

НАЙ-ВАЖНИ ПОСТИЖЕНИЯ И ТЯХНОТО ЗНАЧЕНИЕ

на

Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, дм, дмн,

Професор в Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет
на Медицински университет – София

(КАНДИДАТЪТ УЧАСТВА В КОНКУРСА С ВСИЧКИ НАУЧНИ ТРУДОВЕ)

ПРИНОСИ

Научноизследователски приноси	Брой
Научно-теоретични приноси с оригинален характер	24
<i>H. pylori</i> инфекция	17
<i>Campylobacter</i> инфекция	1
Анаеробни бактерии	4
Влияние на стрес хормоните върху <i>H. pylori</i> и анаеробни бактерии	1
Бактерии от разред <i>Enterobacterales</i>	1
Научно-теоретични приноси за нашата страна	13
<i>H. pylori</i> инфекция	6
<i>Campylobacter</i> инфекция	1
Анаеробни бактерии	4
Бактерии от разред <i>Enterobacterales</i>	1
Други инфекции и микроорганизми	1
Научно-приложни приноси	25
<i>H. pylori</i> инфекция	14
<i>Campylobacter</i> инфекция	1
Анаеробни бактерии	6
Бактерии от разред <i>Enterobacterales</i>	1
Други инфекции и микроорганизми	3
ОБЩО	62

I. НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

H. PYLORI ИНФЕКЦИЯ

Проф. Боянова е ръководител на единствения екип у нас, който обхваща комплексно проучването на *Helicobacter. pylori* инфекцията в България както културелно с изолация и тестване на антибиотичната чувствителност на бактериите, така и с молекулярна диагностика за маркери (гени) за вирулентност и антибиотична резистентност, и щамово типизиране, така и с неинвазивна диагностика на инфекцията и контрол на успеха на ерадикацията посредством фекален антигенен тест, ¹³C уреен дихателен тест (¹³C UBT) и серология за антитела към *H. pylori* и антитела към главния фактор на вирулентността, протеина на цитотоксин асоциирания ген A, CagA. Въз основа на публикациите си, проф. Боянова е избрана за координатор за България в Pan-European Registry on *H. pylori* management: (Hp-EuReg).

1. *H. pylori* инфекцията е установена с инвазивни методи по-често (>88%) при нелекувани и лекувани болни със стомашен карцином отколкото в други европейски страни, което налага профилактична ерадикация на *H. pylori* след операция на ранен стомашен карцином. Проучена е характеристиката и еволюцията на първичната антибиотична резистентност на *H. pylori* при най-възрастните (>65 г.) болни за период от 20 г. (1996–2003 до 2011–2016 г.) и е намерена честа двойна/тройна резистентност в 21.0% от щамове в тази група пациенти в последните години, както и рязко (3.4-кратно) повишаване на резистентността към хинолони, която вече достигна 32.3% (по наше знание за първи път в Европа). Това показва необходимостта от подробна анамнеза за коморбидитета и консумацията на антибиотици от тези болни, както и лабораторно тестване на щамовата чувствителност преди избора на терапевтична схема. Диагностика и терапията на инфекцията при най-възрастните пациенти не трябва да се negliжират. (№ 22А, 33А, 75А)
2. Доказано е за първи път носителство на силно вирулентен (*cagA*⁺/*vacA* s1 тип) и двойно резистентен към антибиотици (metronidazole и clarithromycin) орален *H. pylori* щам на дете с гингивит и гастрит като за целта са използвани четири диагностични методи. Наличието едновременно на хронична орална и стомашна инфекция може да бъде начин за предаване на инфекцията и разширява знанията за нейната епидемиология. (№ 53А, 45Б, 49Б, 55Б)
3. За първи път са въведени три нови метода за *H. pylori*: (3.1) **3-степенен културелен метод** за определяне гъстотата на *H. pylori* при 328 деца и 1421 симптоматични възрастни, (3.2) **метод за тестване на граничните стойности** (в публикациите, screening agar method, SAM, или breakpoint susceptibility testing, BST) с чисти култури и (3.3) **модифициран дисково-дифузионен метод** (MDDM) с 1 µg/диск levofloxacin за тестване чувствителността *H. pylori* на към флуорохинолони. Високата бактериална гъстота може да намали успеха на терапията на *H. pylori* инфекцията. С нововъведения 3-степенен културелен метод е установена висока гъстота на *H. pylori* в над 40% от язвено болните пациенти, при които се налага по-агресивна терапия за ерадикация на инфекцията. BST е използван за нитроимидазоли още от 1998 г., въведен за макролиди от 1999 г. и е проучен за 5 антибиотици през 2008 г. Резултатите от BST и Е теста или метода на серийни разреждания в агар (ADM) съвпадат в ≥93%. Поради неприложимост на ADM за тестване на единични щамове и нестандартизирани резултати от MDDM за повечето антибиотици, BST е надежден и приложим за рутинната практика. Отбелязан е в обзора на Megraud and Lehours (2007) и вече се използва и от някои автори като Falsafi et al. (2004) и Toracchio et al. (2004). Използването на BST е особено полезно за тестване на чувствителността на *H. pylori* към metronidazole, поради риска от фалшива резистентност с Е теста и MDDM. Въведеният нов MDDM за отчитане чувствителността на *H. pylori* с levofloxacin (1 µg/диск) е необходим поради нарастващата резистентност на *H. pylori* към хинолони, като с този метод при сравнение с резултатите от Е теста много големите грешки са 0%, а големите грешки само 0.6%. Съпадението на двата метода по категории е много високо (93.9%). Методът е подходящ за тестване чувствителността на единични щамове, или в лаборатории с по-ограничени ресурси. (№ 12А, 13А, 31А, 33А, 34А, 66А, 68А, 13Б)
4. За първи път е доказана хомоложна трансформация на маркери за резистентност към макролиди при *H. pylori* като възможен механизъм на придобиване на антибиотична резистентност при смесени инфекции с няколко щамове *H. pylori*. Въведеният агаров метод за трансформация е успешен при използване на бактерии в ранна експоненциална фаза на растеж и голямо количество (1 µg) донорна ДНК за преодоляване на ДНК-хидролизиращата активност на бактериите. Като се има предвид наличието на смесени инфекции в 10.2 % от пациентите у нас PCR тествани за комбинации на алелите на гена, индуциран от контакт с епитела *iceA* и на гена за вакуолизиращия токсин *vacA*, това определя ролята на естествената трансформация за придобиване на резистентност. Намерени са щамови различия между

реципиентите и стабилност на трансформантите. Намерени са цитоскелетна дезорганизация на стомашните епителни клетки при инфекция с вирулентните CagA⁺ *H. pylori* щамове и увеличено количество актин в срези от стомашна мукоза (*in vivo*) областта близо до cagA⁺ бактерии. (№ 2М, 41А, 7Б, 10Б, 58Б)

