



## **НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ**

Отдел “Микробиология”,

Национална Референтна Лаборатория “Контрол и Мониториране на  
Антибиотичната Резистентност” (НРЛ “КМАР”)

**Проучване върху геномните характеристики, обуславящи  
лекарствената резистентност (резистом) и вирулентността  
(вирулом) при екстензивно резистентни *Pseudomonas* spp.**

Иван Иванов Стойков

### **АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
“Доктор” по научна специалност 01.06.12 Микробиология

Научен ръководител: доц. Иван Иванов, дм

Научен консултант: проф. Стефана Събчева, дм

*София, 2023 г.*

Дисертационният труд е изработен в Отдел „Микробиология“ към НЦЗПБ, гр. София с финансовата подкрепа на Националния фонд за научни изследвания на Република България чрез проект КП-06-Н23/5 и Европейския фонд за регионално развитие чрез Оперативна програма "Наука и образование за интелигентен растеж" 2014-2020; проект BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология".

Представен е на разширен колегиум на отдел „Микробиология“ на 25.09.2023 г. и е насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд съдържа 233 страници, 31 фигури и 20 таблици. Библиографията включва 680 литературни източника.

Материалите във връзка със защитата са публикувани на интернет страницата на НЦЗПБ и се намират на разположение в библиотеката на НЦЗПБ, гр. София.

---

---

Публичната защита ще се състои на ..... г. от ..... ч. в аулата на НЦЗПБ, бул. „Янко Сакъзов“ № 26, гр. София, на открито заседание на научното жури, назначено със заповед № 581/01.12.2023г. на Директора на НЦЗПБ, съгласно ППЗРАСРБ на НЦЗПБ и ЗРАСРБ.

# Съдържание

Съдържание .....	3
Използвани съкращения.....	6
1. Увод.....	8
2. Цел и задачи.....	10
3. Материали и методи .....	11
3.1. Използвани бактериални щамове .....	11
3.2. Идентификация на изолатите, използвани в проучването .....	15
3.3. Определяне на антимикробната чувствителност на изследваните щамове и CarbaNP тест за фенотипно детектиране на карбапенемази .....	16
3.4. Фенотипно детектиране на карбапенемазна активност.....	16
3.5. Екстракция на нуклеинови киселини .....	16
3.5.1. Екстракция на ДНК.....	16
3.5.2. Екстракция на РНК .....	17
3.6. Методи, базирани на PCR.....	19
3.6.1. Детекция на карбапенемази от клас А, В и D чрез мултиплексен EVAGREEN Real Time PCR.....	19
3.6.2. PCR за детекция на вирулентни фактори .....	21
3.6.3. Мултилокусен анализ на вариабилен брой от тандемни повтори (MLVA9) за типизиране на <i>P. aeruginosa</i> .....	22
3.6.4. Мултилокусно секвенционно типизиране (MLST).....	27
3.6.5. Плазмидно репликационно типизиране .....	31
3.6.6. RT-qPCR за анализ на ефлуксни системи и други гени, свързани с антибиотична резистентност .....	33
3.6.7. Клониране – PCR за амплификация на инсърти и линейризиране на вектори .....	35
3.7. Разделяне на PCR продукти чрез капилярна електрофореза .....	38
3.8. Рестрикционен анализ в пулсова гел-електрофореза (PFGE) и локализация на гени за карбапенемази посредством Southern blot хибридизация.....	39

3.8.1. Пулсова гел-електрофореза.....	39
3.8.2. Southern blot хибридизация .....	41
3.9. Конюгация.....	42
3.10. Трансформация.....	42
3.11. Изпитване на способността за формиране на биофилм .....	43
3.12. Целогеномно секвениране .....	43
3.13. Биоинформатичен анализ .....	44
3.13.1. Анализ и качествен контрол на получените къси и дълги прочити от целогеномното секвениране.....	44
3.13.2. Асемблиране на геноми.....	44
3.13.3. Полиране на сглобените геноми.....	45
3.13.4. Оценка на качеството на получените геноми.....	46
3.13.5. Идентификация на изолатите на базата на данни от целогеномно секвениране.....	46
3.13.6. Аотиране на сглобените геноми .....	47
3.13.7. Антимикробна резистентност, фенотипно предсказване и детерминанти на вирулентността.....	47
3.13.8. Плазмиден анализ.....	47
3.13.9. Анализ на интегративни конюгативни елементи.....	48
3.13.10. Мултилокусно секвенционно типизиране (MLST) и core genome MLST (cgMLST) базирани на данни от целогеномно секвениране .....	48
3.13.11. Анализ на външния мембранен поринов протеин <i>oprD</i> .....	49
4. Резултати и дискусия.....	50
4.1. Обща характеристика на изследваните изолати.....	50
4.2. Идентификация.....	50
4.3. Резистентност към антимикробни препарати.....	51
4.4. Разработване на метод за бърза екстракция на висококачествена РНК от <i>P. aeruginosa</i> .....	53
4.5. Доказване на карбапенемази .....	62

4.6.	RT-qPCR за доказване на експресия на ефлуксни системи и гени свързани с резистентността към антимикробни препарати.....	63
4.7.	Доказване на вирулентни фактори чрез PCR и анализ на способността за формиране на биофилм .....	67
4.8.	Генотипизиране по MLVA9 и MLST .....	69
4.9.	Плазмидно репликационно типизиране чрез PCR .....	71
4.10.	Конюгация.....	72
4.11.	Анализ на плазмидния профил на всички щамове, посредством S1 нуклеазно третиране (линеаризиране на плазмидите) и електрофореза в пулсово поле (PFGE).....	73
4.12.	Биоинформатичен анализ .....	75
4.12.1.	Анализ на качеството на получените къси и дълги прочити, оценка на качеството на получените геноми и тяхното депозиране в NCBI GenBank.....	75
4.12.2.	Идентификация на изолатите.....	77
4.12.3.	Определяне на детерминантите на антимикробна резистентност	78
4.12.4.	Анализ на <i>oprD</i> .....	82
4.12.5.	Плазмиден анализ.....	84
4.12.6.	Резултати от MLST и <i>cgMLST</i> типизирането на изолати <i>P. aeruginosa</i> .....	85
4.12.7.	Определяне на детерминантите на вирулентност.....	94
4.12.8.	Характеристика на IMP-продуциращите <i>P. aeruginosa</i> и поява на IMP-100, нов плазмиден вариант, съществуващ в комбинация с хромозомен VIM-4.....	97
5.	Заклучение .....	111
6.	Изводи .....	115
7.	Приноси.....	116
	Публикации свързани с дисертационния труд .....	117
	Участия в научни форуми.....	118

## *Използвани съкращения*

AMP – Резистентност към антимикробни средства  
СЗО – Световна здравна организация  
МВ – Муковисцидоза  
МПК – Минимална потискаща концентрация  
ЕТА – Екзотоксин А  
ECDC – European Centre For Disease Prevention And Control  
WGS – Whole Genome Sequencing  
MDR – Multidrug Resistant  
XDR – Extensively Drug-Resistant  
PDR – Pandrug-Resistant  
cgMLST – Core Genome Multilocus Sequence Typing  
MLST – Multilocus Sequence Typing  
MLVA – Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis  
MLSA – Multilocus Sequence Analysis  
CLP – Cyclic Lipopeptides  
DDH – DNA-DNA Hybridization  
ANI – Average Nucleotide Identity  
QRDR – Quinolone Resistance-Determining Regions  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
LPS – Lipopolysaccharide  
RND – Rresistance-Nodulation-Division  
ORF – Open Reading Frame  
PBP – Penicillin Binding Protein  
TCS – Two-Component System  
OMP – Outer Membrane Protein  
IS – Insertion Sequence  
ICE – Integrative And Conjugative Element  
ESBL – Extended Spectrum Beta-Lactamase  
MBL – Metallo-B-Lactamase  
ROS – Reactive Oxygen Species  
T1SS – Type I Secretion System  
T2SS – Type II Secretion System

T3SS – Type III Secretion System  
T4SS – Type IV Secretion System  
T5SS – Type V Secretion System  
T6SS – Type VI Secretion System  
QS – Quorum Sensing  
MGE – Mobile Genetic Element  
ST – Sequence Type  
PFGE – Pulse Field Gel Electrophoresis  
IR – Inverted Repeat  
SNP – Single Nucleotide Polymorphism

# 1. Увод

През последните години резистентността на микроорганизмите към антимикробни средства (АМР) се превърна в един от най-значимите проблеми за медицината и общественото здравеопазване, като все по-често тя се определя като глобална заплаха. Според някои експерти, появата на пан-резистентни бактерии (вкл. и в България) и липсата на нови ефективни препарати за терапия, предвещават края на антибиотичната ера. Световната здравна организация (СЗО), както и Европейският център за превенция и контрол на заболяванията (ECDC) са категорични в необходимостта от спешни мерки за ограничаване на АМР в глобален мащаб.

Неотдавнашно проучване, проведено в 204 държави през 2019 г., предостави цялостна оценка на тежестта на АМР, разкривайки приблизително 4,95 милиона смъртни случая, от които 1.27 се дължат пряко на бактериална АМР. *P. aeruginosa* се нарежда на шесто място в света по отношение на смъртността, свързана с АМР и е част от групата на високо рисковите патогени, допринасящи за тази криза. Тези факти подчертават спешната необходимост от специфични политики, програми за превенция и контрол на инфекциите, подобрен достъп до основни антибиотици и разработване на нови ваксини и антибиотици за справяне с тази критична заплаха за общественото здраве. Подчертава се наличието на пропуски в данните от страни с ниски стандарти, като се призовава за разширяване на капацитета на микробиологичните лаборатории и системите за събиране на данни, за да се задълбочи разбирането ни за АМР и да се улесни разработването на ефективни стратегии за действие (Murray et al. 2022).

Един от основните компоненти за справяне с тези проблеми е детайлното проучване на генетичните механизми на АМР. Най-съвременният и комплексен подход за решаването на тази задача, е целогеномното секвениране (WGS), даващо възможност едновременно да се проучат всички генни детерминанти асоциирани не само с множествената резистентност, но и с патоадаптивните механизми на даден микроорганизъм.

Целта на настоящото изследване е извършването на задълбочен геномен анализ на мулти- (MDR), екстензивно- (XDR) и пан-резистентни (PDR) щамове *Pseudomonas* spp., причиняващи трудно-лечими инфекции. Чрез комплекс от съвременни фенотипни и генетични методи първоначално бяха характеризирани и селектиран уникален набор



от MDR, XDR и PDR щамове, които бяха изпитани за чувствителност към антибиотици от най-ново поколение като цефтазидим/авибактам, цефтолозан/тазобактам, меропенем/ваборбактам, имипенем/релебактам и цефидерокол. За определяне механизмите на резистентност бяха използвани молекулярно-генетични техники за доказване носителство на карбапенемази, определяне ефекта на ефлуксните системи върху AMP, изследване на поринов дефицит и др. Паралелно с това, беше проведено проучване върху факторите на вирулентност и способността за производство на биофилм.

След първоначалния подбор беше формирана репрезентативна извадка от 100 MDR изолата *Pseudomonas* spp., които бяха подложени на целогеномно секвениране. Използвайки различни биоинформатични подходи бяха идентифицирани и охарактеризирани детерминантите на резистентност и вирулентност. Техният потенциал за дисеминация беше изследван чрез задълбочен анализ на мобилни генетични елементи като плазмиди, интегративни конюгативни елементи, транспозони и др. Посредством core genome multilocus sequence typing (cgMLST) беше извършен мащабен филогенетичен и филогеографски анализ на изследваните изолати.

Секвенираните геноми бяха депозирани в световните бази данни, създавайки богат и информативен ресурс, на базата на който могат да бъдат извлечени стратегически изводи за епидемичния потенциал и разпространението на ключови детерминанти на антибиотична резистентност и вирулентност.

## 2. Цел и задачи

**Цел :** Проучвания върху геномните характеристики, обуславящи лекарствената резистентност (резистом) и вирулентността (вирулом) при екстензивно резистентни *Pseudomonas* spp.

### Задачи

1. Селекция и фенотипно характеризиране на мулти-резистентни щамове *Pseudomonas* spp.
2. Предварителни анализи за формиране на репрезентативна извадка от изолати за по-нататъшен целогеномен анализ
  - 2.1. Доказване на генетични механизми на резистентност към беталактами чрез молекулярно-генетични техники (карбапенемази, ефлукс, поринов дефицит и др.)
  - 2.2. Доказване на вирулентни фактори чрез PCR и определяне продукция на биофилм
  - 2.3. Генотипизиране (MLVA, MLST) и селекция на щамове за целогеномно секвениране (WGS)
3. Детайлно геномно охарактеризиране на новооткрит вариант на плазмидно-медирана имипенемаза IMP-100 както и други IMP-продуценти при *P. aeruginosa*
4. Биоинформатичен геномен анализ на детерминантите на резистентност и вирулентност
5. Публикуване/депозирание на секвенираните геноми в световните бази данни

## 3. Материали и методи

### 3.1. Използвани бактериални щамове

В изследването бяха включени 100 MDR изолата *Pseudomonas*, от които 96 *P. aeruginosa*, 2 *P. soli*, 1 *P. kurunegalensis* и 1 *P. protegens* (Таблица 1). Тези щамове са част от колекцията на Националната референтна лаборатория по „Контрол и мониторинг на антибиотичната резистентност“ към Националният център по заразни и паразитни болести.

Таблица 1. Изолати използвани в настоящия труд

Species	Strain	month	year	Country	Isolation source	City/region
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2055	12	2010	Bulgaria	tracheal aspirate	Ruse
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2090	3	2011	Bulgaria	wound	Gabrovo
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2232	12	2011	Bulgaria	urine	Stara Zagora
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2288	3	2012	Bulgaria	wound	Stara Zagora
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2713	3	2014	Bulgaria	aspiration system	Ruse
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2717	3	2014	Bulgaria	wound	Ruse
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2848	9	2014	Bulgaria	tracheal aspirate	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2891	12	2014	Bulgaria	sputum	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2892	12	2014	Bulgaria	tracheal aspirate	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2970	6	2015	Bulgaria	CVC	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer2984	7	2015	Bulgaria	tracheal aspirate	Yambol
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3018	8	2015	Bulgaria	urine	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3019	8	2015	Bulgaria	throat swab	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3020	8	2015	Bulgaria	sputum	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3072	11	2015	Bulgaria	urine	Varna

<i>P. aeruginosa</i>	Paer3073	11	2015	Bulgaria	urine	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3074	11	2015	Bulgaria	urine	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3075	11	2015	Bulgaria	urine	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3078	11	2015	Bulgaria	wound	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3103	12	2015	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3106	12	2015	Bulgaria	wound	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3124	2	2016	Bulgaria	urine	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3126	2	2016	Bulgaria	tracheal aspirate	Varna
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3135	4	2016	Bulgaria	sputum	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3136	4	2016	Bulgaria	tracheal aspirate	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3137	4	2016	Bulgaria	pleural fluid	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3138	4	2016	Bulgaria	tracheal aspirate	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3139	4	2016	Bulgaria	wound	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3140	4	2016	Bulgaria	tracheal aspirate	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3141	4	2016	Bulgaria	tracheal aspirate	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3142	4	2016	Bulgaria	urine	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3143	4	2016	Bulgaria	urine	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3144	4	2016	Bulgaria	tracheal aspirate	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3213	7	2016	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. kurunegalensis</i>	Pkur3229	11	2016	Bulgaria	wound	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3285	1	2017	Bulgaria	urine	Burgas
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3325	3	2017	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3327	3	2017	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. soli</i>	Psol3333	3	2017	Bulgaria	abdominal exudate	Sofia

<i>P. soli</i>	Psol3334	3	2017	Bulgaria	abdominal exudate	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3346	3	2017	Bulgaria	urine	Targovishte
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3347	3	2017	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3355	4	2017	Bulgaria	wound	Stara Zagora
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3378	5	2017	Bulgaria	tracheostomy	Pazardzhik
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3407	6	2017	Bulgaria	urine	Panagyurishte
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3495	4	2018	Bulgaria	wound	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3499	4	2018	Bulgaria	wound	Burgas
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3500	4	2018	Bulgaria	urine	Burgas
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3506	4	2018	Bulgaria	wound	Stara Zagora
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3530	6	2018	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3541	6	2018	Bulgaria	throat swab	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3554	6	2018	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3565	7	2018	Bulgaria	tracheal aspirate	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3592	8	2018	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3594	8	2018	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3635	9	2018	Bulgaria	wound	Stara Zagora
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3653	9	2018	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3720	12	2018	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3771	1	2019	Bulgaria	throat swab	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3790	3	2019	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3795	3	2019	Bulgaria	drainage	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3796A	3	2019	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3824	3	2019	Bulgaria	sputum	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3825	3	2019	Bulgaria	wound	Plovdiv
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3854	4	2019	Bulgaria	wound	Sofia

<i>P. aeruginosa</i>	Paer3855	4	2019	Bulgaria	wound	Stara Zagora
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3858	4	2019	Bulgaria	urine	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3859	4	2019	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3860	4	2019	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3877	4	2019	Bulgaria	tracheal aspirate	Pleven
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3900	5	2019	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3936	7	2019	Bulgaria	wound	Pleven
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3951	8	2019	Bulgaria	stool	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3984	11	2019	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer3987	11	2019	Bulgaria	pleural fluid	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4061	12	2019	Bulgaria	sputum	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4067	12	2019	Bulgaria	throat swab	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4070	12	2019	Bulgaria	urine	Burgas
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4090	1	2020	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4095	1	2020	Bulgaria	BAL	Pleven
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4097	1	2020	Bulgaria	pleural fluid	Pleven
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4098	1	2020	Bulgaria	wound	Pleven
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4099	1	2020	Bulgaria	wound	Pleven
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4223	7	2020	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4259	10	2020	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4413	6	2021	Bulgaria	blood	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4485	9	2021	Bulgaria	urine	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4572	2	2022	Bulgaria	sputum	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4574	2	2022	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil

<i>P. aeruginosa</i>	Paer4575	2	2022	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4686	8	2022	Bulgaria	urine	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4687	8	2022	Bulgaria	sputum	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4759	10	2022	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4782Mk	12	2022	Bulgaria	throat swab	Sofia
<i>P. protegens</i>	Ppro224	1	2023	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer1035	3	2023	Bulgaria	urine	Sofia
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4805	2	2023	Bulgaria	tracheal aspirate	Kyustendil
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4856	3	2023	Bulgaria	tracheal aspirate	Smolyan
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4857	3	2023	Bulgaria	tracheal aspirate	Smolyan
<i>P. aeruginosa</i>	Paer4858	3	2023	Bulgaria	nasal swab	Smolyan

### ***3.2. Идентификация на изолатите, използвани в проучването***

Видовата принадлежност на част от изолатите, беше изследвана биохимично с търговските системи за идентификация API 20NE - НФГБ (bioMerieux, Marcy l’Etoile, France).

Идентификация на всички изолати беше извършена и с MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Bremen, Germany) с референтната библиотека MALDI Reference 2022 Library v4.0.0.

### ***3.3. Определяне на антимикробната чувствителност на изследваните щамове и CarbaNP тест за фенотипно детектиране на карбапенемази***

На всички изолати от извадката беше определена МПК към широк набор от антимикробни агенти, използвани за терапия, включително такива от последно поколение като Meropenem-vaborbactam, Ceftazidime-avibactam, Ceftolozan-tazobactam. Изследването беше извършено с помощта на Micronaut-S (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany), MICRONAUT-S Pseudomonas MIC и UMIC® Cefiderocol (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Bremen, Germany). Антибиотиците, невключени в плаките, бяха изпитани чрез E-test или дисково-дифузионния метод. Интерпретацията на резултатите беше извършена съгласно EUCAST (v13.0), използвайки Biomic V3.

За допълнително изпитване на чувствителността към колистин беше използван още и наскоро описания Colisporin тест (Jouy et al. 2017).

### ***3.4. Фенотипно детектиране на карбапенемазна активност***

Фенотипна детекция на карбапенемазна активност на изолатите беше извършена чрез модифициран CarbaNP тест (Nordmann, Poirel, and Dortet 2012).

### ***3.5. Екстракция на нуклеинови киселини***

#### ***3.5.1. Екстракция на ДНК***

##### ***3.5.1.1. Екстракция на тотална ДНК за PCR***

Изолирането на геномна ДНК бе извършено от 24 часови култури върху Columbia Blood Agar или Mueller-Hinton агар чрез термичен лизис в присъствие на Chelex 100 (Walsh, Metzger, and Higuchi 1991).

За целта от бактериална култура с помощта на типче P1000 се вземат 4-5 колонии и се разстилат по дъното и стените на епруветка от 1,5 ml , след което се добавят 200 µl Chelex 100. Пробата се хомогенизира за 10-30 сек. на вортекс, след което се поставя в



термоблок за 10 мин. при температура 96-98°C. След изваждането от термоблока, пробите се охлаждат на лед за 1 мин. и се центрофугират 10 мин. при 13 300 об/мин. Супернатантата се прехвърля в нова епруветка. Последната стъпка от процедурата включва десеткратно разреждане с краен обем около 200 µl и спектрофотометрично определяне на крайната концентрация на изолираната ДНК чрез UV спектрофотометър (GeneQuant pro, Amersham Biosciences), при дължини на вълната  $\lambda_{260}$ .

### ***3.5.1.2. Екстракция на тотална ДНК за целогеномно секвениране***

Екстракцията на тотална геномна ДНК за целогеномно секвениране беше извършена с набора PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Мисури, Тексас, САЩ) съгласно инструкциите на производителя, с изключение на това, че всички стъпки на хомогенизиране бяха извършени чрез пипетиране.

### ***3.5.1.3. Екстракция на плазмидна ДНК***

Плазмидна ДНК беше получена с помощта на NucleoSpin Plasmid Mini kit за плазмидна ДНК (Macherey-Nagel, Düren, Германия), следвайки протокола "low-copy plasmid".

## ***3.5.2. Екстракция на РНК***

### ***3.5.2.1. Разработване на метод за бърза екстракция на висококачествена РНК от *Pseudomonas* spp. - FACTS***

В хода на дисертационния труд беше разработен метод за бърза екстракция на висококачествена РНК от *Pseudomonas*, наречен FACTS (Formamide, CDTA, TCEP, Sarcosyl). Той беше изпитан и сравнен с 3 други техники за екстракция на РНК: RNA Snap (Stead et al. 2012), SDS-Citrate (Oñate-Sánchez and Verdonk 2021), Hot-Phenol Hot-SDS (Jahn, Charkowski, and Willis 2008) и 2 комерсиални набора: GeneMATRIX Universal RNA/miRNA purification kit (cat. No. E3599, EurX Ltd.) с "cell culture" протокола за

тотална РНК и TRIzol™ Reagent (cat. No 15596026), използвайки протокола „cells grown in suspension“.

За анализите бяха използвани три референтни щама *P. aeruginosa*: ATCC 27853, PA01 и EARS 5585. От 24 часови култури на соево-казеинов бульон бяха направени разреждания до 0.5 OD<sub>600</sub>, които да послужат като стандартизиран стартов материал за всеки от методите. Експериментите бяха извършени в един ден от едни и същи култури. Резултатите бяха анализирани на капилярна електрофореза. Критериите, използвани за оценка на методите включваха интегритет, концентрация на изолираната РНК и наличие на остатъчна ДНК.

Анализът на качеството на получената РНК беше извършен чрез системите за капилярна електрофореза QIAxcel (Qiagen) и Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies), както и чрез Qubit RNA Integrity and Quality (IQ) Assay Kit (Thermo Scientific) в съответствие с инструкциите на производителите.

### **3.5.2.2. Екстракция на РНК за последващи анализи**

Извличането на РНК беше извършено по методът FACTS, разработен от нашия екип. Изолатите *P. aeruginosa* бяха култивирани за една нощ на 30 °C в бульон Luria Bertani (LB).

Бактериална култура, съответстваща на 0.25 OD<sub>600</sub>, се смесва с 1/30 обем от 300 mg/ml поливинилсулфонова киселина (PVSA) (278424, Sigma-Aldrich) и се инкубира за 5 мин. на 4 °C за инактивиране на РНКазите. Суспензията се центрофугира при 9000 g за 2 мин. на 4 °C и супернатантата се изхвърля. Клетъчният пелет се ресуспендира в 100 µl лизиращ буфер, съставен от 98% дейонизиран формаид (608082, Beckman Coulter), 2.25 mmol/L транс-1,2-диаминоциклохексан-N,N,N',N'-тетраоцетна киселина (CDTA, 155000250, Thermo Scientific), 1.25 mmol/L Tris(2-карбоксиетил)фосфин (TCEP) (646547, Sigma-Aldrich) и 0.025% N-лауроилсаркозин натрий (SLS) (L9150, Sigma-Aldrich). След това суспензията се инкубира при 68 °C за 10 мин., последвано от охлаждане 2 мин. върху лед и центрофугиране при 16 300 g за 6 мин. при 4 °C. След това супернатантата (съдържаща РНК) се прехвърля в нова епруветка и се съхранява при -80 °C.

### **3.5.2.3. Пречистване на РНК**

Изолираните с FACTS РНК проби бяха разредени 10 пъти и пречистени с помощта на етанол и линеен полиакриламид (LPA). Етанолът и разтвор А (0,025 % LPA, 75 mmol/L амониев ацетат) (Fregel, González, and Cabrera 2010) бяха смесени в съотношение 7:3, след което шест обема от тази смес бяха добавени към всяка проба, последвано от разбъркване и центрофугиране при 16 300 g за 10 мин. при 4 °C. Супернатантата беше отстранена, а пелетите бяха изсушени на въздух и елуирани в 15 µl DEPC вода.

## **3.6. Методи, базирани на PCR**

### **3.6.1. Детекция на карбапенемази от клас А, В и D чрез мултиплексен EVAGREEN Real Time PCR**

За детекция на гените, определящи синтезата на карбапенемази, бе приложен Multiplex Real-time PCR. Праймерни двойки за всеки ген бяха набавени от предварително публикувани източници, включително SIM, SPM, OXA-48-like, GES и KPC (Poirel, Naas, and Nordmann 2006; Mendes et al. 2007; Cole et al. 2009; Gröbner et al. 2009), както и допълнителни праймерни двойки за IMP, VIM и NDM (Goudarzi et al. 2019).

Полимеразно-верижната реакция бе проведена в обем 20 µl. Протоколът за работа е показан на Таблица 2а, а PCR програмата на Таблица 2б.

**Таблица 2а.** PCR протокол за детекция на карбапенемази

<b>Carbapenemase genes detection multi-plex PCR protocol</b>				
<b>Reagent</b>	<b>Stock conc</b>	<b>Reaction conc</b>	<b>Vol per 1 react [μl]</b>	<b>Vol for 10 reactions PCR [μl]</b>
PCR buffer 10x	10.0	1.0	2.0	20.0
dNTP mix [mM]	10.0	0.3	0.5	5.0
DHS Taq [U/ μl]	5.0	0.1	0.2	2.0
DMSO [%]	100.0	2.0	0.4	4.0
EVA Green [X]	20.0	1.0	1.0	10.0
OXA-48 [μM]	10.0	0.30	0.60	6.00
KPC [μM]	10.0	0.16	0.32	3.20
GES [μM]	10.0	0.25	0.50	5.00
IMP [μM]	10.0	0.40	0.80	8.00
VIM [μM]	10.0	0.20	0.40	4.00
GIM [μM]	10.0	0.13	0.25	2.50
SIM [μM]	10.0	0.13	0.25	2.50
SPM [μM]	10.0	0.30	0.60	6.00
NDM-1 [μM]	10.0	0.23	0.45	4.50
sample DNA [ng/μl]	5÷15		2.00	20.0
molecular grade Water			9.73	97.3
Reaction volume:			20	200.0

**Таблица 2б.** Условия на протичане на PCR реакцията

<b>PCR setup program</b>		
<b>Cycles</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>
	95C	4 min
10x Touch-Down	95C	20 s
	64-55C-TD	35 s
	70C	40 s
21x	97C	10 s
	54C	25 s
	70C	50 s
Final elongation	72C	3 min
Melting curve	72-96C	

Положителният резултат се изразява в експоненциално нарастване на флуоресценцията (амплификация), докато при отрицателните, кривата не се променя в хода на реакцията. За потвърждаване и диференциране на конкретните гени, ампликоните от положителните проби допълнително се разделят и анализират на капилярна електрофореза.

### 3.6.2. PCR за детекция на вирулентни фактори

Детектирането на вирулентни фактори беше извършено посредством 2 мултиплекс PCR постановки с предварително публикувани праймери (Ertugrul et al. 2017; Lanotte et al. 2004). Протоколите и PCR условията са показани в таблици 3а, 3б и 3с.

Таблица 3а. Мултиплекс PCR 1

Virulence genes detection multi-plex PCR1 protocol				
Reagent	Stock conc	Reaction conc	Vol per 1 react [μl]	Vol for 10 reactions PCR [μl]
v9.2. buf+20MgCl <sub>2</sub> 160mM TEA-Cl 10x	10.00	1.00	2.00	20.00
TEA-CL [mM]	300.00	24.00	1.60	16.00
dNTP [mM]	2.50	0.20	1.60	16.00
Perpetual [U/ μl]	2.50	0.0325	0.26	2.60
EVAgreen [X]	20.00	0.80	0.80	8.00
rhII F/R [μM]	10.0	0.25	0.50	5.00
rhIRF/R [μM]	10.0	0.25	0.50	5.00
fliC F/R [μM]	10.0	0.25	0.50	5.00
sample DNA [ng/μl]	5÷15		1.50	15.0
molecular grade Water			10.74	107.4
Reaction volume:			20	200.0

Таблица 3б. Мултиплекс PCR 2

Virulence genes detection multi-plex PCR2 protocol				
Reagent	Stock conc	Reaction conc	Vol per 1 react [μl]	Vol for 10 reactions PCR [μl]
v9.2. buf+20MgCl <sub>2</sub> 160mM TEA-Cl 10x	10.00	1.00	2.00	20.00
TEA-CL [mM]	300.00	24.00	1.60	16.00
dNTP [mM]	2.50	0.20	1.60	16.00
Perpetual [U/ μl]	2.50	0.0325	0.26	2.60
EVAgreen [X]	20.00	0.80	0.80	8.00
algD F/R [μM]	10.0	0.20	0.40	4.00
aprA F/R [μM]	10.0	0.15	0.30	3.00
lasA F/R [μM]	10.0	0.40	0.80	8.00
lasB F/R [μM]	10.0	0.25	0.50	5.00
plcH F/R [μM]	10.0	0.15	0.30	3.00
plcN F/R [μM]	10.0	0.10	0.20	2.00
toxA F/R [μM]	10.0	0.10	0.20	2.00
sample DNA [ng/μl]	5÷15		1.50	15.0
molecular grade Water			9.54	95.40
Reaction volume:			20	200.0

Таблица 3с. PCR програма

PCR setup program		
Cycles	Temperature	Time
	95C	4 min
10x Touch-Down	97C	10 s
	66-57C-TD	40 s
	70C	45 s
23x	97C	10 s
	56C	25 s
	70C	90 s
Final elongation	72C	3 min
Melting curve	72-96C	

### 3.6.3. Мултилокусен анализ на вариабилен брой от тандемни повтори (MLVA9) за типизиране на *P. aeruginosa*

За типизиране на изследваните *P. aeruginosa* и определяне на тяхната филогенетична свързаност използвахме схемата описана от Turton и сътр. MLVA<sup>9</sup><sub>London</sub> с девет праймерни двойки (ms172; ms211; ms213; ms214; ms217; ms222; ms207; ms209; ms061) (Таблица 4) (Turton et al. 2010). Амплификацията се извърши в четири дуплексни и една самостоятелна PCR (от 1 до 5). Протоколите и характеристиките на праймерите са представени на таблици 4a-g (Turton et al. 2010).

**Таблица 4а.** Протокол за мултиплекс PCR1

<b>MLVA multi-plex PCR1 protocol</b>				
<b>Reagent</b>	<b>Stock conc</b>	<b>Reaction conc</b>	<b>Vol per 1 react [µl]</b>	<b>Vol for 10 reactions PCR [µl]</b>
v9.2. buf+20MgCl <sub>2</sub> 160mM TEA-Cl 10x	10.00	1.00	1.50	15.00
TEA-CL [mM]	300.00	24.00	1.60	16.00
dNTP [mM]	2.50	0.20	1.20	12.00
Perpetual [U/ µl]	2.50	0.0325	0.20	2.00
DMSO [%]	100.00	5.00	0.75	7.50
ms207L [µM]	10.0	0.20	0.30	3.00
ms207R [µM]	10.0	0.20	0.30	3.00
ms172L [µM]	10.0	0.50	0.75	7.50
ms172R [µM]	10.0	0.50	0.75	7.50
sample DNA [ng/µl]	5÷15		1.50	15.0
molecular grade Water			6.16	61.50
Reaction volume:			15	150.0

**Таблица 4б.** Протокол за мултиплекс PCR2

<b>MLVA multi-plex PCR2 protocol</b>				
<b>Reagent</b>	<b>Stock conc</b>	<b>Reaction conc</b>	<b>Vol per 1 react [µl]</b>	<b>Vol for 10 reactions PCR [µl]</b>
v9.2. buf+20MgCl <sub>2</sub> 160mM TEA-Cl 10x	10.00	1.00	1.50	15.00
TEA-CL [mM]	300.00	24.00	1.60	16.00
dNTP [mM]	2.50	0.20	1.20	12.00
Perpetual [U/ µl]	2.50	0.0325	0.20	2.00
DMSO	100.00	5.00	0.75	7.50
ms211L [µM]	10.0	0.25	0.375	3.75
ms211R [µM]	10.0	0.25	0.375	3.75
ms061L [µM]	10.0	0.55	0.825	8.25
ms061R [µM]	10.0	0.55	0.825	8.25
sample DNA, ng/µl	5÷15		1.50	15.0
molecular grade Water			5.86	58.50
Reaction volume:			15	150.0

**Таблица 4с.** Протокол за мултиплекс PCR3

<b>MLVA multi-plex PCR3 protocol</b>				
<b>Reagent</b>	<b>Stock conc</b>	<b>Reaction conc</b>	<b>Vol per 1 react [μl]</b>	<b>Vol for 10 reactions PCR [μl]</b>
v9.2. buf+20MgCl2 160mM TEA-Cl 10x	10.00	1.00	1.50	15.00
TEA-CL [mM]	300.00	24.00	1.60	16.00
dNTP [mM]	2.50	0.20	1.20	12.00
Perpetual [U/ μl]	2.50	0.0325	0.20	2.00
DMSO	100.00	5.00	0.75	7.50
ms209L [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
ms209R [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
ms213L [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
ms213R [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
sample DNA, ng/μl	5÷15		1.50	15.0
molecular grade Water			5.86	58.50
Reaction volume:			15	150.0

**Таблица 4d.** Протокол за мултиплекс PCR4

<b>MLVA multi-plex PCR4 protocol</b>				
<b>Reagent</b>	<b>Stock conc</b>	<b>Reaction conc</b>	<b>Vol per 1 react [μl]</b>	<b>Vol for 10 reactions PCR [μl]</b>
v9.2. buf+20MgCl2 160mM TEA-Cl 10x	10.00	1.00	1.50	15.00
TEA-CL [mM]	300.00	24.00	1.60	16.00
dNTP [mM]	2.50	0.20	1.20	12.00
Perpetual [U/ μl]	2.50	0.0325	0.20	2.00
DMSO	100.00	5.00	0.75	7.50
ms222L [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
ms222R [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
ms214L [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
ms214R [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
sample DNA, ng/μl	5÷15		1.50	15.0
molecular grade Water			5.86	58.50
Reaction volume:			15	150.0



**Таблица 4е.** Протокол за мултиплекс PCR5

<b>MLVA multi-plex PCR5 protocol</b>				
<b>Reagent</b>	<b>Stock conc</b>	<b>Reaction conc</b>	<b>Vol per 1 react [μl]</b>	<b>Vol for 10 reactions PCR [μl]</b>
v9.2. buf+20MgCl2 160mM TEA-Cl 10x	10.00	1.00	1.50	15.00
TEA-CL [mM]	300.00	24.00	1.60	16.00
dNTP [mM]	2.50	0.20	1.20	12.00
Perpetual [U/ μl]	2.50	0.0325	0.20	2.00
DMSO [%]	100.00	5.00	0.75	7.50
ms217L [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
ms217R [μM]	10.0	0.40	0.600	6.00
sample DNA [ng/μl]	5÷15		1.50	15.0
molecular grade Water			7.06	70.60
Reaction volume:			15	150.0

**Таблица 4ф.** PCR програма на MLVA мултиплекс PCR1-5

<b>PCR setup program</b>		
<b>Cycles</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>
	95C	10 min
5x Touch- Down	96C	20 s
	65-61C-TD	30 s
	70C	60 s
25x	96C	20 s
	60C	30 s
	70C	60 s
Final elongation	72C	15 min

**Таблица 4g.** Характеристика на праймерите използвани в MLVA9 за генотипизиране на *P. aeruginosa*

Мултиплексен PCR	Праймер/ локус	Секвенция	Концентрация на праймерите	Размер на повтора (bp)	Големина на продукта и бр. копия при <i>P.aeruginosa</i> PAO1
1	ms207L	ACGGCGAACAGCACCAGCA	0.4µM	6	146(7)
	ms207R	CTCTTGAGCCTCGGTCACT			
	ms172L	GGATTCTCTCGCACGAGGT	0.4µM	54	789 (12)
	ms172R	TACGTGACCTGACGTTGGTG			
2	ms211L	ACAAGCGCCAGCCGAACCTGT	0.25µM	101	663(5)
	ms211R	CTTCGAACAGGTGCTGACCGC			
	ms061L	CTTGCCGTGCTACCGATCC	0.55µM	6	127(12)
	ms061R	CCCCATGCCAGTTGC			
3	ms209L	CAGCCAGGAACTGCGGAGT	0.4µM	6	148(6)
	ms209R	CTTCTCGCAACTGAGCTGGT			
	ms213L	CTGGGCAAGTGTTGGTGGATC	0.4µM	103	640(5)
	ms213R	TGGCGTACTCCGAGCTGATG			
4	ms222L	AGAGGTGCTTAACGACGGAT	0.4µM	101	390(2)
	ms222R	TGCAGTTCTGCGAGGAAGGCG			
	ms214L	AAACGCTGTTCCGCAACCTCTA	0.4µM	115	426(3)
	ms214R	CCATCATCCTCCTACTGGGTT			
5	ms217L	TTCTGGCTGTGCGACTGAT	0.4µM	109	606(2)
	ms217R	GAACAGCGTCTTTTCCTCGC			

Ампликоните бяха идентифицирани чрез фрагментен анализ на капилярна електрофореза. Генотипът се определя като комбинация от големините (брой на повторите) във всички изследвани локуси (Таблица 5).

