свързани с тях е нараснал от около 30 700 през 2016 г. до приблизително 38 700 през 2019 г., с леко намаление до 35 400 през 2020 г. (ECDC, 2021). По данни на ECDC за 2020 г. България и Гърция са сред държавите с най-високи нива на резистентност към третогенерационни цефалоспорини в Европейския съюз (ECDC, 2021).

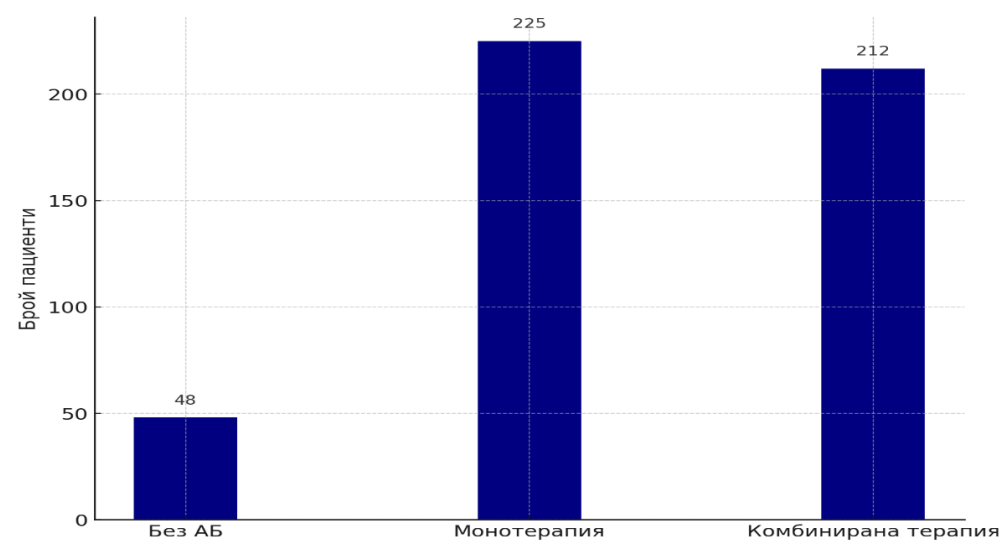
Голямо глобално проучване от 2019 г. относно смъртността, свързана с 33 бактериални патогена (вкл. *Serratia* sp.) и 11 инфекциозни синдрома (включително инфекции на кръвта – BSI), докладва за общо 76 700 смъртни случая, причинени от BSI, свързани със *S. marcescens* в световен мащаб, като близо половината от тях са причинени от резистентни изолати. Според същото проучване, в България са регистрирани 79 смъртни случая, свързани със *Serratia* sp.- асоциирани инфекции (GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Анализите демонстрират, че пациентите с антибиотикорезистентни бактерии, имат три пъти по-висока вероятност от фатален изход в сравнение с тези, инфектирани с чувствителни щамове (ECDC, 2016).

Заключение

Не се установи статистически значима връзка между продукцията на ESBLs и леталния изход при *S. marcescens*-асоциираните инфекции, като леталитетът е сходен при ESBL-продуциращи и ESBL-негативни изолати.

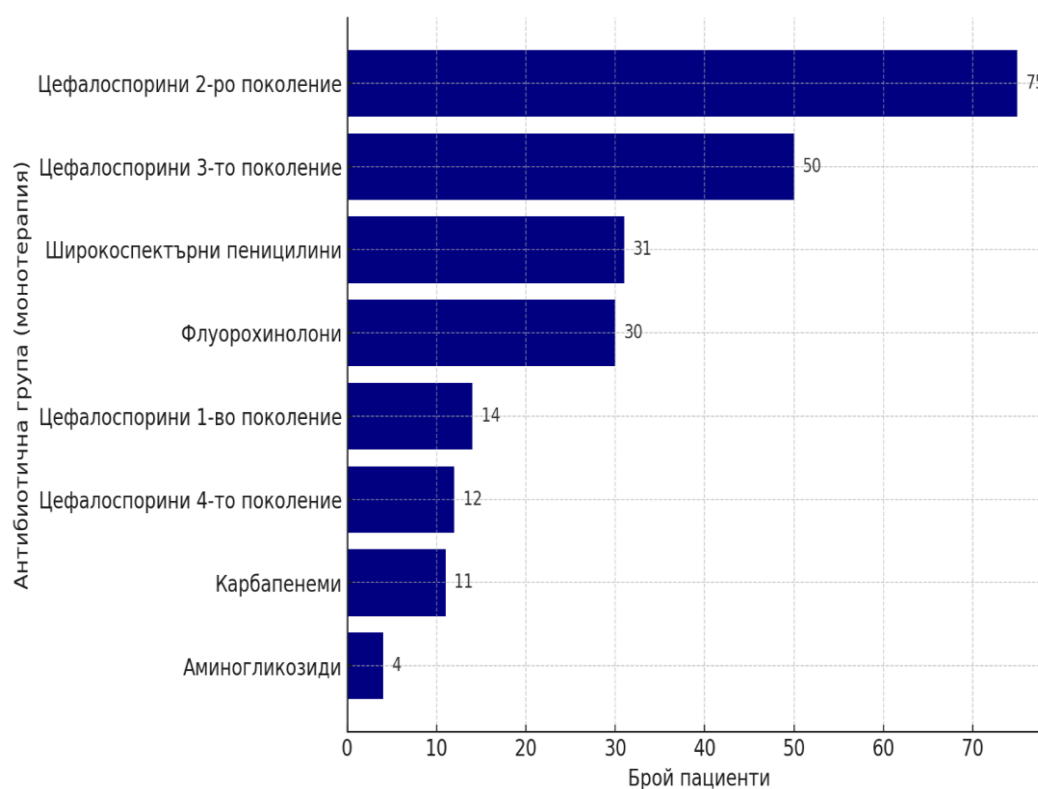
Терапевтични подходи и използвани антибиотици

На фигура 15 е представено разпределението на пациентите с доказана *S. marcescens*-асоциирана инфекция според приложената терапевтична схема (монотерапия, комбинирана терапия или липса на антибиотично лечение).



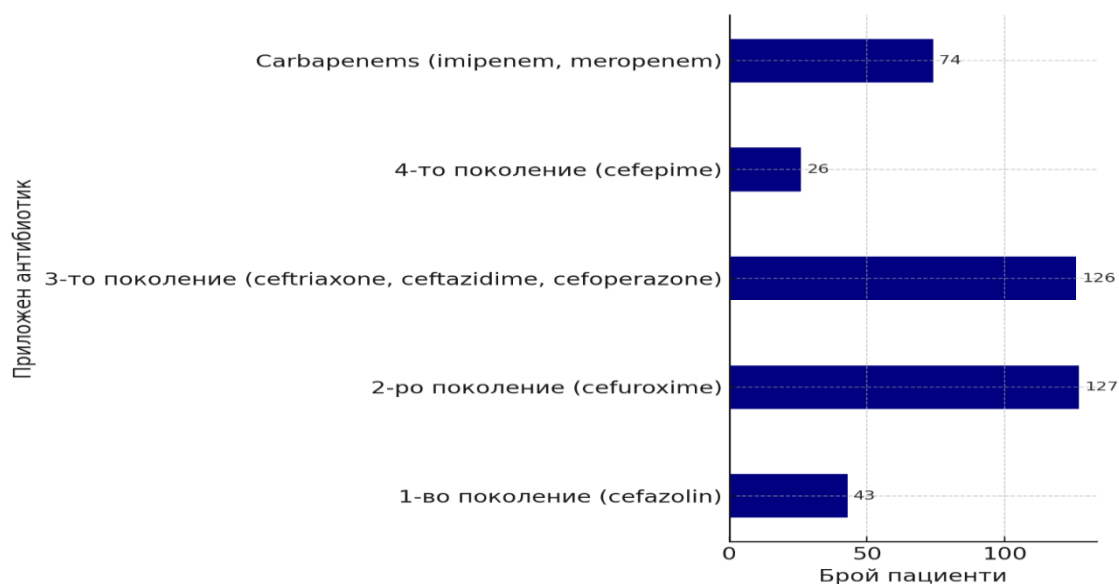
Фигура 15. Разпределение на пациентите според вида на антибиотичната терапия при *S. marcescens*-асоциирана инфекция

Установи се, че при 225 (46.1%) от пациентите е приложено лечение само с един антимикробен препарат (монотерапия), като изборът е представен на фигура 16.



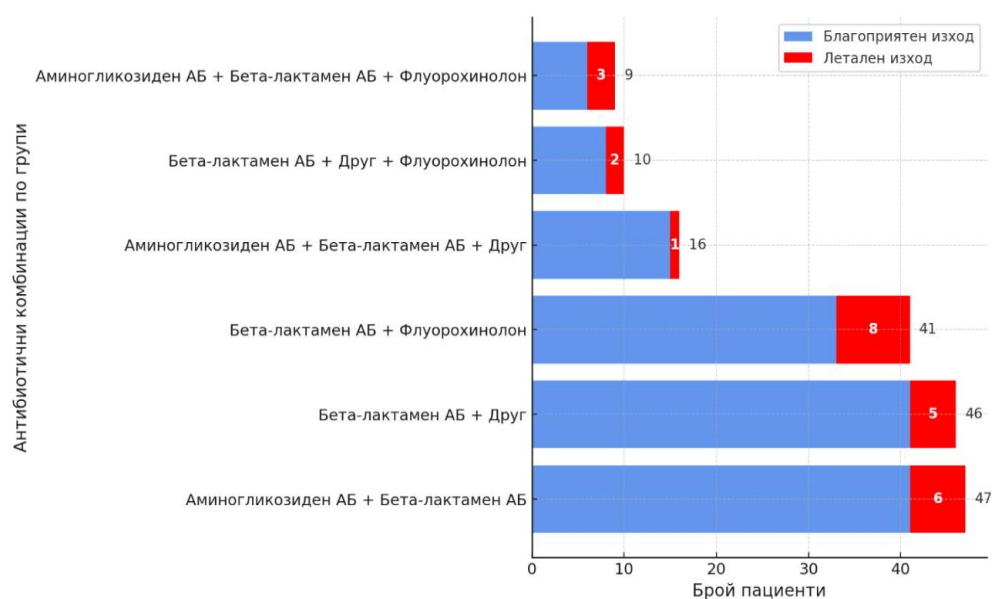
Фигура 16. Разпределение на използваните антибиотични групи при проведена монотерапия.

Предвид централната роля на β -лактамните антибиотици в терапията, беше извършен самостоятелен анализ на тяхното приложение, както в рамките на монотерапия, така и в комбинирани терапевтични режими (фигура 17).



Фигура 17. Разпределение на β -лактамните антибиотици според броя пациенти, при които са приложени като монотерапия или част от комбинирани схеми на лечение.

Изходът от заболяването при най-честите антибиотични комбинации е представен на фигура 18.



Фигура 18. Разпределение на пациентите според използваните антибиотични комбинации и изхода от лечението

На фигура 18 е представено разпределението на най-честите антибиотични комбинации, приложени при хоспитализирани пациенти, със съответния изход от заболяването. Включени са само онези схеми, при които е наблюдаван поне един летален изход ($n = 27$).

За оценка на влиянието на различните антибиотици върху вероятността за летален изход се приложи логистична регресия. В таблица 7 са представени β -коэффициентите, 95% доверителни интервали и p -стойности за всеки модел. Бета-коэффициентът (β) отразява посоката и силата на връзката между независимата променлива и вероятността за настъпване на изхода. Положителните стойности на β показват увеличаване на риска от летален изход при наличие на съответната променлива, докато отрицателните – намаляване на този риск.