5. В проучването с ¹³С уреиният дихателен тест (¹³С UBT) при деца, за първи път се препоръчва да бъде избягвана употребата на прополис и пробиотици няколко дни преди изследването с ¹³С UBT, за да се предотвратят фалшиво негативни резултати от временното потискане на *H. pylori* от неантибиотичните средства. (69Б)
6. За първи път е доказано, че само в комбинация, *iceA1* и *babA2* (ген, кодиращ адхезин, свързващ кръвногрупов антиген) гените са свързани с язвените болести (в 48.1% срещу 28.7% при неиззвени болести) на пациентите, т.е. клиничният изход от инфекцията се дължи на взаимно потенциращото се действие на бактериалните гени на вирулентност. За първи път е намерена връзка на cagA⁺/cagE⁻ генотипа едновременно с пола и възрастта на пациентите. Проучена е честотата на интактния остров на патогенността cagPAI на *H. pylori*, чието състояние, ако е интактен, е от ключово значение за патогенезата на инфекцията и е открито, че при частично увреден (нефункционален) остров на патогенността, cagE и/или cagY гените са най-често липсващите гени и могат да се считат за маркери на състоянието на cagPAI. Честотата на cagA⁺/cagE⁻ щамове с увреден остров на патогенността (cagPAI) на *H. pylori* е 2.1 пъти по-ниска при мъже спрямо жени, което обяснява, поне частично, честите дуоденални язви при мъжете в някои проучвания. Установено е, че честотата на cagE⁺ генотипа се увеличава с възрастта, което сочи обща промяна на щамовата вирулентност съгласно феномена на кохортите, или промяна на отделния щам в хода на доживотната инфекция. У нас е намерена е по-висока (>91%) честота на токсигенните vacA s1 генотипове отколкото обичайно съобщаваната в Европа и за първи път в югоизточна Европа е доказана връзка между vacA i1 генотипа и активния (“включен”, или “on”) статус на oipA гена за външномембранен инфламаторен протеин. (№ 14М, 38А, 41А, 44А, 46А, 50А, 79А)
7. За първи път е проучено в модел с адхерирани върху HEp-2 епителни клетки бактерии, че адхезията на *H. pylori* намалява чувствителността им към антибиотици. Намерено е бактерицидно действие на amoxicillin след 24 ч. контакт в по-високи концентрации за адхерираните (≥0.1 µg/ml) спрямо планктоничните бактерии (≥0.001 µg/ml). За първи път е открито бактерицидното действие на инхибитора на протонната помпа (ИПП) lansoprazole (10 µg/ml) в модел с адхерирани *H. pylori* след 24 ч. контакт. В концентрация 1 µg/ml, инхибиторът на протонната помпа (ИПП) lansoprazole уврежда жизнеността на бактериите и води до поява на кокоидни *H. pylori* след 6-24 часа контакт. Резултатите обясняват някои случаи на неуспех на ерадикацията и са от полза за избора на ИПП за терапия на инфекцията (№ 1А, 2А, 1В)
8. Направено е първото широко сравнително проучване на първичната и вторична резистентност на *H. pylori* към 5 антибиотика върху голям брой (2340) изолати от центрове в 7 държави от източна и централна Европа. В този регион честотата на първична резистентност към metronidazole е значителна, а на тази към clarithromycin е сходна/малко по-висока спрямо тази в западна Европа. Резистентност към amoxicillin, ciprofloxacin и tetracycline е намерена в някои центрове. Честотите на първична и пост-терапевтична резистентност варират широко между центровете. Необходимо е редовно мониториране на профили на резистентността на *H. pylori* и нейната еволюция в европейските държави при пълно стандартизиране на методите за чувствителност и уеднаквяване на граничните стойности за резистентност. В европейското ни проучване на антибиотичната резистентност на *H. pylori* на 18 европейски държави през 2018 г. се установява, че България е на 5то място по първична (при нелекувани за *H. pylori* ерадикация болни) резистентност на *H. pylori* към

clarithromycin и на второ място по първична резистентност на *H. pylori* към levofloxacin в Европа, което е особено тревожно и налага включването на тези антибиотици в терапията да бъде само след лабораторно тестване на чувствителността, което, за съжаление, се прави много рядко у нас. От друга страна, резистентността към amoxicillin и tetracycline остават много ниски, или липсват, което показва, че могат успешно да продължават да се използват в терапевтичните схеми за ерадикация на инфекцията. (№ 17А, 103А, 23В)

9. Необичайна и алармираща за Европа множествена резистентност на *H. pylori* е съобщена още през 2000 г., а през 2009 г., за първи път в Европа в последните 5 г. е доказана множествена (тройна и четворна) антибиотична резистентност на *H. pylori* в 4.2% при нелекувани и по-често (15.4%) при лекувани възрастни и дори в 1.2% при нелекувани деца. Вече е намерена и 5-на резистентност (вероятно свързана с ефлуксна помпа) в щам от лекуван пациент. Причините за множествената резистентност са комплексни, вкл. увеличената национална консумация на групата макролиди, линкозамиди и стрептограмини у нас и от 2000 г. на хинолони, нарастващата първична *H. pylori* резистентност към clarithromycin, високата консумация на тетрациклини в предишни години (1994–1999 г.) и в някои случаи на неподходящо лечение с azithromycin-базирани режими, или с повторна употреба на нитроимидазоли. Това налага стриктно прилагане на антибиотичната политика, периодично мониториране на резистентността на *H. pylori* и правилен избор на терапевтичните схеми в национален и глобален план. (№ 16М, 14А, 27А, 34А, 37А, 39А, 56А, 64А, 91А, 48Б, 59Б)
10. За първи път с логистична регресия са открити като рискови фактори за първична резистентност на *H. pylori* към clarithromycin болничният център, а за тази към metronidazole местораждането в градовете и за първи път в Европа неязвеното заболяване. Намерена е по-ниска честота на metronidazole резистентност (17%) при болни с пептични язви спрямо неязвено болните (28.3%), което е подкрепено по-късно в проучване от Ирландия (Taneike et al., 2009). За първи път професията в здравеопазването е разкрита с логистична регресия като рисков фактор за резистентност на *H. pylori* към metronidazole и двойна резистентност към metronidazole + clarithromycin. Друг оригинален резултат е, че не само жените, но и жителите на София имат по-висок риск (OR 1.453; 95 % CI 1.009–2.093) за metronidazole резистентност от живеещите в други селища, което говори, че гъстотата на населението може да бъде свързана с честотата на резистентност на *H. pylori*. Също така за първи път се съобщават едновременно географската област и вида населено място като рискови фактори за първична резистентност на *H. pylori* към clarithromycin. На базата на тези данни, се препоръчва разширена анамнеза на пациента, както и по-често тестване на чувствителността на щамове при пациентите в големите градове и на групите с повишен риск за антибиотична резистентност. Проучен е моделът на разширеното семейство с над две генерации, който е по-разпространен в нашата страна, отколкото в западните държави. *H. pylori* инфекцията при деца с фамилна анамнеза за гастродуоденални заболявания е 3.3 пъти по-висока (69.1%) в сравнение с контролната група (21.0%). Освен ролята на заразените родители и братя и сестри, в този модел роля за инфектирането на децата имат и заразените роднини от второ коляно (баби/дядовци). Трябва да се има предвид разширеното семейство в анамнезата на педиатричните пациенти. (№ 35А, 48А, 52А, 100А, 64Б)
11. За първи път е открита асоциация между точковата A2143G мутация за clarithromycin резистентност (която често предсказва неуспех на *H. pylori* ерадикацията с clarithromycin-базирани режими) и по-слабо вирулентните *vacA* i2 щамове, и обратно, между A2142G мутацията и по-силно вирулентните *vacA* i1 щамове, което може да обясни по-успешната ерадикация на по-вирулентните щамове спрямо по-слабо вирулентните. (67А)

