

**ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ  
ORIGINAL ARTICLES**

**ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА НОЗОКОМИАЛНИ  
КАРБАПЕНЕМ-РЕЗИСТЕНТНИ ИЗОЛАТИ *ACINETOBACTER BAUMANNII*  
ЧРЕЗ МОЛЕКУЛЯРНОГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ И ТЕХНИКИ,  
БАЗИРАНИ НА ЦЕЛОГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНЕ**

Т. Стратева<sup>1</sup>, А. Стратев<sup>2,3</sup>, Св. Димов<sup>4</sup>, А. Колевски<sup>5</sup>, С. Пейков<sup>1,4,6</sup>

<sup>1</sup>Катедра по медицинска микробиология „Чл.-кор. проф. д-р Иван Митов, дмн“, Медицински факултет, Медицински университет – София

<sup>2</sup>Клиника по анестезиология и интензивно лечение, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София

<sup>3</sup>Катедра по анестезиология и интензивно лечение, Медицински факултет, Медицински университет – София

<sup>4</sup>Катедра „Генетика“, Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

<sup>5</sup>Централна лаборатория по микробиология, УМБАЛ „Александровска“ – София

<sup>6</sup>Лаборатория БиоИнфоТех, София Тех Парк – София

**EPIDEMIOLOGICAL TYPING OF NOSOCOMIAL  
CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLATES  
BY MOLECULAR GENETIC METHODS  
AND WHOLE-GENOME SEQUENCING-BASED TECHNIQUES**

T. Strateva<sup>1</sup>, A. Stratev<sup>2,3</sup>, S. Dimov<sup>4</sup>, A. Kolevski<sup>5</sup>, S. Peykov<sup>1,4,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology “Corr. Mem. Prof. Ivan Mitov, MD, DMSc”, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia

<sup>2</sup>Clinic of Anaesthesiology and Intensive Care, UMHAT “Sv. Ivan Rilski” – Sofia

<sup>3</sup>Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia

<sup>4</sup>Department of Genetics, Faculty of Biology, Sofia University “Sv. Kliment Ohridski”

<sup>5</sup>Central Laboratory of Microbiology, UMHAT “Alexandrovska” – Sofia

<sup>6</sup>BioInfoTech Laboratory, Sofia Tech Park – Sofia

**Резюме:**

Целта на настоящото проучване е извършване на епидемиологично типизиране на нозокомиални карбапенем-резистентни изолати *Acinetobacter baumannii* (CRAB) от четири университетски болници в България чрез молекулярногенетични методи и техники, базирани на целогеномно секвениране (WGS). Бяха изследвани общо 80 CRAB (2014–2024 г.), предварително идентифицирани с автоматизирани системи. Методологията включваше: определяне на антимикробна чувствителност, полимеразна верижна реакция (PCR) за откриване на гени за карбапенемази, WGS, мултиплекс PCR за идентификация на секвенционни групи и международни клонове (ICs), мултилокусно секвенционно типизиране (MLST), KL (локус за капсулен полизахарид) и OCL (локус за външномембранен коров липополизахарид) типизиране. Проучените CRAB бяха категоризирани като изолати с множествена (8.8%), екстензивна (52.5%) и екстензивна + трудна за лечение антимикробна резистентност (38.8%). Бяха установени придобити карбапенемази от клас D със следната честота на разпространение: 92.5% OXA-23-like,

<p><b>Ключови думи:</b></p> <p><b>Адрес за кореспонденция:</b></p>	<p>3.8% OXA-24/40-like и 3.8% OXA-23-like + OXA-24/40-like. WGS доказа OXA-23 и OXA-72 (група OXA-24/40-like). Резултатите от мултиплекс PCR показаха превес на IC2 (76.7%), следван от секвенционна група G5 (15%). При WGS-базиран MLST анализ на 20 CRAB изолата, деветнадесет принадлежаха към секвенционен тип (ST) 2 (IC2) и един към ST636 (IC2). ST2 се беше асоцииран с OCL1 и няколко KL типа (KL9, KL77, KL2 и KL3), докато ST636, съответно с OCL2 и KL40. В заключение, проведеното епидемиологично типизиране на CRAB изолати разкрива явно доминиране на IC2 (общо 82.5%, определени чрез двете групи методи) и глобалния високорисков клон ST2 (95%) в мониторираните болници за проследения 10-годишен период. KL типизирането е ценен инструмент, притежаващ висока дискриминационна способност за разграничаване на нозокомиални изолати <i>A. baumannii</i> по хронология и място на изолиране.</p> <p>карбапенем-резистентни изолати <i>Acinetobacter baumannii</i>, мултиплекс PCR за идентификация на секвенционни групи и клонове, целогеномно секвениране, типизиране чрез мултилокусно секвениране, KL типизиране, OCL типизиране, международен клон 2, глобален високорисков клон ST2</p> <p>Проф. д-р Тая Стратеева, дмн, Катедра по медицинска микробиология „Чл.-кор. проф. д-р Иван Митов, дмн“, Медицински факултет, Медицински университет – София, ул. „Здраве“ № 2, 1431 София, България; e-mail: strateva_tv@medfac.mu-sofia.bg</p>
<p><b>ORCID ID:</b></p>	<p><a href="https://orcid.org/0000-0002-5197-1849">https://orcid.org/0000-0002-5197-1849</a> Tanya Strateva,  <a href="https://orcid.org/0009-0001-3856-4536">https://orcid.org/0009-0001-3856-4536</a> Alexander Stratev,  <a href="https://orcid.org/0000-0002-2564-2427">https://orcid.org/0000-0002-2564-2427</a> Svetoslav Dimov,  <a href="https://orcid.org/0000-0001-9431-9511">https://orcid.org/0000-0001-9431-9511</a> Slavil Peykov</p>
<p><b>Abstract:</b></p> <p><b>Key words:</b></p> <p><b>Address for correspondence:</b></p>	<p>The present study aimed to perform epidemiological typing of nosocomial carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> (CRAB) isolates from four university hospitals in Bulgaria using molecular genetic methods and whole-genome sequencing (WGS)-based techniques. A total of 80 CRAB (2014-2024) preliminary identified by automated systems were investigated. Methodology included: antimicrobial susceptibility testing, polymerase chain reaction (PCR) to detect carbapenemase-encoding genes, WGS, multiplex PCR to identify sequence groups and international clones (ICs), multilocus sequence typing (MLST), KL (capsular polysaccharide locus) and OCL (outer core lipooligosaccharide locus) typing. CRAB studied were categorized as isolates with multidrug (8.8%), extensive drug (52.5%), and extensive drug + difficult-to-treat antimicrobial resistance (38.8%). Acquired class D carbapenemases were identified with the following prevalence rates: 92.5% OXA-23-like, 3.8% OXA-24/40-like, and 3.8% OXA-23-like + OXA-24/40-like. WGS proved OXA-23 and OXA-72 (OXA-24/40-like group). Multiplex PCR results showed a predominance of IC2 (76.7%), followed by sequence group G5 (15%). In WGS-based MLST analysis of 20 CRAB isolates, nineteen belonged to sequence type (ST) 2 (IC2) and one to ST636 (IC2). ST2 was associated with OCL1 and several KL types (KL9, KL77, KL2, and KL3), while ST636, with OCL2 and KL40, respectively. In conclusion, the conducted epidemiological typing of CRAB isolates revealed a clear dominance of IC2 (82.5% overall, as determined by both groups of methods) and the global high-risk ST2 clone (95%) in the monitored hospitals over the 10-year follow-up period. KL typing is a valuable tool with high discriminatory power to distinguish nosocomial <i>A. baumannii</i> isolates by chronology and site of isolation.</p> <p>carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates, multiplex PCR to identify sequence groups and clones, whole-genome sequencing, multilocus sequence typing, KL typing, OCL typing, international clone 2, global high-risk clone ST2</p> <p>Prof. Tanya Strateva, MD, PhD, DMSc, Department of Medical Microbiology “Corr. Mem. Prof. Ivan Mitov, MD, DMSc”, Faculty of Medicine, Medical University of Sofia, 2 Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria; e-mail: strateva_tv@medfac.mu-sofia.bg</p>

