

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ



д-р Гергана Неделчева Куюмджиева

**Епидемиологично типизиране и механизми на антибиотична
резистентност в клинично значими *Klebsiella pneumoniae*, изолирани в
УМБАЛ „Света Марина”, Варна**

Автореферат

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен «Доктор»

Научна специалност:

« Микробиология »

Научни ръководители:

Проф. д-р Теменуга Стоева, д.м.

Доц. д-р Румяна Марковска-Давидкова, д.м.

ВАРНА

2019

Дисертационният труд е представен на 188 стр., съдържа 22 фигури и 21 таблици. Цитирани са 482 литературни източници, 6 на кирилица и останалите на латиница.

Дисертационният труд е обсъден на катедрен съвет на катедра „Микробиология и Вирусология“ в МУ-Варна и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

Проф. д-р Грозданка Лазарова, дм
Доц. д-р Рени Гергова, дм
Доц. д-р Румяна Марковска-Давидкова, дм
Доц. д-р Милена Божкова, дм
Доц. д-р Калинка Божкова, дм

Дисертантът работи като асистент в катедра „Микробиология и Вирусология“ на МУ – Варна и като лекар в лаборатория по микробиология във ВМА – МБАЛ – гр. Варна.

Експерименталната работа е извършена в Катедра „Микробиология и Вирусология“ при МУ – Варна, УМБАЛ „Света Марина“ – Варна и Катедра „Медицинска Микробиология“ при МУ – София. Молекулярно-генетичните изследвания са извършени в катедра „Медицинска Микробиология“ при МУ – София. В процеса на работа получихме изключително ценна методична и практическа помощ от колегите в съответните звена, за което най-искрено им благодарим.

Проучването е финансирано по проект № 7633/2017 на тема: “Проучване на механизмите на хромозомна и плазмидна хинолонова резистентност при цефалоспорини 3 генерация/карбапенем-резистентни клинично значими изолати *Klebisella spp.* в МБАЛ „Света Марина“-Варна”

Защитата ще се състои на 16.12.19.....

Съдържание	
1. Увод	6
2. Цел и задачи	8
3. Материали и методи	9
4. Резултати и обсъждане	11
4.1. Епидемиологична информация	11
4.2. Определяне чувствителността на изолатите <i>K. pneumoniae</i> към антимикробни лекарствени средства.	13
4.2.1. Изпитване на чувствителността към антимикробни лекарствени средства по дисково - дифузионния метод (ДДМ) на Bauer – Kirby.	13
4.2.2. Изпитване на чувствителността към антимикробни лекарствени средства чрез определяне на МПК на антибиотика.	16
4.2.2.1. Изпитване на чувствителността към colistin и tigecycline чрез определяне на МПК чрез микродилуционен метод.	16
4.2.2.2. Изпитване на чувствителността към хинолони чрез определяне на МПК чрез E-тест	17
4.3. Проучване на механизмите на резистентност към β -лактамни антибиотици	27
4.3.1. Фенотипни методи за доказване продукцията на β -лактамази	27
4.3.1.1. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукцията на широко-спектърни β -лактамази	27
4.3.1.2. Модифициран Hodge тест (МНТ)	28
4.3.2. Молекулярно - генетична идентификация на ESBL	30
4.3.2.1. PCR метод за доказване на гени, кодиращи β -лактамази	30
4.3.3. Определяне вида на бета-лактамазата чрез изоелектрично фокусиране IEF и биологичен тест за β -лактамазна хидролитична активност	32
4.3.4. Секвениране на <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{DHA} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{NDM}	37
4.4. Конюгационно предаване на плазмиди, носещи гени за ESBLs и хинолонова резистентност	42
4.5. Определяне типа на плазида	43
4.6. Епидемиологично типизиране	46
4.7. Доказване на гени, кодиращи хинолонова резистентност	59
4.7.1. Доказване на гени, кодиращи плазмидна хинолонова резистентност	59
4.7.2. PCR метод за детекция на мутации в <i>gyr A</i> и <i>par C</i> гените, асоциирани с хромозомно медирана хинолонова резистентност	61
5. Изводи	70
6. Справка за приносите на дисертационния труд	72
7. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд	73

Използвани съкращения

ДДМ	Дисково дифузионен метод
МПК	Минимална подтискаща концентрация
СЗО	Световна Здравна Организация
AmpC	β -lactamases Ambler class C
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Институт за клинични лабораторни стандарти
DDST	Double disk synergy test
ERIC PCR	Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> spp.
ESBLs	Extended spectrum beta-lactamases
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing
<i>gyr B</i>	ген за DNA gyrase subunit B
IEF	Isoelectric focusing
IS	Insertion sequence
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MDR	multidrug resistance
MLST	Multilocus sequence typing
NDM	New Delhi metallo beta lactamase
<i>par C</i>	ген за DNA topoisomerase IV subunit A
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PMQR	Plasmid mediated quinolone resistance
QRDR	Quinolone-Resistance Determining Regions
RAPD-PCR	Randomy amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction
VIM	Verona integron metallo beta lactamase
AMC	amoxicillin/clavulanic acid
AK	amikacin
CAZ	ceftazidime
CRO	ceftriaxone
CTX	cefotaxime
CIP	ciprofloxacin
COL	colistin
CZA	ceftazidime-avibactam
FEP	cefepime
GM	gentamicin
LVX	levofloxacin
NX	nalidix acid

SXT	trimethoprim/sulfamethoxazole
TOB	tobramycin
TGC	tigecycline
TZP	piperacillin/tazobactam

1. Увод

Приложението на антибиотиците в борбата с инфекциите е едно от най-великите достижения на медицинската наука. Още през 60-те години на миналия век обаче започва да се появява резистентност на микроорганизмите спрямо използваните антимикуробни лекарствени препарати, за да се стигне до настоящия момент, в който този феномен се е превърнал в един от най-важните проблеми, стоящи пред медицинската общност и човечеството въобще.

В доклади на Световния Икономически форум за глобалните рискове, антибиотичната резистентност е отбелязана като една от най-големите заплахи за човешкото здраве. Смята се, че в Европа 25 000 души умират всяка година в резултат на мултирезистентни бактериални инфекции, което струва на икономиката на Европейския съюз около 1,5 милиарда € годишно (Walker, 2011; World Economic Forum 2013; World Economic Forum, 2014). В САЩ повече от 2 милиона души ежегодно се заразяват с резистентни бактерии, което се асоциира с 23 000 смъртни случая като пряк резултат (Blair, 2015; World Health Organization, 2014; Hampton, 2013).

Klebsiella pneumoniae е един от най-важните причинители на инфекции, особено на тези, свързани с медицинското обслужване. В последните две десетилетия изолати *K. pneumoniae*, резистентни на трета генерация цефалоспорини се съобщават практически от всички краища на света. Обикновено такива изолати се асоциират с продукцията на широкоспектърни бета-лактамази (ESBLs) и демонстрират често кръстосана резистентност към други антибиотични групи – аминогликозиди, флуорхинолони, trimethoprim/sulphamothoxazole и др. Сравнително наскоро появили се и определени като опасност за общественото здраве са карбапенем – резистентните *K. pneumoniae*, продуциращи карбапенемази от различни класове (KPC, NDM, OXA-48, VIM), които често демонстрират резистентност към практически всички налични бета-лактамни антибиотици. *K. pneumoniae*, продуценти на KPC карабапенемази често са нозокомиални изолати, докато тези, продуциращи NDM и OXA-48 бета-лактамази са както свързани с вътреболнични, така и с придобити в обществото инфекции (Nordmann P, 2014). В последните две-три десетилетия се наблюдава тревожна тенденция на нарастване на резистентността на този бактериален вид към различни групи антимикуробни лекарствени средства, като най-често този феномен се асоциира с придобиването на различни плазмиди. Не случайно видът *K. pneumoniae* е отнесен към групата патогени оозначени като ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*

species). Тези бактериални видове са парадигма за множествена резистентност и крос-трансмисия (Pendleton JN, 2013; Rice LB, 2008; Rice LB, 2010). С особена острота стои проблемът с лечението на инфекции, причинени от мултирезистентни *K. pneumoniae* и нарастването в глобален план на резистентността към стратегически антибиотици и „антибиотици на последен избор“ особено в интензивните болнични структури.

Значението на *K. pneumoniae* за съвременната вътреболнична патология е несъмнено. През 2017г. СЗО създава списък от MDR патогени с глобален приоритет с цел откриване и разработване на нови антимикробни лекарствени средства срещу тези бактерии. В групата с най-висок приоритет, определен като “критичен”, СЗО поставя резистентните към цефалоспорини III генерация и карбапенеми *K. pneumoniae*. По настоящем възникването и разпространението на такива множествено резистентни микроорганизми се приема като заплаха за общественото здрав

K. pneumoniae е един от най-значимите бактериални видове като причинители на инфекции, свързани с медицинското обслужване и е сред петте най-често изолирани бактериални видове в болничните микробиологични лаборатории. В унисон със световните тенденции, в последните няколко години *K. pneumoniae* заема трето място по честота на изолиране от всички клинични материали на пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“, а в етиологичната структура на бактериемииите е сред водещите патогени, заемайки първо място през 2014г. и трето през 2018г. Резистентността към трета генерация цефалоспорини показва трайна тенденция за повишаване, достигаща до 81.6% през 2018г., а тази към карбапенеми – 5.3%. Ето защо осъществяването на адекватна антибиотична терапия в условията на непрекъснато повишаваща се резистентност и контролът върху вътреболничното разпространение на множествено резистентни *K. pneumoniae* поставят сериозни предизвикателства пред лекуващите лекари и клиничните микробиолози. Това определя мониторинга върху тенденциите в развитието на антибиотичната резистентност и разшифроването на генетичните й механизми в множествено-резистентни *K. pneumoniae* да е сред основните задачи на диагностичните микробиологични лаборатории.

2. Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи чувствителността и механизмите на резистентността към бета-лактами и хинолони при клинично значими *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ - гр. Варна в периода 2014 - 2017г. и да се определи клоналната свързаност на изолатите.

Във връзка с изпълнение на основната цел си поставихме следните задачи:

1. Да се колекционират изолати *Klebsiella pneumoniae* резистентни на цефалоспоринови от III генерация и/или карбапенеми и colistin.
2. Да се определи и анализира чувствителността на изолатите *Klebsiella pneumoniae* към набор от антимикробни лекарствени средства.
3. Да се определят Минималните Потискащи Концентрации на хинолони, colistin и tigecycline чрез метода на серийни разреждания в течна среда и/или чрез E тест.
4. Да се проучат механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони чрез фенотипни и молекулярно - генетични методи и да се определят групите и вида на установените ензими.
5. Да се извърши епидемиологично типизиране на изолатите *Klebsiella pneumoniae* чрез ERIC PCR и MLST.

3. Материали и методи

3.1. Бактериални изолати

Сто петдесетте и осем изолата *K. pneumoniae* бяха получени от клинични материали в периода януари 2014 г. - декември 2017г. Един изолат беше от ръце на персонал.

Референтни щамове

E. coli K12: W3110 Rif lac -.

3.2. Методи за идентификация на *Klebsiella pneumoniae*

- Мануални методи
- Идентификация чрез полуавтоматизираната система Crystal E/NF (Becton Dickinson)
- Идентификация чрез автоматизирана система Phoenix 100 (Becton Dickinson)

3.3. Методи за изпитване на чувствителността на *Klebsiella pneumoniae* към антимикробни лекарствени средства

3.3.1. Дисково - дифузионен метод

3.3.2. Методи за определяне на Минимална Подтискаща Концентрация (МПК).

- Определяне на МПК чрез използване на MIC стрип (Epsilon test)
- Определяне на МПК на colistin и tygecycline чрез микродилуционния метод на серийните разреждания в бульон.

3.4. Фенотипни методи за доказване на щамове, продуценти на бета-лактамази:

3.4.1. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) по V. Jarlier и сътр. (Jarlier, 1988) за доказване на щамове, продуценти на широко-спектърни β -лактамази и модифициран Hodge тест за доказване на продуценти на карбапенемази.

3.4.2. Потвърждаване на продукцията на ESBL и определяне на спектъра на продуцирани бета-лактамази чрез изоелектрично фокусиране (IEF)

3.4.3. Bioassay – биологичен тест за β -лактамазна хидролитична активност

3.5. Конюгационно предаване на плазмиди, детерминиращи продукцията на ESBL и гени за хинолонова резистентност.

3.6. Молекулярно-генетична идентификация на видовете бета-лактамази (ESBLs, AmpC, карбапенемази) и механизмите на

хинолонова резистентност – плазмидна и хромозомна.

3.6.1. Полимеразо-верижна реакция (PCR)

3.6.2. ДНК секвениране

3.6.3. PCR за типирание на репликони

3.7. Епидемиологичен анализ

3.7.1. ERIC-PCR

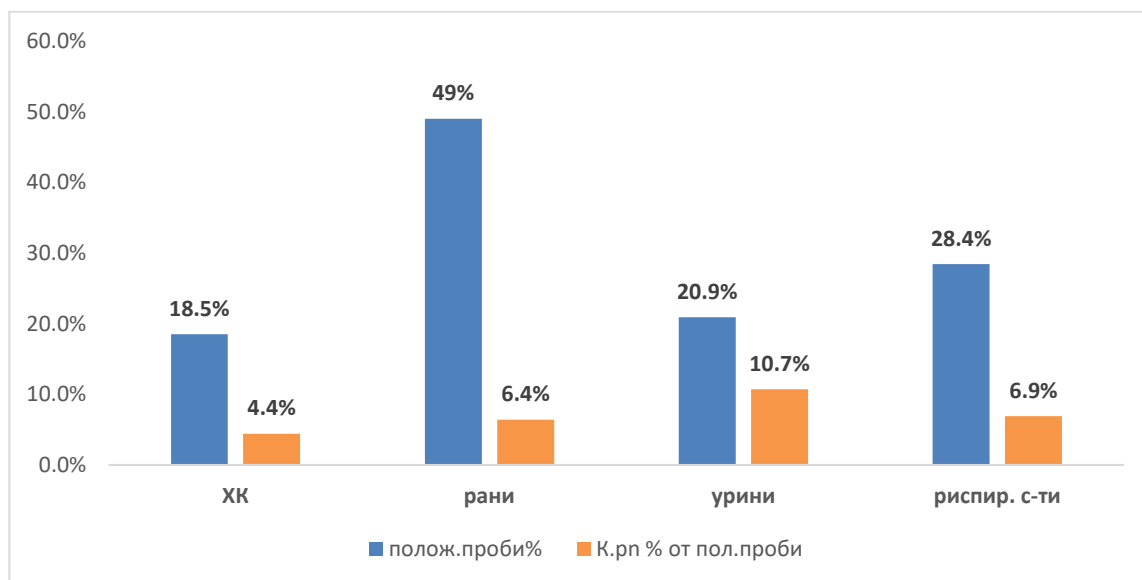
3.7.2. MLST (Multi Locus Sequence Typing)

4. Резултати и обсъждане

4.1. Епидемиологична информация

В периода януари 2014 до декември 2017г. бяха проучени общо 1084 клинично значими изолата *Klebsiella pneumoniae*, получени от различни биологични материали на пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ – Варна, разпределени както следва: урини: n=540 (50%); раневи секрети: n=266 (24%); кръв: n=152 (14%) и респираторни секрети: n=126 (12%).

