

Диви животни и *Staphylococcus aureus* - сентинелна система за оценка на въздействието на човека върху здравето на екосистемата.

Научен обзор

Staphylococcus aureus е важен човешки патоген, който може да причини няколко заболявания, вариращи от леки кожни инфекции до животозастрашаващи състояния. Неговата значимост се е увеличила с развитието на антибиотична резистентност (Inagaki et al., 2019; Horváth et al., 2020; Zhen et al., 2020). MRSA е първо докладван през 1961 г. и се е превърнал в сериозна глобална заплаха досега (СЗО, 2017 г.). Резистентността към метицилин е причинена от включването на *mecA* гена в бактериалната хромозома. Този ген кодира променен пеницилин свързващ протеин *PBP2a*, което води до резистентност към всички β -лактамни антибиотици с изключение на цефалоспорици от пето поколение (Lakhundi and Zhang, 2018). Генът *mecA* се намира в мобилния генетичен елемент *SCCmec*.

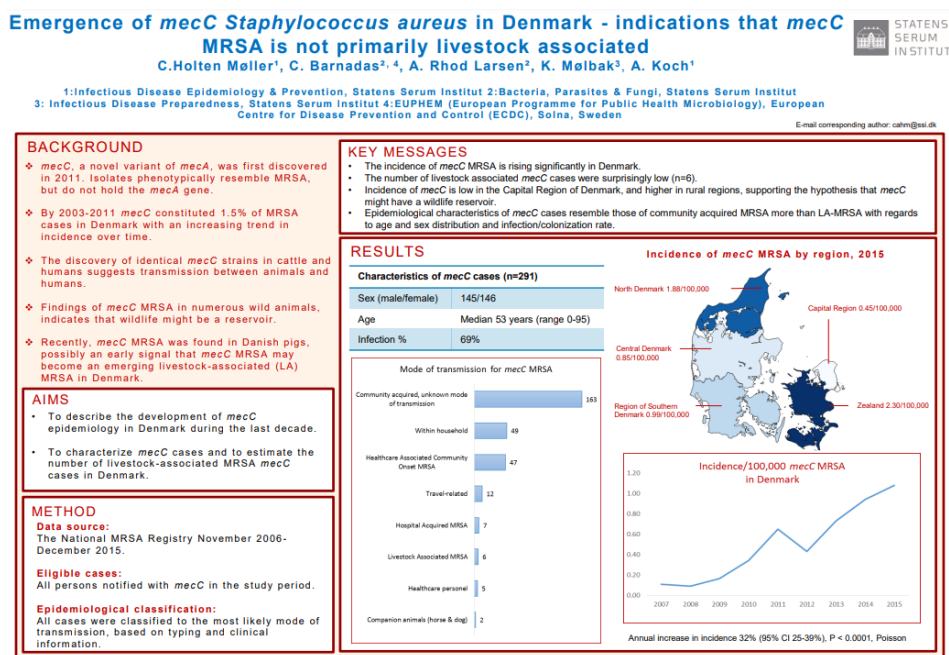


Две неотдавнашни епидемиологични проучвания подчертават възможен зоонозен произход на *S. aureus*. През последните години се появиха свързани с животновъдството, резистентни на метицилин щамове *S. aureus* (LA-MRSA), особено в страни със силно развито животновъдство, като например Нидерландия и Дания. Щамове на LA-MRSA, принадлежащи към дефинирани чрез MLST клонални комплекси (CC) 9, CC30 и по-специално CC398, са се разпространили в няколко държави и в някои случаи също са отговорни за инфекции при хора. Второ скорошно проучване е свързано с откриването на нов ген за резистентност към метицилин, наречен *mecC*, кодиращ алтернативен пеницилин-свързващ протеин, който е върху нова стафилококова хромозомна касета (*SCC mec*), обозначен *SCC mecXI* в MRSA. Към днешна дата *mecC* е идентифициран в изолати *S. aureus*, принадлежащи към свързаните с животните клонални комплекси 49, 130, 425, 599; като *mecC MRSA* са изолирани от хора, главно от различни западноевропейски и централноевропейски страни, но също и от различни животински видове, включително говеда, овце, таралежи, кучета, котки, тюлени, морски свинчета, зайци, плъхове и птици. Наскоро *mecC* е идентифициран и в *Staphylococcus xylosus* и *Staphylococcus stepanovicii* изолати. Наблюдението на различни животински видове и изолати, съдържащи *mec* гените и техните прекурсори, както и други гени за антимикробна резистентност, свидетелства, че те могат да играят роля на резервоари.

Поради заплахата за здравето на животните и хората от появата на MRSA, както и поради все по-намаляващите възможности за ефективно лечение и борба с

този патогенен микроорганизъм, както и поради оскъдните публикувани данни за метицилин-чувствителен *S. aureus* (MSSA) при дивите животни, е необходимо да се проучи молекулярната епидемиология на *S. aureus* в извадка от европейски диви животни и да се направи литературен преглед на предишни проувания по темата.

През 2011 г. е открит нов хомолог на ген *mecA* в изолати *S. aureus* от едър рогат добитък във Великобритания и в човешки проби от Дания, Обединеното кралство и Ирландия (*mecC*). Този нов хомолог, *mecALGA251*, се намира в нов елемент *SCCmec*, който е обозначен като тип XI (*García-Álvarez et al., 2011*). Съгласно препоръките на Международната работна група по класификация новият хомолог е наречен *mecC* (*Ito et al., 2012*). В периода 2003-2011 г. *mecC* съставлява 1,5% от MRSA изолатите с нарастваща тенденция на инвазивност с течение на времето. Откриването на идентични *mecC* съдържащи изолати от говеда и хора предполага предаване между животни и хора. Циркулацията на *mecC* MRSA сред много диви животни показва, че околната среда може да е резервоар. Наскоро *mecC* MRSA е докладван при прасета в Дания, вероятно ранен сигнал, че *mecC* MRSA може да се превърне в нововъзникваща, свързана с добитъка (LA)MRSA „епидемия“. Тези данни са представени в информационен материал, изготвен от *Statens serum institute* и ECDC: „Emergence of *mecC* *Staphylococcus aureus* in Denmark - indications that *mecC* MRSA is not primarily livestock associated“ - C.Holten Møller, C. Barnadas, A. Rhod Larsen, K. Mølbak, A. Koch.

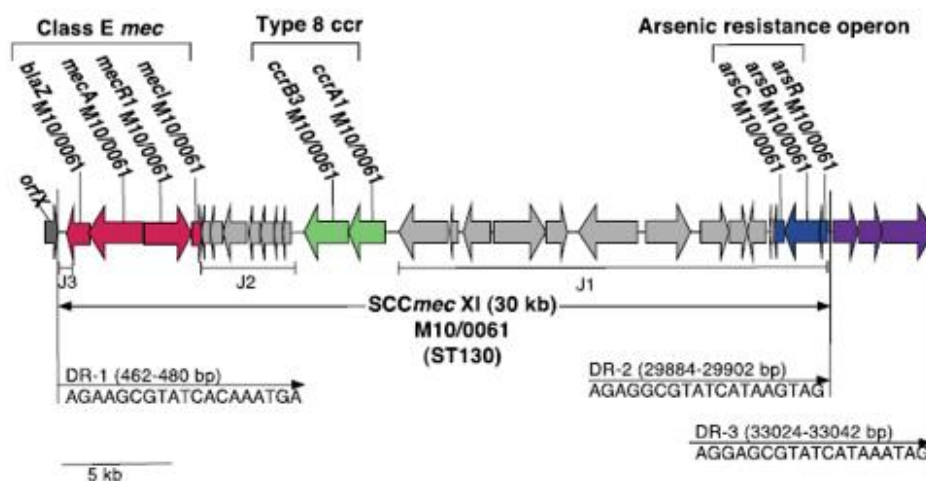


SCCmec има три основни структурни елемента. Първият *mec* генетичен комплекс, който съдържа самия *mec* ген е придружен от трансдюсер и репресорни протеин кодиращи гени. Вторият е *ccr* генетичен комплекс, кодиращ хромозомна касета с рекомбиназни гени. И третият елемент е всяка друга област на касетата и се нарича съединяващ регион (*J1*, *J2*, *J3*). Комплексът на *mec* гена е разделен на пет класа, от които *mecC* принадлежи към клас *E mec* генен комплекс, който включва

blaZ, *mecC*, *mecR1* (трансдюсер), *mecI* (репресор) гени (Shore et al., 2011; Lakhundi and Zhang, 2018). Различните комбинации на различните алотипове образуват 9 различни типа CCR генетичен комплекс.

Gene class and gene(s)	Antimicrobial resistance genes	Virulence-associated genes
Species markers <i>katA</i> , <i>coa</i> , <i>nuc</i> , <i>spa</i>	<i>blaZ</i> <i>blaI-blaRI</i> <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> <i>erm(C)</i> <i>hlu(A)</i> <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> <i>aacA-aphD</i> <i>aadD</i> <i>aphA3-sat</i> <i>dfrS1</i> <i>farI</i> <i>mupA</i> <i>tet(K)</i> <i>tet(M)</i> <i>cat</i> <i>cfr</i> <i>fexA</i> <i>fosB</i> <i>tet efflux</i>	<i>tsst1</i> <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>see</i> , <i>seh</i> <i>sec-sel</i> , <i>sed-sej-ser</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i> <i>sek-seq</i> <i>lukF-PV-lukS-PV</i> <i>lukF-PV (P83)</i> , <i>lukM</i> <i>hla</i> , <i>hld</i> <i>hly</i> Untruncated <i>hly</i> <i>sak-chp-scw</i> <i>etA</i> , <i>etB</i> , <i>etD</i> <i>edinA</i> , <i>edinB</i> <i>edinB</i> <i>arcA-arcB-arcC-arcD</i>
<i>agr</i> group III		Capsule type 8
SCC <i>mec</i> -associated markers <i>mecA</i> <i>ΔmecR1</i> <i>mecR1-mecI</i> <i>ccrA1</i> <i>ccrB1</i> Q9XB68- <i>dcs</i> <i>ccrA2-ccrB2</i> <i>kdp-SCC</i> locus <i>ccrA3</i> <i>ccrB3</i> <i>ccrC</i> , <i>ccrA4-ccrB4</i>		

Фиг. 1: Видове гени, които кодират определени характеристики в *S. Aureus*



Фиг. 2: Схематична диаграма на генетичната организация на SCC*mec* генетичния елемент

От 2011 г. насам в различни биологични проби с произход главно от Западна и Централна Европа са открити няколко *mecC-MRSA* изолати от хора и говеда (Kerschner et al., 2015; Monecke et al., 2016). Освен това през 2016г. в Австралия е публикуван първият доклад за *mecC-MRSA* извън Европа (Worthing et al., 2016), а първото докладване на *mecC-MRSA* от Америка е публикувано през 2021г. (Silva et al., 2021).

Въпреки че честотата на *mecC-MRSA* изглежда ниска при хора във всички сектори, включително здравните заведения, в Дания се наблюдава нарастваща тенденция при клиничните случаи (Petersen et al., 2013; Dube et al., 2021). Досега човешките изолати с *mecC* са били открити или по време на скрининга, или в клинични проби, като инфекции на кожата и меките тъкани, инфекции след хирургични интервенции и инфекции на кръвта (Petersen et al., 2013).

Произходът на *mecC* гена все още не е напълно изяснен. Тъй като е установена по-висока честота на случаи при хора и при хора, които са в контакт със селскостопански животни, пренасящи *mecC*-MRSA, това свидетелства, че **контактът с животни би могъл да бъде възможен рисков фактор за разпространяване на *mecC*-MRSA** (Petersen et al., 2013).

