

РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ (РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ И НАУЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ)

на

на д-р Цветан Борисов Велинов, д.м.,
главен асистент в отдел Микробиология,
Национален Център по Заразни и Паразитни Болести – София

НАУЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ НА ТРУДОВЕТЕ

1. Национален надзор на етиологичната структура, микробната резистентност и антибиотична консумация в България **BulSTAR - Bulgarian Surveillance Tracking Antimicrobial Resistance**

През 1997 г. стартирахме националната програма **BulSTAR**, като един от ключовите моменти в борбата за ограничаване и намаляване на лекарствената резистентност. С нея установихме степента на сериозност на проблема с микробната резистентност на национално ниво и мястото ни сред другите държави членки на Европейския съюз. През годините се увеличаваха и участниците в надзора 1997 г. - 45 лаборатории.; 2002 г. - 52. С цел да се постигне все по-голямо покритие на населението през следващата година се включват още 27 лаборатории (общо 79 участници). През 2004 г. броят на участниците достига до 103. През 2011 година в **BulSTAR** участват **166** микробиологични лаборатории: петте медицински катедри, 59 МБАЛ, 10 СБАЛ, 14 РЗИ и 70 частни лаборатории с покритие на 22 812 легла от общо 38 506 легла за активно и интензивно лечение от национален леглови фонд или покритие от 59,24 %. [**15С, 19С, 32С, 35С, 38С, 39С, 6К, 16К, 28К, 30К**]

1.1. Етиологична структура

1.1.1. Сепсиси. Анализирани са данни от проучване за периода 1997-2005 г., на базата на средно 45 000 хемокултури годишно от които положителни са между 4,4 и 5,1%. Хемокултурите представляват 4,8% от всички проби анализирани в микробиологичните лаборатории. Водещите изолати за България са *S.aureus* 19.3%, *E.coli* 15.4%, *Pseudomonas* и *Acinetobacter spp.* 13.8%, CNS 12.4%, *Enterococcus spp.* 7.5 %, *C.albicans* 5.1% и др. Разлика се наблюдава в етиологичната структура на сепсисите в болници на 500 легла и по-малките болници, като при последните *K.pneumoniae* е третия по значимост изолат. Запазва се тенденцията Грам – положителните и Грам-отрицателните изолати да заемат паритетни дялове в етиологията. Положителна тенденция наблюдаваме в нивата на метицилин резистентните стафилококи, които гравитират между 13-15 % средно за страната, както и стабилизирането на пневмококовата резистентност под 10 % средно за страната. Наблюдаваме ръст на продукцията на широко-спектърни бета-лактамази от представителите на род *Klebsiella* от 37,8% през 2003 до 70 % през 2011г. Трябва да се отбележи и ниският брой на хемокултурите които се изследват в българските болници. [**35С, 36С, 9К, 23К, 25К**]

1.1.2. Пневмонии. Етиологичната структура е изготвена на базата на 13737 изолата за 2002 г., 17351-2003, 17048 – 2005г., 17616 – 2008, 14623 – 2011г. Водещ причинител на пневмониите придобити в обществото, както и на тези свързани с болничен престой е *S.pneumoniae* (35,7% и 34,8% съответно), следван от *S. aureus* и *K.pneumoniae* в обществото и *K.pneumoniae* и *P. aeruginosa* в болниците. Сравнявайки етиологичната структура със

структурите на тези заболявания в западно-европейските страни, прави впечатление големият брой стафилококови изолати у нас, дължащ се вероятно на ниската профилактика на остри вирусни инфекции на горни дихателни пътища. [23С, 24С, 25С, 27С, 34С, 49С, 7К, 18К]

1.1.3. Уроинфекции. Възпаленията на пикочо-половата система е най-честата инфекциозна патология, както в амбулаторната практика, така и в болнични условия. Изборът на антибиотик често се прави емпирично и натрупването на база данни за етиологичната структура и трендовете в резистентността на най-честите патогени дава научната основа за правилната стартова терапия. Системно се анализират средногодишно между 50 и 60 хил. Изолата от урини, което е една четвърт от общия брой постъпили урини за изследване. Водещ причинител и при двата пола е *E.coli* (62,8 % жени амбулатория, 56,2% жени болница; 44,9% мъже амбулатория, 46,1% мъже болница – VulSTAR 2010), втори по честота е *Proteus mirabilis*, а на трето място *Klebsiella pneumoniae*. За последните десет години наблюдаваме една трайна тенденция за намаляване процента на изолираните *E.coli* и при жените и при мъжете, за сметка на увеличаване брой *Proteus spp.*. Тенденция наблюдавана и в други страни и свързана със слабата профилактика на бъбречно-каменната болест. При анализа на резистентността правят впечатление няколко факта: високите нива на резистентност на *E.coli* към ампицилин и триметоприм/сулфаметоксазол (55,65 % и 27,7% съответно) при амбулаторните изолати. Сред болничните изолати процентът на ESBL – продуциращи ентеробактерии е висок - сред *E.coli* изолатите 6.0 % при жени и 11.6 % при мъже, а при *Klebsiella spp.* съответно 13.8 % при жени и 26.9 % при мъже, особено в отделения където има свръхупотреба на трето-генерационни цефалоспорици. [31С, 49С, 20К]