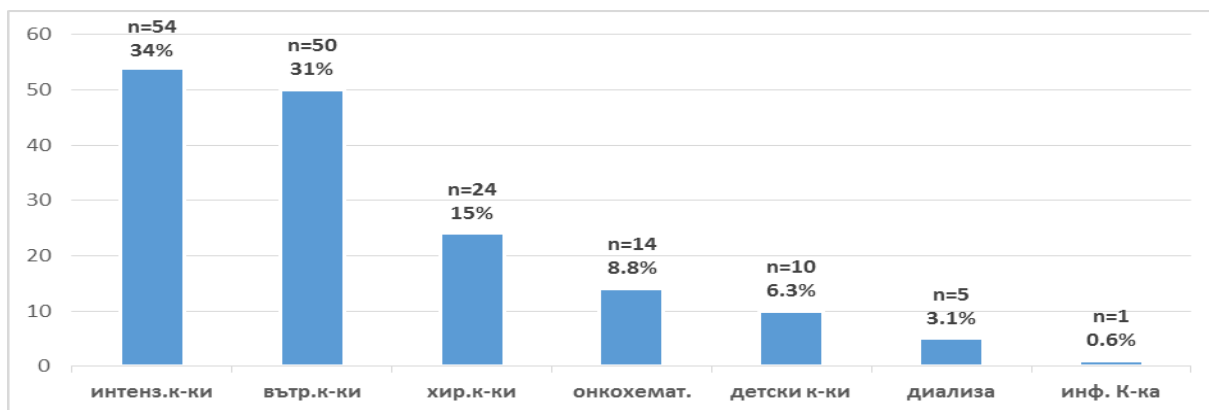
От всички изследвани биологични проби в проследявания период от време, делът на положителните за *K. pneumoniae* клинични материали е както следва: кръв - 4.4% (n=152) (при 18.5% дял на положителните хемокултури от всички хемокултури); раневи секрети - 6.4% (n=266) (при 49% положителни проби); урини - 10.7% (n= 540) (при 20.9% положителни уринни проби) и респираторни секрети - 12% (n=126) (при 28.4% положителни материали от долен респираторен тракт) (фигура 1).



Фигура 1. Относителен дял на положителните клинични проби по видове материали и дял на положителните за *K. pneumoniae* материали (в %).

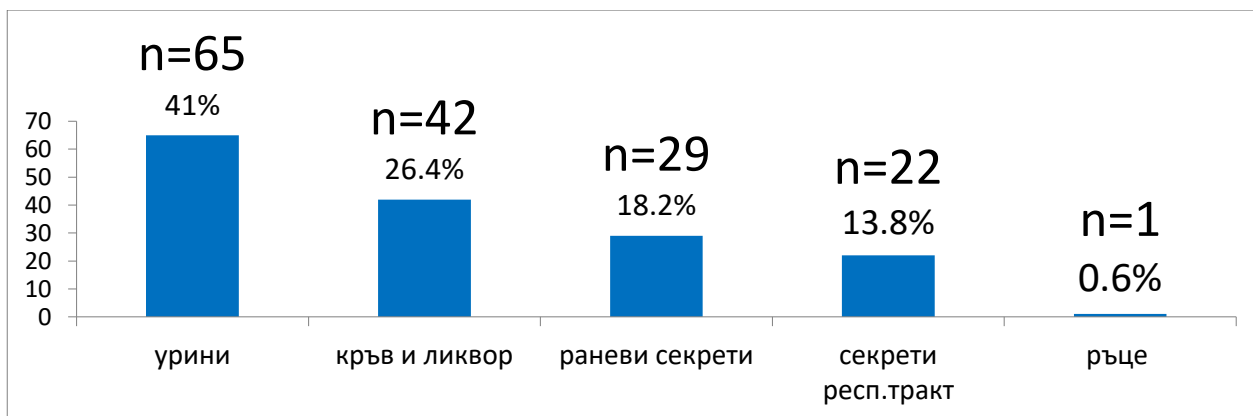
От изолираните общо 1084 клинични изолата *Klebsiella pneumoniae*, резистентни на цефалоспоринови трета генерация бяха 589 изолата и от тях в настоящия дисертационен труд са използвани 159 изолати (получени от недублиращи се пациенти) с цел по-детайлно проучване на механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони и за целите на епидемиологичното типизиране. Тридесет и четири процента от тези изолати (n=54) са получени от пациенти, хоспитализирани в интензивни клиници на болницата, а 66% (n=105) - от не-интензивните болнични звена (фигура 2). В колекцията е включен и един изолат *Klebsiella pneumoniae*, получен от ръце персонал.

Тридесет и осем от изолатите *K. pneumoniae* в колекцията, обект на дисертационния труд, са нечувствителни към карбапенемни антибиотици, като двадесет и пет от тях (66%) са от интензивни клиници. Според вида на клиничния материал, разпределението е както следва: n=21 – от хемокултури; n=6 – урини; n=7 - респираторни секрети и n=4 - от раневи секрети.



Фигура 2. Разпределение на изолатите *Klebsiella pneumoniae* според вида на клиниката, от която са изолирани (в брой и %).

Разпределението на изолатите *K. pneumoniae* според анатомичното място на изолация е както следва: урини: 41% (n=65); кръв и ликвор: 26.4% (n=40+2); раневи секрети: 18.2% (n= 29); секрети от респираторен тракт: 13.8% (n=22); ръце персонал: 0.6% (n=1) (Фигура 3).



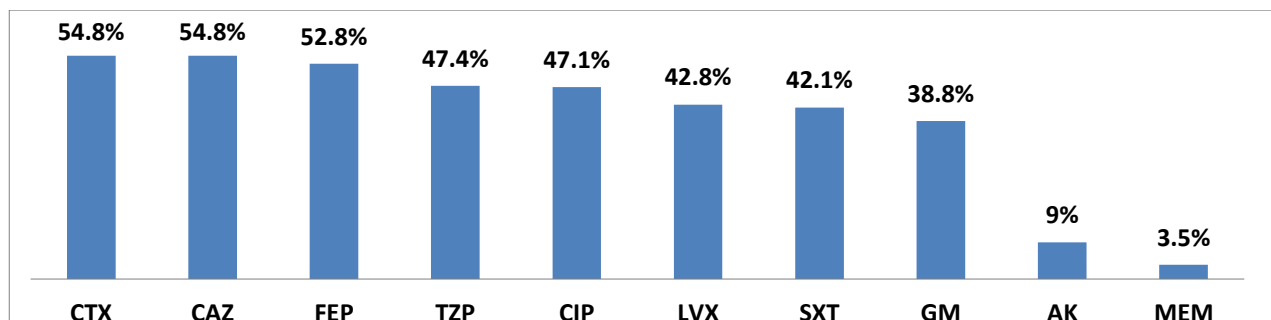
Фигура 3. Разпределение на изолатите *K. pneumoniae* (n=159) според мястото на изолация.

Всички 159 изолата *K. pneumoniae*, използвани за целите на дисертационния труд бяха идентифицирани първоначално чрез мануални биохимични методи и чрез полуавтоматизираната система Crystal E/NF (Becton Dickinson). Всички карбапенем-нечувствителни изолати (n=38) бяха идентифицирани и чрез автоматизираната система Phoenix 100 (Becton Dickinson).

4.2. Определяне чувствителността на изолатите *K. pneumoniae* към антимикробни лекарствени средства.

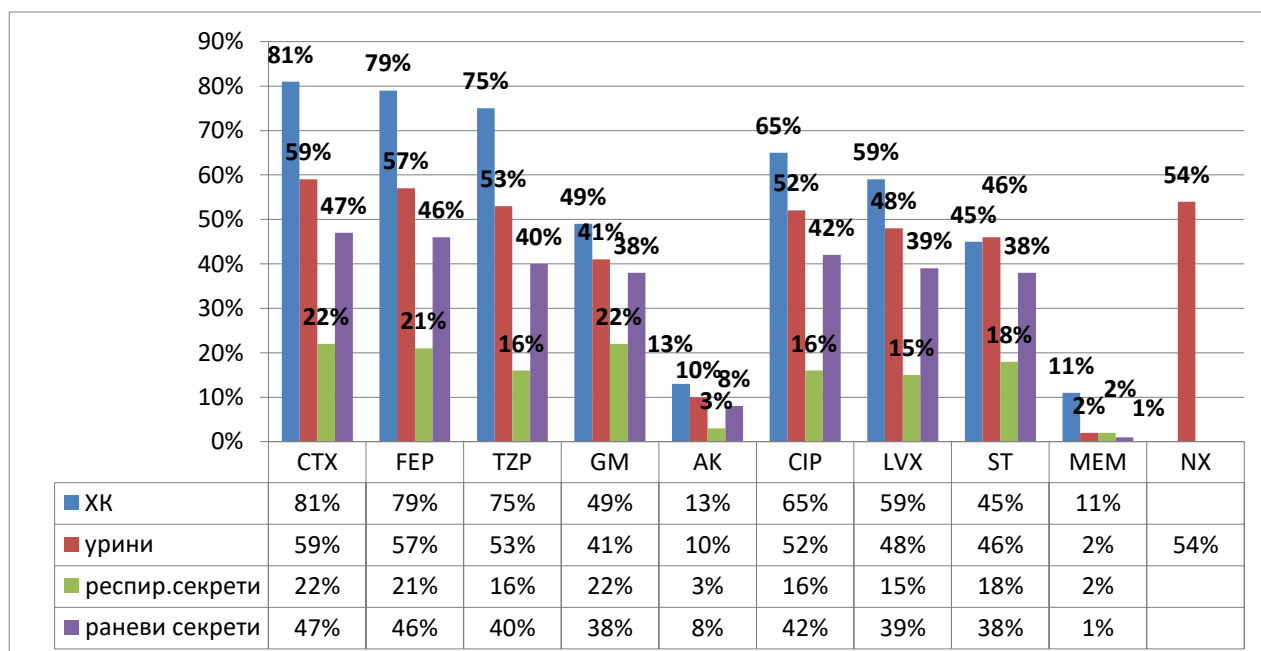
4.2.1. Изпитване на чувствителността към антимикробни лекарствени средства по дисково - дифузионния метод (ДИМ) на Bauer – Kirby.

Резистентността в цялата проучвана група изолати *K. pneumoniae* (n=1084), представена във възходящ ред е както следва: meropenem, 3.5% < amikacin, 9% < gentamicin, 38.3% < sulfamethoxazole/trimethoprim, 42.1% < levofloxacin, 42.8% < ciprofloxacin, 47.1% < piperacillin/tazobactam, 47.4% < ceftipime, 52.8% < ceftazidime, 54.8% , cefotaxime, 54.8%. (фигура 4).



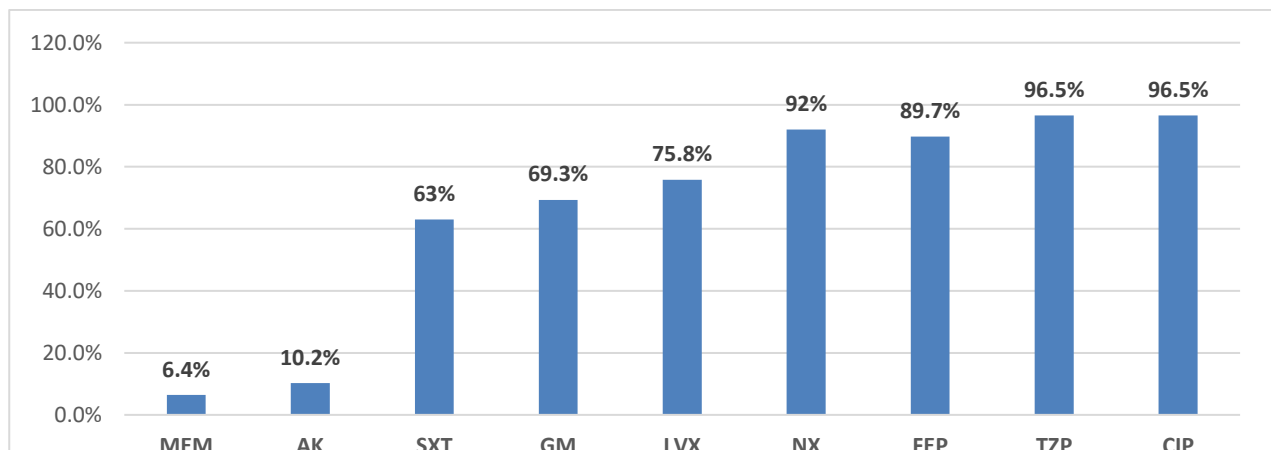
Фигура 4. Резистентност към антимикробни лекарствени средства в цялата проучвана група изолати *K. pneumoniae* (n=1084)

Резултатите от изпитването на чувствителността към набора от антимикробни лекарствени средства според анатомичното място на изолация са представени на фигура 5.