Таблица 7. Регресионен анализ на връзката между леталитет и използван антибиотик

Антибиотик	β - коэффициент	95% ИД	p
Amikacin	0.262	0.075 - 0.917	0.036
Gentamicin	0.064	0.014-0.288	<0.001
Levofloxacin	0.003	0.017-0.432	0.003
Trimethoprim/sulfamethoxazole	0.293	0.096-2.029	0.293
Piperacillin / tazobactam	0.063	0.34-1.096	0.063
Константа			<0.001

Доказа се, че приложението на amikacin, gentamicin и levofloxacin намалява шанса от летален изход от лечението.

От друга страна, при пациентите с инфекции, причинени от резистентни на amikacin *S. marcescens*, се наблюдава по-голяма вероятност от неблагоприятен изход, като разликата е статистически значима ($p=0.004$).

Обсъждане

Повишеният относителен дял на неблагоприятен изход при част от терапевтичните схеми не може да се интерпретира като директен причинно-следствен ефект на антибиотичната терапия, а отразява по-скоро тежестта на клиничните случаи, при които са приложени широкоспектърни комбинации. За да

се определи дали специфични терапевтични режими оказват статистически значимо влияние върху изхода от инфекцията, са необходими допълнителни многофакторни анализи, включващи оценка на клиничната тежест, подлежащите рискови фактори и времето до инициране на лечението. Въпреки тези ограничения, резултатите от настоящото проучване демонстрират добра клинична ефективност на комбинираното приложение на β -лактами и аминогликозиди, характеризиращо се с по-нисък дял на леталитет и отчетлив превес на пациентите с благоприятен изход.

Наличните литературни данни относно ефективността на комбинираната терапия при *S. marcescens*-асоциирани инфекции са противоречиви. Проучване от 2022 г. върху антибиотично лечение на бактериемии и ендокардит не установява предимство на конкретна антибактериална комбинация (Slain D, 2022). За разлика от това, друго изследване от 2023 г., включващо пациенти с ендокардит, показва, че най-честите схеми са комбинации от β -лактама с аминогликозид или флуорохинолон, като комбинираната терапия е свързана с по-добър клиничен изход спрямо монотерапия (Shah S, 2023). В съответствие с това, Patel подчертава, че *S. marcescens*-инфекциите следва да се лекуват с аминогликозид в комбинация с широкоспектърен β -лактамен антибиотик, тъй като монотерапията с β -лактами крие риск от селекция на резистентни щамове (Patel PK, 2024).

От друга страна, данни на Albano и сътрудници логично показват отсъствие на синергизъм между аминогликозиди и β -лактами при NDM-продуциращи щамове на *S. marcescens*, което подчертава терапевтичното предизвикателство при мултирезистентните изолати (Albano RM, 2024). Систематичен преглед от 2023 г. установява, че макар β -лактамите често да се комбинират с аминогликозиди при инвазивни инфекции, липсват убедителни данни, че тези комбинации имат по-висока ефективност в сравнение с монотерапия (Zivkovic Zaric R, 2023).

Резултатите от регресионния анализ показват, че приложението на amikacin, gentamicin и levofloxacin се асоциира със статистически значимо понижаване на риска от 30-дневен летален изход. Това подчертава потенциалната роля на тези антибиотици като протективни фактори в терапевтичния подход при инфекции, причинени от *S. marcescens*. От особено значение е установената зависимост между резистентността към amikacin и неблагоприятния изход от заболяването. Тези данни съответстват на наличните литературни сведения, че amikacin запазва висока активност спрямо *S. marcescens* и често се определя като терапевтичен избор при

тежки инфекции, докато развитието на резистентност към него представлява неблагоприятен прогностичен белег (Ferreira RL, 2020; Cosimato I, 2024).

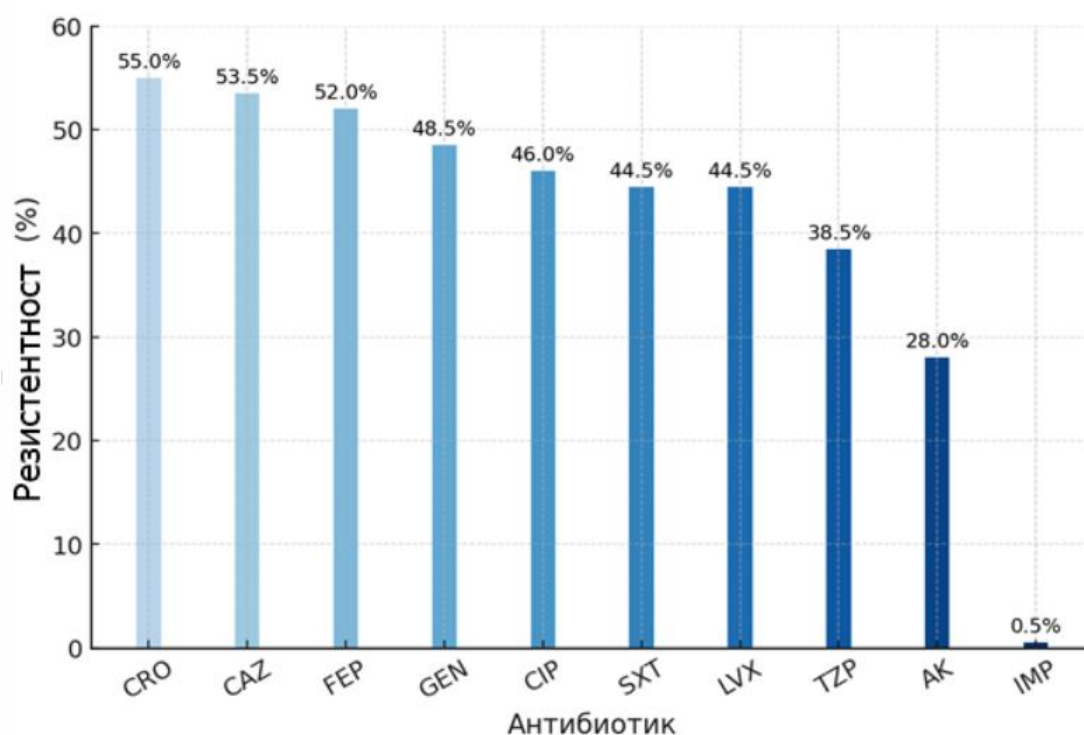
Заклучение

Приложението на amikacin, gentamicin и levofloxacin е независим протективен фактор за намаляване на 30-дневния леталитет. Обратно, резистентността към amikacin се асоциира със статистически значимо повишен риск от неблагоприятен изход.

4.3. Микробиологични проучвания върху резистентността към бета-лактамни антибиотици на колекция от 200 клинични изолата *S. marcescens*.

4.3.1 Резистентност към набор от антимикробни лекарствени средства.

Резистентността в цялата колекция клинични изолати *S. marcescens* (n=200), представена във възходящ ред е представена на фигура 19.



Фигура 19. Резистентност към антимикробни лекарствени средства в проучваната група изолати *S. marcescens* (n=200)

Получените резултати демонстрират високи нива на резистентност при 200-та изолата *S. marcescens* от проучваната колекция към основните антибиотични групи, използвани в клиничната практика и в частност към групата на бета-лактамните антибиотици. Най-високо ниво на резистентност се установява в

групата на цефалоспорините от трета и четвърта генерация (ceftriaxone 55.0% , ceftazidime 53.5%, cefepime 52.0%), следвани от gentamicin 48.5%, хинолоните (ciprofloxacin 46% и levofloxacin 44.5%), trimethoprim/sulfamethoxazole 44.5% и piperacillin/tazobactam 38.5%. Антибиотичните средства с най-висока активност са imipenem (99.0% чувствителност), следван от amikacin (72%). В групата на карбапенем-резистентните *S. marcescens*, единствено amikacin демонстрира добра in vitro активност.

Обсъждане

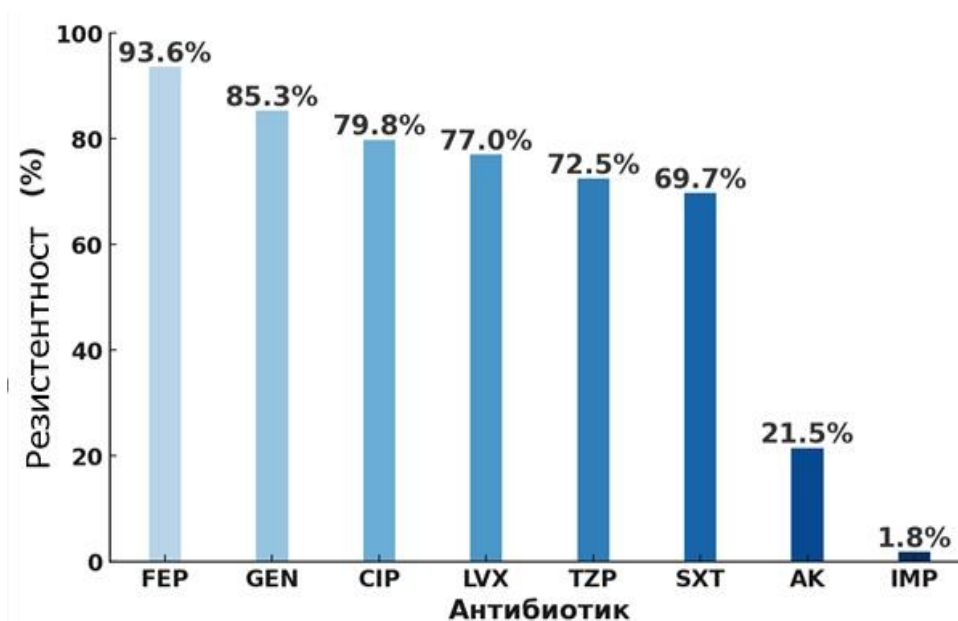
В подобно проучване от 2019 г. в Турция в колекция от 158 клинични изолата, нивата на резистентност към ceftriaxone и ceftazidime са съответно 22.7% и 19.6%. Резистентността към cefotaxime и gentamicin (0.6%) е много ниска (Simsek M, 2019). В друго проучване са докладвани нива на резистентност към amikacin 95.7%, 93.5% към cefazolin, ciprofloxacin 8.5%, imipenem 11.1%, cefotetan 14.7%, gentamicin 17.8%, ampicillin/sulbactam 94.1% (Bozkurt H, 2005). Проучване, включващо 54 изолата (изолирани от трахеални аспирати, кръв, раневи секрети, връх на венозен катетър, хрчка, дрен, урина) от интензивни отделения в Бразилия, съобщава, че всички изолати са резистентни към групата на бета-лактамите и 92.6% към tigecycline, а 96.3% са демонстрирали вродената резистентност на вида към colistin. Чувствителността към флуорохинолони (81.5%) и аминогликозиди (gentamicin 81.5% и amikacin 85.2%) е висока в проучването на Ferreira и съавтори (Ferreira RL, 2020). В проучване в Централна Америка през 2023 г. се доказват повече от 80% изолати, продуценти на ESBL и повече от 50% мултирезистентни шамове (Mayorga DM, 2023). За сравнение нивата на резистентност преди повече от 20 г. са били много по-ниски - в проучване в САЩ са докладвани нива на резистентност 0% към meropenem, 2.8% към imipenem, 8.3% към ceftazidime, 2.7% към gentamicin и 16.9% към piperacillin/tazobactam (Jones RN, 1998). Според проучване в Япония 114 случая на инфекции предизвикани от *S. marcescens* в рамките на 2 години се установява, че те са силно резистентни към piperacillin, цефалоспорини от трето и четвърто поколение, нови хинолони и аминогликозиди (Marumo K, 2000).