## ВЪВЕДЕНИЕ

*Acinetobacter baumannii* е аеробен, неферментиращ глюкоза грам-отрицателен бактерий, широко разпространен в околната и болничната среда. През последните десетилетия *A. baumannii* се утвърждава като силно обезпокоителен нозокомиален агент, особено в отделенията за интензивни грижи (Intensive Care Units – ICUs), където причинява тежки инфекции, свързани с медицинското обслужване (ИСМО) и продължителни, трудноконтролируеми вътреболнични взривове, в това число пневмония, свързана с механична вентилация (Ventilator-associated pneumonia – VAP), болнично придобита пневмония, инфекции на кръвния ток (Bloodstream infections – BSIs), инфекции на уринарния тракт, раневи инфекции и менингити [1]. В годините на пандемия той е докладван като един от водещите етиологични причинители на вторични бактериални инфекции, VAP и BSIs, засягащи критично болните пациенти с COVID-19 [2].

Почти всички клинични щамове *A. baumannii* проявяват резистентност към голям брой антимикробни лекарствени средства (АМЛС) и дезинфектанти и притежават способност за прикрепване към повърхности в болничната среда, устойчивост към изсушаване и образуване на здрави биофилми [3]. Понастоящем карбапенемите, признати за терапия на избор при инфекции, причинени от *A. baumannii* с множествена лекарствена резистентност (MDR-AB), демонстрират глобална неефективност [4]. По тази причина карбапенем-резистентният *A. baumannii* (CRAB) е определен от Центъра за контрол и профилактика на заболяванията като „спешна заплаха за общественото здраве“ и попада в списъка на Световната здравна организация като патоген с „критичен приоритет“ за проучване и създаване на нови, ефективни антибиотици [5, 6]. CRAB-асоцираните инфекции носят значителна тежест за системите на здравеопазване, включително продължителен болничен престой, повишена смъртност, повишена честота на прием в ICU и повторен прием в болница, като всички тези фактори увеличават значително икономическите разходи на вече натоварените системи [7, 8]. Нарастващото разпространение на CRAB е довело до приблизително 326 000 смъртни случая през 2019 г. в световен мащаб [9]. Съвременните тенденции сочат висока честота на инфекциите, причинени от CRAB, MDR-AB и *A. baumannii* с разширена (екстензивна) лекарствена резистентност (XDR-

AB), както и възникване на панрезистентни *A. baumannii* (PDR-AB), за които възможностите за ефективно лечение са силно ограничени [10].

В допълнение към своята забележителна резистентност към много АМЛС *A. baumannii* се характеризира със склонност към клонално разпространение. В продължение на пет десетилетия неговата еволюция се движи главно от два глобални или международни клона (International Clones – ICs) с висок риск (IC1 и IC2) [11]. Към момента са идентифицирани единадесет ICs (IC1–11), с най-широко разпространение на IC2, който обичайно включва CRAB с придобита OXA-23 карбапенемаза от клас D [12–14].

Епидемиологичното типизиране на *A. baumannii* е базирано на богат репертоар от генотипни методи: AFLP (amplified fragment length polymorphism) анализ, PFGE (гел електрофореза на ДНК в пулсово поле), MLVA (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis), rep-PCR (repetitive extragenic palindromic PCR), генотипизиране на единичен локус, трилокусно секвенционно типизиране, мултилокусно секвенционно типизиране (MLST) по схемите Oxford и Pasteur, типизиране според плазмиден профил и острови на патогенност и новогенерационно целогеномно секвениране (whole-genome sequencing – WGS) [15].

Целта на настоящото проучване е да се извърши епидемиологично типизиране на нозокомиални CRAB изолати, получени предимно от ICUs на четири университетски болници в България в периода 2014–2024 г., чрез молекулярногенетични и WGS-базирани методи.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### Бактериални щамове

Проучени са 80 неповтарящи се CRAB, изолирани в периода 2014–2024 г. от университетски болници в София и Варна, както следва: УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (n = 57), УМБАЛ „Александровска“ (n = 12), Военномедицинска академия (ВМА) (n = 9) и УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна (n = 2). От тях 92.5% (74 / 80) бяха получени от ICU пациенти. Разпределението на изолатите по материали е следното: трахеобронхиален аспират (n = 47), кръв (n = 9), гърлен секрет (n = 8), ранев секрет (n = 7), ликвор (n = 4), хрчка (n = 2), централен венозен катетър (n = 2) и урина (n = 1).