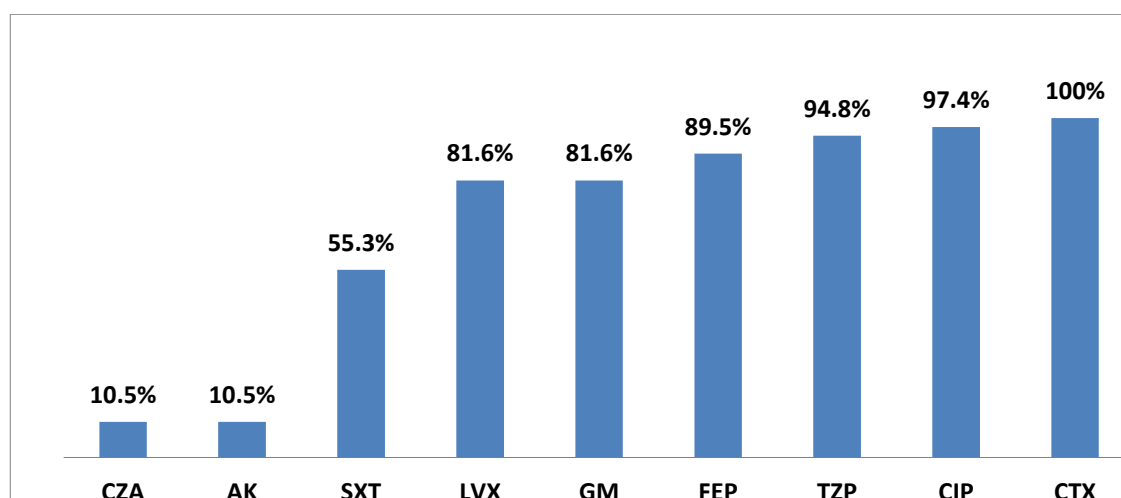
Фигура 5. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на 1084 клинични изолата *K. pneumoniae* според анатомичното място на изолация (%).

В групата на ceftazidime и cefotaxime резистентните изолати *K. pneumoniae* (n=589, 54.4%), нивото на антибиотична резистентност, показана във възходящ ред е както следва: meropenem, 6.4% < amikacin, 10.2% < sulfamethoxazole/trimethoprim, 63% < gentamicin, 69.3% < levofloxacin, 75.8% < cefepime, 89.7% < piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin, 96.5% и за двата (Фиг 6).



Фигура 6. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на 589 резистентни към трета генерация цефалоспорици изолати *K. pneumoniae* (%).

В групата на карбапенем-нечувствителните изолати *K. pneumoniae* (n=38), нивата на резистентност, показани във възходящ ред са както следва: ceftazidime/avibactam, amikacin, 10.5% < sulfamethoxazole/trimethoprim, 55.3% < gentamicin, 81.6%, levofloxacin, 81.6% < cefepime, 89.5% < piperacillin/tazobactam, 94.8 % < ciprofloxacin, 97.4% < cefotaxime, ceftazidime, 100%. (фигура 7)



Фигура 7. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на 38 карбапенем-нечувствителните изолати *K. pneumoniae* (%).

На таблица 1 е показана чувствителност към ceftazidime/avibactam на 38 карбапенем-нечувствителни изолати *K. pneumoniae*.

Таблица 1. Чувствителност към ceftazidime/avibactam на 38 карбапенем-нечувствителни изолати *K. pneumoniae* (брой) според носителство на карбапенемазни гени.

Изолати <i>K. pneumoniae</i> и съответните карбапенемазни гени	CZA Чувствителност	CZA Резистентност
KPC-2 (n=32)	(n=32)	
KPC-2 / VIM-1(n=1)	(n=1)	
OXA-48 (n=1)	(n=1)	
VIM-1 (n=1)		(n=1)
NDM-1 (n=3)		(n=3)

На таблици 2 и 3 сравнително са представени нивата на резистентност в цялата колекция изолати *K. pneumoniae*, в групата на ceftazidime, cefotaxime-резистентните и в групата на карбапенем-резистентните изолати.

Таблица 2. Сравнително представяне на нивата на резистентност в цялата колекция *K. pneumoniae* и групата на ceftazidime, cefotaxime-резистентните изолати.

антибиотик	Цяла колекция изолати (%) n=1084	Резистентни на цефалоспорици 3 ген (%) n=589	P
MEM	3.5%	6.4%	P = 0.0101
AK	9%	10.2%	P = 0.48
SXT	42.1%	63%	P = 0.0001
GM	38.8%	69.3%	P = 0.0001
LVX	42.8%	75.8%	P = 0.0001
FEP	52.8%	89.7%	P = 0.0001
TZP	47.4%	96.5%	P = 0.0001
CIP	47.1%	96.5%	P = 0.0001

Таблица 3. Сравнително представяне на нивата на резистентност в групата на ceftazidime, cefotaxime-резистентни и карбапенем-нечувствителни изолати *K.pneumoniae*.

Антибиотик	Резистентни на цефалоспорици 3	Карбапенем – нечувствителни	P
------------	--------------------------------	-----------------------------	---

	ген (%) n=589	(%) n=38	
MEM	6.4%	100%	P = 0.0001
AK	10.2%	10.5%	P = 1.0
SXT	63%	55.3%	P = 0.68
GM	69.3%	81.6%	P = 0.529
LVX	75.8%	81.6%	P = 0.8
FEP	89.7%	89.5%	P = 1.0
TZP	96.5%	94.8%	P = 1.0
CIP	96.5%	97.4%	P = 1.0

4.2.2. Изпитване на чувствителността към антимикробни лекарствени средства чрез определяне на МПК на антибиотика.

4.2.2.1. Изпитване на чувствителността към colistin и tigecycline чрез определяне на МПК чрез микродилуционен метод.

Чувствителността към colistin бе изпитана чрез определяне на МПК на антибиотика за всички карбапенем - нечувствителни изолати *K. pneumoniae* (n=38) по микродилуционния метод в бульон чрез използване на Sensititre TM плаки. За интерпретацията на МПК на colistin бяха използвани граничните стойности за colistin за *Enterobacteriaceae*, определени от EUCAST v. 7.1 (МПК $\leq 2\mu\text{g/ml}$ – чувствителни; МПК $> 2\mu\text{g/ml}$ – резистентни). Осем изолата (21%) бяха определени като резистентни, демонстрирайки МПК_{colistin} $> 4\mu\text{g/ml}$. При останалите 30 изолата (79%) стойността на МПК_{colistin} беше $\leq 2\mu\text{g/ml}$, което определи тези изолати като чувствителни (Таблица 4).

Таблица 4. Чувствителност към colistin на 38 карбапенем-нечувствителни изолата *K. pneumoniae*, определена чрез микродилуционен метод в бульон (Sensititre TM).

МПК на colistin ($\mu\text{g/ml}$)	Карбапенем-нечувствителни <i>K. pneumoniae</i> (n=38)	Интерпретация (EUCAST 2017)
$>4\mu\text{g/ml}$	n=8	R (21.05%)
$2\mu\text{g/ml}$	n=4	S (10.53%)
$1\mu\text{g/ml}$	n=10	S (26.32%)
$0.5\mu\text{g/ml}$	n=16	S (42.11%)

Чувствителността към tigecycline бе изпитана чрез определяне на МПК на антибиотика за всички карбапенем - нечувствителни изолати *K. pneumoniae* (n=38) по микродилуционния метод в бульон чрез използване на Sensititre ТМ плаки. За интерпретацията на МПК на tigecycline бяха използвани граничните стойности за tigecycline за *Enterobacteriaceae*, определени от EUCAST v. 7.1 (МПК $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ – чувствителност; МПК >1 и $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ – интермедиерна чувствителност; МПК $>2 \mu\text{g/ml}$ – резистентност). Дванадесет изолата (31.6%) бяха определени като резистентни, демонстрирайки МПК_{tigecycline} = 4 $\mu\text{g/ml}$. Два изолата демонстрираха МПК_{tigecycline} = 2 $\mu\text{g/ml}$ (интермедиерна чувствителност), а при останалите 25 изолата (65.8%) стойността на МПК_{tigecycline} беше $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, което определи тези изолати като чувствителни (Таблица 5).

Таблица 5. Чувствителност към tigecycline на 38 карбапенем-нечувствителни изолата *K. pneumoniae*, определена чрез микродилуционен метод в бульон (Sensititre ТМ).

МПК на tigecycline ($\mu\text{g/ml}$)	Карбапенем-нечувствителни <i>K. pneumoniae</i> (n=38)	Интерпретация (EUCAST 2017)
4 $\mu\text{g/ml}$	n = 12	R (31.6%)
2 $\mu\text{g/ml}$	n = 1	I (2.6%)
1 $\mu\text{g/ml}$	n = 10	S (26.3%)
<1 $\mu\text{g/ml}$	n = 15	S (39.5%)

4.2.2.2. Изпитване на чувствителността към хинолони чрез определяне на МПК чрез Е-тест.

Чувствителността към хинолони на всички 159 изолата беше определена и чрез Е тест (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) (фигура 8).

Получените МПК на nalidix acid, ciprofloxacin и levofloxacin са показани на таблица 6.

Таблица 6. Разпределение на МИК на nalidix acid, ciprofloxacin и levofloxacin при 159 изолата *Klebsiella pneumoniae*.

Антимикробен препарат	МИК mg/l																		
	0.04	0.12 5	0.19	0.25	0.38	0.5	0.7 5	1	1.5	2	3	6	8	12	16	24	≥ 32 2	MIC 50	MIC 90
Ciprofloxacin	1	-	-	-	-	2	-	-	2	4	-	2	3	6	5	-	13 6	≥ 32	≥ 32
Levofloxacin	-	1	-	-	-	7	4	4	1	2	-	7	1 5	10	15	-	93	≥ 32	≥ 32
	МИК mg/l																		
	≤ 0.7 5	1	1.5 5	2	3	6	8	12	16	24	32	4 8	64	98	128	≥ 256	MIC 50	MIC 90	
Nalidix acid	-	-	-	-	4	3	1	2	1	2	-	-	-	-	-	146	≥ 256	≥ 256	

Обсъждане

В проучвания четири годишен период в УМБАЛ "Света Марина", Варна, *K. pneumoniae* е сред десетте най-често изолирани микроорганизми от общия брой изследвани клинични материали, като заема трето място по честота на изолируемост с относителен дял вариращ между 8.2% за 2014г. и 8.7% за 2017г. Голямата значимост на този причинител се подчертава от факта, че в етиологичната структура на бактериемииите за същия период, *Klebsiella pneumoniae* е най-честия изолат от кръв през 2014г. (7.2%), заема второ и трето място през 2017г. (8.8%) и 2016г. (8.4%), а през 2015г. е с относителен дял от 9.7%, което ѝ отрежда четвърто място в микробния спектър на бактериемииите.

Получените резултати в настоящото проучване демонстрират високи нива на резистентност при изолираните *K. pneumoniae* към основните антибиотични групи, използвани в клиничната практика. Най-високо ниво на резистентност се установява в групата на цефалоспориините от трета и четвърта генерация (ceftazime, cefotaxime, 54.8%, cefepime, 52.7%, piperacillin/tazobactam 47.4%), следвано от това към хинолоните (ciprofloxacin, levofloxacin - 47.1%, 42.8%) и към gentamicin (38.3%). За подобна колекция от 1021 изолата *K. pneumoniae*, изолирани от пациенти в Университетска болница в Бразилия през 2016г. Lorenzoni и колектив съобщават значително по-високи нива на резистентност към ciprofloxacin (68.7%), gentamicin (56.2%) и meropenem (52.6%), но по-ниски към amikacin (3.4%) (Lorenzoni, 2018). В скорошно проучване на S. Ryu и колектив върху антибиотичната резистентност на общо 6472 клинични изолати *K. pneumoniae*, изолирани от пациенти в Общинска болница в Южна Корея в периода 2012 – 2016г., се съобщава за статистически значимо нарастване на резистентността към piperacillin/tazobactam до 46% през 2016г. и за стабилизиране на относителния дял на levofloxacin и cefazidime резистентните *K. pneumoniae*, като се доказват средни нива от 30% и 34% съответно за 5 годишен период (Ryu, 2018), значително по-ниски от установените от нас - 54.8% към ceftazidime и 42.8% към levofloxacin. В допълнение, тридесет и седем медицински центъра в 12 азиатско-тихоокеански страни участващи в програмата SMART през периода 2008 - 2014 г. съобщават дори по-високи нива на резистентност към levofloxacin (64%), ciprofloxacin (72.9%), ceferime (86,3%) и ceftriaxone (99.7%) (Jean SS, 2017).

В настоящото проучване, се отчетоха статистически значими ($p = 0.0001$) разлики в нивата на резистентност към почти всички антибиотични

препарати (с изключение на amikacin), сравнявайки цялата колекция 2014-2017г (n=1084) и групата изолати резистентни на трета генерация цефалоспорини (n=589) (таблица 2). В допълнение, в групата на резистентните на трета генерация цефалоспорини и тази на карбапенем-резистентните изолати, бяха отчетени статистически незначими разлики в нивата на резистентност към тестваните антибиотици, с изключение на карбапенемите (p=0.0001) (Таблица 3.)