През последните години *mecC* е бил идентифициран при други стафилококови видове, като *S. xylosus* (Harrison et al., 2013; Desvars-Larrive et al., 2019) и *S. stepanovicii* (Loncaric et al., 2013), животински изолати. Освен това ***mecC*-MRSA е изолиран не само от домашни, но и от диви животни** (Loncaric et al., 2013; Monecke et al., 2013; Porrero et al., 2014; Mrochen et al., 2018; L. Ruiz-Ripa et al., 2019; Heaton et al., 2020). *MecC*-MRSA не изглежда да имат гостоприемникова специфичност; изолират се от различни видове бозайници, включително таралежи, червени лисици, елени, кафяв заек, диви зайци и диви свине (Monecke et al., 2016; L. Ruiz-Ripa et al., 2019; Heaton et al., 2020). Само няколко проучвания са изследвали възможната роля на околната среда за разпространението на този патоген. Едно проучване е докладвало **изолати *mecC*-MRSA в речните води в район, където *mecC*-MRSA е открит в изолати от диви свине и елени**, което предполага, че **водата може да бъде място на експозиция или предаване между различните животински видове и околната среда** (Porrero et al., 2014).

Проучването „*Detection of mecC-Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in river water: a potential role for water in the environmental dissemination*“ на авторски колектив M. Concepción Porrero, Ewan M. Harrison, José Francisco Fernández-Garayzábal, Gavin K. Paterson, Alberto Díez-Guerrier, Mark A. Holmes and Lucas Domínguez доказва **ролята на околната среда като резервоар на патогенни бактерии като *S. aureus***. Резистентността към β -лактамни антибиотици при MRSA, както стана ясно, се медира от експресията на алтернативен пеницилин-свързващ протеин (*PBP2a*), който е кодиран от *mecA* гена. През 2011 г. различна форма на гена *mecA*, наречена *mecC*, е описана при хора и говеда (García-Álvarez et al., 2011), а наскоро е потвърдено присъствието на *mecC*-MRSA в редица животински видове, включително диви животни. По-нови проучвания в Дания, използващи традиционна епидемиология и секвениране на целия геном, показват, че ***mecC*-MRSA може да се предава от добитък на хора**. Въпреки че предишни проучвания идентифицират директния контакт като най-правдоподобния механизъм за предаване на MRSA между животни и хора, **потенциалната роля на други механизми и среди на разпространение остава неизвестна**. Наличието на резистентни към антибиотици бактерии във водата е признато и вероятно се дължи на селективния натиск, свързан с остатъците на антимикробни средства във водата и високата концентрация на микроорганизми, което насърчава обмяна на генетичен материал. По-конкретно, съобщава се, че MRSA оцелява във водна среда дълго време. В градските отпадъчни води и морските води **откриването на MRSA се свързва с човешката дейност и замърсяването на водоизточниците**. Въпреки това, въпреки че пречиствателните станции за отпадни води намаляват MRSA, **изхвърлянето на отпадни води може да действа като резервоар за MRSA** (Borjesson et al., 2009; Rosenberg Goldstein et al., 2012). *mecC*-MRSA са открити в градски отпадъчни води в Испания (Porrero et al., 2014), след което са документирани редица случаи на *mecC*-MRSA при хора, без да има документиран очевиден пряк контакт на хората с домашни

или диви животни. По-рано са идентифицирани три изолата на *mecC-MRSA* от дива свиня ($n = 1$) и елен лопатар ($n = 2$) в същото дивечово стопанство (Porrero et al., 2014). Това, съчетано с ниското разпространение на MRSA при диви животни в Испания (Porrero et al., 2013), е накарало учените да разширят обхвата на пробовземане и да използват молекулярни методи като пълен геномен секвентен анализ, за да се проучи разпространението и циркулацията на тези резистентни щамове сред дивеча и околната среда. **Открити и документирани са *mecC-MRSA* изолати и са подложени на секвениране на целия геном, за да се разбере филогенетичната връзка по между им. Анализът е установил, че тясно свързани изолати циркулират и в дивата природа и в речните басейни, подчертавайки възможен механизъм за разпространение между животни и дори потенциално предаване на хора.**

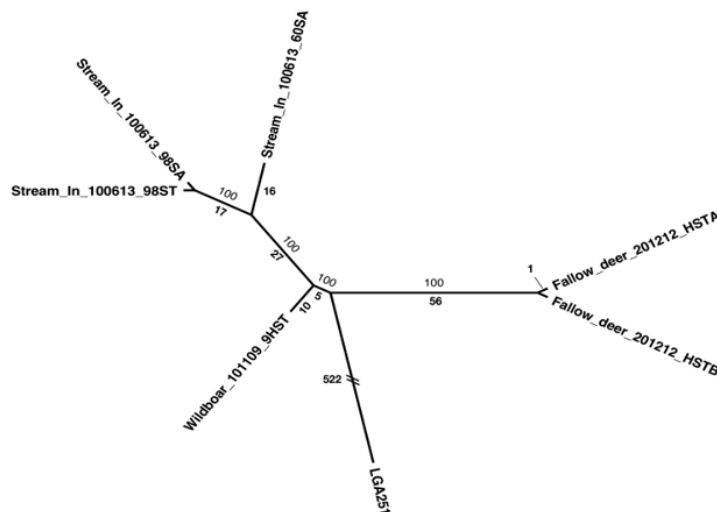
Резултатите от това проучване ясно показват, че **има филогенетична връзка между изолатите от диви свине, елени, говеда и речни водоизточници**. Нито една от пробите, взети от работниците във дивечовите стопанства не е положителна за MRSA. Това проучване е първият доклад за изолиране на *mecC-MRSA* от източник в околната среда. Трите *mecC-MRSA* изолата от речните корита са **генетично идентични с тези, изолирани от диви животни (Porrero et al., 2014)**, което ясно показва, че **същият генотип на *S. aureus* циркулира от дивите животни и речните води, както и в стопанствата за продуктивни животни**. Посредством секвениране на целия геном, с цел изясняване допълнително на генетичната връзка между дивите животни и изолатите от речна вода и последващ филогенетичен анализ, използващ единични нуклеотидни полиморфизми (SNP), присъстващи в основния геном, показват, че **всички изолати са тясно свързани, различавайки се с общо 132 SNP**. Изолати от диви животни и речни води са групирани в три отделни клейда, които се различават от ~ 100 SNP.

Наскоро са идентифицирани до 40 SNP различия между човешки изолати (Golubchik et al., 2013). Повечето изолати показват силно запазен допълнителен геном, с изключение на загубата на фаг в някои изолати. Като цяло филогенетичният анализ показва, че всички изолати са силно свързани, което предполага съществуването на **тясна връзка между *mecC-MRSA* ST425-t11212, циркулиращи между различните животински видове и водната среда**. Това проучване доказва, че водата представлява един от основните пътища за разпространение на патогенни бактерии (Vaz-Moreira et al., 2014) и MRSA могат да оцелеят няколко дни в замърсена водна среда (Tolba et al., 2008).

Ядивните растения също могат да бъдат колонизирани от голямо разнообразие от патогенни бактерии като MRSA, представляващи **важна връзка между околната среда и хората**. Въз основа на множество примери за бактериални групи, които включват ендوفити, докладвани в годни за консумация растения и които имат тясна филогенетична връзка с човешки опортюнистични патогени, учените от екипа на Vaz-Moreira твърдят, че **растенията, изложени на биологично замърсяване, предизвикано от човека, могат да представляват път на предаване на антибиотична резистентност към хората**.

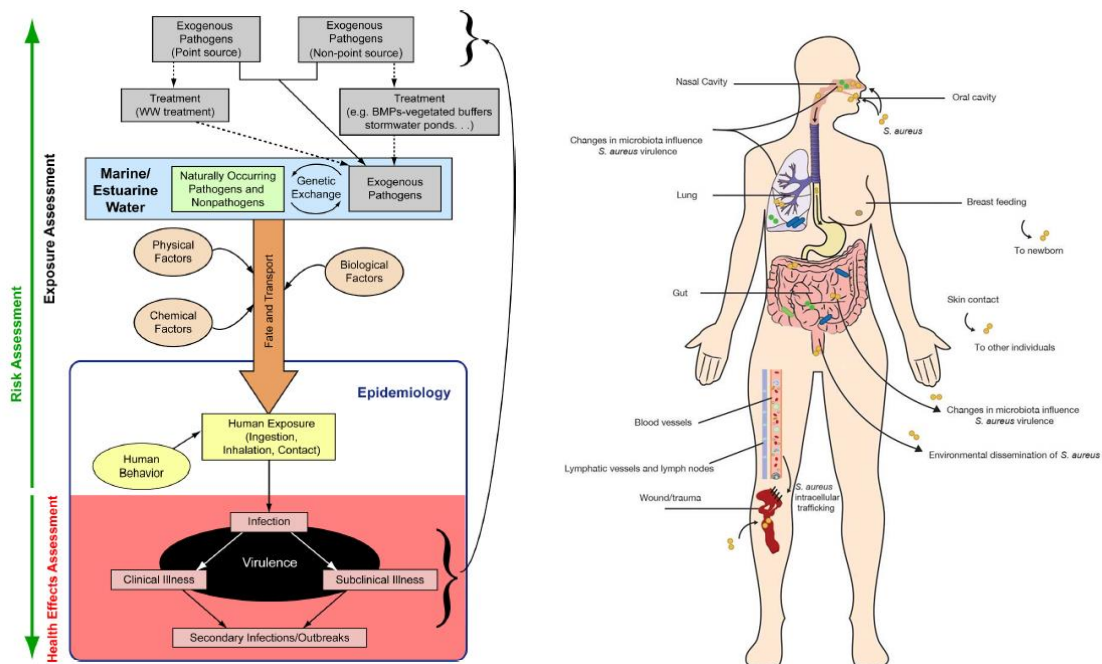
Следователно наличието на *mecC-MRSA* в речни води и води за напояване подчертава потенциалната роля на водата в разпространението на *mecC-MRSA*. В допълнение, **фактът, че както дивите животни, така и добитъкът могат да споделят общ водоизточник, може също да улесни предаването на MRSA между различни**

животински видове. Ще са необходими допълнителни проучвания, за да се оцени ролята на водата в поддържането и разпространението на MRSA между различни части на околната среда.



Фиг. 3: Филогенетична връзка между изследваните изолати *mecC*-MRSA от диви животни и околна среда

Профилите на антимикробна резистентност също са сходни, като изолатите от водата са резистентни на бензилпеницилин и цефокситин, но са податливи на всички други антимикробни средства, тествани за диви животни (Porrero et al., 2014). Тези профили на антимикробна чувствителност съответстват на тези, описани по-рано за изолатите на *mecC*-MRSA. Допълнителен анализ на геномната последователност на *mecC*-MRSA изолатите от речна вода и диви животни идентифицират само гените за резистентност *mecC* и *blaZLGA251*, които отговарят на наблюдаваните циркулиращи фенотипове на резистентност. Сравнение на *SCCmec* тип XI на всички *mecC*-MRSA изолати с този на линия LGA251 разкрива, че той е силно запазен (99,94% идентичност над 29 422 bp) във всички изолати. Изолатите от дива свиня съдържат допълнително ~ 14,4 kb интрон, което съответства на предполагаем конюгативен транспозон, вмъкнат в генома. Този транспозон показва по-висока стойност от 95% на нуклеотидна идентичност с транспозони, присъстващи в редица мобилни генетични елементи или хромозомата на други изолати *S. aureus*. Той съдържа редица гени, участващи в конюгативното транспониране, включително *tcpA*, *tcpE* и *tcpC*. Наличието на конюгативен транспозон, вмъкнат в типа *SCCmec* XI елемент в изолати от дива свиня представлява интерес, тъй като потенциално би могъл да посредничи при прехвърлянето на *SCCmec* тип XI касета между бактериите като алтернативен механизъм на разпространение и оцеляване в сравнение с трансдукцията, която е демонстрирана за други *SCCmec* елементи (Scharn et al., 2013). Като цяло, това проучване демонстрира за първи път присъствието на *mecC*-MRSA в екологичен водоизточник и подчертава потенциалната роля на водата в разпространение на *mecC*-MRSA.