**Таблица 5.** Очакван размер при съответен брой на повторите във всеки от деветте изследвани VNTR локуса при *P. aeruginosa*

бр.повтори локус	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	7	8	8.5	9	10	11	12	13	14	15	
ms172_54bp													573	607	627	681	735	<b>789</b>	843			
ms211_101bp			360		461		562	600	<b>663*</b>		764	865	966									
ms213_103bp	221	280	324		427	484	530	567-595	<b>633</b>	680	737	840	943		1046							
ms214_115bp			311		<b>426</b>		541	570	677	720	795											
ms217_109bp	497	551	<b>606</b>	658	715		824		933		1042											
ms222_101bp	289		<b>390</b>		491		592		693		794											
ms207_6bp							128		134		140	<b>146</b>	152		158	164	170	176	182	188	194	
ms209_6bp			124		130		136		142		<b>148</b>	154	160		166	172						
ms061_6bp											91	97	103		109	115	121	<b>127</b>	133	139	145	

\*с удебелен шрифт е означен размера на локусите при референтния щам PAO1

### 3.6.4. Мултилокусно секвенционно типизиране (MLST)

Амплификационната реакция беше извършена в краен обем 25  $\mu$ l по протокола на Chris Dowson и Barry Curran (Curran et al. 2004). Състава на реакцията, както и температурният режим са представени на таблици 6 (а и б). Използвани бяха модифицирани праймери с добавени праймерни опашки, които са показани на Таблица 6с (опашките са подчертани, а оригиналните секвенции на праймерите са представени с удебелен шрифт).

Таблица 6а. Протокол за амплификация

MLST amplification protocol				
Reagent	Stock conc	Reaction conc	Vol per 1 react [ $\mu$ l]	Vol for 10 reactions PCR [ $\mu$ l]
1X PCR buffer + 2mM MgCl <sub>2</sub>	10.00	1.00	2.50	25.00
dNTP [mM]	10.00	0.20	1.20	12.00
Perpetual [U/ $\mu$ l]	2.50	0.04	0.20	2.00
DMSO	100.00	5.00	0.75	7.50
Primer F [ $\mu$ M]	10.0	0.30	0.60	6.00
Primer R [ $\mu$ M]	10.0	0.30	0.60	6.00
sample DNA [ng/ $\mu$ l]	15 $\times$ 30		2.00	20.0
molecular grade Water			17.16	171.50
Reaction volume:			25	250.0

Таблица 6б. Температурен режим за амплификация на ампликоните

PCR setup program		
Cycles	Temperature	Time
	96C	4 min
25x	96C	60 s
	55C	60 s
	72C	60 s
Final elongation	72C	10 min

**Таблица 6с.** Праймери използвани за амплификация и секвениране на структурните гени при MLST на *P. aeruginosa* (<https://pubmlst.org/paeruginosa/info/primers.shtml>)

Ген/ Праймер	Секвенция на праймера 5'-3'	Модифицирана * секвенция на праймера	Референция на модификацията
<b>acsA</b>			
acsA F	<u>GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA</u> <b>CCTGGTGTACGCCTCGCTGAC</b>		
acsA R	<u>TTGTGAGCGGATAACAATTTTC</u> <b>GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT</b>		
<b>aroE</b>			
aroE F	<u>GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA</u> <b>TGGGGCTATGACTGGAAACC</b>	<b>ACGATTTCCCCGGGTTC</b>	(Eusebio et al. 2013)
aroE R	<u>TTGTGAGCGGATAACAATTTTC</u> <b>TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA</b>	<b>CGCGCCAGAGGAAGAAT</b>	
<b>guaA</b>			
guaA F	<u>GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA</u> <b>CGGCCTCGACGTGTGGATGA</b>		
guaA R	<u>TTGTGAGCGGATAACAATTTTC</u> <b>GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA</b>		
<b>mutL</b>			
mutL F	<u>GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA</u> <b>CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG</b>	<b>AGCCTGGCAGGTGGAAAC</b>	(Eusebio et al. 2013)
mutLR	<u>TTGTGAGCGGATAACAATTTTC</u> <b>CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC</b>		
<b>nuoD</b>			
nuoD F	<u>GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA</u> <b>ACCGCCACCCGTA CTG</b>		
nuoD R	<u>TTGTGAGCGGATAACAATTTTC</u> <b>TCTCGCCCATCTTGACCA</b>		
<b>ppsA</b>			
ppsA F	<u>GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA</u> <b>GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG</b>		
ppsA R	<u>TTGTGAGCGGATAACAATTTTC</u> <b>GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG</b>		
<b>trpE</b>			
trpE F	<u>GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA</u> <b>GCGGCCAGGGTCGTGAG</b>		
trpE R	<u>TTGTGAGCGGATAACAATTTTC</u> <b>CCCGGCGCTTGTTGATGGTT</b>		
<b>Универсални секвенционни праймери (комплементарни на 5' опашките в ампликона)</b>			
<b>MLST_Kpf</b>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA		Diancourt et.al. (Diancourt et al. 2005)
<b>MLST_Kpr</b>	TTGTGAGCGGATAACAATTTTC		

Електрофоретичното разделяне на получените ампликони беше извършено на QiAxcel (Qiagen) – автоматизирана система за капилярна гел електрофореза. След като беше определено наличието на специфични ампликони без артефакти, последва пречистване на ампликоните.

След потвърждение на получените ампликони бяха предприети стъпки за тяхното пречистване от остатъчни праймери, dNTP и неспецифични продукти, включително праймерни димери с размер <200bp. Беше използван протоколът на Rosenthal и колеги (Rosenthal, Coutelle, and Craxton 1993):

- a) Пречистващият разтвор (2x PEG буфер) се добавя към готовия PCR-продукт в обемно съотношение 1:1, хомогенизира се на вортекс и се инкубира за 10 минути на стайна температура.
- b) Центрофугира се 10 минути на 13 300 об/мин на стайна температура и супернатантата се отстранява
- c) Към утайката се добавят 200  $\mu$ l 75% етанол
- d) Центрофугира се 10 минути на 13 300 об/мин на стайна температура
- e) Супернатантата се отстранява и се изчаква остатъчният етанол да се изпари - 10 минути на 37°C
- f) Изсушената утайка се разтваря в 20 $\mu$ l бидестилирана вода (ddH<sub>2</sub>O) и се съхранява на -20°C

След пречистването им, ампликоните бяха готови за секвениращата реакция. Тя беше извършена в краен обем от 12.5  $\mu$ l (Таблица 7а). Температурният режим е показан в Таблица 7б.

**Таблица 7а.** Протокол за секвениращ PCR

<b>MLST Sequencing protocol</b>				
<b>Reagent</b>	<b>Stock conc</b>	<b>Reaction conc</b>	<b>Vol per 1 react [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Vol for 10 reactions PCR [<math>\mu</math>l]</b>
Sequencing buffer [X]	10.00	0.60	0.75	7.50
DTCS mix [X]	2.50	0.40	2.00	20.00
MLST Kp-F [ $\mu$ M]	10.00	0.33	0.41	4.10
MLST Kp-R [ $\mu$ M]	10.00	0.33	0.41	4.10
sample DNA [ng/ $\mu$ l]	15 $\pm$ 35		2.00	20.00
molecular grade Water			6.93	69.30
Reaction volume:			12.50	125.00

**Таблица 7б.** Температурен режим на секвениращ PCR

PCR setup program		
Cycles	Temperature	Time
	96C	4 min
33x	96C	20 s
	50C	20 s
	60C	4 min

Продуктите от секвениращия PCR бяха пречистени по протокол разработен от Fregel и сътр. (Fregel, González, and Cabrera 2010), който протича в няколко стъпки:

a) Пречистването беше извършено чрез пречистващ разтвор- смес от 96% етанол и Solution A (Solution A - 0,075M амониев ацетат (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) и 0,025% LPA (линеен полиакриламид)) в съотношение – 7 части етанол към 3 части Solution A. Пречистващият разтвор се прибавя в обем 8 пъти по-голям от обема на пробата, т.е в съотношение 8:1.

b) Центрофугира се за 45 минути на 2000 об/мин (560g) при температура 10-12 °C или 10 мин на 13 300 об/мин (17 000g).

c) Супернатантата се отстранява и пробата се суши на 37°C за 15 минути

d) Към изсушената проба се прибавят 30 µl буфер за накапване SLS (Sample Loading Solution- Beckman Coulter)

Секвенаторът, на който се извършваха анализите по метода на Sanger бе 8-капилярен GeXP (Beckman Coulter). Електрофорезата беше извършена при следните условия - температура на капилярките – 55°C, денатурация на 90°C за 120 секунди, инжектиране (навлизане на продуктите в капилярката) – 2.0 kV за 10 секунди и разделяне – 3.0 kV за 180 минути. Получените секвенции бяха обработени с помощта на софтуера GeneiousPrime® 2023.2.1.

### 3.6.5. Плазмидно репликоново типизиране

Плазмидно репликоново типизиране беше извършено посредством два мултиплексни touchdown PCR в реално време, чиито протоколи са представени на Таблица 8 (а и б).

**Таблица 8а.** Протокол за мултиплекс PCR1

PBRT multi-plex PCR1 protocol				
Reagent	Stock conc	Reaction conc	Vol per 1 react [μl]	Vol for 10 reactions PCR [μl]
PCR buffer (EURx)+2mM MgCl <sub>2</sub> 40 mM TEA-Cl 10x [X]	10.00	1.00	2.00	20.00
TEA-CL [mM]	300.00	24.00	1.60	16.00
dNTP [mM]	2.50	0.35	2.80	28.00
Perpetual [U/ μl]	2.50	0.03	0.24	2.40
EVAgreen [X]	20.00	0.85	0.85	8.50
IncP-1 (α, β, ε) F/R [μM]	10.0	0.30	0.60	6.00
IncP-1γ F/R [μM]	10.0	0.30	0.60	6.00
IncP-1γ-like F/R [μM]	10.0	0.30	0.60	6.00
IncP-1δ F/R [μM]	10.0	0.30	0.60	6.00
IncP-1ζ F/R [μM]	10.0	0.30	0.60	6.00
IncP-7 F/R [μM]	10.0	0.35	0.70	7.00
IncP-9 F/R [μM]	10.0	0.40	0.80	8.00
IncQ F/R [μM]	10.0	0.30	0.60	6.00
IncA/C (IncP-3) F/R [μM]	10.0	0.20	0.40	4.00
IncN F/R [μM]	10.0	0.25	0.50	5.00
IncW F/R [μM]	10.0	0.20	0.40	4.00
IncP-6 (IncU) F/R [μM]	10.0	0.30	0.60	6.00
sample DNA, ng/μl	10÷35		1.50	15.0
molecular grade Water			4.01	40.10
Reaction volume:			20.00	200.0

**Таблица 8b.** Протокол за мултиплекс PCR2

<b>MLVA multi-plex PCR2 protocol</b>				
<b>Reagent</b>	<b>Stock conc</b>	<b>Reaction conc</b>	<b>Vol per 1 react [µl]</b>	<b>Vol for 10 reactions PCR [µl]</b>
PCR buffer (EURx)+2mM MgCl <sub>2</sub> 40 mM TEA-Cl 10x [X]	10.00	1.00	2.00	20.00
TEA-CL [mM]	300.00	24.00	1.60	16.00
dNTP [mM]	2.50	0.35	2.80	28.00
Perpetual [U/ µl]	2.50	0.03	0.24	2.40
EVAgreen [X]	20.00	0.85	0.85	8.50
IncP-2 F/R [µM]	10.0	0.30	0.60	6.00
IncP-10 F/R [µM]	10.0	0.30	0.60	6.00
pKLC102-like F/R [µM]	10.0	0.30	0.60	6.00
pMOS94-like F/R [µM]	10.0	0.30	0.60	6.00
sample DNA, ng/µl	10÷35		1.50	15.0
molecular grade Water			8.61	86.10
Reaction volume:			20.00	200.0

Оптималните концентрации на праймерите (Таблицы 9) за мултиплексен PCR 1 и 2 бяха определени експериментално. Термичните условия бяха еднакви и за двата мултиплекса и са представени на Таблица 8с.

**Таблица 8с.** Температурен режим (mPCR1 и mPCR2)

<b>PCR setup program</b>		
<b>Cycles</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>
	95C	4 min
10x Touch-Down	97C	10 s
	65-56C-TD	40 s
	70C	45 s
23x	97C	10 s
	55C	30 s
	70C	60 s
Final elongation	72C	3 min
Melting curve	72-96C	

Положителните PCR продукти бяха потвърдени на система за капилярна гел-електрофореза с висока разделителна способност QIAxcel (Qiagen, Hilden, Германия).



**Таблица 9.** Използвани праймери в mPCR1 и mPCR2

Replicon type	Primers	Fragment Length (bp)	Reference
P-1(α,β,ε)	Forward: TTCACSTTCTACGAGMTKTGCCAGGAC Reverse: GWCAGCTTGCGGTA CTCTCCC	281	(Bahl et al. 2009)
P-1γ	Forward: TTCACSTTCTACGAGCTTTGCAGCGAC Reverse: GTCAGCTCGCGGTA CTCTCCCA	281	(Bahl et al. 2009)
P-1γ-like	Forward: TTCACSTTCTACGAACTGTGTAAT Reverse: GTCAAGGCCCGATA CTCTCCCA	281	(Wolters et al. 2015)
P-1δ	Forward: TTCACSTTCTACGAGCTTTGCACAGAC Reverse: GACAGCTCGCGGTA CTTTCCCA	281	(Bahl et al. 2009)
P-1ζ	Forward: TTCACSTTCTACGAAATCTGCAAAGAC Reverse: GATAGCTTCCGATA CTTTCCCA	281	(Wolters et al. 2015)
P-7 (repA)	Forward: CCCTATCTCACGATGCTGTA Reverse: GCACAAACGGTCGTCAG	524	(T. Yu Izmalkova et al. 2005)
P-9uni	Forward: GAGGGTTTTGGAGATCATWAGA Reverse: GGTCTGTATCCAGTTRTGCTT	610-637	(Dealtry et al. 2014)
Q	Forward: CTCCCGTACTA ACTGTACAG Reverse: ATCGACCGAGACAGGCCCTGC	436	(Götz et al. 1996)
Inc A/C (IncP-3)	Forward: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA Reverse: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465	(Carattoli et al. 2005)
Inc N	Forward: GTCTAACGAGCTTACCGAAG Reverse: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	(Carattoli et al. 2005)
Inc W	Forward: CCTAAGAACAACAAGCCCCCG Reverse: GGTGCGCGGCATAGAACCCT	242	(Carattoli et al. 2005)
IncP-6 (IncU) (repA)	Forward: ACSGTGAAYASCAAGAGCGG Reverse: TGCTGCATCCGCTCGCCYTC	302	This study
IncP-2 (repA)	Forward: TCGTGAGGAGTTCTGTTGAAG Reverse: TTCTGCGACTGAAGCTCTTT	126	This study
IncP-10 (repA)	Forward: CAGCGAACAATCATGGTGG Reverse: TGAGGTAGTCAAGCGTCAAC	325-332	This study
pKLC102-like (repA)	Forward: GACCCSGACAAGGATTTCAA Reverse: TTSGCSTKCGGATAGACG	74	This study
pMOS94-like (repA)	Forward: GTTGTGCTCGTAGSTGATCT Reverse: CGCAATCAACATCGACAAGT	304	This study

### ***3.6.6. RT-qPCR за анализ на ефлуксни системи и други гени, свързани с антибиотична резистентност***

Общо 500 ng пречистена РНК бяха подложени на третиране с ДНКаза и превръщане в кДНК в една стъпка, както е описано по-рано (Dilworth and McCarrey 1992). Реакционната смес (19 µl) се състоеше от 1× cDNA буфер (EurX), 20 µmol/L случайни пентадекамери, 0.5 mmol/L dNTPs, 0.5 U/µL термостабилен RNase инхибитор (EurX), 8 U DNase I (New England Biolabs). След инкубация на 37 °C за 30 мин., ДНКазата беше инактивирана и РНК денатурирана на 70 °C за 5 мин.. Реакциите бяха охладени на лед за

2 мин., след което бяха добавени 250 U smART RT ензим (EurX) и беше проведена инкубация за 5 мин. на 25 °С, 1 ч. на 42 °С и 30 мин. на 48 °С, след което реакцията беше прекратена на 85 °С за 5 мин.

Получената кДНК беше използвана в EVAGreen® (31000, Biotium) qPCR, таргетиращ ефлуксните системи MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ, както и гените OprD и AmpC, имащи отношение към MDR фенотипа. Анализът беше извършен, както е описано в предходни проучвания (Quale et al. 2006; Wi et al. 2018) (Таблица 10а, Таблица 10b и Таблица 10с), а резултатите бяха интерпретирани съгласно Cabot и сътр. (Cabot et al. 2011)(Таблица 11).

**Таблица 10а.** Протокол за qPCR за експресия на гени свързани с резистентността

Efflux, oprD, ampC expression PCR protocol				
Reagent	Stock conc	Reaction conc	Vol per 1 react [µl]	Vol for 10 reactions PCR [µl]
HFS Complete buffer [X]	10.00	1.00	2.00	20.00
TPrA-Hcl [mM]	2000.00	32.00	0.32	3.20
dNTP mix [mM]	25.00	0.25	0.20	2.00
HFS Taq Polymerase [U/µl]	5.00	0.05	0.20	2.00
HNB [µM]	5.00	0.05	0.20	2.00
DMSO [%]	100.00	2.00	0.40	4.00
EVAGreen [X]	20.00	1.00	1.00	10.00
Primers F/R [µM]	10.0	0.40	0.80	8.00
cDNA [ng/µl]	10÷35		5.00	50.0
molecular grade Water			9.88	98.80
Reaction volume:			20.00	200.0

**Таблица 10b.** Температурен режим за амплификация на гените за ефлукс и *oprD*

PCR setup program		
Cycles	Temperature	Time
	95C	5 min
40x	95C	15 s
	56C	20 s
	63C	20 s
Final elongation	63C	1 min
Melting curve	63-96C	

**Таблица 10с.** Температурен режим за амплификация на *ampC* гена

PCR setup program ampC		
Cycles	Temperature	Time
	95C	5 min
40x	95C	15 s
	56C	20 s
Final elongation	63C	1 min
Melting curve	63-96C	

**Таблица 11.** Критерии за оценка на експресията на ефлуксни системи и други гени свързани с антибиотичната резистентност

(Cabot et al., 2011)	MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, AmpC	MexAB-OprM	oprD relevant reduction
overexpression	$X > 10$	$X > 3$	$X \leq 30\%$
borderline	$5 < X < 10$	$2 < X < 3$	
negative	$X < 5$	$X < 2$	

### 3.6.7. Клонирание – PCR за амплификация на инсърти и линеаризиране на вектори

Амплифицираният с праймерите IMP-new\_Clon\_F/R фрагмент от 1150 bp, включващ пълната отворена рамка на четене (ORF) на IMP-100 (OR004774), промоторната област и част от гена *Int1*, беше клониран във вектора pET28a T7pCONS TIR-2 sfGFP (кат. № 154464, Addgene, Inc., Watertown, MA, USA), посредством FastCloning протоколът (C. Li et al. 2011). Амплификацията на инсърта и PCR за линеаризация на вектора са описани подробно в Таблицы 12 и 13.

Накратко, PCR реакциите за амплификация на *bla*<sub>IMP</sub> инсърта се състояха в обем от 50 µl, съдържащи 0.04 U proofreading onHybrid полимераза (EURX Sp. z o.o., Gdańsk, Poland), 1x буфер, 0.3 µM от всеки праймер, 0.2 mM dNTPs, допълнително 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> и 3 µl (10-30 ng/µl) ДНК.

**Таблица 12а.** Протокол за амплификация на инсърта

Insert amplification PCR Protocol					PCR setup program			
No of rxns	10				Cycles	Temperature	Time	
PCR rxn vol:	50					98C	10 min	
Reagent	Stock conc	Final conc	Vol per 1 rxn [µl]	Total Vol for 10 reactions [µl]	18x	97C	10 s	
PCR buffer 10x	10	1	5	50		64C	25 s	
dNTP mix [mM]	10	0,2	1	10		70C	25 s	
onHybrid Pol	2	0,04	1	10		Final elongation	72C	3 min
IMP-new_Clon_F [µM]	10	0,3	1,5	15				
IMP-new_Clon_R [µM]	10	0,3	1,5	15				
MgCl <sub>2</sub> [mM]	25	0,5	1	10				
sample DNA [µl]	10÷30 ng/µl		3,0	30				
ddH <sub>2</sub> O				360,00				

**Таблица 12б.** Използвани праймери за амплификация на инсърта

Primers	Sequence (5'-3')
IMP-new_Clon_F	GCCGCGCGGCAGCCATATGAAAAAATTATTTGTTTTATGC
IMP-new_Clon_R	GGTGGTGGTGCTCGAGTTAGTTACTTGGCAGTGATG

За линейзирането на вектора реакциите се състояха в обем от 50 µl и съдържаха 0.04 U proofreading onHybrid полимераза (EURX Sp. z o.o., Gdańsk, Poland) 1x буфер, 0.3 µM от всеки праймер, 0.25 mM dNTPs, допълнително 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> и 1.5 µl (10-30 ng/µl) ДНК.

**Таблица 13а.** Протокол за линеаризиране на вектора

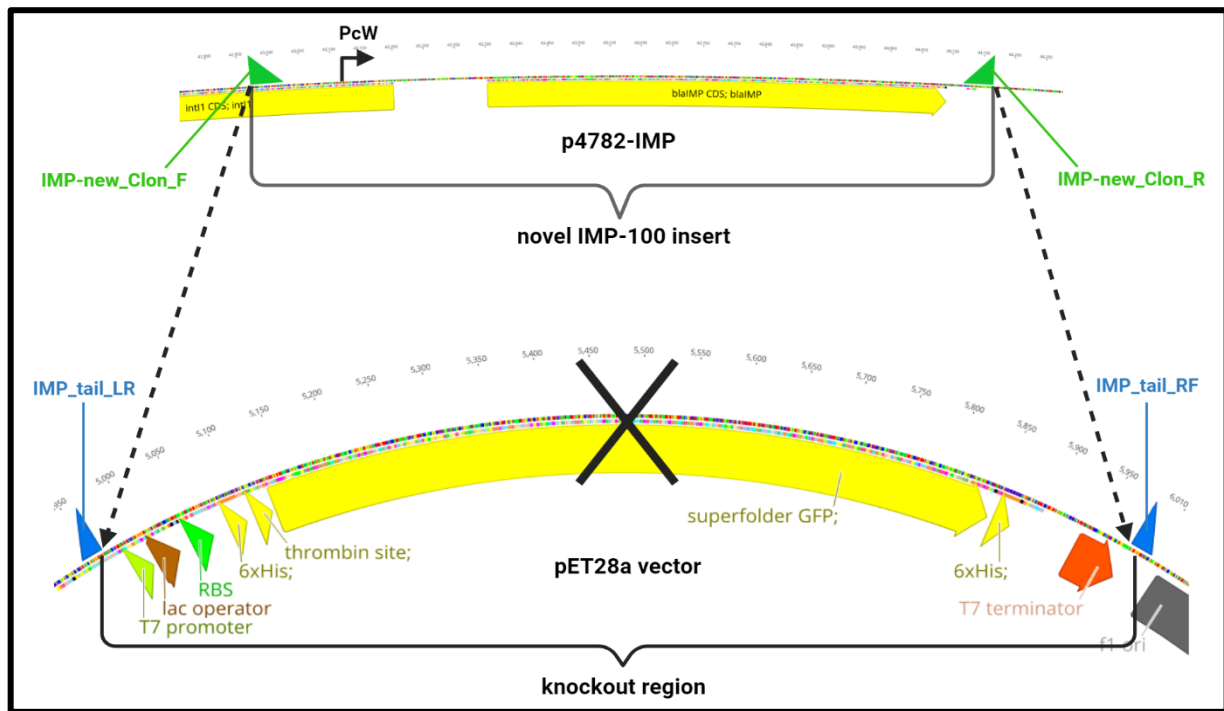
Vector linearization/amplification PCR Protocol					PCR setup program		
No of rxns	10				Cycles	Temperature	Time
PCR rxn vol:	50					98C	10 min
Reagent	Stock conc	Final conc	Vol per 1 rxn [ $\mu$ l]	Total Vol for for 10 reactions [ $\mu$ l]	20x	97C	10 s
PCR buffer 10x	10	1	5	50		64C	3 min
dNTP mix [mM]	10	0,25	1,25	12,5	Final elongation	72C	3 min
onHybrid Pol	2	0,04	1	10			
pet28A-IMP_tail_LR [ $\mu$ M]	10	0,3	1,5	15			
pet28A-IMP_tail_RF [ $\mu$ M]	10	0,3	1,5	15			
MgCl <sub>2</sub> [mM]	25	0,5	1	10			
DMSO [%]	100	2	1	10			
sample DNA, [ $\mu$ l]	10÷30 ng/ $\mu$ l		3,0	30			
ddH <sub>2</sub> O				347,50			

**Таблица 13б.** Използвани праймери за линеаризиране на вектора

Primers	Sequence (5'-3')
pet28A-IMP_tail_LR	TCTCGATCCTCTACGCCGGAC
pet28A-IMP_tail_RF	GCTGAAAGGAGGAAC TATATCC

PCR продуктите бяха смесени в съотношение 1:1 и бяха обработени с рестриктазата DpnI за 2 ч. при 37 °C.

Векторът pET28a T7pCONS TIR-2 sfGFP поначало е предназначен за бактериална експресия на протеини. За да се избегне отклонение в измерванията на стойностите на МПК при трансформантите поради свръхекспресия на инсърта от промотора T7, целият регион от T7 промотора до T7 терминатора е нокаутиран посредством специфични двойки праймери за линеаризация на вектора. Инсърта се състоеше от ORF на *bla*<sub>IMP-100</sub>, неговия промоторен регион P<sub>cW</sub> и част от гена *Int1*. Беше сметнато че така конструирания инсърт ще позволи експресията на IMP-100 в щам-реципиент да бъде най-близка до тази в щам-донор Paer4782МК. Схематично представяне на дизайна на клонирането е налично на Фигура 1.



Фигура 1. Схематична репрезентация на дизайна на клонирането.

### 3.7. Разделяне на PCR продукти чрез капилярна електрофореза

Електрофоретичното разделяне на получените ампликони бе извършено на QiAxcel (Qiagen) – автоматизирана система за капилярна гел електрофореза. За целта се използва касета, съставена от 12 капилярки изпълнени с гел (QIAxcel DNA High Resolution Kit). Анализът е автоматизиран и могат да се изследват едновременно до 12 проби. Както при агарозната гел-електрофореза, ДНК фрагментите се придвижват в капилярката с различна скорост според размера си и при преминаването си през лъч от UV светлина се отчитат чрез датчик, който трансформира флуоресцентния сигнал в електричен. Данните се обработват чрез софтуера „ScreenGel” (Qiagen) и резултатите се визуализират под формата на електрофореограма или снимка-гел. За определянето на размера на ампликоните се използват два маркера – т.нар alignment маркер (за подравняване) и size маркер (за определяне на големината им). Alignment маркера е с две ивици и се избира в зависимост от големината на очакваните фрагменти, например 50bp-750 bp, 50 bp-2000 bp, 15-3000bp, 50-6000bp и тн.

### ***3.8. Рестрикционен анализ в пулсова гел-електрофореза (PFGE) и локализация на гени за карбапенемази посредством Southern blot хибридизация***

#### ***3.8.1. Пулсова гел-електрофореза***

Пулсовата гел-електрофореза (PFGE) е надеждна техника за генотипиране, използвана за разделяне на големи ДНК молекули след смилаването им с уникални рестрикционни ензими и нанасянето им върху гел-матрица под въздействието на електрическо поле, което периодично променя посоката си. PFGE е разновидност на агарозната гел-електрофореза, която позволява анализ на много големи ДНК фрагменти (>1000 kb). Тя осигурява добро представяне на цялата бактериална хромозома в един гел с високо възпроизводим рестрикционен профил.

Хромозомен анализ на изолатите продуценти на карбапенемази беше извършен посредством рестрикция с I-Ceu I (S. L. Liu, Hessel, and Sanderson 1993), а анализ на плазмидния им профил беше извършен посредством S1 нуклеазно третиране (Barton, Harding, and Zuccarelli 1995).

От 24 часови култури на кръвен агар бяха приготвени клетъчни суспензии в 600 µl Cell Suspension буфер (100mM Tris, 100mM EDTA) с оптична плътност  $OD_{600}=1.5 \pm 0.2$  при зададен Factor=2. Беше приготвен разтвор на 1.2% агароза в краен обем от 25 ml TE буфер (10mM Tris, 1mM EDTA) чрез разтапяне в микровълнова фурна на максимална мощност, след което беше оставен на термоблок при 55-60°C. В епендорф епруветки (1.5 ml) бяха накапани по 250 µl клетъчна суспензия и 250 µl от разтопената агароза. Така получената смес беше суспендирана с пипета и накапана в матрица за приготвяне на блокчета. След втвърдяване, блокчетата бяха избутани във Falcon епруветки (50 ml), съдържащи 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) и 5 ml Cell Lysis буфер (50mM Tris, 50mM EDTA, 1% Sarcosyl), и бяха инкубирани на 55°C за 2 ч. при постоянно разбъркване. След това блокчетата бяха промити 2 пъти с по 10 ml ddH<sub>2</sub>O и 3 пъти с по 10 ml TE буфер за по 10-15 мин. на 55 °C отново при постоянно разбъркване. Блокчетата бяха съхранявани в TE буфер на 4°C.

За рестрикция с I-Ceu I всяко агарозно блокче беше първоначално инкубирано в 150 µl 2x CutSmart рестрикционен буфер за 15 мин. на стайна температура, след което буферът беше отдекантиран и беше добавена 200 µl рестрикционната смес (1x CutSmart рестрикционен буфер, 10 U I-Ceu I). Последва инкубация за 3 ч. на 37°C.

Калибриране на агарозните блокчета преди S1 нуклеазното третиране беше извършено в 150 µl 2x S1 нуклеазен буфер за 15 мин. на стайна температура, след което буферът беше сменен с 200 µl рестрикционна смес (1x S1 нуклеазен буфер, 25 U S1 нуклеаза). Инкубацията беше проведена за 20 мин. на 37 °C.

За молекулен маркер беше използвана *Salmonella braenderup H9812* (Hunter et al. 2005). Калибрирането на агарозните блокчета беше извършено в 150 µl 2x B2 рестрикционен буфер. Рестрикцията беше осъществена в реакционна смес, съдържаща 200 µl 1x B2 рестрикционен буфер и 50 U Xba1, при 37°C за 2 часа.

След рестрикция блокчетата бяха калибрирани с 500 µl TBE буфер (44.5mM Tris, 44.5mM boric acid, 1mM EDTA, pH 8.0). Приготвен беше разтвор на 1% агароза в 100 ml TBE буфер. След разтапяне, агарозата беше оставена да се охлади до 50-55°C, а през това време блокчетата бяха фиксирани върху гребена. Агарозата беше излята бавно в матрицата за да се предотврати образуване на мехури. Гелът беше оставен за 10 мин. на стайна температура, след което беше оставен на 4°C за 20 мин..

Апаратът за пулсова електрофореза беше промит с 2 L дестилирана вода, след което беше зареден с ~2 L 0.5x TBE буфер. Електрофорезата беше проведена на 14°C при следните параметри - Voltage density: 6 V/cm (стандартно), Included angle: 120° (стандартно за CHEF), Initial switch time: 2.16 сек., Final switch time: 63.8 сек., Runtime: ~19-20 ч. (стандартно).

След приключване на електрофорезата, гелът беше оцветен с 200 ml разтвор на GelRed (3x GelRed, 0.1M NaCl) при постоянно разклащане в продължение на 30 минути на стайна температура. С цел намаляване на фона, гелът беше обезцветен с дестилирана вода, отново при постоянно разклащане за 20 минути на стайна температура.



Получените гелове бяха визуализирани на фотодокументационна система Nu Genius (Syngene NG/1151 Cambridge UK).

### **3.8.2. *Southern blot хибридизация***

Southern blotting е техника, използвана за прехвърляне на ДНК фрагменти от електрофоретичен гел върху мембранна основа. Това прехвърляне, последвано от специфична обработка, води до имобилизиране на ДНК фрагментите, създавайки полуперманентна репродукция на модела на ивици от гела върху мембраната. След като бъде имобилизирана, ДНК се подлага на хибридизационен анализ, който позволява идентифицирането на ивици със сходство в последователността с маркирана сонда. При Southern blotting се използват различни мембрани (нитроцелулоза, незареден найлон или положително зареден найлон), буфери за пренос и методи. Найлоновите мембрани, известни със своята здравина, са изгодни за многократни цикли на репробирание. Нитроцелулозните мембрани, въпреки че са по-неустойчиви, все още се използват широко поради по-ниския фон при някои хибридизационни сонди. Основният протокол включва капилярен трансфер на ДНК във възходяща посока, като се използва буфер с високо съдържание на соли, последван от UV облъчване или изпичане за трайно имобилизиране. Алтернативните протоколи използват различни методи за трансфер, включително алкален трансфер към положително заредени найлонови мембрани, низходящ капилярен метод за по-бърз и по-пълен трансфер, както и електрофоретичен трансфер (електроблотинг) в присъствие на буфер с ниска йонна сила, като обикновено се предпочитат незаредени найлонови мембрани (Brown 1993).

В настоящото проучване за трансфера на ДНК от гел към положително заредена найлонова мембрана беше приложен електроблотинг. Използван беше апарат за електроблотинг Genie blotter (Idea Scientific Company, Minneapolis, Minn, USA) и беше следван протокола, предоставен от производителя (Idea Scientific 2000). Хибридизацията беше извършена с дигоксигенин-белязани ДНК сонди, използвайки набора DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostics, catalog number: 11585614910) съгласно инструкциите на производителя.

### 3.9. *Конюгация*

Спонтанната трансмисия на плазмиди, носещи детерминанти на резистентност, беше изследвана чрез техниките filter mating (Livermore and Jones 1986) и combined mating (Walter, Porteous, and Seidler 1987). В опит да се повиши ефективността на конюгацията при *Pseudomonas* в протокола бяха въведени допълнителни стъпки, както е описано по-рано (Sakuda et al. 2018). Като реципиентни щамове бяха използвани устойчивите на рифампицин *E. coli* C600 и спонтанен мутант на *P. aeruginosa* PA01<sup>Rif<sup>R</sup></sup>. Трансконюгантите бяха селективно култивирани върху MacConkey агар, допълнен с цефтазидим (30 mg/L) и рифампицин (200 mg/L) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA).

### 3.10. *Трансформация*

Плазмидна ДНК от щама Paer4782МК беше трансформирана в *P. aeruginosa* PA01<sup>Rif<sup>R</sup></sup>. Протоколите за трансформация на плазмида, съдържащ клонирания IMP-100 и целия плазмид p4782-IMP бяха идентични (Tu et al. 2016). Накратко, реципиентите *E. coli* NEB-10 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA) и *P. aeruginosa* PA01<sup>Rif<sup>R</sup></sup> бяха инокуирани върху Columbia агар на 35°C за една нощ. Няколко колонии бяха инокуирани в 10 ml ВНІ бульон и бяха култивирани при постоянно разклащане (200 rpm) на 35 °C до достигане на логаритмична фаза ( $0,6 \pm 0,05$  OD). След това по 1.4 ml от културата бяха разпределени в епруветки от 1,5 ml и центрофугирани на  $8000 \times g$  за 2 мин.. Супернатантата беше изхвърлена, клетъчните пелети бяха промити 2 пъти на стайна температура с по 1 ml вода за молекулярна биология чрез внимателно ресуспендиране с пипета, след което бяха разтворени в 80 µl вода. След това към пелетите беше добавена сместа от вектор и инсърт (20 µl) или плазмидна ДНК, като след внимателно разбъркване цялото количество беше незабавно прехвърлено в 2 милиметрови кювети за електропорация (Avantor, Inc., Radnor, PA, USA). Електропорацията беше извършена при 2500 mV на Eporator® (Eppendorf, Hamburg, Germany). Веднага след това в кюветите бяха добавени по 1 ml ВНІ бульон, с последващо внимателно разбъркване и инкубация на 35 °C в продължение на 2 ч.. По 50 µl от трансформантите бяха нанесени на прясно приготвени петрита с ВНІ агар, съдържащи 50 mg/L канамицин и 8 mg/L цефтазидим.

### ***3.11. Изпитване на способността за формиране на биофилм***

Изпитване на способността на изолатите да формират биофилм беше извършено чрез модифициран метод с кристал виолет. Накратко, 10 µl от клетъчна суспензия с оптична плътност 0.5 OD<sub>600</sub> бяха инокулирани в ямки на микротитърна плака, съдържащи 190 µl TSB среда. В периферните ямки на плаката бяха добавени по 200 µl автоклавирана дестилирана вода за да се намали изпарението. След това плаката беше инкубирана в продължение на 16 ч. при 37°C. След отстраняване на планктонните клетки, биофилмите бяха фиксирани с 99% метанол. Ямките бяха промити два пъти с фосфатен буфер или стерилен физиологичен разтвор и оставени да изсъхнат на въздух. След това към всички ямки бяха добавени по 200 µl разтвор на кристалвиолет (с концентрация 0.2%). След 5 минути излишният кристалвиолет беше отстранен, ямките бяха промити два пъти и оставени да изсъхнат на въздух. Накрая, кристалвиолетът, свързан с клетките, беше разтворен в 33% оцетна киселина. Измерването на формирания биофилм беше осъществено с помощта на оптичен четец за плаки при дължина на вълната 570 nm (Shukla and Rao 2017).