Проучване от 2009г. върху ESBLs продукцията на резистентни към цефалоспорини от трета генерация клинични изолати *K. pneumoniae* от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ "Света Марина" – Варна идентифицира CTX-M-3 и CTX-M-15 ESBLs като основен механизъм, асоцииран с резистентността към ceftazidime и cefotaxime (Марковска, 2012). Проучване, извършено през 2010г. върху динамиката в резистентността на най-честите бактериални патогени в болницата в периода 2004 - 2008г. установява нарастващи нива на резистентност в *K. pneumoniae* към цефалоспорини от трета генерация, вариращи в диапазона 12% - 42%. В същото проучване резистентността към gentamicin е между 21% и 37%, а тази към ciprofloxacin – между 4% и 24%, с ясна тенденция за увеличаване (Стоева, 2010). Ежегодно мониторираните нива на резистентност към цефалоспорини от трета генерация на основните бактериални видове от семейство *Enterobacteriaceae* в периода 2009 – 2013г. показват тенденция да остават високи при *K. pneumoniae*, като се стабилизират в диапазона 52-54% (непубликувани данни). Резултатите от настоящото проучване, отразяващо следващия 4 годишен период - 2014 - 2017г., потвърждават тази тенденция, като показват резистентност към cefotaxime (ceftazidime) от 54.8%. Сходно 10 годишно проучване върху резистентни към цефалоспорини трета генерация Грам отрицателни бактерии в Университетска болница в Япония, обхващащо периода 2006 – 2015г., също установява нарастващ дял на резистентните към цефалоспорини от трета генерация *K. pneumoniae* (вкл. ESBL продуциращи), но в значително по-слаба степен в сравнение с докладваните от нас нива: от 22% за 2006 г до 32% за 2015г. (Yamaguchi Hi, 2018).

В настоящото проучване установяваме, че антибиотичната резистентност на тестваните изолати *K. pneumoniae* варира според анатомичното място на изолация. Инвазивните изолати от хемокултури демонстрират сигнификантно по-високо нива на резистентност към всички тествани антибиотици в сравнение с изолатите от други видове клинични материали. Най-високо ниво на резистентност сред тази група изолати се доказва към цефалоспорините от трета генерация cefotaxime и ceftazidime (81%). По

данни на EARS-Net средната резистентност през 2016г. към цефалоспорини от трета генерация за Европа за изолати *K. pneumoniae* от кръв и ликвори е 25.7%, като проследена в периода 2013-2016г. показва тенденция слабо да се понижава. Данните показват широки вариации в стойностите на проследявания показател: от 0% за Исландия до 72.5% (2013-2016г.) за България и Гърция, като тези две страни заемат първо място сред общо 30 държави - участнички в мониторинга. По данни на EARS-Net през 2016г. в общо 8 държави резистентността към цефалоспорини от трета генерация е над 50%. Страни с близки до средните европейски стойности са: Малта, Испания, Белгия, Словения, Франция. Нива над 30% се установяват в Унгария (35-37%), Португалия (40-47%), Латвия (52-47%) и Хърватия (47-49%). За периода 2013-2016г. за 6 страни (от общо 30) се установява сигнификантно увеличение на тази резистентност. За същия период националните данни сочат, че в България се наблюдава статистически незначима тенденция за намаляване на резистентността, като тя се движи от 74.8% през 2014г. до 75% през 2015г. и 72.5% през 2016г. Получените от нас локални данни за периода 2014 – 2016г. са много близки до съобщаваните на национално ниво. По-голяма част от cefotaxime – резистентните инвазивни изолати *K. pneumoniae*, изолирани от хемокултури, демонстрират множествена резистентност, което създава сериозно терапевтично затруднение и е значим фактор за изхода от инфекциите на кръвта, асоциирани с такива изолати.

След бета-лактамна група антибиотици (ceftazidime, cefotaxime, piperacillin/tazobactam), най-високи нива на резистентност в нашето проучване се доказват за хинолоните ciprofloxacin и levofloxacin, както в цялата проучвана група, така в групата на изолатите от хемокултури (65% и 59% съответно). По данни на EARS-Net за 2016г. резистентността към хинолони в инвазивни изолати *K. pneumoniae* за Европа се движи от 0% за Исландия до 68.6% за Гърция. Заедно с Литва, Италия, Румъния, Чехия, Словакия и Полша, България е сред 8-те държави с нива на резистентност над 50% (55.6%), което съответства на получените от нас резултати. Средното Европейско ниво на резистентност към хинолони за 2016г. е 24.6%, като за периода 2014 – 2016г. данни за сигнификантно намаляване на тази резистентност се установява само в две от общо 30 мониторираните държави (Дания и Австрия). Подобно на хинолоните, настоящото проучване установява силно редуциране на чувствителността на инвазивните изолати *K. pneumoniae* и към gentamicin (49%). По данни на EARS-Net за 2016г., България е страната, в която се регистрира най-високо ниво на резистентност към аминогликозиди в инвазивни изолати *K. pneumoniae* (64.4%).

Мониторингът установява значителни вариации за Европа: от 0% за Исландия до над 50% за страни като Гърция, Полша, Румъния, Словакия и България. Средното Европейско ниво на аминокликозидна резистентност за 2016г. е 19%. Положителен резултат от настоящото проучване е съхранената активност на amikacin (13% резистентност), като този антибиотик е сред най-активните препарати срещу изолати *K. pneumoniae* от кръв, заедно с meropenem. В съответствие с нашите резултати, данните от EARS-Net 2015г. сочат, че само 17.2% от инвазивните изолати *K. pneumoniae* в Европа (15 421 изолата) са едновременно резистентни на gentamicin и amikacin. В настоящото проучване, подобно на изолатите от кръв, високи нива на антибиотична резистентност се установяват и сред групата изолати *K. pneumoniae* от урини: cefotaxime (59%), cefepime (57%), piperacillin/tazobactam (53%), gentamicin (41%), ciprofloxacin (52%) и levofloxacin (48%). В контраст с изолатите от кръв и урина, *K. pneumoniae* от респираторни секрети и в по-малка степен тези от раневи секрети демонстрират по-ниски нива на резистентност към всички изпитвани антибиотични групи: cefotaxime – 22% и 47% съответно, cefepime – 21% и 46%, piperacillin/tazobactam – 16% и 40%, ciprofloxacin – 16% и 42% и levofloxacin – 15% и 39%.

И в четирите групи изолати (кръв, урина, рани, респираторни секрети) най - активните антибиотици са meropenem с нива на резистентност, вариращи от 1 до 11% и amikacin - от 3 до 13%.

В настоящото проучване резистентността към карбапенеми в цялата колекция от изолати е 4%, като при *K. pneumoniae* от кръв това ниво е най-високо - 11% и е над средното за Европа за периода 2014 - 2016г. (6.1%) . Сред причините за повишената изолируемост на инвазивни, карбапенем - резистентни *K. pneumoniae* в УМБАЛ "Света Марина" – Варна, са възможна вътреболнична дисеминация на епидемични, карбапенем-резистентни клонове *K. pneumoniae*, вътревидов хоризонтален трансфер на гените, кодиращи резистентност към карбапенемни антибиотици или внасяне на различни (в генетично отношение) карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* изолати в болницата. Мониторирането на тази проблемна резистентност в УМБАЛ „Света Марина“ показва, че в периода 2007-2011г. активността на карбапенемните антибиотици срещу инвазивни изолати *K. pneumoniae* е напълно съхранена (0% резистентност). Първите карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* са идентифицирани в периода април – август 2012г. (Markovska, 2013; Стоева, 2013; Стоева, 2016а). В национален мащаб в периода 2007 – 2011г. карбапенемната резистентност сред изолатите *K.*

pneumoniae от хемокултури в България е под 1%, а в периода 2013- 2016г. се движи в диапазона 0% - 7.2%. Процентът на карбапенем-резистентните изолати сред всички 30 Европейски мониториранни държави за 2016г. варира в широки граници – от 0% в Хърватска, Словения, Норвегия, Чехия, Естония, Исландия, Люксембург до 31.4% за Румъния, 33.9% - Италия и 66.9% за Гърция, където се доказва вътре- и междуболнична дисеминация на хиперепидемичен карбапенем-резистентен клон *K. pneumoniae*. (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>). Този факт е много тревожен, тъй като оставащите терапевтични алтернативи за инфекциите, причинени от карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* са изключително малко и често се ограничават до използването на colistin, tigecycline и fosfomycin. Това се потвърждава и от резултатите в настоящото проучване, които показват още по-изразена множествена резистентност, сравнена с тази при ESBL продуциращите изолати *K. pneumoniae* от хемокултури, като сред засегнатите антибиотици е и colistin (21% резистентност). По литературни данни инфекциите на кръвта, причинени от карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* се асоциират със значителна смъртност – между 22% и 72%, една от причините, за което е ненавременната и често липсваща ефективна антибиотична терапия (Стоева, 2016a); Borer, 2009; Diene, 2014).

В настоящото проучване беше определена чувствителността и към три антимикробни лекарствени препарата, определяни като стратегически антибиотици и средства на последен избор в случаите на инфекции, причинени от карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* - ceftazidime/avibactam, colistin и tigecycline. Получените от нас резултати показват, че в групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, с най-добра активност заедно с amikacin (10.5% резистентност), са ceftazidime/avibactam (10.5%), следван от colistin (21%) и tigecycline (34.2%).

Avibactam е принципно нов, синтетичен бета-лактамазен инхибитор с не-бета-лактамна структура. Въведен официално в клинична употреба в началото на 2015г. в състава на комбиниран препарат заедно с цефалоспорина от III генерация - ceftazidime, основните му показания за приложение се отнасят до интраабдоминални инфекции (в съчетание с metronidazole) и усложнени инфекции на уринарния тракт. Обширни клинични проучвания сочат добрата ефективност на препарата и при лечението на нозокомиални пневмонии, включително такива, асоциирани с механична вентилация (Sader, 2014 Lagacé-Wiens, 2014). Терапевтичният спектър на ceftazidime-avibactam включва множество резистентни Грам-отрицателни бактерии от семейство *Enterobacteriaceae* (вкл. *Klebsiella*

pneumoniae) и *Pseudomonas aeruginosa*, продуциращи широкоспектърни β -лактамази от клас А (ESBLs), карбапенемази от клас А (КРС) и/или β -лактамази от клас С (AmpC ензими – предимно цефалоспориноми). За разлика от тях, ензимите от клас В, известни като метало - β -лактамази, също с карбапенемазна активност (NDM, VIM, IMP, VEB, PER) са устойчиви на действието на avibactam, поради което бактерии, продуценти на този тип карбапенемази не се повлияват от комбинирания препарат (Lagacé-Wiens, 2014).

Множество проучвания демонстрират добрата *in vitro* активност на ceftazidime/avibactam по отношение на карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, съобщавайки висок относителен дял на чувствителни изолати (Alatoom, 2017; Lagacé-Wiens, 2014). Получените от нас резултати напълно потвърждават тези данни. Практически всички изолати, доказани като продуценти на карбапенемата от клас А - КРС-2 (таблица 1), демонстрираха напълно съхранена чувствителност към ceftazidime/avibactam. Интерес представлява и факта, че единствения изолат, при който бе установена продукция на две различни бета-лактамази с карбапенемазна активност – КРС-2 и VIM-1 (клас В метало-бета лактамаза), също показва чувствителност към комбинирания препарат. Предвид неефективността на ceftazidime/avibactam спрямо метало-беталактамазите (вкл. VIM), тази находка свързахме с вероятно ниско ниво на експресия на *bla*_{VIM-1} гена при доминиращ ефект на КРС-2 карбапенемата. Като се вземе под внимание характерния профил на активност на ceftazidime/avibactam, всички NDM-1 продуциращи изолати *K. pneumoniae* бяха доказани като резистентни към действието му. Получените от нас данни сочат много нисък относителен дял на NDM-1 продуциращи *K. pneumoniae* в проучвания период от време и доминиране на КРС-2 продуциращите изолати *K. pneumoniae* в интензивните болнични структури. В този смисъл, приложението на ceftazidime/avibactam е сред малкото добри терапевтични опции за пациентите. Предимство на комбинирания препарат е добрата му поносимост, липсата на кумулативен ефект и сериозни странични ефекти при стандартен дозов режим от 2g ceftazidime и 500mg avibactam в интравенозна инфузия на всеки 8 часа.

Скорошно проспективно мултицентърно проучване от 2018г., сравняващо ефикасността на ceftazidime/avibactam и colistin при лечението на тежки инфекции, причинени от карбапенем-резистентни чревни бактерии (предимно *K. pneumoniae*) установява значимо по-ниски нива на смъртност и по-висока вероятност за благоприятен изход в групата пациенти, лекувани с ceftazidime/avibactam (Van Duin, 2018).

Полимиксиновият антибиотик colistin е одобрен за клинична употреба още в края на 50-те години на 20-ти век, но поради съобщения за висок риск от невро- и нефротоксичност не е бил широко използван в терапевтичната практика. Впоследствие проучвания показват, че рискът от потенциални токсични усложнения при употребата на colistin е по-нисък от първоначално установения и понастоящем той се използва успешно за лечение на инфекции, предизвикани от множество резистентни Грам - отрицателни бактерии, основно *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, но и карбапенем - резистентни ентеробактерии, сред които *K. pneumoniae* (Landman, 2008). Поради повсеместното разпространение на този тип патогени, употребата на colistin е нарастнала драматично, което закономерно води до повишаване на нивата на резистентност към този препарат (Monaco, 2014; Otter, 2017). Колистиновата резистентност сред *K. pneumoniae* е вече широко разпространена в много региони на Европа, Северна и Южна Америка, Азия и Южна Африка, като този феномен най-често бива обвързан със селективния натиск от употребата му (Ah YM, 2014). В настоящото проучване резистентността към colistin сред карбапенем-резистентните изолати е 21%. По-висок дял на колистинова резистентност съобщават Ю. Проевска и колектив при проучване върху клинични MDR изолати *K. pneumoniae* 32.9% при карбапенем-нечувствителни и 14.3% при карбапенем-чувствителни изолати *K. pneumoniae* (Проевска- Мартева). Савов също съобщава за резистентност към colistin в карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, продуценти на KPC-2 и SHV-5 бета-лактамази, изолирани в България (Savov, 2017). EARS Net-2015 докладва 8.8% резистентност към colistin сред общо изследвани 26.3% от всички инвазивни изолати *K. pneumoniae* през 2015г. в Европа, като по-голяма част от тези изолати са докладвани от Гърция и Италия. Сред тестваните на colistin карбапенем-резистентни изолати, 31.9% са резистентни, докато едва 2.6% от карбапенем-чувствителните *K. pneumoniae* са и colistin-резистентни. Много голям дял (95%) от изолатите с комбинирана (карбапенемна и колистинова) резистентност са съобщени от Гърция и Италия (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2015>; Ah, 2014) Наскоро публикувано обширно проучване в Гърция, обхващащо 15-годишен период, демонстрира сигнификантна зависимост между употребата на colistin и развитието на резистентност към препарата сред инвазивни, карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* с покачване на колистиновата резистентност от 0 до 26% в проследявания период (Tansarli, 2018). При проучване на свързани със здравето обслужване инфекции на кръвта, бързо нарастване на колистиновата резистентност сред *K. pneumoniae*, е установено и в друга съседна на България държава – Турция.