1.1.4. Раневни инфекции и инфекции свързани с хирургична намеса (SSI). До 2005 година данните за раневите инфекции се събираха заедно, а след 2005 г. бяха отделени SSI. Според VulSTAR, тенденцията за най-често изолиране на *E.coli* и *Staphylococcus aureus* се запазва през целия период на мониторинг, като през 2010 г. честотата на изолиране и на двата микроорганизма достига около 26% за всеки. Голям дял имат също *P.aeruginosa* и ентерококите, които се нареждат съответно на 3-то и 4-то място. Като цяло се наблюдава неблагоприятната тенденция за по-често изолиране на Грам-отрицателни микроорганизми, начело с *E.coli* и други представители на сем. Enterobacteriaceae, също и неферментативните *P.aeruginosa* и *A. baumannii*, на които се падат близо 61% от всички изолати, а това е ясен сигнал за неблагоприятното хигиенно състояние на нашите хирургични отделения. Делът на анаеробните бактерии, изолирани от този тип инфекции, е нисък - и у нас, и в Европа – движи се под 1 %.[28С, 29С, 30С, 48С]

1.1.5. Остър среден отит при деца. В проучването са взели участие 11 ото-рино-ларинголога от 4 столични болници. За микробиологичен анализ се приемаха само ексудат от средно ухо при спонтанна руптура на тъпанчевата мембрана или при тимпаноцитеза при деца до 10 г.. *S.pneumoniae* се изолира при 48,1% от случаите, *H.influenzae* – 29.6%, *M.catarrhalis* – 11.1% и *S.pyogenes* – 3.7%. [43С, 50С, 33К]

Серотипизиране на инвазивни *S.pneumoniae* изолати. При направено мащабно проучване на инвазивни пневмококови изолати за периода 2009 -2010г. за установяване на персистиращите серотипове, бе установено следното разпределение: Серотип 19F (16,7%), следван от серотип 1 (11,7%), 4 (8,3%), 6В, 23F, 9V и 3 по (5,6% всеки) и серотипове 18С, 7F и 6А по 2,8%. [42С]

1.2. Мониторинг на микробната резистентност

1.2.1. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* е микроорганизъм, който колонизира кожата на около 30% от здравите носители. При определени условия може да предизвика тежки инфекции. MRSA има потенциал да се разпространява много бързо в болнична среда и

понастоящем представлява труден за контролиране проблем в много страни от Европа и света. На голям риск са подложени хората с компрометиран имунитет. Появата на MRSA може да доведе до удължен болничен престой и по-висока смъртност, най-вече заради ограничената ефективност на лечението. Този микроорганизъм е най-често идентифициран като мултирезистентен. Данни от BulSTAR показват положителна тенденция относно процент на MRSA сред изолати на *S. aureus* в България - намалява от 13,9% през 2002 до 5,4% през 2008 г. Това се дължи главно на повишена осведоменост по проблемите с MRSA, увеличените усилията за контрол на инфекциите и хигиена на ръцете, както и на променената антибиотична политика в болниците в страната. Годишния доклад за 2007 на European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) показва, че седем държави-членки съобщават за значително намаляване процента на MRSA сред *S. aureus* от инфекции на кръвта. [8С, 20С, 21С, 19К, 31К]