Фиг. 4: Взаимовръзка между животни, хора и околна среда, онагледяваща разпространението и предаването на патогенни индикаторни бактерии като *Staphylococcus aureus*

В проучването на *Scharn et al., 2013* много ясно са описани **механизмите на трансфер на гени за резистентност при MRSA**. Донорни щамове, използвани в това проучване с трансдукция, са *S. aureus COL, USA300 FPR3757* и скорешни *USA300* клинични изолати *RG1786* и *RG1710*. Реципиентите са всички метицилин-чувствителни щамове, но се различават по наличието или отсъствието на *ACME* (*SCCmec* е в съседство с регион, наречен аргининов катаболитен елемент (*ACME*)). За някои експериментални проучвания реципиентите са претърпяли трансдукция за предизвикване на резистентност към новобиоцин (използван е *S. aureus U9NO* като донор) като допълнителен маркер. Допълнителни реципиенти също са трансдуцирани или нативно носещи *USA300* пеницилиназен плазмид *pCRG1308* или *pCRG1306B*, и двата от които са с размер ~30 kb, или един от добре характеризираните плаزمиди *pI258, pI524* и *pII147*.

Strain	Relevant characteristics
Methicillin-resistant donors	
FPR3757 ^a	SCC _{mec} IV ^d , <i>dru</i> type 9g, ACME ⁺ <i>tet</i> ^c
RG1710 ^a	USA300 SCC _{mec} IV, <i>dru</i> type 9i, ACME ⁺ <i>tet</i>
RG1786 ^a	USA300 SCC _{mec} IV, <i>dru</i> type 9af, ACME ⁺ <i>tet</i>
COL ^b	SCC _{mec} I, ^d <i>dru</i> type 10a, ACME ⁻ <i>tet</i>
Methicillin-sensitive recipients	
RG1439	RG1308 USA300, ACME ⁺ (pCRG1308) <i>nov</i>
RG1933	RG1439 (ΔpCRG1308)
RG2150	RG1933(pCRG1308)
RG2373	RG1933(pl258)
RG2374	RG1933(pl524)
RG1438	RG1306B USA300, ACME ⁺ (pCRG1306B) <i>nov</i>
RG1171	USA300 ACME ⁻ <i>nov</i>
RG2151	RG1171(pCRG1308)
RG2367	RG1171(pl1147)
RG2392	FPR3757 ΔSCC _{mec} <i>nov</i>
RG2393	RG2392(pCRG1308) <i>nov</i>
8325-4	8325 cured of prophages
RG2319	8325-4(pCRG1308)
RN4220	Restriction-deficient mutant of 8325-4
RG2323	RN4220(pCRG1308)
GS451	8325-4 (φ11)

a Donor propagated with phage 80α.

b Donor propagated with phage 29.

c Encoded by a small (~4-kb) plasmid.

d SCC_{mec} I and SCC_{mec} IV are 34 kb and 24 kb in size, respectively.

Фиг. 5: Характеристики на бактериалните щамове

Ранните доклади описват **противоречиви данни за успешна трансдукция на резистентност към метицилин в *S. aureus***. *Cohen* и *Sweeney* съобщават за успешен трансфер само в реципиенти, които притежават профаг и/или пеницилиназен плазмид, докато *Stewart* и *Rosenblum* отбелязват само изискването за пеницилиназен плазмид в реципиента. *Shafer* и *Iandolo* описват свързан с плазмид котрансфер на гени за резистентност към метицилин и тетрациклин в *S. aureus* щам 8325-4, пренасяни чрез бактериофаг φ11. Въпреки това, тези проучвания са проведени преди сегашното развитие на геномните технологии и молекулярните методи за изпитване на стафилококите и структурата и функцията на *SCC_{mec}*. Изясняването на този въпрос е важно поради няколко причини. Докато множество механизми на хоризонтален генен трансфер могат да възникнат в популациите стафилококи, **трансдукцията** представлява правдоподобно средство, чрез което *SCC_{mec}* преминава от един щам към друг. По този начин, **охарактеризирането на този процес може да осигури важна представа относно появата и разпространението на щамове MRSA**. В допълнение, охарактеризирането на трансфера и движението на *SCC_{mec}* елементите има важно значение за епидемиологичния анализ (т.е. *SCC_{mec}* типизиране), както и молекулярната диагностика, базирана на архитектурата на *SCC_{mec}*. **За да бъдат изяснени условията, свързани с трансдукцията на *SCC_{mec}* в *S. aureus*, усилията трябва да бъдат съсредоточени основно върху характеризирани на MRSA донори и метицилин-чувствителни реципиенти**, тъй като появата и разпространението на MRSA, свързани

с общността, е от огромна клинична значимост. Като цяло резултатите от горесцитираното проучване демонстрират движението на гени и *SCCmec* елементи от донори към реципиенти, като данните подчертават важното взаимодействие на два ключови процеса в реципиентните клетки, които са необходими за ефективен трансфер на хромозомни гени: хромозомна интеграция и експресия. По отношение на първия, трансдукцията на *SCCmec* се наблюдава само когато донорите и реципиентите са хомоложни по отношение на присъствието или отсъствието на *ACME*. Този резултат предполага придобиването на *SCCmec* чрез хомоложна, а не чрез *scr*-медирана рекомбинация поради изискването за допълващи *SCCmec* крайни последователности.

Противно на доклада на *Stewart* и *Rosenblum*, в това проучване е открито, че ролята на пеницилиназния плазмид не е свързана с производството на β -лактамаза (*BlaZ*), тъй като клавулановата киселина, β -лактамазен инхибитор, няма ефект върху честотата на трансдукция. Ролята на пеницилиназния плазмид логично е свързана с регулаторните гени на плазмида *blaR1-blaI* (пеницилинов сензор/индуктор и репресор на резистентност, съответно), които могат да регулират транскрипцията на *blaZ* гена за производство на пеницилиназа, а също и транскрипцията на *mecA*. Въпреки това, участието на *BlaR1* и *BlaI* в регулирането на експресията на *mecA* е сложно взаимодействие, което в момента далеч не е ясно. *Arede et al.* наскоро демонстрираха, че докато *bla* сензорът/индукторът (*BlaR1*) не може да замени *mec* сензорния индуктор, *bla* репресорът (*BlaI*) и *mec* репресорът (*MecI*) могат интерактивно да образуват *MecI::BlaI* хетеродимер с намален афинитет към *mecA* промотор, вероятно увеличаващ експресията на *mecA*. Въпреки че *BlaR1* не изглежда да участва пряко в експресията на *mecA*, *Arede et al.* демонстрират способността на *BlaR1* да дестабилизира *MecI::BlaI* хетеродимера, което води до експресия на *mecA*. Освен това *Ryffel et al.* предполагат, че наличието на плазмидни регулаторни гени позволява бързо индуциране на експресия на *mecA*. Всички тези данни подкрепят теорията, че само подгрупа от *SCCmec* трансдукти може да бъде в състояние да установи ранна *mecA* транскрипция, водеща до пълна експресия на гени за резистентност към метицилин. Потенциалното значение на *bla-mec* комплекса е отговорен за успешния трансфер и експресия на *SCCmec*, което се подкрепя от факта, че MRSA обикновено притежава *blaZ*-кодирана β -лактамаза и нейните регулаторни гени. С това се доказва предположението, че има деликатен баланс между вмъкването на *SCCmec* и експресията на *mecA* в реципиентните щамове, което изисква допълнително проучване.

Един от най-интригуващите аспекти на това проучване е свързан с първият протеин, кодиран НММ PF07799, с област от 103 bp със 100% идентичност, имащ хомолози в множество бактерии, включително при *Yersinia ruckeri* и *Yersinia pestis*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* и *S. aureus*, *S. hominis*, *S. epidermidis* и *S. capitis*. Този резултат демонстрира важната роля, която хомоложните последователности могат да играят в структурната вариация, наблюдавана в мобилни елементи като *SCCmec*.

Допълнителни проучвания на пренареждането на *SCCmec* по време на прехвърляне могат да осигурят важна информация за това как могат да възникнат

такива заличавания и пренареждания на *SCCmec*. Подобреното разбиране на такива събития има очевидни и важни последици за епидемиологичното типизиране. Такава информация също е фундаментална за точността на молекулярната диагностика, като откриване на MRSA, базирано на *SCCmec* архитектура, където пренареждането може пряко да повлияе на идентификацията.

Трите класически средства за хоризонтален генен трансфер при стафилококовите популации са: конюгация, трансформация и трансдукция, като резултатите от това и много други проучвания по темата подчертават **важността на тези молекулярни методи за изпитване за увеличаване на разбирането ни за условията, при които най-вероятно се случва прехвърлянето на *SCCmec* в природата и събитията, свързани с пренареждането на *SCCmec***. Това знание има потенциала да даде важна представа за разбирането на появата и устойчивостта на настоящи и може би дори бъдещи щамове на MRSA.

На първо място продуктивните животни като говедата са свързани с *mecC-MRSA* разпространение и се смята, че те са първоизточник на този патогенен причинител. Според по-нови резултати от проучвания дивите гризачи и инсектите или дребните хищници биха могли да служат също като резервоар за *mecC-MRSA* (Becker et al., 2014; Dube et al., 2021).

Въпреки че наличието на *S. aureus* при хората, домашните любимци и селскостопанските животни е широко разпространено, има ограничена информация за разпространението на този патоген в дивата природа (Loncaric et al., 2013).

В средата на 60-те години на миналия век проучване на тема „*Staphylococcus aureus* strains associated with the hedgehog, *Erinaceus europaeus*“ от John M. B. Smith и Marples, M.J. съобщава за 86% разпространение на устойчиви на пеницилин *S. aureus* при диви таралежи в Нова Зеландия. Изглежда, че таралежите са също много подходящи гостоприемници за коагулаза положителни стафилококи. За съжаление е трудно да се сравни разпространението на стафилококите при таралежите с това, което се среща при други животни, тъй като, с изключение на хората, **проучванията за нормалната честота на патогенни стафилококи при животни са до голяма степен пренебрегнати**. Таралежите пренасят много коагулаза положителни стафилококи, възлизащи на 68%. Съответните нива на откриване на резистентни стафилококи при човека са 16% по кожата и 40% по ръцете (Williams, 1963). **Изключително високият процент на резистентни към пеницилин *S. aureus*, изолати от таралежи (86%), докладвани още 60-те години е изключително притеснителен факт, който трябва да бъде взет под внимание при мониторинга и диагностиката на този патогенен причинител**. Тази резистентност се дължи на производството на пеницилиназа, тъй като всички щамове тогава са били чувствителни към метицилин (целбенин). Резистентността към пеницилин при човешки патогенни стафилококи често е съчетана с резистентност към други антибиотици (Wentworth, 1963). Нормалната честота на резистентни към пеницилин видове в *S. aureus* при човека е около 25% (Rountree & Rheuben, 1956).

Става ясно, че таралежите представляват досега неразпознат и не достатъчно охарактеризиран резервоар на устойчиви на пеницилин щамове *S. aureus*.

Необходима е допълнителна работа, за да се определи до каква степен тези микроорганизми могат да бъдат предадени на човешката популация.