Доказана е ясна зависимост между резистентността към colistin и карбапенемите от една страна и риска от фатален изход на заболяването от друга (Aydin, 2018).

Сред най-значимите фактори за възникване на резистентност към colistin се оценяват повишената консумация на антибиотика, като особено рискови са провеждането на монотерапия с colistin, продължителността на лечението (над 14 дни), както и субоптималното дозиране на препарата. За *K. pneumoniae* е характерен феноменът „хетерорезистентност“ към colistin, който се проявява с наличие на субпопулации с различно ниво на резистентност в щамове, определени като чувствителни при използване на стандартни методи за определяне на чувствителност (Silva, 2016; El-Halfawy, 2015). Смята се, че дори при оптимално дозиране на colistin съществува риск от развитие на резистентност, поради селектиране на хетерорезистентните субпопулации (El-Halfawy, 2015; Blondeau, 2009). Нарастване нивото на колистинова резистентност в дадена болнична структура може да се дължи и на клонално разпространение на даден епидемичен colistin резистентен щам в хода на вътреболнична епидемия с различна интензивност и продължителност във времето.

Tigecycline е първият глицилциклинов антибиотик и е един от малкото нови препарати с активност срещу Грам-отрицателни бактерии, включващи множество резистентни *Enterobacteriaceae* и *A. baumannii*. В последните години обаче се появяват редица съобщения за резистентност към tigecycline при лечение на инфекции, причинени от мултирезистентни *K. pneumoniae*. В САЩ в мултицентрово проучване сред 287 хоспитализирани пациенти се съобщава за висок дял на tigecycline нечувствителни *K. pneumoniae*, асоциирани с различни инфекции. В това проучване Van Duin и кол. установяват, че в 46% от случаите на инфекции с карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* се доказва интермедиерна чувствителност или резистентност към tigecycline (van Duin, 2015a). Подобни данни съобщават Elgendy и кол. в университетска болница в Египет, установявайки 39.1% резистентност към tigecycline сред неутропенични пациенти от интензивно хематологично отделение, инфектирани с *K. pneumoniae*, без преди това да е проведено лечение с tigecycline (Elgendy SG, 2018). В унисон с тези данни, нашите резултати показваха резистентност над 25% (34.2%) към tigecycline в групата на карбапенем-резистентните изолати *K. pneumoniae*. В този смисъл, към настоящия момент tigecycline би могъл да се използва като алтернатива за терапия на инфекции, причинени от карбапенем и/или и colistin резистентни *K. pneumoniae*, но след изпитване на чувствителността на изолата.

В заключение, изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства установи висок процент на резистентност към цефалоспорини от III генерация (54.8%) на изолати *Klebsiella pneumoniae* за периода 2014 – 2017г. Резистентните на цефалоспорини трета генерация изолати демонстрираха във висока степен резистентност към представители и на други антибиотични групи – piperacillin/tazobactam (96.5%), ciprofloxacin (96.5%), trimethoprim/sulphamethoxazole (63.0%) и gentamicin (69.3%). Значително по-високи нива на резистентност бяха установени при изолати *K. pneumoniae* от кръв и урина в сравнение с тези от раневи секрети и секрети от респираторния тракт. В групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, единствено ceftazidime/avibactam и amikacin демонстрираха най-добра in vitro активност.

4.3. Проучване на механизмите на резистентност към β -лактами.

4.3.1. Фенотипни методи за доказване продукцията на β -лактамази

4.3.1.1. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукцията на широко-спектърни β -лактамази.

С цел скрининг при 159 клинични изолати *K. pneumoniae* се приложи двойно - дисковият тест за синергизъм (DDST) по метода на Jarlier (таблица 7). Заложени бяха следните дискове: cefotaxime 30 μ g, ceftriaxone 30 μ g, ceftazidime 30 μ g и amoxicillin/clavulanic acid (20/10). При 122 изолата (76.7%) бе отчетен положителен резултат: синергизъм между дисковете, натоварени с цефалоспоринов препарат от III генерация (CTX 30, CRO 30 или CAZ 30) и диска amoxicillin/clavulanic acid (фигура 9). При 3 изолата (1.9%) се получи феномен на антагонизъм, а при 5 (3.14%) се отчете едновременно синергизъм и антагонизъм.

Таблица 7. Разпределение на изолатите *K pneumoniae* според ефекта при DDST за определяне продукцията на ESBL.

Общ брой изпитвани клинични изолати <i>K. pneumoniae</i> (брой)	Ефект на синергизъм	Ефект на антагонизъм	Синергизъм + Антагонизъм	Липса на ефект
n = 159	n=122 76.7%	n=3 1.9%	n=5 3.14%	n=29 18.2%

При последващите PCR реакции общо 149 изолата (93.7%) бяха определени като продуценти на ESBLs по този метод. Данните показват, че чувствителността на теста е 143/149 – 96%. Вероятно този висок процент се дължи на намаляването на разстоянието между дисковете amoxicillin/clavulanic acid и ceftazidime или cefotaxime от 2.5 см на 2 см, което увеличи шанса за поява на синергизъм. В част от изолатите се установи феномен на антагонизъм (три изолата), а при други - синергизмът беше придружен с феномен на антагонизъм поради индуциране на AmpC ензимите от clavulanic acid, което по-късно при проведените молекулярно-генетични анализи бе потвърдено в пет изолата изолата *K. pneumoniae*, които демонстрираха негативен DDST и чрез PCR метода бяха идентифицирани като DNA-1 и CTX-M-3 продуценти.

4.3.1.2. Модифициран Hodge тест (МНТ).

При 38 карбапенем-нечувствителни изолати бе приложен модифициран Hodge тест. Положителни резултати получихме при 92% (n=35) от изолатите. При останалите 2 изолата се отчетоха отрицателни резултати, а при един много слабо положителен резултат.

При последващите PCR реакции всички 38 карбапенем-нечувствителни изолати бяха доказани като продуценти на карбапенемази.

Обсъждане

Бързото идентифициране на продукцията на бета-лактамази с широк спектър на действие в медицински значими Грам отрицателни бактерии е от изключителна важност за провеждане на адекватна антибиотична терапия и ограничаване разпространението на такива щамове в болничната среда. Понастоящем са разработени множество тестове за детекция на ESBLs и AmpC ензими (Polsfuss, 2012; Fahim, 2017; Shaikh, 2016).

Един от най-често използваните фенотипни методи за детекция на широкоспектърни бета-лактамази сред представителите на семейство *Enterobacteriaceae* е т.нар. двойно дисков тест за синергизъм (DDST), въведен от Jarlier (Jarlier, 1988). Този тест е лесно изпълним, но не е неподходящ за детекция на ESBLs в присъствието на AmpC β-лактамази, тъй като последните са устойчиви на clavulanic acid (Jacoby, 2009). Според EUCAST, 2018 чувствителността в представителите на семейство *Enterobacteriaceae* към цефалоспорини трябва да се интерпретира според отчетените зони на задръжка, а фенотипните методи за скрининг за ESBLs продукцията да се извършват с епидемиологична цел (<http://www.eucast.org>). По-трудно и недостатъчно надеждно е осъществяване на детекция на AmpC-

продуциращи бактерии с фенотипни тестове. Недостатък на фенотипните тестове е и невъзможността им да разграничават различните семейства плазмид-медиранни AmpC ензими и хромозомни такива (Jacoby, 2009). Поради тази причина multiplex PCR реакцията се явява основен метод и „златен стандарт“ за AmpC детекция и идентификация. Други автори използват tazobactam и ceftipime с цел разграничаване на фалшиво-отрицателните резултати при детекцията на ESBL в присъствието на AmpC β-лактамаза. Tazobactam е много слаб индуктор на AmpC β-лактамазите, а ceftipime (като индикаторен антибиотик) е по-надежден при детекцията на ESBLs в присъствие на AmpC β-лактамази, а така също е и по-устойчив при свръхпродукция на хромозомни AmpC β-лактамази (Fahim, 2017).

В настоящата работа беше установена липса на синергизъм и/или наличие на синергизъм/антагонизъм при DDST при 29 изолата. Феноменът на антагонизъм може да се асоциира с наличие на плазмидни AmpC β-лактамази, които при наличие и на ESBL се комбинира със синергизъм. Липса на синергизъм при DDST в изолати, резистентни на широкоспектърни цефалоспорини и/или такива с намалена чувствителност към карбапенеми може да се асоциира със високите нива на резистентност при комбинациите от ESBL и карбапенемази и липса на каквато и да било зона около дисковете, както и с неензимно медирана резистентност напр загуба на OmpK35 и OmpK36 порини (Martínez-Martínez, 2008).

По отношение на продукцията на карбапенемази съществуват различни фенотипни методи за детекция, но нито един не е достатъчно надежден или универсален. Модифицираният тест Hodge е лесно изпълним и е добър за детекция на серин-базирани карбапенемази. Той обаче често дава фалшиво отрицателни или съвсем слабо положителни резултати при металобета-лактамазите. В настоящата работа положителните изолати от провеждането на МНТ в последствие се доказаха като продуценти на KPC-2 карбапенемазата (33 изолата), OXA-48 (един изолат) и VIM-1 (два изолата, единият от които копродуцент на KPC-2). Двата изолата с отрицателен Ходж тест и единственият – със слабо позитивния, се доказаха като продуценти на NDM-1 карбапенемаза.

По литературни данни най-използвани методи са двойно-дисковия синергистичен тест (DDST) и комбинирания дисков тест (CDT). При DDST се използва диск с карбапенем, поставен до диск с MBL инхибитор (най-често EDTA) (Miriagou, 2010; Hrabak, 2014). За детекция на MBLs се използват E-тест ленти натоварени с imipenem и imipenem плюс EDTA или meropenem и meropenem плюс EDTA (Miriagou, 2010; Girlich, 2013). Детекцията на KPC се базира на феномена на инхибиране на ензима от борониева киселина (Pasteran, 2008). Най-прецизната идентификация днес е

доказването на карбапенемазни гени с молекулярно-генетичните техники - PCR (вкл. Real Time PCR) с последващо секвениране на гена (Nordmann, 2011a).

В заключение, проведеният двойно-дискон синергичен тест с цефалоспорини трета генерация и amoxicillin/clavulanic acid (20/10) за установяване наличието на ESBLs β -лактамази в изолати от *K. pneumoniae* очаквано се характеризира със сравнително добра чувствителност – 81 % , както и модифицирания тест за наличие на карбапенемази се характеризира с добра чувствителност - 92%.

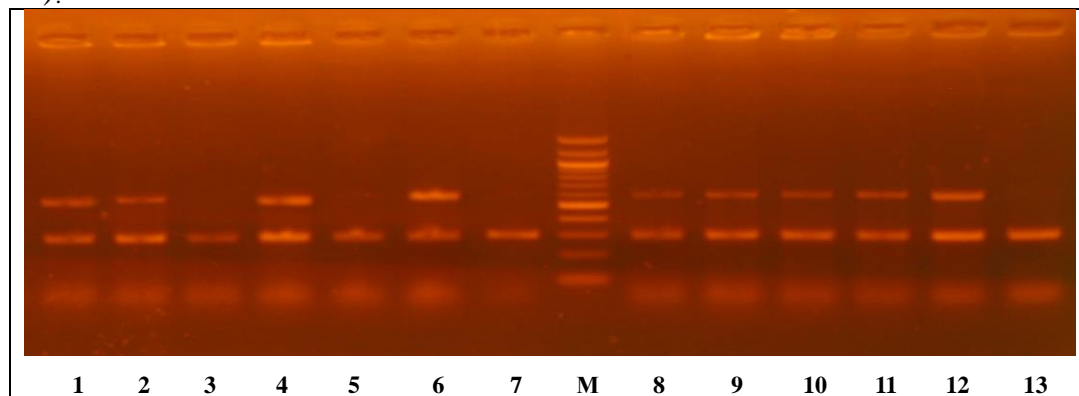
4.3.2. Молекулярно - генетична идентификация на ESBL

4.3.2.1. PCR метод за доказване на гени, кодиращи β -лактамази

С цел установяване на генетичните механизми на резистентност към β -лактами беше приложен PCR метода и секвениране за доказване на най-често срещаните гени, кодиращи широко спектърни β -лактамази (CTX-M и SHV ESBLs от клас А), карбапенемази (клас А, В, D), основните AmpC ензими от клас С, както и OXA β -лактамази от клас D, според установените от изоелектричното фокусиране резултати.

- **PCR за доказване на гени, кодиращи CTX-M и SHV ESBLs**

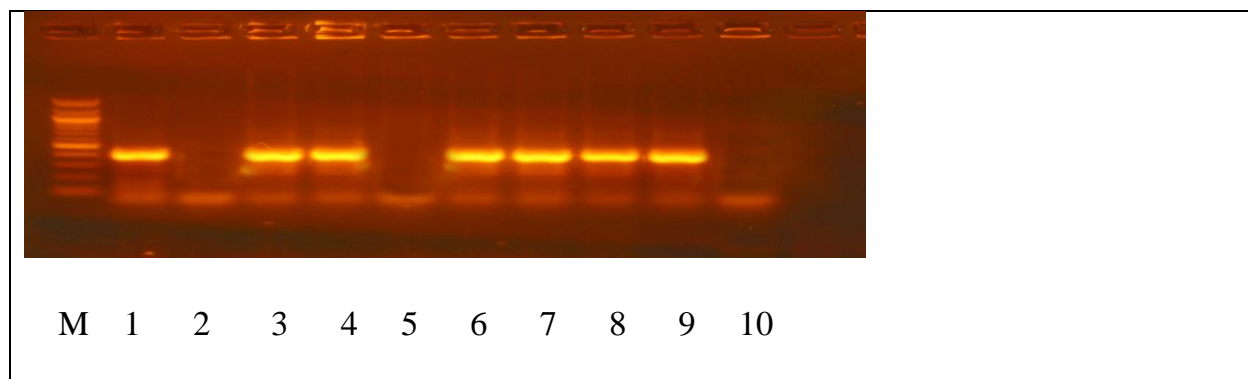
При всички 159 изолата *K. pneumoniae* беше приложен multiplex PCR за детекция на *bla*_{CTX-M} и *bla*_{SHV}. Генерираните PCR продукти бяха с големина 290 bp за *bla*_{SHV} и 585 bp за *bla*_{CTX-M} съответно. При 93.1% от изолатите (n=148) се доказва наличие на *bla*_{CTX-M}, а при 100% (n=159) - *bla*_{SHV} (фигура 8).