Заклучение

Изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства в колекцията от изолати *S. marcescens* логично установи висок процент на резистентност към третогенерационни и четвъртогенерационни цефалоспорини (ceftriaxone 55.0%; ceftazidime 53.5%; ceferime 52.0%) в проучваната колекция от изолати. Резистентността към gentamicin е 48.5%, към ciprofloxacin 46.0%, trimethoprim/sulfamethoxazole 44.5%, piperacillin/tazobactam 38.5%, levofloxacin 44.5%, amikacin 28.0%, imipenem 0.5%. В групата на карбапенем-резистентните *S. marcescens*, единствено amikacin демонстрира добра in vitro активност. Сравнителният анализ показва статистически значима връзка между резистентността към цефалоспорини от трето поколение и резистентността към други групи антибиотични средства.

- **Антибиотична резистентност на изолати *S. marcescens*, резистентни към цефалоспорини от трето поколение.**

В групата на ceftazidime и ceftriaxone резистентните изолати *S. marcescens* (n=108, 54.0%), нивото на антибиотична резистентност е показана във възходящ ред на фигура 20.



Фигура 20. Резистентност към антибиотични лекарствени средства на 108 резистентни към трета генерация цефалоспорини изолати *S. marcescens* (%)

Сравнително представяне на нивата на резистентност в групите на резистентните и на чувствителните към 3-та генерация цефалоспоринови изолати спрямо други антибиотични групи, са представени в таблица 8.

Таблица 8. Сравнение между нивата на резистентност в групата на резистентните и чувствителните към третогенерационните цефалоспоринови изолати към не-беталактамни антибиотици

	CRO Резистентни N=108	CRO Чувствителни N=92	P - value
АК резистентни	44(40.7%)	64 (59.3)	< 0.001
АК чувствителни	64 (59.3)	77 (83.7)	
GEN резистентни	96 (88.9%)	4 (4.3%)	< 0.001
GEN чувствителни	12 (11.1%)	88 (95.7%)	
LVX резистентни	87 (80.6%)	21 (19.4%)	< 0.001
LVX чувствителни	3 (3.3%)	89 (96.7%)	
SXT резистентни	79 (73.1%)	21 (19.4%)	< 0.001
SXT чувствителни	6 (6.5%)	86 (93.5%)	

Сравнителният анализ показва статистически значима връзка между резистентността към цефалоспоринови от трето поколение и резистентността към други групи антибиотични средства.

Обсъждане

Молекулярните механизми, обуславящи установената връзка, включват факта, че плазмидите, носещи гени за резистентност към бета-лактами (вкл. IncFI, IncFII, Inc A/C, Inc M/L и IncHI2) носят не само гени, кодиращи бета-лактамази, но също и гени, които медиат резистентност към хинолони (*qnr*, *aac-(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxAB*) и такива, асоциирани с резистентност към други антимикробни препарати като аминогликозиди и trimethoprim/sulfamethoxazole. Този факт може да обясни честата асоциация на резистентността към бета-лактамните антибиотици и резистентността към други антибиотични групи и фенотипа на множествена лекарствена резистентност, демонстриран от тези изолати (Ivanova D, 2008). Като резултат клоналното разпространение на MDR-ESBL-произвеждащи *S. marcescens*

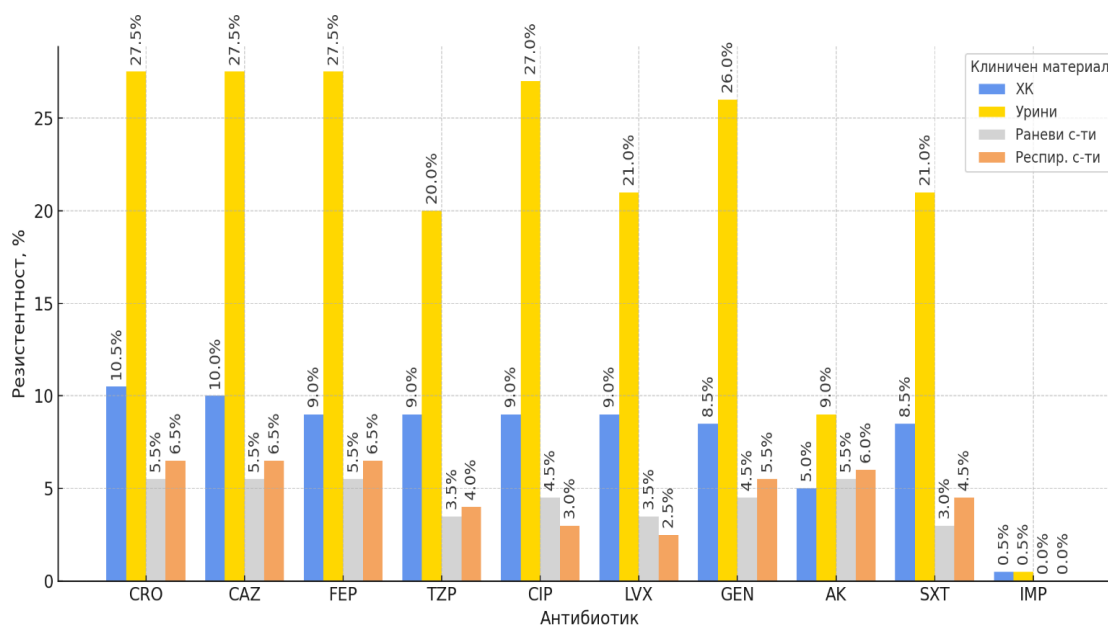
може сериозно да ограничи терапевтичните възможности. От друга страна вродената резистентост на *Serratia* sp. към препаратите на последен избор при MDR Грам-отрицателни *Enterobacterales* colistin, допълнително ограничава терапевтичните възможности.

Заклучение

Резистентните към трета и четвърта генерация изолати *S. marcescens* (n=108) демонстрират във висока степен резистентност към представители и на други антибиотични групи- gentamicin (85.3%), ciprofloxacin (79.8%), levofloxacin (77.0%), piperacillin/tazobactam (72.5%), trimethoprim/sulfamethoxazole (69.7%) и amikacin (21.5%). Сравнителният анализ показва статистически значима връзка между резистентността към цефалоспоринови от трето поколение и резистентността към други групи антибиотични групи.

• Антибиотична резистентност според анатомичното място на изолация

Резултатите от изпитването на резистентността към набора от антимикробни лекарствени средства според анатомичното място на изолация са представени на фигура 21.



Фигура 21. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на 200 клинични изолата *S. marcescens* според анатомичното място на изолация (%)

В настоящото проучване се установява, че антибиотичната резистентност при изолатите на *S. marcescens* варира в зависимост от анатомичното място на изолация. Изолатите, получени от кръв и урини, демонстрират значително по-

високи нива на резистентност към всички тествани антимикубни средства в сравнение с тези от други клинични материали. Най-висока резистентност в тази група се наблюдава към цефалоспорици от трето поколение – ceftriaxone и ceftazidime. При изолатите от кръв резистентността към тези агенти достига 10.5%, докато при изолатите от урина тя е 27.5%. За сравнение, изолатите от раневи и респираторни секрети, показват значително по-ниски нива на резистентност към трето- и четвъртогенерационни цефалоспорици, като едва 5.5% от тях са резистентни към тези антибиотици. И в четирите групи изолати (кръв, урина, рани, респираторни секрети) като най – активни антибиотици се доказаха imipenem и amikacin.

Заклучение

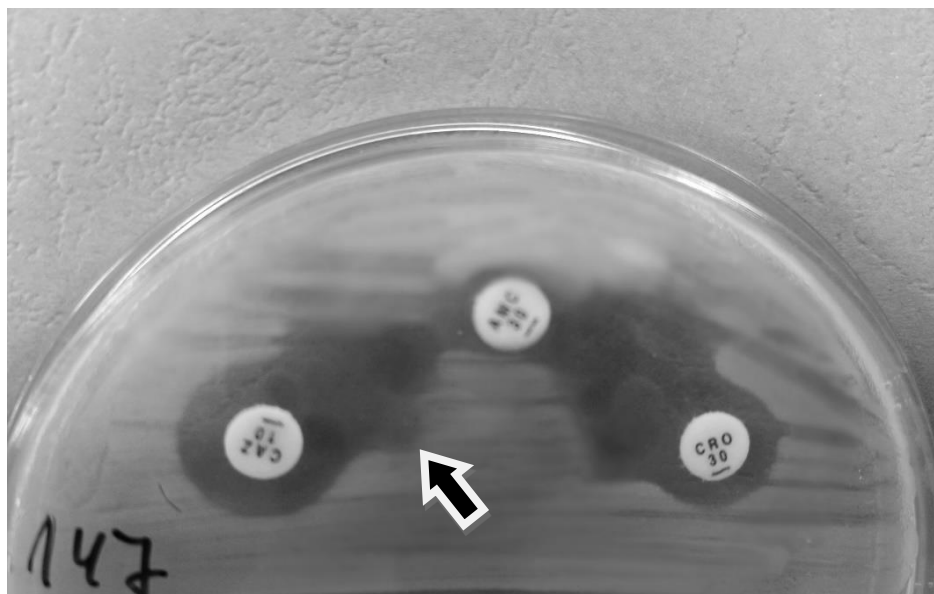
Изолатите *S. marcescens* от урини, както и инвазивните изолати от кръв демонстрират сигнификантно по-високо нива на резистентност към всички тествани антибиотици в сравнение с изолатите от други видове клинични материали, като най-висока е резистентността към цефалоспорици от трето поколение. Независимо от анатомичното място на изолация imipenem, meropenem и amikacin запазват най-висока активност. Двата карбапенем-резистентни изолати *S. marcescens* демонстрираха запазена активност единствено към amikacin.

5.3.2. Механизми на резистентност към β -лактамни антибиотици.

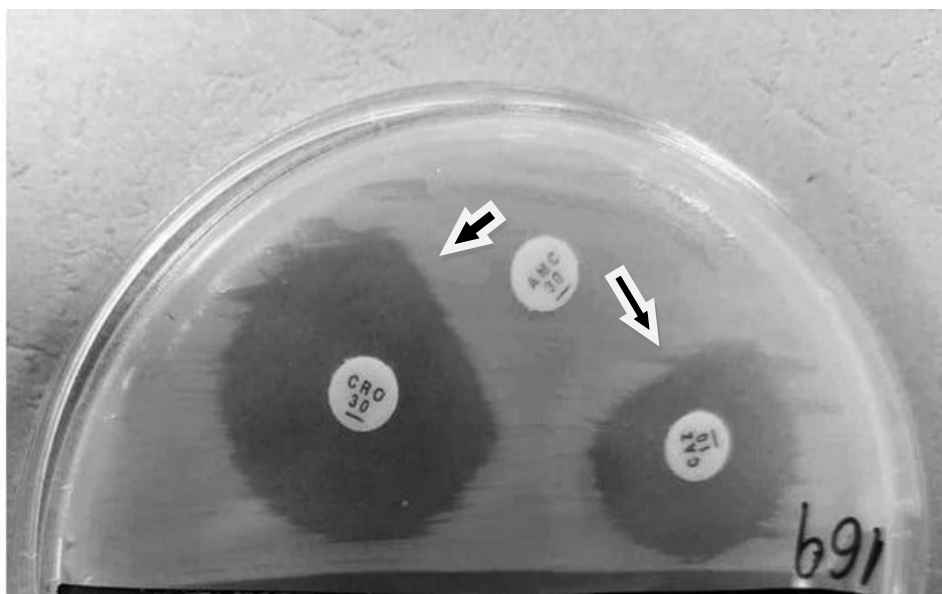
5.3.2.1. Детекция на широкоспектърни бета-лактамази чрез фенотипни и методи