Това проучване също така отбелязва, че 45% от таралежите имат хронични микотични инфекции, причинени от антибиотик-продуциращ дерматофит, наречен *Trichophyton erinacei*. *Smith и Marples*, още 1965г. предполагат, че таралежите потенциално могат да бъдат естествени резервоари на устойчив на пеницилин *S. aureus*, защото по-ранно проучване е демонстрирало производството на пеницилинови съединения от дерматофити, които биха могли да осигурят селективен натиск за развитие на резистентност. Впоследствие те са успели да докажат, че **видовете *Trichophyton* са в състояние да произведат пеницилинови съединения с антистафилококова активност *in vivo* и *in vitro*, което може да намали пеницилиновата резистентност на *S. aureus* (*Smith and Marples, 1965*).**

През 2021г. *Dube et al.* е извършил подобно скринингово проучване на популацията на шведските таралежи и установява, че **таралежите могат да пренасят *T. erinacei*, произвеждащ бензилпеницилин, и че този дерматофит се среща съвместно с *mecC-MRSA***. Освен това, това проучване потвърждава високото (60%) разпространение и разнообразие на *mecC-MRSA* в шведските таралежи (*Dube et al., 2021*).

Въпреки това сравнително голямо количество изследвания на дивата природа в някои страни, **няма цялостност като работа по разпространението на щамовете *MRSA* в дивата природа.**

Проучване от Унгария на тема: „*Prevalence of Staphylococcus aureus in wild hedgehogs (Erinaceus europaeus) and first report of mecC-MRSA in Hungary*“ на авторски колектив *Judit Sahin-Tóth, Ervin Albert, Alexandra Juhász, Ágoston Ghidán, János Juhász, Andrea Horváth, Martin C. Steward, Orsolya Dobay* е **първото проучване, което изследва наличието и циркулацията на стафилококи в дивата природа на Унгария и първото описание на *mecC-MRSA* в Унгария.**

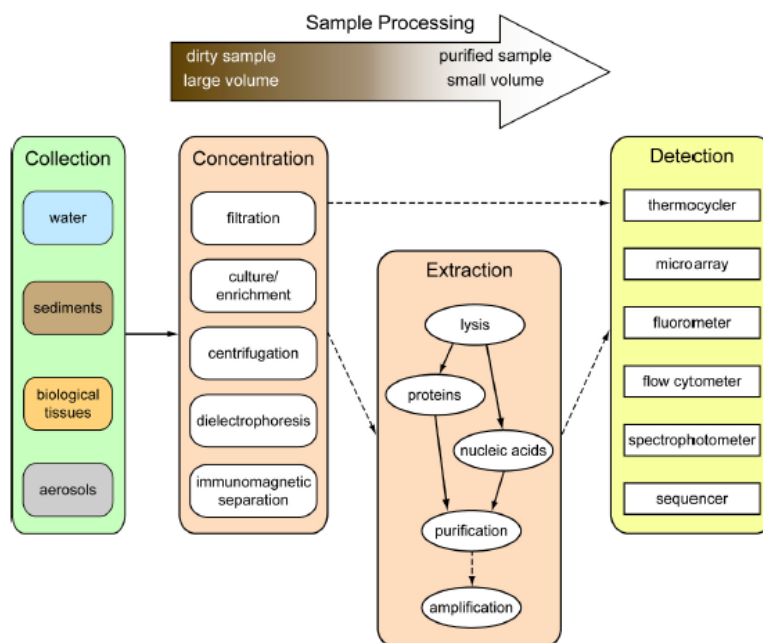
В горите **дивите свине** са обичайна част от екосистемата, както бе подчертано по-горе в текста. Те имат **голяма и гъста популация**. Хранителната екология на дивите свине може да се характеризира с всеяден избор на храна. Тези бозайници набавят повечето от хранителните вещества чрез корените, при което са **в пряк контакт с почвата и всички биологични замърсители, които се натрупват в нея**. Хипотезата, изложена в проучване „*Wild boars and staphylococcus aureus - a sentinel system to assess human impact on ecosystem health*“ на авторски колектив *Ágnes Csivincsik, Eszter Nagy, Tibor Halász, Tamás Tari, Brigitta Bóta, Rebeka Nagy, Ildikó Benedek, Gábor Nagy, Melinda Kovács* е, че **дивите свине могат да са също едни от основните гостоприемници на разнообразни бактерии, произхождащи от околната среда**, като основното място в което се натрупват е в субмандибуларния лимфен възел, който е входна врата на тялото.

Както стана ясно, стафилококите са повсеместно разпространени бактерии, които могат да бъдат изолирани дори от здрави хора и животни, както и в околната среда. Селективната култура на тези бактерии е проста и вече има достатъчно надеждни молекулярни методи за идентифициране на вида и откриване на *mecA* и *mecC* гена на резистентност към метицилин. Целта на това проучване е да се демонстрира, че ***Staphylococcus aureus*, който инвазира дивите свине, може да бъде добър сентинелен**

микроорганизъм за оценка на въздействието на човешката дейност върху естествената екосистема.

Проучването е проведено в югозападната част на Унгария, в защитена зона, където ловът е разрешен. Районът е свързан с окръжния град Капошвар. Големи животновъдни ферми не са характерни за този район. В рамките на обекта, включен в това проучване има някои популярни туристически атракции (*Zselic Starry Sky Park* и горски хотел). Взетите проби от трупове са събрани като част от рутинния ловен отстрел, а не за научни цели. По време на ловния сезон са събрани проби от субмандибуларни лимфни възли, които незабавно са изпратени в лабораторията. Всички Грам положителни коки са преминали през процес на молекулярна идентификация, като са използвани специфични праймери за откриване на *S. aureus* и гена *tesA*.

В резултат на това проучване е установено, че *S. aureus* може да бъде открит в субмандибуларните лимфни възли на диви свине на относително високо ниво на разпространение. Въз основа на това откритие може да се заключи, че система за наблюдение, която се основава на молекулярна обработка на субмандибуларните лимфни възли на диви свине, е подходяща за откриване на *S. aureus* в естествената екосистема. Степента на поява на гена *tesA* в труповете на диви свине е достигнала 15% в това изследване, което изглежда високо, като се има предвид, че мястото на изследването е естествено местообитание. Това проучване не анализира източника на устойчиво генно замърсяване. Въпреки че животновъдството не е широко разпространено в района, авторите считат, че **близки градове или местната туристическа дейност биха могли да допринесат за разпространението на антимикробна резистентност в околната среда.** Ще са необходими допълнителни изследвания, за да се потвърди тази хипотеза.



Фиг. 6: Схематично представени молекулярните методи за детекция и диагностика на *S. aureus*

В изключително задълбочено френско проучване на тема „*Dynamics of livestock-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus in pig movement networks: Insight from mathematical modeling and French data*“ на авторски колектив *Jonathan Bastarda, Mathieu Andraud, Claire Chauvin, Philippe Glaser, Lulla Opatowski, Laura Temime* са представени моделите, използвани при анализа на разпространението на MRSA в свинефермите и между животните чрез дискретен динамичен стохастичен модел.

През последното десетилетие са предложени няколко математически модела за изследване на разпространението на LA-MRSA в рамките на едно стадо свине (*Sørensen et al., 2017; Sørensen et al., 2018*), като е взет предвид транспорта и движението на животни между животновъдните обекти и в рамките на една ферма, както и направлението на отглеждане (*Ciccolini et al., 2012; Schulz et al., 2018; Schulz et al., 2019*), също предвид е взето и прескачането на междувидовата бариера от животни на хора (*Porphyre et al., 2012*). Тези модели са позволили да се проучи прилагането на конкретни мерки за контрол, базирани на намалена употреба на антимикробни средства, намалено смесване на животни в рамките на една ферма и между различни стопанства, подобрена биосигурност, ограничения на движението на животните, както и доброволно унищожаване на прасетата при заболяване. *Porphyre et al., 2012* в проучването си са оценили риска от предаване на патогенните MRSA на човешката популация ако не се прилагат такива мерки за контрол на ниво ферма, като не е включен персонала във фермите и стопанствата или хората в контакт с животни. В това проучване става ясно, че е необходимо подробно описание на разпространението на LA-MRSA както в рамките на стадата, така и между стадата, като се оценяват стратегиите за контрол (*Crombé et al., 2013; Schulz et al., 2018*). Във френското проучване е предложен нов прогнозен математически модел на разпространение на MRSA при прасета, който съчетава епидемиологична и демографска динамика на ниво стадо и между стадата. Този модел се основава на данни от реални данни за транспорт и движение на животни на ниво държава и се прилага към ситуацията във Франция. Използвайки модела, учените се стремят да идентифицират различни фактори, свързани с широкото разпространение на LA-MRSA. Освен това, се оценява ефекта от мерките за контрол на ниво ферма върху разпространението на MRSA, като накрая, учените се стремят да оптимизират избраните или прилаганите контролни мерки, като същевременно бъде засилен и мониторингът на тези патогени сред стадата животни.

$$P_{exp, farm} = \frac{\text{Number of pigs of a batch exported}}{\text{Number of pigs in a batch}} = \frac{\frac{\text{Number of pigs exported in 2014}}{\text{Number of 4-week periods in a year}}}{\frac{\text{Number of fattening pigs in the farm in 2014}}{\text{Number of batches}}} = \frac{\frac{\text{Number of pigs exported in 2014}}{13}}{\frac{\text{Number of fattening pigs in the farm in 2014}}{7}}$$

Фиг. 7: Формули, заложи в прогнозния модел

Динамично описание на модела

Изграден е дискретен динамичен стохастичен модел на разпространението на MRSA в свинефермите и между тях. Моделирани са два различни процеса както в

стадата, така и между тях: колонизация на MRSA и динамика на предаване, от една страна, и демография на свинете, от втора страна.

Демографски модел

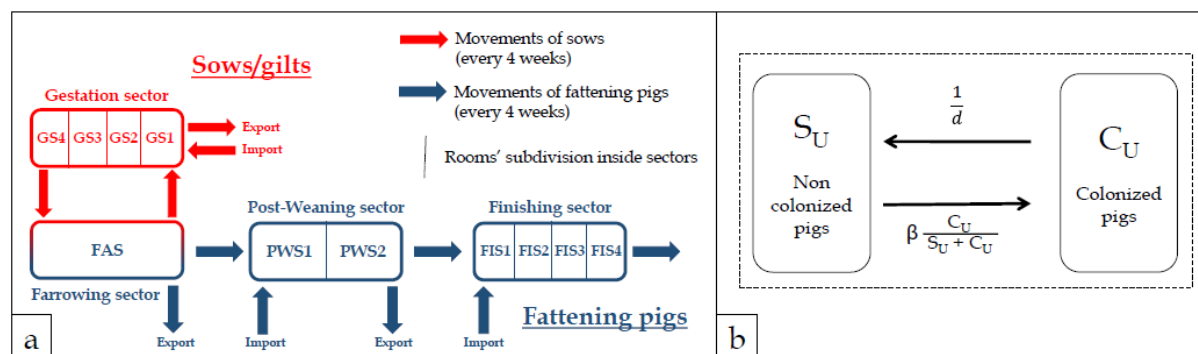
Демографските процеси са моделирани детерминистично, както за нива в рамките на фермата и между фермите. Моделът включва както стадата за разплод, така и стадата за угодяване във фермите. В модела са взети предвид всички движения на животни и населването на фермите с нови животни по категории - свине майки за разплод, прасета за угодяване и др., като са взети под внимание и вида движения на животните в рамките на едно стопанство или между различни животновъдни обекти.