1.2.2. *Streptococcus pneumoniae* е чест причинител на заболявания, особено при малки деца, възрастни хора и лица с компрометирана имунна система. Клиничният спектър обхваща инфекции на горни дихателни пътища като синусит, отит като заболяванията могат да се усложнят и да се стигне до пневмония и инвазивни инфекции като менингит. Според BulSTAR от 1997 г. той е водещият причинител на пневмонии, отити и менингити. До началото на 90-те години на миналия век повечето клинични изолати *S.pneumoniae* са универсално чувствителни на penicillin, но впоследствие се появяват първите пеницилин-нечувствителни *S.pneumoniae* (Penicillin non-susceptible *S.pneumoniae* - PNSSP) и започват да се разпространяват повсеместно. Заедно с появата на PNSSP в различни части на света се появяват съобщения за изолиране на щамове пневмококи с множествена резистентност освен към бета-лактами, така и към други класове антибиотици като макролиди, хлорамфеникол, тетрациклини и триметоприм/сулфаметоксазол. Положителна тенденция е постепенният спад от 2004 година с 37.7% до 15.2 % през 2011 година според данните на BulSTAR, които оформят средните стойности за страната. [8С, 42С, 18К, 19К]

1.2.3. *E.coli* е най-честия изолат в клиничната микробиологична практика и е разпространен патоген както в болничната, така и в извънболничната среда. *E.coli* е най-честият причинител на амбулаторни (69%-2001г.; 65%-2005г.; 57,1%-2011г.) и болнични уроинфекции(56,7%-2001г.; 57%-2005г.; 54,4%-2011г.), причинява раневи инфекции и инфекции свързани с оперативна намеса (23,5%-2011г.), изолира се често от хемокултури и е един от най-важните патогени, свързани с хранителни токсикоинфекции. [8С, 19К]

1.2.4. *K.pneumoniae* също е един от най-честите Грам-отрицателни изолати в микробиологичните лаборатории, а в последните години показва много висок потенциал за развитие на резистентност, особено към цефалоспорините. Това прави този бактериален вид и един от най-честите причинители на вътреболнични инфекции (ВБИ). Най-честите причинявани инфекции са уринарния (10,3%-2011г) и на респираторния тракт (13,7%-2011г.). Те се свързват с опортюнистични инфекции при хора с нарушен имунен статус. Групата на широко-спектърните бета-лактамази (Extended-spectrum beta-lactamases) или ESBL) обуславят резистентност към повечето пеницилини и цефалоспорини. Много често микроорганизмите произвеждащи ESBL проявяват кръстосана резистентност и към аминокликозиди и флуорохинолони. Най-често съобщавани като продуценти на ESBL са на първо място видовете от род *Klebsiella*, следвани от *E.coli*. Резистентността към съвременните широкоспектърни β -лактамни антибиотици, медирана от широкоспектърни β -лактамази, е един непрекъснато нарастващ проблем в световен мащаб. Според данните на BulSTAR през последните 5 години отрицателна е тенденцията за изолирането на щамове *K.pneumoniae* продуценти на ESBL, от 5% за 2002 г. и достигат до 21% за 2010г. Докато при *E.coli* нивата са по-стабилни и се движат

около 5-6%. Данните са средните стойности за страната от всичките тествани изолати. [8С, 19К]

1.2.5. *Pseudomonas aeruginosa* е опортюнистичен патоген, който предизвиква инфекции в човешкия организъм при различни нарушения на имунната система като трансплантации, HIV/СПИН - положителни, както и при пациенти със съпътстващи системни заболявания - муковисцидоза, диабет, карциноми и др. Той причинява респираторни инфекции (средни нива между 10 и 12 % от болничните пневмонии за периода 1999 – 2011 г.), инфекции свързани с хирургична намеса (средни нива между 7 и 10 % за периода 2005 – 2011 г.), сепсиси (средни нива между 4 и 11 % за периода 2001 – 2011 г.) и други най-вече като болнични инфекции, свързани с хоспитализация или друга здравна дейност. *P. aeruginosa* съчетава вродена и придобита резистентност към голям брой групи антибиотици, в т.ч. β-лактами, аминогликозиди и флуорохинолони. Според данни от надзора на резистентността, чувствителността на този бактерия остава константна за последните десет години към карбапенеми (около 90%), наблюдаваме спад на резистентността към gentamicin от 45% през 2004 г. до 26,7% през 2011 г., стабилни са и нивата на резистентност към флуорохинолони около 20%. [8С]

1.2.5. New Delhi metallo-beta-lactamase. Във връзка с участие в международен проект за проучване разпространението на New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1), е извършван надзор за разпространението на този ензим в Европа. NDM-1 е описана за пръв път 2008г. В отделни изолати *Klebsiella pneumonia* при пациент репатриран в Швеция след лечение в Ню Делхи, Индия. Използвани бяха данни събрани на анкетен принцип след попълване на въпросник от страна на кореспондиращите лица за съответните страни. Събрани бяха данни от всичките 29 страни членки на Европейският съюз, Исландия и Норвегия. Общо 77 случая са докладвани от 13 страни за периода 2008 г. до 2010 г.. *Klebsiella pneumonia* е микроорганизма най-често докладван (54%), като продуцент на този ензим. [41С]