Като контролен щам при изпитване чувствителността на изолатите към АМЛС беше из-

ползван *A. baumannii* ATCC 19606 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

### **Идентификация на изследваните щамове**

Видова идентификация на изследваните изолати беше извършена чрез автоматизирани системи VITEK 2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), BD Phoenix M50 (BD, Franklin Lakes, NJ USA) и MALDI Biotyper Sirius (Bruker, Bremen, Germany). Изпълнението на процедурите беше според изискванията на фирмата производител.

### **Изпитване на чувствителност към АМЛС**

Чувствителността на изолатите беше тествана чрез определяне на минимални потискащи концентрации (МПК) с градиентен метод (MIC Test Strip; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) или метод на серийни разреждания в бульон (Sensi Test Colistin; Liofilchem). Получените резултати бяха интерпретирани според ежегодните препоръки на Европейския комитет за тестване на антимикробната чувствителност (EUCAST) (<https://www.eucast.org/>). Поради липса на критерии в документите на EUCAST, касаещи чувствителността на *A. baumannii* към ampicillin-sulbactam, изолатите бяха категоризирани по критериите на американския Институт по клинични и лабораторни стандарти (CLSI) (<https://clsi.org/>).

### **Дефиниране на категории “MDR-AB”, “XDR-AB”, “PDR-AB” и “A. baumannii с трудна за лечение резистентност”**

Категоризирането на терапевтично проблемните *A. baumannii* се основава на следните групи АМЛС: аминогликозиди (amikacin, gentamicin, tobramycin), антипсевдомонадни карбапенеми (imipenem, meropenem, doripenem), пеницилини + β-лактамазни инхибитори ampicillin-sulbactam), антипсевдомонадни флуорохинололи (ciprofloxacin, levofloxacin), инхибитори на фолатния път (trimethoprim-sulfamethoxazole), тетрациклини и полимиксини (colistin, polymyxin B). Според най-широко използваните критерии, като MDR-AB се определят изолатите с придобита нечувствителност към поне 1 препарат в 3 или повече от изброените групи АМЛС; XDR-AB – нечувствителните към поне 1 препарат във всички, с изключение на 2 или 1 от изброените групи; и PDR-AB – нечувствителните към всички посочени АМЛС [16].

Според критериите на Дружеството по инфекциозни болести на САЩ категорията “*A. baumannii* с трудна за лечение резистентност – DTR-AB”

включва изолатите, които са интермедиерни или резистентни към всички антипсевдомонадни широкоспектърни цефалоспорини, карбапенеми, ampicillin-sulbactam и флуорохинололи [17].

### **Изолиране на ДНК**

Изолиране на обща ДНК от проучените CRAB изолати беше извършено чрез DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilgen, Germany) според инструкциите на производителя от 3-mL 24-часова течна култура в Brain Heart Infusion (Liofilchem), получена от единична колония.

### **Полимеразна верижна реакция (PCR) за откриване на гени, кодиращи карбапенемази**

При изследваните CRAB изолати беше извършен PCR-базиран скрининг за откриване на гени, кодиращи следните карбапенемази: карбапенем-хидролизиращи β-лактамази от клас D (CHDLs) (оксацилинази от групи OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA-58, OXA-143 и OXA-235), метало-β-лактамази (MBLs) от клас B (IMP, NDM и VIM типове) и KPC тип карбапенемази от клас A. PCR беше провеждана в обем 25.0 μL, като крайната концентрация на микса за всяка проба съдържаеше 2 μL ДНК, 0.1 μM от всеки праймер, 12.5 μL AllTaq Master Mix (QIAGEN) и 8.5 μL ултрачиста PCR H<sub>2</sub>O (QIAGEN).

Олигонуклеотидите, използвани като праймери за амплификация, и амплификационните протоколи са подробно описани в предходно наше проучване [18].

### **Целогеномно секвениране (WGS)**

Избрана група от CRAB изолати (n = 20) от ICUs на четирите университетски болници бяха подложени на WGS с цел установяване на конкретния ензимен вариант на откритите чрез PCR карбапенемази, както и за извършване на MLST и типизиране на база KL (capsular polysaccharide) и OCL (outer core lipooligosaccharide) локуси. Процесът включваше произволна фрагментация на изолираната ДНК с помощта на устройство Covaris g-TUBE и последваща селекция чрез магнитни перли до средна дължина на фрагментите от 200-400 bp. Получените фрагменти бяха поправени в краищата, 3'-аденилирани, лигирани към специфични за избраните платформи адаптери и PCR-амплифицирани, за да се изготвят секвенционните библиотеки за всяка проба. Впоследствие те бяха секвенирани с помощта на платформата

MGISEQ-2000 (BGI Group, Hong Kong, China) в режим на прочити с 2 x 150-bp скачени краища.

### Биоинформатичен анализ

Генерираните секвенционни прочити в двойки FASTQ файлове бяха качени в свободно достъпната онлайн платформа за биоинформатични анализи Galaxy (Galaxy Version 2.19.0, <https://usegalaxy.eu>), където бяха проведени всички по-нататъшни стъпки по контрол на качеството, сглобяване и оценка на сглобените „драфт“ геноми на изследваните CRAB посредством интегрираните инструменти FastQC v0.11.9, Trimmomatic v0.38, SPAdes v3.12.0 и Quast v5.2.0.

### Резистомен анализ

Получените „драфт“ геномни контиги от изследваните CRAB изолати бяха проверени за детерминанти на антимикробна резистентност (AMR) чрез инструмента ABRicate (Galaxy Version 1.0.1), при използване на следните настройки: NCBI Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database, минимална ДНК идентичност (70%) и минимално ДНК покритие (60%).

### Мултиплекс PCR-базиран метод за идентификация на секвенционни групи и международни клонове на *A. baumannii*

Епидемиологично типизиране на 60 нозокомиални CRAB изолата (2017–2022 г.) беше извършено по метода на *Turton et al.*, основаващ се на две мултиплексни PCR за откриване на алелни вари-

анти в три гена под селективен натиск: *ompA* (кодиращ външномембранен протеин A), *csuE* (част от Csu пилусната система, участващ в образуване на биофилм) и *bla*<sub>OXA-51-like</sub> (вродена карбапенемаза от клас D). Праймерните двойки, използвани за амплификация в двете групови мултиплексни реакции, са представени в табл. 1, а за тяхното провеждане беше приложен следният протокол: начална денатурация на 94 °C за 3 min; последвана от 30 цикъла на денатурация за 45 s на 94 °C, хибридизация на праймерите за 45 s на 57 °C и елонгация на веригата за 1 min на 72 °C; и терминална елонгация на веригата при 72 °C за 5 min [19].