- **Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукция на широко-спектърни β -лактамази.**

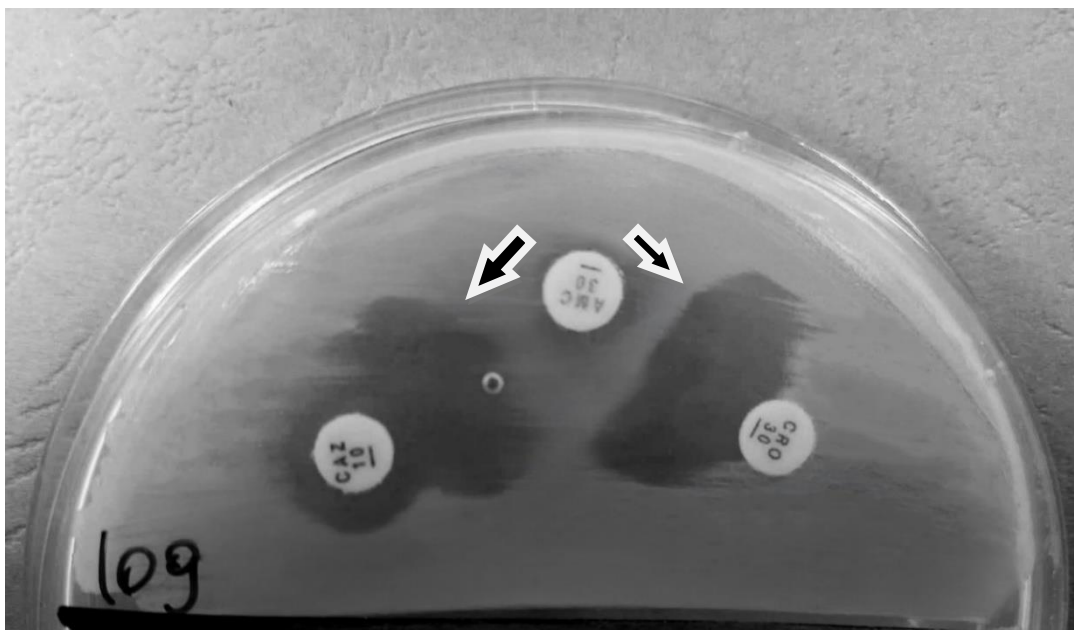
С цел скрининг за продукция на ESBLs при 108 клинични изолата, с предварително установена резистентност към третогенерационни цефалоспорици бе приложен двойно - дисковия тест за синергизъм (DDST) по метода на Jarlier. При 60 изолата бе отчетен положителен резултат: синергизъм между дисковете, натоварени с цефалоспоринов препарат от III генерация (CRO и/или CAZ) и диска amoxicillin/clavulanic acid (AMC). При 6 изолата се получи феномен на антагонизъм, а при 17 - синергизмът беше придружен с феномен на антагонизъм, вероятно поради индуциране на хромозомните AmpC ензими от clavulanic acid. При 25 изолата не се установи взаимодействие между дисковете.



Фигура 22. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукция на широко-спектърни β -лактамази: наличие на зона на синергизъм между дисковете amoxicillin/clavulanic acid 20/10 (AMC 30) и дискове ceftriaxone 30 μ g (CRO 30) и ceftazidime 30 μ g (CAZ 30).



Фигура 23. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукция на широко-спектърни β -лактамази: наличие на зона на антагонизъм между дисковете amoxicillin/clavulanic acid 20/10 (AMC 30) и дискове ceftriaxone 30 μ g (CRO 30) и ceftazidime 30 μ g (CAZ 30)

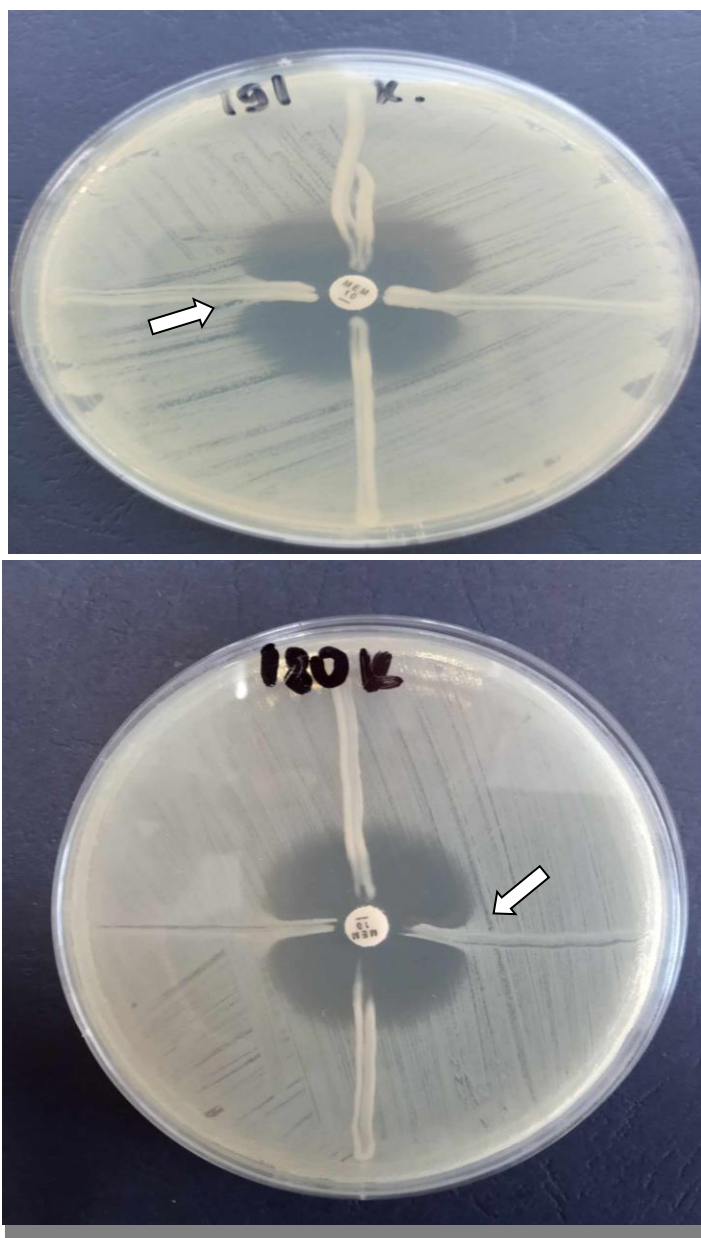


Фигура 24. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукция на широко-спектърни β -лактамази: наличие на зони на синергизъм и антагонизъм между дисковете amoxicillin/clavulanic acid 20/10 (AMC 30) и дискове ceftriaxone 30 μ g (CRO 30) и ceftazidime 30 μ g (CAZ 30).

При последващите PCR реакции общо 95 изолата бяха определени като продуценти на ESBLs. В сравнение, DDST отчете положителен резултат при 60 изолата, което съответства на чувствителност 63.2% (60/95).

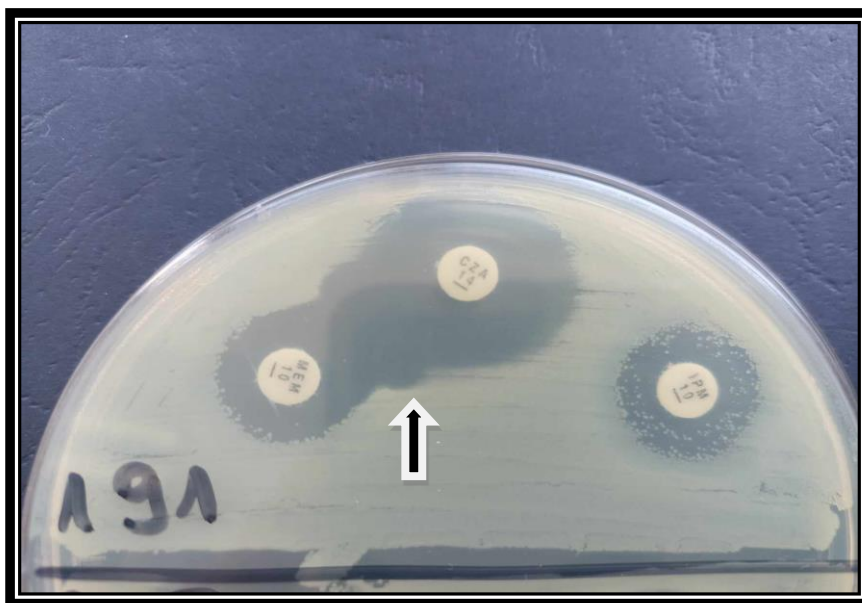
- **Модифициран Hodge тест (МНТ)**

Модифицираният Hodge тест бе приложен при двата карбапенем-резистентни изолата (фигура 25). И при двата изолата резултатите бяха отчетени като положителни. При последващи PCR реакции тези изолати бяха доказани като продуценти на карбапенемази.



Фигура 25. Модифициран Hodge тест

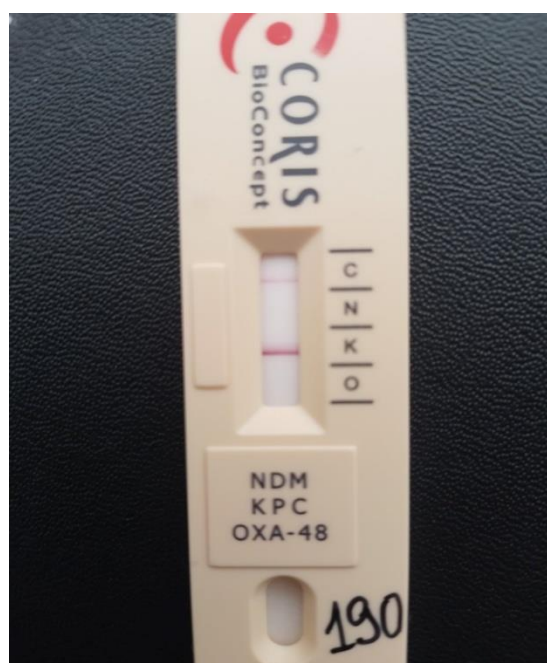
При единия изолат се доказва феномен на синергизъм между дисковете, натоварени с ceftazidime/avibactam и meropenem (фигура 26). Чрез последваща PCR реакция се доказва наличието на KPC- карбапенемаза.



Фигура 26. Феномен на синергизъм

- Доказване на карбапенемази чрез имунохроматографски метод

Чрез бърз имунохроматографски тест бяха тествани двата карбапенем-резистентни изолата, като само единият даде положителен резултат (фигура 27).



Фигура 27. Доказване на клас А β -лактамази чрез бърз имунохроматографски тест

Обсъждане

В настоящото изследване чувствителността на DDST при *S. marcescens* се оказва по-ниска в сравнение с установяваната при други представители на

Enterobacterales. *S. marcescens* е естествен AmpC продуцент, като се знае, че AmpC β -лактамазите не се инхибират от клавуланова киселина. В резултат се наблюдава маскиране на ефекта на ESBL и поява на фалшиво отрицателни резултати, което редуцира диагностичната стойност на метода при този вид. Тези наблюдения съответстват на литературни данни, според които DDST, въпреки широкото си приложение, има ограничена надеждност при изолати, продуциращи AmpC β -лактамази (Jacoby, 2009). Въпреки това тестът остава един от най-често използваните фенотипни методи за бърз скрининг на ESBL-продуценти, тъй като е лесен за изпълнение и достъпен в рутинната микробиологична практика (Jarlier V, 1988; EUCAST, 2017). Разработени са и редица други методи за детекция на ESBLs (Polsfuss S, 2012; Fahim Q, 2017; Shaikh NK, 2016), които могат да допълват или потвърждават резултатите от фенотипния скрининг. Съгласно актуалните препоръки на EUCAST, интерпретацията на чувствителността към цефалоспорини при *Enterobacterales* следва да се базира на отчетените зони на инхибиция, докато фенотипните тестове за ESBL се използват основно с епидемиологична цел (EUCAST, 2024). Наблюдава се и феномен на синергизъм между дисковете, натоварени с ceftazidime/avibactam и meropenem, при изолат, който се доказва като продуциращ KPC-карбапенемаза. Това е в съответствие с известната активност на avibactam срещу ензими от клас A, включително KPC, което обяснява установения синергизъм.