1.3. Надзор на антибиотичната консумация

Данните за годишната консумация на антибиотици в България бяха получени от Intercontinental Marketing Services Health Inc. (IMS-Health). Консумацията на антибиотици за системна употреба в болниците е 570 DDD (Defined Daily Doses) на 100 легло/дни, като най-често изписваните антибиотици са от групата на цефалоспорините с 284 DDD на 100 легло/дни и то за сметка на цефалоспорини от трета генерация (174 DDD на 100 легло/дни). На второ място се нарежда групата на пеницилините с 98 DDD на 100 легло/дни, като 53 DDD на 100 легло/дни е дяловото участие на пеницилини с инхибитори на бета-лактамази. На трето място се подреждат аминогликозидите с 48 DDD на 100 легло/дни. Данните от BulSTAR показват, че според употребата на антибиотици в болничната система, нашата страна се нарежда на едно от последните места по количество консумирани антибиотици сред Европейските страни. Различното при нас е структурата на консумираните антибиотици. Огромният процентен дял на цефалоспорините води до селективен натиск върху представителите от сем. Enterobacteriaceae и това се отразява на ръста на широко-спектърните бета-лактамази продуцирани от бактериите представители на това семейство. [16К, 37К, 38К]

Редовното публикуване на тези данни на страницата на Българската Асоциация на Микробиолозите(БАМ) www.bam-bg.net, в специализирани научни списания и ежегодното им дискутиране на конгресите на БАМ, дава възможност на широк кръг специалисти да се възползват от тях.

2. Проучване активността на антимикробни средства към изолати с проблемна резистентност

2.1. Cefoperazone/Sulbactam. В това проучване сме си поставили за цел да проверим антимикробната активност на комбинацията cefoperazone/sulbactam към клинични изолати с проблемна резистентност.

Тествани бяха 171 бактериални изолата от хора (хемокултури, раневи секрети, трахеални аспирати, урини и др.), 97 полirezистентни *P.aeruginosa*, 52 MDR *A. baumannii* и 22 - *K.pneumoniae* продуценти на ESBL. Минималната потискаща концентрация на cefoperazone и cefoperazone/sulbactam беше установена чрез метода за разреждане на антибиотик в агар според изискванията на NCCLS. Чувствителност на MDR *P.aeruginosa* - според минималната потискаща концентрация (МПК) на cefoperazone/sulbactam 10,8% от щамовете *P.aeruginosa* са резистентни с МПК $\geq 64/32$ mg/L. Останалите са чувствителни с МПК между 2/1 mg/L и 16/8 mg/L. Чувствителност на MDR *A. baumannii* - 0.5% от щамовете *A. baumannii* са резистентни на cefoperazone/sulbactam с МПК $>64/32$ mg/L. Останалите са с МПК между $<0,125+0,25$ и 16/8 mg/L. 95,45 % от тестваните щамове *K.pneumoniae* показаха чувствителност на тестваната комбинация. [10К]

2.2. Daptomycin. В настоящето изследване са използвани общо 100 клинични изолата, включващи 60 щама *S.aureus* (MRSA) и 40 щама *Enterococcus spp.* (20 бр. *Enterococcus faecium*, 15 бр. *Enterococcus faecalis* и 5 бр. *Enterococcus avium*), изолирани в различни медицински центрове от цялата страна. Всички щамове са неповтарящи се, и са събрани през периода 1998-2007 г. Идентификацията беше извършена чрез стандартни биохимични тестове, Ари® 20 Strep и Ари® Staph (bioMerieux® SA). Суха субстанция Daptomycin (Hospira Inc., Kansas, USA, произведена за Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland 97,84 %), беше тестван според критериите и указанията на Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Определен бе MIC към *E.faecium* - 0,25 - 2 µg/ml., MIC към *E.faecalis* - 0,25 - 1 µg/ml, MIC към *E. avium* - 1 µg/ml и MIC към *S.aureus* - 0,125 - 1 µg/ml. За тестване бяха подбрани щамове, доказани като MRSA. Всичките определени минимални инхибиращи концентрации бяха по-ниски от препоръчителните гранични стойности (breakpoints) според стандарта на CLSI за 2007 година, за съответните микроорганизми. [40С, 32К]