За определянето на секвенционните групи и клонове беше използвана схемата на *Karah et al.* [20], която е показана в табл. 2.

### MLST типизиране

Беше извършен MLST анализ на сглобените „драфт“ геномни секвенции при 20 CRAB, подложени на WGS, чрез интегрирания в платформата Galaxy MLST инструмент (Galaxy Version 2.19.0, <https://usegalaxy.eu/>).

Секвенционните типове (STs) бяха определени по Pasteur MLST схема (<https://pubmlst.org/organisms/acinetobacter-baumannii>), базирана на идентификация на вътрешните региони на следните *housekeeping* гени: *cpn60* (60-kDa шаперонин), *fusA* (фактор на елонгация EF-G), *gltA* (цитрат синтаза), *purG* (СТР синтаза), *recA* (фактор на хомоложна рекомбинация), *rplB* (50S рибозомален протеин L2) и *groB* (РНК полимераза, субединица B).

Таблица 1. Олигонуклеотиди, използвани като праймери за амплификация в мултиплексните полимеразни верижни реакции (multiplex PCR) за идентификация на секвенционни групи и международни клонове на *A. baumannii*

Праймерна двойка	Нуклеотидна последователност (5' – 3')	Размер на продукта (bp)
<b>Група 1 multiplex PCR</b>		
Group1ompAF306 Group1/2ompAR660	GATGGCGTAAATCGTGGTA CAACTTTAGCGATTTCTGG	355
Group1csuEF Group1csuER	CTTTAGCAAACATGACCTACC TACACCCGGGTTAATCGT	702
Gp1OXA66F89 Gp1OXA66R647	GCGCTTCAAATCTGATGTA GCGTATATTTGTTTCCATTC	559
<b>Група 2 multiplex PCR</b>		
Group2ompAF378 Group1/2ompAR660	GACCTTTCTTATCACAACGA CAACTTTAGCGATTTCTGG	343
Group2csuEF Group2csuER	GGCGAACATGACCTATTT CTTCATGGCTCGTTGGTT	580
Gp2OXA69F169 Gp2OXA69R330	CATCAAGGTCAAACSTAA TAGCCTTTTTTCCCATC	162

Таблица 2. Схема за определяне на секвенционни групи (международни клонове) на *A. baumannii* според комбинациите от ампликони в две multiplex PCR, насочени към гените *ompA*, *csuE* и *bla*<sub>OXA-51-like</sub>

Група (G)	Група 1 multiplex PCR			Група 2 multiplex PCR		
	<i>csuE</i> (702 bp)	<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> (559 bp)	<i>ompA</i> (355 bp)	<i>csuE</i> (580 bp)	<i>ompA</i> (343 bp)	<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub> (162 bp)
G1 (IC2)	+	+	+	-	-	-
G2 (IC1)	-	-	-	+	+	+
G3 (IC3)	+	+	-	-	+	-
G4	-	+	+	-	-	-
G5	-	-	+	-	-	-
G6	+	-	-	-	+	+
G7	-	-	+	+	-	-
G8	-	+	+	+	-	-
G9	-	-	+	+	-	+
G10	-	+	-	+	+	-
G11	-	-	-	-	+	+
G12	-	+	-	-	-	-
G13	+	-	+	-	-	-
G14	+	+	-	-	-	-

multiplex PCR – мултиплексна полимеразна верижна реакция; IC – международен клон.

### KL и OCL типизиране

Определяне на KL и OCL типове на CRAB изолатите беше извършено чрез Kaptive Web v1.3.0 (<https://kaptive-web.erc.monash.edu/>), който представлява инструмент за *in silico* типизиране на бактериални локуси за синтез на повърхностни структури, съответно капсулен полизахарид и сърцевинен (коров) липоолигозахарид във външната мембрана [21, 22].

## РЕЗУЛТАТИ

### AMR на изследваните изолати *A. baumannii*

Всички изследвани изолати (n = 80) демонстрираха резистентност към карбапенемите имипенем и меропенем (МПК в диапазона 16 – >32 mg/L и МПК<sub>50/90</sub> >32 mg/L). От тях 8.8% (7 от 80) бяха определени като MRD-AB, 52.5% (42 от 80) – като XDR-AB, а 38.8% (31 от 80) показваха XDR + DTR профил на AMR. Най-висока *in vitro* активност беше отчетена при colistin (липса на резистентни изолати).

### PCR и WGS-базиран скрининг за карбапенемаза-кодиращи гени

Във всички CRAB изолати бяха доказани *bla*<sub>OXA-51-like</sub> гени за вродена CHDL. Честотата на

разпространение на придобитите CHDLs беше следната: 92.5% OXA-23-like, 3.8% OXA-24/40-like и 3.8% OXA-23-like + OXA-24/40-like. Идентифицираните *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub>-съдържащи щамове (самостоятелно или в комбинация с *bla*<sub>OXA-23-like</sub>) бяха изолирани във ВМА (n = 4), УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (n = 1) и УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна (n = 1). Продуцентите на карбапенемази от група OXA-23 произхождаха от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (56 от 57 включени в проучването) и УМБАЛ „Александровска“ (всички 12 изолата). Изследваните CRAB бяха отрицателни за други CHDL гени, като *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-143-like</sub> и *bla*<sub>OXA-235-like</sub>. Не бяха открити MBL гени (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> и *bla*<sub>NDM</sub>), както и детерминанти, кодиращи KPC тип карбапенемази от клас A.

Проведеното WGS на 20 CRAB изолата от ICUs идентифицира вродената CHDL от група OXA-51 като OXA-66, всички карбапенемази от група OXA-23 като OXA-23 и един OXA-72 ензим, отнасящ се към група OXA-24/40, доказан в изолат Aba190 от Университетската болница във Варна (2019 г.).