### ***3.12. Целогеномно секвениране***

Част от геномните библиотеки (n=28) на изолатите бяха приготвени с набора NEXTFLEX Rapid XP DNA-Seq Kit (PerkinElmer Applied Genomics). При друга част от изолатите (n=6) беше използван набора Illumina DNA Prep (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Целогеномното секвениране на гореизброените беше осъществено на платформа Illumina MiSeq с MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles PE) (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). При един изолат (Paer4782MK) геномната библиотека беше секвенирана на платформата NextSeq 550 с поточна клетка V2.5 (2 × 150 bp) (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Останалата част от изолатите (n=65) бяха подадени за секвениране на Illumina HiSeq 4000 към компанията Novogene (Novogene, Beijing, China).

При 14 от изолатите същият ДНК екстракт без допълнителна селекция по размер беше използван за дълговерижно секвениране на MinION Mk1C с набора Rapid Barcoding Kit 96 (SQK-RBK110.96) и FLO-MIN106D (R9.4.1) (Oxford Nanopore Technologies,

Oxford, UK). Последната стъпка на пречистване на библиотечния пул беше извършена с 0.4x SPRI магнитни частици, както наскоро беше предложено за отстраняване на ДНК фрагменти <1.5 kb (Alvarez-Arevalo et al. 2022).

### **3.13. Биоинформатичен анализ**

Получените от целогеномното секвениране данни бяха подложени на обстоен биоинформатичен анализ, целящ пълно охарактеризиране на изследваните изолати.

#### **3.13.1. Анализ и качествен контрол на получените къси и дълги прочити от целогеномното секвениране**

Анализ на получените секвенции беше извършен чрез приложенията FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>, достъпно на 6 декември 2023 г.) и MultiQC (Ewels et al. 2016). Тези инструменти предоставиха информация относно замърсяването, дължината и броя на получените рийдове, наличието на остатъчни адаптори и индекси, качествени хистограми, съдържание на GC и наличие на неопределени бази (Ns).

Почистването и филтрирането на суровите данни бяха извършени с помощта на няколко софтуерни пакета – TrimmomaticPE (Bolger, Lohse, and Usadel 2014) и fastp v0.23.2 (Chen et al. 2018) за получените прочити от късоверижното секвениране, докато filtlong v0.2.1 (<https://github.com/trwick/Filtlong>, достъпно на 6 декември 2023 г.) беше използван за прочитите от дълговерижното секвениране. Прагът на минимално качество (Q score) за пропускане на късите прочити беше настроен на Q27. От дългите прочити бяха запазени само тези с дължина над 1000 нуклеотидни бази, при което 5% от най-некачествените рийдове бяха отстранени, независимо от тяхната дължина. Всички рийдове с качество под прага бяха изключени от последващите анализи.

#### **3.13.2. Асемблиране на геноми**

Сглобяването на генома е основна стъпка в биоинформатиката, която включва реконструиране на пълната ДНК последователност на даден организъм от

фрагментирани данни, генерирани от технологиите за секвениране. Целта е да се създаде непрекъснато и точно представяне на генома на даден организъм. Асемблирането на генома предоставя основата за различни последващи анализи, включително прогнозиране на гени, функционално аотиране, сравнителна геномика и идентификация на генетични вариации, като например единични нуклеотидни полиморфизми (SNP) и структурни варианти. Точните геномни сглобки са от съществено значение за разбирането на биологията, еволюцията и генетичното разнообразие на организмите.

Първоначално, при изолатите с налични данни от дълговерижно секвениране, бяха генерирани сглобки (асемблита) само от дългите прочити с помощта на Flye v0.2.1 (Kolmogorov et al. 2019). При тези от тях с покритие на генома >100x, за асемблиране беше използван Truicycler v0.5.3 (Wick et al. 2021). В случаите, когато не беше постигнат кръгов геном, беше предприет хибриден подход на сглобяване с помощта на Unicycler v0.4.8 (Wick et al. 2017). Хибридно асемблиране комбинира дълги и къси прочити за да подобри непрекъснатостта и пълнотата на генома. Геномите на изолатите, които бяха секвенирани само по късоверижната технология бяха асемблирани чрез Unicycler v0.4.8.

### ***3.13.3. Полиране на сглобените геноми***

Полирането на сглобените геноми е важна стъпка, насочена главно към подобряване на точността и качеството на първоначалния „драфт“ геном. Тази стъпка е от съществено значение, тъй като дори и най-добрите алгоритми за сглобяване могат да внесат грешки, като изкуствени нуклеотидни замени или дори инсерции и делеции.

Полирането на геномите, сглобени чрез Flye, Truicycler и хибридният подход, се извърши първоначално с MEDAKA v1.7.3 (ONT, <https://github.com/nanoporetech/medaka>, достъпно на 6 декември 2023 г.), а след това с Polypolish v0.5.0 (Wick and Holt 2022) и POLCA (Zimin and Salzberg 2020). Геномите, асемблирани с Unicycler, използвайки само късоверижни рийдове, бяха полирани единствено с Polypolish и POLCA, тъй като MEDAKA изисква наличие на дълговерижни прочити.

### ***3.13.4. Оценка на качеството на получените геноми***

Оценката на качеството на геномите е от съществено значение за извличане на точни и надеждни данни от тях. За тази цел бяха използвани три инструмента. За оценка на целостта и точността на геномните сглобки, както и за идентифициране на потенциални грешки беше използван Quast v5.0.2 (Mikheenko et al. 2018), който предоставя статистически данни и метрики като N50, L50 и GC съдържание. За измерване на пълнотата на генома беше използван софтуерът BUSCO v5.4.6 (Manni et al. 2021), който търси консервативни гени с единични копия, предоставяйки информация за това доколко геномът съдържа очаквания генен набор. CheckM v1.2.1 (Parks et al. 2015) беше използван за анализ на пълнотата на генома, нивото на замърсяване и хетерогенността на щамовете, както и получаване на информация за размера на генома и откритите маркерни гени.

### ***3.13.5. Идентификация на изолатите на базата на данни от целогеномно секвениране***

*In silico* инструментите за идентификация на щамове използват както сглобени геноми, така и сурови прочити, получени от секвенирането. В зависимост от приложението, анализът може да бъде акцентиран върху конкретни гени или върху честотите на нуклеотидни k-mer последователности, които са уникални за определен организъм. Основната цел е идентификацията на генетични маркери, разграничаващи един щам от друг. След идентификацията, генетичните маркери се сравняват с референтни бази данни, съдържащи информация за генетичните профили на различни микроорганизми, което позволява точното определяне на щамовете въз основа на генетичното им сходство.

За идентификацията на изолатите бяха използвани два инструмента – rMLST (Jolley et al. 2012), който се фокусира върху силно консервативни участъци в рибозомните гени, и KmerFinder v 3.0.2, който анализира честотите на срещане на определени k-mer последователности в геномните секвенции (Clausen, Aarestrup, and Lund 2018).

### ***3.13.6. Аотиране на сглобените геноми***

Аотирането на генома включва идентификация и описание на различни функционални и структурни характеристики в геномната последователност. Тези характеристики могат да включват гени, кодиращи последователности, некодиращи региони, регулаторни елементи и други функционални елементи. Аотирането на генома предоставя информация за генетичното съдържание и функционалния потенциал на генома на даден организъм.

След асемблирането, всички геноми бяха аотирани посредством *Bakta v1.7* с пълната база данни (*v5.0-full*) (Schwengers et al. 2021). Този софтуер беше препочетен поради неговата лесна употреба и възможността му за бързо и надеждно видово-специфично аотиране.

### ***3.13.7. Антимикробна резистентност, фенотипно предсказване и детерминанти на вирулентността***

За идентифицирането на гени за антимикробна резистентност и фенотипно прогнозиране на профила на резистентност бяха използвани *AMRFinderPlus v3.11.4* (Feldgarden et al. 2021) и *ResFinder v4.3.1* (Bortolaia et al. 2020), които сравняват геномни последователности с бази данни за откриване на гени за резистентност. Детерминантите на вирулентност бяха анализирани чрез *VFAnalyzer* (B. Liu et al. 2022) и *Abricate* (Seemann T, *Abricate*, Github <https://github.com/tseemann/abricate>, достъпено на 20 декември 2023г.), използвайки бази данни, съдържащи обширен набор от вирулентни фактори.

### ***3.13.8. Плазмиден анализ***

Анализ на плазмидния профил на изолатите беше извършен с *Mob-suite v3.1.4* (Robertson and Nash 2018), който идентифицира нуклеотидни последователности с потенциален плазмиден произход въз основа на специфични маркери, характерни за плазмидите. Също така беше използван и софтуерът *plaSquid* (Giménez, Ferrés, and Iraola 2022), който използва модули от *Mob-suite* пакета. И двата инструмента класифицират откритите плазмиди в различни типове или семейства и оценяват техния потенциал за

мобилност, като изследват наличието на гени, свързани с конюгацията, мобилизацията и трансфера на плазмиди.

### ***3.13.9. Анализ на интегративни конюгативни елементи***

Интегративните конюгативни елементи (ICEs) са самотрансмисивни мобилни генетични елементи (MGEs), разполагащи с механизъм за конюгация и сложни регулаторни системи, управляващи техните изрязване, репликация и конюгативен трансфер. Тези елементи се интегрират и репликират като част от хромозомата на гостоприемника. При определени условия претърпяват ексцизия от хромозомата, циркуляризация и впоследствие се пренасят в нови клетки-гостоприемници чрез конюгация. Тези елементи играят ключова роля в еволюцията и адаптацията на бактериите, разпространявайки важни характеристики като гени за антибиотична резистентност и фактори на вирулентност (Wozniak and Waldor 2010).

За изследване наличието на ICEs и асоциираните с тях гени беше използван софтуера ICEfinder, който извършва сравнителен анализ на нуклеотидни последователности в специализирана база данни (M. Liu et al. 2019).

### ***3.13.10. Мултилокусно секвенционно типизиране (MLST) и core genome MLST (cgMLST) базирани на данни от целогеномно секвениране***

MLST е широко използван метод за молекулярно типизиране на бактерии, който изследва вариациите в последователностите на housekeeping гени. При него на всеки щам се определя секвенционен тип (ST), което позволява анализирането на еволюционни връзки и клоналното разпределение в различни среди и гостоприемници (Yan et al. 2023). За разлика от MLST, cgMLST е метод с много по-висока разделителна способност, основан на целогеномно секвениране и анализиране на всички гени от така наречения “core” геном, който представлява набора от всички хомоложни гени, общи за дадена извадка от геноми. Този метод придоби популярност в изследването на огнища и проследяването на



разпространението на бактерии, като осигурява висока резолюция при разграничаването на генетично много близки щамове (Yan et al. 2021).

Типизиране по методът MLST беше извършено, използвайки данните от целогеномното секвениране и софтуера mlst v2.23.0 (Seemann T, mlst Github <https://github.com/tseemann/mlst>, достъпено на 6 декември 2023 г.).

Извършен беше и мащабен сравнителен филогенетичен и филогеографски анализ спрямо колекция от 2470 изолата от цял свят. За целта бяха изтеглени 2470 генома от базата данни на PathogenWatch (<https://pathogen.watch/>, достъпено на 6 декември 2023 г.) подбрани спрямо откритите при нас секвенционни типове. Анализът беше базиран на cgMLST включващ 3876 SNP локуса като за осъществяването му използвахме приложението chewBBACA (Silva et al. 2018).

### **3.13.11. Анализ на външния мембранен поринов протеин oprD**

В карбапенемаза-негативните *P. aeruginosa*, резистентността към карбапенемите е предимно свързана с инактивацията на външния мембранен порин OprD. Дефектите в OprD, породени от различни генетични промени, довеждат до намалена чувствителност към карбапенемите. Тези промени включват индели, инсерции на IS елементи и аминокиселинни замени, които влияят на структурата на порина.

За оценка на функционалността и интегритета на OprD от данните от целогеномното секвениране беше използвано приложението PorinPredict (Biggel et al. 2023).

## **4. Резултати и дискусия**

### **4.1. Обща характеристика на изследваните изолати**

Нарастващата антибиотична резистентност на опортюнистичните патогени от род *Pseudomonas* и нарастващото им значение за инфекциите свързани с медицинското обслужване в българските болници, бе основната причина за избора им като обект на настоящия дисертационен труд. Всички изследвани изолати бяха MDR, XDR или PDR, което означава, че опциите за лечение на причинените от тях инфекции са ограничени, а в някои случаи липсват.

В настоящото проучване бяха включени 100 клинични изолата *Pseudomonas*, произхождащи от общо 14 града в България (Таблица 1). Всички изследвани изолати бяха от щамовата колекция на НРЛ „КМАР“ към Националния център по заразни и паразитни болести събирани за период от 14 години – от 2010г. до 2023г.

### **4.2. Идентификация**

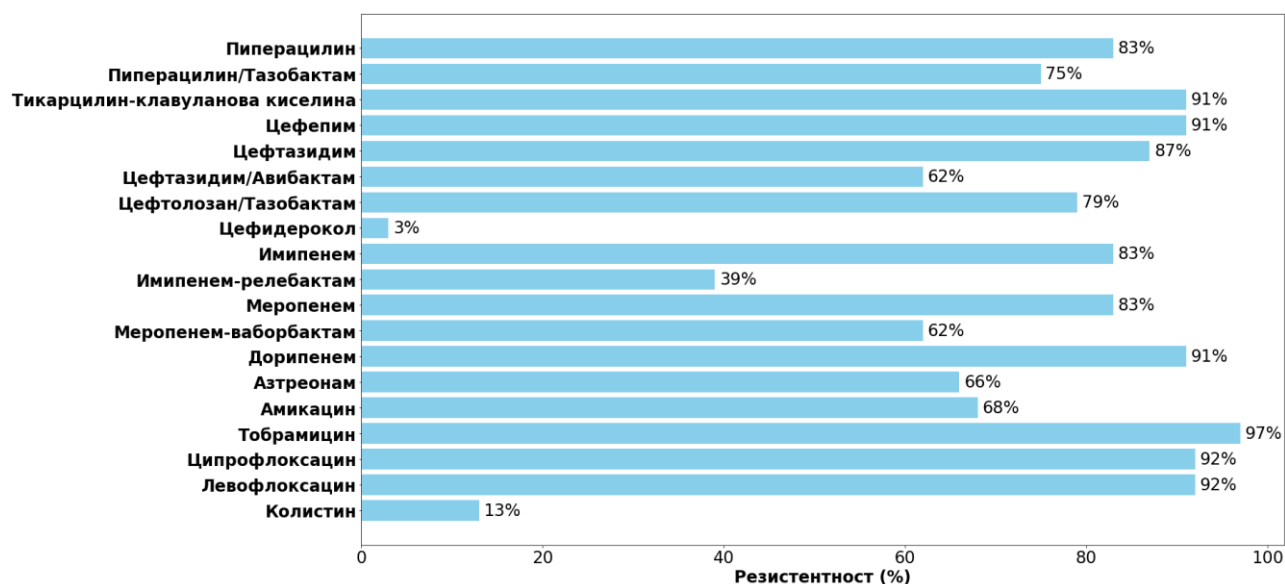
Всички изолати бяха ревитализирани и подложени на ре-идентификация с MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Bremen, Германия). Използваната на този етап база данни не бе способна да разграничи допълнително представителите на *P. putida* комплекса, при което изолатите *P. soli* и *P. kurunegalensis* бяха погрешно класифицирани като *P. putida*. По-късно, след провеждане на целогеномно секвениране и анализ на данните беше извършено прецизно доуточняване на вида на тези изолати. Два от тях бяха идентифицирани като *P. soli* и един като *P. kurunegalensis*. След внесените корекции окончателния вариант на извадката от изолати включваше 96 *P. aeruginosa*, 2 *P. soli*, 1 *P. kurunegalensis* и 1 *P. protegens* (Таблица 1).

### **4.3. Резистентност към антимикробни препарати**

Резултатите от изпитването на антимикробна чувствителност се базират на обширно изследване, включващо 100 изолата *Pseudomonas* spp.. За целта, бяха извършени тестове за определяне на резистентност към 19 различни антимикробни препарата, включително такива от ново поколение като Меропенем/Ваборбактам, Цефтазидим/Авибактам, Цефтолозан/Тазобактам, Имипенем-релебактам и Цефидерокол. Този процес включваше както дисково дифузионни, така и бульон дилуционни методи с използването на комерсиални панели. Резултатите бяха интерпретирани според стандартите на EUCAST ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

От бета-лактамите най-висока устойчивост се наблюдаваше към антибиотиците пиперацилин, пиперацилин/тазобактам, тикарцилин/клавуланова киселина, цефепим и имипенем, където над 70% от изолатите проявиха резистентност. Повече от 60% от изолатите проявиха нечувствителност към цефтазидим/авибактам (МПК >8/4 mg/L), а резистентността към цефтолозан/тазобактам достигаше до 79% (МПК >4/4 mg/L). Висока устойчивост (над 90% от изолатите) се наблюдаваше и при флуорохинолоните ципрофлоксацин и левофлоксацин. Сред аминогликозидите висока резистентност беше наблюдавана при 97% от изолатите към тобрамицин и 68% към амикацин. Същевременно, голяма част от изолатите бяха чувствителни към антибиотиците колистин (13%) и цефидерокол (3%) (Фигура 2).

Според критериите на Magiorakos от 2012 година (Magiorakos et al. 2012) за MDR, XDR и PDR фенотипове в изследваната извадка 93% от изолатите бяха категоризирани като MDR, 4% - XDR, 3% - PDR.



**Фигура 2.** Антибиотична резистентност при изолатите *Pseudomonas*.

Поради възможната адаптивна резистентност на *P. aeruginosa* към колистин (Skiada et al. 2011) беше очаквано да бъдат срещнати несъответствия в резултатите от тестването. За да изключим възможни грешки в измерването, изолатите, първоначално показали резистентност на колистин, бяха подложени на повторно тестване чрез поне два метода. За целта беше приложен още един подход - Colispot теста (Jouy et al. 2017). В резултат на внимателна преоценка, някои изолати с гранични стойности на МПК, първоначално считани за резистентни, проявиха чувствителност след потвърдителните тестове. Така, общият брой резистентни на колистин изолати беше окончателно определен на 13%.

Цефидерокол е нов синтетичен антибиотик, който е конюгиран със сидерофор и разполага с уникален механизъм за проникване в бактериалните клетки. Използвайки бактериалните системи за транспорт на желязо, този механизъм спомага за постигане на високи концентрации на антибиотика в периплазмата (Page 2019). Въпреки че цефидерокола е перспективно средство за борба с мултирезистентни Грам-негативни бактерии, неговата ефективност при лечение на инфекции, предизвикани от карбапенем-резистентни патогени, остава недостатъчно изпитана (Simner and Patel 2020). В нашата извадка беше наблюдавана резистентност към този препарат при 3 от изолатите (Paer3142, Paer3796A и Paer4782МК), въпреки че все още не се използва в медицинската практика в България. Paer3142 прояви чувствителност само към пиперацилин/тазобактам (I), амикацин (S) и колистин (S). От друга страна, Paer3796A беше чувствителен към

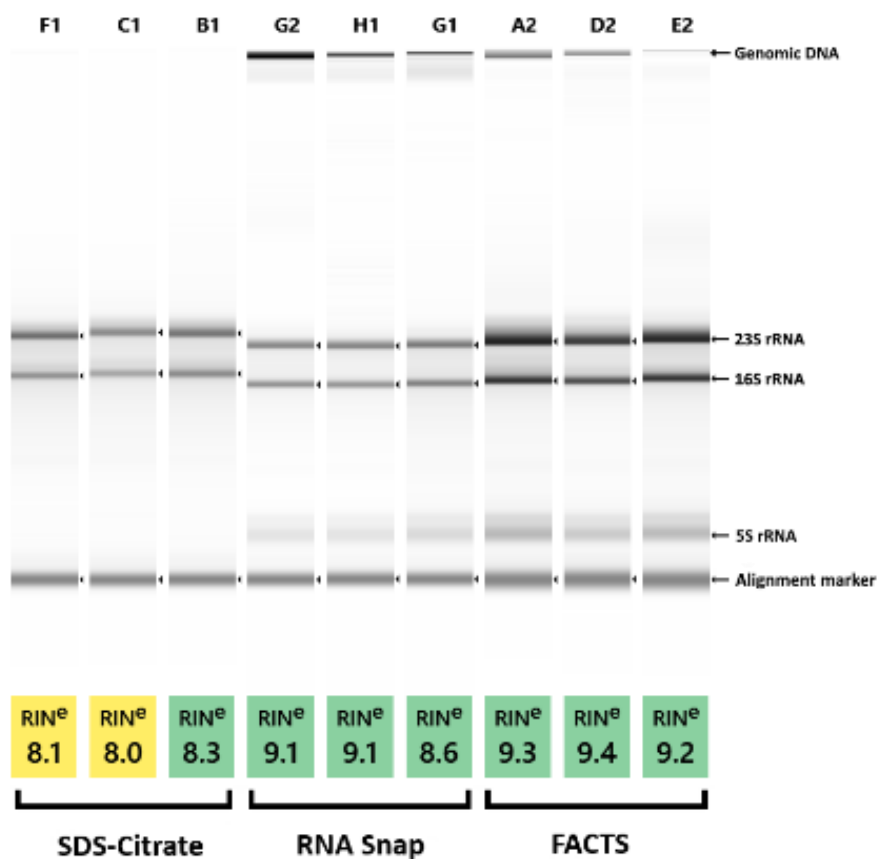
пиперацилин/тазобактам (I), имипенем (I), имипенем/релебактам (S), амикацин (S), левофлоксацин (S) и колистин (S). Paer4782МК прояви чувствителност единствено към колистин (S) и азтреонам (I). След анализ на целогеномните данни и съпоставка с литературата, в посочените изолати не беше идентифициран механизма на резистентност към цефидерокол.

#### ***4.4. Разработване на метод за бърза екстракция на висококачествена РНК от *P. aeruginosa****

Изпробвани и сравнени бяха общо 6 метода за екстрахиране на РНК от *Pseudomonas*: FACTS (разработен от екипа), RNA Snap, SDS-Citrate, Hot-Phenol Hot-SDS, RNA Extracol и Trizol RNA extraction.

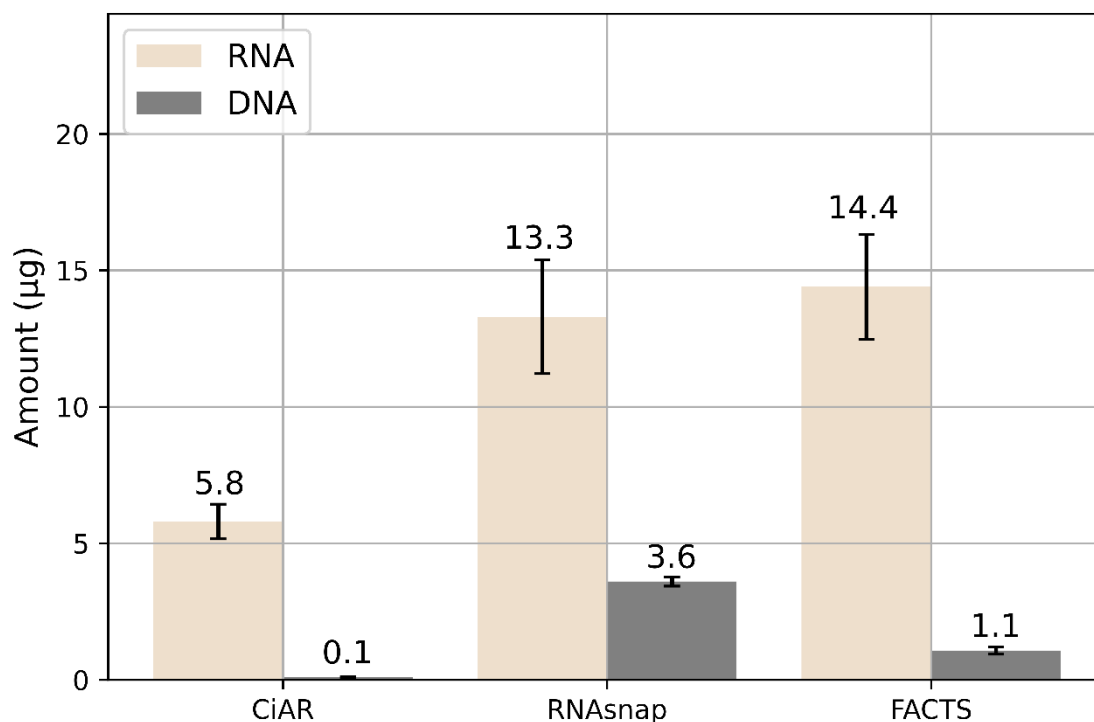
При предварителни експерименти с GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx) и Trizol (Invitrogen) се установи, че тези набори произвеждат незначителни количества РНК от изследваните бактерии и бяха изключени от последващите анализи. Методът с Hot SDS/hot phenol предостави приемливи резултати, но беше сметен за трудоемък и времеемък (>24 часа), следователно беше отхвърлен. За по-нататъшен анализ бяха избрани три бързи метода, включително FACTS (разработен в рамките на текущата дисертация), RNAsnap и CiAR, и бяха сравнени по отношение на фактори като интегритет на РНК, добив и наличие на остатъчна ДНК.

Относно интегритета на получената РНК, най-добрите резултати бяха постигнати с метода FACTS. RNAsnap беше най-бързият и най-лесен за изпълнение метод, но показва по-високо замърсяване с геномна ДНК. CiAR предостави адекватни резултати, но при всички проби бяха наблюдавани малко по-ниски стойности на RIN (RNA Integrity Number). Важно е да се отбележи, че при CiAR липсваха ивици, съответстващи на 5S рРНК, в сравнение с останалите методи, където пълния набор от рРНК беше наличен (Фигура 3). Съотношенията 23S/16S за всички методи бяха  $\geq 1.8$ .



**Фигура 3.** Agilent TapeStation анализ на интегритета на РНК на проби, изолирани чрез CiAR (SDS-цитрат), RNAsnap и FACTS от три референтни щама *P. aeruginosa*: ATCC 27853 (F1, G2, A2), PAO1 (C1, H1, D2) и EARS 5585 (B1, G1, E2). Жълтото оцветяване е отразява РНК проби със стойности на RIN  $\leq 8,1$ , което показва умерено до добро качество на РНК, докато зеленото се използва за обозначаване на пробите с най-високо качество.

Не се наблюдаваха значими разлики в количеството на изолираната РНК между методите FACTS и RNAsnap ( $p > 0.05$ ), докато пробите, обработени с CiAR, показваха приблизително три пъти по-нисък добив на РНК в сравнение с RNAsnap и FACTS ( $p < 0.05$ ). Количеството на остатъчната геномна ДНК варираше значително между методите ( $p < 0.05$ ). Пробите, обработени с RNAsnap, бяха силно замърсени с ДНК, тези от FACTS съдържаха средно количество, докато CiAR показва незначително съдържание на ДНК (Фигура 4).



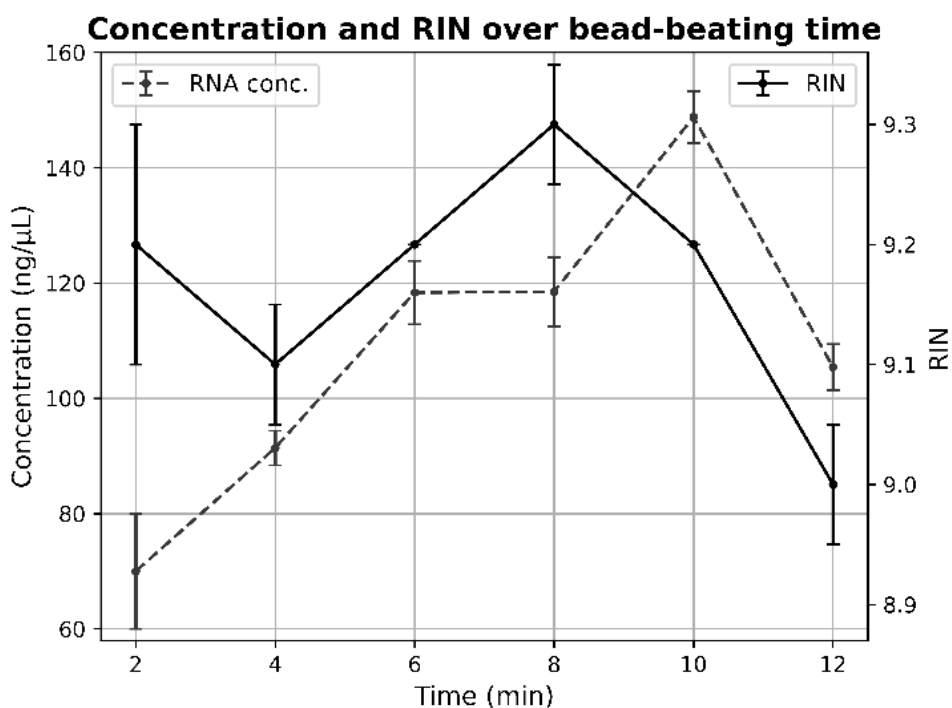
**Фигура 4.** Сравнение на методите за екстракция на РНК по отношение на количеството РНК и ДНК въз основа на средните стойности от три повторения на *P. aeruginosa* ATCC 27853 за всеки метод.

CiAR показва отлични стойности на съотношенията 260/280 ( $\geq 2$ ) и 260/230 ( $2 \leq 2.2$ ). Стойностите на 260/280 за FACTS бяха  $\geq 2$ , а тези на съотношението 260/230 бяха малко по-високи от 2.2, което е горната граница на препоръчителния оптимум. Две от пробите на RNAsnap показаха по-ниски стойности на 260/280 ( $< 1.7$ ) и 260/230, което показва замърсяване както с протеини, така и с въглехидрати. Третата проба беше в рамките на приемливия диапазон 260/230 = 2.1 (Таблица 14).

**Таблица 14.** Сравнение на трите метода по отношение на чистота

Sample	Method	260/230	260/280
ATCC	CiAR	1.2	2.2
PAO1	CiAR	2.2	2.2
EARS	CiAR	2	2.22
ATCC	RNAsnap	1.81	1.64
PAO1	RNAsnap	1.5	1.5
EARS	RNAsnap	2.1	1.62
ATCC	FACTS	1.7	2.3
PAO1	FACTS	2.467	2.056
EARS	FACTS	2.4	2.038

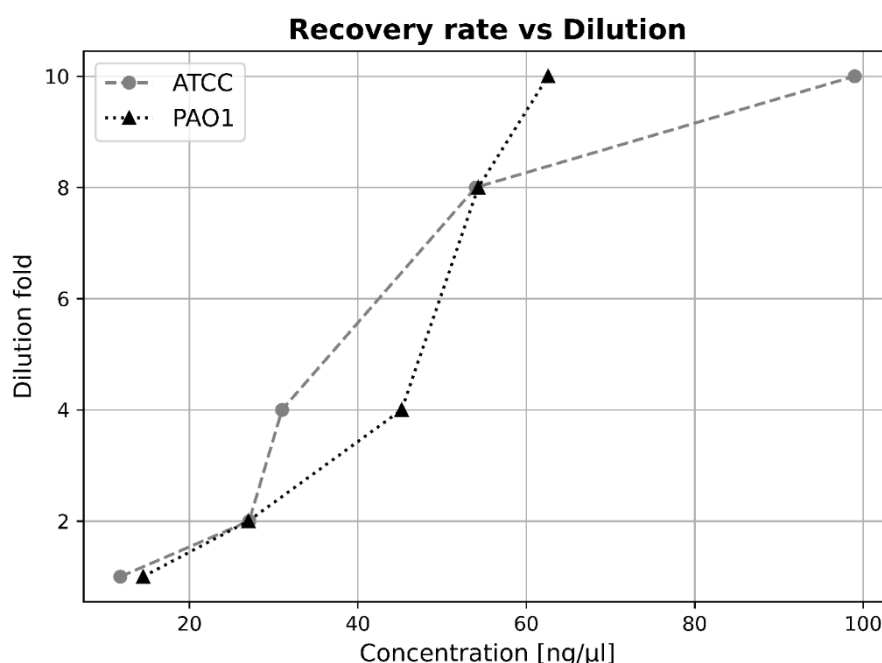
FACTS беше изпитан и върху Грам-положителни бактерии, които обикновено представляват предизвикателство при извличането на висококачествена РНК. За целта беше въведена стъпка на механичен лизис с циркониумови топчета. Оптималното време за биене беше експериментално определено на 9 минути, където беше наблюдавано минимално разграждане и най-висока концентрация на РНК (Фигура 5).



**Фигура 5.** Оптимизация на механичния лизис при FACTS за Грам-положителни бактерии (*Enterococcus faecalis*): Графика, представяща връзката между концентрацията на РНК, стойностите на RIN и времето на биене. Експериментът бе изпълнен в две повторения.



За да бъде подходяща за използване в RT и qPCR, изолираната РНК изисква допълнително пречистване. Въздействието на формамид (като този, използван в RNAsnap и FACTS) върху утаяването на нуклеиновите киселини с етанол беше проучено и съобразено с предишни изследвания, показващи, че високата концентрация на формамид може да повлияе неблагоприятно извличането на РНК след утаяване (Nadin-Davis and Mezl 1982). Бяха изпитани различни разреждания (2-, 4-, 8- и 10-кратни) на РНК проби от *Pseudomonas*, изолирани с FACTS, за да бъде определена концентрацията на формамид, при която се извлича най-високо количество РНК. Получените резултати показаха най-висок добив на РНК при концентрация на формамид под 10% (10-кратно разреждане), както е показано на Фигура 6.

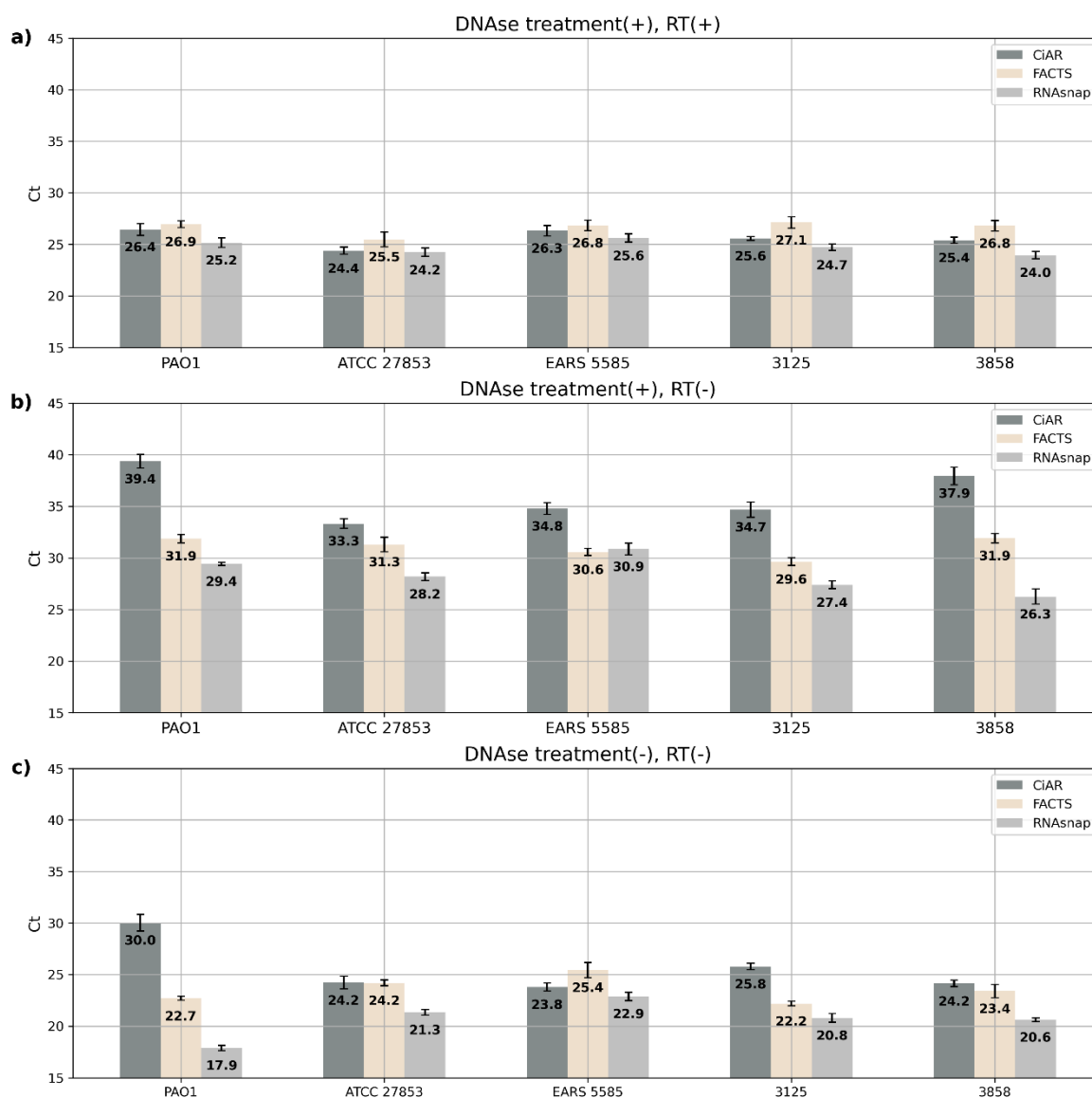


**Фигура 6.** Влияние на концентрацията на формамид върху степента на възстановяване на утаената РНК в зависимост от коефициента на разреждане на пробата; РНК пробите, екстрахирани с FACTS от *P. aeruginosa* ATCC 27853 и PAO1 бяха използвани в едно повторение за всяко разреждане.

След пречистване на РНК и обработка с ДНКаза, пробите бяха подложени на RT-qPCR, като в реакцията бяха включени праймери за гена *groD*, използван като референтен. В изследването участваха както необработени с ДНКаза I РНК проби за оценка на нивата на остатъчната ДНК, така и обработени с ДНКаза I проби, които не бяха

обратно транскрибирани. Последните бяха анализирани паралелно като контроли, служещи за оценка на ефективността на реакцията с ДНКаза.

RNASnap показва най-ниските стойности на Ct сред пробите, третирани с ДНК-аза (ДНКаза (+)/RT (+)) (Фигура 7a). Той обаче имаше и най-ниските стойности на Ct при пробите, третирани с ДНКаза, които не бяха обратно транскрибирани (ДНКаза (+); RT(-)), което предполага високи нива на неразградена остатъчна ДНК (Фигура 7b). CiAR демонстрира отлични резултати, с най-високи стойности на Ct за пробите с DNase(+)/RT(-) и необработените с ДНКаза(-)/RT(-) (Фигура 7c), превъзхождайки останалите методи, докато пробите с RNASnap имаха най-ниски стойности на Ct в тази група. FACTS показва малко по-високи стойности на Ct от другите два метода в групата (DNase (+)/RT (+)), което предполага по-нисък добив на РНК (Фигура 7a), но в същото време значително по-малко замърсяване с ДНК в сравнение с RNASnap ( $p < 0,05$ ), с изключение на щамове EARS 5585 (Фигура 7b) и 3125 (Фигура 7c).