2.3. Tigecycline. Tigecycline е нов глицилцикличов антибиотик с потенциална активност към широк спектър Грам-пол. и Грам-отр. микроорганизми. Направено бе проучване на активността на препарата към 187 неповтарящи се клинични: *Staphylococcus aureus* (70), *Enterococcus spp.* (24), *Escherichia coli* (37), *Klebsiella pneumoniae* (36) и *Acinetobacter baumannii* (20), събрани за периода 2009-2010 г. Идентификацията беше извършена чрез стандартни биохимични тестове и мануални идентификационни системи Ари® (bioMerieux® SA). Тестването бе извършено и интерпретирано според критериите и указанията на Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Всичките щамове *S. aureus* показаха МПК ≤ 0.5 µg/ml. *Enterococcus spp.* - 0.12 µg/ml - 0.25 µg/ml; демонстрирана бе и много висока активност на препарата към *E. coli* и *K. pneumoniae* продуценти на ESBL. Само един изолат *A. baumannii* прояви резистентност към tigecycline с МПК 8 µg/ml. [44С]

2.4. Ceftobiprole. Във връзка с участие в международен проект CLASS бе извършено проучване за определяне граничните стойности на бактерии с проблемна резистентност към ceftobiprole (пето-генерационен цефалоспорин), изолирани в 10 клинични центрове в България, за периода 2009-2010 г. Анализирани са общо 100 изолата: *S. aureus* - MSSA и MRSA; коагулазо негативни стафилококи methicillinsusceptible(MS) CoNS и MR-CoNS vancomycin-resistant и vancomycinsusceptible *E. faecalis*; MDR *S.pneumoniae* (резистентни на два или повече от следните антибиотици: penicillin; второ-генерационни цефалоспорини; macrolides; tetracyclines и trimethoprim/sulfamethoxazole); *Streptococcus spp.* От groups A, B, C и G ; *Haemophilus influenzae*; *E. coli*; *K.pneumoniae*; *Enterobacter spp.*; и *P. aeruginosa*. Не установихме резистентност сред стафилококовите, стрептококовите и хемофилусни изолати. Щамове *E. coli*; *K.pneumoniae*; *Enterobacter spp.*, продуценти на широко-спектърни бета лактамази, показаха относително високи МПК, същото се наблюдава и псевдомонасните изолати. [46С]

3. Микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на резистентност на *S.aureus* и НФГБ с проблемна резистентност

3.1. НФГБ. *P. aeruginosa* *Acinetobacter* spp. Резистентност на *P. aeruginosa* към антимикробни лекарствени средства се свързва с разнообразни и различно съчетаващи се механизми: продукция на индуцибелна цефалоспориноза, тясноспектърни и широкоспектърни β -лактамази; дерепресия на AmpC β -лактамаза; мутации във външномембранни протеини; синтез на аминокликозид-модифициращи ензими; структурни промени на мишените на флуорохинолоните, детерминиращи високо ниво на устойчивост към този клас антибиотици. При рутинно изследване на ESBL продукция с модифициран двойно-диск тест, бяха открити *P.aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. изолати, резистентни на цефтазидим и с положителен ДД-тест. С PCR анализ с PER-1, VEB-1, TEM и SHV специфични праймери, установихме наличието на *bla*_{per-1} гена при четири изолата *Acinetobacter*. [8К]

С цел установяване разпространението на VEB1 бета-лактамазата в клинични изолати *P.aeruginosa* в България, бяха тествани 342 цефтазидим резистентни щамове от колекцията на НРЛ КМАР за периода 1999-2005 г. изолати от 22 български болници. След използване на скринингови методи за продукция на ESBL, бяха определени 117 щамове за генетичен анализ. Идентификацията на щамове бе потвърдена на VITEK-1 automated system (bioMerieux). За контрол на чувствителността бе използван *P. aeruginosa* ATCC 27853, а за положителна PCR контрола - *P.aeruginosa* BM 4492. Използвайки специфични праймери за *bla*_{veb-1} ген (VEB-1 ACGA CTT CCA TTT CCC GAT, VEB-1B GCGCA CTC TGC AAC AAA TAC GC), чрез метода на PCR, бе доказано присъствието на този ген при 36,8% (43/117) от тестваните щамове. При всичките изолати *bla*_{veb-1} положителни описахме интересен феномен – синергизъм между карбапенемите и широкоспектърни цефалоспориноли. Проучването доказва широкото разпространение на този ензим сред *P.aeruginosa*. Такова широко разпространение в литературата е описано сред щамове изолирани във Виетнам и Кувейт, но не и сред изолати от съседните ни страни, като Турция и Гърция. [4К, 17К, 27К]