### Определяне на секвенционни групи и клонове чрез мултиплекс PCR метод, откриващ алелни варианти в *ompA*, *csuE* и *bla*<sub>OXA-51-like</sub> гени

На типизиране чрез гореспоменатия молекулярногенетичен метод бяха подложени CRAB,

събрани за 5-годишен период, а именно 5 изолата от пациенти в четири различни клиники на ВМА (2017 г.) и 55 изолата (2017–2022 г.) от няколко отделения и клиники на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Получените резултати от двете групови мултиплексни PCR бяха обобщени и интерпретирани с приложение на схемата на *Karah et al.* [20]. В табл. 3 е представен пълен списък на типизираните CRAB изолати заедно с отчетените резултати и принадлежността им към секвенционни групи и ICs. В проследения период доминираше IC2 (76.7% от изследваните изолати), следван от G5 (15%). Останалите секвенционни групи (G13, G3

(IC3) и G4) бяха представени от единични CRAB изолати (фиг. 1).

Въпреки малкия брой типизирани изолати от ВМА е видно, че 5 CRAB от 5 различни клиники показваха принадлежност към 4 различни секвенционни групи. В периода 2017-2022 г. в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ беше установен превес на IC2 (81.8%), следван от G5 (12.7%) и G13 (5.5%). Редките секвенционни групи бяха открити предимно сред изолатите от интензивното отделение за лечение на пациенти с COVID-19 (5 от общо 7 CRAB, принадлежащи към G5 и 2 от общо 3 CRAB, относящи се към G13).

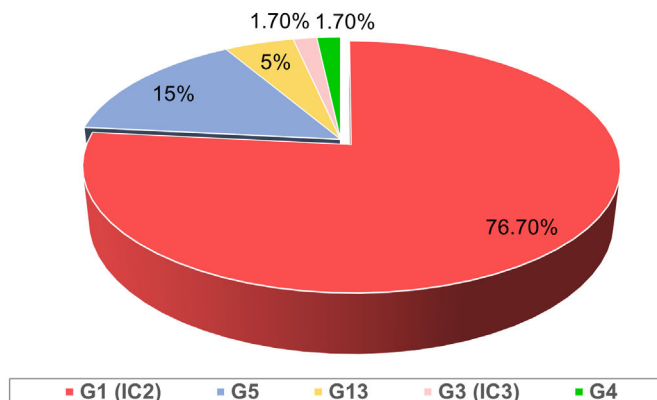
**Таблица 3. Епидемиологично типизиране на нозокомиални карбапенемаза-продуциращи изолати *A. baumannii* чрез мултиплекс PCR-базиран метод, откриващ алелни варианти в гените *ompA*, *csuE* и *bla<sub>OXA-51-like</sub>***

Изолати	Болница	Клиника	Година	CHDL група (придобити)	Gr1 PCR	Gr1 PCR	Gr1 PCR	Gr2 PCR	Gr2 PCR	Gr2 PCR	G (IC)
					<i>csuE</i> (702 bp)	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> (559 bp)	<i>ompA</i> (355 bp)	<i>csuE</i> (580 bp)	<i>ompA</i> (343 bp)	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> (162 bp)	
Aba223	ВМА	КИТ	2017	OXA-24/40	-	-	+	-	-	-	G5
Aba224	ВМА	КЧПХТ	2017	OXA-24/40	-	-	+	-	-	-	G5
Aba225	ВМА	КАРИЛ	2017	OXA-23, OXA-24/40	-	+	+	-	-	-	G4
Aba229	ВМА	КСХ	2017	OXA-24/40	+	+	-	-	+	-	G3 (IC3)
Aba230	ВМА	КГЕ	2017	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba231	Рилски	ОАИЛ	2017	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba239	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23, OXA-24/40	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba240	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba241	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba242	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba243	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba244	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba245	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba246	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba247	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba248	Рилски	КНХ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba249	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba250	Рилски	ККХ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba251	Рилски	ККХ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba252	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba253	Рилски	Ревматология	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba254	Рилски	ОАИЛ	2019	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba255	Рилски	ОАИЛ	2020	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba257	Рилски	ОАИЛ	2020	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba258	Рилски	ОАИЛ	2020	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba259	Рилски	ККХ	2020	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba260	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba261	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba262	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba263	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba264	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5

Таблица 3. Продължение

Изолати	Болница	Клиника	Година	CHDL група (придобити)	Gr1 PCR	Gr1 PCR	Gr1 PCR	Gr2 PCR	Gr2 PCR	Gr2 PCR	G (IC)
					<i>csuE</i> (702 bp)	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> (559 bp)	<i>ompA</i> (355 bp)	<i>csuE</i> (580 bp)	<i>ompA</i> (343 bp)	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> (162 bp)	
Aba265	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba266	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba267	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba268	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba269	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba270	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba271	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	-	+	-	-	-	G13
Aba272	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	-	+	-	-	-	G13
Aba273	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba274	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba275	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	-	+	-	-	-	G13
Aba276	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba277	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba278	Рилски	ОАИЛ	2021	OXA-23	-	-	+	-	-	-	G5
Aba279	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba280	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba281	Рилски	ОАИЛ-Ковид	2021	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba282	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba283	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba284	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba285	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba286	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba287	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba288	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba289	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba290	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba291	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba292	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)
Aba293	Рилски	ОАИЛ	2022	OXA-23	+	+	+	-	-	-	G1 (IC2)

PCR – полимеразна верижна реакция; CHDL – карбапенем-хидролизираща  $\beta$ -лактамаза от клас D; G – секвенционна група; IC – международен клон; ВМА – Военномедицинска академия; КИТ – Клиника за интензивна терапия; КЧПХТ, Клиника по чернодробно-панкреатична хирургия и трансплантология; КАРИЛ – Клиника по анестезиология, реанимация и интензивно лечение; КСХ – Клиника по сърдечна хирургия; КГЕ – Клиника по гастроентерология; ОАИЛ – Отделение по анестезиология и интензивно лечение; ККХ – Клиника по коремна хирургия.



Фиг. 1. Разпространение на секвенционни групи (международни клонове) сред 60 карбапенем-резистентни изолати *A. baumannii* от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ и Военномедицинска академия в периода 2017-2022 г.

### Определяне на ST, KL и OCL типове при CRAB изолати, подложени на WGS

Проведеното WGS-базирано типизиране на избрани карбапенемаза-продуциращи *A. baumannii* от ICUs на четирите мониториращи болници, изолирани в хронологичен диапазон от 10 години, включваше MLST и две техники за *in silico* определяне на локуси за синтез на капсулен полизахарид (KL) и външномембранен сърцевинен (коров) липоолигозахарид (OCL). Получените резултати, заедно с определените варианти на придобити CHDLs, са детайлно представени в табл. 4.