Фигура 8. Multiplex PCR за детекция на гени, кодиращи CTX-M и SHV ESBLs. Изолати на позиция № 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12. – положителни за наличие на *bla*_{CTX-M}; изолати на позиция №1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13. – положителни за наличие на *bla*_{SHV}; M- маркер.

- **PCR за доказване на гени, кодиращи AmpC ензими (DNA, FOX, EBC, MOX, ACC и CMY).**

Общо 60 изолата *K. pneumoniae* - карбапенем резистентни и/или резистентни на sefoxitin и демонстриращи антагонизъм при DDST бяха тествани чрез PCR за продукцията на AmpC ензими. Само три карбапенем резистентни изолата бяха положителни за наличие на *bla_{CMY}*, като големината на амплифицирания продукт беше 1000bp. От 8-те изолата, демонстриращи антагонизъм, всички бяха негативни за *bla_{CMY}*. Шест изолата бяха позитивни за наличие на *bla_{DNA}*. Размерът на амплифицирания продукт беше 405 bp (фигура 9). Не бяха доказани *bla_{EBC}*, *bla_{FOX}*, *bla_{MOX}* и *bla_{ACC}* гени.



Фигура 9. PCR за детекция на гени, кодиращи DNA ензими. Изолати на позиция №1, 3, 4, 6, 7, 8 – положителни за наличие на *bla_{DNA}*; Изолати на позиция №2, 5, 10. – отрицателни за наличие на *bla_{DNA}*; М- маркер. Позиция №9 положителна контрола.

- **PCR за доказване на гени, кодиращи OXA бета-лактамази**

Чрез PCR за *bla_{OXA}* III гр бяха изпитани общо 116 изолата, от които 75% (n=87) бяха положителни. При всички тези изолати *K. pneumoniae* се установи едновременно присъствие на *bla_{CTX-M}* и *bla_{SHV}*.

- **PCR за доказване на гени, кодиращи бета-лактамази с карбапенемазна активност.**

Общо 38 изолата *K. pneumoniae* с намалена или липсваща чувствителност към карбапенеми бяха тествани за наличие на гени, кодиращи карбапенемази от различни класове. При 33 изолата беше доказан *bla_{KPC}*, докато *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* и *bla_{OXA}* бяха идентифицирани в единични изолати, съответно - 3 за *bla_{NDM}*, 2 за *bla_{VIM}* и един за *bla_{OXA}*. Един изолат беше положителен едновременно за *bla_{VIM}* и *bla_{KPC}*.

4.3.3. Определяне вида на бета-лактамазата чрез изоелектрично фокусиране IEF и биологичен тест за β -лактамазна хидролитична активност.

Изоелектрично фокусиране (IEF) беше извършено с 45 репрезентативни (според фенотипа на резистентност и резултатите от групово специфичния PCR за определяне на вида ESBL/AmpC/карбапенемаза) изолати, с цел разделяне и определяне наличието на β -лактамази. Изоелектричните точки (pI) на изследваните ензимни екстракти бяха определени чрез сравняване с β -лактамази с известни pI, а именно: CTX-M-15, pI 8.8; CTX-M-3, pI 8.4; SHV-5,-12, pI 8.2; SHV-3, pI 7.0; OXA-1, pI 7.4; TEM-1, pI 5.4; тясноспектърна бета-лактамаза SHV, pI 7.6; CMY-1, pI 8.0.

Резултатите от IEF показаха присъствие в тестваните изолати на 2 до 5 бета-лактамази. Продукция само на един ензим бе доказана в един изолат *K. pneumoniae*.

От групата на CTX-M положителните изолати (n=109) бяха изследвани 25 изолата. При 17 от изолатите присъстваше β - лактамаза с pI 8.8, която хидролизира cefotaxime, т.е. положителен биологичен тест (фигури 10 и 11). При четири изолата, чиято бета-лактамаза се фокусира в pI 8.4 се визуализира също положителен тест за хидролиза на cefotaxime. Тези изоелектрични точки отговарят на широкоспектърните бета-лактамаза от CTX-M тип. При четири изолата установихме две бета-лактамази от CTX-M тип едновременно продуцирани от един и същи изолат (таблица 8).

От групата на CTX-M и/или KPC положителните изолати бяха изследвани десет, като беше доказан ензим с pI 6.7, за който освен хидролитична активност към cefotaxime беше установена и хидролитична активност спрямо imipenem. На тази изоелектрична точка отговаря KPC-2 ензима. При седем изолата се визуализира и бета-лактамаза с pI 8.8. При един в допълнение към бета-лактамазата с pI 6.7 (активност спрямо imipenem) установихме и бета-лактамаза с pI 5.1(активност спрямо imipenem). В тази точка се фокусира VIM-1 метало-карбапенемазата.

При един изолат с намалена чувствителност към imipenem и положителен за OXA-48 и CTX-M се доказаха две бета-лактамази – с pI 8.8 (активност спрямо cefotaxime) и pI 7.2 (активност спрямо imipenem). На тази изоелектрична точка (pI 7.2) се фокусира OXA-48 карбапенемазата.

При четири изолата положителни за ДНА установихме бета-лактамаза с

pI 6.9, като при три от тях се установи и ESBL фокусираща се в pI 8.4.

При един изолат (VIM и SHV положителен) не установихме CTX-M ензими. Той продуцираше бета-лактамази с pI 8.2 и pI 5.1 (активност спрямо imipenem).

В резултат на IEF потвърдихме продукцията на установените при PCR експериментите групи бета-лактамази, като те съответстваха на броя на доказаните с IEF ензими. TEM ESBLs, фокусиращи се в ниска изоелектрична точка (под pI 7) не бяха установени. Само в групата на NDM продуцентите не беше потвърдена продукцията на NDM чрез IEF. Тази карбапенемаза не се визуализира при изоелектричното фокусиране. В литературата няма съобщение, в което да се докладва успешно фокусиране на този тип ензими.

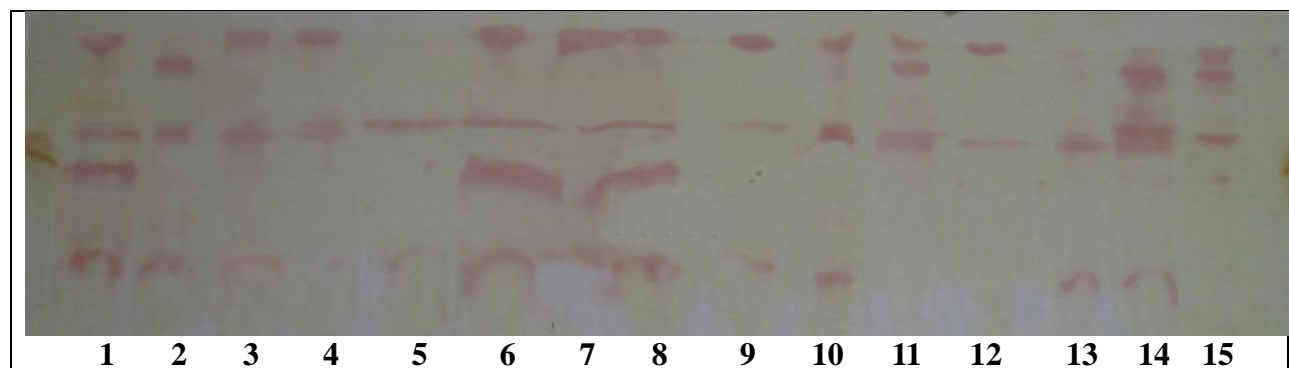
В допълнение, при 36 изолата се доказа β - лактамаза с pI 5.4, без хидролична активност към cefotaxime (отрицателен биологичен тест). При 18 изолата бяха установени и допълнителни бендове с pI 7.4 (без хидролитична активност). В тази изоелектрична точка се фокусират OXA-1 ензимите. При 29 изолата бяха визуализирани бета-лактамази с pI 7.6, всички без активност към cefotaxime. Обобщените резултати от IEF и биологичния тест за β -лактамазна хидролитична активност са представени в таблица 8.

Таблица 8. Обобщени резултати от IEF и биологичния тест за хидролитична активност за определяне наличието на β - лактамази сред изолати *Klebsiella pneumoniae*.

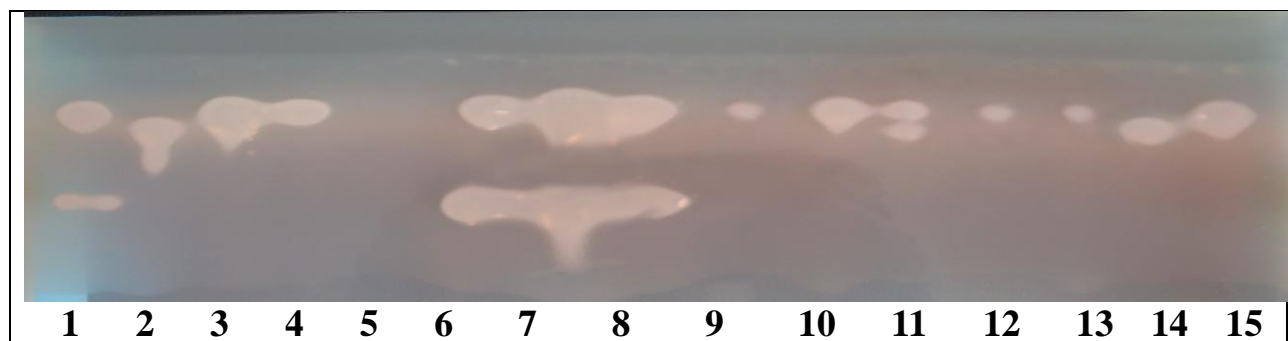
PCR положителни	Брой изолати, тествани с IEF	pI (IEF)	Bioassay: хидролиза на IMP 0.5 mg/L	Bioassay: хидролиза на CTX 2mg/L
CTX-M, SHV n=109	n=17	[5.4] / [7.4] /[7.6]/ 8.8	-	При pI 8.8
	n=4	5.4 / [7.6] / 8.4	-	При pI 8.4
	n=4	5.4 / 7.6 / 8.4 / 8.8	-	При pI 8.4,8.8
CTX-M, KPC, SHV n=30	n=9	[5.4] / 6.7 / [7.4] / 8.8	При pI 6.7	При pI 8.8
KPC, SHV n=2	n=1	5.4 / 6.7 / 7.4	При pI 6.7	-
KPC, VIM,	n=1	5.1 / 6.7	При pI 5.1,	-

SHV n=1			6.7	
CTX-M,OXA-48, SHV n=1	n=1	5.4 / 7.2 / 7.4 / 8.8	При pI 7.2	При pI 8.8
CTX-M,NDM,CMY, SHV n=3	n=1	5.4 / 8.8	-	При pI 8.8, >9.0
VIM, SHV n=1	n=1	5.1 / 8.2	При pI 5.1,	При pI 8.2
DHA, SHV n=3	n=1	5.4 / 7.6 / 7.8	-	-
DHA,CTX-M, SHV n=5	n=3	5.4 / 7.6 / 7.8 / 8.4	-	При pI 8.4
SHV n=4	n=2	5.4 / 7.6	-	-

Съкращения: pI- изоелектрична точка, IEF- изоелектрично фокусиране, IMP – imipenem; CTX – cefotaxime.



Фигура 10. Позиции №1 и 2 - контролни щамове *K. pneumoniae*, продуценти съответно на TEM-1 (pI 5.4), KPC-2 (pI 6.7), SHV-1 (pI 7.6) и CTX-M-15 (pI 8.8) (позиция 1); TEM-1 (pI 5.4), SHV-1 (pI 7.6) и CTX-M-3 (pI 8.4) (позиция 2) бета-лактамази; № 3, 4, 9, 10 - клинични изолати *K. pneumoniae*, продуценти на TEM-1, SHV-1, CTX-M-15 ; № 6, 7, 8 - клинични изолати *K. pneumoniae*, продуценти на TEM-1, KPC-2, SHV-1 и CTX-M-15; № 11 и 15 - клинични изолати *K. pneumoniae*, продуценти на SHV-1, CTX-M-3 и CTX-M-15; № 12 - клиничен изолат *K. pneumoniae*, продуцент на SHV-1 и CTX-M-15; № 13 - клиничен изолат *K. pneumoniae*, продуцент на TEM-1 и SHV-1; № 14 - клиничен изолат *K. pneumoniae*, продуцент на TEM-1, SHV-1 и CTX-M-3.



Фигура 11. Позиция № 1 и 2 – контролни щамове *K. pneumoniae* продуценти съответно на КРС-2 (pI 6.7) и СТХ-М-15 (pI 8.8) (позиция 1); СТХ-М-3 (pI 8.4) (позиция 2) бета-лактамази, хидролизиращи cefotaxime; Позиции № 4, 6, 8, 9, 10, 12, 13 и 15 - продуценти на СТХ-М-15 клинични изолати *K. pneumoniae*, които хидролизират cefotaxime при pI 8.8.; Позиции № 3, 7, 11, 14 - клинични изолати *K. pneumoniae*, които хидролизират cefotaxime при pI 8.4; Позиция №5 - продуцент на СТХ-М-15 клиничен изолат *K. pneumoniae*, който не хидролизира cefotaxime.