Епидемиологичен модел

Variable	Description	Value
N_f	Number of farms in the network	10,542
N_b	Number of farms in the network housing breeding sows	5102
D_{prod}	Duration of a full production cycle	28 weeks
β	Transmission rate of LA-MRSA between two pigs (baseline)	0.26 week^{-1}
d	Average LA-MRSA colonization duration in pigs (baseline)	4.3 weeks
C_{STP}	Sow-to-piglets contamination probability	1
P_{exp}	Proportion of fattening pigs exported at the end of each production step (4 weeks or 12 weeks of age)	farm-specific
P_{rep}	Proportion of sows replaced by gilts every four weeks	3.19 %
P_{farms}	Proportion of farms contaminated by MRSA at $t = 0$	5 %
$P_{col \ farms}$	Mean proportion of pigs colonized by MRSA in contaminated farms at $t = 0$	16 %
$P_{col \ total}$	Global proportion of pigs colonized by MRSA at $t = 0$	$5 \% * 16 \% = 0.8 \%$

Фиг. 8: Параметри на модела и техните стойности

Предаването на MRSA от животно на животно е моделирано в рамките на един животновъден обект, чрез дискретен времеви стохастичен *Susceptible-Colonized-Susceptible (SCS)* модел.



Фиг. 9: Схематично представен дискретен стохастичен модел в рамките на един животновъден обект

Според данните от модела, предаването на патогена може да се осъществи само в рамките на същия животновъден обект. По този начин единственият начин за разпространение на MRSA между фермите е чрез движение на животни или чрез диви животински популации в близост до фермите. Предполага се, че свинете не променят статуса на MRSA по време на транспортирането им между фермите. За всяка седмица t

са изчислени възприемчивите (т.е. неколонизирани) и колонизираните популации свине в рамките на даден земеделски сектор U на седмица $t + 1$ както следва:

$$S_U(t + 1) = S_U(t) - \Delta SC_U(t) + \Delta CS_U(t)$$

$$C_U(t + 1) = C_U(t) + \Delta SC_U(t) - \Delta CS_U(t) ,$$

където $S_U(t)$ е броят на възприемчивите прасета в сектор U през седмица t , а $C_U(t)$ броят на колонизираните прасета в сектор U през седмица t . $\Delta SC_U(t)$ и $\Delta CS_U(t)$ представляват съответно потока от S_U към C_U състояние и от C_U към S_U състояние през седмица t . Данните са извлечени от биномни модели, както следва:

$$\Delta SC_U(t) \sim \text{Bin}(S_U(t); 1 - e^{-\beta \frac{C_U(t)}{S_U(t) + C_U(t)}})$$

$$\Delta CS_U(t) \sim \text{Bin}(C_U(t); 1 - e^{-\frac{1}{d}})$$

където β е скоростта на предаване на MRSA между прасета от един и същи сектор (приема се за постоянна за всички възрасти и всички ферми), което може също да отчита непрякото предаване през околната среда на сектор свиневъдство, и d е средната продължителност на колонизацията на MRSA на прасе преди естествената деколонизация. В предишна експериментална работа на *Gibbons et al., 2013* е показано, че MRSA персистира в половината от колонизираните прасета за най-малко 30 дни ($d = 4,3$ седмици).

При **реалистичния сценарий** са използвани данни от Френската агенция за безопасност на храните през 2007 г., за да бъде оценено носителството на MRSA при свине във Франция (*Jouy et al., 2008; Madec and Haenni, 2010*). В това проучване е установено, че 5% от свинефермите са MRSA-позитивни (т.е. в които се отглежда поне едно MRSA-позитивно прасе), а 0,8% от взетите проби от прасета са MRSA-позитивни. За да се симулира тази ситуация, при $t = 0$, учените произволно са избрали 5% от фермите да бъдат MRSA-положителни. В тези ферми са определени 16% от произволно избраните прасета от всички възрасти като колонизирани с MRSA, което води до 0,8% от общото разпространение при прасетата. Този сценарий се използва за калибриране на β и за оценка на въздействието на прилаганите контролни мерки в ендемична ситуация.

В така нареченият входящ сценарий са приети начална ситуация без MRSA и се симулира въвеждането на една единствена MRSA положителна група от женски животни в дадена ферма при $t = 0$. Сценарий 2 се използва за идентифициране на фактори, свързани с потенциала на разпространение на патогена във фермите и поголемите животновъдни обекти, и за избор на ефективни контролни ферми за откриване на разпространението на нов щам MRSA в мрежата за движение на прасета. В този сценарий за всяка ферма са симулирани 50 стохастични повторения, като този брой е достатъчен, за да поддържа средната стойност и дисперсията на модела стабилни.

Този математически прогнозен модел би могъл да се приложи и в България, като най-вече би могъл да послужи за наблюдение и симулиране например какво би се получило при намаление с 25% на предаването на MRSA в рамките на един животновъден обект при прилагане на различни мерки за контрол. Във Франция този модел е дал прогноза от 11,1% намаление на изчисленото общо разпространение на MRSA 2 години след прилагане на мерки за контрол и до 20,2% намаление след 4 години

в сравнение с базовия случай „без каквито и да е мерки и действия“ във ферми с най-висока степен на отклонение.

Проучване на тема “*First mecC and mecA Positive Livestock-Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (mecC MRSA/LA-MRSA) from Dairy Cattle in Malaysia*“ от *Erkihun Aklilu and Hui Ying Chia*, е още едно потвърждение за висок процент положителни за *S. aureus* (от общо 95 проби, 44 проби (46,3%), 17 (38,6%) от които са потвърдени като MRSA.

По същия начин едно скорошно проучване на изолати на *S. aureus*, получени от проби от мляко от маститни крави в Бангладеш, съобщава за високо разпространение на 20% (29/145) MRSA, идентифицирано чрез наличието на ген *mecA*. Също така, по-скорошно проучване от Китай съобщава, че 15,52% от 219 изолата на *S. aureus* при маститни крави са потвърдени като MRSA чрез диск дифузионен тест с цефокситин, тест с микроразреждания на оксацилин и откриване на *mecA*. Сравнително по-ниски нива на разпространение на MRSA също се съобщават от други проучвания, проведени в различни страни, включително САЩ и Китай. Проучване от Италия съобщава, че 3,8% (40/484) изолати на *S. aureus* от мляко и млечни продукти са MRSA, докато друго проучване от същата страна съобщава, че от 169 щамове на *S. aureus*, изолирани от италиански млечни крави, 12 (7,1%) и 157 (92,9%) са съответно MRSA и метицилин-чувствителен *S. aureus* (MSSA).

В много страни се съобщава за различни нива на разпространение на говежди MRSA. *Huber et al.* съобщават за ниско разпространение на MRSA в краве мляко (2 от 142 изолата на *S. aureus*) в Швейцария. В Германия са открити 16,7% от нивото на разпространение и 0,4% в Унгария. В скорошно проучване на *Paterson et al.*, 7 изолата на MRSA са открити в 1500 проби от резервоари за съхранение на мляко, тествани в Обединеното кралство. Докато 4,4% от анализиранияте проби от мляко в Германия са положителни за MRSA. Някои от азиатските страни също съобщават за появата на говежди MRSA. *Pu et. al.* съобщават за 47,6% разпространение в Китай, докато други съобщават за 6,3% в Корея, 13,1% в Индия и 1,5% в Япония. Тези доклади предполагат, че азиатските страни имат относително по-високи нива на разпространение на говежди MRSA в сравнение с европейските страни и Малайзия е сред азиатските страни, които са съобщили за високо разпространение на говежди MRSA и тези констатации могат да се дължат на възможна неразумна употреба на антибиотици.

Високият процент на MRSA, изолиран от млекодайни крави в това проучване, може да се дължи на факта, че антибиотиците се използват широко за контрол и предотвратяване на бактериални инфекции като мастит по говеда. Безразборната употреба на антибиотици може да доведе до появата на мултирезистентни бактериални щамове и увеличава риска от наличие на остатъци от тези лекарства в млякото. Откриването на висок процент на MRSA от млекодайни говеда също показва, че има висок риск от потенциално предаване на тази зооноза, особено за фермерите, ветеринарните лекари, работещи с добитък, и за обществеността, която може да консумира млечни продукти, които не са обработени правилно. Това е така, защото говеда, заразени с MRSA, могат да действат като резервоар на MRSA и могат да предават бактериите на други животни и хора.

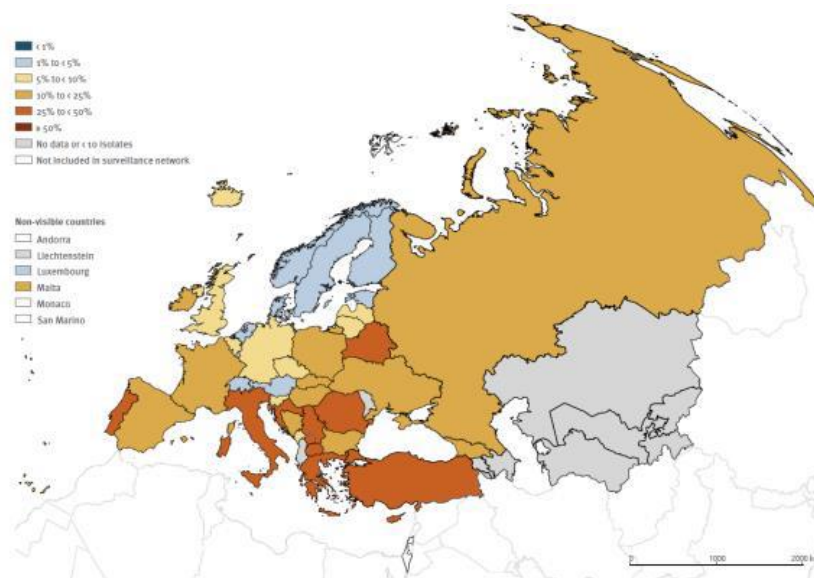
В това проучване, от 95 проби, общо 15 (57,69%) добитък, свързан с метицилин резистентен *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA), носещ новия *mecC* ген, са открити чрез PCR. От 15-те положителни изолата, 11 са положителни както за *mecA*, така и за *mecC* гените. Това показва, че **LA-MRSA, притежаващ *mecC* ген, присъства не само в европейските страни, но и в азиатските, особено в Малайзия.** Доколкото е известно, настоящото откритие е първият доклад за LA-MRSA (*mecC* положителен) при млекодайни говеда в Малайзия и е сред малкото съобщения за *mecC* положителен LA-MRSA извън Европа. Този висок процент на *mecC* положителен LA-MRSA при млекодайни говеда показва, че има **висок риск от зоонозно предаване на този патоген** на ветеринари или фермери поради способността му да колонизира широк кръг гостоприемници. Проучванията съобщават, че колонизацията на MRSA при говеда може да бъде професионален риск за ветеринарни лекари, фермери, доячи и хора, работещи в кланици.