12. Доказана е за първи път ролята на предишната (преди 10 г.) национална консумация на tetracycline като фактор за първична резистентност при деца и възрастни към агента. Спадът на честотата на резистентност може да отнеме много години. Установена е за първи път ползата от дългосрочно проследяване на еволюцията на първичната резистентност на *H. pylori*, която в нашите проучвания показва значимо (7.7-кратно) увеличение към хинолони при удължаване на периода на проучване до 20 г. Дългосрочното проследяване може да бъде препоръчано и за други причинители на инфекции, защото може да предскаже предстоящите промени в профилите на резистентност. (№ 37A, 39A, 40A)
13. Множествената резистентност на *H. pylori* е причина за неуспешни опити за ерадикация на инфекцията и за нейното преодоляване трябва да се проучват нови терапевтични схеми, нови антибиотици, адюванти, средства активни към биофилмите и др. В наше проучване за първи път са сравнени активностите на levofloxacin и един по-нов флуорохинолон, delafloxacin, с добро действие в среда с ниско pH, каквато е характерна за стомаха. Делафлоксацинът показва миниална потискаща концентрация МПК₉₀ 0.125 mg/l спрямо ≥ 32 mg/l за левофлоксацина и активност дори срещу 19 levofloxacin резистентни *H. pylori* изолати с МПК₅₀ и МПК₉₀ 0.094 и съотв. 0.38 mg/l. Този нов антибиотик има голям потенциал и трябва да бъде клинично проучен в режими за ерадикация на *H. pylori* инфекцията, както вече планираме заедно с португалски колеги (91A, 97A)
14. Открита е за първи път активността на неантибиотични средства като българското розово масло (за което проф. Боянова е съпритежател на патент) и главния му компонент гераниол с 4 метода, на българския прополис с 3 метода и на щамове *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB), вкл. концентрати, култури в мляко и филтрати върху *H. pylori in vitro*. Българският прополис показва много добра доза-зависима активност срещу повечето щамове. За първи път е установено, че всички изследвани щамове лактобацили инхибират растежа на част от щамове *H. pylori*, вкл. резистентни към антибиотици. Определени са най-активните срещу *H. pylori* щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, потискащи >86% от щамове *H. pylori* при ниско pH и >53% при неутрализирано pH. Проучени са седем GLB щамове на българските лактобацили, произвеждащи термостабилни бактериоцин-подобни субстанции, като дори неутрализираните безклетъчни филтрати потиснаха растежа на >2/3 от *H. pylori* щамове. Бактериоцините трябва да бъдат предпочитани като пробиотици за допълнение към терапията или за профилактика и след терапия на *H. pylori* инфекцията (№ 9M, 17M, 10A, 19A, 26A, 36A, 32B, 36B)
15. Въведени са два нови метода за проучване на антимикробната активност на неантибиотични средства върху *H. pylori* и е направено първото клинично проучване на българското розово масло срещу тези бактерии. Въведеният **модифициран агаров ямково-дифузионен метод** за определяне антимикробната активност на неантибиотични средства с ямки 7 mm диаметър, гъст инокулум (Mc Farland 2) и обеми <100 µl вече се ползва и от други автори (Kumar and Kamaraj, 2011; Okeleye et al., 2011, както и в една нова публикация на Hammad et al., International Food Research Journal 2021;28(2): 377-385). Въведен е и един **нов сравнителен скринингов метод (comparative screening assay- CSA)** за предварителен скрининг на бактерицидната активност едновременно на няколко неантибиотични средства. С този метод са изследвани инфузии за 6 растения в концентрации подобни на тези в използваните за чайове и отвари. Този метод е много по-икономичен и по-улеснен от класическите бактерицидни техники. Базира се на отчитане на определена степен на редукция на колонии образуващите единици (CFU) на 60та и 120та минута от контакта на бактериите с тестваните неантибиотични агенти. Наше клинично проучване на терапия с българско розово масло показва, че се подобряват обективните и субективни показатели на болестта, негативизира се бързия уреазен тест (RUT) в 60% и се намалява гъстотата на *H. pylori* в 40-60% от болните, а вероятно се повлияват и бактериалните фактори на

вирулентност. Неантибиотичните агенти имат потенциал за контрола на тази хронична и многото честа инфекция. (9М, 10А, 19А, 26А, 55А, 65Б)

16. За първи път е доказан (с ^{13}C UBT) благотворният ефект (odds ratio-OR, 0.38; 95% confidence interval, CI, 0.19–0.78) на редовната консумация (≥ 1 ден седмично) на българския пчелен мед върху честотата на *H. pylori* инфекцията при нелекувани пациенти. Освен това, за първи път е доказано серологично при 294 безсимптомни кръвни донори, че има връзка между консумацията на пчелен мед (>5 дена седмично) и по-ниската честота на *H. pylori* инфекцията (OR, 0.68; 95% CI, 0.473–0.967), както и обратна връзка между консумацията >5 дена седмично на пчелния мед (OR, 0.65; 95% CI, 0.486–0.859) и българското кисело мляко (OR, 0.56; 95% CI, 0.341–0.921) и CagA IgG честотата, показваща наличие на антитела срещу вирулентните щамове. За първи път е проучена с три метода активността на 6 растителни инфузии върху *H. pylori*, като е намерена най-голяма активност на тези от зелен чай, жълт кантарион и ройбос и най-слабо действие на инфузията от липов чай. Редовната и честа консумация на кисело мляко, пчелен мед и някои растителни инфузии могат да се препоръчат като полезни навици за допълнителен контрол на *H. pylori* инфекцията. (55А, 60А, 74А, 65Б)
17. За първи път е организирано и е в ход мащабно Паневропейско проучване на терапията на *H. pylori* инфекцията Pan-European Registry on *H. pylori* Management (HP-EuReg), в което проф. Боянова е координатор за България. Установени са важни зависимости: общият успех на ерадикацията с режимите от първа и втора линия е субоптимален (74%), добавянето на esomeprazole и използването на бисмут, или не-бисмут четворни терапии дават по-успешна ерадикация, не-бисмутната четворна едновременно (concomitant) терапевтична схема, оптимизирана с двойна доза ИПП постига 90% ИТТ (intention to treat) ерадикация. След 3 и 4 опита за ерадикация, резистентността на *H. pylori* към clarithromycin, metronidazole, хинолони и двойната резистентност е много висока (48 до 67%). При спасителните (rescue) режими, т.е. след няколко неуспешни терапии, е подходящо удължаване на режимите до 14 дена и използването на esomeprazole като ИПП. Странични действия от терапията са установени в 17%, но налагат прекъсване на терапията само в 4% от болните. Направен е анализ на терапията на *H. pylori* инфекцията на над 1000 пациенти алергични към penicillin в Европа, вкл. у нас. За тези пациенти четворният режим с ИПП, бисмут, tetracycline и metronidazole е по-успешен за терапия от първа линия отколкото тройният режим с ИПП, clarithromycin и metronidazole. Като спасителен (rescue) режим след няколко неуспешни опита за терапия обаче, четворният режим дава субоптимална (75%) ерадикация. В друго проучване на над 21000 пациенти с първа линия емпирична терапия на *H. pylori* е установено, че добра ($>90\%$) ерадикация могат да дадат само четворният режим с бисмут за 10 дни, или режимът с 4 лекарства и 3 антибиотика (concomitant режим с clarithromycin, amoxicillin и metronidazole, или tinidazole) за 14 дни. През годините се наблюдава тенденция за удължаването на времето за терапията от първоначално 7 до 10-14 дни и по-ефективно потискане на киселинността в стомаха, което подобрява терапевтичния успех. Тези резултати са от огромна полза за по-добрата ерадикация терапията на хроничната *H. pylori* инфекция, терапевтичният успех на която спада прогресивно през годините. (101А, 102А, 45В-57В)

CAMPYLOBACTER ИНФЕКЦИЯ

18. Установено е за първи път действието на българския прополис върху клинични изолати *Campylobacter coli* и *Campylobacter jejuni* от болни с ентероколит. Макар по-слабо активен отколкото към *H. pylori*, прополисът инхибира растежа на щамове *C. jejuni* и по-резистентния към антибиотици *C. coli* със среден диаметър 13.6 mm и следва допълнително да се проучи за терапия на асоциирани инфекции, особено от резистентни към антибиотици бактерии. (№ 19А, 96В)