**Фигура 7.** Остатъчна ДНК при всеки метод за екстракция на РНК от щамове *P. aeruginosa* PAO1 ATCC 15692, ATCC 27853, EARS 5585, 3125, 3858. Представени са средните стойности от qPCR на *rpoD* в три повторения: (а) с кДНК от проби, третиран с ДНКаза, по-ниската стойност означава по-добър резултат; (б) остатъчна геномна ДНК след третиране с ДНКаза, по-висока стойност означава по-добър резултат; (с) обща геномна ДНК, нетретирана с ДНКаза или RT, по-висока стойност означава по-добър резултат.

FACTS беше вдъхновен от предишните бързи техники за екстракция на РНК, базирани на формамид (напр. RNASnap (Stead et al. 2012) и One step hot-formamide методът (Shedlovskiy, Shcherbik, and Pestov 2017)). Освен формамид, FACTS включва

химикали, които функционират синергично с нагряването за бактериален лизис и бърза инактивация на РНКазите, като същевременно оставят по-голямата част от високомолекулната ДНК агрегирана в клетъчния пелет. Първо, промиването на клетките с PVSA (неспецифичен инхибитор на РНКазите) елиминира екзогенните РНКазите срещу минимална част от цената в сравнение с търговските продукти за съхранение на РНК (Earl et al. 2018). Второ, систематично оптимизирахме ефективната концентрация на всеки реактив за максимален добив на РНК с минимална остатъчна ДНК. CDTA беше предпочетен пред утвърдения EDTA като хелатиращ агент, тъй като според информацията той е по-липофилен и показва по-силно свързване на метали, като едновременно с това допринася за лизиса и инактивирането на РНКазите ([https://www.dojindo.eu.com/images/Product\\_Photo/Chelate\\_Table\\_of\\_Stability\\_Constants.pdf](https://www.dojindo.eu.com/images/Product_Photo/Chelate_Table_of_Stability_Constants.pdf), достъпено на 13 Юни 2023). От друга страна, TCEP, който е необратим и устойчив на окисление при различно рН, се счита за по-добър редуциращ агент в сравнение с дитиотрейтола и  $\beta$ -меркаптоетанола, които са широко приети в протоколите за изолиране на РНК (Rhee and Burke 2004). Не на последно място, ниската концентрация на саркозил (анионен детергент) улеснява суспендирането и пермеабелизирането на клетките.

По отношение на интегритета на РНК, RNAsnap и FACTS показаха по-добри резултати. Пробите на CiAR бяха леко деградирани, но все пак бяха с приемливо качество. Стойностите на RIN за пробите на FACTS бяха системно по-високи от тези на другите два метода. Една от възможните причини за намаления интегритет на пробите CiAR може да се обясни с разликата в елуиращите агенти. Предварителните изпитвания включваха няколко цикъла на замразяване и размразяване, което доведе до постепенно намаляване на интегритета на CiAR пробите, докато при пробите от RNAsnap и FACTS не се наблюдаваше значителна промяна. Предходни проучвания са показали, че формамидът е мощен агент за запазване на РНК, и е установено, че дори многобройните цикли на замразяване и размразяване са имали минимално въздействие върху целостта на РНК за разлика от пробите, разтворени в обработена с DEPC вода (Shedlovskiy, Shcherbik, and Pestov 2017; Chomczynski 1992). Ето защо за дългосрочно съхранение на РНК се препоръчва пробите да се съхраняват в оригиналния буфер за лизис с формамид, а не пречистени.

Концентрациите на РНК в изследването бяха консистентни при всички тествани методи, докато концентрациите на остатъчната ДНК варираха значително. Най-ниските нива на ДНК бяха открити в пробите, обработени с CiAR, докато най-високите нива бяха открити в пробите, обработени с RNAsnap. Освен това, CiAR пробите показаха много висока чистота, следвани от FACTS и накрая RNAsnap. Важно е да се отбележи, че CiAR пробите са преминали през пречистване като задължителна стъпка в протокола, без която точните измервания не биха били възможни. В съответствие с нашите очаквания беше установена по-ниска концентрация в РНК пробите от Грам-положителните бактерии, което може да се дължи на по-високата им устойчивост на лизис.

За целите на това проучване предпочетохме за пречистването да използваме утаяване с етанол и LPA като носител поради ефикасия и опростен характер на метода. Резултатите ни показаха, че методът е ефективен при утаяване на РНК, въпреки че първоначално е разработен за пречистване на ДНК (Gaillard and Strauss 1990).

По-рано беше доказано, че високите нива на остатъчна ДНК могат да изискват многократно третиране с ДНКаза за да се отстрани напълно (Jahn, Charkowski, and Willis 2008). Резултатите от измерването нивата на *proD* чрез qPCR предполагат, че при пробите обработени с RNAsnap, вероятно е налице значително количество остатъчна ДНК, което води до изкуствено надценяване на резултатите от qPCR с кДНК от ДНКаза(+)/RT(+) пробите. Този ефект може да се дължи на по-високата температура на инкубиране, използвана в етапа на лизиране (95 °C за разлика от 68 °C във FACTS), което вероятно е довело до по-ефективно лизиране и освобождаване на ДНК. Необходими са допълнителни изследвания за потвърждаване на тази хипотеза.

Нашите резултати показаха, че RNAsnap и CiAR са най-благоприятни по отношение на ефективността и лекотата на изпълнение, но новоразработеният метод FACTS демонстрира по-добри резултати по отношение на интегритета на РНК. FACTS се явява рентабилна, високоефективна и обещаваща техника за бързо извличане на РНК от *P. aeruginosa*, други Грам-отрицателни и някои Грам-положителни бактерии, осигуряваща висококачествена РНК, подходяща за експресионни анализи, с минимално наличие на замърсяваща ДНК.

Една от основните лимитации на това изследване е ограниченият набор от бактериални видове. Трите метода бяха тествани единствено върху *P. aeruginosa*, докато други Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии бяха изследвани само с FACTS. В резултат на това за тези видове не беше възможно сравнение с други методи. Освен това методът FACTS беше изпитан и върху *Bacillus licheniformis*. Независимо от прилагането на механичен лизис, извличането на РНК от този организъм се оказва невъзможно, което подсказва, че методът може да не е подходящ за бактерии, които се лизират трудно (напр. спорулиращи). За да се преодолеят тези ограничения, са необходими допълнителни изследвания за оптимизиране на протокола за работа с тези видове микроорганизми.

#### **4.5. Доказване на карбапенемази**

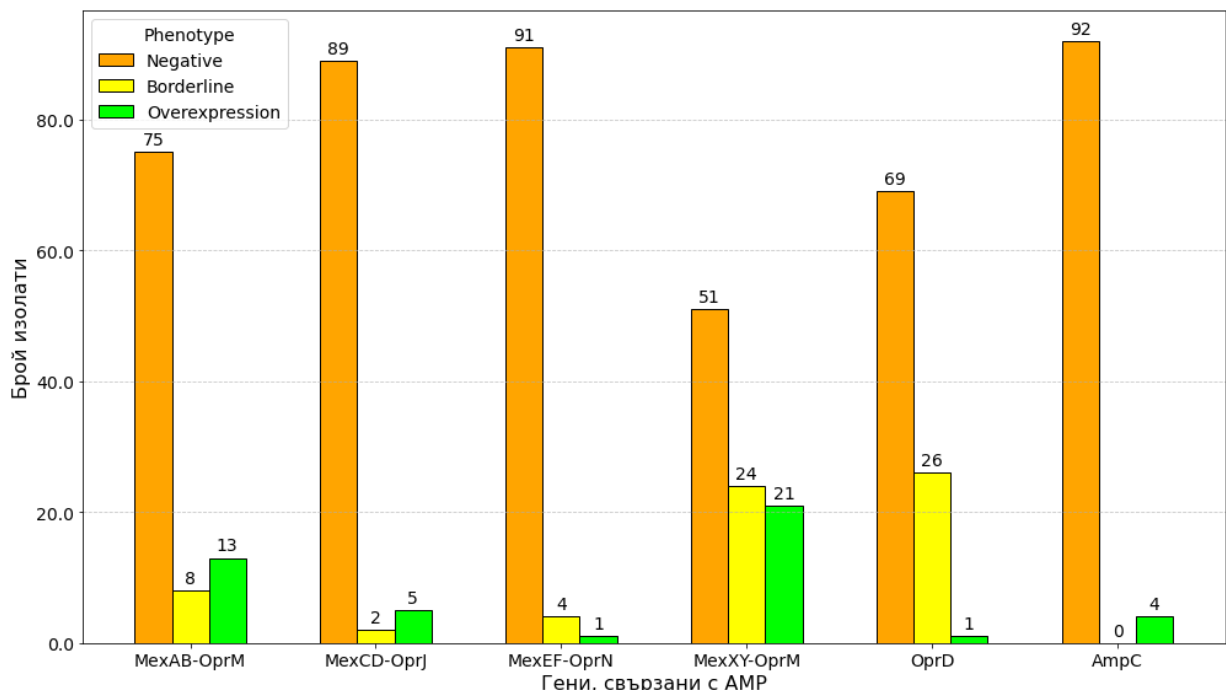
Като част от референтната дейност на лабораторията НРЛ-КМАР всички резистентни на карбапенеми изолати се подлагат на модифицирания CarbaNP тест (Nordmann, Poirel, and Dortet 2012) за фенотипна детекция на карбапенемазна активност. В изследваната извадка беше доказано фенотипно наличието на карбапенемазни ензими при 36 (36%) изолата.

Положителните изолати бяха анализирани чрез мултиплексен Real-time PCR, съчетан с капилярна електрофореза за разграничаване на девет типа най-често докладвани карбапенемази в ЕС. Сред откритите в България карбапенемази често се наблюдават ензими от типа VIM (Schneider et al. 2008; Strateva, Setchanova, and Peykov 2021), но са документирани и случаи на карбапенемази NDM-1, GES-5 и OXA-50 (Kostyanev et al. 2020; Petrova et al. 2019). Тези данни съответстват с резултатите от анализа на изследваната в настоящия дисертационен труд извадка, които потвърдиха наличието на карбапенемази в общо 33 изолата, включително NDM (n=5) и VIM (n=28). При всички изолати, продуценти на NDM, както и при един от продуцентите на VIM, бяха открити и бета-лактамази от типа GES. При 3 изолата идентификацията на вида карбапенемаза с PCR беше неуспешна. За допълнително доуточняване на вариантите на доказаните гени, карбапенемазната активност на GES бета-лактамазите и идентифицирането на трите неизвестни карбапенемази беше приложено целогеномно секвениране (виж т. 3.12.3.).

#### 4.6. RT-qPCR за доказване на експресия на ефлуксни системи и гени свързани с резистентността към антимикробни препарати

За оценка на влиянието на различни гени, свързани с резистентността към антимикробни препарати, беше проведен експресионен анализ, включващ ефлуксните системи MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ, както и гените *oprD* и *ampC* на цялата извадка от мултирезистентни изолати *P. aeruginosa*. За определяне на нивата на експресия бяха следвани вече утвърдени критерии (Cabot et al. 2011) (Таблица 11).

Оформени бяха няколко профила на свръхпродуценти: MexAB-OprM (n=13); MexCD-OprJ (n=5); MexEF-OprN (n=1); MexXY-OprM (n=21); AmpC (n=4) (Фигура 8). Наблюдавани бяха и изолати със свръхекспресия на повече от една система/ген - MexAB-OprM + MexXY-OprM (n=4), MexXY-OprM + AmpC (n=1), MexCD-OprJ + MexXY-OprM (n=1) (Таблица 15).



**Фигура 8.** Брой изолати и тяхната експресия на ефлуксни системи и гени, свързани с AMP.

Увеличена експресия на MexAB-OprM беше установена при 13 от изолатите. При 7 от тях, тази експресия беше повишена с повече от 4 пъти над референтната стойност, а един изолат показва >13-кратно увеличение. Осем изолата от извадката показаха гранични нива на експресия, докато останалите (n=75) държаха стойности в рамките на референтите. Както беше обсъдено в литературния обзор, повишената експресия на MexAB-OprM може да предизвика резистентност към  $\beta$ -лактами,  $\beta$ -лактамазни инхибитори и хинолони, което съвпада с получените от нас резултати. От общия брой свръхпродуценти на MexAB-OprM, 6 бяха и продуценти на карбапенемази, затруднявайки оценката на ефекта от свръхекспресията върху резистентността към  $\beta$ -лактамите. Ясно се виждаше връзката обаче при изолатите непродуциращи карбапенемази, от които повечето бяха резистентни към голяма част от  $\beta$ -лактамите, с изключение на някои от антибиотиците от ново поколение като цефидерокол, имипенем/релебактам и цефтазидим/авибактам. Всички 13 свръхпродуцента бяха резистентни на хинолони.

В изследваната извадка бяха детектирани 5 свръхпродуцента и 2 изолата с гранична експресия на MexCD-OprJ. Свръхпродуцентите проявиха резистентност към хинолони, и голяма част от  $\beta$ -лактамите, включително карбапенеми (меропенем, имипенем, дорипенем), цефтолозан/тазобактам и цефтазидим/авибактам. Известно е, че MexCD-OprJ има отношение към резистентността към хинолони, макролиди, хлорамфеникол и  $\beta$ -лактами, с изключение на карбеницилин, цефтазидим и азтреонам (Masuda et al. 2000). Спрямо тези данни, изключихме възможността свръхекспресията на тази ефлуксна система да допринася за резистентността към цефтазидим/авибактам, предполагайки, че вместо това е засегнат друг механизъм. При 3 от изолатите беше наблюдавана чувствителност на азтреонам, корелираща със силно намалена експресия на MexAB-OprM. Този феномен е характерен за мутанти от тип *nfxB*, за които се счита, че проявяват свръхчувствителност към карбеницилин и азтреонам, поради намаляването на активността на MexAB-OprM (Gotoh et al. 1998).

При анализа на експресията на MexEF-OprN беше установен само един свръхпродуцент с 12 пъти по – висока от референтната експресия. Тази ефлуксна помпа е свързана с резистентността към хинолони, хлорамфеникол, триметоприм и имипенем, а свръхекспресията ѝ е характерна за мутанти от тип *nfxC* (Köhler et al. 1997).



Единственият свръхпродуцент на тази система прояви резистентност към хинолони и карбапенеми, с изключение на имипенем/релебактам. В него беше забелязано значително понижение в експресията на *OprD*, което вероятно се дължи на свръхекспресията на *MexEF-OprN*. Този феномен е характерен за мутантите от тип *nfxC*, където свръхекспресията на *MexEF-OprN* води до намаляване експресията на *oprD* и следователно индиректно предизвиква резистентност срещу имипенем (Trias and Nikaido 1990).

Свръхекспресия на *MexXY* беше отчетена при 21, а гранични стойности проявиха 24 от изследваните изолати. Сред основните цели на тази ефлуксна система са флуорохинолони, определени  $\beta$ -лактами и аминогликозиди (Poole 2002; Schweizer and Schweizer 2003). Повечето свръхпродуценти бяха резистентни към голяма част от  $\beta$ -лактамите, с изключение на цефтазидим/авибактам, имипенем/релебактам и цефидерокол, където мнозинството изолати бяха чувствителни. Всички изолати свръхпродуценти бяха резистентни на флуорохинолоните ципрофлоксацин и левофлоксацин. По отношение на аминогликозидите, 20/21 бяха резистентни на тобрамицин, а 14/21 бяха резистентни на амикацин.

Всички изследвани изолати, с изключение на един, проявиха намалена експресия на *OprD*. Този факт частично може да обясни високата резистентност към карбапенеми сред изолатите в нашата извадка, тъй като *OprD* представлява основния портал за навлизане на карбапенемите в клетката.

Свръхпроизводство на *AmpC* беше наблюдавано при 4 изолата, докато всички останали показаха стойности в рамките на референтната експресия. При *P. aeruginosa*, свръхекспресията на *AmpC*- $\beta$ -лактамазата е основна причина за резистентност към  $\beta$ -лактами (Colom et al. 1995; Sanders et al. 1986). Детектираните свръхпродуценти демонстрираха резистентност към цефалоспорици и пеницилици, а повечето от тях бяха резистентни и на карбапенеми. По отношение на антибиотиците от ново поколение, всички бяха чувствителни на меропенем/ваборбактам, имипенем/релебактам и цефтазидим/авибактам. Един от изолатите беше резистентен на цефтолозан/тазобактам, а друг (Paer3855) показва резистентност към цефидерокол. Сред потенциалните механизми за резистентност към цефидерокол са аминокиселинни замени в *AmpC*,

свръхекспресия на ефлуксната помпа MexAB-OprM и мутации в сидерофорните рецептори PiuD и PirA (Karakonstantis, Rousaki, and Kritsotakis 2022). Въпреки това, резултатите от изследването показаха, че изолатът, проявяващ резистентност към цефидерокол, не спада към свръхпродуцентите на MexAB-OprM, и не притежава мутации в съответните гени. Този факт подсказваше, че може да участва друг механизъм, за който обаче бяха необходими допълнителни изследвания и не беше установен в хода на дисертационния труд.

Шест изолата, които не произвеждат карбапенемази, показаха свръхекспресия едновременно на два гена. Един от тях, Paer3500, се отличаваше с изключително висока експресия на MexAB-OprM – повече от 13 пъти над референтната, както и свръхекспресия >70 пъти над референтната за MexXY-OprM (Таблица 15). С подобен профил на експресия бяха още 3 изолата. Всички свръхпродуценти едновременно на MexAB-OprM и MexXY-OprM бяха резистентни на флуорохинолони и повечето  $\beta$ -лактами, включително тези от ново поколение, с изключение на имипенем/релебактам и цефидерокол.

**Таблица 15.** Изолати със свръхекспресия на повече от един от изследваните гени. Числата показват колко пъти е по висока експресията спрямо референтната

Щам	MexAB-OprM	MexCD-OprJ	MexEF-OprN	MexXY-OprM	oprD	ampC	Group
Paer2892	4,45	NA	4,29	16,53	0,27	NA	mexA+mexX
Paer3126	9,55	0,46	3,94	30,25	NA	NA	mexA+mexX
Paer3135	6,44	0,71	2,93	13,02	0,02	NA	mexA+mexX
Paer3500	13,76	NA	5,62	78,25	0,15	NA	mexA+mexX
Paer3078	1,40	0,32	3,23	11,11	0,63	21,89	mexX+ampC
Paer3635	1,08	10,31	1,20	11,62	0,02	2,74	mexC+mexX

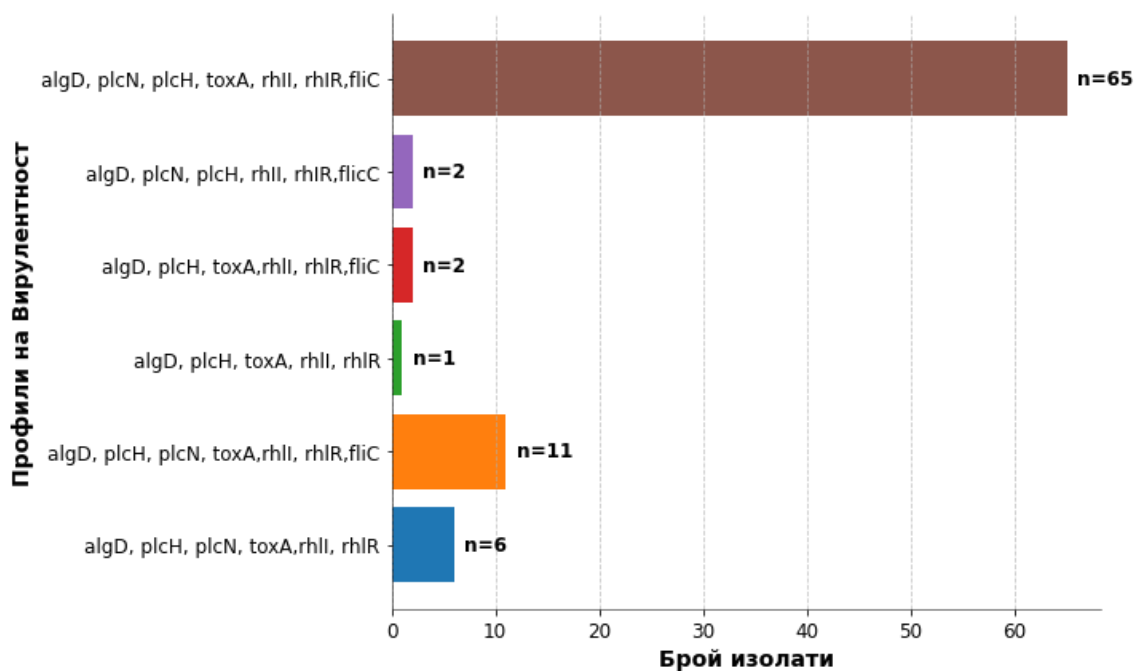
Един от свръхпродуцентите на *ampC* (Paer3078) проявяваше свръхекспресия и на ефлуксната система MexXY-OprM. Той беше резистентен на флуорохинолони и аминокликозиди, както и голяма част от  $\beta$ -лактамите, с изключение на имипенем и тези

от по-ново поколение като цефтазидим/авибактам, цефтолозан/тазобактам, меропенем/ваборбактам, имипенем/релебактам и цефидерокол.

Един от свръхпродуцентите на MexCD- OprJ (Paer3635) беше категоризиран и като свръхпродуцент на MexXY- OprM. Този изолат беше чувствителен само на колистин и имипенем/релебактам, което представляваше интерес, тъй като е от малкото изключения, резистентни на цефидерокол в нашата извадка. Въпреки усилията обаче, при него също не беше установен механизма на резистентност към цефидерокол.

#### 4.7. Доказване на вирулентни фактори чрез PCR и анализ на способността за формиране на биофилм

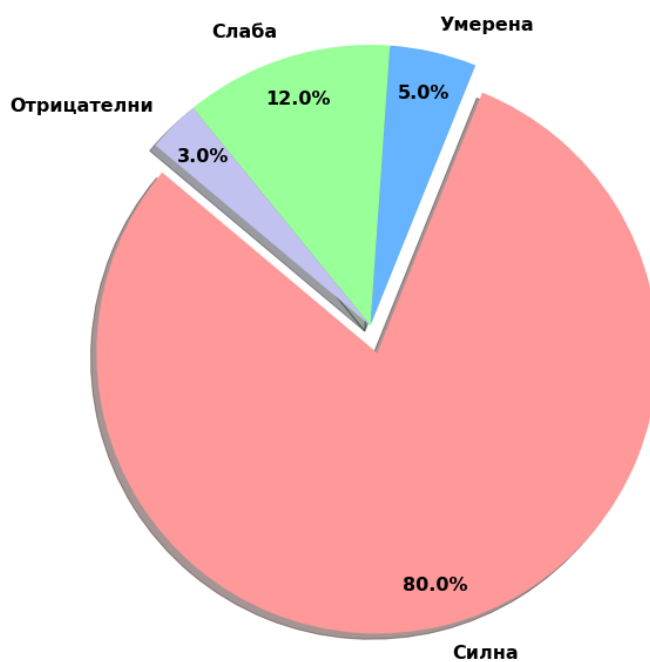
За характеризиране на вирулентността на изолатите беше проведен PCR в две мултиплексни реакции за доказване на седем гена кодиращи основните фактори на вирулентност и патогенност: *algD* – биосинтез на алгинат, *aprA* – алкална фосфатаза, *fliC* – флагелин (подвижност), *toxA* – екзотоксин А, *lasAB* – протеази/еластази, *plcHN*-фосфолипази, *rhlIR* – кворум сенсинг (Mitov, Strateva, and Markova 2010; Ertugrul et al. 2018). Анализът беше извършен върху 87 налични към момента изолата, при което бяха идентифицирани 6 различни профила на вирулентност (Фигура 9).



Фигура 9. Профили на вирулентност базирани на PCR.

Откриването на почти всички изследвани фактори на вирулентност при повечето изолати показва значителен патогенен потенциал, който в комбинация с MDR фенотипа би представлявал значителна пречка за терапията.

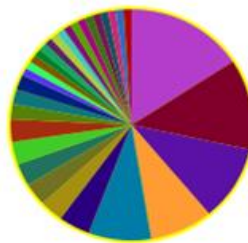
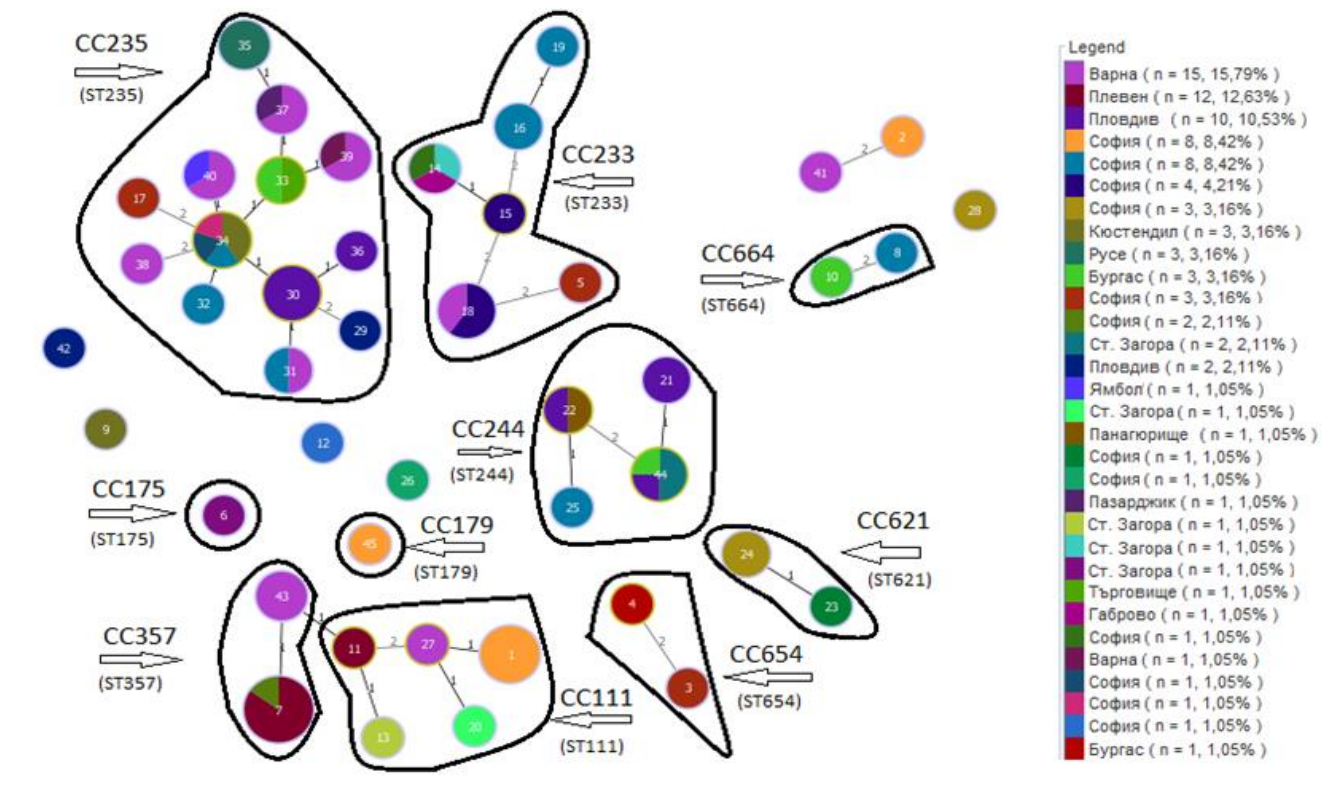
От друга страна, продукцията на биофилм, като ключов фактор на вирулентност, не само участва в инфекциозния процес, но и повишава резистентността към антибиотици и дезинфектанти. Този феномен се явява основен рисков фактор както при пациентите с МВ, така и при прикрепяне към повърхности и инструментариум в болниците. За оценка на способността на изолатите за формиране на биофилм беше приложен полу-количественият метод с абсорбция на кристал виолет върху полистиренови микротитърни плаки (Shukla and Rao 2017). Резултатите от анализа показаха силна продукция на биофилм при 80%, умерена при 5%, и слаба при 12% от изследваните изолати (Фигура 10). Също така, при 3% от изолатите не беше установена продукция на биофилм. Тези резултати категорично подчертават високата честота и важността на биофилма при клиничните щамове на *Pseudomonas* spp.



**Фигура 10.** Анализ на способността за продукция на биофилм при изследваните изолати.

#### **4.8.    *Генотипизиране по MLVA9 и MLST***

Типизиране по MLVA9 беше извършено върху 92 изолата, а типизиране чрез MLST беше приложено върху 28 репрезентативни изолата (на базата на MLVA анализа). Установени бяха 26 MLVA генотипа, които бяха подразделени на 45 субтипа. Сред извадката изолати имаше 2, които бяха нетипируеми по MLVA. В резултат от MLST анализа бяха обособени общо 10 секвенционни типа и няколко клонални комплекса, повечето принадлежащи към високо-рискови международни клонове (CC111, CC235 и др.) (Фигура 11).

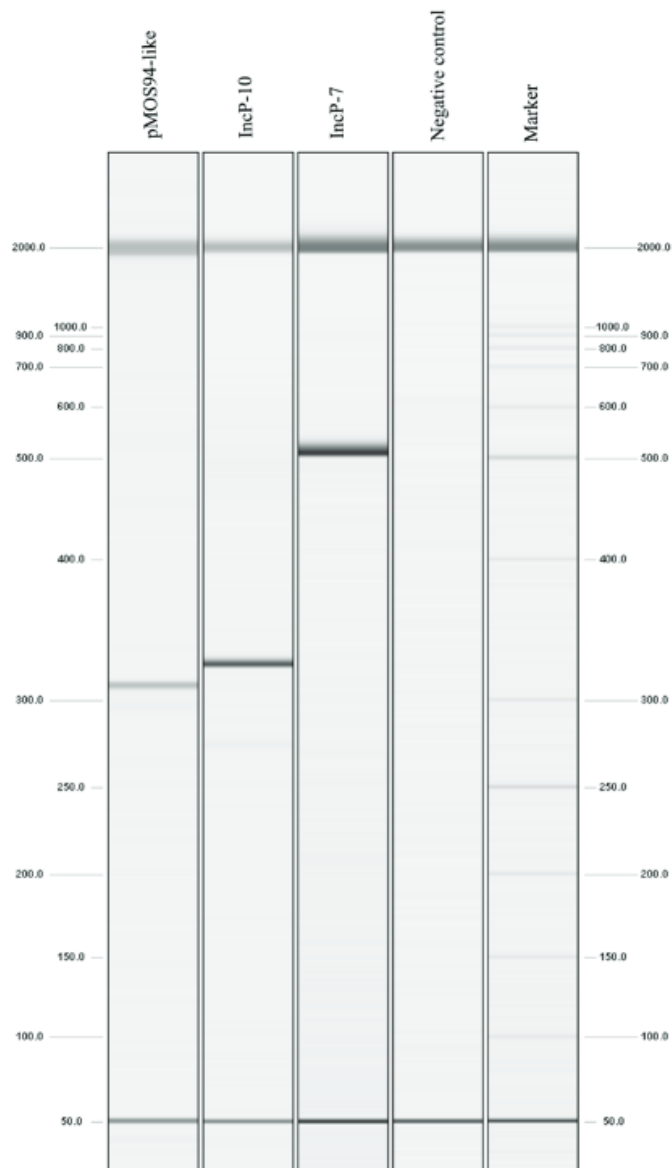


**Фигура 11.** Филогенетичен анализ и Minimum spanning tree (MST), базирано на MLVA9 London на 92 клинични изолата *P. aeruginosa* (Turton et al. 2010). С линии са посочени връзките между типовете, а с цифра броя вариабилни локуси. Показани са секвенционните типове (ST), а с черно са заградени клоналните комплекси (CC).

## 4.9. Плазмидно репликационно типизиране чрез PCR

В хода на настоящата дисертация беше разработен мултиплексен PCR за типизиране на плазмидни репликони при *Pseudomonas*. Първоначално беше извършен предварителен *in silico* анализ, върху който се основаваше разработването и дизайнът на нови оригинални праймери, покриващи някои от по-редките и/или новооткрити плазмидни репликони като IncG/U/P6, IncP-2, IncP-10, pMOS94-like, pKLC102-like. След това беше извършено PCR-базирано плазмидно репликационно типизиране (PBRT) при всички изолати с праймери за 10 от по-честите репликони (IncP-1abyde, IncP-4, IncP-7, IncP-9, IncW, IncQ, IncA/C, IncN и др.), както и за наскоро описаните pMOS94 и pKLC102-like плазмидни семейства.

Установено беше наличието на IncP-7 (n=1) и IncP-10 (n=1) репликони при изолати без карбапенемази. При един от щамовете с неидентифицирана от CarbaNP теста карбапенемаза беше установено наличие на pMOS94-подобен плазмид, чиято генетична линия беше открита съвсем скоро (Pilato et al. 2019a). Резултатът от капилярната електрофореза е показан на Фигура 12.



**Фигура 12.** Анализ на плазмидните репликони при 3 от положителните на PCR изолати.

#### ***4.10. Конюгация***

В резултат на множество различни експериментални постановки за извършване на конюгативен трансфер: а) с използване на твърда среда; б) филтърен метод; в) с използване на помощен щам за мобилизация на плаزمиди; г) със селекция по различни антибиотици (цефтазидим, меропенем и др.), не бяха получени резистентни конюганти. Подобни резултати се докладват и от други автори (Papagiannitsis et al. 2017), което

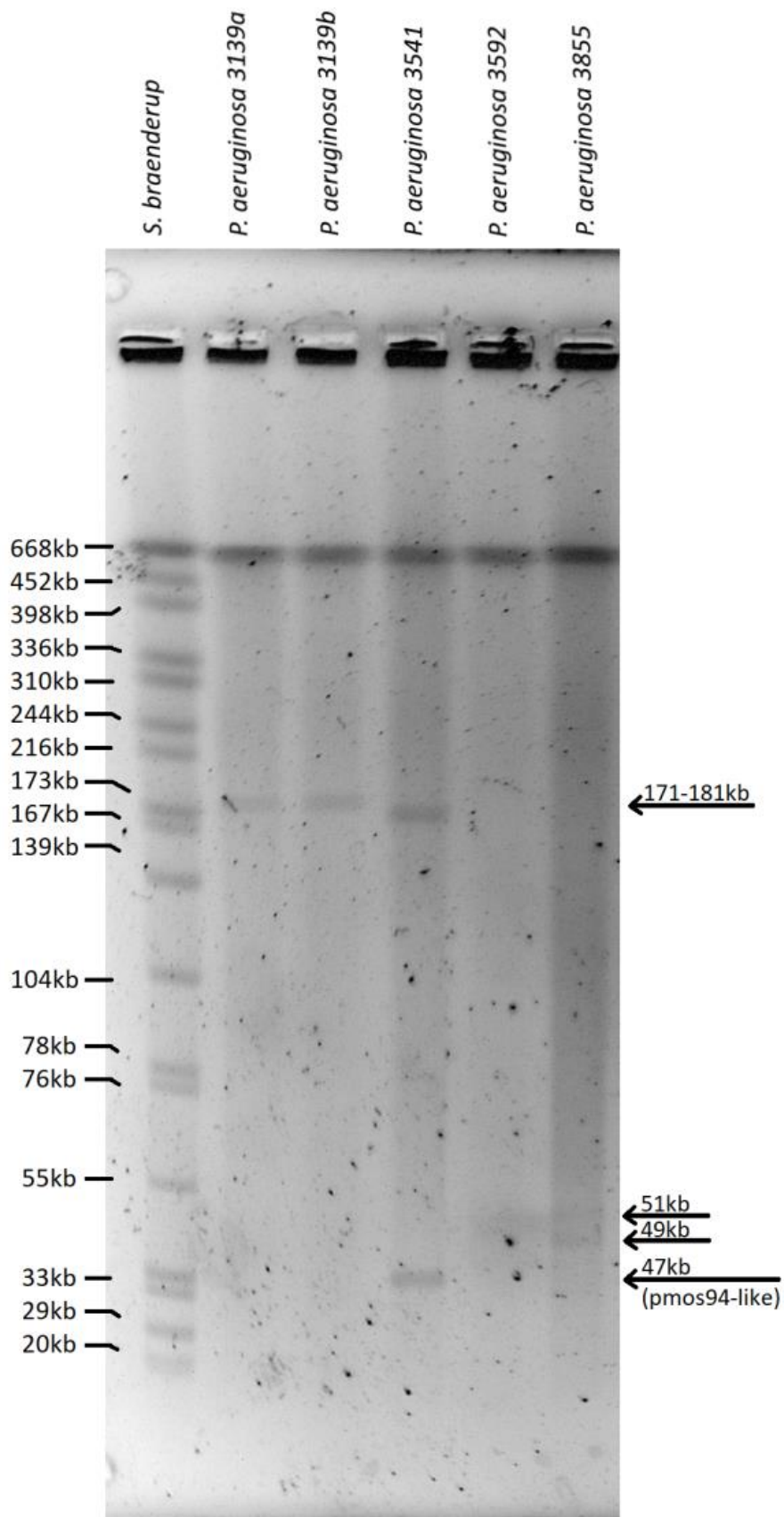


логично ни насочи към търсене на вероятна хромозомна локализация на гените, кодиращи карбапенемази (вж. следващата точка).