В това проучване са тествани различни групи антибиотици и резултатите показват, че **всички изолати на MRSA са резистентни към оксацилин, но са чувствителни към имипенем и енрофлоксацин.** Освен това, **всички изолати са резистентни към поне един вид антибиотици,** показвайки характеристики на резистентност към множество лекарства на изолатите на MRSA. Възможното обяснение за резистентността на изолатите на MRSA към пеницилин и други подобни антибиотици може да се дължи на факта, че тези групи антибиотици обикновено се използват от фермери и ветеринари при лечение на млекодайни говеда, особено за заболяване като мастит. За да се предотврати нарастването на случаите на антибиотична резистентност при млекодайни говеда, се **препоръчва наблюдение за ранно идентифициране на нови резистентни към антибиотици клонове на *S. aureus*.** Също така е важно да се подобри биосигурността и да се прилагат добри животновъдни практики в млечните ферми, за да се предотврати разпространението на MRSA и други устойчиви на антимикробни патогенни бактерии. Поради зоонозия потенциал на LA-MRSA ветеринарните лекари и работниците във фермите се съветват да **се придържат към процедурите за безопасност, включително използването на лични предпазни средства.**

В заключение, констатациите от настоящият преглед на литературата показват, че са **необходими повече проучвания за по-нататъшно идентифициране на *mecC* положителните изолати чрез допълнителна молекулярна характеристика и техники за типизиране.** Независимо от това, изолирането на *mecC* положителен LA-MRSA от млекодайни говеда в това проучване е първият такъв доклад за откриването на този щам MRSA в Малайзия и се очаква да послужи като предварителни данни за започване на цялостно и широкомащабно изследване. **Информацията от този преглед, е важна, за да се изтъкне наличието и циркулацията на тази бактерия сред стадата млекодайни говеда и да се определят рисковете за общественото здраве, които тя може да представлява, главно за собствениците на животни, хората, които са в пряк контакт с животни носители и тези, които консумират непастьоризирани млечни продукти.** Освен това данните от това изследване могат да се използват и за **информирание на обществеността относно потенциалната обществена заплаха, представлявана от MRSA животински изолати и изолати от околната среда.**

Данни за България и за *S. Aureus* и MRSA:

За *S. aureus* процентът на инвазивни изолати, резистентни към метицилин (MRSA), в България е между 5 и 10% за 2020 г.



Данни за общ брой тествани инвазивни изолати (N) и процент на изолати с AMP фенотип (%) в ЕС/ЕИП, по бактериални видове и антимикробна група/агент, средно изчислено спрямо населението ЕС/ЕИП, 2016–2020 г.

Bacterial species	Antimicrobial group/agent	2016 ^a		2017 ^a		2018 ^a		2019 ^a		2020 ^a		2020 EU/EEA country range ^a
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
<i>S. aureus</i>	MRSA ^a	57 730	17.7	66 279	16.8	72 882	16.4	74 718	15.7	72 314	16.7	1.4–49.1

Данни за общ брой тествани инвазивни изолати (N) и проценти изолати с AMP фенотип (%) в ЕС/ЕИП (с изключение на Обединеното кралство), по бактериални видове и антимикробна група/агент, спрямо популацията ЕС/ЕИП и тенденция (с изключение на Обединеното кралство) за 2016–2020 г.

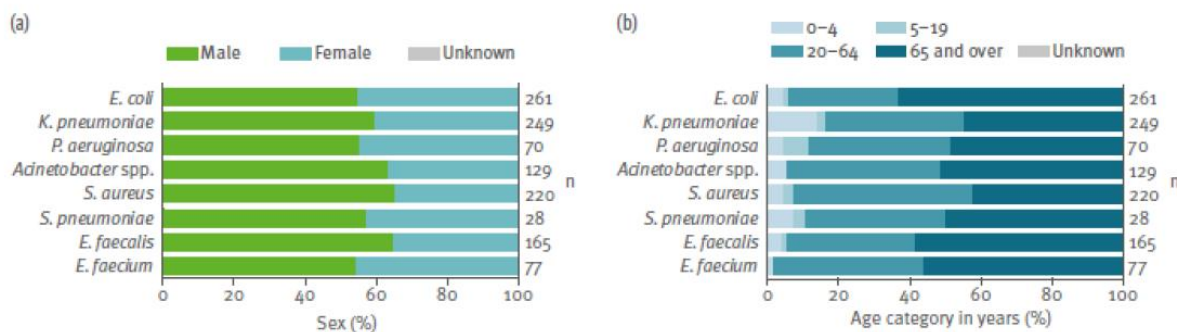
Bacterial species	Antimicrobial group/agent	2016		2017		2018		2019		2020		2020 EU/EEA country range ^a	Trend 2016–2020 ^a
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
<i>S. aureus</i>	MRSA ^a	51 013	19.3	57 396	18.3	63 837	17.7	65 604	17.1	72 314	16.7	1.4–49.1	↓

Данни, докладвани за България от Национален център по заразни и паразитни болести за периода 2016 – 2020г.

Данни за населението и болничните изолати - географско разпределение и обхват, България, 2016–2020г

Bacterial species	2016			2017			2018			2019			2020		
	Labs (n)	Isolates (n)	Isolates from ICU (%)	Labs (n)	Isolates (n)	Isolates from ICU (%)	Labs (n)	Isolates (n)	Isolates from ICU (%)	Labs (n)	Isolates (n)	Isolates from ICU (%)	Labs (n)	Isolates (n)	Isolates from ICU (%)
<i>S. aureus</i>	18	231	22	18	227	25	22	313	29	23	324	23	23	220	22

Бактериални изолати и процент резистентност, разпределени по пол и възраст за България



Общ брой тествани инвазивни изолати (n) и проценти на изолати с фенотип на резистентност (%), разпределени по бактериални видове и антимикробна група/агент, 2020 г. ЕС/ЕИП, спрямо популацията и тенденция за България, 2016–2020 г.

Bacterial species	Antimicrobial group/agent	2016		2017		2018		2019		2020		2020 EU/EEA range and population-weighted mean*	Trend 2015–2020*
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
<i>S. aureus</i>	MRSA*	231	14.3	227	13.7	313	17.6	324	14.8	220	11.8	16.7 (1.4–49.1)	–

За MRSA няма промяна в тренда на резистентността в България според обобщения годишен доклад на ECDC и EFSA за 2020г. и обхващащ периода 2016–2020г.

Отчита се стационаране на средните нива на метицилин-резистентните *S. aureus* (MRSA) за последните пет години при хората на около 10%, благодарение най-вече на съставянето и публикуването на национални инструкции за действие при изолиране на MRSA на уебстраницата на БАМ (Българска асоциация по микробиология), подобряване скрининга и изолирането на пациентите с MRSA, както и на хигиената и мерките за контрол на инфекциите в българските болници. Средният процент инвазивни MRSA, които е 22% за страните от ЕС е намален от над 20% до 11% в страната.

По данни на НЦЗПБ има промяна в таблиците на EUCAST с клинични гранични стойности и съответните диаметри на зоните на задръжка са актуализирани от НЦЗПБ в България и има нови гранични стойности. Граничните стойности на EUCAST се използват за категоризиране на резултатите от изпитване на чувствителността в три клинични категории: S - *Susceptible, standard dosing regimen* (чувствителен при стандартен режим на дозиране); I - *Susceptible, increased exposure* (чувствителен при повишена експозиция); R - *Resistant* (резистентен).

Също така в плана за дейността на НРЛ „Контрол и мониториране на антимикробната резистентност“ през 2022г. на НЦЗПБ са включени дейности, свързани с лечебно-диагностичната референтна дейност като надзор на AMP; определяне на антибиотична чувствителност според EUCAST и доказване на гени и мутации, асоциирани с антимикробна лекарствена резистентност; разширяване на обхвата на надзора чрез междуведомствена колаборация с Референтната лаборатория по AMP на НДНИВМИ към БАБХ: изследване на животински MDR щамове и механизми на резистентност с епидемичен потенциал, потвърждаване и генетично характеризирани на продуценти на карбапенемази и резистентност към

полимиксини с епидемиологично значение чрез бързи фенотипни и PCR- базирани методи.

Като компетентен орган на ECDC и референтно звено по контрола на инфекциите за България, НЦЗПБ е изготвил също проект на „Национална програма за рационална употреба на антибиотиците и надзор на антибиотичната резистентност”, който е с подкрепата на СЗО.

Тези всички начинания и всички разгледани в този литературен преглед констатации, свидетелстват, че е **необходима колаборация между ведомствата и заинтересованите страни**, за да се постигне по-добър надзор, по-обстойна и пълна информация и да се обхване освен човешката и животинската популации, също и околната среда като не маловажен фактор на разпространение на AMP.

Заключение:

Този преглед показва ясно, че дивите животни и околната среда и водите са естествени резервоари на зоонозни *mecC*-MRSA линии, които предхождат ерата на антибиотиците, което е в противоречие с общоприетото мнение, че широко разпространената резистентност при клиничните патогени е съвременен феномен, който се влияе от употребата на антибиотици при хора и във ветеринарната практика.

Данните за разпространението на *mecC*-MRSA при хора и различни животински видове показват, че таралежите са един от основните гостоприемници в Европа, които са били **неглижирани до момента**. Например в Дания разпространението на резистентни *S. Aureus* при таралежите е значително по-високо, отколкото при едрия рогат добитък, овцете и козите, а броят на случаите при хора е относително нисък. Това е допълнително подкрепено от откритието, че на *mecC*-MRSA като цяло липсват генетични маркери за адаптация при хора и преживни животни, с изключение на линията CC425:B3.1, която е прескочила междувидовата бариера от таралежи към говеда в югозападна Англия. Преди това се е смятало, че млечното направление крави са най-вероятният резервоар на *mecC*-MRSA и основен източник на зоонозни инфекции при хората. Тази хипотеза е подкрепена от факта, че β -лактамите обикновено се използват за лечение на говежди мастит, както се вижда от данните за продажбите в Европа. Въпреки това, все повече резултати от проучвания доказват, че **повечето *mecC*-MRSA линии произхождат от таралежи**, въпреки че млечното направление крави и други селскостопански животни вероятно действат като междинни гостоприемници и вектори при зоонозно предаване на MRSA от таралежи на хора.

Щамът тип *T. erinacei* IMI 101051 от Нова Зеландия произвежда два β -лактами - пеницилин G и KPN - като *mecC* и *blaZLGA251* допринасят за **намалената чувствителност на *mecC*-MRSA към тези антибиотици**. Предишни проучвания са установили, че *T. erinacei* е широко разпространен сред таралежите в Нова Зеландия и Северозападна Европа и че изолатите от двата континента произвеждат лабилно на пеницилиназа пеницилиноподобно вещество, а скорошно проучване характеризира пеницилин G от *T. erinacei* в Швеция (наличието на други β -лактами не е изследвано). Това предполага, че произвеждащите пеницилин изолати на *T. erinacei* са циркулирали в европейските таралежи много преди да бъдат въведени в Нова Зеландия през края на

1800г. и че **резистентността към метицилин се появява за първи път в Европа като коеволуционна адаптация на *S. aureus* към колонизация на таралежи**. Също така, **не може да се изключи, че клиничната употреба на антибиотици при хора и продуктивни животни е допринесла за еволюцията на някои от *mecC*-MRSA CC130 и CC425 линии**, въпреки че само една от тези линии (CC425:B3) показва признаци на адаптация на някой от тези гостоприемници. Всички разгледани открития и проучвания показват, че седем от по-младите линии на *mecC*-MRSA (CC130:A3, CC130:A4, CC130:A5, CC130:A6, CC130:A8, CC130:A9 и CC425: B1) са придобили техния тип XI *SCCmec* варианти от ранните *mecC*-MRSA CC1943: C2 и CC1943: C3 линии. **Елементът тип XI *SCCmec* също е открит в някои коагулаза отрицателни видове *Staphylococcus* от диви животни и добитък**, но еволюционните връзки между тези потенциални донори и *mecC*-MRSA остава да бъдат допълнително изследвани. Анализите показват, че повечето събития на **предаване на *mecC*-MRSA в популациите на таралежи и между таралежи и вторични гостоприемници са силно локализирани**. Филогенетичните констатации, че някои човешки *mecC*-MRSA изолати вероятно произхождат от местни резервоари - таралежи или други диви животни, показва, че ***mecC*-MRSA е причина за спорадични инфекции при хората през последните 200 години**, повече от половин век преди MRSA да бъде идентифициран за първи път при пациенти през 1960 г. Взаимодействията на гостоприемника, които водят до зоонозно предаване, вероятно включват директен контакт с диви и домашни животни или околната среда. Също така са идентифицирани **няколко събития на разпространение на дълги разстояния между Обединеното кралство и Дания и континентална Европа**. Взаимовръзките между животинските видове (домашни и диви) и околната среда, които свързват географски изолирани популации животни, са **слабо разбрани**, но може да включват транскеански движения на хора и животни. Освен това, скорошен доклад за *mecC*-MRSA при бели щъркели повдига също хипотезата за възможността **мигриращите птици да бъдат ефективни преносители на тези патогени**.