Обсъждане

Една от възможностите за определяне вида и броя на β -лактамазите е методът на изоелектрично фокусиране. При комбиниране на този метод с полимеразо-верижна реакция и секвениране могат да се идентифицират основните типове β -лактамази. Във възможностите на IEF е да се маркира продукцията на ензим, който не е доказан с PCR. В настоящия експеримент изоелектричното фокусиране показва присъствие на различни β -лактамази и потвърди наличието и продукцията на всички ензими, доказани с PCR експериментите, а комбинацията на този метод с биологичния тест за хидролитична активност спрямо cefotaxime показва присъствие на тясноспектърни и широкоспектърни ензими с β -лактамазна активност, както и карбапенемази.

Доказаната в 78% (36/45) от изолатите *K. pneumoniae* β -лактамаза с pI 5.4, демонстрираща отрицателен биологичен тест за хидролитична активност, съответства на тясноспектърната бета-лактамаза TEM-1 от молекулярен клас А, кодираща резистентност към ampicillin, карбокси- и уреидопеницилини. Резултатите от PCR експериментите показаха, че изолатите не продуцират ESBL от TEM тип.

В най-висок процент от тестваните изолати *K. pneumoniae* (76%, n=29) беше доказана бета-лактамаза, която се фокусира в pI 8.8 и демонстрира

хидролитична активност спрямо cefotaxime. На тази изоелектрична точка отговаря CTX-M-15 ESBL (www.lahey.org/studies/webt.asp).

В настоящата работа едва при седем изолата *K. pneumoniae* бяха визуализирани ензими с изоелектрична точка 8.4 с изразена хидролиза на cefotaxime при биологичния тест. На тази изоелектрична точка съответства CTX-M-3 ESBL (www.lahey.org/studies/webt.asp), което бе потвърдено и от молекулярно-генетичните изследвания.

В десет изолата (10/38) установихме ензим с изоелектрична точка 6.7, като в пет от изолатите биологичният тест за хидролиза на imipenem беше позитивен. В тази изоелектрична точка се фокусира бета-лактамазата с карбапенемазна активност от клас А - KPC-2 (www.lahey.org/studies/webt.asp). В пет от изследваните *K. pneumoniae* се доказва едновременна продукция на KPC-2 и бета-лактамаза с pI 8.8, съответстваща на CTX-M-15 ESBL.

В настоящото проучване при 8 от изследваните изолати се установи наличие на β -лактамаза с pI 7.8, нехидролизираща cefotaxime. В тази изоелектрична точка се фокусира DHA-1 AmpC β -лактамазата. Извършените PCR експерименти с типово специфични праймери в тези изолати доказаха наличието на *bla*_{DHA}.

Установените в петнадесет и респективно деветнадесет изолата *K. pneumoniae* ензими с изоелектрична точка 7.4 и 7.6 без хидролитична активност спрямо cefotaxime отговарят на тясно-спектърните OXA-1 и SHV-1/11 ензими.

В един изолат *K. pneumoniae* бе доказан ензим с изоелектрична точка pI 8.2. SHV-5, 9, 10, 12, 45 и SHV-90 бета-лактамази са ензими, които се фокусират в тази pI (www.lahey.org/studies/webt.asp).

В заключение, чрез метода на IEF в проучваните изолати се установи разнообразие от β -лактамази, като често изолатите ко-продуцираха няколко ензима. IEF в комбинация с биологичния тест за хидролитична активност потвърди в групата на проучваните изолати *K. pneumoniae* продукцията на два вида ESBLs, представени предимно от CTX-M и при един изолат от SHV ензими. В част от изолатите бяха доказани карбапенемази от KPC групата; при един изолат - OXA-48, при два - VIM и при три изолата – NDM карбапенемаза. AmpC ензими (DHA) бяха доказани както самостоятелно продуцирани, така и в комбинация с CTX-M бета-лактамази. При четири изолата установихме продукцията на два вида CTX-M ензими.

4.3.4. Секвениране на *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{DHA}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}

Всички CTX-M положителни изолати бяха тествани със CTX-M-P1/P2 праймери и дадоха положителна реакция, което доказва наличието на CTX-M 1-ва група. Репрезентативни изолати, положителни за *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} (според PCR резултата и ERIC профила) бяха избрани за установяване на точния тип на ESBLs чрез нуклеотидно секвениране. Бяха идентифицирани следните варианти бета-лактамази: CTX-M-3, CTX-M-15, SHV-1, SHV-11, SHV-12, SHV-28.

*Bla*_{CTX-M-15} беше установен при 81.1% (n=129) от изолатите; *bla*_{CTX-M-3} - при 9.4% (n=15), като в 2.5% (n=4) бяха идентифицирани и двата гена (*bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{CTX-M-3}). При *bla*_{SHV} позитивните изолати (n=159) доказахме следните варианти: SHV-1, SHV-11, SHV-12 и SHV-28 (Таблица 9).

*Bla*_{OXA} положителните изолати *K. pneumoniae* бяха идентифицирани като продуценти на OXA-1 ензим и само при един изолат бе доказана продукцията на карбапенемаза OXA-48. *Bla*_{DHA} (n=8) позитивните идентифицирахме като продуценти на DHA-1 бета-лактамазата от клас C (Таблица 9).

От групата на бета-лактамазите с карбапенемазна активност, освен OXA-48 в един изолат, беше доказана KPC-2 карбапенемазата в 33 изолата. От групата на метало-карбапенемазите бяха идентифицирани NDM-1 в три изолата, а VIM-1 - в два изолата, единият от които ко-продуциращ KPC-2, а другият - SHV-12 ESBL.

Таблица 9. Резултати от PCR експериментите за доказаните *bla* гени, кодиращи бета-лактамази в колекция от изолати *K. pneumoniae*.

<i>bla</i> гени	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{DHA}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{NDM} M
Брой положителни спрямо брой изследвани изолати	148 / 159	159/ 159	87 /116	8/159	33/159	2 / 159	3 / 159
Относителен дял (в %)	93%	100%	75%	5%	20.6%	1.26%	1.9%
Варианти на основни <i>bla</i> гени	CTX-M-15 CTX-M-3	SHV-1 SHV-11 SHV-12 SHV-28	OXA-1 OXA-48	DHA-1	KPC-2	VIM-1	NDM-1

Обсъждане

Множествената резистентност сред представителите на *K. pneumoniae* се свързва със способността на тези микроорганизми да оцеляват в болничната среда, селективния антибиотичен натиск и сравнително лесното придобиване на мобилни генетични елементи, често носители на цели генни касети, обуславящи резистентност към различни антибактериални лекарствени средства.

В настоящия момент *K. pneumoniae* демонстрира устойчивост към повечето β -лактамни антибиотици, особено характерно за изолатите от интензивните болнични звена. Резистентността при *K. pneumoniae* към тази антибиотична група основно се асоциира с продукцията на β -лактамазни ензими от всички молекулярни класове (A, B, C, D), с водещото значение на широкоспектърните бета-лактамази от клас A (TEM, SHV, CTX-M) и в много по-малка степен с механизми, свързани с намалена проникваемост на клетъчната мембрана (Ghasemi, 2013; Ahmed, 2013; Bialvaei, 2016; Al-Agamy, 2017; Као, 2016). Така в настоящото проучване чрез молекулярно-генетични методи беше доказано наличието на ESBLs и / или AmpC ензими и/или карбапенемаза при 155 изолата *K. pneumoniae*.

Плазмид-медираните CTX-M бета-лактамази са най-често срещаните ESBLs, особено при *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. mirabilis* (Zhao WH, 2013; Peirano and Pitout, 2010; Zhou K, 2015). През последните години значително се увеличиха научните съобщения за нозокомиални инфекции, причинени от множество резистентни CTX-M-15 продуциращи *Klebsiella pneumoniae* (Lee MY, 2011; Baraniak, 2013; D'Andrea, 2013; Rodrigues C, 2014)). В Европа най-широко разпространение на *bla*_{CTX-M-15} се докладва във Великобритания, Холандия, Дания, Германия, Чехия, Словакия и Франция (Bevan, 2017). В проучване на SENTRY за 2016г. за разпространението на *bla* гените сред изолати *Klebsiella pneumoniae* в САЩ, се установява, че общо 60.3% са носители на *bla*_{CTX-M} варианти от групите CTX-M-1 и CTX-M-9, съответно в 52.7% и 7.6% (Mendes RE, 2019). При ретроспективно проучване на Ну и колектив в периода 2013 – 2015 върху MDR изолати *K. pneumoniae*, изолирани от пациенти с вентилаторна пневмония в Китай, се доказват различни гени, кодиращи ESBLs: *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} и *bla*_{TEM}, но с преобладаване на *bla*_{CTX-M-15} (63.3%) (Xu H, 2018). В друго проучване от Китай върху 38 болнични множество-резистентни изолати *Klebsiella pneumoniae*, се съобщава за 94.7% носителство на *bla*_{SHV} гени, като са доказани следните варианти: *bla*_{SHV-11} (n=32), *bla*_{SHV-142} (n=3) и *bla*_{SHV-1} (n=1). *Bla*_{CTX-M} гени са установени също във висок процент (68.4%; n=26) от

изолатите, с доминиране на *bla*_{СТХ-М-14}, като е идентифицирано едновременно носителство на *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{СТХ-М-3} (Lin D, 2018)

Като основен фактор за бързо разпространение на СТХ-М в *K. pneumoniae* се смятат конюгативните плазмиди (D'Andrea, 2013; Mathers, 2015; Zhou K, 2015) или транспонируемите елементи (инсерционни последователности, транспозони и интегрони). Генът *bla*_{СТХ-М-15} често се асоциира със специфични инсерционни последователности (например *ISEcpl*) и плазмиди от групата IncF (Carattoli, 2009; Zhou K, 2015).

В съответствие с Европейските и световни тенденции, в настоящата проучвана колекция от изолати *K. pneumoniae*, с най-висок относителен дял се представят СТХ-М продуцентите, които са 93% (148/159) от всички изолати: *bla*_{СТХ-М-15} се доказва в 81.1%, *bla*_{СТХ-М-3} – в 9.4%, а носителството и на двата гена (*bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{СТХ-М-3}) бе установено в 2.5%. Настоящото проучване доказва повече варианти на SHV бета-лактамазата: SHV-1, SHV-11, SHV-12 и SHV-28. В допълнение, установихме висок процент на асоциация между *bla*_{ОХА-1} и *bla*_{СТХ-М-15}: в 98.9% от положителните изолати за *bla*_{ОХА-1} се установи присъствие и на *bla*_{СТХ-М-15}. Вероятно тази находка се дължи на разположението на гените върху общ транспонируем елемент.

Резистентността на *K. pneumoniae* към карбапенемни антибиотици се асоциира най-често с продукцията на четири основни групи карбапенемази, като *Klebsiella pneumoniae* карбапенемазата (KPC), Verona integron-encoded метало-бета латамазата (VIM), ОХА-48 и New Delhi метало-беталактамазата (NDM) са най-разпространените.

Високи нива на KPC продуценти се съобщават в САЩ, Южна Америка, Израел, Китай, Индия, а също и в Гърция, Франция, Италия, Полша, Обединеното Кралство и Ирландия. *Bla*_{KPC}, предимно разположен върху плазмиди, често се асоциират с успешни клонове *K. pneumoniae*, каквито са ST258 и ST11, което улеснява тяхното бързо разпространение (Woodford N, 2011; Nordmann P, 2014). През последното десетилетие се описват и нови лекарствено устойчиви международни клонове, сред които е KPC продуциращия *K. pneumoniae* клон ST307, доказан в страни като САЩ, Италия, Франция, Швейцария, Англия и Колумбия (Castanheira, 2013; Villa, 2017). В България KPC-2-продуциращи изолати *K. pneumoniae* са доказани за първи път през 2012г. (Markovska, 2013).

Клас D карбапенемазата ОХА-48 за първи път е идентифицирана в изолат *K. pneumoniae* от Турция през 2003г. От тогава до сега, в Турция ОХА-48 продуциращи *K. pneumoniae* се съобщават с особено голяма интензивност (Aktaş, 2008). ОХА-48 продуценти *K. pneumoniae* са широко разпространени в много Европейски държави, сред които Белгия, Франция, Германия, Гърция,

Холандия, Швейцария и Испания. Средният Изток и Африканските държави също са смятани за резервоар на ОХА-48 продуценти (Poirel, 2012b; Hays, 2012; Kocsis, 2013; Dortet, 2012a; Shibl, 2013; Brink, 2013; Singh, 2016; Potron, 2011a).

NDM продуциращи изолати се появяват през 2008г. и много бързо се разпространяват в целия свят (Азия, Африка, Австралия, Америка и Европа). Главен резервоар за NDM-продуценти се явява Индийския субпонтинент (Индия, Пакистан, Шри Ланка), но Балканите и Арабския полуостров също се смятат за важен източник на NDM-карбапенемазите. В България до 2014г. честотата на карбапенемаза-продуциращите *Enterobacteriaceae* е много ниска. От 2014г. до настоящия момент съобщенията за такива изолати постепенно се увеличават. Двете карбапенемази КРС-2 и NDM-1 първоначално са доказани в изолати *E. coli* (Poirel et al, 2014; Markovska et al, 2017b). КРС-2 и NDM-1 продуциращи изолати *K. pneumoniae* се съобщават като единични случаи (Todorova, 2016; Kostyanev, 2016) или взривове (Markovska, 2015; Savov, 2018).

В настоящата работа в групата на карбапенем-резистентните изолати *K. pneumoniae* се доказва разнообразие от карбапенемази, с доминиране на КРС-2 карбапенемазата: КРС-2 в 86.8% (при 20.6% в наличната колекция), VIM-1 в 5.3% (при 1.3% в наличната колекция), NDM-1 в 7.9% (при 1.9% в наличната колекция) и ОХА-48 в 2.6% (при 0.6% в наличната колекция).