Деветнадесет от изследваните 20 CRAB изолата (95%) показаха принадлежност към глобално разпространения ST2 (клонален комплекс (CC) 2 или IC2) и притежаваха алелен профил: *cnp60* (2) – *fusA* (2) – *gltA* (2) – *pyrC* (2) – *recA* (2) – *rplB* (2) – *rpoB* (2). От детерминантите за придобити CHDLs в тях бяха открити *bla*<sub>OXA-23</sub>. Единствено изолат Aba190, получен от ICU пациент в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, беше класифициран в ST636, който представлява троен локусен вариант на

ST2 [*cnp60* (1) – *fusA* (2) – *gltA* (2) – *pyrC* (2) – *recA* (2) – *rplB* (1) – *rpoB* (1)]. В генома на Aba190 бяха идентифицирани *bla*<sub>OXA-23</sub> и *bla*<sub>OXA-72</sub> (ген за OXA-72 карбапенемаза от група OXA-24/40). Подобно беше разпределението по OCL типове, 95% OCL1 и 5% OCL2, като единственият с принадлежност към OCL2 е Aba190 от Варна. Честотата на разпространение на KL типове сред проучените нозокомиални CRAB изолати от периода 2014–2024 г. беше следната: 50% KL9 (10 от 20 изолата), 20% KL77 (4 / 20), 15% KL2 (3 / 20), 10% KL3 (2 / 20) и 5% KL40 (1 / 20). Най-разпространеният капсулен тип KL9 се идентифицира при CRAB изолати от ВМА (2014 и 2015 г.) и УМБАЛ „Александровска“ (през 2014 г. и последната година на проследената декада, 2024). KL77 се асоциира само с ранни CRAB от УМБАЛ „Александровска“ (2014 и 2016 г.), а KL2 – само с нови изолати от същата болница (2024). Двата изолата в извадката от УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ (Aba60/2014 г. и Aba176/2019 г.) се отличават от останалите със своя капсулен тип (KL3), а Aba190 от УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна (ST636/OCL2) е единственият с KL40 тип.

Таблица 4. Епидемиологично типизиране на ICU карбапенемаза-продуциращи изолати *A. baumannii* чрез техники, базирани на целогеномно секвениране

Изолати	Болница	Година	Материал	CHDL (придобити)	ST	KL тип	OCL тип
Aba4	ВМА	2014	ТБА	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba5	ВМА	2014	ТБА	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba7	ВМА	2014	ТБА	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba11	ВМА	2015	Ранев секрет	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba32	Александровска	2014	Ранев секрет	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba33	Александровска	2014	ТБА	OXA-23	2	KL77	OCL1
Aba40	Александровска	2014	ТБА	OXA-23	2	KL77	OCL1
Aba60	Св. Иван Рилски	2015	ЦВК	OXA-23	2	KL3	OCL1
Aba87	Св. Марина	2015	Храчка	OXA-23	2	KL77	OCL1
Aba146	Александровска	2016	Ранев секрет	OXA-23	2	KL77	OCL1
Aba176	Св. Иван Рилски	2019	ТБА	OXA-23	2	KL3	OCL1
Aba190	Св. Марина	2019	ТБА	OXA-23, OXA-72	636	KL40	OCL2
Aba302	Александровска	2024	Кръв	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba303	Александровска	2024	Кръв	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba304	Александровска	2024	Кръв	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba305	Александровска	2024	Кръв	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba306	Александровска	2024	Кръв	OXA-23	2	KL9	OCL1
Aba307	Александровска	2024	ТБА	OXA-23	2	KL2	OCL1
Aba308	Александровска	2024	ТБА	OXA-23	2	KL2	OCL1
Aba309	Александровска	2024	ТБА	OXA-23	2	KL2	OCL1

ICU – отделение за интензивни грижи; CHDL – карбапенем-хидролизираща β-лактамаза от клас D; ST – секвенционен тип; KL – локус за капсулен полизахарид; OCL – локус за външномембранен коров липоолигозахарид.

## ОБСЪЖДАНЕ

*A. baumannii* е водещ етиологичен причинител на ИСМО и вътреболнични взривове, свързани с висока заболяемост и смъртност. Той притежава множество геномни острови, богати на AMR детерминанти и мобилни генетични елементи, което позволява лесна промяна на генома, адаптация и персистенция в болнични условия [23]. Популационната структура на *A. baumannii* е подчертано клонална, с глобално разпространени епидемични MDR линии, отговорни за над 100 000 нозокомиални инфекции годишно [24].

Проведените от нас молекулярногенетични и геномни проучвания показват явно доминиране на IC2 в мониторираните университетски болници, 76.7% и 100% от изследваните *A. baumannii*, отчетени съответно чрез мултиплекс PCR метод за идентифициране на секвенционни групи / клонални комплекси и WGS-базиран MLST анализ.

Членовете на трите основни „европейски“ линии (IC1, IC2 и IC3) се свързват с по-голямата част от болничните взривове, причинени от *A. baumannii* в световен мащаб, и с по-висока резистентност към много АМЛС [25-27]. Особена тревога буди устойчивостта към карбапеними, която основно се дължи на продукция на придобити CHDLs от групите OXA-23, OXA-24/40 и OXA-58. IC1 и IC2 са идентифицирани във всички контингенти, което потвърждава повсеместното им разпространение и характеристиката им на глобални клонове в популационната структура на *A. baumannii* [12]. CRAB от глобалните клонове IC1 и IC2 обикновено се асоциират с OXA-23 карбапенемаза [28], което се потвърждава и от нашите резултати (наличие на *bla*<sub>OXA-23</sub> във всички CRAB изолати от IC2). В миналото IC3 е бил причисляван към главните клонове, но в последните години се установяват спорадични случаи на клинични CRAB от IC3, най-вече в Испания, САЩ и Южна Америка [12]. В нашето проучване сред представителна извадка от 60 изолатата *A. baumannii* беше открит само един, отнасящ се към IC3 (Aba229, табл. 3). Той беше изолиран през 2017 г. от пациент в Клиниката по съдова хирургия на ВМА и беше идентифициран като носител на OXA-24/40 карбапенемаза.