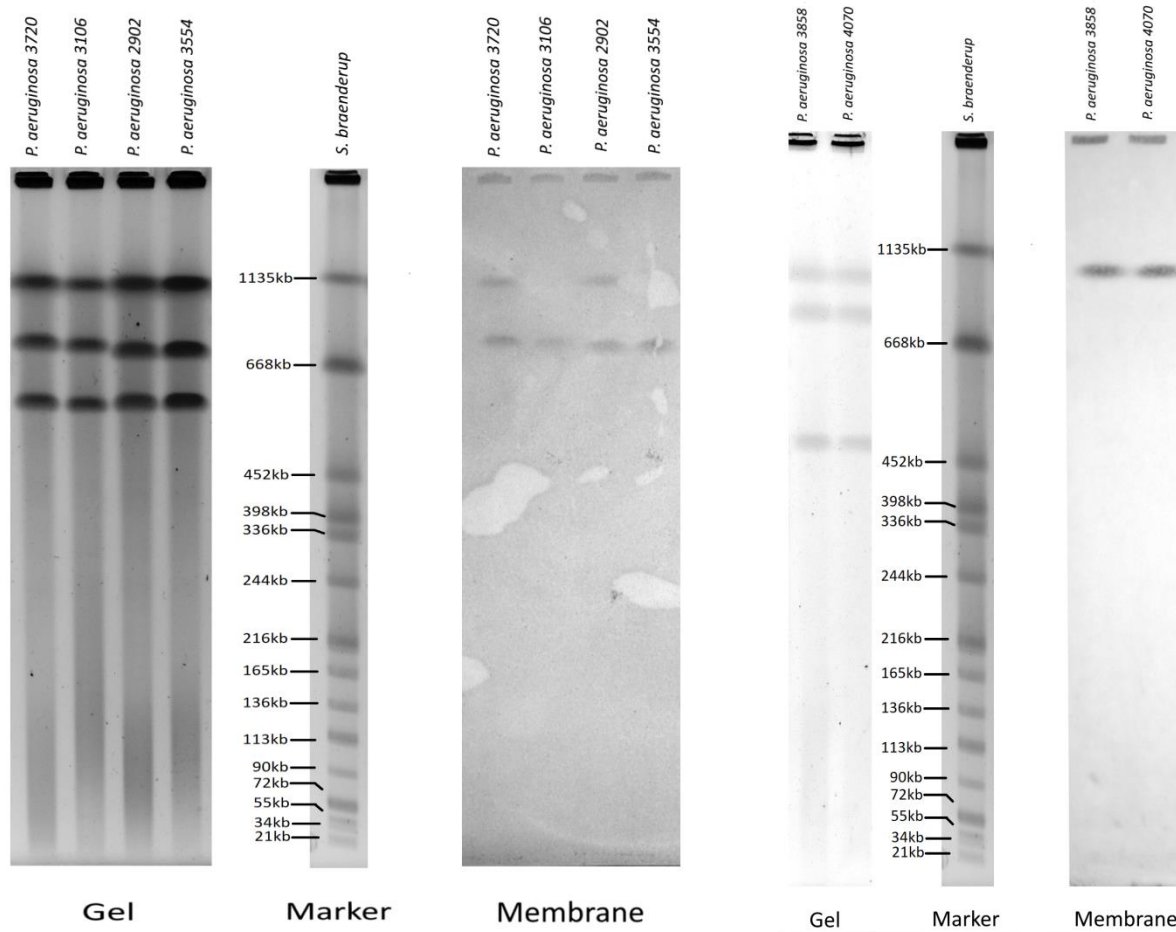
#### ***4.11. Анализ на плазмидния профил на всички щамове, посредством S1 нуклеазно третиране (линеаризиране на плазмидите) и електрофореза в пулсово поле (PFGE)***

Анализ на плазмидния профил на изолатите беше извършен посредством S1 нуклеазно третиране и PFGE. В резултат на анализа, при пет щамове бе установено наличието на плазмиди с размери, вариращи от 33 kb до 181 kb (Фигура 13). S1-PFGE профилът на изолата с предварително установен pMOS94-подобен репликон, беше представен от два плазмиди с размери 47,6 kb и 174,5 kb. При два изолата без карбапенемаза беше установен плазмид с един и същи размер от 181 kb (вероятно с установения репликон P7). При друг изолат без карбапенемаза, бяха открити други два плазмиди с размери 51 kb и 49 kb (един от тях с вероятен IncP-10 репликон). Като цяло плазмидния профил при изследваните изолати се оказва изключително ограничен.

Всички изолати с карбапенемазна продукция бяха подложени и на рестриктазен анализ посредством I-Seu I нуклеазно третиране, електрофореза в пулсово поле и последваща хибридизация (Southern blot) със специфични DIG-белязани сонди, с което бе потвърдена хромозомната локализация на *bla<sub>VIM</sub>* и *bla<sub>NDM</sub>* гените, кодиращи карбапенемази (Фигура 14). Тези резултати обясняват и неуспешните конюгационни експерименти.



**Фигура 13.** S1-PFGE плазмиден профил при щамове с установени плазмиди.



**Фигура 14.** I-Ceu I PFGE (хромозомен) рестриктазен профил при щамове с установени А) *bla<sub>VIM</sub>* и В) *bla<sub>NDM-1</sub>* карбапенемази.

## 4.12. Биоинформатичен анализ

### 4.12.1. Анализ на качеството на получените къси и дълги прочити, оценка на качеството на получените геноми и тяхното депозиране в NCBI GenBank

Анализът на получените къси прочити от секвенирането беше извършен с използването на FastQC и MultiQC, които предоставиха ценна информация за качеството на данните.

Данните от пет изолата дадоха незадоволителни резултати. Въпреки това, решихме да предприемем допълнителни стъпки с цел подобряване качеството на прочитите и тяхното използване за геномно асемблиране. Извършихме филтрация и почистване на

рийдовете с TrimmomaticPE, след което използвахме Unicycler v4.8.0 за асемблиране. Получените асемблирани геноми подлежах на качествен анализ с Quast.

Един от ключовите аспекти на качественото геномно асемблиране е дълбочината на покритието, като минималният праг, който зададохме, беше 15x. За петте проблемни изолата забелязахме дълбочина на покритие <15x, което показва, че броят на висококачествените прочити беше недостатъчен за реконструиране на репрезентативен геном. Установени бяха ниски стойности на N50 (<10kb), огромен брой контиги и аномални размери на генома (Таблица 16). След внимателен преглед и обсъждане, беше взето решение тези геноми да бъдат изключени от последващите анализи.

**Таблица 16.** Отпаднали геноми поради ниско качество

Sample	No. of Trimmed Reads	Mean Read Length [bp]	No. of Contigs	Genome Length [bp]	Largest Contig [bp]	N50 [bp]	GC-Content [%]	Depth [x]
Paer3072	195798	274	20948	12567000	23010	651	66.27	4
Paer3126	267874	264	21602	12978145	11630	650	66.18	5
Paer2288	382476	264	10971	10172768	71640	2483	66.30	9
Paer3790	469092	246	8050	9397210	79729	4777	66.28	12
Paer2713	545976	281	10072	10252985	102085	6606	66.18	14

На дълговерижно секвениране бяха подложени 17 генома, за някои от които бяха налични и данни от късоверижното секвениране. В комбинация с късоверижно секвениране, тази технология предоставя възможност да бъде извършен допълнителен scaffolding на получените геноми, както и да бъде циркуляризирана хромозомата и наличните плазмиди. Изолатите, подложени на дълговерижно секвениране бяха подбрани по-следните критерии: 1. предполагаемо наличие на плазмиди; 2. потенциална резистентност към цефидерокол; 3. Потенциално наличие на нови гени/алели; 4. екстензивно резистентен фенотип.

В резултат от асемблирането бяха получени 9 напълно завършени кръгови генома, 1 завършен линеен геном, както и 7 драфт генома. Специфичните параметри и особености на всеки от тези геноми, секвенирани по дълговерижната технология (Nanopore), са представени в Таблица 17.

**Таблица 17.** Всички дълговерижно секвенирани геноми и техните параметри

Assembly	Number of contigs	Largest contig	Total length	GC (%)	N50	Status	Topology
Paer2090	1	6790832	6790832	66.02	6790832	Complete	Circular
Paer3078	2	6964892	7142531	65.91	6964892	Complete	Circular
Paer3125	2	6764435	6778234	65.95	6764435	Complete	Circular
Paer3285	1	7037714	7037714	65.94	7037714	Complete	Circular
Paer3541	4	6856166	7083871	65.71	6856166	Complete	Circular
Paer3554	1	6899894	6899894	66.04	6899894	Complete	Circular
Paer3771	1	6960573	6960573	66.02	6960573	Complete	Circular
Paer3858	1	6911916	6911916	65.95	6911916	Complete	Circular
Paer4782МК	3	7092247	7444543	65.57	7092247	Complete	Circular
Paer3500	2	6962803	7126447	65.92	6962803	Complete	Linear
Paer3018	3	5900471	7108499	65.92	5900471	Draft	Linear
Paer3142	9	3622202	7183349	65.88	3622202	Draft	Linear
Paer2970	25	1827831	7244870	65.84	863536	Draft	Linear
Paer3796A	29	6476045	7160797	65.68	6476045	Draft	Linear
Paer3635	30	3201486	7376759	65.50	2160491	Draft	Linear
Paer3139	32	6949570	7178433	65.54	6949570	Draft	Linear
Paer3855	85	1541166	7030290	66.00	356770	Draft	Linear

За оценка на завършеността на геномите бяха използвани приложението BUSCO, което следи за наличието на ортолози, представени в единствено копие, които са силно консервативни сред близкородствени организми. Всички геноми показаха завършеност над 98%, което е индикация за това, че повечето от очакваните консервативни гени са налице. Не бяха установени фрагментирани или липсващи консервативни гени. В съответствие с тези резултати CheckM разкри много ниски нива на замърсяване с чужда ДНК (<0.9%).

Получените висококачествените геноми (n=96) бяха депозираны в геномната банка на NCBI (GenBank) в общ проект под номер [PRJNA1017673](#). Геномите на три от изолатите бяха са депозираны в Европейския нуклеотиден архив (ENA) с проектен номер [PRJEB62425](#).

#### ***4.12.2. Идентификация на изолатите***

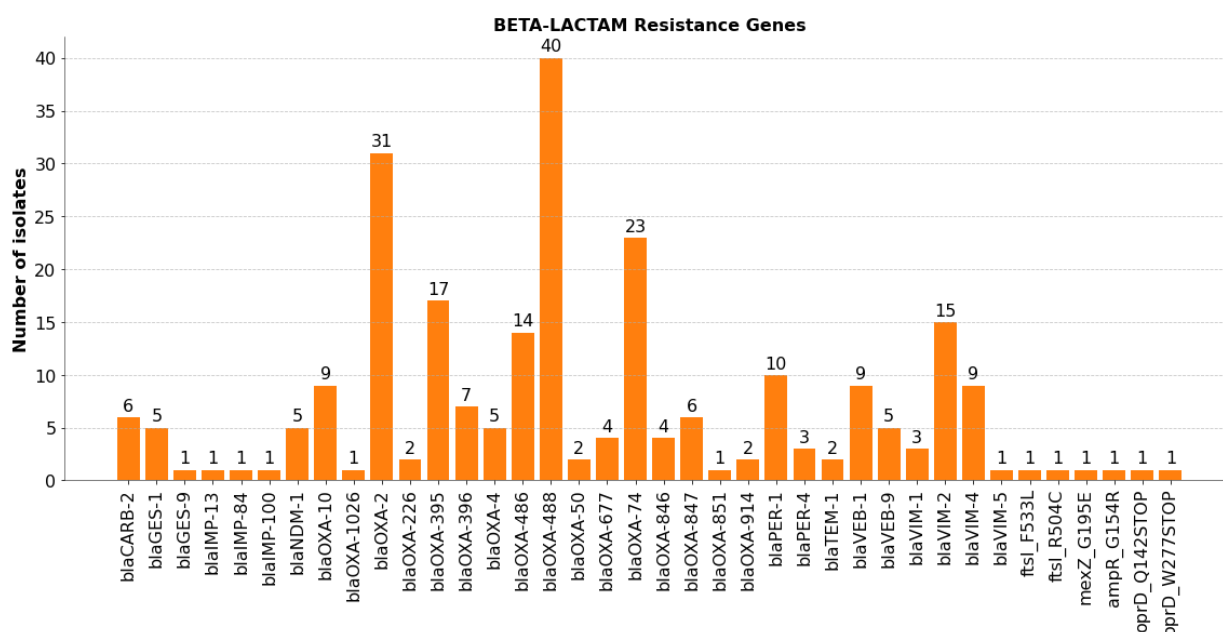
Идентификацията на изолатите беше извършена с помощта на rMLST (Jolley et al. 2012) и KmerFinder (Clausen, Aarestrup, and Lund 2018). Успешно беше потвърдена

идентификацията на 96 изолата *P. aeruginosa* и един изолат *P. protegens*. Видът на трите изолата *P. putida* комплекса беше успешно определен с висока прецизност. Два от тях бяха идентифицирани като *P. soli*, докато третият беше определен като *P. kurunegalensis* (вж. Таблица 1). Този случай изтъкна необходимостта от съчетаване на различни методи за прецизна идентификация на бактериални изолати, като най-надеждната такава може да бъде постигната чрез целогеномно секвениране.

### 4.12.3. Определяне на детерминантите на антимикробна резистентност

Определяне на резистентния профил на секвенираните мултирезистентни изолати *Pseudomonas* беше извършено посредством AMRFinderPlus и ResFinder.

Резултатите от анализа показаха изключително разнообразие от детерминанти на резистентност към  $\beta$ -лактами (Фигура 15а).



**Фигура 15а.** Разпределение на детерминантите на резистентност към  $\beta$ -лактами.

Бяха идентифицирани общо 5 типа  $\beta$ -лактамази от клас А – CARB, GES, PER, VEB, TEM. С изключение на CARB (с единствен вариант - CARB-2), всички бяха ESBL. Сред GES вариантите (GES-1 и GES-9) не бяха открити такива с карбапенемазна

активност. Ензимите от типа PER бяха представени от 2 варианта - PER1, който е инхибитор резистентен, и PER-4. В групата на VEB бяха разграничени също два варианта – VEB-1 и VEB-9. Детектиран беше само един вариант на TEM (TEM-1).

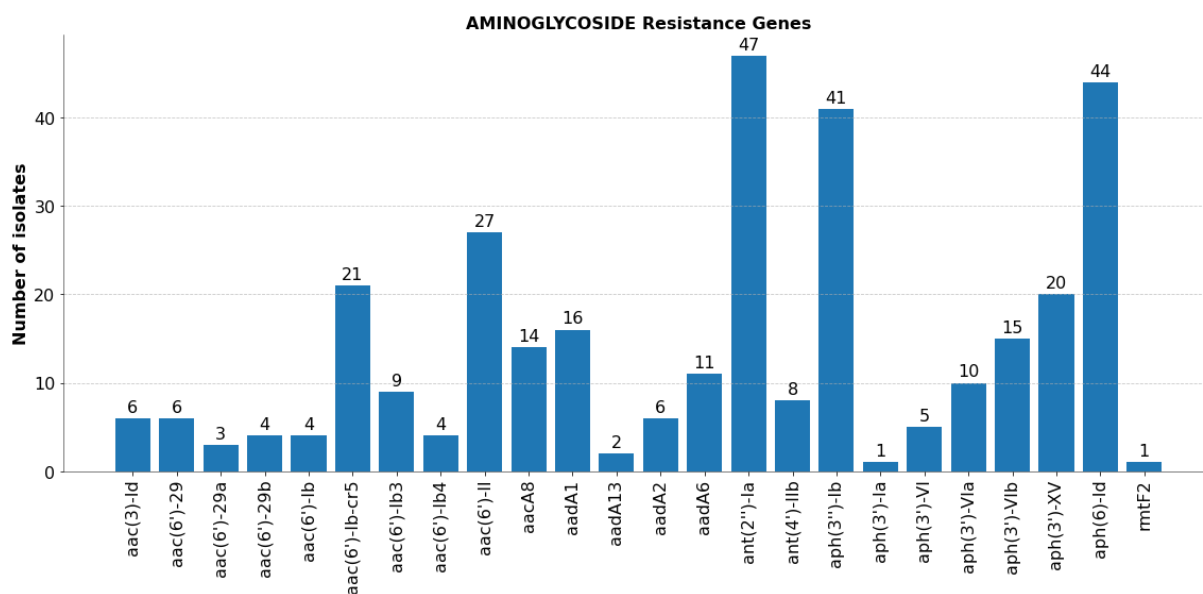
Относно клас В ензимите, бяха открити общо 3 вида карбапенемази – VIM, NDM и IMP. Сред изолатите бяха разграничени 4 варианта на VIM – VIM-1, VIM-2, VIM-4 и VIM-5. При изолатите с NDM беше потвърден само един вариант – NDM-1. Карбапенемазите от вида IMP бяха представени в три варианта – IMP-13, IMP-84 и IMP-100. IMP-100 беше идентифициран и охарактеризиран за първи път в хода на настоящото проучване, а също така за първи беше детектирана карбапенемаза от този тип в България (вж. т. 3.12.8).

Относно  $\beta$ -лактамазите от клас D, бяха идентифицирани общо 3 семейства - OXA-2, OXA-10 и OXA-50. Семейството OXA-50 беше представено от 11 варианта - OXA-4, OXA-50, OXA-395, OXA-396, OXA-486, OXA-488, OXA-846, OXA-847, OXA-851, OXA-914, OXA-1026. Семейството OXA-10 беше представено от 3 ензима – OXA-10, OXA-677 и OXA-74, като два от тях (OXA-677 и OXA-74) бяха категоризирани като ESBL. Семейството OXA-2 беше представено от два ензима – OXA-2 и OXA-226, като от тях OXA-226 също беше идентифициран като ESBL.

В хода на анализа бяха открити и няколко съществени мутации, свързани с антибиотичната резистентност. В изолат Paer3855 бе идентифицирана мутация в транскрипционния регулатор AmpR (*ampR*<sup>G154R</sup>), която доведе до свръхекспресия на AmpC  $\beta$ -лактамазата, както беше потвърдено от резултатите на експресионния анализ (вж. т. 3.6.). В същия изолат бяха установени още две съществени мутации – едната в транскрипционния регулатор MexZ (*mexZ*<sup>G195E</sup>), а другата в OprD (*oprD*<sup>Q142STOP</sup>). И двете мутации са описани при изолати със секвенционен тип ST175 (каквото е Paer3855), като мутацията *mexZ*<sup>G195E</sup> се асоциира с повишена експресия на ефлуксната система MexXY, а другата с инактивиране на OprD (Cabot et al. 2016). Въпреки това, експресионният анализ показва слабо увеличение на експресията на MexXY в този изолат, близко до граничните стойности, което не го определи като свръхпродуцент. В друг изолат беше забелязана допълнителна мутация в OprD (*oprD*<sup>W277STOP</sup>), която предизвиква преждевременен стоп кодон и се асоциира с повишена резистентност към карбапеними.

Открити бяха и две мутации в пеницилин-свързващия протеин PBP3 (*ftsI*) при 2 изолата, включително *ftsI*<sup>F533L</sup> и *ftsI*<sup>R504C</sup>, имащи отношение към карбапенемната резистентност.

Във връзка с аминогликозидната резистентност бяха доказани редица аминогликозид модифициращи ензими от всеки от трите типа, както и една 16S rRNA метилтрансфераза (Фигура 15b).



**Фигура 15b.** Разпределение на детерминантите на резистентност към аминогликозиди.

В изследваната извадка бяха детектирани общо три вида аминогликозид-ацетилтрансферази - AAC(3) (с единствен представител AAC(3)-Id), AAC(6') и AacA (с единствен представител AacA8). Сред AAC(6') ацетилтрансферазите се наблюдаваше изключително разнообразие от варианти, като по-интересните от тях включваха тези с активност към амикацин и тобрамицин - AAC(6')-Ib3, AAC(6')-II, AAC(6')-29a, AAC(6')-29b, aac(6')-Ib-cr5. За AAC(6')-Ib-cr5 е известно също, че проявява активност и към хинолони.

Аминогликозид-фосфорилтрансферазите бяха 3 вида - APH(3'') (с единствен представител APH(3'')-Ib), APH(3') и APH(6) (с единствен представител APH(6)-Id). Най-разпространени сред изолатите бяха APH(3'')-Ib и APH(6)-Id, които обуславят резистентност към стрептомицин. По голям интерес представляваха ензимите от типа

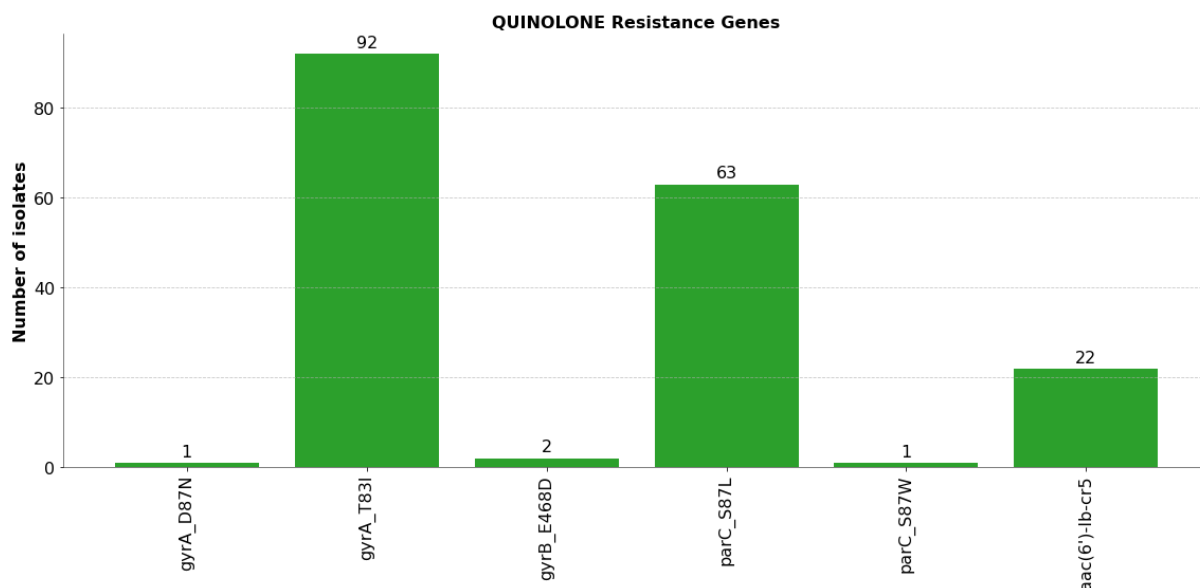


APH(3'), при които бяха идентифицирани множество варианти. Всички детектирани от този тип ензими проявяваха активност срещу амикацин и канамицин, с изключение на APH(3')-Ia, която действа само срещу канамицин.

Детектираните аминогликозид-нуклеотидил трансферази, включваха представители на семейството ANT(3'')-Ia и двата ензима ANT(2'')-Ia и ANT(4')-IIb. Сред идентифицираните ензими от семейството ANT(3'')-Ia бяха AadA1, AadA2, AadA6 и AadA13. Те се характеризират с активност срещу стрептомицин. Нуклеотидил-трансферазата ANT(2'')-Ia беше най-разпространена сред изследваните изолати, проявявайки активност срещу гентамицин, канамицин и тобрамицин. При малка част от изолатите беше детектирана нуклеотидил-трансферазата ANT(4')-IIb, която проявява активност срещу канамицин, тобрамицин и амикацин.

Един единствен изолат (Paer4413) беше асоцииран с присъствието на 16S rRNA метилтрансфераза – *rmtF2*. Той беше също така продуцент на VIM-4 и GES-9, а допълнително бяха установени и мутации в *GyrA* (*gyrA*<sup>T83I</sup>) и *ParC* (*parC*<sup>S87L</sup>), които се свързват с резистентност към хинолони. Този изолат показва изключително резистентен фенотип като прояви чувствителност единствено към колистин и цефидерокол.

По отношение на резистентността към хинолони, бяха открити няколко детерминанти, включващи един ензимен механизъм и мутационни явления (Фигура 15с).



**Фигура 15с.** Разпределение на детерминантите на резистентност към хинолони.

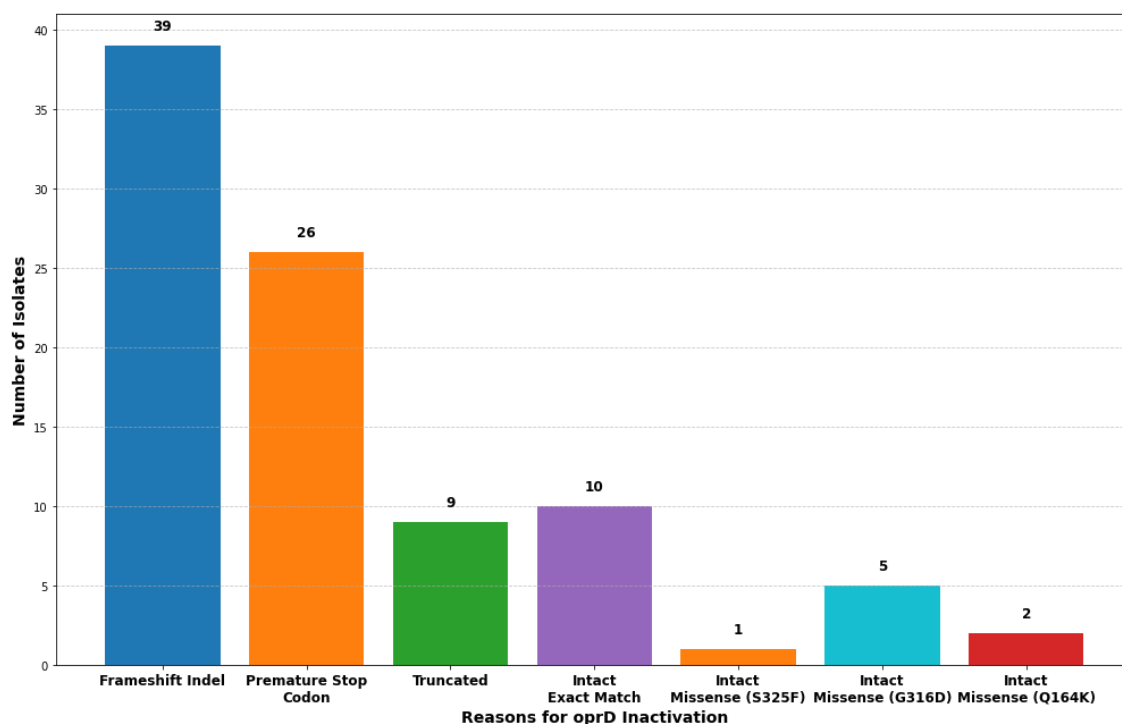
Потвърдено беше присъствието на ацетилтрансферази от типа AAC(6)-Ib-cr5, за които вече стана ясно, че освен активност към амикацин, проявяват такава и към хинолони. При голяма част от изолатите бяха наблюдавани мутациите *gyrA*<sup>T83I</sup> и *parC*<sup>S87L</sup>, които са най-често срещаните при *P. aeruginosa* (Del Barrio-Tofiño et al. 2017). В редки случаи бяха открити и други мутации в тези гени (*gyrA*<sup>D87N</sup> и *parC*<sup>S87</sup>). Допълнително, при два изолата беше установена и мутация в гена *gyrB* (*gyrB*<sup>E468D</sup>).

#### 4.12.4. Анализ на *oprD*

Функционалността на външния мембранен поринов протеин OprD беше изследвана чрез специализираното приложение PorinPredict, разработено специално за анализ *P. aeruginosa*. За изследването бяха използвани асемблирани геноми от всички налични изолати на *P. aeruginosa*.

При всички изолати бе установен 100% интегритет на промотора на гена *oprD*. Също така, бяха идентифицирани общо 5 различни варианта на гена, обозначени от *oprD*-1 до *oprD*-5 в съответствие с използваната от приложението номенклатура. При 9 от изолатите не бе открит съответстващ вариант в базата данни, поради което техния *oprD* беше категоризиран като „неопределен“.

От всички анализирани изолати, общо 74 бяха характеризирани с неактивен *oprD* ген. При 39 от тях инактивацията се дължеше на мутации с изместване рамката на четене, при 26 беше наличен преждевременен стоп кодон, а при 9 изолата генът беше прекъснат от инсерционен елемент (Фигура 16). Този резултат корелира с данните, получени от експресионния анализ и фенотипното изпитване на чувствителност към антимикробни агенти, подчертавайки важността на *oprD* за резистентността на *P. aeruginosa* към карбапенеми.



**Фигура 16.** Състояние на гена *oprD* при изолатите *P. aeruginosa*.

При 18 от изолатите беше открит интактен ген, като при 8 от тях се установиха мутации от тип "miss-sense" (вж. Таблица 18). След извършена литературна справка стана ясно, че мутацията S325F има потенциална връзка с повишаване на МИК на имипенем (Khoury et al. 2019). Тази мутация беше идентифицирана в изолат Paer3796A, за който преди това бе установено, че произвежда карбапенемаза IMP-84. Независимо от наличието на мутацията, целостта на *oprD* в Paer3796A остава непокътната, което подсказва за наличието на функционален *oprD* протеин. За останалите 2 мутации (G316D и Q164K) не беше открита информация в наличната към момента литература.

Таблица 18. OprD варианти с miss-sense мутации

Изолат	OprD вариант на база аминокиселинн	Интегритет на OprD на база аминокиселинна последователност	Missense/no nsense мутации	Ефект
Paer3796A	OprD_5	Интактен с missense мутация	S325F	Потенцил за повишаване МПК на имипенем (Khoury et al., 2019)
Paer3858	OprD_5	Интактен с missense мутация	G316D	Неизвестен
Paer3859	OprD_2	Интактен с missense мутация	Q164K	Неизвестен
Paer4070	OprD_5	Интактен с missense мутация	G316D	Неизвестен
Paer4574	OprD_5	Интактен с missense мутация	G316D	Неизвестен
Paer4575	OprD_5	Интактен с missense мутация	G316D	Неизвестен
Paer4686	OprD_5	Интактен с missense мутация	G316D	Неизвестен
Paer4687	OprD_2	Интактен с missense мутация	Q164K	Неизвестен

#### 4.12.5. Плазмиден анализ

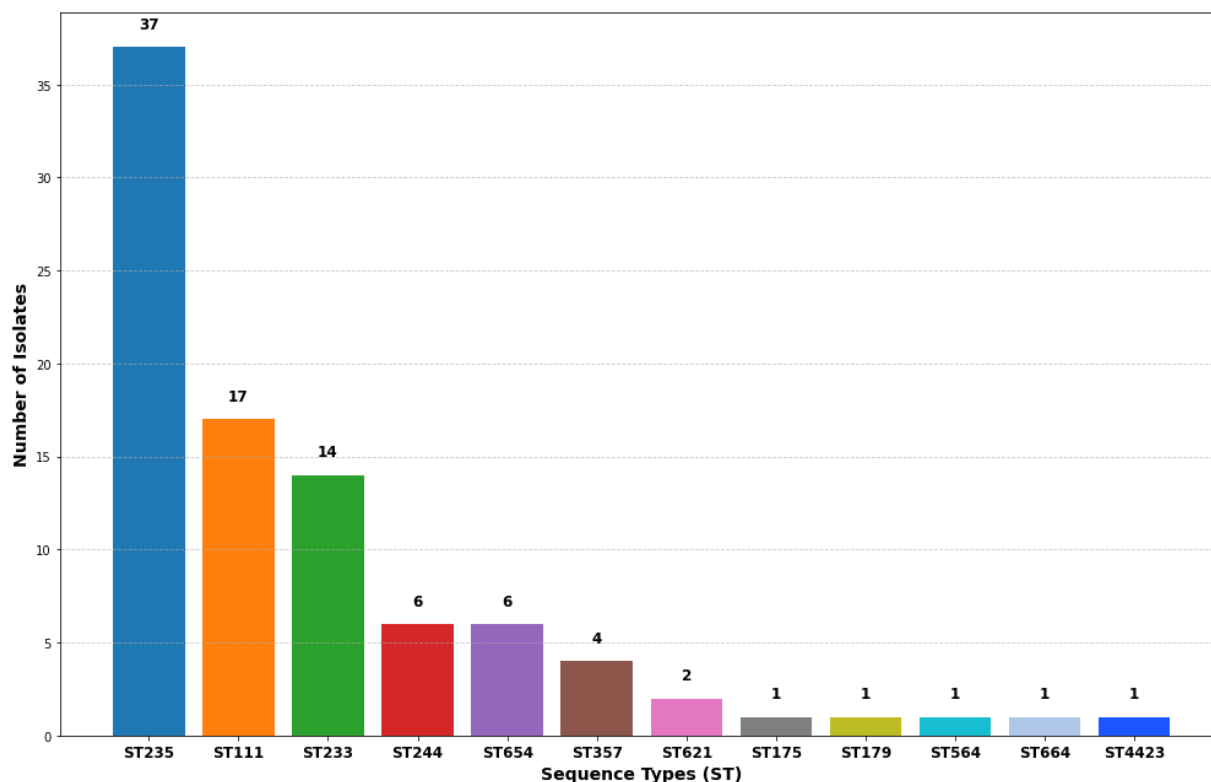
Първоначалният плазмиден анализ беше извършен, посредством Abriicate, използвайки базата данни PlasmidFinder. Характерното за тази база данни е, че съдържа предимно плазмидни репликони срещани главно при *Enterobacteriales*. Малка част от тези репликони се срещат и при *Pseudomonas*. Въпреки това, в резултат от анализа не бяха открити репликони, съответстващи на тези от базата данни, при нито един от изолатите. Поради неудовлетворителните резултати беше решено да се използват други два софтуерни пакета - Mob-suite и plaSquid.

Сред изолатите бяха идентифицирани общо три вида плазмидни репликони - IncP-2 (n=22), IncP-9 (n=1) и IncN (n=3). Плазмидите IncP-9 и IncP-2 често се асоциират с катаболизма на нафталин и други ароматни въглеводороди (Tatyana Yu Izmalkova et al. 2006). IncN плазмиди са открити в клинични проби и такива от различни животински гостоприемници. Те се асоциират по-често с резистентност към карбапенеми и цефалоспорици от трето поколение при щамове *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* и *E. coli* (Poirel, Bonnin, and Nordmann 2011). Секвенциите, съдържащи, плазмидни репликони бяха проверени за наличие на детерминанти на резистентност и вирулентност, но такива не бяха открити.

Плазмидните репликони IncP-7, IncP-10 и pMOS94-like, засечени по-рано с PCR, не бяха детектирани от използваните приложения. С цел изключване на възможността за фалшиво-положителни резултати от PCR панела, секвенциите на праймерните двойки бяха наложени и подравнени спрямо геномите на съответните изолати. Този подход успешно идентифицира и потвърди и трите репликаона.

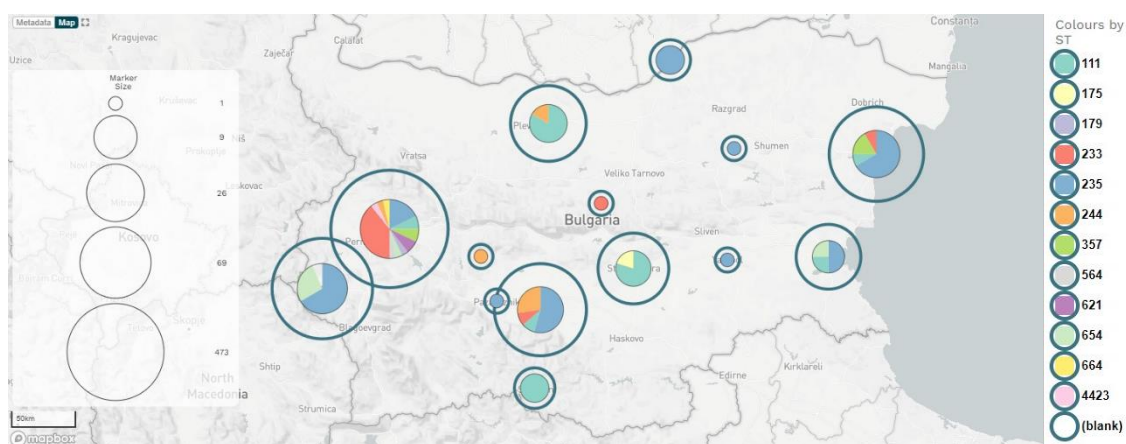
#### ***4.12.6. Резултати от MLST и cgMLST типизирането на изолати P. aeruginosa***

В изследваната извадка от 92 изолати *P.aeruginosa* бяха детектирани и потвърдени общо 12 секвенционни типа: ST111, ST175, ST179, ST233, ST235, ST244, ST357, ST564, ST621, ST654, ST664, ST4423 (Фигура 17).



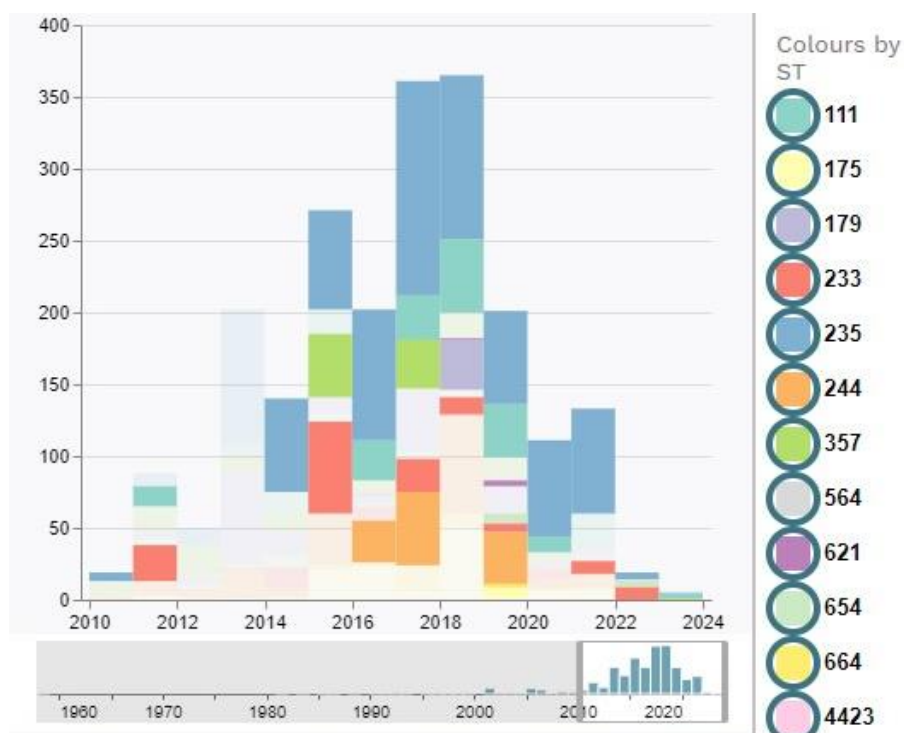
**Фигура 17.** Разпределение на изолатите по секвенционни типове.