B.cereus. Изпитана бе чувствителността на 149 щамове *B.cereus* complex към 23 антимикробни средства с цел оптимизиране избора на препарати при лечението на заболявания причинени от този микроорганизъм. Определянето на минималните инхибиращи концентрации (МИК), бе направено чрез метода на серийни разреждания в агар. Тествани бяха бета-лактами, аминокликозидни и хинолонови антибиотици, polymyxin и комбинацията trimethoprim/sulfamethoxazole. Въз основа на стойностите на МИК, всички изолати бяха определени като чувствителни на azlocillin, piperacillin, ceftazidim и meropenem и резистентни към комбинацията ampicillin/sulbactam, аминокликозиди и polymyxin. Проучените щамове *B.cereus* complex, показаха необичайна in vitro чувствителност към антипсевдомонасните пеницилини, цефалоспоринолите от трета и четвърта генерации, карбапенемите, trimethoprim/sulfamethoxazole и флуорохинолоните. Най-висока активност оценена чрез стойностите на МИК₉₀, показаха меропенем, цефтазидим, пиперацилин и азлоцилин, което ги прави средство на избор за лечение на *B.cereus* complex инфекциите. [22К]

3.2. *S.aureus*. Идентифицирането на метицилин резистентните стрептококи (MPC) има голяма значимост за правилната етиотропна терапия. Целта на проучването бе да се сравни дифузионният тест (DDT), оксацилин-скрин агаровият тест и ПВР за доказване на mecA ген при диагностицирането на MPC. Бяха тествани 50 избрани клинични изолати (41 *S.aureus* и 9 *S.epidermidis*), определени като MPC с DDT. От общо изследвани 41 *S.aureus* при 23 щамове бе доказано наличието на mecA ген, като този резултат кореспондира и с тестването на скрин агара с изключение на два щамове, които бяха определени като чувствителни с фенотипните методи. При *S.epidermidis* mecA ген бе доказан при 6 щамове и тук два щамове бяха определени

като чувствителни с фенотипните методи. Директното демонстриране на *mesA* ген, дава сериозни доказателства за метицилиновата резистентност при стафилококите. Поради силното влияние на редица фактори от околната среда, фенотипните методи могат да се окажат недостатъчни за прецизната диагноза на този тип резистентност. PCR метода е по-чувствителен, по-точен и по-бърз за доказване на *intrinsic resistance* при стафилококите, детерминирана от *mesA* ген. [16С,12К]

4. Система за управление на качеството в микробиологичните лаборатории

4.1. Външна оценка на качеството. Качеството е степента на съответствие между очакванията и реализацията, синоним на постоянство. Осигуряването на еднакви продукти или услуги по всяко време. Програмите за качествен контрол са ефективен начин за подържане стандартите на диагностичните лаборатории в цял свят и обновяването на тези стандарти, когато е необходимо. През 1999г. в България стартирахме програма за външна оценка на качеството на дейностите в микробиологичните лаборатории. Участие в първият контролен цикъл взеха 28 лаборатории на РЗИ (бивши ХЕИ), 17 лаборатории на многопрофилни болници за активно лечение и 4 университетски лаборатории. Контролните цикли се провеждат два пъти годишно и оценяват възможностите на контролираните лаборатории за идентификация на микроорганизмите и чувствителността им към антимикробни средства. Целта на външната оценка бе да подобри локалните диагностичните процедури и да стандартизира методите за определяне на микробна чувствителност. Резултатите от първото проучване демонстрираха извести слабости в диагностичния процес. 12% от участниците демонстрираха отлични резултати, 28,5% - много добри, а 18,36% не успяха да покрият минималните изисквания. Резултатите от последните проучвания за 2011 г., в които участваха около 300 лаборатории, показаха много добри резултати. Над 90% от лабораториите не допускат грешки при идентификацията на микроорганизмите и над 85% докладват стандартизирани и правилно интерпретирани антибиограми. Провежданите регулярно междулабораторни сравнителни проучвания демонстрираха като повишаване качеството на предлаганата услуга, но и доведоха до увеличаване на теоретичната и практическа подготовка по отношение на новостите в диагностичния процес в микробиологичните лаборатории. [10С, 1К, 5К]