АНАЕРОБНИ БАКТЕРИИ

19. За първи път се съобщава ролята на анаеробните коки от вид *Finegoldia magna*, най-патогенните анаеробни коки, в постоперативни проби от болни с оментопластика като терапевтичен подход при болни с постпневмонектомичен емпием. Установен е профилът на резистентност на *F. magna*, като 31% от изолатите бяха резистентни към clindamycin, или levofloxacin, но всички бяха чувствителни към amoxicillin/clavulanate. За първи път в Европа е наблюдаван синергизъм на микроаерофилните коки (в >83-100%) с анаероби както при плеврален емпием, така и дълбоки инфекции на главата и шията. Антибиотичната чувствителност на анаеробите е вече непредсказуема, което показва нарастващата полза от анаеробната диагностика при орофациалните и плевропулмонарни, както и при други тежки инфекции с често участие на анаероби. (№ 15А, 25А, 28А, 70А, 23Б, 25Б)
20. Намерени са и са сравнени факторите за еволюцията на антибиотичната резистентност на клинично важни анаеробни бактерии в глобален план и в нашата страна. Като главни фактори са установени вида, риботипа, държавата, болничния център, националната и индивидуална антибиотична консумация и вида на клиничната проба. Установено е, че емпиричната терапия на болни с инфекции на главата и шията намалява честотата на изолиране на анаеробите от род *Fusobacterium* spp., но не повлиява тази на *Prevotella* spp. В сравнение с други проучвания е открита по-динамична и разнопосочна промяна в резистентността на *Prevotella* spp. от болни с орофациални инфекции като резистентността към penicillin нараства четири пъти в рамките на 7 години, а обратно, при тетрациклина има двукратно намаление на нечувствителните щамове. Това показва, че емпиричната терапия при тежки инфекции с участие на анаероби трябва винаги да бъде съобразена с лабораторните резултати, или с актуалните данни за чувствителността в държавата, или региона (№ 28А, 42А, 58А)
21. През 2012 г., за първи път в континентална Европа и 29 години след от съобщението във Великобритания (Masfari et al., 1983) е намерен *Clostridioides (Clostridium) difficile* щам в асоциация с анаеробните коки *Peptoniphilus asaccharolyticus* от кожата на glans penis на нелекуван пациент с хроничен баланит. Резултатът показва една допълнителна ниша в човешкия организъм на вече все по-проблемните анаеробни бактерии *C. difficile*. (49А, 63Б)
22. Направена е асоциация между резистотиповете на *C. difficile* при рецидивиращи инфекции като индикатор за необходимо риботипиране, или мултилокусно секвенционно типичане (MLST) за разграничаване на реинфекциите от рецидивите. Проследен е пациент на възраст 15 г. с улцерозен колит и неговите изолати *C. difficile* при обострянията в рамките на две години. Резистотиповете на изолатите през 2016 и 2017 г. се различават, което подсказва реинфекция, която след това се потвърди с MLST като два различни типа, ST49 и ST92. Различията в резистотиповете на бактериите при хронични инфекции налагат необходимостта от молекулярно типичане. Постигна се излекуване на пациента с пулсова терапия с перорален vancomycin за 6 седмици. (87А)

ВЛИЯНИЕ НА СТРЕС ХОРМОНИТЕ ВЪРХУ *H. PYLORI* И АНАЕРОБНИ БАКТЕРИИ

23. За първи път е въведен нов метод за тестване на действието на стрес-хормоните (адреналин) върху *H. pylori* с агар с по-бедна среда (с 2.5% кръв) и инокулум с по-ниска гъстота (1 Mc Farland) от обичайно използваната за тестовете за чувствителност на *H. pylori*. По този начин с два метода беше намерено преобладаващо усилване на щамовия растеж в около 1/2 и >1/3 от изолатите. С подобен метод се установява стимулиране, или инхибиране на растежа и на анаеробни бактерии като *Prevotella intermedia* и *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes*. Определи се, че ефектът на адреналина върху анаеробните и микроаерофилни бактерии е доза зависим, видово зависим и щамово зависим, като вероятно се повлиява от физиологичното състояние на бактериите и/или на мутации.

Резултатите имат клинично значение, защото като стимулират бактериалния растеж, или вирулентност, стрес хормоните като адреналина и норадреналина могат да причинят клинично обостряне на инфекциите. Направен е и обзор с включени наши резултати в областта на новата научна дисциплина-микробната ендокринология (73А, 84А)

БАКТЕРИИ ОТ РАЗРЕД *ENTEROBACTERALES*

24. За първи път е открит AmpC ензим ACT-68 (NCBI GenBank MK568456) при *Enterobacter asburiae* изолат (1/176 изолата *Enterobacter* spp.) определен като клон ST23 на *Enterobacter cloacae* complex. Изолатът е резистентен към множество антибиотици, вкл. бета-лактами, аминогликозиди, хинолони и комбинацията trimethoprim/sulphomethoxazole. (95А)

II. НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ ПРИНОСИ ЗА НАШАТА СТРАНА

H. PYLORI ИНФЕКЦИЯ

1. През 1993-1994 г. е извършено първото в България проучване на разпространението на *H. pylori* инфекцията върху 351 безсимптомни възрастни кръвни донори, при което е намерено високо серопревалиране (82.6%) на инфекцията. Неотдавна направеното второ проучване, 18 години след първото, показва все още висока (72.4%) честота на серопревалиране на инфекцията и наличие на CagA IgG, указващ вирулентни щамове, в около 2/3 от изследваните кръвни донори. Честотата на серопозитивност е свързана с феномена на кохортите (заразяване с *H. pylori* в детска възраст и оттук по-честа инфекция при по-възрастните, в нашето проучване 53.3% в групата на 18-30 г. спрямо >77% при по-възрастните), пола и социално-икономическия статус на изследваните. Инфекцията е по-честа при жените, по-възрастните пациенти, при по-ниско образование на родителите, наличие на братя и сестри и местоживееене в провинцията. Друго проучване на серопревалирането е направено на 165 безсимптомни деца на възраст 1-17 г., от които в 24.2% е доказана инфекцията, а CagA серопревалирането между серопозитивните е 40.0%. Това сочи намаление на инфекцията при по-младите субпопулации поради подобряване на социално-икономическите условия и честа употреба на антибиотици. От друга страна, проблемът с инфекцията в нашата страна все още не е разрешен (№ 4А, 71А, 82А, 6Б)
2. *H. pylori* е изолиран в 14-21% от проби от хранопроводна лигавица, вероятно поради гастроезофагеален рефлукс, което може да има значение за пренасяне на инфекцията. Във второто в световен мащаб проучване по наше знание, не е намерена връзка между стомашната ксантома и *H. pylori*, като в тези случаи инфекцията е много (<0.02%) рядка. В няколко проучвания през годините се установи *H. pylori* инфекцията в около 3/4 от нелекуваните симптоматични възрастни у нас и значително по-рядко при (44.4%) при деца на възраст 3-10 г. В по-късно проучване на 656 педиатрични пациенти през 2020-2017 г., честотата на инфекцията е открита само в 24.5% от децата, което отново показва постепенно намаление на инфекцията у нас. *H. pylori* не се изолира от проби от животни, което подкрепя, че инфекцията е антропоноза. (№ 13М, 3А, 7А, 11А, 31А, 33А, 85А, 2Б, 3Б, 4Б, 14Б, 37Б, 54Б)
3. Честотата на стомашните не-*pylori Helicobacter* видове като *Helicobacter heilmannii* също е проучена, те са открити рядко само в <2% от пробите на симптоматични възрастни и деца, но за втори път (по наше знание) е намерена коинфекция на *H. pylori* и не-*pylori Helicobacter* видове, което показва клиничната роля, макар и рядко, на стомашните *Helicobacter* видове от животински произход за инфекцията в нашата популация. (№ 12М, 7А, 20А, 31А, 11Б)