Седем от най-разпространените високорискови клонове (ST235, ST233, ST111, ST244, ST357, ST175, ST654) в света бяха детектирани и в България. Разпределението на секвенционните типове в страната е представено на Фигура 18.



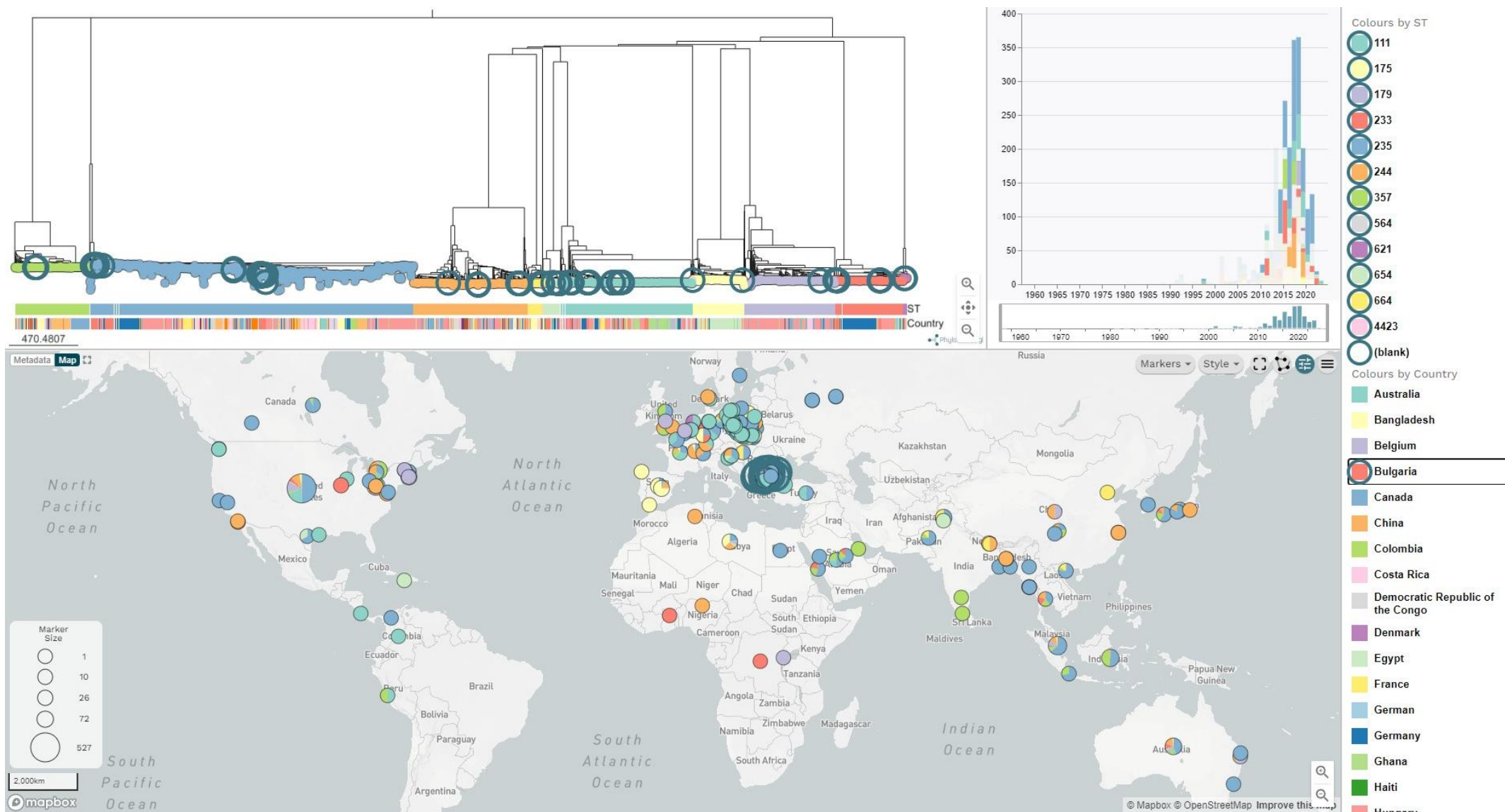
**Фигура 18.** Разпределение на MLST типове по градове.

Сред първоначално установените клонове в България са ST235, ST111 и ST233. Те са също най-разпространени и устойчиви през целия изследван период (2010–2023 г.) (виж Фигура 19).



**Фигура 19.** MLST типове спрямо анализирания период (2010–2023г.).

Въз основа на детектираните секвенционни типове бяха изтеглени 2470 генома от базата данни на PathogenWatch и беше извършен сравнителен филогенетичен и филогеографски анализ, базиран на cgMLST и включващ 3876 SNP локуса (Фигура 20).



**Фигура 20.** Сравнителен филогенетичен и филогеографски анализ спрямо колекция от 2470 изолата от цял свят базиран на cgMLST включващ 3876 SNP локуса.

ST235 е асоцииран с продукцията на разнообразни  $\beta$ -лактамази (от клас А и клас Б) и проявена силна вирулентност, предимно свързана с продукцията на T3SS ефектора *exoU*. Съобщава се за повишена смъртност при пациенти с инфекции на кръвта предизвикани от този клон (del Barrio-Tofiño, López-Causapé, and Oliver 2020). Един единствен изолат (Paer3143) от този секвенционен тип беше продуцент на карбапенемаза и беше единственият носител на VIM-1 сред изолатите *P. aeruginosa* в изследваната извадка. При cgMLST анализа българските изолати от ST235 бяха разпределени в общо 4 клъстера с представители от 9 града. Първият изолат от този тип датираше от 2010 година, а клонът успешно се разпространява и персистира в цялата страна до ден днешен (Фигура 21).

Продуцентите на карбапенемази, принадлежащи към ST111, бяха разпределени в два клъстера. В групата от изолати с този секвенционен тип бяха детектирани два различни вида карбапенемази – VIM-2 и VIM-5. Продуцентите на VIM-2 бяха групирани в един клъстер, включващ представители от Плевен (n=5) и София (n=2). В същото време, единственият продуцент на VIM-5 беше поместен в друг клъстер, съдържащ само един представител от Стара Загора, изолиран през 2011 г. (Фигура 22).

При анализа на изолатите от ST233 установихме наличието на три различни карбапенемази - VIM-2, VIM-4 и IMP-100. Карбапенемазните продуценти бяха разпределени в два клъстера с представители от четири града. Единият клъстер се характеризираше с преобладаващо носителство на VIM-4, докато другият - на VIM-2. При един от продуцентите на VIM-4 (Paer4782МК) беше детектирана новооткритата карбапенемаза IMP-100. Първият изолат с VIM-2 датира от 2011г, а през 2015 се появява първият с VIM-5. IMP-100 беше детектиран едва наскоро през 2023г. в София (Фигура 23).

При биоинформатичния анализ на гените за резистентност бяха детектирани още два продуцента на IMP карбапенемазата - Paer3541 (IMP-13) и Paer3796A (IMP-84). Тези изолати бяха класифицирани като ST621, епидемичен клон, известен с носителство на гена *bla<sub>IMP</sub>* и разпространение на фосфолипазата *pldA* (T6SS ефектор) (Boulant et al. 2018). Този ефектор е свързан със системата за секреция H2 тип VI (H2-T6SS) и участва в бактериалната ендоцитоза (Russell et al. 2013).

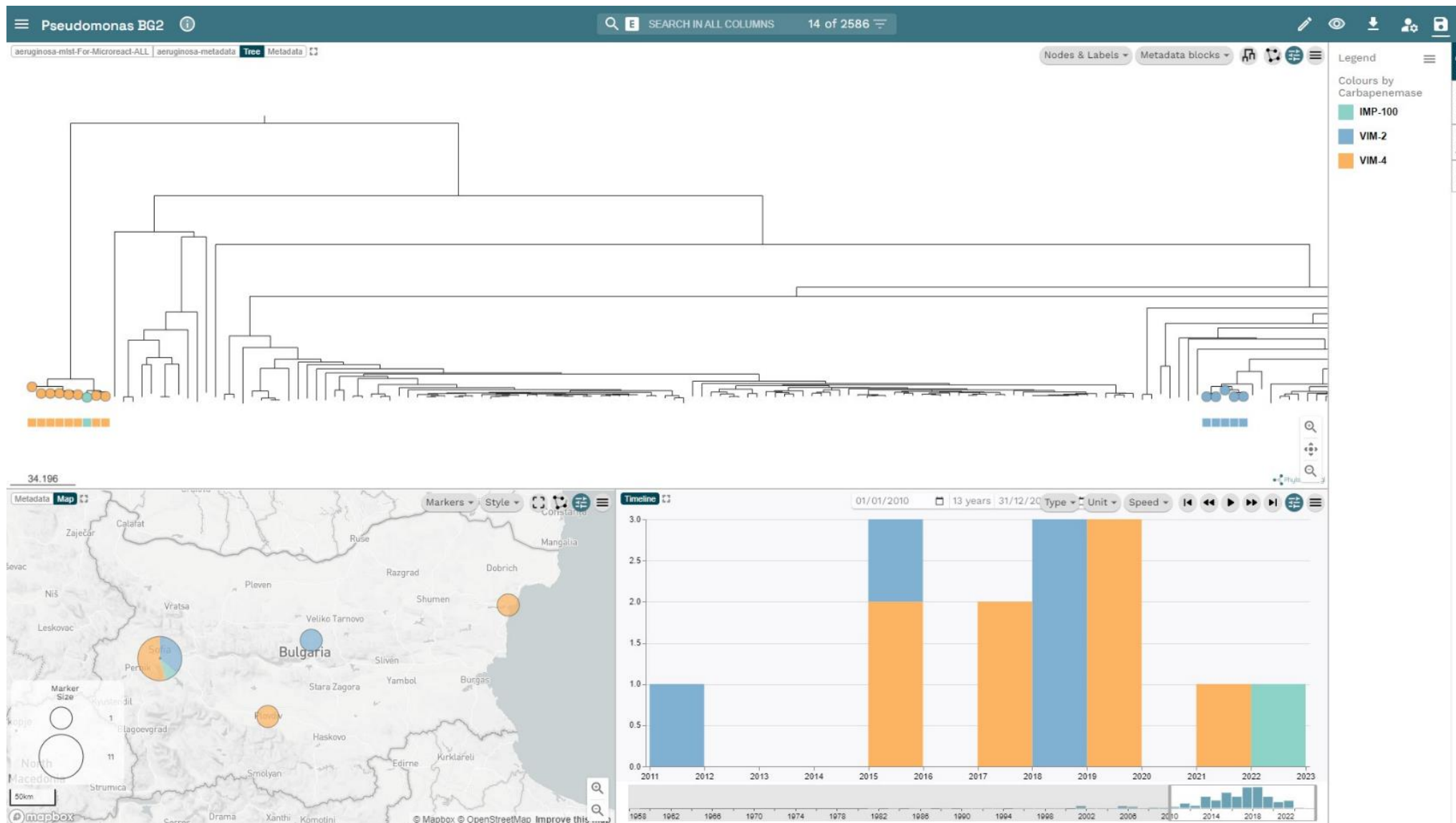




**Фигура 21.** Визуализация на изолатите от изследваната извадка, принадлежащи към клон ST235, използвайки резултатите от cgMLST метода.



Фигура 22. Секвенционен тип ST111, асоцииран с VIM-5 и VIM-2 карбапенемази.



**Фигура 23.** Асоциация на ST233 с 3 вида карбапенемази – VIM-2, VIM-4 и новооткритата IMP-100.

Още един секвенционен тип от изследваната извадка, а именно ST654, беше асоцииран с наличие на карбапенемази. Този секвенционен тип е идентифициран в региони като Южна Америка, Европа и Азия и често е свързан с носителство на различни метало- $\beta$ -лактамази (del Barrio-Tofiño, López-Causapé, and Oliver 2020). В нашето изследване открихме 6 изолата с този секвенционен тип, от които 5 бяха носители на NDM-1 (Кюстендил и Бургас), а един - на VIM-2 (София). При cgMLST анализа беше установена висока степен на сходство между изолатите, носещи NDM-1, което подчертава тяхната потенциална епидемиологична връзка (Фигура 24).

Наличието на установените високорискови ST в страната отразява глобалната тенденция за разпространение и персистиране на мултирезистентни клонове, което изисква задълбочено наблюдение и усилия за управление на антибиотиците и на антибиотичните политики.



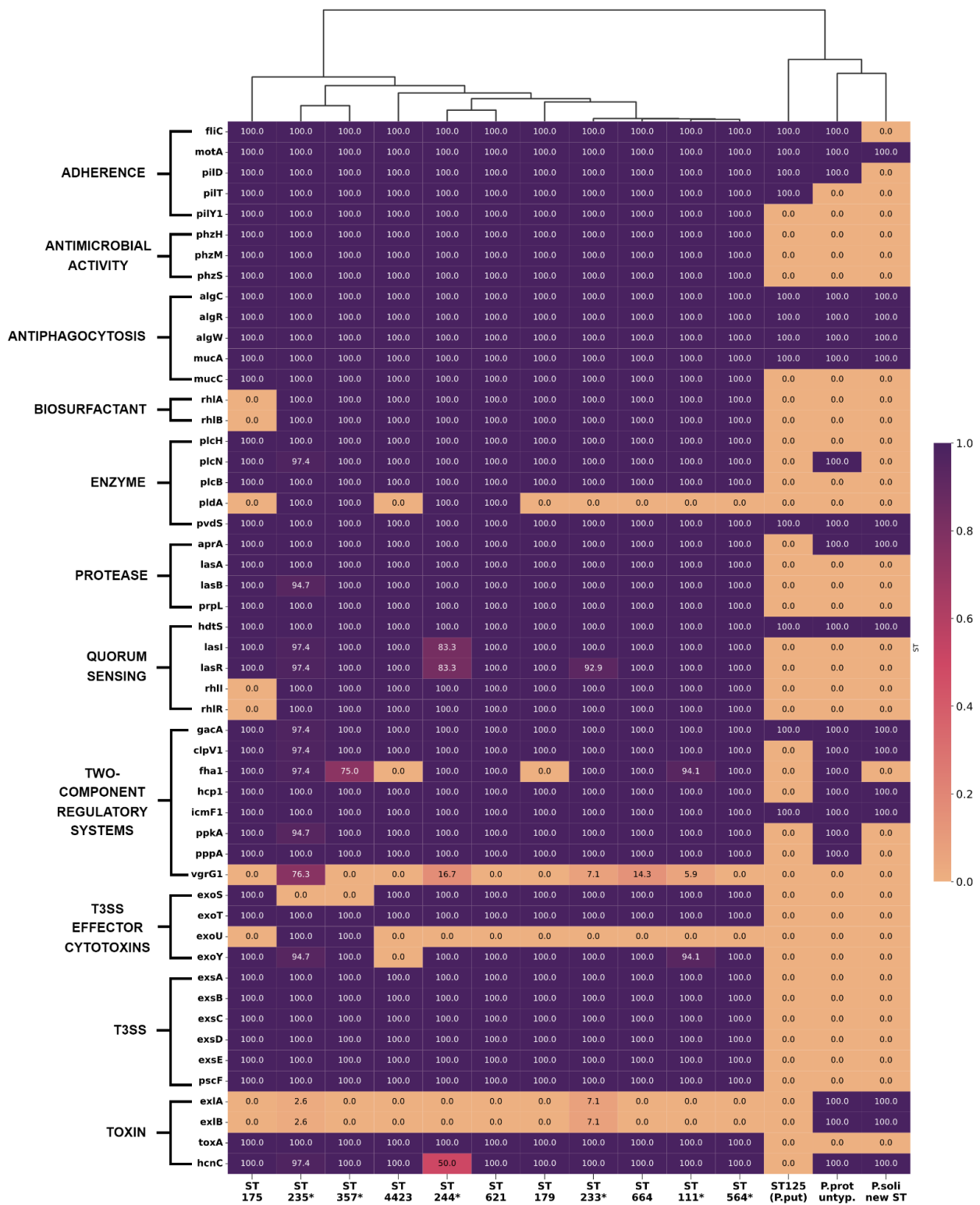
Фигура 24. Секвенционен тип ST654, асоцииран с NDM-1 и VIM-2.

#### **4.12.7. Определяне на детерминантите на вирулентност**

Анализът на вирулентните фактори беше извършен посредством Abricate и VFAnalyzer, използвайки базата данни Virulence Factor Database (VFDB). Използван беше пълният набор от налични вирулентни фактори (~30 000) в тази база данни. Поради голямото разнообразие от открити вирулентни фактори, те бяха разглеждани на ниво секвенционен тип (Фигура 25).

При всички типове се наблюдаваха фактори на вирулентност, свързани с адхезията и подвижността, включително флагелуми, биосинтез на пили от тип IV и “twitching motility”. Гените за биосинтез на алгинат, известни с това, че подпомагат устойчивостта на бактериите срещу суровите условия и имунните реакции на гостоприемника (Franklin et al. 2011), бяха открити във всички изолати. Фосфолипаза C и хемолитичната *plcH* (Vasil et al. 2009) бяха идентифицирани при всички секвенционни типове, докато фосфолидаза D беше детектирана само при някои от високорисковите клонове като ST235, ST357, ST621, ST244. Допълнителни фактори на вирулентност, включително алкална протеаза (AprA), еластаза (LasA и LasB), протеаза IV (PrpL) и екзотоксин A (ToxA), както и компоненти на кворум-сенсинга като ацилхомосерин лактон синтаза (HdtS), транскрипционни фактори (LasI, RhlI) и рецептори (LasR, RhlR), както и двукомпонентната система GacS/GacA бяха открити при всички типове. Оперонът за биосинтез на рамнолипиди *rhl*, свързан с проникването в клетките на гостоприемника и образуването на биофилм (McClure and Schiller 1996; Zulianello et al. 2006), също присъства в изследваната извадка (с изключение на изолатите с ST175). Ефекторите на T3SS, включително *exoS*, *exoT* и *exoY*, участващи в манипулирането на сигналните пътища на клетките-гостоприемници и имунните отговори, както и гените на T3SS, с малки изключения, бяха налични при изолати от всички секвенционни типове, което показва наличието на функционален механизъм на T3SS, способен да доставя ефекторни молекули в клетките-гостоприемници. При ST4423 не беше установено наличие на *exoY*, но този секвенционен тип беше представен от един единствен изolat, поради което не могат да бъдат извлечени изводи за целия клон. При ST357 и ST235 беше установено наличие на *ExoU*. *ExoU* и *ExoS* са взаимноизключващи се T3SS ефектори, като *ExoS* води до забавена апоптотична клетъчна смърт, докато *ExoU* предизвиква бърз лизис на

клетките на гостоприемника (Hauser 2009). Всички изолати бяха носители на оперона на циановодорода (HcpABC) - силно токсично съединение, за което е известно, че нарушава клетъчните процеси и влияе на аеробното дишане (Ryall et al. 2008). При изолат Paer4782МК беше открит генът *katG*, участващ в защитата от оксидативен стрес (Manca et al. 1999). Той беше локализиран върху плазмид (p4782-IMP), носител на новия IMP-100.



Фигура 25. Разпедение на вирулентните фактори спрямо STs.



#### **4.12.8. Характеристика на IMP-продуциращите *P. aeruginosa* и поява на IMP-100, нов плазмиден вариант, съществуващ в комбинация с хромозомен VIM-4**

След извършен пълен фенотипен и геномен анализ на три клинични изолата *P. aeruginosa* беше устаовено наличието на 3 различни варианта на IMP карбапенемаза. Трите щама (Paer3541, Paer3796A и Paer4782МК), са изолирани в София, България, между 2018 и 2022 г. Paer3541 е изолиран от гърлен секрет на хоспитализиран пациент, Paer3796A - от урина на лице в амбулаторни условия, а Paer4782МК - от кръвна култура на пациент с остра миелоидна левкемия. В последния беше установено наличието на нов вариант на IMP карбапенемазата, който след депозиране в GenBank беше официално обозначен като IMP-100 ([OR004774](#)). Този вариант беше разположен на мултирезистентен плазмид, който нарекохме p4782-IMP ([NZ\\_OX638703](#)), и беше съвместно съществуващ с хромозомно кодиран ген *bla<sub>VIM-4</sub>*. Доколкото ни е известно, това е първото проучване, което документира наличието на карбапенемаза от типа IMP в клинични изолати на *P. aeruginosa* в България.

##### **4.12.8.1. Изследване на антимикробна чувствителност към всички налични за лечение препарати и скрининг за детерминанти на резистентност**

Изследването на антимикробната чувствителност показва разнообразни профили на резистентност сред трите изолата. Paer4782МК показва високо ниво на резистентност към множество класове антибиотици, включително аминогликозиди, флуорохинолони и всички  $\beta$ -лактами, с изключение на азтреонам, което е в съответствие с XDR фенотипа. Paer3541 демонстрира резистентност към цефалоспорини и флуорохинолони, но остана чувствителен към карбапенеми и аминогликозиди (с изключение на тобрамицин). Paer3796A показва резистентност към всички тествани цефалоспорини, карбапенеми (с изключение на имипенем/релебактам), флуорохинолони (с изключение на левофлоксацин) и аминогликозиди (с изключение на амикацин). И трите щама бяха чувствителни към колистин. Два от тях (Paer4782МК и Paer3796) проявиха резистентност към цефидерокол. AST профилите на трите изолата *P. aeruginosa* са

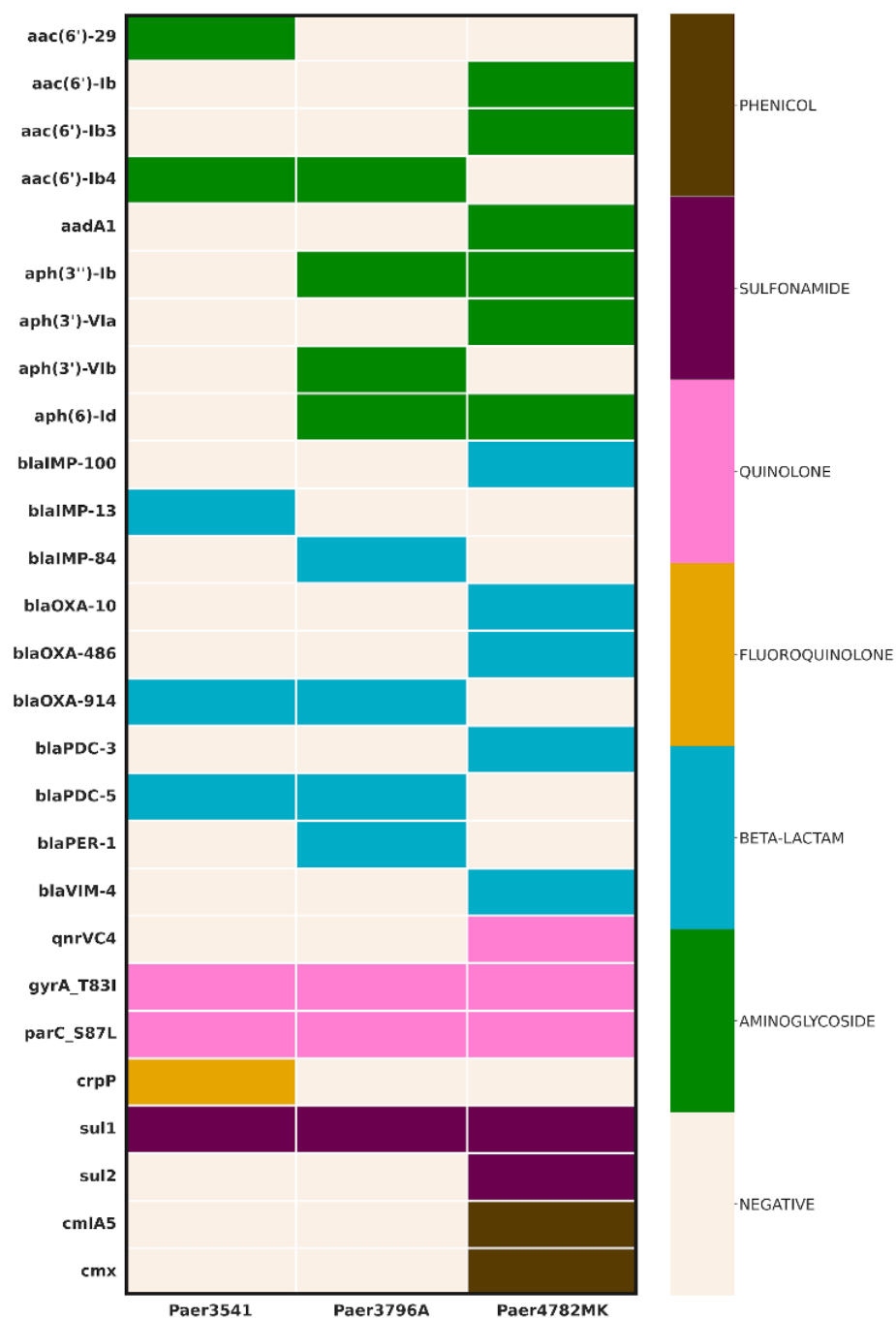
представени на Таблица 19.

**Таблица 19.** Чувствителност към антимикробни препарати на продуцентите на IMP

Antimicrobials	MIC (µg/ml)					
	Paer4782	SIR*	Paer3541	SIR	Paer3796A	SIR
Piperacillin	≥32	R	16	I	8	I
Piperacillin/tazobactam	64/4	R	16/4	I	8/4	I
Cefepime	≥8	R	≥8	R	≥8	R
Ceftazidime	≥32	R	≥32	R	≥32	R
Ceftazidime/Avibactam	≥8/4	R	≥8/4	R	≥8/4	R
Ceftolozane/tazobactam	≥8/4	R	≥8/4	R	≥8/4	R
Cefiderocol	4	R	0.25	S	8	R
Imipenem	≥8	R	1	I	4	I
Imipenem/relebactam**	≥32/4	R	0.75/4	S	1.5/4	S
Meropenem	≥16	R	0.5	S	≥16	R
Meropenem/Vaborbactam**	≥256/8	R	0.5/8	S	≥256/8	R
Doripenem**	≥32	R	2	I	≥32	R
Aztreonam	4	I	8	I	≥16	R
Trimethoprim/sulfamethoxazole	≥8/152	n/a	≥8/152	n/a	≥8/152	n/a
Amikacin	≥32	R	16	S	4	S
Tobramycin	≥32	R	16	R	8	R
Gentamicin	16	n/a	≥32	n/a	≥32	n/a
Ciprofloxacin	≥8	R	≥8	R	2	R
Levofloxacin	≥8	R	≥8	R	2	I
Fosfomycin	32	n/a	≥128	n/a	<16	n/a
Colistin	<1	S	<1	S	<1	S

\*SIR – Susceptible (S), Susceptible to increased exposure (I), Resistant (R);\*\* - gradient strip; n/a - not applicable

Скринингът за детерминанти на антимикробна резистентност разкри широк набор от гени (Фигура 26). Всички три изолата демонстрираха наличие на IMP карбапенемаза, като уникалният алел IMP-100 беше идентифициран в Paer4782МК върху плазмид от семейството pMOS94 (Pilato et al. 2019b). В допълнение, щамът Paer4782МК беше носител и на *bla<sub>VIM-4</sub>*. Други два близки хромозомни варианта на IMP, IMP-13 и IMP-84, бяха открити съответно в Paer3541 и Paer3796A. Присъстваха и допълнителни придобити β-лактамази с разширен спектър като PER-1 и множество генетични детерминанти, свързани с резистентност към повечето не-β-лактамни препарати.



**Фигура 26.** Анализ на детерминантите на резистентност на IMP продуцентите, базиран на данни от целогеномното секвениране.

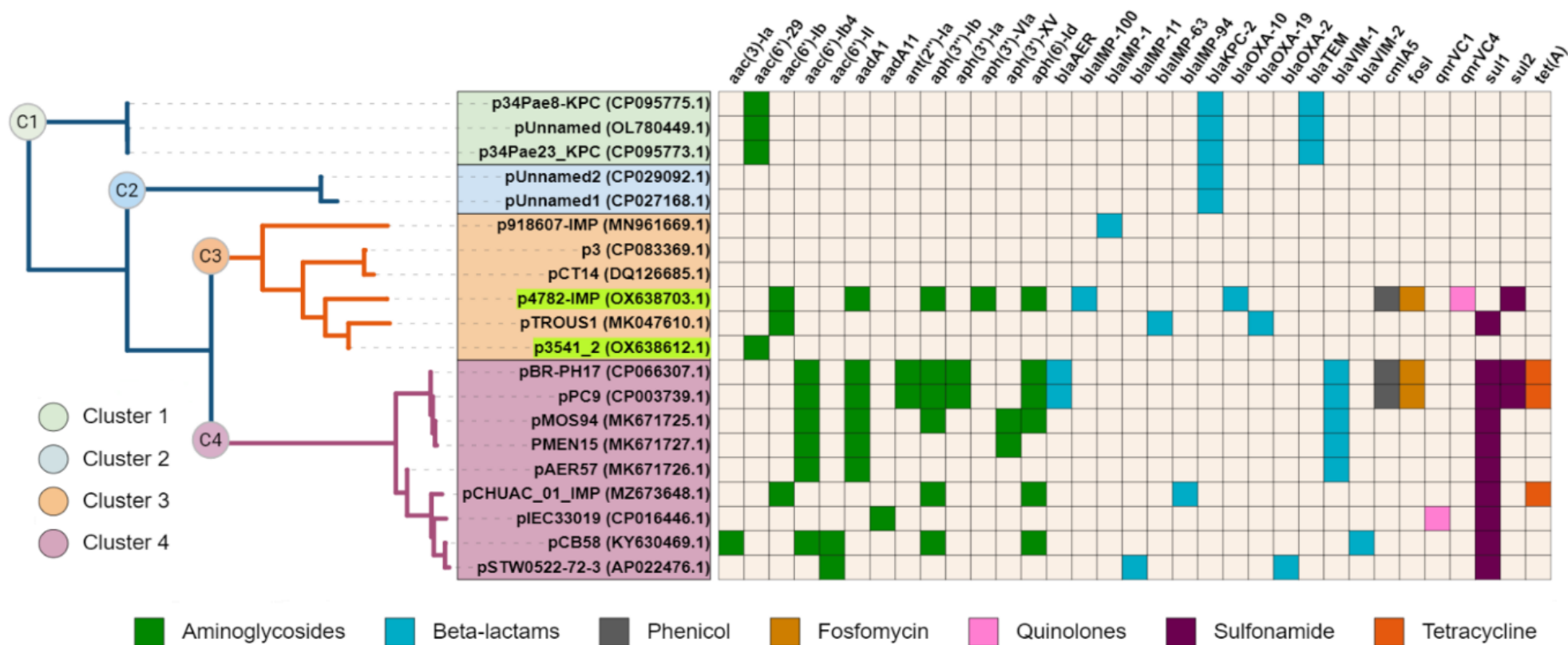
При анализа на гена *oprD* беше установено, че и Paer3541, и Paer3796A притежават интактен порин. Въпреки че беше идентифицирана аминокиселинна замяна (S325F) в OprD на Paer3796A, протеинът беше функционален. За разлика от тях, в Paer4782MK беше наличен прекъснат *oprD* ген, чиято функция е потенциално нарушена. При нито

един от изолатите не бяха открити известни мутации, свързани със свръхекспресията на ефлукс или AmpC.

#### **4.12.8.2. Плазмиден анализ**

В Paer4782МК бяха идентифицирани два плазида - p4782-IMP (61.5 kb) и p4782\_002 (290.8 kb). Плазмид p4782-IMP ([OX638703.1](#)) беше родствено свързан с MOB<sub>F</sub> и MPF<sub>T</sub> семейството от типа на плазида pMOS94 и за наша изненада беше носител на новия алел *bla*<sub>IMP-100</sub> ([OR004774](#)), както и на други гени свързани с антибиотичната резистентност. Плазмид p4782\_002 ([OX638702.1](#)) беше нетипируем и не притежаваше нито детерминанти на резистентност, нито на вирулентност; поради това той не беше разглеждан допълнително. В Paer3541, бяха открити два плазида - p3541\_1 (179.3 kb, [OX638611.1](#)) и p3541\_2 (41.5 kb, [OX638612.1](#)). Подобно на p4782-IMP, плазмидът p3541\_2 беше от тип MOB<sub>F</sub> и MPF<sub>T</sub> и беше установено, че съдържа един единствен ген за резистентност (*aac*(6')-29), кодиращ аминокликозид ацетилтрансфераза. Плазмидът p3541\_1 имаше неизвестни MOB и MPF типове, подобно на p4782\_002. При Paer3796А беше идентифициран само един плазмид p3796А (178.5 kb, [OX638565.1](#)) също с неизвестни MOB и MPF типове, който не носеше никакви детерминанти за резистентност или вирулентност.

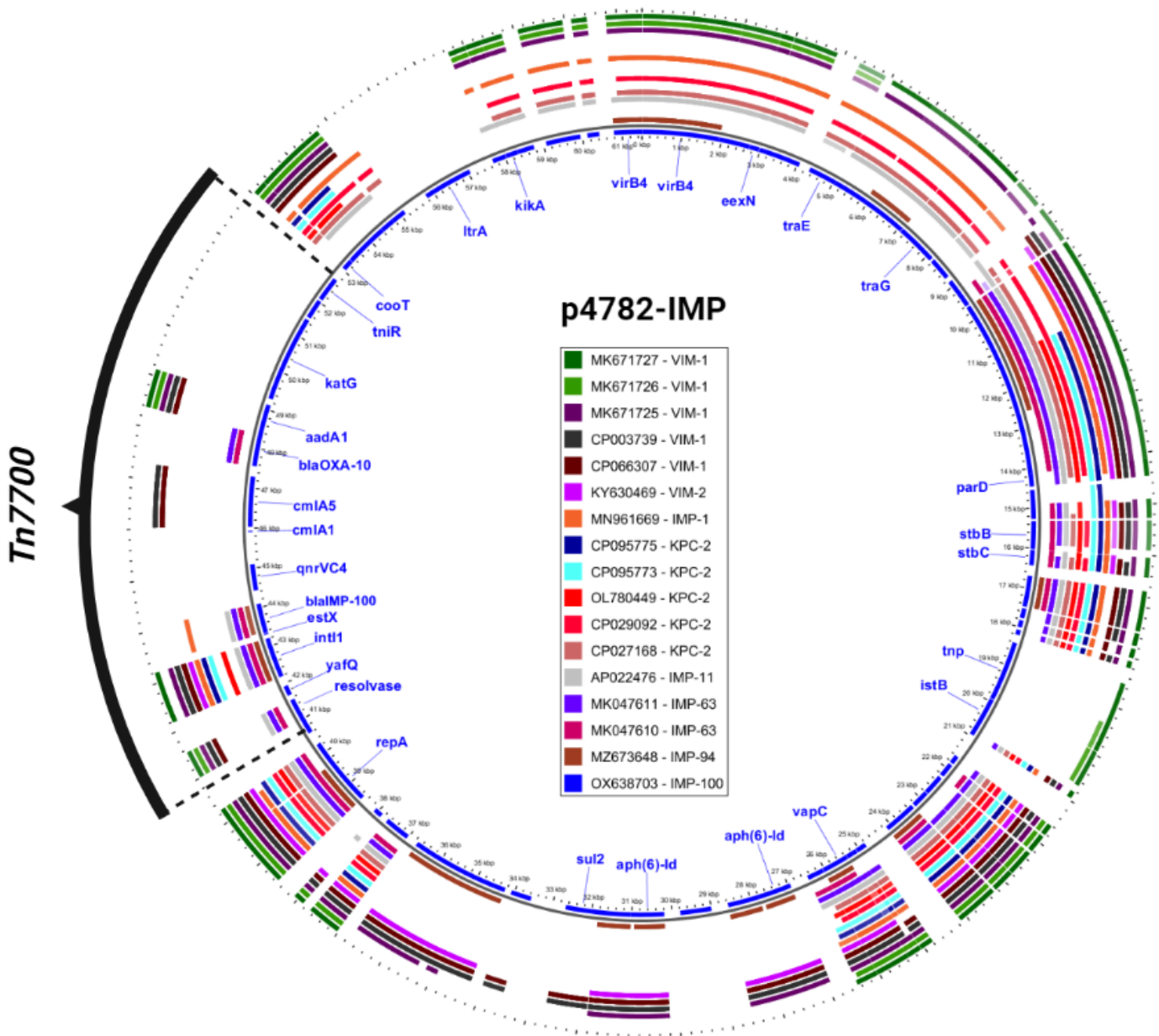
Извършено беше BLAST търсене в базата данни nr/nt на NCBI, включващо цялата секвенция на плазмидата p4782-IMP, след което беше конструирано дърво с най-близките плаزمиди (n = 19). Всички плазмиди бяха изследвани за наличие на гени за резистентност и резултатите бяха илюстрирани под формата на топлинна карта, асоциирана с филогенетичното дърво (фигура 27).



**Фигура 27.** Филогенетично дърво и топлинна карта с гените за резистентност. Плазмидите от настоящото изследване са отбелязани в зелено. Различните клъстери на дървото (C1 ÷ C4) са обозначени с различни цветове. Легендата на топлинната карта по-долу предоставя информация за антибиотичния клас на откритите гени. Дървото е генерирано по метода Neighbor-joining след търсене с NCBI BLAST с максимална разлика в секвенциите (Max Seq Difference score)  $\geq 0,75$ . Топлинната карта и дървото бяха визуализирани с iTOL 6.8 (<https://itol.embl.de/about.cgi>, достъпено на 25.07.2023 г.).

По време на анализа беше открито, че клъстер С1 съдържа три плазида с неизвестен МОВ тип, които кодират КРС ензими. Останалите клъстери С2-С4 включваха плазмиди от семействата МОВ<sub>F</sub> и МРФ<sub>T</sub>. С2 приличаше на плазмидите от С3, но за разлика от тях носеше само ензима КРС. Клъстерите С3 и С4 показаха сходство с плазмидите, подобни на рMOS94 (Pilato et al. 2019a). Интересно е, че С3 плазмидите бяха характеризирани с по-ниско съдържание на гени, свързани АМР, в сравнение с С4. Въпреки голямото изобилие на АМР гени, открити в плазмид р4782-IMP (подобно на плазмидите в С4 клъстера), той беше групиран в рамките на клъстера С3, където се намираха плазмидите, съдържащи по-малко детерминанти на резистентност.