Съществуват различни фенотипни методи за детекцията на продуценти на карбапенемази, но нито един не е достатъчно надежден или универсален. Модифицираният Hodge-тест е лесно изпълним, но често дава фалшиво отрицателни или съвсем слабо положителни резултати при метало-beta-лактамазите. Като алтернатива, през последните години са въведени различни имунохроматографски тестове, които предлагат бързина, лесна интерпретация и възможност за детекция на основните карбапенемазни ензими – в нашето проучване за KPC, NDM и OXA-48 съответно. Тези методи показват висока специфичност (>95.0%), но чувствителността им варира в зависимост от изследваните щамове и вида на ензима (Boutal H, 2018). В проучване с 299 клинични карбапенем-резистентни изолати, NG-Test Carba 5 отчита 99.6–100% точност (Zhu Y, 2021). В нашето проучване положителен резултат се установи само при един от двата карбапенем-резистентни изолати, доказан чрез PCR като *bla_{KPC}*. Макар размерът на изследваната извадка да е малък и да не позволява формиране

на обобщени заключения, резултатът е показателен за потенциалните ограничения на фенотипните тестове и съответства на литературни данни, че тяхната чувствителност може да варира в зависимост от вида на продукцията на карбапенемаза. Независимо от своите ограничения, имунохроматографските тестове имат важно място като бърза скринингова диагностика, позволяваща навременно предприемане на епидемиологични мерки. За целите на надеждното доказване и молекулярна характеристика на продукцията на карбапенемази обаче, златен стандарт остават молекулярно-генетичните методи.

Заключение

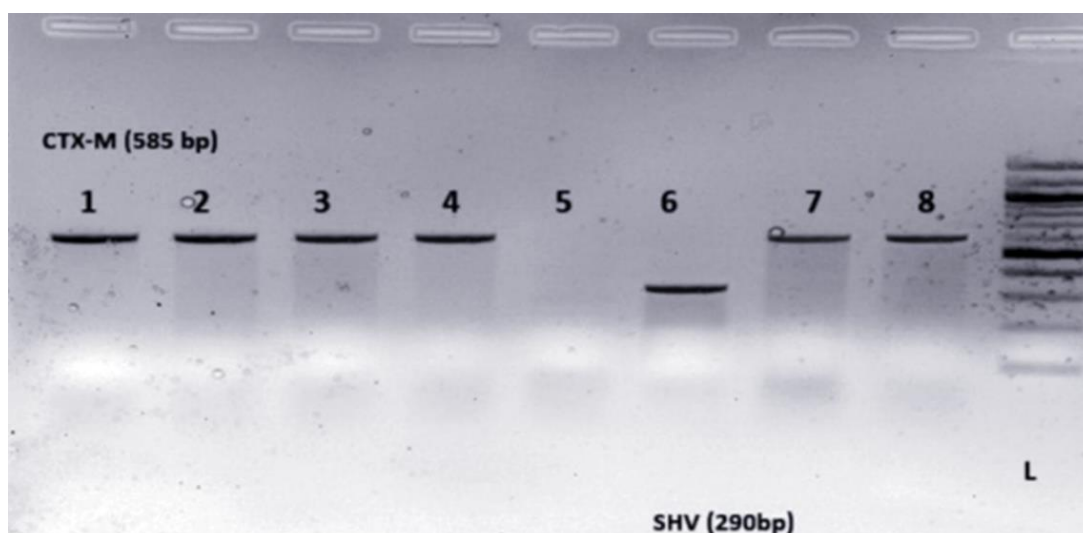
Проведеният двойно-дисков синергичен тест с цефалоспорини трета генерация и amoxicillin/clavulanic acid (20/10) за установяване наличието на ESBLs β -лактамази в изолати *S. marcescens* се характеризира с очаквано по-ниска чувствителност – 63.2%, а модифицираният Hodge тест за наличие на карбапенемази се характеризира с много добра чувствителност- 100%. Бързият имунохроматографски тест отчете положителен резултат само при един от двата карбапенем-резистентни изолата.

4.3.2.2. Детекция на широкоспектърни бета-лактамази чрез молекулярно - генетични методи

С цел установяване на генетичните механизми на резистентност към β -лактами беше приложен PCR метода за доказване на най-често срещаните гени, които кодират широко спектърни β -лактамази (CTX-M и SHV ESBLs от клас A), карбапенемази (клас A, B), както и OXA β -лактамази от клас D.

• PCR за доказване на гени, кодиращи CTX-M, SHV, TEM ESBLs

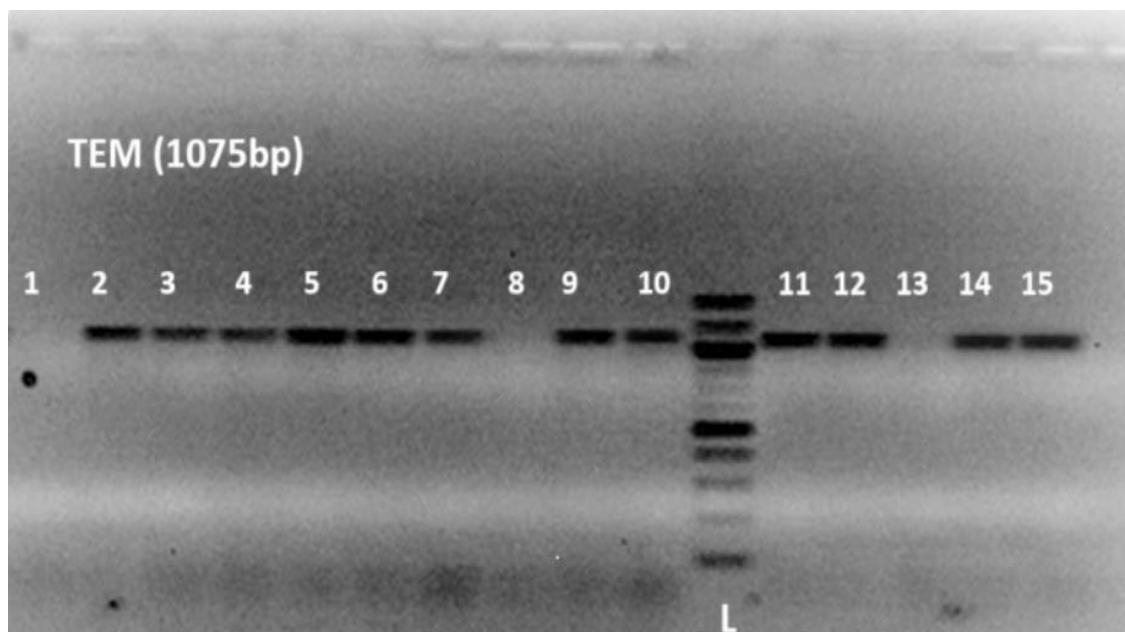
При всички 108 изолата *S. marcescens* беше приложен multiplex PCR за детекция на *bla*_{CTX-M} и *bla*_{SHV}. Генерираните PCR продукти бяха с големина 290 bp за *bla*_{SHV} и 585 bp за *bla*_{CTX-M} съответно (фигура 28). При 71% от изолатите (n=77) се доказва наличие на *bla*_{CTX-M}, а при 0.9% (n=1) - *bla*_{SHV}. От общо 108 изолата, при 95 (87.9%) се доказва наличието на гени, медиращи продукцията на β -лактамази.



Фигура 28. PCR детекция на гени, кодиращи CTX-M, SHV ESBLs ; L, 100bp ДНК маркер; Изолати 1,2,3,4,7,8- детекция на *bla*_{CTX-M}; изолат 5- не се открива ген; изолат 6- детекция на *bla*_{SHV}

В настоящото проучване единственият изолат, носещ *bla*_{SHV}, е с фенотипните характеристики на ESBL продуцент. Изолиран е от трахеален секрет на пациент с VAP и множество предшестващи хоспитализации у нас и в чужбина, на фона на провеждана антибиотична терапия с amoxicillin/clavulanic acid. В конкретния случай, емпиричният избор на начална антибиотична терапия с този препарат, от една страна неефективен поради вродената резистентност на *S. marcescens* в резултат на хромозомната Amp^C, комбинирана с вероятно плазмидно медираната *bla*_{SHV}, индуцирана от клавулановата киселина се свързва с клиничен неуспех, тъй като изходът от заболяването е летален.

При всички 108 изолата *S. marcescens* беше приложен single plex PCR за детекция на *bla*_{TEM} като генерираните PCR продукти бяха с големина 1075 bp. Наличието на *bla*_{TEM} се доказва при 56 изолата (52.0%) (фигура 29).



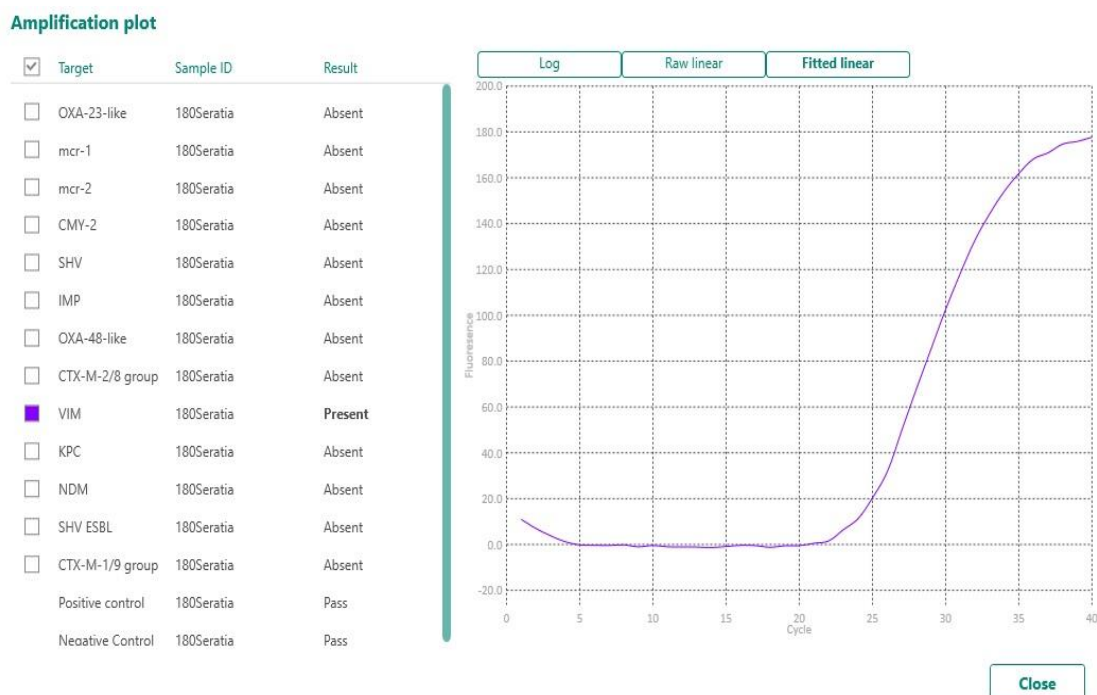
Фигура 29. PCR за детекция на TEM ; L, 100bp ДНК маркер; изолат 1,8,13- не се открива ген, изолати 2-7,9-12,14,15- детекция на *bla*_{TEM}