4.2. Дискowo-дифузионен метод за определяне на лекарствена чувствителност. С цел стандартизиране на лабораторните методи за определяне на лекарствена чувствителност изготвихме инструкция за дискowo-дифузионен метод за определянето ѝ на клинично значими микроорганизми. Една от най-важните дейности на клиничната микробиологична лаборатория е определянето чувствителността на микроорганизмите към антимикробни химиотерапевтици. Целта на тестовете за чувствителност е *in vitro* определяне успеха на терапията с конкретен антимикробен агент на пациент с дадена, етиологично доказана инфекция. От друга страна, тестовете за чувствителност са необходими за откриване и проследяване на клинично значима антимикробна резистентност при микроорганизмите, предизвикващи инфекции. В настоящето описание на дискowo-дифузионния метод са представени всички основни елементи на антибиограмата, които трябва да бъдат контролирани, както и някои насоки за правилната интерпретация на резултатите от тестовете за чувствителност. [22С, 35К]

4.3. НИС КМНИ. Изработена е и внедрена в практиката софтуерна програма „Националната Информационна Система за Клинична Микробиология и Надзор на Инфекциите (НИС КМНИ)”. Програмата дава големи възможности да се събират и анализират база данни за етиологията, резистентността, консумацията на антибиотици, регистрацията на нозокомиалните инфекции и др., както локално за лечебното заведение, така и за страната. В програмата е заложили механизми за: алармиране при неправилно интерпретиране на антимикробната

чувствителност; регистрация на вътреболнични взривове; хистограми за следене нивата на зоните на здръжка на антибиотичните дискове; финансови анализи и др. [26К, 29К]

5. Лабораторна диагностика, типирание и епидемиология на инфекциите

5.1. *Francisella tularensis*. Установена бе първата епидемия от туларемия на територията на Република България. Очертани бяха границите на ендемично огнище, от което през годините се появяваха епидемични или спорадични случаи на заболяването. Направена бе епидемична характеристика на взрива, като бе установен източника на инфекция и начина на предаване. [5С] Бяха проучени и сравнени диагностичните възможности на произведени у нас диагностикуми за туларемия, в обстановка на епидемия. Установена бе по-висока чувствителност на реакцията непряка хемаглутинация в сравнение с реакция аглутинация, което я прави по-пригодна за скринингова диагностика на това заболяване. Предложени бяха и модификации на хранителните среди за първично изолиране, които допринасят за ускоряване на етиологичната диагноза с няколко дни. Методиката за индиректна имунофлуоресценция за серологична диагностика на заболяването е с висока чувствителност и специфичност и при придобиване на определени умения, може да се използва за бърза серо-диагностика. [14С] Разработена бе и апробирана в практиката, модифицирана хранителна среда за определяне на чувствителността на туларемийните бактерии към химиотерапевтици, която отговаря на всички критерии за стандартизирана тест среда. Определени бяха граничните стойности на най-често използваните в практиката антимикуробни средства към *F.tularensis*. [47С] Установена бе резистентност на всичките изолирани в България щамове *F.tularensis*, към бета лактамни антибиотици и макролиди. Предложена бе оптимизирана схема за профилактика и лечение на туларемията, на базата на определените гранични стойности на антибиотичите. Разработихме и въведохме в практиката PCR метод, за бърза етиологична диагноза на заболяването. Разработихме AFLP – PCR метод [фингърпринтинг] за видова и щамова дискриминация на туларемийни бактерии, като с посочения метод постигнахме добро разграничаване на изолатите от последната епидемия в сравнение с други изолати от България. [26С, 33С, 14К, 15К] За пръв път в света установихме ендосимбионтното развитие на туларемийни бактерии с *T.pyriformis*. [1Д, 2С, 2К]. [1М]

5.2. *Vibrio cholerae*. Чрез метода на полимеразно верижната реакция, за пръв път в България беше доказано наличието на ген, отговорен за продукцията на холерен токсин при 23 щамове *V.cholerae* от различни серо- и биотипове. Идентификацията на щамовете бе потвърдена с рутинни биохимични тестове, а биотиповете определихме чрез използването на специфични бактериофаги. Използваните от нас специфични праймери за детекция на *ctxA* - ген детерминиращ синтезата на субединица А на холерния токсин, се оказаха подходящи за изследването на щамове от различни географски региони. Същият протокол за генетичен анализ използвахме и при проучването на *V.cholerae*O139 – щам причинител на холероподобни заболявания и разпространил се бързо в края на 1991 г. на целия Индийски полуостров. До появата на този щам в световната научна литература не се срещаха данни за токсигенни щамове вибриони, които да не са „O1” серогрупа. Остава дискусабилен въпроса дали *V.cholerae*O139 е от групата на неаглутиниращите с „O1” вибриони придобил ген за токсигенност или е видоизменен *V.cholerae* b. *ElTor*. [3С, 4С]

5.3. *Brucella melitensis*. При рутинно изследване на хемокултура от болен с ендокардит през м.март 2002 г., изолирахме *Brucella melitensis*. Идентификацията на микроорганизма бе направена на базата на типичния растеж върху хранителните среди за изолиране, микроскопска характеристика, вкл. директна имунофлуоресценция с специфични антители, рутинни биохимични методи и чрез VITEK-1 automated system (bioMerieux). Диагнозата бруцелоза бе

потвърдена и от направените имунологични изследвания – аглутинационни тестове тип Видал и Грубер и непряка хемаглутинация. [11К]

5.4. Микроскопични гъбички.