4. Установено е намаление на ненаситените мастни киселини на фосфолипидите на стомашните клетъчни и бактериалните мембрани при контакта на бактериите с клетките, което е от значение през началата фаза на установяване на инфекцията. (№ 22Б)
5. В PCR проучване на симптоматични болни у нас е намерена много висока честота на гените на вирулентност на *H. pylori*, вкл. на *vacA s1a* (>88%), *cagA* и *oipA* в активен статус (>80%), *cagE* и *iceA1* (>68%) и *babA2* гените (>48%). Вирулентните *cagA*⁺ и *vacA s1* щамове са по-често разпространени у нас в сравнение с други европейски държави. Както и в други проучвания, язвено болните имат най-често щамове с най-вирулентните генотипове. Връзката на местоживеенето в големите градове и щамовата вирулентност следва допълнително да се проучи. Изследвани са 15 есенциални гена на острова на патогеност *cagPAI* на *H. pylori*. Установено е, че интактният (функционален) *cagPAI* е наличен в повечето (в 64.1%) от изследваните изолати и че само 16.7% и 19.2% от тях показват пълно или съотв. частично отсъствие на острова на патогенност. Интактният *cagPAI* е и по-чест при щамове с най-вирулентните *vacA* алели *s1a*, *m1* и *i1*. Въпреки че не е налична връзка на *htrA* гените с типа заболяването, този ген е по-чест при *vacA s1a* и *i1* щамовете, което показва комбинирано действие на тези гени в патогенезата на инфекцията. Доказана е естествена трансформация на маркер за резистентност към metronidazole, което е от значение за смесените инфекции от няколко щама *H. pylori*. (№ 14М, 38А, 41А, 44А, 46А, 79А, 127В)
6. Установено е, че резистентността на *H. pylori* става става все по-малко предсказуема с времето. Периодично са извършвани проучвания върху еволюцията на резистентността на *H. pylori*. Намерено е 3.1-кратно нарастване на честотата на първичната честота на резистентност към clarithromycin и 7.7-кратно нарастване на тази към хинолоните през 2007-2009 г. спрямо 1990-1995 г. Обратно, за tetracycline има намаление на МПК₅₀ от 1990 г. Националната честота на употреба на новите макролиди, хинолони и тетрациклини е в пряка връзка с честотата на резистентност към тези антибиотици. Честотата на clarithromycin нечувствителни щамове е 1.2-1.4 пъти по-ниска от тази към azithromycin, следователно този азалид не трябва да се използва в терапията на *H. pylori* инфекцията. Установено е постоянно повишаване на общата първична clarithromycin резистентност, която от 2005-2007 до 2010-2015 г. продължи (както и в предишни проучвания) да нараства от 17.9 до 25.6%, което налага тестване на щамовата чувствителност преди използването на този антибиотик, особено в тройните схеми за ерадикация на *H. pylori* инфекцията. През 2010-2015 г. обаче вече е намерена и нарастваща първична резистентност и към metronidazole (до 31.5%) и флуорохинолони (до 18.3%), както и тревожна множествена резистентност към 5 антибиотика от различни класове при лекуван пациент. Пост-терапевтични проблеми са честата (≥50%) резистентност на *H. pylori* при възрастни към metronidazole, или clarithromycin, двойната (metronidazole + clarithromycin) резистентност в 42.3% и множествената резистентност, каквато е открита дори при нелекувани деца. По наши данни в публикация от 2015 г. честотата на двойната резистентност е 16.7%, а на множествената резистентност е 4.2% от изолатите. Описан е случаят на три неуспешни опити за ерадикация на *H. pylori* инфекцията от силно вирулентен щам с четворна резистентност, както и друг случай с два неуспешни опита за ерадикация като са дискутирани възможните терапевтични опции. Резултатите подчертават не само ползата, но и все по-голямата необходимост от редовно тестване на щамовата чувствителност преди терапия на пациентите. (№ 16М, 14А, 18А, 27А, 34А, 39А, 40А, 64А, 65А, 69А, 31Б, 43Б, 68Б)

CAMPYLOBACTER ИНФЕКЦИЯ

7. Установено е участието на видове от род *Campylobacter* в 3.7-8.3% от случаите при пациенти с рецидивиращи хронични чревни болести като болест на Crohn, улцерозен колит и хроничен ентероколит и висока резистентност на щамовете към антибиотици. Резултатите сочат, че при хроничните чревни заболявания е особено препоръчителна диагностиката на

кампилобактерните инфекции. Определено е, че *C. jejuni* може да индуцира неутрофилен окислителен взрив в полиморфонуклеарните клетки, което подпомага оздравяване от инфекцията. (№ 6М, 23А, 1Б, 28Б)

АНАЕРОБНИ БАКТЕРИИ

8. Анаеробни бактерии от >10 рода са много често (средно в $\geq 70\%$) изолирани при заболявания като плеврален емпием, белодробен абсцес, максилофациални и хронични жлъчни инфекции, с вариабилна антибиотична резистентност на щамове. Проучена е ролята на анаеробните коки, на *Prevotella* spp. при орофациални инфекции, на по-редките *Bacteroides ureolyticus*, *Campylobacter gracilis* и *Sutterella wadsworthensis* при плеврален емпием, белодробен абсцес и медиастинит и на анаеробите като причинители на инфекция след оментопластика. (№ 5М, 15А, 25А, 28А, 32А, 17Б, 23Б-27Б, 38Б, 42Б, 46Б)
9. Като рискови фактори за антибактериална резистентност на *Prevotella* spp. от болни с орофациални инфекции са определени годината на проучването, националната и вероятно индивидуалната (за tetracycline) консумация на антибиотиците, но също и резистентността на коинфектиращите бактерии. Определена е резистентността на видовете от *B. ureolyticus* групата и MLS_B-индуцибилна резистентност в 27.3% от clindamycin-чувствителните изолати на Грам-положителни анаеробни коки (GPAC). *F. magna* е често откривана и е определена като най-вирулентния и най-резистентен вид между анаеробните коки. Намерена е тройна антибиотична резистентност при GPAC, както и при *S. wadsworthensis*. Установени са големи различия в профилите на резистентност при клостридиалните видове, вкл. високо ниво на резистентност към penicillin при изолати *Clostridium clostridioforme* и *C. ramosum*, към sefoxitin при *C. clostridioforme*, *C. innocuum* и *C. difficile* и към clindamycin в 6 изолата от 6 вида клостридии. Профилите на резистентност на анаеробите към някои антибиотици се различават много между видовете, поради което е необходима идентификация до вид на причинителите на инфекцията. (№ 8А, 15А, 16А, 25А, 28А, 42А, 17Б, 19Б, 23Б)
10. Проучено е носителството на *C. difficile* културелно и с PCR при 61 асимптоматични български деца на възраст 2–17 г., включително педиатрични пациенти и здрави деца. Установена е колонизация с *C. difficile* в малък брой (6.6%) от децата и без наличие на токсигенни изолати. Данните са сравнени с тези в литературата, показващи широки вариации (от 0 до > 45%) на носителството. (90А)
11. Интерес представляват и резултатите от проучването на пациенти с хронични баланити което показва, че анаеробите са 1.6-пъти по-чести при нелекувани симптоматични пациенти с хроничен баланит спрямо контролните пациенти, като най-често са изолирани анаероби от род *Prevotella* и анаеробни коки), което подсказва етиологичната им връзка с развитието на хроничния баланит. Най-активни антибиотици срещу причинителите на баланити са metronidazole и amoxicillin/clavulanate (49А, 63Б)

БАКТЕРИИ ОТ РАЗРЕД ENTEROBACTERALES

12. Намерен е за първи път карбапенемаза продуциращ изолат *Klebsiella pneumoniae* у нас и последващото разпространение на изолати, съдържащи различни карбапенемази. Проучена е множествената антибиотична резистентност на факултативно анаеробни бактерии от разред *Enterobacteriales*. В проучване на 228 резистентни към 3^{та} генерация цефалоспорини изолати *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* е намерена широкоспектърна бета-лактамаза (ESBL) от тип CTX-M, съпътствана от висока честота на резистентност към аминогликозиди и хинолони, но запазено добра активност към fosfomycin и tigecycline на изолатите *E. coli*. Карбапенемаза продуциращите чревни бактерии силно ограничават избора за лекуване на свързаните инфекции. Открити са и са проучени с различни

молекулярни методи (вкл. мултилокусно секвенциално типичане, конюгация и плазмидно репликонно типичане) *K. pneumoniae* щамове произвеждащи *K. pneumoniae* карбапенемаза KPC-2, Verona интегрон-кодирана металобеталактамаза VIM-1 и OXA-48 и разпространението на клон ST15 в болниците, но също и като фекално носителство в 2 от 250 изследвани, което е от епидемиологично значение. За първи път у нас е намерен карбапенем резистентен щам *E. coli* от пандемичния мултилокус секвенциален тип 131 (ST131) продуциращ KPC-2 ензим. Необходими са мониториране на разпространението на тези щамове, тяхната бърза диагностика и строго спазване на всички мерки за контрол на инфекциите. Разкрити са механизмите на хинолоновата резистентност при изолати *Enterobacter* spp. резистентни към цефалоспорици от трета генерация. Най-често намереният маркер е *qnrB*, който може да се пренася заедно с гените за бета-лактамаза и така да се селектират изолати резистентни едновременно към бета-лактами и към хинолони. (54A, 63A, 72A, 76A, 83A, 88A)

ДРУГИ ИНФЕКЦИИ И МИКРООРГАНИЗМИ

13. Определени са честотата и резистентността на бактерии от род *Acinetobacter* изолирани от клинични проби. Проучени са генотипните профили на резистентността на *Streptococcus pyogenes* изолати резистентни към макролиди в асоциация с маркерите за вирулентност. За първи път у нас е установен *msr(D)*, който може да бъде свързан с ефлукс на макролидите (93A, 77B)

III. НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

H. PYLORI ИНФЕКЦИЯ

1. Едни от често изследваните групи пациенти за *H. pylori* инфекцията са най-уязвимите възрастови групи на децата и на най-възрастните пациенти, за които са направени редица проучвания. Определени са специфичните особености на инфекцията за нашата страна при изследване на 656 педиатрични пациенти: сходна честота на инфекцията при деца под 8 г. и при по-големите деца, която подсказва ранно заразяване, по-честа инфекция при момичетата и по-ниска честота при деца с гастроезофагеална рефлуксна болест (ГЕРБ) и жлъчен рефлукс в сравнение с контролите. Въпреки, че инфекцията намалява 2.5 пъти от 1996-2006 до 2010-2017 г., тя все още представлява проблем у нас като се открива при всяко четвърто дете от изследваните, така че трябва да се направят още по-големи усилия за разширяването на диагностиката и подобряване на терапията за ерадикация при децата в нашата страна. (7A, 18A, 20A, 22A, 24A, 75A, 85A, 99A, 8Б, 78Б, 18М, 88Б, 91В)
2. Установени са рисковите фактори за *H. pylori* инфекцията у нас, главно на условията в детска възраст за инфектирането. Много фактори трябва постоянно да се оптимизират напр. икономическият статус, битовите условия, употребата на диетични фактори като кисело мляко и пчелен мед, хигиенните навици и съжителстването на няколко поколения в дома. От друга страна, в нашата страна се забелязва и глобалната тенденция за намаление за честотата на инфекцията при по-младите поколения (у нас 24.2% при децата спрямо 72.4% при възрастните безсимптомни в последните години), както и на честотата на вирулентните щамове (40.0% при децата спрямо 66.7% при възрастните), което е благоприятно като прогноза за една по-ниска честота на пептичните язви и стомашните тумори в бъдеще време (№ 4A, 71A, 77A, 6Б)
3. *H. pylori* инфекцията е установена много често при педиатрични пациенти (76.6%) с анемия срещу 21.3% при децата без анемия и при повечето (82.2%) деца със загуба на тегло срещу 17.8% при останалите деца. Резултатите сочат, че диагностиката и ерадикацията на *H. pylori* инфекцията са наложителни и особено полезни при анемични деца и при тези с отслабване

на тегло. При изследване на симптоматични деца през 2010-2017 г. е намерено, че *H. pylori* инфекцията все още е значителна и засяга всяко пето дете възраст до 7 години (20%), както и че намалява относително бавно, с около 1.8% годишно за период от 21 години (85А, 99А)

4. Доказано е, че културелната диагностика на инфекцията е акуратна дори в групите пациенти на възраст >65 г., при децата и при болните с кървящи язви. В последната група бързият уреазен тест (RUT) трябва да се отчита и по-късно, включително до 48ия час. Повечето болни с кървящи язви имат висока (3+ и 4+) гъстота на инфекцията. Налага се да се прави по-често диагноза и съобразена със щамовата чувствителност терапия на инфекцията при най-малките деца и най-възрастните болни, като се има предвид, че като цяло, културелният метод е установен като по-акуратен метод от директния препарат, лабораторно приготвения RUT и фекалния антигенен тест. Направени са препоръки за вземането и транспортирането на стомашните биопсични проби и за микроскопската и хистологичната диагностика на инфекцията. (№ 5А, 20А, 21А, 33А, 35Б, 41Б)
5. Оптимизирани са диагностичните техники за *H. pylori* инфекцията. Въведени са два модифицирани агарови бързи уреазни теста с висока акуратност ($\geq 86\%$) на 2-ия час инкубация с част от биопсичните хомогенати и те могат да бъдат рутинно използвани. Установено е, че замразени стомашни биопсии от лекувани болни, както и пробите от стомашен мукус са субоптимални за диагностика на *H. pylori* инфекцията и не се препоръчват. За нейното оптимизиране е нужно да се вземе предвид ниската (36.6%) чувствителност на лабораторно приготвения RUT при лекувани болни, да не се съхраняват продължително пробите за фекалния антигенен тест и да се инкубират културите най-малко 10 дни, особено важно при замразени стомашни проби. От друга страна, RUT, хистологията и културелният метод могат да се използват успешно при болни с кървящи язви. Най-надеждни за контрол на *H. pylori* ерадикацията са културелният метод с използване на две среди (селективна и неселективна) за първоначална изолация на *H. pylori* и уреиният дихателен тест ^{13}C UBT. Акуратността на ^{13}C UBT е 90.6% при възрастните нелекувани и 90.3% при лекуваните болни. Необходимо е контролът на ерадикацията да се прави не 4 седмици, а поне 8 седмици след края на терапията, което намалява фалшиво-негативните резултати. Проучени са факторите свързани с фалшиво негативни UBT резултати. Установено е, че фекалният антигенен тест не може да замени културелното изследване поради фактори на пациента вкл. диетата и разграждане на антигена при дълъг престой на бактериите в колона, а RUT също не е оптимален след терапия на *H. pylori* при намален брой бактерии. За подобрение на хистологичната диагностика е успешно използвана комбинация на полу-Грамово оцветяване и цветен жълт филтър. (№ 3М, 13М, 5А, 6А, 20А, 21А, 31А, 33А, 37Б, 41Б, 61Б, 67Б)
6. Молекулярните проучвания показаха, че и двата *cag* гена (*cagA* и *cagE*) на *H. pylori* са свързани с пептични язви в нашата страна, но най-добре се откриват вирулентните щамове с *cagA/cagE* комбинация, или само с *cagE* гена, затова този ген следва да се използва по-често за определяне на риска от тежки заболявания. Установена е ползата от добавянето на втори чифт праймери за доказване на *cagA* гена у нас и в страни с висока честота на *cagA*⁺ щамове, което в наше проучване увеличи намирането на *cagA* в 14.7% от *cagA* негативните щамове. Намерена е връзка на *iceA1* алела със щамовата чувствителност към clarithromycin. Този алел е по-често наличен (74.4%) при чувствителни спрямо резистентни щамове (55.3%). По-рядката clarithromycin резистентност при вирулентните щамове подсказва по-добра ерадикация с clarithromycin-базирани режими на по-вирулентните щамове. Установено е, че статусът на *vacA* i алелите по-добре разкрива щамовата вирулентност от другите *vacA* алели. За разлика от *vacA* s1 и m1, честотата на *vacA* i1 алелът е значително по-висока (75.0%) при болните с пептични язви спрямо тези с неязвени (58.6%) болести. Това показва, че *vacA* i1 е по-надежден от *vacA* s и m алелите за откриване на вирулентни

щамове, които изискват по-агресивна терапия. Честотата на намерения интактен отров на паогенността в нашите изолати *H. pylori* беше висока, но със 16% по-ниска от тази на *cagA*, което показва, че само с *cagA* не може да се съди за състоянието на острова на патогенност. Други гени като *homB* не са подходящи за диагностични цели. (№ 38А, 41А, 44А, 50А, 127В)