- **Доказване на гени, кодиращи AmpC ензими**

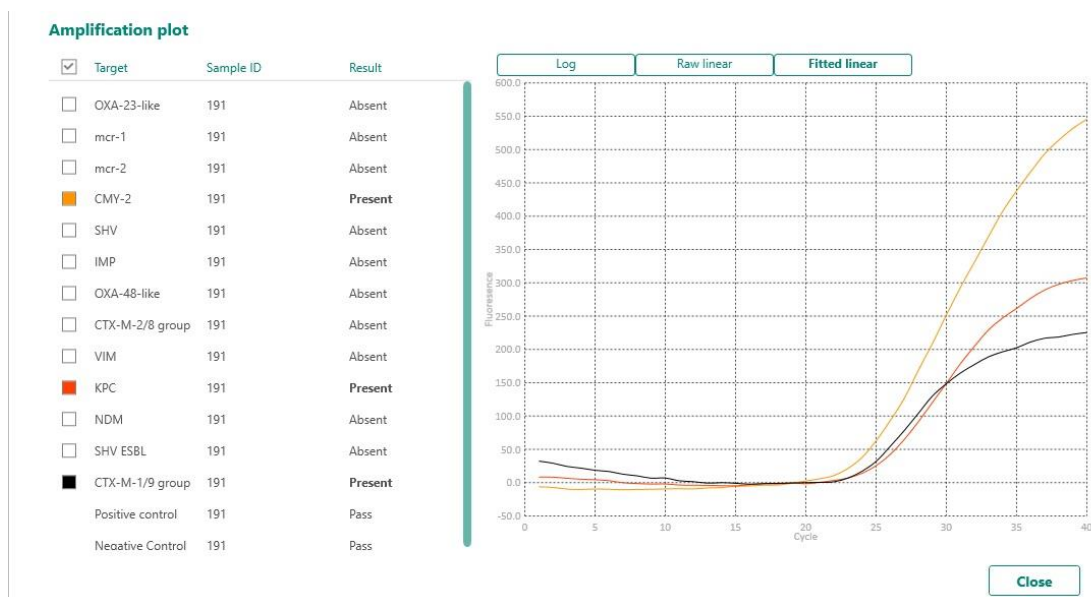
Един от карбапенем - резистентните изолати се доказва положителен и за наличието на *bla*_{CMY-2}, използвайки real-time PCR MM GRAM NEG RES (Alifax S.r.l, Italy)

- **Доказване на гени, кодиращи клас А (KPC) и клас В карбапенемази (*bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP})**

Чрез real-time PCR MM GRAM NEG RES (Alifax S.r.l, Italy) бяха тествани двата резистентни на карбапенеми изолата, като при единият се доказва *bla*_{VIM}, а при другият - *bla*_{KPC}. Резултатите са показани на фигура 30 и на фигура 31.



Фигура 30. Детекция на *bla*_{VIM} чрез real-time PCR MM GRAM NEG RES



Фигура 31. Детекция на *bla*_{CMY-2}, *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M} чрез Real-time PCR MM GRAM NEG RES

Изолатът в нашето проучване е първият български изолат *S. marcescens*, доказан като продуцент на KPC карбапенемаза. Изолиран е от кръв, получена от пациент, приет с Covid-19 инфекция, с множество придружаващи заболявания (захарен диабет, исхемична болест на сърцето, аневризма на аортата) и наличие на предшестваща хоспитализация в същата болница.

Изолатът, носещ *bla_{VIM}* се изолира от урина от катетър на пациент, опериран по повод на карцином на пикочния мехур без данни за предшестваща хоспитализация. По време на лечението е приложена комбинирана антибиотична терапия с cefuroxime, amikacin и metronidazole. Независимо от множествената резистентност на изолата (високостепенна резистентност към всички бета-лактамни антибиотици, ciprofloxacin, levofloxacin, gentamycin, tobramycin и trimethoprim/sulfamethoxazole), с голяма вероятност поради съхранената чувствителност към amikacin, клиничният отговор е благоприятен и пациентът е успешно дехоспитализиран с подобрене.

- **Доказване на гени, кодиращи клас D β -лактамази (OXA-48)**

От изследваната колекция не се доказва щам, носител на ген *bla_{OXA-48}*.

Таблица 9 представя обобщени данни за разпределението на детектираните гени.

Таблица 9. Честота на установените гени сред изолираните щамове (n, %)

Ген	Брой изолати <i>S. marcescens</i> (n, %)
<i>bla_{CTX-M}</i>	36 (33.3%)
<i>bla_{TEM}</i>	19 (17.6%)
<i>bla_{CTX-M}</i> + <i>bla_{TEM}</i>	37 (34.3%)
<i>bla_{SHV}</i>	1 (0.9%)
<i>bla_{CTX-M}</i> + <i>bla_{VIM}</i>	1 (0.9%)
<i>bla_{CTX-M}</i> + <i>bla_{KPC}</i> + <i>bla_{CMY}</i>	1 (0.9%)

Обсъждане

Установената висока честота на изолати с резистентност към трето поколение цефалоспорини, медирана от широкоспектърни β -лактамази (ESBLs), при 95 от общо 108 щамове (87.9%), потвърждава водещата роля на този механизъм при *S. marcescens*. Резистентността при останалите 13 щамове (12.1%) може да бъде обяснена с различни механизми, включващи хиперпродукция или дерепресия на хромозомната Amp^C β -лактамаза, намалена пермеабилност на външната мембрана и/или активен ефлукс. Тези алтернативни механизми също могат да обусловят намалена чувствителност към цефалоспорини, но обикновено се свързват с по-ниски нива на резистентност в сравнение с ESBL-продуциращите изолати.

Идентифицирани са над 400 различни ESBL ензими, разпространени в различни представители на *Enterobacterales* в глобален мащаб (Lawrence J, 2024). В литературата се съобщава, че мултирезистентните щамове *S. marcescens* се свързват с по-инвазивни инфекции и имат тенденция да се разпространяват бързо вътрболнично (Vilacoba E, 2014; Álvarez VE, 2020; Bielli A, 2020).

Хромозомно медираните β -лактамази са широко разпространени сред Грам-отрицателните бактерии. Първата плазмидно-медирана β -лактамаза, TEM-1, е описана през 60-те години на XX век (Datta, 1965). Този ензим е идентифициран първоначално в *E. coli* изолат, получен от кръв на пациент в Гърция на име Темонiera, от което произлиза и наименованието TEM (Medeiros, 1984). Благодарение на плазмидно и транспозонно медирания си механизъм на разпространение, TEM-1 впоследствие е установена в множество други бактериални видове. В рамките на няколко години след първоначалното ѝ описание, тази β -лактамаза се разпространява глобално и днес е детектирана в различни *Enterobacterales*, както и в *P. aeruginosa*, *H. influenzae* и *N. gonorrhoeae*. В настоящото проучване анализът на получените данни показва, че два от изолатите, носещи само *bla*_{TEM}-гени, проявяват резистентност към цефалоспорини от трето поколение, но запазват чувствителност към сефепиме, а останалите са резистентни и към четвърто поколение цефалоспорини. Този фенотип вероятно се дължи на продукцията на широкоспектърни β -лактамази (ESBL) от TEM тип, каквито са TEM-3, TEM-10 или TEM-52. За разлика от класическите TEM-1 и TEM-2, които не хидролизират цефалоспорини от трето поколение, тези мутирани ензими имат разширен спектър на активност. Въпреки това, сефепиме обикновено запазва ефективността си благодарение на повишената си стабилност срещу хидролиза от някои ESBL ензими, както и по-доброто си проникване през външната мембрана на Грам-отрицателни бактерии, включително *S. marcescens*. Възможно е участие на допълнителни механизми на резистентност като промени в пориновите канали или ефлуксни механизми, които могат да повлияят на проникването на цефалоспорини от трето поколение, но не и на тези от четвърто.

Друг представител на плазмидно-медираните β -лактамази е SHV-1 (sulfhydryl variable), първоначално описан в *K. pneumoniae* и *E. coli* (Wyres KL, 2018). До края на 90-те години на XX век европейските проучвания върху широкоспектърните β -лактамази (ESBL) установяват предимно варианти на SHV-SHV-2 и SHV-5, главно при изолати на *Klebsiella* spp (Livermore, 2007). Редица

проучвания вече съобщават за *S. marcescens*, продуциращи *bla_{SHV-12}* (Crivaro V, 2007; Ivanova D, 2008; Musaffer HK, 2024, Pérez-Viso B, 2024). Друго проучване на 4 карбапенем-резистентни изолата *S. marcescens* доказва наличието и на *bla_{SHV-134}* (Bolourchi N, 2022).

До средата на 90-те години гените CTX-M се откриват рядко, въпреки че по това време са описани епидемии на *S. typhimurium*, продуциращи CTX-M-4 и CTX-M-5 в няколко европейски държави. В съвременни условия сред широкоспектърните β -лактамази от TEM-, SHV- и CTX-M типове именно последните се утвърждават като доминиращи ензими при клинични изолати от семейство *Enterobacterales* (Livermore, 2007). Плазмидно-медираните CTX-M β -лактамази в момента са най-често срещаните ESBL сред представителите на *Enterobacterales* (Zhao WH, 2013; Pitout JD, 2010) Понастоящем са идентифицирани над 130 различни CTX-M ензима, които се класифицират в седем клъстера въз основа на тяхното генетично сходство. Сред тях CTX-M-15 и CTX-M-14 са най-разпространените варианти, следвани от CTX-M-2, CTX-M-3 и CTX-M-1 (Zhao, 2013).

В предишно проучване в УМБАЛ „Св.Марина“ Варна проведено през 2011 г. върху изолати *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. agglomerans* и *S. marcescens* показва, че най-разпространеният ензим е CTX-M-3, който е и доминиращ в 83% от щамовете *Serratia*, което се потвърждава и от настоящите резултати (Markovska RD, 2014). Проучване сред трансплантирани пациенти в Полша също показва, че повечето от изолираните щамове *S. marcescens* произвеждат, както CTX-M, така и TEM бета-лактамази. През последната година от проучването се изолират *S. marcescens*, резистентни на карбапенеми от трима пациенти (Mlynarczyk A, 2009). В скорошно обширно проучване върху 322 изследвани изолати Грам-отрицателни бактерии, повече от половината са положителни за ESBL при използване на фенотипни методи. Разпространеността на производството на ESBL сред *E.coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *P.mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. и *S. marcescens* е съответно 55.3%, 63.4%, 17.8%, 57.1%, 33.3%, 28.5%, 38.4% и 4%. Общо 144 са тествани за наличие на *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* и *bla_{SHV}*. Чрез PCR се е доказало, че 59% имат поне един ген от тези типове. Разпространеността на гените *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* и *bla_{SHV}* е съответно 60.0%, 57.6% и 38.3%. Meropenem и amikacin са показали най-високи нива на чувствителност (съответно 83.1% и 82.5%), докато най-малко ефективните антибиотици са били

amoxicillin (3.1%) и cefalexin (13.9%). ESBL - продуцентите логично са показали високи нива на резистентност към cefotaxime, ceftriaxone и ceftazidime (съответно 79.5%, 78.9% и 79.5%) (El Aila NA, 2023).