Pityrosporum ovale. През 80-те години на миналото столетие, в медицинската практика се наложи схващането, че *P. ovale* (липофилна гъбичка с медицинско значение), е етиологичен агент на себорейният дерматит. С цел изясняване етиологичната му роля, проведехме култивирането на материали от 20 болни (17 с pityriasis versicolor и трима с себорейен дерматит) върху среда на Faergemann. При 17 от тях за пръв път в България изолирахме *Pityrosporum ovale*. Тримата болни, при които посевките останаха негативни бяха с pityriasis versicolor alba. [1С]

Геотрихозата е системно заболяване, проявяващо се предимно при хора в имуен дефицит и много наподобява кандидозата. В България до този момент не са правени проучвания за разпространението на *Geotrichum candidum*, като етиологичен агент на пневмонии и мукокутанни инфекции. За периода 1995-1998 г. са изследвани 98 храчки и 67 посеви от уста при пациенти с предполагаема микотична инфекция. *Geotrichum candidum* е изолиран при 15 пациента (8 материала от храчки и 7 от уста). След десет дневен курс с Nizorale, се наблюдаваше значително подобрение на клиничната картина. Идентификацията бе проведена с рутинни техники. [6С]

Доказването на антигени се превръща в често използван метод за доказване на системни микози. Проучени са чувствителността и специфичността на латекс аглутинационни тестове за доказване на системни кандидоза, аспергилоза и криптококоза. В проучването са тествани 34 серумни проби с доказани съответно 17 системни кандидози, 7- криптококози и 10 – аспергилози; 25 ликвора на пациенти с криптококов менингит; 10 храчки и 5 БАЛ на пациенти с аспергилоза, както и 10 серума от здрави лица. Потвърдената бе висока специфичност и чувствителност на латекс аглутинационните тестове. [7С, 11С, 13С]

Сравнени са три вида хранителни среди (Chlamydospore agar, Corn Meal, оризов агар) за култивиране на гъбичките от род *Candida* с цел установяване на морфологични различия между отделните представители. Най-добри диагностични възможности демонстрира Corn Meal агар, който можем да го предложим като предпочитан метод за видова морфологична идентификация на дрожди от род *Candida*. [9С]

Настъпилите промени в етиологичната структура на системните микози причинени от дрожди с медицинско значение, налага точната идентификация на тези патогени.

Методите за **определяне лекарствена чувствителност** in vitro дават възможност за оценка на относителната активност на два или повече антимикотика и корелират с активността in vivo. Проучването е направено на 60 изолата от 11 вида дрожди: *Candida albicans*-15, *Candida parapsilosis* -4, *Candida pseudotropicalis* -2, *Candida krusei*-3, *Candida rugosa* -8, *Candida lipolytica*- 3, *Rhodotorula rubra* - 17, *Rhodotorula glutinis* – 2, *Cryptococcus laurentii* – 1, *Cryptococcus luteolus* – 1, *Cryptococcus neoformans* – 4 щама. Идентификацията бе направена със системата Auxacolor (Bio-Rad), а проверката на чувствителността с Fungitest (Bio-Rad). И двата теста доказаха в хода на изследването своята бързина, точност и лесна приложимост. Определени са и МПК на 277 *Candida* изолати от хемокултури чрез използването на Е-тестове и микродилуционния кит Micronaut-AM (Merlin). МПК на fluconazole, отчетена на 24–48 h са: 0.75–2 mg/L за *C. albicans*, 12–32 mg/L за *C. glabrata*, 1.5–3 mg/L за *C. parapsilosis*, 48–64 mg/L за *C. krusei*. МПК за voriconazole е: 0.023–0.032 mg/L за *C. albicans*, 3–6 mg/L за *C. glabrata*, 1–2 mg/L за *C. parapsilosis*, 2–3 mg/L за *C. krusei*. [12С, 18С, 3К, 13К, 24К]