Основните механизми на β -лактамна резистентност при *S. aureus* са ензимно разцепване на amidната връзка в β -лактамния пръстен на пеницилиназа-лабилни пеницилини от *blaZ*-кодирани пеницилинази и производството на *mecA* или *mecC*-кодирани *PBP2a* и *PBP2c*, съответно, с намален афинитет към широк спектър от β -лактами. *mecC* и *blaZLGA251* също са открити на псевдо-*SCCmec* генетичен елемент (*ΨSCCmecP5085*) в *Staphylococcus edaphicus*, обитаващ почвата бактериален вид, изолиран от Антарктика. За разлика от елемента *SCCmec om mun XI*, на *ΨSCCmecP5085* липсват гените за касетна хромозомна рекомбиназа (*ccr*), които са отговорни за движението (изрязване и интегриране) на *SCCmec*.

Въпреки всички доказателства за хоризонтален генен трансфер при тези бактериални видове, все пак екологичният резистом показва ограничен потенциал за такъв трансфер на гени и поради тази причина приносят на екологичните ARG (гени за антибиотична резистентност) за резистентност при човешки патогени все още е противоречив. Изглежда разумно да се предположи, че **микробиома на дивите животни е в по-голяма степен изложен на екологичния резистом, отколкото човешкия микробиом и следователно е по-вероятно да придобие екологични ARG**.

Следователно дивите животни могат да представляват досега неразпознат път, чрез който ARG от околната среда могат да бъдат прехвърлени към клинични изолати патогенни *Staphylococcus*. Този обзор представлява само малка част от географския обхват и малка представителна извадка за изследвани проби, затова са необходими по-всеобхватни, по-задълбочени и обхващащи по-големи територии проучвания върху пътищата на пренос, вирулентността, степента на антимикробна резистентност и механизмите за генен трансфер между изолатите от различни човешки и животински източници и от околната среда.

За да се разбере по-добре динамиката на предаване, някои учени са изследвали честотата на потенциално предаване на *mecC-MRSA CC130* в рамките на различни ферми и животновъдни обекти, използвайки диапазон от максимални прагове на разстояние по двойки SNP, за да се дефинира клъстер. Оказва се, че е възможно по-високото разпространение на *mecC-MRSA* при отглеждани в плен диви животни, отколкото при свободно живеещите в дивата природа, въпреки че също е вероятно някои от тези потенциални събития на предаване да са се случили в дивата природа преди опитомяването им.

Също остава неясно дали изолати на пеницилин-продуциращи *T. erinacei* присъстват в цяла Европа и дали има връзка между тяхното разпространение и географския обхват на *mecC-MRSA*.

В заключение, трябва допълнителни проучвания върху екологичните и еволюционните механизми, довели до появата на резистентност към метицилин в пред-антибиотичната ера, например като съвместна еволюционна адаптация на *S. aureus* към колонизация на инфектирани с дерматофити таралежи. Тези резултати подчертават значението на възприемането на широка гледна точка в духа на стратегията “One Health” за антибиотичната резистентност, която признава ролята на естествения подбор при дивите животни и свързаността на естествените, селскостопанските и човешките екосистеми в еволюцията и разпространението на устойчиви на антибиотици патогени.

Разпространението на антибиотичната резистентност в околната среда е от значение за човешкото и животинското здраве, тъй като устойчивостта на околната среда може да допринесе за появата и разпространението на патогени, които са трудни или невъзможни за лечение (Wellington et al. 2013; Larsson et al. 2018). Тоест в допълнение към риска, породен от патогени, резистентни към антибиотици, циркулиращи в околната среда, детерминанти на резистентност към антибиотици в резистомите от околната среда имат потенциала да бъдат включени в човешката популация и бактериалните съобщества и в домашните животни чрез хоризонтален генен трансфер (Dolejska, Papagiannitsis, 2018). Предвид потенциалните отрицателни икономически и здравни последици от разпространението на резистентни към антибиотици бактерии в околната среда, много изследователи възприемат подходите на „One Health“ стратегията за изследване на антибиотичната резистентност (Robinson et al. 2016), включително оценки на устойчивостта в източници на околната среда като почви, вода и диви животни (Allen et al. 2010). Научното изследване на антибиотичната резистентност при диви животни включва вземане на проби от полудиви видове, животни в зоологически градини и свободно

разхождащи се диви животни. Многобройни проучвания върху антибиотична резистентност при диви животни има, някои от които са на: *Bonnedahl and J'arhult 2014; Greig et al. 2015; Arnold et al., 2016; Vittecoq et al., 2016; Wang et al., 2017;* и проучвания на АМР в околната среда на: *Allen et al. 2010; Berendonk et al. 2015; Huijbers et al. 2015; Surette and Wright 2017; Bueno et al. 2018*, но въпреки това, въпреки доста обширните усилия за идентифициране и ограничаване на антибиотичната резистентност в дивата природа и публикуването на многобройни проучвания, е **необходимо постоянно следене на новостите в диагностиката и мониторинга на патогените, както и допълнителен преглед на научната литература/ информация за оценка на ползата от използването на микроорганизмите в дивата природа като индикатори за антибиотична резистентност. Молекулярните подходи биха могли да са в помощ при оценката как дивата природа придобива, обменя и разпространява устойчиви на антибиотици бактерии и как подобни изследвания могат да осигурят ценни данни и да спомогнат вземането на своевременни и адекватни мерки за ограничаване разпространението на тези патогенни резистентни видове.**

Следователно двете основни области за управление, контрол и профилактика на антибиотичната резистентност са:

- **Разумно използване на антимикробните лекарства** (т.е. само при нужда, в правилната доза, в правилните дозови интервали и за правилна продължителност);
- **Хигиенни мерки за контрол на предаването на резистентни микроорганизми** (контрол на инфекциите), включващи хигиена, скрининг, изолация и т.н.

Необходимо е **разработването на стратегия за профилактика на инфекциите и политика за ограничаване разпространението на резистентните микроорганизми**, като за постигане на заложените цели следва да се одобрят критерии за предписване, прилагане и употреба на антимикробните средства.

Необходимо е **провеждането на национална стратегия за профилактика на инфекциите, рационално използване на антибиотиците и борба с разпространението на антибиотичната резистентност, съобразно изискванията на ЕС**. За функционирането на тази стратегия следва да се дефинират и спазват определени критерии за прилагане и употреба на антимикробните средства. Важно е да има работещи и ефективни системи за надзор, които да осигуряват достоверни, съпоставими и надеждни данни за разпространението, честотата, динамиката и механизмите за разпространение на резистентните микроорганизми. Стратегията за надзор на антибиотичната резистентност трябва да е всеобхватна и да оценява потенциалната връзка между употребата на антибиотици и развитието на резистентност. Важна стъпка е да се избегне и намали по-нататъшно възникване на резистентни микроорганизми, като се редуцира ненужната и прекомерна употреба на антимикробни препарати.

„One-Health“ подходът е **добра отправна точка, включваща координирани действия както от страна на хуманната, така и от ветеринарната медицина и хранителната индустрия.**

Понастоящем Референтната лаборатория към НДНИВМИ извършва антибиограми на изолати от животни, но това е крайно недостатъчно. Крайно наложително е **изграждането на лабораторен капацитет в страната и най-вече национална електронна система за надзор на АМР в животновъдството и селското**

стопанство, необходимо е също да се внедрят новите молекулярни методи в диагностиката.

За България данните от НЦЗПБ сочат, че 39% от интервюираните са приемали антибиотици през последната година, като 12% посочват прием без рецепта; 59% смятат, че антибиотиците са ефективни срещу вируси, а 53% срещу настинки и грип. Единственото друго проучване е проведено от пловдивски екип сред 1050 българи и сочи че самолечението с антибиотици достига до 43%.

Изложените данни показват, че в Европа като цяло **информираността на обществото по отношение на антибиотиците остава ниска. България е една от страните с най-висок прием на антибиотици без рецепта** наред с Гърция, Румъния, Кипър и Латвия. **Необходими са още по-мощни кампании целящи, които да образуват населението по отношение този важен проблем.**

Неслучайно важността на проблема с антибиотичната резистентност е довела до сформирани в Стокхолм през 2006 г. на международна кампания за запознаване с антибиотиците и промотиране на тяхната рационална употреба. С решение на Европейския парламент датата **18-ти Ноември** е определена за **Европейски Ден на Антибиотиците** (*European Antibiotic Awareness Day*). Европейският Ден на Антибиотиците е международна здравна инициатива, ръководена от Европейският Център по Контрол на Заболяванията (ECDC), съвместно със Световната Здравна Организация (СЗО) и много европейски институции и научни организации в страните от ЕС. **Целта на тази международна кампанията** е това да бъде ежегодно събитие, с което да се повиши **информираността на обществото относно антибиотиците и да се разясни правилната им употреба**, с цел запазването им като животоспасяващи лекарства.

България също трябва да се включи **все по-активно във всеобщата кампания за разумна употреба на антибиотици. Националният план за действие срещу антимикробната резистентност трябва също да се вкара в действие** и да бъдат отделени необходимите средства за тази глобална кауза.

Ефективният **контрол на АМР изисква координирани усилия за постигане на всичките цели във всяка държава.** “Закупуването” на повече време за откриване на лекарства и поддържане на ефективността на антимикробните средства толкова дълго, колкото може, зависи от **многосекторни инициативи за отговорна употреба на антимикробни средства**, както и от **по-добри практики, които намаляват риска от инфекция и необходимостта от лечение.** Успехът на тези инициативи зависи от **добро управление, доказателствата и данните от наблюдението**, както и от ефективното застъпничество и програмите за промяна на поведението на потребителите.



Изготвил:

Красимира Захариева,
Главен експерт в дирекция „ОРХВ“

Използвана литература:

1. Inagaki, Kengo, Jose Lucar, Chad Blackshear, and Charlotte V. Hobbs. "Methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: nationwide estimates of 30-day readmission, in-hospital mortality, length of stay, and cost in the United States." *Clinical Infectious Diseases* 69, no. 12 (2019): 2112-2118.
2. Horváth, Andrea, Orsolya Dobay, Judit Sahin-Tóth, Emese Juhász, Júlia Pongrácz, Miklós Iván, Enikő Fazakas, and Katalin Kristóf. "Characterisation of antibiotic resistance, virulence, clonality and mortality in MRSA and MSSA bloodstream infections at a tertiary-level hospital in Hungary: a 6-year retrospective study." *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 19, no. 1 (2020): 1-11.
3. Zhen, X., Lundborg, C.S., Zhang, M., Sun, X., Li, Y., Hu, X., Gu, S., Gu, Y., Wei, J. and Dong, H., 2020. Clinical and economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a multicentre study in China. *Scientific reports*, 10(1), pp.1-8.
4. Lakhundi, Sahreena, and Kunyan Zhang. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology." *Clinical microbiology reviews* 31, no. 4 (2018): e00020-18.
5. McClure, Jo-Ann M., Sahreena Lakhundi, Ayesha Kashif, John M. Conly, and Kunyan Zhang. "Genomic comparison of highly virulent, moderately virulent, and avirulent strains from a genetically closely-related MRSA ST239 sub-lineage provides insights into pathogenesis." *Frontiers in microbiology* 9 (2018): 1531.
6. García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L.R., Larsen, A.R., Skov,