През 2022 г. в Китай е изолиран мултирезистентен щам *S. marcescens* YL4, който притежава четири хромозомно локализирани гена за антибиотична резистентност- *bla_{SRT-1}*, свързан с резистентност към β -лактамни антибиотици (аминопеницилини), *aac(6')-Ic*, кодиращ резистентност към аминогликозиди, и *tet(41)*, отговорен за устойчивост към тетрациклини, както и *mcr-9*, отговорен за резистентността към colistin. Освен тях, *S. marcescens* YL4 разполага с два големи плаزمиди pYL4.1 (321,744 bp) и pYL4.2 (46,771 bp), носещи допълнителни гени за антибиотична резистентност. Плазмид pYL4.1 е съдържал *bla_{IMP}* – кодиращ металобета-лактамаза, *mcr-9* – допълнително копие на гена за резистентност към colistin, две копия на *bla_{TEM-1B}*, *aac(3)-IId*, *aadA2*, *dfrA12*, *sul1* – резистентност към trimethoprim и сулфонамиди, *qacEΔ1* – ген, свързан с резистентност към катионни антисептици. Плазмид pYL4.2 е носил *bla_{TEM-1B}*, *qnrB6* – ген, свързан с флуорохинолонова резистентност, *aac(6')-Ib-cr* – модифицира както аминогликозиди, така и ciprofloxacin, *sul1*, *qacEΔ1* – съвпадат с гени, открити и в pYL4.1 Комбинацията от хромозомни и плазмидни механизми, обхващаща β -лактами, аминогликозиди, тетрациклини, флуорохинолони, сулфонамиди, colistin и антисептици, поставя този щам в категорията на екстензивно-резистентните (XDR) организми (Zhong Y, 2022).

Предполага се, че *mcr-9* е интегриран в *S. marcescens* YL4 чрез плазмиден трансфер – механизъм, който представлява сериозно предизвикателство, тъй като потенциално може да допринесе за разпространението на колистинова резистентност сред бактерии, които първоначално не притежават такава характеристика. Хоризонталният трансфер на гени за резистентност е документиран в предходни изследвания (Liu Z, 2021). Подобен механизъм е описан още през 2016 г., когато генът *mcr-1* е идентифициран за първи път в изолати на *E. coli* в Китай (Liu YY, 2016). След първоначалното му откриване множество проучвания документират появата на *mcr-1* до *mcr-10* в различни бактериални видове и географски региони (Ling Z, 2020; Sun J, 2018; Wang C, 2020). Към момента *mcr-9* е идентифициран в 40 държави на шест континента, което подчертава необходимостта от засилено епидемиологично наблюдение и контрол на плазмидно-медираната резистентност към colistin (Liu Z, 2021).

През 2022 г. при четири карбапенем-резистентни изолата на *S. marcescens* е установено *bla*_{OXA-48a}, локализиран върху плазмид. (Bolourchi N, 2022). *IncL-pOXA-48a* е идентифициран по-рано сред карбапенем-резистентни щамове на *S. marcescens* в Испания (Perez-Viso B, 2021). В периода 2016–2017 г. в Израел са изолирани 32 OXA-48-продуциращи *Enterobacterales*, 81.0% от които са *S. marcescens* (Regev-Yochay G, 2018).

В научната литература са документирани множество случаи на KPC-продуциращи *S. marcescens* (Tsakris A, 2010; Cai JC, 2008). В проучване от 2020 г. всички изолати експресират *bla*_{KPC} и *bla*_{TEM} гени, като 14.8% съдържат *bla*_{OXA-1}, а 16.7% – гени от *bla*_{CTX-M-1} групата. В рамките на същото проучване не са открити генни варианти на *bla*_{SHV}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} и *mcr-1* (Ferreira RL, 2020). В Бразилия при изследване на 10 карбапенем-резистентни изолата на *S. marcescens* е установено, че всички носят гена *bla*_{KPC-2}, като инфекциите, причинени от тях, са свързани с висока смъртност сред пациентите, от които са изолирани (Cruz TTPS, 2021). KPC-често се среща в комбинация с други β-лактамази, включително ESBL и AmpC ензими, което допринася за усложнени фенотипове на резистентност. Документиран е случай на KPC-2-продуцираща *S. marcescens* при пациент с инфекция, придобита в обществото, което предполага че такива инфекции могат да бъдат придобити и разпространявани и извън болничната среда. (Margate E, 2015). Изолатът в нашето проучване е първият български изолат *S. marcescens*, доказан като продуцент на KPC карбапенемаза.

През 2020 г. е описан епидемичен взрив в извънболнично заведение за дългосрочни грижи в САЩ, причинен от *S. marcescens*, носеща гена *bla*_{KPC-3}. Геномното секвениране и профилирането на плазмидите показват участие на три линии *S. marcescens* и два плазида, носещи *bla*_{KPC-3} (Jimenez A, 2020). Освен това, през 2023 г. в Китай са идентифицирани два изолата *S. marcescens*, продуциращи KPC-2, от пациенти с бактериемия. Геномният анализ разкрива наличието на плазмиди от тип IncR, носещи гена *bla*_{KPC-2} (Jia J, 2023).

Метало-β-лактамазите (MBL) от клас B, включително *IMP*, *VIM* и *NDM*, са сред най-често срещаните и клинично значими β-лактамази, тъй като имат способността да хидролизират широк спектър от β-лактамни антибиотици (с изключение на азтреонам). Тези ензими са разпространени в глобален мащаб, като най-висока честота на изолиране се наблюдава в Югоизточна Азия и различни европейски държави.

Типовете VIM се срещат по-често сред Грам-отрицателни неферментиращи бактерии, докато в рамките на *Enterobacterales* тези ензими най-често се идентифицират в *K. pneumoniae*, *E. coli* и *E. cloacae*. Глобално проучване на разпространението на VIM сред представители на *Enterobacterales* установява следните географски разлики: VIM-1 има широко глобално разпространение, VIM-2 е идентифициран в Мексико и Испания, а VIM-4 е документиран в Европа, включително в един изолат на *S. marcescens* от Чешката република. В допълнение, VIM-5 и VIM-31 са установявани в Турция, VIM-19, -26, -27 и -33 – в Гърция, VIM-23 е открит в Мексико, а VIM-29 е идентифициран в Саудитска Арабия и Обединеното кралство (Matsumura Y, 2017). Нозокомиалните взривове, причинени от VIM-продуциращи *S. marcescens*, са рядко описани в научната литература, като повечето случаи се съобщават от отделения за неонатална интензивна грижа (Ghaith DM, 2018). Първият документиран Грам-отрицателен патоген, продуциращ VIM, е *P. aeruginosa*, който остава и най-често съобщаваният микроорганизъм с този механизъм на резистентност, следван от *K. pneumoniae* и *A. baumannii*. Първият случай на VIM-продуцираща *S. marcescens*, предизвикала вътреболничен взрив, е докладван в Аржентина (Nastro M, 2013). Оттогава са докладвани няколко други огнища в различни региони по света. През 2018 г. е описан вътреболничен взрив в интензивно отделение за възрастни, причинен от VIM-продуциращи изолати на *S. marcescens*, с регистрирана смъртност от 50.0% (Iovene MR, 2019). През 2020 г. е описан изолат на *S. marcescens*, продуциращ VIM-4, изолиран от пациент след кардиохирургична интервенция, като материалът е получен от инфектирана зона около имплантиран кардиостимулатор (Akos T, 2020). През 2024 г. е документиран вътреболничен взрив в отделение за изгаряния, причинен от VIM-продуциращи карбапенем-резистентни бактерии, включително *S. marcescens*. Наблюдавано е бързо развитие на резистентност към cefiderocol при част от изолатите, което подчертава риска от терапевтичен неуспех дори при употреба на нови антимикробни средства (Freiberg JA, 2024).

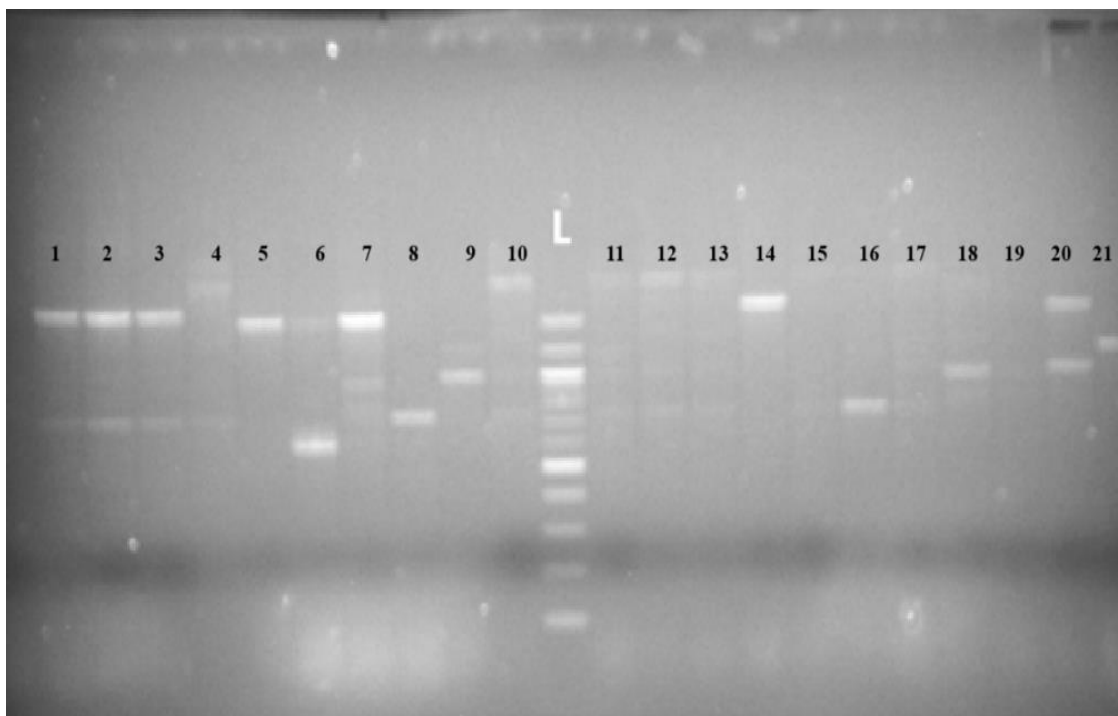
Заключение

Основният механизъм на резистентност към цефалоспорини от трета генерация в изследваната колекция изолати *S. marcescens* е свързан с продукцията на ESBLs, като най-чести се доказаха CTX-M бета-лактамазите (71.0%), следвани от TEM (52.0%) и само 0.9% SHV. В един от карбапенем-резистентните изолати се доказва наличието на *bla*_{KPC}, което е и първият описан случай в България. Той се

доказа носител и на *bla*_{СТХ-М}, *bla*_{ТЕМ} и *bla*_{СМУ-2}. Другият карбапенем-резистентен изолат се доказва носител на *bla*_{VIM}. От изследваната колекция не се доказва щам, *S. marcescens* носител на ген *bla*_{ОХА-48}.

4.4. Проучване на болничното разпространение на *S. marcescens* чрез RAPD и ERIC PCR.