В стари епидемиологични проучвания, проведени с използване на мултиплекс PCR-базиран метод на *Turton et al.* [19], CRAB изолати от G5 и G13 са докладвани с ниска честота в няколко европейски държави (Австрия, Дания и

Швеция) [29, 30], което корелира с находките от настоящата работа.

Идентифицираният от нас ST2 (95% от изследваните CRAB) е най-доминиращият ST, отнасящ се към IC2, и най-разпространеният високорисков и хипервирулентен клон в Европа [12, 31]. Така например ST2 е най-честият ST сред инвазивни CRAB изолати от 10 балкански и средиземноморски държави (2016–2018 г.), включени в многоцентровото проучване EURECA (67.7%) [32]. Друго широкомащабно WGS-базирано проучване определя ST2 като най-разпространения ST сред CRAB (2013–2017 г.) от три средиземноморски държави, както следва: Гърция (93.5%), Италия (82.9%) и Израел (40%) [33]. Сред клинични изолати *A. baumannii*, събрани в Белгия в периода 2014–2017 г., също преобладава ST2 (58.1%), следван от ST636 (14%), към който се отнася един от нашите изолати. Колекцията включва CRAB, MDR-AB, XDR-AB и дори PDR-AB изолати [34]. ST2 и ST636 са единствените идентифицирани STs (съотв. 63.2% и 36.8%) в хода на WGS охарактеризиране на нозокомиални MDR-AB щамове от Унгария, изолирани през 2021–2022 г. [31]. През 2021 г. *Gajic et al.* докладват взрив на BSI при недоносени новородени, причинен от *A. baumannii* с AMR детерминанти *bla*<sub>OXA-66</sub> и *bla*<sub>OXA-72</sub> от ST636 (характеристики и на нашия изолат Aba190) в неонатологично ICU в Сърбия [35]. Освен това *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub>-положителни CRAB, принадлежащи към ST636, са докладвани и в други съседни държави, като Хърватия [36] и Албания [37].

Според наскоро проведено проучване, представящо цялостен геномен анализ (резистом, вирулом и мобилом) на нозокомиални изолати *A. baumannii* от цял свят с депозиран пълни геноми в базата данни NCBI Genome от 2004 до 2024 г. (n = 609), геномите демонстрират висока клонална хетерогенност (общо 96 STs по схема Pasteur), като ST2 е преобладаващ (50.9%) [23]. Капсулното типизиране идентифицира разнообразие от KL типове (общо 88), от които най-чести са KL2 (20.5%), KL3 (12.2%) и KL9 (6.7%). Въпреки малката група анализирани от нас CRAB геноми (n = 20), бяха установени 5 различни KL типа, при това сред тях също бяха открити KL9, KL2 и KL3 (съотв. 50%, 15% и 10%). Интересна находка е KL77, към който бяха причислени 20% от нашите нозокомиални CRAB. В гореспоменатото проучване едва 1% от геномите (7 от 609) са показали такава принадлеж-

ност [23]. Геномният „пейзаж“ на глобалните нозокомиални *A. baumannii* за двете проследени декади се допълва от 14 идентифицирани OCL типа, сред които най-разпространени са OCL1 (64.2%) и OCL2 (9%). Тези OCL типове бяха единствените доказани в нашето проучване за периода 2014-2024 г., но следва да се има предвид малката извадка секвенирани геноми.

В нозокомиални условия високата вариационност на капсулните типове в щамовете *A. baumannii* влияе върху имунната модулация, устойчивостта към изсушаване и комплемент-медирано убиване. Освен това тя улеснява адхезията към клетките на гостоприемника, болничните повърхности и инструменти, което допълнително увеличава нивата на вирулентност на патогена [38]. Не на последно място, авторите на гореспоменатото изследване EURECA, включило инвазивни CRAB от Балканския и Средиземноморския регион (без България), обобщават, че определянето на KL локуса е изключително полезно като инструмент за типизиране, притежаващ много висока дискриминационна способност, който позволява разкриване на разнообразието на *A. baumannii* на геномно ниво, а също и спрямо географския произход, в рамките на дадени линии, като IC1 и IC2. Така например ST2 е включвал 21 различни KL локуса, а ST1 – 9 варианта на KL локуса. Въпреки това някои от идентифицираните варианти на KL локуса са общи за двата STs [32].

## Изводи

1. Проучените CRAB изолати от няколко университетски болници в България (2014-2024 г.) демонстрират и кръстосана резистентност към АМЛС от други класове, което е основание за категоризирането им като MDR-AB (8.8%), XDR-AB (52.5%) и XDR + DTR-AB (38.8%).

2. Водещият механизъм на резистентност към карбапенеми при изследваните нозокомиални CRAB изолати е продукцията на придобити CHDLs, които имат следната честота на разпространение: 92.5% OXA-23-like, 3.8% OXA-24/40-like и 3.8% OXA-23-like + OXA-24/40-like. WGS идентифицира OXA-23 и OXA-72 карбапенемази, принадлежащи съответно към групи OXA-23 и OXA-24/40.

3. Епидемиологичното типизиране на нозокомиални CRAB изолати показва категорично доминиране на IC2 (общо 82.5%, определени чрез молекулярногенетични и WGS-базирани техники) и глобалния високорисков клон ST2 (95%) в мони-

торираните болници за проследения 10-годишен период. Секвенционни групи G13, G3 (IC3) и G4, както и ST636 (IC2) включват единични изолати.

4. ST2 се асоциира с OCL1 и няколко KL типа (KL9, KL77, KL2 и KL3), докато единственият идентифициран ST636 – с OCL2 и KL40 типове. Типизирането на база алелни варианти на KL локусите на *A. baumannii* е ценен инструмент, притежаващ висока дискриминационна способност за разграничаване на нозокомиалните изолати по време и място на изолиране.