- R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J., Holmes, M.A., 2011. *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect. Dis.* 11, 595–603.
7. Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., De Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M.T.G., Coleman, D.C., Goering, R., Giffard, P.M., Skov, R.L., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Tenover, F.C., Oliveira, D.C., Boyle-Vavra, S., Laurent, F., Kearns, A.M., Kreiswirth, B., Ko, K.S., Grundmann, H., Sollid, J.E., John, J.F., Daum, R., Soderquist, B., Buistx, G., 2012. *Guidelines for reporting novel mecA gene homologues. Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4997–4999.
 8. Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R., Coleman, D.C., 2011. *Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3765–3773.
 9. Monecke, S., Gavier-Widen, D., Mattsson, R., Rangstrup-Christensen, L., Lazaris, A., Coleman, D.C., Shore, A.C., Ehricht, R., 2013. *Detection of mecC-positive Staphylococcus aureus (CC130-MRSA-XI) in diseased European hedgehogs (Erinaceus europaeus) in Sweden. PLoS One* 8, 4–9.
 10. Monecke, S., Gavier-Widén, D., Hotzel, H., Peters, M., Guenther, S., Lazaris, A., Loncaric, I., Müller, E., Reissig, A., Ruppelt-Lorz, A., Shore, A.C., Walter, B., Coleman, D.C., Ehricht, R., 2016. *Diversity of Staphylococcus aureus isolates in European wildlife. PLoS One* 11, 1–27.
 11. Kerschner, H., Harrison, E.M., Hartl, R., Holmes, M.A., Apfalter, P., 2015. *First report of mecC MRSA in human samples from Austria: molecular characteristics and clinical data. New Microbes New Infect.* 3, 4–9.
 12. Worthing, K.A., Coombs, G.W., Pang, S., Abraham, S., Saputra, S., Trott, D.J., Jordan, D., Wong, H.S., Abraham, R.J., Norris, J.M., 2016. *Isolation of mecC MRSA in Australia. J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2348–2349.
 13. Silva, J.G., Araujo, W.J., Leite, E.L., Dias, L.M., Vasconcelos, P.C., Silva, N.M.V., Oliveira, R.P., Sena, M.J., Oliveira, C.J.B., Mota, R.A., 2021. *First report of a livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST126 harbouring the mecC variant in Brazil. Transbound. Emerg. Dis.* 68, 1019–1025.
 14. Williams, R.E.O., 1963. *Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance. Bacteriological reviews*, 27(1), pp.56-71.
 15. Wentworth, Bertina B. "Bacteriophage typing of the staphylococci." *Bacteriological reviews* 27, no. 3 (1963): 253-272.
 16. Rountree, P.M. and Rheuben, J., 1956. *Penicillin-Resistant Staphylococci in the General Population. Medical Journal of Australia*, 1(10), pp.399-402.
 17. Dube, F., Söderlund, R., Lampinen Salomonsson, M., Troell, K. and Börjesson, S., 2021. *Benzylpenicillin-producing Trichophyton erinacei and methicillin resistant Staphylococcus aureus carrying the mecC gene on European hedgehogs—A pilot-study. BMC microbiology*, 21(1), pp.1-11.
 18. Sahin-Tóth, J., Albert, E., Juhász, A., Ghidán, Á., Juhász, J., Horváth, A., Steward, M.C. and Dobay, O., 2022. *Prevalence of Staphylococcus aureus in wild hedgehogs (Erinaceus*

- europaeus) and first report of *mecC*-MRSA in Hungary. *Science of The Total Environment*, 815, p.152858.
19. Wild boars and staphylococcus aureus - a sentinel system to assess human impact on ecosystem health“ - Ágnes Csivincsik, Eszter Nagy, Tibor Halász, Tamás Tari, Brigitta Bóta, Rebeka Nagy, Ildikó Benedek, Gábor Nagy, Melinda Kovács, <https://www.one2022.eu/sites/default/files/2022-05/Agnes%20Csivincsik.pdf>
 20. Aklilu, Erkihun, and Hui Ying Chia. "First *mec C* and *mec A* positive livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (*mec C* MRSA/LA-MRSA) from dairy cattle in Malaysia." *Microorganisms* 8, no. 2 (2020): 147.
 21. Porrero MC, Harrison E, Fernández-Garayzábal JF, Paterson GK, Díez-Guerrier A, Holmes MA, Domínguez L. Detection of *mecC*-M ethicillin-resistant *S taphylococcus aureus* isolates in river water: a potential role for water in the environmental dissemination. *Environmental microbiology reports*. 2014 Dec;6(6):705-8.
 22. Wellington, Elizabeth MH, Alistair BA Boxall, Paul Cross, Edward J. Feil, William H. Gaze, Peter M. Hawkey, Ashley S. Johnson-Rollings et al. "The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria." *The Lancet infectious diseases* 13, no. 2 (2013): 155-165.
 23. Larsson, D.J., Andremont, A., Bengtsson-Palme, J., Brandt, K.K., de Roda Husman, A.M., Fagerstedt, P., Fick, J., Flach, C.F., Gaze, W.H., Kuroda, M. and Kvint, K., 2018. Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment international*, 117, pp.132-138.
 24. Dolejska, M. and Papagiannitsis, C.C., 2018. Plasmid-mediated resistance is going wild. *Plasmid*, 99, pp.99-111.
 25. Robinson, T.P., Bu, D.P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E.M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S.I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S. and Laxminarayan, R., 2016. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), pp.377-380.
 26. Xu, H.H., Trawick, J.D., Haselbeck, R.J., Forsyth, R.A., Yamamoto, R.T., Archer, R., Patterson, J., Allen, M., Froelich, J.M., Taylor, I. and Nakaji, D., 2010. *Staphylococcus aureus* TargetArray: comprehensive differential essential gene expression as a mechanistic tool to profile antibacterials. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(9), pp.3659-3670.
 27. Bonnedahl, J. and Järhult, J.D., 2014. Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala journal of medical sciences*, 119(2), pp.113-116.
 28. Greig, J., Rajić, A., Young, I., Mascarenhas, M., Waddell, L. and LeJeune, J., 2015. A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain. *Zoonoses and Public Health*, 62(4), pp.269-284.
 29. Arnold, A. R., C-AD Burnham, B. A. Ford, S. D. Lawhon, S. K. McAllister, D. Lonsway, V. Albrecht et al. "Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid detection of penicillin-binding protein 2a in human and animal *Staphylococcus intermedius* group, *Staphylococcus lugdunensis*, and *Staphylococcus schleiferi* clinical isolates." *Journal of clinical microbiology* 54, no. 3 (2016): 745-748.

30. Vittecoq M, Godreuil S, Prugnotte F, Durand P, Brazier L, Renaud N, Arnal A, Aberkane S, Jean-Pierre H, Gauthier-Clerc M, Thomas F. *Antimicrobial resistance in wildlife. Journal of Applied Ecology*. 2016 Apr;53(2):519-29.
31. Guo, Yunlei, Guanghui Song, Meiling Sun, Juan Wang, and Yi Wang. "Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10 (2020): 107.
32. Wang, W., Baloch, Z., Jiang, T., Zhang, C., Peng, Z., Li, F., ... & Xu, J. (2017). *Enterotoxigenicity and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from retail food in China. Frontiers in microbiology*, 8, 2256.
33. Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.N. and Kreuzinger, N., 2015. *Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. Nature reviews microbiology*, 13(5), pp.310-317.
34. Huijbers, Patricia MC, Hetty Blaak, Mart CM de Jong, Elisabeth AM Graat, Christina MJE Vandenbroucke-Grauls, and Ana Maria de Roda Husman. "Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: a review." *Environmental science & technology* 49, no. 20 (2015): 11993-12004.
35. Guitor, A.K., Raphenya, A.R., Klunk, J., Kuch, M., Alcock, B., Surette, M.G., McArthur, A.G., Poinar, H.N. and Wright, G.D., 2019. *Capturing the resistome: a targeted capture method to reveal antibiotic resistance determinants in metagenomes. Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(1), pp.e01324-19.
36. Bueno CZ, Moraes AM. *Influence of the incorporation of the antimicrobial agent polyhexamethylene biguanide on the properties of dense and porous chitosan-alginate membranes. Materials Science and Engineering: C*. 2018 Dec 1;93:671-8.
37. Sahin-Tóth, J., Kovács, E., Tóthpál, A., Juhász, J., Forró, B., Bányai, K., Havril, K., Horváth, A., Ghidán, Á. and Dobay, O., 2021. *Whole genome sequencing of coagulase positive staphylococci from a dog-and-owner screening survey. Plos one*, 16(1), p.e0245351.
38. Mouhanna, A. and Csivincsik, Á., 2020. *One Health approach to companion carnivores with special regard to raw-feeding. Acta Agraria Kaposváriensis*, 24(2), pp.75-88.
39. Becker, Karsten, Christine Heilmann, and Georg Peters. "Coagulase-negative staphylococci." *Clinical microbiology reviews* 27, no. 4 (2014): 870-926.
40. Loncaric, I., Kübber-Heiss, A., Posautz, A., Stalder, G.L., Hoffmann, D., Rosengarten, R. and Walzer, C., 2013. *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus spp. carrying the mecC gene, isolated from wildlife. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(10), pp.2222-2225.
41. Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C. and Manaia, C.M., 2014. *Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. FEMS microbiology reviews*, 38(4), pp.761-778.
42. Tolba, O., Loughrey, A., Goldsmith, C.E., Millar, B.C., Rooney, P.J. and Moore, J.E., 2008. *Survival of epidemic strains of healthcare (HA-MRSA) and community-associated (CA-MRSA) methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in river-, sea-and swimming pool water. International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211(3-4), pp.398-402.

43. Scharn, C.R., Tenover, F.C. and Goering, R.V., 2013. Transduction of staphylococcal cassette chromosome mec elements between strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(11), pp.5233-5238.
44. Arède, P., Ministro, J. and Oliveira, D.C., 2013. Redefining the role of the β -lactamase locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: β -lactamase regulators disrupt the MecI-mediated strong repression on mecA and optimize the phenotypic expression of resistance in strains with constitutive mecA expression. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), pp.3037-3045.
45. Ryffel, C., Strässle, A., Kayser, F.H. and Berger-Bächi, B., 1994. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(4), pp.724-728.
46. Aklilu, E. and Chia, H.Y., 2020. First mec C and mec A positive livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (mec C MRSA/LA-MRSA) from dairy cattle in Malaysia. *Microorganisms*, 8(2), p.147.
47. Guo, Yunlei, Guanghui Song, Meiling Sun, Juan Wang, and Yi Wang. "Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10 (2020): 107.
48. Huber, H.; Koller, S.; Giezendanner, N.; Stephan, R.; Zweifel, C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland. *Euro Surveill.* 2010, 15, 19542.
49. Paterson, G.K.; Larsen, A.; Robb, A.; Edwards, G.; Penycott, T.; Foster, G.; Mot, D.; Hermans, K.; Baert, K.; Peacock, S.J.; et al. The newly described mecA homologue, mecALGA251, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012, 67, 2809–2813.
50. Paterson, G.K.; Harrison, E.M.; Holmes, M.A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2014, 22, 42–47.
51. Pu, W.; Su, Y.; Li, J.; Li, C.; Yang, Z.; Deng, H.; Ni, C. High incidence of Oxacillin-susceptible mecA-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. *PLoS ONE* 2014, 9, e88134.
52. НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА ЗА РАЦИОНАЛНА УПОТРЕБА НА АНТИБИОТИЦИТЕ И НАДЗОР НА АНТИБИОТИЧНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ (2017 – 2021)- https://www.ncipd.org/images/UserFiles/File/Antibiotici/NAtional-Programme-on-AMR-Bulgaria-2016-_1_BG.pdf
53. EUCAST 2022 - <https://www.bam-bg.net/index.php/bg/articles/10-bg-bg/95-eucast-2>