7. Модифицираният дисково дифузионен метод (MDDM) и въведените от Л. Боянова метод на тестването на граничните стойности-BST и MDDM с дискове levofloxacin са определени като акуратни методи за тестване на чувствителността на *H. pylori* към макролиди и хинолони. Поради големите зони на инхибиране на *H. pylori* с MDDM, трябва да се изследват само един или два диска на петри. Трябва да се отчита наличието на смесени инфекции и субпопулации на *H. pylori* в част от пациентите. Дори при нелекувани деца, резистентност е доказана към всички тествани антимикробни средства, което налага тестване на чувствителността поне към 4 антибиотика. (№ 16М, 12А, 13А, 18А, 34А, 68А, 48Б, 59Б)
8. Установено е, че azithromycin не показва предимства и не следва да се да се предпочита пред clarithromycin за *H. pylori* инфекцията поради малко по-слабата активност на азалида и субоптималната ($\leq 70\text{--}75\%$) ерадикация. Определена е нуждата от подобряване на сътрудничеството на пациента, което може да спадне с 30% от първия до втория месец след лечението. Потвърди се, че фекалният антигенен тест и RUT отстъпват на културелното изследване за контрол на ерадикацията. Установена е ролята на антибиотично резистентните *H. pylori* щамове за успеха на лечението с балонната дилатация на стенози в горния гастроинтестинален тракт и особено при съобразяване с *in vitro* резултатите за щамовата чувствителност. Представен е алгоритъм за терапия на *H. pylori* позитивни деца с диспептична симптоматика. Установена е честотата на резистентните към рифамицини *H. pylori* изолати у нас при 3.4% от педиатричните и при 7.0% от възрастните пациенти. В режимите за ерадикация не трябва да се използва rifaximin, поради незадоволителна ефективност, но rifabutin-базираните режими са опция за трета линия терапия при инфекции с множествено резистентни *H. pylori*, като трябва се имат предвид обаче и страничните действия на рифамицините. (№ 98А, 21Б, 40Б, 47Б, 60Б, 30В)
9. Проучени са еволюцията на първичната резистентност на *H. pylori* към clarithromycin и хинолони, както и на множествената резистентност, което показва предимството на терапията според щамовата чувствителност и индивидуалния, вместо емпиричния избор на лечение. У нас, болните с кървящи язви имат относително ниска честота на metronidazole резистентност, но е намерена резистентност към всички използвани за ерадикация антибиотици. Лекуваните болни имаха често ($>44\%$) metronidazole резистентни изолати, както и clarithromycin резистентност и 3 до 3.5 пъти по-честа двойна резистентност от нелекуваните. При децата, местожителството е свързано с първична резистентност към clarithromycin. Познаването на рисковите фактори за резистентност на *H. pylori* трябва да се има предвид при избора на емпиричен ерадикационен режим. (№ 18А, 34А, 35А, 39А, 40А, 43А, 48А, 66А, 20Б, 34Б, 43Б, 33В, 34В)
10. С логистична регресия е доказана ползата от разширената анамнеза за избора на емпирична терапия на *H. pylori* инфекцията. Така са намерени множество рискови фактори за антибиотична резистентност на *H. pylori* като възрастта (≤ 65 г.), пола (женски), професията (в здравеопазването), коинфекциите (вкл. респираторни и уроинфекции) и най-вероятно наличието на диабет. Такива данни трябва да се включват в разширена анамнеза на болните. Дадени са опции за емпирична терапия за болните с риск за резистентност. Сравнени са резултатите с използване на граничните стойности за резистентност на EUCAST с предишно използваните и е установена най-висока разлика (3.4%) за amoxicillin. Проучена е активността към linezolid на *H. pylori* като резервен антибиотик при някои множествено резистентни щамове. Линезолидът показва по-слаба активност в сравнение с clarithromycin

и levofloxacin, въпреки че е активен срещу някои (4/11) щамове с резистентност към антибиотика, но за включване в терапията се изисква предварително in vitro тестване на чувствителността към агента. Проучени са и честотите на резистентност към един почти вече „забравен“ антибиотик fosfomycin, както и към rifampin (като показател на чувствителността към rifabutin). МПК₉₀ на clarithromycin и metronidazole са по-високи от тези fosfomycin и rifampin срещу 50 изследвани *H. pylori* изолата, така че в държави, или области с висока резистентност на *H. pylori*, те могат да се имат предвид за някои спасителни (rescue) режими за ерадикация. (48A, 56A, 65A, 66A, 98A)

11. Установена е щамово зависимата активност на някои неантибиотични средства, както и активността им към антибиотично резистентни щамове. Клиничното проучване с колеги от Португалия не показва повишаване на успеха на ерадикация на *H. pylori* при добавяне на *Lactobacillus acidophilus* към тройната схема за терапия при язвено болни. Затова са необходими по-широки клинични проучвания на активните бактериоцин произвеждащи щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и на прополиса, с продължителен и прецизно дозиран прием. Бактериоцин произвеждащите 7 щамове български лактобацили (GLB) могат да бъдат подходящи кандидати за участие в контрола на инфекцията (№ 17M, 19A, 26A, 36A, 43A, виж също т. I/13)
12. Освен благоприятният ефект на редовната консумация на пчелен мед (виж по-горе т. I/15), редовната (поне 1 ден седмично), консумацията на зелен/черен чай също е свързана с по-ниска (OR, 0.45; 95% CI, 0.21–0.95) честота на *H. pylori* инфекцията при нелекувани диспептични пациенти спрямо контролите. Полезните диетични фактори са един лесен, икономичен и приятен начин за подпомагане на контрола на инфекцията и трябва по-широко да се препоръчват. (60A)
13. Въведен е за първи път у нас ¹³C уреинният дихателен тест (¹³C UBT) със собствена апаратура за неинвазивна диагностика на *H. pylori* инфекцията. Определена е DOB (delta over baseline) стойността за пациентите в нашата страна при сравняване с резултатите от 3 други теста според ROC кривата (работната характеристика). Установено е, че неуспехът на терапията при възрастните може да се обясни с антибиотичната резистентност на *H. pylori*, употребата на нестандартни терапии (за 10.5% от лекуваните) и понякога лошото сътрудничество на пациентите. В последващо проучване е установена честотата (41.8%) на инфекцията при 101 нелекувани и 33 лекувани деца и е доказано ранното им заразяване на възраст 3 години. Високата честота (33.7%) на неуспешно излекуваните възрастни и деца (36.4%), при незадоволителна ерадикация (<67%) показва необходимостта от оптимизиране на режимите и сътрудничеството на пациента. (67Б, 76Б)
14. Важни практически изводи от полза за промяна на терапията на *H. pylori* инфекцията са направени в Паневропейското проучване на терапията на *H. pylori* инфекцията Pan-European Registry on *H. pylori* Management (HP-EuReg), в което проф. Боянова е координатор за България (представено по-горе).

CAMPYLOBACTER ИНФЕКЦИЯ

15. Установени са коинфекции на *C. jejuni* с други чревни патогенни видове и рискът от фатален изход при сепсис от *C. jejuni*. Намерена е честа антибиотична резистентност на изолатите от род *Campylobacter*, особено от болни с хронични чревни нарушения, при които има двойна и тройна (28.9%) резистентност. Това налага *Campylobacter* spp. да бъдат рутинно диагностицирани и у нас при пациенти с ентероколит и сепсис. (№ 23A, 1Б, 28Б)

АНАЕРОБНИ БАКТЕРИИ

16. Определена е необходимостта от оптимизиране на изследването на анаеробните хемокултури, вкл. на обема кръв, състава на бульона, тестването на чувствителността на

изолатите и бързото съобщаване на резултатите от β -лактамазния тест. Обоснована е препоръка да се мисли за актиномикоза при рецидивиращи инфекции, неподдаващи се на рутинно прилагана антибиотичната терапия. Описан е случай на възрастен мъж с актиномикоза със 6-месечна продължителност и множество кратки неуспешни терапии, което налага да не се забравя тази инфекция. Установено е, че повечето Грам-позитивни анаеробни коки (GPAC) не растат добре в бульон, затова за рутинно тестване на чувствителността е въведен BST. Намерената честота на много видове анаероби в орофациалните, плевропулмонарните и жлъчните инфекции подчертава необходимостта от анаеробна диагностика в повече болнични центрове. Проучена е диагностиката на периодонтални патогенни бактерии при сравнение на културелния метод и PCR. Установено е, че в анаеробната диагностика е важно резултатите от директния препарат по Грам да бъдат съобщавани на клиницистите дори при липса на бактериален растеж. Видовата идентификация на анаеробите е клинично важна. Участието на най-резистентните анаероби от *Bacteroides fragilis* група е установено дори при инфекции над диафрагмата. (№ 5M, 7M, 8M, 9A, 16A, 25A, 28A, 32A, 57A, 61A, 62A, 18B, 25B, 26B, 29B, 38B, 46B)