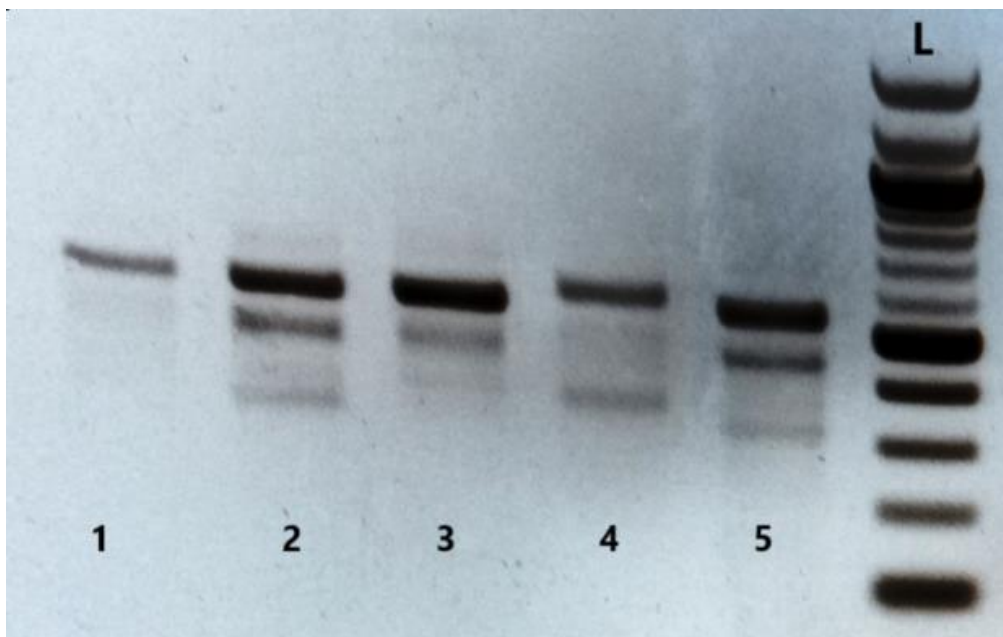
В нашето изследване резултатите, получени чрез използване на RAPD, RAPD-2 и RAPD-3, се оказаха незадоволителни, тъй като не осигуриха достатъчно дискриминация между анализираните щамове. От анализа на получените електрофоретични профили се установи, че най-често изследваните щамове или не генерират изобщо, или генерират 1 до 3 бенда, което не позволява анализ на епидемиологичната им свързаност. Аналогични са и резултатите, получени при използване на RAPD-4, RAPD-5 и RAPD-6 - повечето анализирани изолати се генерираха едва 1–2 бенда, което не позволява надеждно сравняване и разграничаване на щамове. Това ограничава приложимостта на този метод за надеждно епидемиологично типизиране (фигура 32).



Фигура 32. RAPD5-PCR на изолати *S. marcescens* с праймери 5'-AACGCGCAAC-3'; L, 100bp ДНК маркер

За целите на епидемиологичното типизиране беше изпробван и ERIC-PCR, който отново не осигури задоволителна дискриминация между изолатите (фигура

33). Получените резултати потвърждават ограничената приложимост на този метод за разграничаване на епидемичните щамове на *S. marcescens*.



Фигура 33. ERIC- PCR на изолати *S. marcescens*; L, 100bp ДНК маркер

Обсъждане

В световен мащаб целогеномното секвениране (*whole-genome sequencing*, WGS) се утвърждава като един от най-чувствителните и достоверни методи за епидемиологичен анализ, позволявайки детайлна характеристика на бактериалните щамове и проследяване на механизмите за разпространение (Rossen JWA, 2019). Въпреки предимствата си, този метод е значително по-скъп, изисква специализирано оборудване и биоинформатичен анализ, което ограничава рутинното му приложение. По-достъпните молекулярни методи за типизиране на *S. marcescens* са RAPD и ERIC-PCR, както и PFGE.

В България Иванова и съавтори успешно използват RAPD за епидемиологично типизиране на 11 клинични изолати *S. marcescens*. Получените модели с праймер RAPD-2 показват висока степен на генетична хомогенност като седем изолата остават неразличими, а при останалите се наблюдава минимално различие само в един бенд. При използване на праймер RAPD-4, всички изолати остават неразличими което предполага генетична свързаност между тях (Ivanova D, 2008).

Ефективността на молекулярно-генетичните методи за типизиране, като RAPD-PCR и ERIC-PCR, зависи от избора на праймери, лабораторните условия и

специфичните геномни характеристики на изследвания бактериален вид. При *S. marcescens* тези методи често показват по-ниска дискриминационна способност в сравнение с други представители на *Enterobacterales*, като *E.coli* и *K.pneumoniae*. Една от основните причини за това е ограниченото и неравномерно разпределение на повтарящи се елементи в генома на *S. marcescens*, като ERIC-последователностите – ключов елемент за ефективността на ERIC-PCR. Аналогично, при RAPD-PCR ниската генетична вариабилност в консервативните зони на генома води до сходни електрофоретични профили, дори между епидемиологично различни щамове. Допълнително, сравнителната геномна стабилност на *S. marcescens* – изразена в по-ниска честота на подвижни генетични елементи като интегрони, IS-елементи и плазмиди ограничава разнообразието в PCR профилите (Poirel L, 2017; van Belkum A, 2007). Поради това дори използването на различни праймери не осигурява надеждна диференциация на щамове, което редуцира приложимостта на тези техники за епидемиологично проследяване в рутинната практика.

Заключение

Резултатите от настоящото проучване демонстрират, че RAPD-PCR и ERIC-PCR притежават ограничена дискриминационна способност при епидемиологичното типизиране на *S. marcescens*. Генетичната стабилност и ниската вариабилност на вида редуцират ефективността на тези техники в рутинната практика, което обуславя необходимостта от прилагането на високодискриминационни методи като PFGE или WGS.

5. Изводи

Анализът на резултатите, получени в нашите изследвания, както и сравняването им с литературните данни ни дават основание да направим следните изводи:

1. Преобладаващата част от *S. marcescens*-асоциираните инфекции са вътреболнични (97.5%), което определя хоспитализацията като най-значимият рисков фактор за развитието на инфекцията, причинена от този патоген.
2. Най-висок леталитет се наблюдава при пациенти с неврологични заболявания (28.6%) и злокачествени процеси (17.1%). Разликата между групите и изходът от заболяването е статистически значима, което посочва неврологичните заболявания и злокачествените процеси като водещи диагнози, при които най-често се наблюдава летален изход.
3. Най-висока заболеваемост се наблюдава във възрастовата група 70–79 години, а най-ниска в групата 20–29 години, което определя възрастта като значим рисков фактор за инфекцията, причинена от *S. marcescens*.
4. Сърдечно-съдовите (65.8%), ендокринологичните (31.6%) и урологичните (13.9%) придружаващи заболявания се доказаха като значими допълнителни рискови фактори за придобиване на *S. marcescens*-асоциирана инфекция, като не и за леталитет.
5. Престоят в интензивно отделение се установи като съществен предиктор, както за възникване на инфекцията, така и за летален изход.
6. Наличието на чуждо тяло е водещ рисков фактор за *S. marcescens*-асоциирани инфекции (80.0%), следвано от проведени инвазивни процедури (16.0%) и интубация/механична вентилация (7.9%).
7. Видът на инфекцията се установи като независим прогностичен фактор за продължителността на болничния престой, като най-дълга хоспитализация се наблюдава при инфекциите на кръвта, а най-кратка – при уринарни инфекции.
8. Приложението на amikacin, gentamicin и levofloxacin е независим протективен фактор за намаляване на 30-дневния леталитет. Резистентността към amikacin се асоциира със статистически значим повишен риск от летален изход.
9. В проведеното изследване не се установи статистически значима връзка между консумацията на colistin и честотата *S. marcescens* асоциираните инфекции. Въпреки липсата на доказана корелация, наблюдаваният паралелен тренд на нарастване на двете променливи в последните години от проучването (2021–2023

г.) предполага потенциална зависимост, която изисква по-нататъшен мониторинг и анализ в по-дългосрочен времеви период.

10. Основният механизъм на резистентност към цефалоспорици от трета генерация в изследваната колекция изолати *S. marcescens* е свързан с продукцията на ESBLs, като най-чести се доказаха CTX-M бета-лактамазите (71.0%), следвани от TEM (52.0%) и само 0.9% SHV. Основен механизъм за резистентност към карбапенеми са карбапенемазите KPC и VIM.

11. RAPD-PCR и ERIC-PCR притежават ограничена дискриминационна способност при епидемиологичното типизиране на *S. marcescens*

6. Справка за приносите на дисертационния труд

Приноси с оригинален характер:

1. Извършен е задълбочен анализ на основните епидемиологични аспекти на *S. marcescens*-асоциираните инфекции сред хоспитализирани пациенти за 8-годишен период, като това е първото по рода си изследване у нас. Установени са основните рискови фактори за придобиване на инфекция и леталитет.
2. Изпитана е резистентността на клинични изолати *S. marcescens* от голяма болнична структура към широк набор от антибактериални лекарствени средства. Получените данни позволяват разработване на алгоритъм за терапевтично поведение при инфекции, причинени от *S. marcescens*.
3. Извършено е детайлно проучване на механизмите на резистентност към бета-лактамни антибактериални препарати, вкл. карбапенеми в колекция от клинични изолати *S. marcescens*, което доведе до натрупване на научно познание на локално, национално и европейско ниво.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдиха се молекулярно-генетичните механизми на β -лактамна резистентност в клинични изолати *S. marcescens*, като се потвърди водещата роля на CTX-M и TEM β -лактамазите.
2. Резистентността към карбапенеми в клинични изолати *S. marcescens* се потвърди като резултат от продукцията на карбапенемази – KPC и VIM.
3. Потвърдиха се най-значимите рискови фактори за възникване на инфекции, свързани със *S. marcescens* и свързания с тях леталитет.

Приноси с научно-приложен характер

1. Оценена е чувствителността на фенотипните тестове за детекция на ESBLs при изолати *S. marcescens*, резистентни на третогенерационни цефалоспорини.
2. Създаден е протокол за ДНК екстракция на ДНК-аза продуциращи бактерии, каквито са и *S. marcescens*.
3. Представена и оценена е ефективността на бързите молекулярно-генетични методи за детекция на бета-лактамази.
4. Представена и оценена е ефективността на бързите имунохроматографски тестове за доказване на карбапенемази в клинични изолати *S. marcescens*.

8. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд

Публикации в научни списания:

1. Niyazi D, **Radeva S**, Bozhkova M, Savova D, Stoeva T. A cheap and simple method for DNA isolation from endonuclease-producing *Serratia marcescens*. *Iran J Public Health*. 2023 May;52(5):1089–91. doi:10.18502/ijph.v52i5.12731
2. **Radeva S**, Bozhkova M, Niyazi D. History and presence of *Serratia marcescens*. *Acta Microbiol Bulg*. 2023;39(3):233–8. doi:10.59393/amb23390303
3. **Radeva S**, Niyazi D, Bozhkova M, Stoeva T. Antimicrobial resistance of *Serratia marcescens* causing bloodstream infections in a large university hospital in Bulgaria: an 8-year analysis (2016–2023). *Acta Microbiol Hung*. 2024;71(3):191–6. doi:10.1556/030.2024.02330
4. **Radeva S**, Niyazi D, Bozhkova M, Stoeva T. Wound infections caused by *Serratia marcescens*: a microbiological survey. *Scr Sci Med*. 2024;55(2). doi:10.14748/ssm.v55i2.9855

Съобщения, изнесени на научни форуми:

1. **Radeva S**, Bozhkova M, Niyazi D, Savova D, Stoeva T. Resistance rates to third-generation cephalosporins and carbapenems in *Serratia marcescens* isolates obtained from various clinical samples from two Bulgarian hospitals. *Med Sci Forum*. 2022;12(1):32. doi:10.3390/eca2022-12693
2. **Radeva S**, Bozhkova M. Clinical significance and mechanisms of resistance of *Serratia marcescens*. In: 11th South-East European Conference and 31st Annual Assembly of IMAB; 2021 Oct 28–31; [online presentation].