Допълнително беше извършено детайлно сравнение между филогенетично най-близките плазмиди, съдържащи карбапенемаза, и р4782-IMP, като беше използван BLAST Atlas на сървъра Gview (<https://server.gview.ca>, достъпено на 25.07.2023). Анализът разкри специфична инсерция на транспозон в плазмидния гръбнак на семейството МОВ<sub>F</sub>/МРФ<sub>T</sub>, както е показано на Фигура 28. Този нов транспозон (Tn7700) беше носител на новия алел *bla*<sub>IMP-100</sub>, както и на множество АМР детерминанти, които обясняват нетипичното изобилие на гени за резистентност, наблюдавано в р4782-IMP.



**Фигура 28.** Сравнение на p4782-IMP с филогенетично най-близките плазмиди с карбапенемази. Най-вътрешното кръгч (синьо) е p4782-IMP. Само важните генни анотации са визуализирани в синия текст. Новият транспозон (Tn7700) е показан в черно.

### 4.12.8.3. Клонирание, трансформация и конюгация

В резултат от експериментите по клонирание и трансформация бяха успешно получени трансформантите PA01-p4782-IMP и *E. coli* NEB10-IMP-100. Изпитване на антимикробна чувствителност беше проведено както на реципиентите (PA01<sup>Rif<sup>R</sup></sup> и *E. coli* NEB10), така и върху трансформантите. Резултатите са представени на Таблица 20.

**Таблица 20.** Чувствителност към антимикробни препарати на получените трансформанти

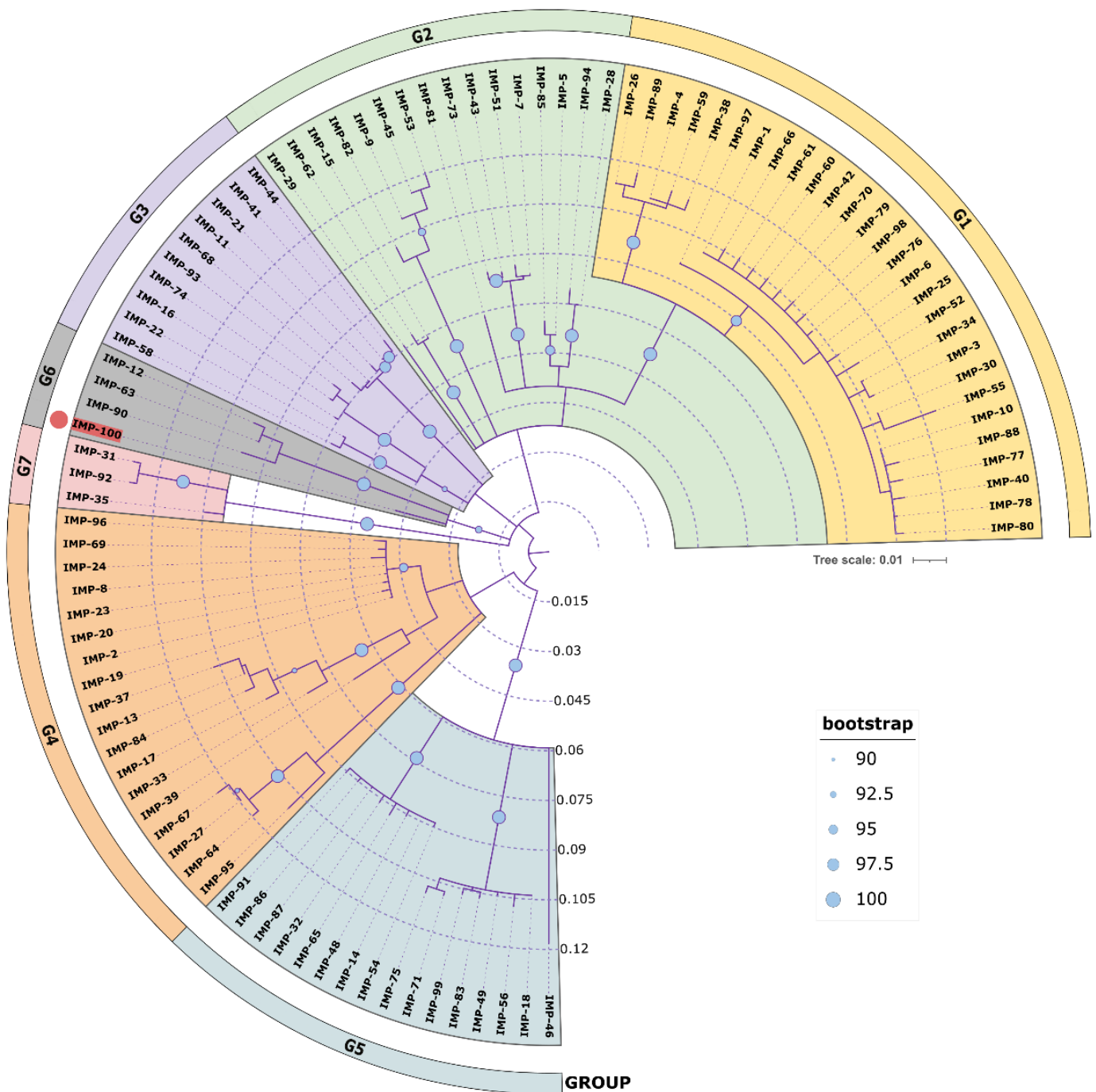
Antimicrobials	Donor Strain	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Paer4782	PA01	PA01-p4782-IMP	<i>E.coli</i> NEB10	<i>E.coli</i> NEB10-IMP-100
Piperacillin	≥32	<4	≥32	<4	4
Piperacillin/Tazobactam	64/4	1/4	64/4	<1/4	4/4
Cefepime	≥8	<1	≥8	<1	≥8
Ceftazidime	≥32	0.5	≥32	<0.25	≥32
Ceftazidime/Avibactam	≥8/4	<1/4	≥8/4	<1/4	≥8/4
Ceftolozane/Tazobactam	≥8/4	<1/4	≥8/4	<1/4	≥8/4
Cefiderocol	4	0.25	8	0.125	0.125
Imipenem	≥8	<1	≥8	<1	2
Imipenem/Relebactam*	≥32/4	0.25/4	8/4	0.125/4	2/4
Meropenem	≥16	<0.125	≥16	<0.125	2
Meropenem/Vaborbactam*	≥256/8	0.25/8	48/8	≤0.016/8	2/8
Doripenem*	≥32	0.1	≥32	0.08	6
Ertapenem*	n/a	n/a	n/a	0.023	6
Aztreonam	4	1	8	<1	<1
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≥8/152	1/19	1/19	<1/19	<1/19
Amikacin	≥32	<4	4	<4	<4
Tobramycin	≥32	<0.25	8	<0.25	0.5
Gentamicin	16	0.25	16	0.25	0.25
Ciprofloxacin	≥8	0.0625	1	<0.06	0.06
Levofloxacin	≥8	0.125	1	<0.125	<0.125
Fosfomycin	32	16	≥128	<16	<16
Colistin	<1	<1	<1	<1	<1



Въвеждането на целия p4782-IMP в PA01 увеличи МПК на имипенем най-малко осем пъти, а на меропенем най-малко 128 пъти. За сравнение, само генът *bla*<sub>IMP-100</sub> в *E. coli* NEB10-IMP-100 повиши МПК на имипенем поне 2 пъти, а на меропенем - поне 16 пъти. Въпреки че *in silico* анализът с mob-suite предсказа възможност за трансфер на MDR плазмидата, всички експерименти по конюгация бяха неуспешни както с *E. coli* NEB10, така и с PA01, въпреки многобройните опити и вариации на методиките.

#### **4.12.8.4. Филогения и анализ на генетичното обкръжение на *bla*<sub>IMP-100</sub>**

Филогенетичен анализ на всички варианти на IMP беше извършен чрез подравняване на протеиновите последователности и последващо изграждане на филогенетично дърво (Фигура 29). Групирането на алелите на IMP и маркирането на получените групи бяха извършени съгласно схема за групиране, предложена по-рано (X. Li et al. 2023). Към настоящия момент бяха регистрирани 95 алела, включително IMP-100. Новият алел IMP-100 попадна в клъстер G6, разкриващ най-голямо сходство с IMP-63, IMP-12 и IMP-90.



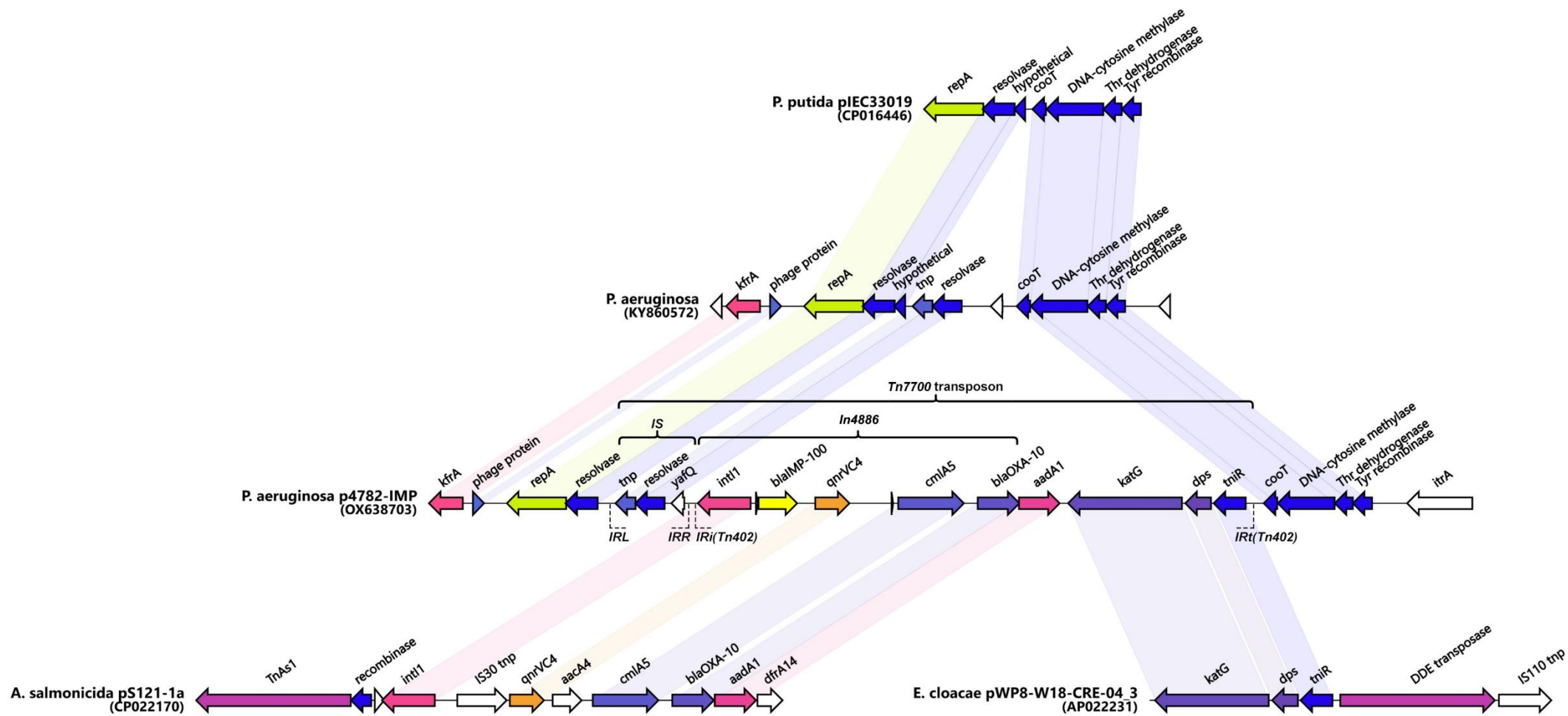
**Фигура 29.** Филогенетично дърво на всички налични варианти на IMP. Всички налични белтъчни секвенции на NCBI бяха изтеглени и подравнени с Muscle alignment 3.8.425 в Geneious Prime 2022, а филогенетичното дърво беше построено с Geneious Tree builder по модела на Jukes-Cantor и neighbor-joining метода с bootstrap 1000. Дървото беше визуализирано в iTOL 6.8 (<https://itol.embl.de/about.cgi>, достъпно на 25.07.2023 г.). Клъстерните групи G1 ÷ G7 са оцветени по различен начин в съответствие с Li et al., 2023, а новия алел IMP-100 е оцветен в червено с червена точка.

Генът *bla*<sub>IMP-100</sub> беше позициониран като първа касета под контрола на слаб промотор P<sub>cW+P2</sub> (Wei et al. 2011) в нова интегронна платформа от типа *Tn402-In1300* (регистрирана като *In4886*), и беше последван от касетите *qnrVC4*, *cmlA5* и *bla*<sub>OXA-10</sub> (Фигура 30).

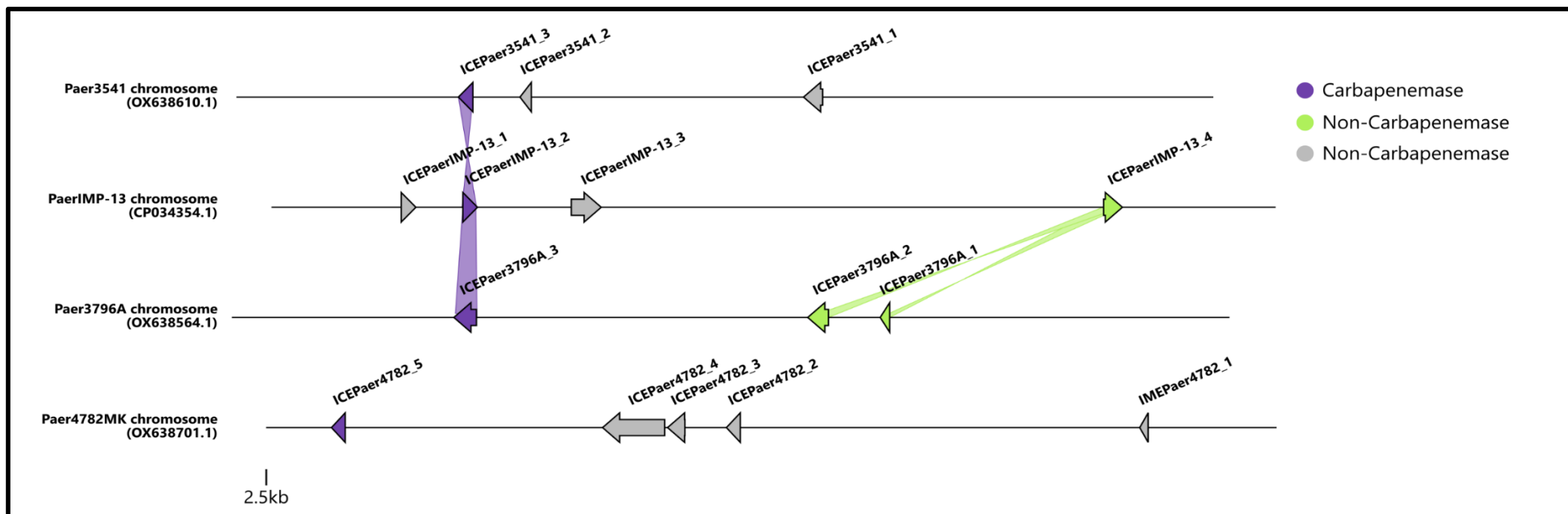
Подобен масив от касети (*In1300*) е докладван по-рано в MDR плазмида pS121-1a на *Aeromonas salmonicida* ([CP022170](#)). *In4886* беше предшестван от нов предполагаем инсерционен елемент, който тук беше обозначен като *IS4782*. Той беше фланкиран от несъвършени 25 bp инвертни повтори IRL (TGTCATTTTCAGAAGGCGACTGCAC) и IRR (TGTCATTTTCAGAAGACGACTGCAC), които много наподобяваха тези на *ISPa17* и *Tn402*. IRR също беше открит в далечния 3' край на интегрона *Tn402* (Фигура 30). *IS4782* съдържаше три гена: ген за токсин *yafQ*, предполагаема резолваза (188 AA) и къса транспозаза (128AA). Този предполагаем IS нямаше значими хомолози в базите данни ISFinder или TnCentral (Siguier et al. 2006; Ross et al. 2021). Търсенето с BLAST успя да открие осем идентични съвпадения (всички плазмидни, като едно от тях беше докладваният тук плазмид p3541\_2), които съвпадат само с гените за резолваза и транспозаза, но не и с цялия IS. Беше направена хипотеза, че този елемент е способен да се разпространява хоризонтално самостоятелно или заедно с интегрона *Tn402* поради това, че споделя едни и същи инвертни повтори. След това успяхме да идентифицираме и картографираме подобни мобилни елементи, за да открием хипотетичния произход на предполагаемия нов транспозон, регистриран като *Tn7700* (фигура 30). 5' краят най-много приличаше на комбинацията *tnp/resolvase*, открита в транспозон на *P. aeruginosa* от Чехия ([KY860572](#)) (Paragiannitsis et al. 2017), последван от носещия IMP-100 *In4886*, който беше силно подобен на този от MDR плазмид на *A. salmonicida* pS121-1a (Фигура 30). 3' краят на транспозона наподобяваше остатък от друг такъв, открит в плазмид на *Enterobacter cloacae* ([AP022231](#)), съдържащ *katG*, *dps* и *tniR*. Подобни структури са докладвани в повечето плазмиди, подобни на pMOS94, където *ISPa17* предшества интегроните *Tn402*, носещи карбапенемаза (Pilato et al. 2019a). Неотдавна беше предположено, че транспозазата *ISPa17* може да е способна да мобилизира съседни интегрони от тип *Tn402*, което води до образуване на различни транспозонни елементи (Papa-Ezdra et al. 2023). Транспозонът *Tn7700* имаше 5 bp директни повтори (AAAAC), разположени на разстояние до 26 bp от всеки IR, което, макар и малко вероятно, може да подсказва за минали събития на транспозиция. Накрая, открихме и вероятното място на

вмъкване на целия *Tn7700*, произхождащо от плазмид на *P. putida* от Бразилия ([CP016446](#)) (Souza et al. 2023).

При останалите два щама установихме, че IMP-13 (Paer3541) и IMP-84 (Paer3796A) са разположени хромозомно в интегрони от клас 1, вградени в транспозони, подобни на *Tn5051*, докато VIM-4 (при Paer4782MK) беше открит в интегрон, подобен на *In237*. Важно е да се отбележи, че всички тези MBL бяха компоненти на самопренасящи се интегративни конюгативни елементи от типа T4SS, което означава, че те са способни да се разпространяват чрез хоризонтален трансфер (Фигура 31). Накрая, всички предполагаеми нови мобилни генетични елементи бяха депозирани в съответните бази данни (ISFinder, TnRegistry и INTEGRALL) (Siguiet et al. 2006; Moura et al. 2009; Tansirichaiya, Rahman, and Roberts 2019).



**Фигура 30.** Генетично обкръжение на *bla*<sub>IMP-100</sub>. Изобразен е хипотетичният произход на новия трансозон Tn7700. Съвпадащите гени от различни източници са свързани и еднакво оцветени. Несъвпадащите гени (хипотетични протеини или не) са показани в бяло. Немаркираните гени са хипотетични. Фигурата е създадена с помощта на Clinker v0.0.28 (<https://github.com/gamcil/clinker>, достъпно на 25.07.2023 г.).



**Фигура 31.** Сравнение на хромозомните ICEs между изолатите от това проучване и референтния изолат PaerIMP-13 ([CP034354.1](#)). Лилавите ICE показват наличието на карбапенемазни гени, а зелените и сивите ICE - отсъствието им. Свързаните помежду си ICEs показват силно сходство.

## 5. Заключение

Дисертационният труд предоставя обширен анализ на антибиотичната резистентност и вирулентност на *Pseudomonas* spp. в български болници, обхващащ 100 клинични щама от различни градове, изолирани през последните 14 години. Сред тях, 93% бяха категоризирани като мултирезистентни, 4% - екстензивно резистентни и 3% - панрезистентни. Чувствителността на изолатите беше изпитана към 19 антимикуробни препарата, включително 5 от ново поколение. Наблюдавани бяха много високи нива на резистентност към  $\beta$ -лактами и флуорохинолони. По отношение на аминогликозидите, повечето изолати бяха резистентни на тобрамицин, а не малка част от тях бяха резистентни и на амикацин. Висока резистентност беше наблюдавана и към цефтолозан/тазобактам). С малки изключения, изолатите останаха чувствителни на колистин и цефидерокол. Цефидерокол е нов сидерофорен антибиотик, който все още не се употребява в България. Въпреки положените усилия, в настоящия труд механизмът на резистентност към него не беше открит. За доуточняване на този механизъм са планирани допълнителни експерименти базирани на сравнителен пан-транскриптомен анализ посредством RNA-Seq технологията.

Идентифицираните механизми, обуславящи резистентност, включваха голямо разнообразие от ензими и мутации. Открити бяха различни типове  $\beta$ -лактамази, включително CARB, GES, PER, VEB и TEM. Идентифицирани бяха 3 вида карбапенемази от клас В (VIM, NDM, IMP), като сред тях беше детектиран и охарактеризиран новооткрит вариант IMP-100.

При първоначалния PCR скрининг не бяха открити карбапенемази от типа IMP използвайки докладваните в литературата праймери. Тяхното наличие бе установено едва след целогеномното секвениране, което ни подтикна да търсим алтернативни праймери. В следствие след замяна на праймерите, при Paer4782МК успешно беше детектирана карбапенемазата IMP. След целогеномно секвениране и обстоен биоинформатичен анализ откритата находка се оказа нов, плазмидно медиран IMP алел, който след публикуване получи официалния номер - IMP-100.

Клас D бета-лактамазите бяха представени от семействата OXA-2, OXA-10 и OXA-50, сред които се доказаха деривати с разширен спектър (OXA-677, OXA-74 и OXA-226). Тези находки отварят възможности за бъдещи проучвания. Така например, наскоро китайски екип потвърди, че OXA-677 (дериват на OXA-10) се локализира в транспозон и е в състояние да хидролизира меропенем (субституция V117F), като в комбинация с нарушен пермеабилитет може да допринася значително за резистентността към карбапенеми.

Относно аминокликозидите, разнообразието на детерминантите включваше аминокликозид-ацетилтрансферази (AAC), аминокликозид-фосфорилтрансферази (APH) и аминокликозид-нуклеотидил трансферази (ANT), които се асоциираха с резистентност срещу различни аминокликозиди, сред които амикацин и тобрамицин. Забележително беше присъствието на редки ензими като 16S rRNA метилтрансферазата *rmtF2*, чиито генетично обкръжение предстои да бъде проучено.

По отношение на ензимно-медираната резистентност към хинолони, беше потвърдено присъствието на AAC(6')-Ib-cr5, проявяващ активност едновременно към амикацин, тобрамицин и ципрофлоксацин.

Сред голяма част от изолатите беше установена свръхекспресия на различни ефлуксни системи, включително MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN и MexXY-OprM. Повишената експресия на ефлуксните системи MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN показва силна корелация с резистентността към  $\beta$ -лактами и хинолони. Висока резистентност към аминокликозиди и хинолони беше наблюдавана при свръхпродуцентите на MexXY-OprM. От друга страна, намалена експресия на OprD беше наблюдавана при всички изследвани изолати, което до голяма степен обясни високата резистентност към карбапенеми. Свръхпроизводство на AmpC- $\beta$ -лактамазата беше установено при четири изолата, като те демонстрираха резистентност към цефалоспорини и пеницилини. Сред извадката имаше 6 изолата свръхпродуценти едновременно по 2 от изследваните гени. Обособени бяха общо 3 профила на комбинирана свръхекспресия - MexAB-OprM и MexXY-OprM (n=4); MexCD-OprJ и MexXY-OprM (n=1); AmpC и MexXY-OprM (n=1).



Детектирани бяха редица важни мутации свързани с резистентността към антимикробни препарати. При 2 изолата бяха открити мутации в пеницилин-свързващия протеин РВРЗ (*ftsI*), имащи отношение към карбапенемната резистентност. При един изолат свръхпродуцент на AmpC беше открита мутация в AmpR регулатора, с което беше обяснен механизмът на дерепресия. В допълнение, при него беше открита мутация в транскрипционния регулатор MexZ, имащ отношение към експресията на MexXY-OpгM, както и преждевременен стоп кодон в OpгD. При другите свръхпродуценти на AmpC не бяха открити мутации в регулаторните гени, което подчертава необходимостта от допълнителни изследвания за установяване на причината за дерепресия.

Мутациите в гените *gyrA* и *parC* кодиращи топоизомерази са често срещан механизъм на резистентност към хинолони и бяха открити в голяма част от изолатите, което корелираше с наблюдаваното високо ниво на резистентност.

С цел изясняване способността за трансфер на резистентността към цефалоспорици и карбапенеми бяха изпитани различни варианти на *in vitro* конюгация и трансформация. Всички опити за конюгация бяха неуспешни, което беше предпоставка да се търси хромозомната локализация на гените, кодиращи карбапенемази. При всички изолати без продуцента на IMP-100, беше потвърдено наличието на карбапенемази в хромозомата посредством рестриктазен анализ с I-Seu I и последващата хибридизация, което обясни неуспешните опити за конюгация. Въпреки че новооткритият IMP вариант беше установен в pMOS94-подобен плазмид, чиято трансферабилност беше прогнозирана *in silico*, трансконюгант не бе получен. След справка в наличната литература стана ясно, че голяма част от pMOS94-подобните плаزمиди се характеризират с нарушен модул за трансфер (Pilato et al. 2019a).

В резултат от целогеномния анализ при някои изолати бяха открити VIM карбапенемази, локализирани в интегративни конюгативни елементи (ICE), което е предпоставка за техния потенциален хоризонтален генен трансфер.

Висока продукция на биофилм и повечето известни вирулентни фактори бяха открити при голяма част от изолатите. Потвърдена беше асоциацията на вирулентни фактори като фосфолипаза D с високорискови международни епидемични клонове като

ST235, ST357, ST621, ST244. При два от тях, ST357 и ST235, беше установено също и наличие на EhoU, подчертавайки техния висок патогенен потенциал (Hauser 2009).

За първи път в страната беше проучен резистома и вирулома на редки или погрешно идентифицирани в миналото видове като *P. soli* и *P. protegens*, чиято роля като болнични патогени нараства през последните години.

В заключение, настоящия труд предоставя нови мащабни данни за геномните характеристики, асоциирани с мултирезистентния фенотип на разнообразни български клинични изолати *Pseudomonas* spp. изолирани за 14 годишен период. Предвид нарастващата антибиотична резистентност в глобален мащаб, липсата на нови препарати, както и проблема със злоупотребата с наличните средства, считаме, че дисертацията в бъдеще ще е обект на интерес от разнообразен кръг специалисти.

## 6. Изводи

1. За проучения 14-годишен период се установява, че *Pseudomonas spp.* придобиват все по-голямо клинично значение в България, с повсеместно разпространение на всиоко-рискови международни епидемични клонове и експресирайки все по-значителен арсенал от гени за резистентност и вирулентност.
2. Преобладаващата част от гените кодиращи карбапенемази при *Pseudomonas spp.* се откриват в хромозомни мобилни генетични елементи, повечето локализиращи в интегративни конюгативни елементи (ICE) с потенциал за хоризонтален генетичен трансфер.
3. Появата на IMP-карбапенемази асоциирани с плазмиди през последните 5 години в България, би могла да доведе до бързото им разпространение в бъдеще.
4. Клиничните изолати *P. aeruginosa* се характеризират с множество и разнообразни фактори на вирулентност класифициращи се във всички познати категории, като 85% показва умерена до силна продукция на биофилм.
5. Въпреки бурното развитие през последните години на схемите за класифициране и типизиране на плазмиди, по-голямата част от плазмидите при *Pseudomonas spp.* все още не могат да бъдат отнесени към познатите плазмидни семейства.
6. Поради значителния размер на генома (> 6 Mb) и наличието на множество повтори, за детайлно охарактеризиране на мобилома при *Pseudomonas spp.*, е необходимо извършване на дълговерижно секвениране от трето поколение.

## 7. Приноси

### Приноси с оригинален характер

1. Проведено е първото в страната геномно проучване върху колекция от клинични мултирезистентни щамове *Pseudomonas* spp. (n=100) за период от 14 години (2010-2023г)
2. Открит е нов генетичен вариант на карбапенемаза IMP-100, асоцииран с новооткритите мобилни генетични елементи - интегрон *In4886* и транспозон *Tn7700* локализирани в нов плазмид p4782-IMP от семейство pMOS-94
3. За първи в България се доказват щамове *P. aeruginosa* резистентни на цефидерокол и е доказана плазмидно медирана резистентност
4. Разработена е нова схема за PCR-базирано репликационно типизиране на 13 плазмидни семейства асоциирани с резистентност при *Pseudomonas* spp..
5. Секвенирани са 100 генома на мултирезистентни щамове *Pseudomonas* spp., от които 96 са депозирани в генбанката на NCBI.
6. Разработен е нов метод за екстракция на висококачествена РНК от *Pseudomonas* и други бактерии

### Приноси с научно-приложен характер

1. Изпитана е чувствителността към химиотерапевтици от последно поколение (меропенем/ваборбактам, цефтолозан/ тазобактам, цефтазидим/авибактам, имипенем/релебактам) и са доказани генетичните механизми на резистентност към тях
2. Установени са генетичните механизми на резистентност към беталактами, аминогликозиди и хинолони при изследваните *Pseudomonas* spp.
3. Установени са основните вирулентни фактори асоциирани с патогенезата на инфекции причинени от *Pseudomonas* spp. и е проучена степента на образуване на биофилм
4. На базата на cgMLST включващ 3876 SNP локуса е проведен мащабен сравнителен филогенетичен и филогеографски анализ на българските изолати спрямо колекция 2470 изолата от цял свят
5. Установени са плазмидните MOB-групи при българските MDR щамове

## ***Публикации свързани с дисертационния труд***

1. **Stoikov I.**, I. N. Ivanov, D. Donchev, D. Teneva, E. Dobрева, R. Hristova, S. Sabtcheva. Genomic characterization of IMP-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Bulgaria reveals the emergence of IMP-100, a novel plasmid-mediated variant coexisting with a chromosomal VIM-4. *Microorganisms* 2023, 11, 2270. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092270> **IF 4.5, Q2, H-INDEХ 66**
2. **Stoikov I.**, I. N. Ivanov, D. Doncheva, E. Dobрева, R. Hristova, S. Sabtcheva. High-quality RNA extraction from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria with a novel rapid and cost-effective method. *Biotechnol & Biotechnol Eq.* 37, 2023, 1, 223450. <https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2234502> **IF 1.67, Q3, H-INDEХ 48**
3. **Stoikov I.**, I. N. Ivanov, E. Dobрева, D. Donchev, S. Sabtcheva, R. Hristova. Development and pilot validation of a novel PCR-based replicon typing scheme for plasmid families associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. *Probl Inf Parasit Dis.* 51, 2023, 1, 37-45. **Q4, H-INDEХ 6**
4. Sabtcheva S., **I. Stoikov**, S. Georgieva, D. Donchev, E. Dobрева, I. N. Ivanov. Incidence and characterization of carbapenem resistance mediated by acquired beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Bulgarian cancer hospital. *Acta Microbiol Bulg.* 39, 2023, 4, 418-422. **Q4, H -INDEХ 3**

## Участия в научни форуми

- **Участие в международни научни форуми, по темата на дисертацията**
  1. Ivanov I. N., **I. Stoikov**, D. Donchev, E. Dobрева, R. Hristova, S. Sabtcheva. Emergence and genomic characterization of IMP-producing multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Bulgaria. FEMS 10th Congress of European Microbiologists, 9-13 July, 2023 Hamburg, Germany. M193 Poster.
- **Участие в национални научни форуми, по темата на дисертацията**
  2. **Стойков И.**, И. Н. Иванов, Е. Добрева, С. Събчева, К. Иванова, Р. Христова. Разработване и *in-silico* валидиране на PCR-базирана схема за плазмидно репликоново типизиране при *Pseudomonas* spp. XIX Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, 14-16 септември 2021, София. Сборник научни трудове, стр. 154-155, постер №37
  3. **Стойков И.**, И. Н. Иванов, С. Лозенов, Р. Христова, Д. Дончев, Е. Добрева, С. Събчева. Оценка на Colispot теста като лесен за изпълнение, рентабилен скринингов инструмент за откриване на устойчиви на полимиксини *Enterobacterales* и *Pseudomonas aeruginosa*. XX Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, 16-18 септември 2022, Пловдив. Сборник научни трудове, стр. 25-27, доклад.
  4. I. Ivanov I. N., **I. Stoikov**, D. Donchev, E. Dobрева, R. Hristova, S. LozenovR., S. Sabtcheva. Characterization of cefiderocol resistance in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* by whole genome sequencing – preliminary results. XV Национален конгрес на българските микробиолози с международно участие, 5-8 октомври 2022, Копривщица. (Доклад)
  5. **Стойков И.**, И. Н. Иванов, Д. Дончев, Е. Добрева, Р. Христова, С. Събчева. Поява и геномна характеристика на мултирезистентни IMP-продуциращи *Pseudomonas asruginosa* в България. XXI Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, 29.09.2023 - 01.10.2023, Пловдив. Сборник научни трудове, стр. 14-16, доклад.

# Библиография

1. Alvarez-Arevalo, Maria, Eva Baggesgaard Sterndorff, David Faurdal, Tue Sparholt Jørgensen, Anna Sophie Mourched, Oliwia Vuksanovic, Subhasish Saha, and Tilmann Weber. 2022. "Extraction and Oxford Nanopore Sequencing of Genomic DNA from Filamentous Actinobacteria." *STAR Protocols* 4 (1). <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2022.101955>.
2. Bahl, Martin Iain, Mette Burmølle, Annelein Meisner, Lars Hestbjerg Hansen, and Søren J. Sørensen. 2009. "All IncP-1 Plasmid Subgroups, Including the Novel  $\epsilon$  Subgroup, Are Prevalent in the Influent of a Danish Wastewater Treatment Plant." *Plasmid* 62 (2): 134–39. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2009.05.004>.
3. Barrio-Tofiño, Ester Del, Carla López-Causapé, Gabriel Cabot, Alba Rivera, Natividad Benito, Concepción Segura, María Milagro Montero, et al. 2017. "Genomics and Susceptibility Profiles of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates from Spain." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (11). <https://doi.org/10.1128/AAC.01589-17>.
4. Barrio-Tofiño, Ester del, Carla López-Causapé, and Antonio Oliver. 2020. "Pseudomonas Aeruginosa Epidemic High-Risk Clones and Their Association with Horizontally-Acquired  $\beta$ -Lactamases: 2020 Update." *International Journal of Antimicrobial Agents* 56 (6): 106196. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106196>.
5. Barton, Bret M., Gordon P. Harding, and Anthony J. Zuccarelli. 1995. "A General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids." *Analytical Biochemistry* 226 (2): 235–40. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1995.1220>.
6. Biggel, Michael, Sophia Johler, Tim Roloff, Sarah Tschudin-Sutter, Stefano Bassetti, Martin Siegemund, Adrian Egli, Roger Stephan, and Helena M. B. Seth-Smith. 2023. "PorinPredict: In Silico Identification of OprD Loss from WGS Data for Improved Genotype-Phenotype Predictions of *P. Aeruginosa* Carbapenem Resistance." *Microbiology Spectrum* 11 (2). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.03588-22>.
7. Bolger, Anthony M., Marc Lohse, and Bjoern Usadel. 2014. "Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data." *Bioinformatics* 30 (15): 2114. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>.
8. Bortolaia, Valeria, Rolf S. Kaas, Etienne Ruppe, Marilyn C. Roberts, Stefan Schwarz, Vincent Cattoir, Alain Philippon, et al. 2020. "ResFinder 4.0 for Predictions of Phenotypes from Genotypes." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75 (12): 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA345>.
9. Boulant, Thibaud, Yves Marie Boudehen, Alain Filloux, Patrick Plesiat, Thierry Naas, and Laurent Dortet. 2018. "Higher Prevalence of PldA, a *Pseudomonas Aeruginosa* Trans-Kingdom H2-Type VI Secretion System Effector, in Clinical Isolates Responsible for Acute Infections and in Multidrug Resistant Strains." *Frontiers in Microbiology* 9 (March). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02578>.
10. Brown, Terry. 1993. "Southern Blotting." *Current Protocols in Molecular Biology* 21 (1): 2.9.1-2.9.20. <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB0209AS21>.
11. Cabot, Gabriel, Carla López-Causapé, Alain A. Ocampo-Sosa, Lea M. Sommer, María Ángeles Domínguez, Laura Zamorano, Carlos Juan, et al. 2016. "Deciphering the Resistome of the Widespread *Pseudomonas Aeruginosa* Sequence Type 175 International High-Risk Clone through Whole-Genome Sequencing." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (12): 7415. <https://doi.org/10.1128/AAC.01720-16>.
12. Cabot, Gabriel, Alain A. Ocampo-Sosa, Fe Tubau, María D. Macia, Cristina Rodríguez, Bartolomé Moya, Laura Zamorano, et al. 2011. "Overexpression of AmpC and Efflux Pumps in *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections: Prevalence and Impact on Resistance in a Spanish Multicenter Study." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (5): 1906. <https://doi.org/10.1128/AAC.01645-10>.
13. Carattoli, Alessandra, Alessia Bertini, Laura Villa, Vincenzo Falbo, Katie L. Hopkins, and E. John Threlfall. 2005. "Identification of Plasmids by PCR-Based Replicon Typing." *Journal of Microbiological Methods* 63 (3): 219–28. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>.
14. Chen, Shifu, Yanqing Zhou, Yaru Chen, and Jia Gu. 2018. "Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor." *Bioinformatics* 34 (17): i884–90. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY560>.
15. Chomczynski, Piotr. 1992. "Solubilization in Formamide Protects RNA from Degradation." *Nucleic Acids Research* 20 (14): 3791. <https://doi.org/10.1093/NAR/20.14.3791>.
16. Clausen, Philip T.L.C., Frank M. Aarestrup, and Ole Lund. 2018. "Rapid and Precise Alignment of Raw Reads against Redundant Databases with KMA." *BMC Bioinformatics* 19 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12859-018-2336-6/TABLES/2>.
17. Cole, Justin M., Audrey N. Schuetz, Charles E. Hill, and Frederick S. Nolte. 2009. "Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase Genes." *Journal of Clinical Microbiology* 47 (2): 322. <https://doi.org/10.1128/JCM.01550-08>.
18. Colom, K., A. Fdz-Aranguiz, E. Suinaga, and R. Cisterna. 1995. "Emergence of Resistance to Beta-Lactam Agents in *Pseudomonas Aeruginosa* with Group I Beta-Lactamases in Spain." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 14 (11): 964–71. <https://doi.org/10.1007/BF01691378>.
19. Curran, Barry, Daniel Jonas, Hajo Grundmann, Tyrone Pitt, and Christopher G Dowson. 2004. "Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa*." *Journal of Clinical Microbiology* 42 (12): 5644–49. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>.
20. Dealtry, Simone, Guo-Chun Ding, Viola Weichelt, Vincent Dunon, Andreas Schlüter, María Carla Martini, María Florencia Del Papa, et al. 2014. "Cultivation-Independent Screening Revealed Hot Spots of IncP-1, IncP-7 and IncP-9 Plasmid Occurrence in Different Environmental Habitats." *PloS One* 9 (2): e89922–e89922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089922>.