17. За втори път в света е доказано, че *Capnocytophaga* spp. може да участва в етиологията на плеврален емпием дори при имунокомпетентни пациенти. Важно е, че антибиотичната резистентност на коинфектиращи бактерии може да предизвика резистентност в анаеробите като *Prevotella* spp., или обратно. Намерено е 3.5 пъти увеличение на clindamycin резистентността на анаеробните коки за период от 16 години у нас. С оглед на нарастващата антибиотична резистентност е проучена чувствителността на анаеробите към два „забравени“ антибиотика - fosfomycin и фузидиева киселина. На базата на собствени проучвания и обобщение на литературни данни е разкрита клиничната значимост, вирулентност и антибиотичната резистентност на най-патогенния вид на Грам-положителните анаеробни коки-*Finegoldia magna*. В трудовете се подчертава динамичната еволюция на резистентността на някои анаероби и нуждата от въвеждане на анаеробната микробиология у нас в повече центрове. (15A, 42A, 58A, 59A, 70A, 23B)
18. Направени са препоръки за оптимизиране на терапията на анаеробните инфекции. Определена е ползата от терапията според *in vitro* данните за щамова чувствителност на тежки периодонтити и плеврален емпием, както и тази от нови/оптимизирани терапевтични методи като оментопластика и трансторакален дренаж по Моналди за плевропулмонарни инфекции. Доказано е, че успешното лечение на актиномикозата зависи от продължителната терапия, съобразена и с резистентността на коинфектиращите анаероби. Открити са множество резистентни щамове *Finegoldia magna* и *Sutterella wadsworthensis* и ampicillin/sulbactam нечувствителни щамове *B. fragilis* група и *Prevotella oralis*, което силно ограничава избора на антибиотици за терапията. Двата почти „забравени“ антибиотика – fosfomycin и фузидиева киселина могат да бъдат от полза самостоятелно (fosfomycin), или в комбинация (за фузидиевата киселина) за лечение на инфекции над диафрагмата от clindamycin-резистентни анаероби, след предварително *in vitro* тестване на щамовата чувствителност. (№ 8A, 28A, 57A, 59A, 61A, 17B, 18B, 23B, 25B, 26B, 38B, 21B, 28B, 29B)
19. Намерената активност на българския прополис към множество видове анаероби, вкл. полирезистентен щам, трябва да предизвика медицински интерес и проучвания на агента за профилактика и като допълнение в терапията на някои орални, кожни и раневи инфекции. (№ 29A, 39B)
20. Обобщени са ползите и подробни препоръки за дозата и продължителността на прилагането на пробиотици по време на и след антибиотичната терапия за различни инфекции. Установено е, че $\leq 4.5\%$ от пациентите изследвани за *H. pylori* имат не-*pylori* гастрални

хеликобактери от животински произход в стомаха. Свърхрастеж на *Candida* spp. се откри в 24.1% от фекалните проби от лекувани болни, изпратени за диагностика на *Campylobacter* spp. Затова се подчертава правилната употреба на пробиотиците, които трябва да бъдат вземани поне 2-4 часа след дозата антибиотик и поне 1-3 седмици след антибиотичната терапия, както и че тяхната употреба трябва да се избягва само при тежко имунокомпрометирани пациенти, или недоносени новородени. (47А- тази статия е препечатана в последствие от Medscape: <http://www.medscape.com/viewarticle/763157>)

21. На базата на собствени проучвания и литературни данни е определена необходимостта от разширени проучвания на действието на стрес хормоните (катехоламините) и техните механизми върху растежа и експресията на растежа и вирулентността на анаеробните бактерии, както и на биологичните последици за човешкия организъм в условия на стрес. Така проучването на микробната ендокринология на анаеробните бактерии може да бъде от полза за много голям брой медицински специалности. (73А)

БАКТЕРИИ ОТ РАЗРЕД *ENTEROBACTERALES*

22. Установено е нарастващо разпространение на ESBL и карбапенемаза продуциращи *E. coli* и *K. pneumoniae* в наши болници и наличие на фекално носителство на такива бактерии, което налага много предпазлива употреба на 3та генерация цефалоспорици и карбапенеми, съобразно антибиотичната политика, както и да се спазват всички препоръки на ESCMID от 2014 г. Проучено е синергичното действие на различни антибиотици с colistin със скрининг тест и с метода на El-Azizi върху резистентни изолати *K. pneumoniae*. Установено е синергично действие на комбинациите colistin-rifampicin в 36% и на colistin-gentamicin в 20%. Резултатите са от значение и терапевтична полза за избора на комбинирана терапия в случаите на множество резистентни бактерии като карбапенем резистентните *K. pneumoniae*, защото в някои случаи това може да бъде една от последните опции за терапия. Намерено е фекално носителство на ESBL продуциращи *E. coli* и *K. pneumoniae* с множествена резистентност в 27% от пробите от хоспитализирани по друг повод пациенти и при здрави изследвани. Процентът на фекалните носители в това проучване е 2.7 пъти по-висок от средния (10%) в Европа, което може да са свърже с честата консумация на цефалоспорици в нашата страна. Необходимо е да се ограничи честата употреба на цефалоспорици у нас и да се спазват стриктно мерките за контрол на инфекциите. (54А, 63А, 72А, 76А, 71Б, 74Б, 75Б)

ДРУГИ ИНФЕКЦИИ И МИКРООРГАНИЗМИ

23. Проучена е честотата и чувствителността на аероби/факултативни анаероби от болни с тежък хроничен периодонтит и болни с оментопластика за постпневмонектомичен емпием. Определени са честотите и антибиотичната чувствителност на причинителите на бактериемия с хемокултурелната диагностика Bactec, както и тези на изолати от университетска болница по ортопедия, за която е предложена смяна на penicillin и ampicillin с β -лактами/ β -лактамазни комбинации и намаляване на употребата на tetracycline. Описана е диагностиката на рядко срещаната у нас риносклерома и на периодонтити, свързани с *Aggregatibacter aphrophilus*. (№ 7М, 8М, 62А, 12Б, 16Б, 25Б, 21В)
24. Анализирани са причинителите, най-честите инфекции и антибиотичната резистентност при болни от диабет, както и специфичните терапевтични и профилактични мерки в тази група пациенти. Подчертано е, че хипергликемията ≥ 11.1 mmol/l (≥ 200 mg/dl) при диабетно болните води до имунна супресия по няколко различни механизми и трябва да не се допуска. Определен е рискът от животозастрашаващите инфекции като некротизиращи мекотъканни инфекции, емфизематозен пиелонефрит, емфизематозен холецистит и малигнен отит, както и рискът от периперативни инфекции в тази група. При тези пациенти са от най-голямо значение ранната диагноза, незабавната и агресивна антибиотична терапия и хирургична

обработка при някои от инфекциите. Обосновава се профилактиката на инфекциите при тези пациенти, напр. на орални имуностимуланти за жените с безсимптомна бактериурия и рекурентни уроинфекции, рутинен скрининг за инфекции на краката и биоцидни превръзки при наличие на такива, използването на пробиотици и добрия постоперативен контрол на глюкозата при хоспитализираните болни. (51A)

25. В ръководствата за студенти по медицинска микробиология са представени съвременните методи за диагностика и интерпретацията на резултатите за клинично важни инфекции. В монографиите за *H. pylori*, едната от които издадена във Великобритания (Caister Academic Press), се обсъждат предимствата, недостатъците, опциите за избор и специфичността на методите използвани за инфекцията. Разглеждат се ролята на микробиологичната диагностика при тежки инфекции като плеврален емпием и най-важните проблеми на инфекциозната патология като цяло. В главата за Manual of Clinical Microbiology (MCM13) на American Society for Microbiology- ASM Press, “Approaches to the Identification of Anaerobic Bacteria” са представени, актуализирани и описани в най-големи детайли методите за диагностиката на анаеробите, от класическите до най-съвременните като MALDI-TOF MS и 16S rRNA генното секвениране с цел по-широко внедряване на анаеробната микробиология в много повече лаборатории и центрове. Сравнени са предимствата и недостатъците на методите за тестване на антибиотичната чувствителност, възможностите и ограниченията за тяхната приложимост, различията в граничните стойности за резистентност на CLSI и EUCAST, както и насоките за въвеждане на дисково-дифузионния метод, досега използван само в аеробната диагностика, което силно ще може да улесни работата с облигатните анаероби. (1M-5M, 10M-24M)