## Библиография

- Sharma R, Lakhanpal D. *Acinetobacter baumannii*: A comprehensive review of global epidemiology, clinical implications, host interactions, mechanisms of antimicrobial resistance and mitigation strategies. *Microb Pathog*, 2025, 204: 107605.
- Alenazi TA, Shaman MSB, Suliman DM, et al. The impact of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill patients with or without COVID-19 infection. *Healthcare (Basel)*, 2023, 11 (4): 487.
- Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, et al. *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: A review. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 3711-3719.
- Thacharodi A, Vithlani A, Hassan S, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* raises global alarm for new antibiotic regimens. *iScience*, 2024, 27 (12): 111367.
- CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2021-2022. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2024. Available online: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/data-research/threats/update-2022.html> [Accessed 31 January 2026].
- World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> [Accessed 31 January 2026].
- Pogue JM, Zhou Y, Kanakamedala H, Cai B. Burden of illness in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in US hospitals between 2014 and 2019. *BMC Infect Dis*, 2022, 22 (1): 36.
- Zhen X, Chen Y, Hu X, et al. The difference in medical costs between carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and non-resistant groups: a case study from a hospital in Zhejiang province, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 36 (10): 1989-1994.
- Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 2022, 399 (10325): 629-655.
- Papathanakos G, Andrianopoulos I, Papathanasiou A, et al. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* treatment: still a debatable topic with no definite solutions. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75 (10): 3081.
- Boutzoukas A, Doi Y. The global epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *JAC Antimicrob Resist*, 2025, 7 (4): dlaf134.
- Shelenkov A, Akimkin V, Mikhaylova Y. International clones of high risk of *Acinetobacter baumannii* – definitions, history, properties and perspectives. *Microorganisms*, 2023, 11 (8): 2115.
- Hansen F, Porsbo LJ, Frandsen TH, et al. Characterisation of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates

- from Danish patients 2014-2021: detection of a new international clone – IC11. *Int J Antimicrob Agents*, 2023, 62 (2): 106866.
14. Xu A, Li M, Hang Y, et al. Multicenter retrospective genomic characterization of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from Jiangxi patients 2021-2022: identification of a novel international clone, IC11. *mSphere*, 2024, 9 (6): e0027624.
  15. Anwer R. Molecular epidemiology and molecular typing methods of *Acinetobacter baumannii*: An updated review. *Saudi Med J*, 2024, 45 (5): 458-467.
  16. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18 (3): 268-281.
  17. Kadri SS, Adjemian J, Lai YL, et al. Difficult-to-treat resistance in Gram-negative bacteremia at 173 US hospitals: Retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and outcome of resistance to all first-line agents. *Clin Infect Dis*, 2018, 67 (12): 1803-1814.
  18. Strateva TV, Sirakov I, Stoeva TJ, et al. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Bulgarian intensive care unit patients. *Microorganisms*, 2023, 11 (4): 875.
  19. Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, et al. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13 (8): 807-815.
  20. Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Update*, 2012, 15 (4): 237-247.
  21. Wyres KL, Cahill SM, Holt KE, et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* loci for capsular polysaccharide (KL) and lipooligosaccharide outer core (OCL) synthesis in genome assemblies using curated reference databases compatible with *Kaptive*. *Microb Genom*, 2020, 6 (3): e000339.
  22. Cahill SM, Hall RM, Kenyon JJ. An update to the database for *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharide locus typing extends the extensive and diverse repertoire of genes found at and outside the K locus. *Microb Genom*, 2022, 8 (10): mgen000878.
  23. Pearl S, Anbarasu A. Genomic landscape of nosocomial *Acinetobacter baumannii*: A comprehensive analysis of the resistome, virulome, and mobilome. *Sci Rep*, 2025, 15 (1): 18203.
  24. Li S, Jiang G, Wang S, et al. Emergence and global spread of a dominant multidrug-resistant clade within *Acinetobacter baumannii*. *Nat Commun*, 2025, 16 (1): 2787.
  25. Borges Duarte DF, Gonçalves Rodrigues A. *Acinetobacter baumannii*: insights towards a comprehensive approach for the prevention of outbreaks in health-care facilities. *APMIS*, 2022, 130 (6): 330-337.
  26. Rahman A, Styczynski A, Khaleque A, et al. Genomic landscape of prominent XDR *Acinetobacter* clonal complexes from Dhaka, Bangladesh. *BMC Genomics*, 2022, 23 (1): 802.
  27. Thoma R, Seneghini M, Seiffert SN, et al. The challenge of preventing and containing outbreaks of multidrug-resistant organisms and *Candida auris* during the coronavirus disease 2019 pandemic: report of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak and a systematic review of the literature. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2022, 11 (1): 12.
  28. Castanheira M, Mendes RE, Gales AC. Global epidemiology and mechanisms of resistance of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Clin Infect Dis*, 2023, 76 (Suppl 2): S166-S178.
  29. Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M, ARPAC Steering Group. Genetic diversity of carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14 (2): 161-167.
  30. Karah N, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. A diversity of OXA-carbapenemases and class 1 integrons among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Sweden belonging to different international clonal lineages. *Microb Drug Resist*, 2011, 17 (4): 545-549.
  31. Hummel D, Juhasz J, Kamotsay K, et al. Genomic investigation and comparative analysis of European high-risk clone of *Acinetobacter baumannii* ST2. *Microorganisms*, 2024, 12 (12): 2474.
  32. Kostyanov T, Xavier BB, Garcia-Castillo M, et al. Phenotypic and molecular characterizations of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected within the EURECA study. *Int J Antimicrob Agents*, 2021, 57 (6): 106345.
  33. Frenk S, Temkin E, Lurie-Weinberger MN, et al. Large-scale WGS of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates reveals patterns of dissemination of ST clades associated with antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2022, 77 (4): 934-943.
  34. Valcek A, Nesporova K, Whiteway C, et al. Genomic analysis of a strain collection containing multidrug, extensively drug-, pandrug-, and carbapenem-resistant modern clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66 (9): e0089222.
  35. Gajic I, Jovicevic M, Milic M, et al. Clinical and molecular characteristics of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* ST636 outbreak at a neonatal intensive care unit in Serbia. *J Hosp Infect*, 2021, 112: 54-60.
  36. Dobrović K, Škrobo T, Selec K, et al. Healthcare-associated bloodstream infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in COVID-19 intensive care unit: A single-center retrospective study. *Microorganisms*, 2023, 11 (3): 774.
  37. Tafaj S, Kostyanov T, Xavier BB, et al. Clonal transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harbouring *bla*<sub>OXA-24</sub>-like and *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes in a tertiary hospital in Albania. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 23: 79-81.
  38. Maure A, Robino E, Van der Henst C. The intracellular life of *Acinetobacter baumannii*. *Trends Microbiol*, 2023, 31 (12): 1238-1250.

Постъпила за печат на 4 февруари 2026 г.