21. Diancourt, Laure, Virginie Passet, Jan Verhoef, Patrick A D Grimont, and Sylvain Brisse. 2005. "Multilocus Sequence Typing of Klebsiella Pneumoniae Nosocomial Isolates." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8): 4178–82. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>.
22. Dilworth, Donald D., and John R. McCarrey. 1992. "Single-Step Elimination of Contaminating DNA Prior to Reverse Transcriptase PCR." *Genome Research* 1 (4): 279–82. <https://doi.org/10.1101/gr.1.4.279>.
23. Earl, Conner C., Mark T. Smith, Richard A. Lease, and Bradley C. Bundy. 2018. "Polyvinylsulfonic Acid: A Low-Cost Rnase Inhibitor for Enhanced RNA Preservation and Cell-Free Protein Translation." *Bioengineered* 9 (1): 90–97. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1313648>.
24. Ertugrul, Bulent M., Erman Oryasin, Benjamin A. Lipsky, Ayşe Willke, and Bulent Bozdogan. 2017. "Virulence Genes FliC, ToxA and PhzS Are Common among Pseudomonas Aeruginosa Isolates from Diabetic Foot Infections." <https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1393839>.
25. ———. 2018. "Virulence Genes FliC, ToxA and PhzS Are Common among Pseudomonas Aeruginosa Isolates from Diabetic Foot Infections." *Infectious Diseases* 50 (4): 273–79. <https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1393839>.
26. Eusebio, Nadia, Tiago Pinheiro, Adelina A. Amorim, Fernanda Gamboa, Lucilia Saraiva, Leonor Gusmão, António Amorim, and Ricardo Araujo. 2013. "SNaPaer: A Practical Single Nucleotide Polymorphism Multiplex Assay for Genotyping of Pseudomonas Aeruginosa." *PLoS ONE* 8 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066083>.
27. Ewels, Philip, Måns Magnusson, Sverker Lundin, and Max Käller. 2016. "MultiQC: Summarize Analysis Results for Multiple Tools and Samples in a Single Report." *Bioinformatics* 32 (19): 3047–48. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW354>.
28. Feldgarden, Michael, Vyacheslav Brover, Narjol Gonzalez-Escalona, Jonathan G. Frye, Julie Haendiges, Daniel H. Haft, Maria Hoffmann, et al. 2021. "AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog Facilitate Examination of the Genomic Links among Antimicrobial Resistance, Stress Response, and Virulence." *Scientific Reports* 2021 11:1 11 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>.
29. Franklin, Michael J., David E. Nivens, Joel T. Weadge, and P. Lynne Howell. 2011. "Biosynthesis of the Pseudomonas Aeruginosa Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl." *Frontiers in Microbiology* 2 (AUG). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00167>.
30. Fregel, Rosa, Ana González, and Vicente M. Cabrera. 2010. "Improved Ethanol Precipitation of DNA." *Electrophoresis* 31 (8): 1350–52. <https://doi.org/10.1002/elps.200900721>.
31. Gaillard, Claire, and François Strauss. 1990. "Ethanol Precipitation of DNA with Linear Polyacrylamide as Carrier." *Nucleic Acids Research* 18 (2): 378. <https://doi.org/10.1093/nar/18.2.378>.
32. Giménez, Matías, Ignacio Ferrés, and Gregorio Iraola. 2022. "Improved Detection and Classification of Plasmids from Circularized and Fragmented Assemblies." *BioRxiv*, August, 2022.08.04.502827. <https://doi.org/10.1101/2022.08.04.502827>.
33. Gotoh, Naomasa, Hideto Tsujimoto, Masataka Tsuda, Kiyomi Okamoto, Atsuko Nomura, Takaomi Wada, Masaaki Nakahashi, and Takeshi Nishino. 1998. "Characterization of the MexC-MexD-OprJ Multidrug Efflux System in DeltamexA-MexB-OprM Mutants of Pseudomonas Aeruginosa." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (8): 1938–43. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.8.1938>.
34. Götz, A., R. Pukall, E. Smit, E. Tietze, R. Prager, H. Tschäpe, J. D. Van Elsas, and K. Smalla. 1996. "Detection and Characterization of Broad-Host-Range Plasmids in Environmental Bacteria by PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 62 (7): 2621–28. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2621-2628.1996>.
35. Goudarzi, Hossein, Elnaz Sadat Mirsamadi, Zohreh Ghalavand, Mojdeh Hakemi Vala, Hamed Mirjalali, and Ali Hashemi. 2019. "Rapid Detection and Molecular Survey of BlaVIM, BlaIMP and BlaNDM Genes among Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii Using New Multiplex Real-Time PCR and Melting Curve Analysis." *BMC Microbiology* 19 (1). <https://doi.org/10.1186/S12866-019-1510-Y>.
36. Gröbner, Sabine, Dirk Linke, Wolfgang Schütz, Claudia Fladerer, Johannes Madlung, Ingo B. Autenrieth, Wolfgang Witte, and Yvonne Pfeifer. 2009. "Emergence of Carbapenem-Non-Susceptible Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Klebsiella Pneumoniae Isolates at the University Hospital of Tübingen, Germany." *Journal of Medical Microbiology* 58 (7): 912–22. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.005850-0/CITE/REFWORKS>.
37. Hauser, Alan R. 2009. "The Type III Secretion System of Pseudomonas Aeruginosa: Infection by Injection." *Nature Reviews. Microbiology* 7 (9): 654. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2199>.
38. Hunter, Susan B., Paul Vauterin, Mary Ann Lambert-Fair, M. Susan Van Duyn, Kristy Kubota, Lewis Graves, Donna Wrigley, Timothy Barrett, and Efrain Ribot. 2005. "Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (3): 1045. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1045-1050.2005>.
39. Idea Scientific. 2000. "GENIE Electrophoretic Transfer." Genie Blotter Instructions. 2000. <https://ideascientific.com/pdf/Genie.pdf>.
40. Izmalkova, T. Yu, O. I. Sazonova, S. L. Sokolov, I. A. Kosheleva, and A. M. Boronin. 2005. "The P-7 Incompatibility Group Plasmids Responsible for Biodegradation of Naphthalene and Salicylate in Fluorescent Pseudomonads." *Microbiology* 74 (3): 290–95. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0065-0>.
41. Izmalkova, Tatyana Yu, Dmitri V. Mavrodi, Sergey L. Sokolov, Irina A. Kosheleva, Kornelia Smalla, Christopher M. Thomas, and Alexander M. Boronin. 2006. "Molecular Classification of IncP-9 Naphthalene Degradation Plasmids." *Plasmid* 56 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2005.12.004>.
42. Jahn, Courtney E., Amy O. Charkowski, and David K. Willis. 2008. "Evaluation of Isolation Methods and RNA Integrity for Bacterial RNA Quantitation." *Journal of Microbiological Methods* 75 (2): 318–24. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.004>.
43. Jolley, Keith A., Carly M. Bliss, Julia S. Bennett, Holly B. Bratcher, Carina Brehony, Frances M. Colles, Helen Wimalaratna, et al. 2012. "Ribosomal Multilocus Sequence Typing: Universal Characterization of Bacteria from



- Domain to Strain." *Microbiology (Reading, England)* 158 (Pt 4): 1005–15. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.055459-0>.
44. Jouy, Eric, Marisa Haenni, Laëtitia Le Devendec, Aurélie Le Roux, Pierre Châtre, Jean Yves Madec, and Isabelle Kempf. 2017. "Improvement in Routine Detection of Colistin Resistance in *E. Coli* Isolated in Veterinary Diagnostic Laboratories." *Journal of Microbiological Methods* 132 (January): 125–27. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.11.017>.
  45. Karakonstantis, Stamatis, Maria Rousaki, and Evangelos I. Kritsotakis. 2022. "Cefiderocol: Systematic Review of Mechanisms of Resistance, Heteroresistance and In Vivo Emergence of Resistance." *Antibiotics* 11 (6). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11060723>.
  46. Khoury, Jessica Y. El, Alexandra Maure, H el ene Gingras, Philippe Leprohon, and Marc Ouellette. 2019. "Chemogenomic Screen for Imipenem Resistance in Gram-Negative Bacteria." *MSystems* 4 (6). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00465-19>.
  47. K ohler, Thilo, Mehri Mich ea-Hamzehpour, Uta Henze, Naomasa Gotoh, Lasta Kocjancic Curty, and Jean Claude Pech ere. 1997. "Characterization of MexE-MexF-OprN, a Positively Regulated Multidrug Efflux System of *Pseudomonas Aeruginosa*" 23 (2): 345–54. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1997.2281594.X>.
  48. Kolmogorov, Mikhail, Jeffrey Yuan, Yu Lin, and Pavel A. Pevzner. 2019. "Assembly of Long, Error-Prone Reads Using Repeat Graphs." *Nature Biotechnology* 2019 37:5 37 (5): 540–46. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>.
  49. Kostyanov, Tomislav, M. N. Nguyen, R. Markovska, P. Stankova, B. B. Xavier, C. Lammens, Y. Marteva-Proevska, et al. 2020. "Emergence of ST654 *Pseudomonas Aeruginosa* Co-Harboring BlaNDM-1 and BlaGES-5 in Novel Class I Integron In1884 from Bulgaria." *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 22 (September): 672–73. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2020.06.008>.
  50. Lanotte, Philippe, Stephane Watt, Laurent Mereghetti, Nathalie Dartiguelongue, Aziz Rastegar-Lari, Alain Goudeau, and Roland Quentin. 2004. "Genetic Features of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients Compared with Those of Isolates from Other Origins." *Journal of Medical Microbiology* 53 (1): 73–81. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.05324-0/CITE/REFWORKS>.
  51. Li, Chaokun, Aiyun Wen, Benchang Shen, Jia Lu, Yao Huang, and Yongchang Chang. 2011. "FastCloning: A Highly Simplified, Purification-Free, Sequence- and Ligation-Independent PCR Cloning Method." *BMC Biotechnology* 11 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-92/FIGURES/6>.
  52. Li, Xinyue, Xiaofei Mu, Fangzhou Chen, Xiuhui Lu, Jiaqi He, Yali Zheng, Dongsheng Zhou, Zhe Yin, and Peng Wang. 2023. "Characterization of Three Novel IMP Metallo- $\beta$ -Lactamases, IMP-89, IMP-91, and IMP-96, and Diverse BlaIMP-Carrying Accessory Genetic Elements from Chinese Clinical Isolates." *Microbiology Spectrum* 11 (3). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.04986-22>.
  53. Liu, Bo, Dandan Zheng, Siyu Zhou, Lihong Chen, and Jian Yang. 2022. "VFDB 2022: A General Classification Scheme for Bacterial Virulence Factors." *Nucleic Acids Research* 50 (D1): D912–17. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1107>.
  54. Liu, Meng, Xiaobin Li, Yingzhou Xie, Dexi Bi, Jingyong Sun, Jun Li, Cui Tai, Zixin Deng, and Hong Yu Ou. 2019. "ICEberg 2.0: An Updated Database of Bacterial Integrative and Conjugative Elements." *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D660–65. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1123>.
  55. Liu, Shu Lin, Andrew Hessel, and Kenneth E. Sanderson. 1993. "Genomic Mapping with I-Ceu I, an Intron-Encoded Endonuclease Specific for Genes for Ribosomal RNA, in *Salmonella* Spp., *Escherichia Coli*, and Other Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (14): 6874. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.14.6874>.
  56. Livermore, D. M., and C. S. Jones. 1986. "Characterization of NPS-1, a Novel Plasmid-Mediated  $\beta$ -Lactamase, from Two *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29 (1): 99–103. <https://doi.org/10.1128/AAC.29.1.99>.
  57. Magiorakos, A.-P., A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, et al. 2012. "Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance." *Clinical Microbiology and Infection* 18 (3): 268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
  58. Manca, Claudia, Simon Paul, Clifton E. Barry, Victoria H. Freedman, and Gilla Kaplan. 1999. "Mycobacterium Tuberculosis Catalase and Peroxidase Activities and Resistance to Oxidative Killing in Human Monocytes in Vitro." *Infection and Immunity* 67 (1): 74–79. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.1.74-79.1999>.
  59. Manni, Mos e, Matthew R. Berkeley, Mathieu Seppey, Felipe A. Sim ao, and Evgeny M. Zdobnov. 2021. "BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes." *Molecular Biology and Evolution* 38 (10): 4647–54. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB199>.
  60. Masuda, N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, and T. Nishino. 2000. "Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas Aeruginosa*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (12): 3322–27. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3322-3327.2000>.
  61. McClure, Carol D., and Neal L. Schiller. 1996. "Inhibition of Macrophage Phagocytosis by *Pseudomonas Aeruginosa* Rhamnolipids in Vitro and in Vivo." *Current Microbiology* 33 (2): 109–17. <https://doi.org/10.1007/S002849900084>.
  62. Mendes, Rodrigo E., Katia A. Kiyota, Jussimara Monteiro, Mariana Castanheira, Soraya S. Andrade, Ana C. Gales, Antonio C.C. Pignatari, and Sergio Tufik. 2007. "Rapid Detection and Identification of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis." *Journal of Clinical Microbiology* 45 (2): 544. <https://doi.org/10.1128/JCM.01728-06>.
  63. Mikheenko, Alla, Andrey Prjibelski, Vladislav Saveliev, Dmitry Antipov, and Alexey Gurevich. 2018. "Versatile Genome Assembly Evaluation with QUAST-LG." *Bioinformatics* 34 (13): i142–50. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY266>.
  64. Mitov, Ivan, Tanya Strateva, and Boyka Markova. 2010. "Prevalence of Virulence Genes among Bulgarian Nosocomial

- and Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*.” *Brazilian Journal of Microbiology* 41 (3): 588–95. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300008>.
65. Moura, Alexandra, Mário Soares, Carolina Pereira, Nuno Leitão, Isabel Henriques, and António Correia. 2009. “INTEGRALL: A Database and Search Engine for Integrons, Integrases and Gene Cassettes.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (8): 1096–98. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP105>.
  66. Murray, Christopher JL, Kevin Shunji Ikuta, Fablina Sharara, Lucien Swetschinski, Gisela Robles Aguilar, Authia Gray, Chieh Han, et al. 2022. “Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis.” *The Lancet* 399 (10325): 629–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
  67. Nadin-Davis, S., and V. A. Mezl. 1982. “Optimization of the Title Ethanol Precipitation of RNA from Formamide Containing Solutions.” *Preparative Biochemistry* 12 (1): 49–56. <https://doi.org/10.1080/00327488208065549>.
  68. Nordmann, Patrice, Laurent Poirel, and Laurent Dortet. 2012. “Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae.” *Emerging Infectious Diseases* 18 (9): 1503. <https://doi.org/10.3201/EID1809.120355>.
  69. Oñate-Sánchez, Luis, and Julian C. Verdonk. 2021. “Citrate-Citric Acid RNA Isolation (CiAR) for Fast, Low-Cost, and Reliable RNA Extraction from Multiple Plant Species and Tissues.” *Current Protocols* 1 (12). <https://doi.org/10.1002/cpz1.298>.
  70. Page, Malcom G.P. 2019. “The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics.” *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 69 (Suppl 7): S529–37. <https://doi.org/10.1093/CID/CIZ825>.
  71. Papa-Ezdra, Romina, Nicolás F. Cordeiro, Matilde Outeda, Virginia Garcia-Fulgueiras, Lucía Araújo, Verónica Seija, Juan A. Ayala, Inés Bado, and Rafael Vignoli. 2023. “Novel Resistance Regions Carrying TnaphA6, BlaVIM-2, and BlaPER-1, Embedded in an ISPa40-Derived Transposon from Two Multi-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolates.” *Antibiotics* 12 (2): 304. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12020304/S1>.
  72. Papagiannitsis, Costas C., Matej Medvecký, Katerina Chudejova, Anna Skalova, Veronika Rotova, Petra Spanelova, Vladislav Jakubu, Helena Zemlickova, and Jaroslav Hrabak. 2017. “Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas Aeruginosa* of Czech Origin and Evidence for Clonal Spread of Extensively Resistant Sequence Type 357 Expressing IMP-7 Metallo- $\beta$ -Lactamase.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (12). <https://doi.org/10.1128/AAC.01811-17>.
  73. Parks, Donovan H., Michael Imelfört, Connor T. Skennerton, Philip Hugenholtz, and Gene W. Tyson. 2015. “CheckM: Assessing the Quality of Microbial Genomes Recovered from Isolates, Single Cells, and Metagenomes.” *Genome Research* 25 (7): 1043–55. <https://doi.org/10.1101/GR.186072.114>.
  74. Petrova, Atanaska, Yana Feodorova, Tsonka Miteva-Katrandzhieva, Michael Petrov, and Mariana Murdjeva. 2019. “First Detected OXA-50 Carbapenem-Resistant Clinical Isolates *Pseudomonas Aeruginosa* from Bulgaria and Interplay between the Expression of Main Efflux Pumps, OprD and Intrinsic AmpC.” *Journal of Medical Microbiology* 68 (12): 1723–31. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.001106/CITE/REFWORKS>.
  75. Pilato, Vincenzo Di, Alberto Antonelli, Tommaso Giani, Lucia Henrici De Angelis, Gian Maria Rossolini, and Simona Pollini. 2019a. “Identification of a Novel Plasmid Lineage Associated with the Dissemination of Metallo- $\beta$ -Lactamase Genes among *Pseudomonads*.” *Frontiers in Microbiology* 10 (July): 1504. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01504>.
  76. ———. 2019b. “Identification of a Novel Plasmid Lineage Associated with the Dissemination of Metallo- $\beta$ -Lactamase Genes among *Pseudomonads*.” *Frontiers in Microbiology* 10 (July): 464887. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01504/BIBTEX>.
  77. Poirel, Laurent, Rémy A. Bonnin, and Patrice Nordmann. 2011. “Analysis of the Resistome of a Multidrug-Resistant NDM-1-Producing *Escherichia Coli* Strain by High-Throughput Genome Sequencing.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (9): 4224–29. <https://doi.org/10.1128/AAC.00165-11>.
  78. Poirel, Laurent, Thierry Naas, and Patrice Nordmann. 2006. “Pyrosequencing as a Rapid Tool for Identification of GES-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamases.” *Journal of Clinical Microbiology* 44 (8): 3008–11. <https://doi.org/10.1128/JCM.02576-05>.
  79. Poole, Keith. 2002. “Outer Membranes and Efflux: The Path to Multidrug Resistance in Gram-Negative Bacteria.” *Current Pharmaceutical Biotechnology* 3 (2): 77–98. <https://doi.org/10.2174/1389201023378454>.
  80. Quale, John, Simona Bratu, Jyoti Gupta, and David Landman. 2006. “Interplay of Efflux System, AmpC, and OprD Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolates.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (5): 1633–41. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1633-1641.2006>.
  81. Rhee, Steven S., and Donald H. Burke. 2004. “Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine Stabilization of RNA: Comparison with Dithiothreitol for Use with Nucleic Acid and Thiophosphoryl Chemistry.” *Analytical Biochemistry* 325 (1): 137–43. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.019>.
  82. Robertson, James, and John H.E. Nash. 2018. “MOB-Suite: Software Tools for Clustering, Reconstruction and Typing of Plasmids from Draft Assemblies.” *Microbial Genomics* 4 (8). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000206>.
  83. Rosenthal, A, O Coutelle, and M Craxton. 1993. “Large-Scale Production of DNA Sequencing Templates by Microtitre Format PCR.” *Nucleic Acids Research* 21 (1): 173–74. <https://doi.org/10.1093/nar/21.1.173>.
  84. Ross, Karen, Alessandro M. Varani, Erik Snesrud, Hongzhan Huang, Danilo Oliveira Alvarenga, Jian Zhang, Cathy Wu, Patrick McGann, and Mick Chandlere. 2021. “TnCentral: A Prokaryotic Transposable Element Database and Web Portal for Transposon Analysis.” *MBio* 12 (5). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02060-21>.
  85. Russell, Alistair B., Michele Leroux, Krisztina Hathazi, Danielle M. Agnello, Takahiko Ishikawa, Paul A. Wiggins, Sun Nyunt Wai, and Joseph D. Mougous. 2013. “Diverse Type VI Secretion Phospholipases Are Functionally Plastic Antibacterial Effectors.” *Nature* 496 (7446): 508. <https://doi.org/10.1038/NATURE12074>.
  86. Ryall, B., J. C. Davies, R. Wilson, A. Shoemark, and H. D. Williams. 2008. “*Pseudomonas Aeruginosa*, Cyanide Accumulation and Lung Function in CF and Non-CF Bronchiectasis Patients.” *European Respiratory Journal* 32 (3): 740–47. <https://doi.org/10.1183/09031936.00159607>.

87. Sakuda, Ayako, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazuhiro Matsui, Yurika Takahashi, Kazunori Okada, Hisakazu Yamane, Masaki Shintani, and Hideaki Nojiri. 2018. "Divalent Cations Increase the Conjugation Efficiency of the Incompatibility P-7 Group Plasmid PCAR1 among Different *Pseudomonas* Hosts." *Microbiology (Reading, England)* 164 (1): 20–27. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000583>.
88. Sanders, Christine C., W. Eugene Sanders, Christine C. Sanders, and W. Eugene Sanders. 1986. "Type i  $\beta$ -Lactamases of Gram-Negative Bacteria: Interactions with  $\beta$ -Lactam Antibiotics." *Journal of Infectious Diseases* 154 (5): 792–800. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.5.792>.
89. Schneider, Ines, Emma Keuleyan, Rudolf Rasshofer, Rумыana Markovska, Anne Marie Queenan, and Adolf Bauernfeind. 2008. "VIM-15 and VIM-16, Two New VIM-2-Like Metallo- $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates from Bulgaria and Germany." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (8): 2977. <https://doi.org/10.1128/AAC.00175-08>.
90. Schweizer, Herbert P., and Herbert P Schweizer. 2003. *Efflux as a Mechanism of Resistance to Antimicrobials in Pseudomonas Aeruginosa and Related Bacteria: Unanswered Questions. Genetics and Molecular Research*. Vol. 2. [http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0002\\_abstract.htm](http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0002_abstract.htm).
91. Schwengers, Oliver, Lukas Jelonek, Marius Alfred Dieckmann, Sebastian Beyvers, Jochen Blom, and Alexander Goesmann. 2021. "Bakta: Rapid and Standardized Annotation of Bacterial Genomes via Alignment-Free Sequence Identification." *Microbial Genomics* 7 (11): 000685. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000685/CITE/REFWORKS>.
92. Shedlovskiy, Daniel, Natalia Shcherbik, and Dimitri G. Pestov. 2017. "One-Step Hot Formamide Extraction of RNA from *Saccharomyces Cerevisiae*." *RNA Biology* 14 (12): 1722–26. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1345417>.
93. Shukla, Sudhir K., and Toleti Subba Rao. 2017. "An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate." *BioRxiv*, January, 100214. <https://doi.org/10.1101/100214>.
94. Siguier, P., J. Perochon, L. Lestrade, J. Mahillon, and M. Chandler. 2006. "ISfinder: The Reference Centre for Bacterial Insertion Sequences." *Nucleic Acids Research* 34 (Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKJ014>.
95. Silva, Mickael, Miguel P. Machado, Diogo N. Silva, Mirko Rossi, Jacob Moran-Gilad, Sergio Santos, Mario Ramirez, and João André Carriço. 2018. "ChewBBACA: A Complete Suite for Gene-by-Gene Schema Creation and Strain Identification." *Microbial Genomics* 4 (3). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000166>.
96. Simmer, Patricia J., and Robin Patel. 2020. "Cefiderocol Antimicrobial Susceptibility Testing Considerations: The Achilles' Heel of the Trojan Horse?" *Journal of Clinical Microbiology* 59 (1). <https://doi.org/10.1128/JCM.00951-20>.
97. Skiada, Anna, Antonis Markogiannakis, Diamantis Plachouras, and George L. Daikos. 2011. "Adaptive Resistance to Cationic Compounds in *Pseudomonas Aeruginosa*." *International Journal of Antimicrobial Agents* 37 (3): 187–93. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2010.11.019>.
98. Souza, Cintya O., Rodrigo Cayô, Karla Valéria B. Lima, Danielle M. Brasiliense, Ana Paula Streling, André V. Siqueira, Felipe Alberto-Lei, et al. 2023. "Genetic and Biochemical Characterization of BIM-1, a Novel Acquired Subgroup B1 MBL Found in a *Pseudomonas* Sp. Strain from the Brazilian Amazon Region." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 78 (6): 1359–66. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAD077>.
99. Stead, Mark B., Ankit Agrawal, Katherine E. Bowden, Rakia Nasir, Bijoy K. Mohanty, Richard B. Meagher, and Sidney R. Kushner. 2012. "RNAsnap™: A Rapid, Quantitative and Inexpensive, Method for Isolating Total RNA from Bacteria." *Nucleic Acids Research* 40 (20). <https://doi.org/10.1093/nar/gks680>.
100. Strateva, Tanya, Lena Setchanova, and Slavil Peykov. 2021. "Characterization of a Bulgarian VIM-2 Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolate Belonging to the High-Risk Sequence Type 111." <https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1934531>.
101. Tansirichaiya, Supatthep, Md Ajijur Rahman, and Adam P. Roberts. 2019. "The Transposon Registry." *Mobile DNA* 10 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1186/S13100-019-0182-3/FIGURES/3>.
102. Trias, J., and H. Nikaïdo. 1990. "Outer Membrane Protein D2 Catalyzes Facilitated Diffusion of Carbapenems and Penems through the Outer Membrane of *Pseudomonas Aeruginosa*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34 (1): 52–57. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.1.52>.
103. Tu, Qiang, Jia Yin, Jun Fu, Jennifer Herrmann, Yuezhong Li, Yulong Yin, A. Francis Stewart, Rolf Müller, and Youming Zhang. 2016. "Room Temperature Electrocompetent Bacterial Cells Improve DNA Transformation and Recombineering Efficiency." *Scientific Reports* 6 (April). <https://doi.org/10.1038/SREP24648>.
104. Turton, J. F., S. E. Turton, L. Yearwood, S. Yarde, M. E. Kaufmann, and T. L. Pitt. 2010. "Evaluation of a Nine-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Scheme for Typing of *Pseudomonas Aeruginosa*." *Clinical Microbiology and Infection* 16 (8): 1111–16. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03049.x>.
105. Vasil, Michael L., Martin J. Stonehouse, Adriana I. Vasil, Sandra J. Wadsworth, Howard Goldfine, Robert E. Bolcome, and Joanne Chan. 2009. "A Complex Extracellular Sphingomyelinase of *Pseudomonas Aeruginosa* Inhibits Angiogenesis by Selective Cytotoxicity to Endothelial Cells." *PLOS Pathogens* 5 (5): e1000420. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000420>.
106. Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. "Chelex® 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material." *BioTechniques* 10 (4): 506–13. <https://doi.org/10.2144/000114018>.
107. Walter, Michael V, Arlene Porteous, and Ramon J Seidler. 1987. "Measuring Genetic" 53 (1): 105–9.
108. Wei, Quhao, Xiaofei Jiang, Min Li, Xiaoyun Chen, Gang Li, Ru Li, and Yuan Lu. 2011. "Transcription of Integron-Harboured Gene Cassette Impacts Integration Efficiency in Class 1 Integron." *Molecular Microbiology* 80 (5): 1326–36. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07648.X>.
109. Wi, Yu Mi, Kerryll E. Greenwood-Quaintance, Audrey N. Schuetz, Kwan Soo Ko, Kyong Ran Peck, Jae Hoon Song, and Robin Patel. 2018. "Activity of Ceftolozane-Tazobactam against Carbapenem-Resistant, Non-Carbapenemase-Producing *Pseudomonas Aeruginosa* and Associated Resistance Mechanisms." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01970-17>.
110. Wick, Ryan R., and Kathryn E. Holt. 2022. "Polypolish: Short-Read Polishing of Long-Read Bacterial Genome Assemblies." *PLOS Computational Biology* 18 (1): e1009802. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1009802>.

111. Wick, Ryan R., Louise M. Judd, Louise T. Cerdeira, Jane Hawkey, Guillaume Méric, Ben Vezina, Kelly L. Wyres, and Kathryn E. Holt. 2021. "Trycycler: Consensus Long-Read Assemblies for Bacterial Genomes." *Genome Biology* 22 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13059-021-02483-Z/FIGURES/4>.
112. Wick, Ryan R., Louise M. Judd, Claire L. Gorrie, and Kathryn E. Holt. 2017. "Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads." *PLOS Computational Biology* 13 (6): e1005595. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005595>.
113. Wolters, Birgit, Martina Kyselková, Ellen Krögerrecklenfort, Robert Kreuzig, and Kornelia Smalla. 2015. "Transferable Antibiotic Resistance Plasmids from Biogas Plant Digestates Often Belong to the IncP-1ε Subgroup." *Frontiers in Microbiology* 5 (January): 765. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00765>.
114. Wozniak, Rachel A.F., and Matthew K. Waldor. 2010. "Integrative and Conjugative Elements: Mosaic Mobile Genetic Elements Enabling Dynamic Lateral Gene Flow." *Nature Reviews Microbiology* 2010 8:8 8 (8): 552–63. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2382>.
115. Yan, Shigan, Zhaoxu Jiang, Wencheng Zhang, Zhenhai Liu, Xiaorui Dong, Donghui Li, Zijun Liu, Chengyu Li, Xu Liu, and Liping Zhu. 2023. "Genomes-Based MLST, CgMLST, WgMLST and SNP Analysis of Salmonella Typhimurium from Animals and Humans." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 96 (May): 101973. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2023.101973>.
116. Yan, Shigan, Wencheng Zhang, Chengyu Li, Xu Liu, Liping Zhu, Leilei Chen, and Baowei Yang. 2021. "Serotyping, MLST, and Core Genome MLST Analysis of Salmonella Enterica From Different Sources in China During 2004–2019." *Frontiers in Microbiology* 12 (September): 688614. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.688614/BIBTEX>.
117. Zimin, Aleksey V., and Steven L. Salzberg. 2020. "The Genome Polishing Tool POLCA Makes Fast and Accurate Corrections in Genome Assemblies." *PLOS Computational Biology* 16 (6): e1007981. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1007981>.
118. Zuilianello, Laurence, Coralie Canard, Thilo Köhler, Dorothée Caille, Jean Silvain Lacroix, and Paolo Meda. 2006. "Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by Pseudomonas Aeruginosa." *Infection and Immunity* 74 (6): 3134. <https://doi.org/10.1128/IAI.01772-05>.

## *Благодарности*

Изказвам своята благодарност на научния си ръководител доц. Иван Иванов и научния ми консултант проф. Стефана Събчева за тяхната подкрепа, помощта, полезните съвети и напътствия, както и за възможностите за изява, които ми бяха предоставени.

Благодаря на екипа на Националната референтна лаборатория „Контрол и Мониториране на Антибиотичната резистентност“ за оказаната подкрепа.

Това проучване беше подкрепено от Националния фонд за научни изследвания на Република България чрез проект КП-06-Н23/5 и Европейския фонд за регионално развитие чрез Оперативна програма "Наука и образование за интелигентен растеж" 2014-2020; проект BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Фундаментални, транслираци и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология".

# *Abstract*

Antimicrobial resistance (AMR) has become one of the most significant problems for medicine and public health, and it is increasingly identified as a global threat during decade. According to some experts, the emergence of pan-resistant bacteria (including in Bulgaria) and the lack of new effective therapeutics herald the end of the antibiotic era. The World Health Organization (WHO) as well as the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) are adamant on the need for urgent measures to control the AMR globally.

*P. aeruginosa* ranks sixth worldwide in terms of AMR-related mortality and is listed as a critical high-risk pathogen according to WHO. To address this growing public health threat, there is a need for specific policies, infection prevention and control programs, improved access to essential antibiotics, and the development of new vaccines and antibiotics. A key strategy to tackle these issues is the detailed investigation of the genetic mechanisms of AMR. The most advanced and comprehensive method for this task is the whole genome sequencing (WGS). WGS allows for the simultaneous examination of all gene determinants associated with both multidrug resistance and the pathoadaptive mechanisms of a given microorganism.

The aim of this study was to perform an in-depth genomic analysis of multi-drug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) and pan-resistant (PDR) *Pseudomonas* spp. isolates causing difficult-to-treat infections.

Using a combination of modern phenotypic and genetic methods, a unique set of MDR, XDR and PDR strains were initially characterized and selected for antimicrobial susceptibility testing to the latest generation of antibiotics such as ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam, meropenem/vaborbactam, imipenem/relebactam and cefiderocol. Employing molecular genetic techniques, we identified resistance mechanisms, demonstrated carbapenemase carriage, assessed the influence of efflux systems on AMR, and examined porin deficiency. Concurrently, the study explored the virulence factors and biofilm production capabilities of the isolates.

An extensive analysis of antibiotic resistance and virulence was conducted on 100 clinical strains of *Pseudomonas* spp. from Bulgarian hospitals, isolated over the last 14 years and originating from various regions. Among these, 93% were classified as MDR, 4% as XDR, and 3% as PDR. The susceptibility to 19 antimicrobials, including 5 from a newer generation, was tested. Very high levels of resistance to  $\beta$ -lactams and fluoroquinolones were observed. Regarding aminoglycosides, the majority of isolates showed resistance to tobramycin, with a

smaller proportion also displaying resistance to amikacin. Additionally, there was high resistance to ceftolozane/tazobactam. With few exceptions, isolates generally maintained sensitivity to colistin and cefiderocol. The identified resistance mechanisms included a wide variety of enzymes and mutations. Different types of  $\beta$ -lactamases were detected, including CARB, GES, PER, VEB and TEM. Three types of class B carbapenemases (VIM, NDM, IMP) were identified, among which one newly discovered variant (IMP-100) was discovered and characterized for the first time.

Class D beta-lactamases were represented by the OXA-2, OXA-10, and OXA-50 families, among which extended-spectrum derivatives (OXA-677, OXA-74, and OXA-226) were also identified.

With regards to the aminoglycosides, the diversity of determinants included aminoglycoside acetyltransferases (AAC), aminoglycoside-phosphoryltransferases (APH) and aminoglycoside-nucleotidyl transferases (ANT), which were associated with resistance to various aminoglycosides, including amikacin and tobramycin. Notable was the presence of rare enzymes such as the 16S rRNA methyltransferase *rmtF2*, however its genetic setting remains to be further investigated.

Regarding enzyme-mediated resistance to quinolones, the presence of the bifunctional AAC(6')-Ib-cr5, exhibiting simultaneous activity towards amikacin, tobramycin and ciprofloxacin was confirmed.

Overexpression of various efflux systems, including MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN and MexXY-OprM, was registered among a large proportion of the isolates. Increased expression of the efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN showed a strong correlation with resistance to  $\beta$ -lactams and quinolones. High resistance to aminoglycosides and quinolones was observed in MexXY-OprM overproducers. On the other hand, reduced OprD expression was observed in all isolates studied, which largely explained the high resistance to carbapenems. Overproduction of AmpC- $\beta$ -lactamase was detected in four isolates, and they demonstrated resistance to cephalosporins and penicillins. Among the samples, there were 6 isolates overproducing simultaneously 2 of the genes tested. A total of 3 combined overexpression profiles were identified, MexAB-OprM and MexXY-OprM (n=4); MexCD-OprJ and MexXY-OprM (n=1); AmpC and MexXY-OprM (n=1).

A number of important mutations associated with antimicrobial resistance were detected. Mutations in the penicillin-binding protein PBP3 (*ftsI*), relevant to carbapenem resistance, were found in 2 isolates. In one isolate overproducing AmpC, a mutation in the

AmpR regulator was detected, explaining the mechanism of derepression. In addition, a mutation in the transcriptional regulator MexZ, relevant to MexXY-OprM expression, was detected, as was a premature stop codon in OprD. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes encoding topoisomerases are a common mechanism of quinolone resistance and were found in a large proportion of the isolates, correlating with the high level of resistance observed.

In order to elucidate the ability to transfer resistance to cephalosporins and carbapenems, different variants of in vitro conjugation were tested. All conjugation and mating attempts were unsuccessful, suggesting the chromosomal localization of genes encoding carbapenemases. In all isolates except the IMP-100 producer, the presence of chromosomal carbapenemases was confirmed by restriction analysis with I-Ceu I and subsequent hybridization, which explained the failed conjugation experiments.

As a result of the whole-genome analysis, the VIM carbapenemases were found localized within integrative conjugative elements (ICEs) in some isolates, suggesting a potential for horizontal gene transfer.

Most isolates exhibited high biofilm production, along with the presence of the majority of known virulence factors. The association of virulence factors such as phospholipase D with high-risk clones such as ST235, ST357, ST621, ST244 was confirmed. Two of them, ST357 and ST235, were also found to harbor ExoU, highlighting their high pathogenic potential.

For the first time in Bulgaria, the resistome and virulome of rare or often misidentified species, such as *P. soli* and *P. protegens*, which role as hospital pathogens has been increasing in recent years, have been studied.

In conclusion, the present work provides new large-scale data on genomic features associated with the multidrug-resistant phenotype of diverse Bulgarian *Pseudomonas* spp. clinical isolates collected over a 14-year period. Considering the expanding antibiotic resistance globally, the lack of new drugs, and the problem of misuse of available antibiotics, we believe that this work will be of interest to a large range of specialists in the future.