В скорошно проучване върху 88 карбапенемаза продуциращи *K. pneumoniae*, изолирани в периода 2014-2018г. в седем клинични центрове у нас, се доказва водещото значение на КРС-2 в едни болнични центрове, а на NDM-1 – в други. Клоналната дисеминация е характерна особеност както за КРС-2 продуциращи щамове *K. pneumoniae*, така и за някои щамове, продуценти на NDM-1. Такава клонална дисеминация на NDM-1 *K. pneumoniae* вече е документирана и у нас (Markovska R, 2019; Savov, 2018). Машабно проучване за периода 2015-2017г. върху карбапенемаза продуциращи *K. pneumoniae* показва разпространението на ST15, ST29, ST336 и ST902 клоновете при КРС-2 продуциращите изолати и на ST11 при NDM-1 продуциращите, като КРС-2 *K. pneumoniae* произвежда и СТХ-М-15, а NDM-1 положителните притежават и *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{СМУ-4} (Markovska, 2019). Савов и колектив също доказват седемнадесет NDM-1 продуциращи изолати, притежаваци също *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{СМУ-4} (Savov, 2018). В съответствие с това, в нашето проучване NDM-1 продуциращите изолати *K. pneumoniae* се доказаха като ко-продуценти на СТХ-М-15 и СМУ-4 бета-лактамази. Подобни резултати за едновременна продукция на ESBLs и карбапенемази получават и автори от Испания, които съобщават, че 43% от

ESBL продуциращите *K. pneumoniae* са били едновременно и карбапенемаза - продуценти. Като най-чести ESBLs те доказват бета-лактамазите от CTX-M групата (83.2%), а от карбапенемазите - OXA-48 (90.8%) (Díaz-Agero, 2019). В нашето проучване беше идентифициран само един изолат *K. pneumoniae*, продуциращ OXA-48 карбапенемаза.

Подобни резултати на нашите се съобщават от Carrasco и колектив, които провеждат проучване върху карбапенем - резистентни *K. pneumoniae*, изолирани от различни болници в Чили. От общо 22 изолата, 20 се оказват продуценти на КРС карбапенемаза, един – на NDM-1, а един е носител на *bla*_{OXA-370} (Carrasco-Anabalón S, 2018).

Доказателство за широкото разпространение на КРС карбапенемазите е съобщението от Сингапур от 2019г., което установява висок дял на полимиксин- и карбапенем-резистентни изолати от семейство *Enterobacteriaceae*, предимно сред *Enterobacter* spp. (54.1%) и *Klebsiella pneumoniae* (43.2%). Над 50% от тези изолати са идентифицирани като КРС-продуценти (59.5%), демонстрирайки високи нива на резистентност към всички изпитвани бета-лактамни антибиотици, но чувствителност към amikacin (100%), tigecyclin (89.2%), ceftazidim-avibactam (83.8%), fosfomycin (70.3%) и levofloxacin (64.9%) (Teo JQ, 2019). Аналогично, в Китай при епидемиологично проучване върху 38 болнични карбапенем-резистентни изолата *Klebsiella pneumoniae*, *bla*_{KPC-2} е доказан в 89.5%, а *bla*_{IMP} – в 4.9% (n=3). От гените, кодиращи AmpC ензими е идентифициран само *bla*_{DHA} в 18.4% (Lin D, 2018).

В контраст на тези съобщения, проучване от Индия върху ESBL и карбапенемаза-продуциращи изолати *K. pneumoniae* (n=250), получени от пациенти в интензивни отделения за едногодишен период, установява 84% ESBL продуценти и 66% резистентност към карбапеними. Сред карбапенем - резистентните изолати (n=165), 9.7% са били положителни за *bla*_{NDM-1}. (Bhaskar BH, 2019).

В настоящото проучване colistin-резистентни изолати (n=8) бяха доказани само в групата на карбапенем-нечувствителните изолати. Те се оказаха носители на *bla*_{KPC-2} (n=6) и *bla*_{NDM-1} (n=2) и демонстрираха напълно съхранена чувствителност към tigecycline. По отношение резистентността към ceftazidime/avibactam, носителите на *bla*_{KPC-2} показаха чувствителност, а носителите на *bla*_{NDM-1} бяха резистентни.

В настоящото проучване гени, кодиращи AmpC ензими бяха доказани в 8 изолата, като в шест от изолатите DHA-1 беше ко-продуцирана заедно с CTX-M-3, CTX-M-15 и SHV-11, а в останалите два изолата - заедно с NDM-1 и CTX-M-15 бета-лактамази.

Проучвания от азиатско-тихоокеанския регион също съобщават за разпространение на CMY-2 бета-лактамазата, но предимно в *E. coli*, докато DNA-1 е доказана в изолати *K. pneumoniae*. Авторите потвърждават доминирането на АСТ/MIR ензимите от групата на AmpC β-лактамазите в представители на *E. cloacae* complex (Sheng, 2013; Jean, 2017).

Проучвайки изолати *K. pneumoniae*, френски автори също установяват плазмидно кодирани DNA-1 бета – лактамази, като са идентифицирани плаزمиди, принадлежащи към IncR, IncH и IncL/M групите (Henequen C, 2018).

В заключение, основният механизъм на резистентност към цефалоспорини от трета генерация в настоящата колекция от изолати *K. pneumoniae* се асоциира с продукцията на ESBLs в 96.9%, като най-чести са CTX-M бета-лактамазите в 93%, с водещото значение на CTX-M-15 в 81.1% и CTX-M-3 в 9.4%. Резистентността към карбапенемни антибиотици се медуира от продукцията на карбапенемази, като KPC-2 е най-често продуцираната бета-лактамаза с карбапенемазна активност (21%). NDM-1 и VIM-1 продуцентите са единични.

4.4. Конюгационно предаване на плазмиди, носещи гени за ESBLs и хинолонова резистентност.

С цел проучване трансферабилността на гените за резистентност към β-лактамни и хинолонови антибиотици в проучваните изолати *K. pneumoniae* бяха извършени конюгационни експерименти. Като реципиент използвахме щам *E. coli* K12: W3110 Rif lac-

От проведените общо 146 конюгационни експеримента, маркери за резистентност към β - лактами бяха предадени при 56 (38.4%), а към хинолони - при 15 (10.3%) от общо 146-те донорни изолата *K. pneumoniae*. При всички трансконюганти беше установено предаване на детерминанти, определящи намаляване на чувствителността към цефалоспорини трета генерация, а в осем от случаите и към карбапенемите imipenem и meropenem (донорите са *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CMY-4}, *bla*_{DNA-1} - положителни). Честотата на предаване на аминокликозидната резистентност, свързана с ESBL гените е както следва: за tobramycin – 62.5% (35/56), за gentamicin – 70% (39/56), amikacin – 7% (4/56) и trimethoprim/sulphamethoxazole - 23% (13/56). Фенотипът на резистентност на трансконюгантите към β-лактами (amoxicillin/clavulanic acid (AMC), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), piperacillin/tazobactam (TZP), imipenem (IMP), meropenem (MEM)) и не-β-лактамни антибиотици (gentamicin, amikacin, tobramycin, ciprofloxacin, levofloxacin, tetracycline,

trimethoprim/sulphamethoxazole, chloramphenicol) е показан на таблица 10.

4.5. Определяне типа на плазмида

С цел охарактеризиране на репликоните проведохме PCR - базирано типирание на репликони при 118 донорни щамове и всички 56 трансконюганти. При изолатите, които ползвахме като донори установихме следните репликони: L/M (n=21), R (n=31), F (n=12), FI (n=3), FII (n=19), FIA (n=2), A/C (n=3), N (n=1), HI2 (n=1) (Таблица 11).

При трансконюгантите доказахме: L/M в 10.7% (n=6); F в 10.7% (n=6); R в 5.4% (n=3); FII в 12.5% (n=7); FIA в 1.8% (n=1); A/C в 1.8% (n=1) и 58.9% (n=33) - нетипируеми репликони (nt). В единия трансконюгант се установиха два репликона **L/M** и **R**. На таблица 10 е представена връзката между донорите, резистотипа и типа на репликоните, идентифицирани в получените трансконюганти.

Таблица 10. Връзка между *bla* гените в донорни клинични изолати *K. pneumoniae* и резистотипа и типа на репликоните при 56 трансконюганта.

Тип на донорите	Брой донори	Брой получени трансконюганти	Резистотип на трансконюгантите	Тип репликон
СТХ-М-15 продуценти	96	n=35	CTX, AMC, CAZ, TB, GEN, TET (n=4) CTX, TB, TET (n=1) CTX, AMC, TET (n=1) CTX, AMC, CAZ, TB, CIP , SXT (n=1) CTX, AMC, TB, GEN, TET (n=6) CTX, AMC, TB, CIP (n=3) CTX, AMC, TB, GEN, CIP (n=2) CTX, AMC, CHL (n=1) CTX, AMC, CAZ, TB, GEN (n=9) CTX, AMC, CAZ, TB, GEN, CIP , SXT (n=6) CTX, AMC, TB, GEN, TET, CIP , SXT (n=1)	F F FIA R nt nt nt nt nt nt
СТХ-М-3 продуценти	7	n=3	CTX, AMC, TB, GEM, AMK (n= 3)	L/M
СТХ-М-3/ СТХ-М-	9	n=5	CTX, AMC (n=3) CTX, AMC, GEN (n=1)	L/M L/M

15/ ОХА -1 продуцен ти			CTX, AMC, TB, GEN, TET, CIP , SXT, CHL(n=1)	L/M; R
СТХ-М- 15 /ОХА- 48 продуцен ти	1	n=1	IMP, MEM n=1	R
КРС-2 / СТХ-М- 15 продуцен ти	20	n=10	CTX, AMC, CAZ, IMP, MEM, TZP (n=3) CTX, IMP, TZP (n=1) CTX, CAZ, IMP, TZP (n=2) AUG, CTX, TB, GEN (n=4)	FII FII FII nt
NDM-1/ СМУ-4/ СТХ-М- 15 продуцен ти	2	n=1	CTX, CAZ, CIP , TET, CHL (n=1) – <i>bla_{СМУ}</i> and <i>bla_{СТХ-М-15}</i> положителен	A/C
ДНА-1	6	0		

Обсъждане

Преносът на гени между хромозоми и плазмиди значително увеличава възможността за трансфер на детерминанти на резистентност и тяхната последваща дисеминация. Конюгативните плазмиди са едни от най-важните механизми за вътревидови, междувидови и междуродови генетични трансфери. Плазмидите обикновено се класифицират по тяхната несъвместимост (Inc), дефинирана като неспособност на два плазида да съществуват и реплицират стабилно в един и същ бактериален изолат. В този смисъл в трансконюгантите могат да бъдат установени плазмиди само от различни групи на несъвместимост (Novick, 1976). През 1988 г. Couturier и колектив предлагат схема за генетично типизиране на плазмиди, базирано на Southern blot хибридизация, използвайки клонирани репликони като сонди (Couturier, 1988).

Понастоящем в семейство *Enterobacteriaceae* са признати 27 Inc групи от Плазмидната секция на Националната колекция от типови култури (Лондон, Обединеното кралство), включително шест IncF (FII to VII) и три IncI (I1, Iγ, I2) (Carattoli, 2009). Сред типизираните R-плазмиди, плазмидите IncFII, IncA/C, IncL/M и IncII са най-често доказваните (Carattoli, 2009).

Отделни плазмидни семейства се откриват по-често сред представителите на семейство *Enterobacteriaceae*, като играят основна роля в разпространението на различни гени на резистентност. Например, плазмидите IncFII, IncA/C, IncL/M, IncN и IncII, носещи гени за широкоспектърни бета-лактамази и AmpC бета-лактамази, се считат за "епидемични R-плазмиди", открити в бактериални изолати, принадлежащи към семейство *Enterobacteriaceae* с различен произход и източници (Carattoli, 2011).

В настоящото проучване бяха извършени успешни конюгационни експерименти на пренос на *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-3} и *bla*_{KPC-2} гените в реципиентен щам *E. coli*, като в трансконюгантите бяха доказани IncFII за *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{KPC-2} положителните и IncL/M плазмиди за *bla*_{CTX-M-3} положителните трансконюганти, както и IncR - за *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{OXA-48}. Асоциацията на *K. pneumoniae* с *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{KPC-2} от една страна и IncFII от друга е установена и в по-ранно проучване в клинични изолати *K. pneumoniae* от нашата болница (Markovska, 2013; Markovska, 2015). Проучване върху дисеминация на KPC-2 продуциращ *K. pneumoniae* клон в България също доказва асоциацията на OXA-48 карбапенемаза с IncL/M (Markovska, 2015).

Молекулярно епидемиологични проучвания на Zhao и кол. също потвърждават тясната корелация на *bla*_{CTX-M} гените с плазмиди, главно принадлежащи към IncF, IncI, IncN, IncHI2, IncL/M и IncK групи. Авторите доказват, че IncF групата (FIA, FIB и FII) е с най-голямо значение при преноса на *bla*_{CTX-M-15}, докато IncF, IncK и IncII са свързани с широкото разпространение на *bla*_{CTX-M-14} гени. Според същите автори, *bla*_{CTX-M-1} се свързва предимно с IncN и IncII, *bla*_{CTX-M-3} гена – с IncL/M и IncII, а *bla*_{CTX-M-9} - с IncHI2 (Zhao WH, 2013).

В унисон с нашите резултати, изследователи от Китай съобщават за изолиране на екстензивно резистентен щам *K. pneumoniae*, който ко-продуцира NDM-1 и KPC-2 карбапенемази. Посредством цялостно геномно секвениране на този изолат, авторите доказват следните плазмиди: IncN плазмид, носител на *bla*_{NDM-1} и *qnrS1* гени; IncFII(K) плазмид, съдържащ *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{TEM-1} и *bla*_{KPC-2}; IncHI1/IncFIB плазмид p30457-1, носител на гени на вирулентност, идентичен с pLVPK, отговорен за регулацията на синтеза на капсулните полизахариди (Liu Y, 2019).

Често плазмидното носителство се свързва и с разпространение на гени, кодиращи и фактори на вирулентност. Чешки автори при изследване на мултирезистентни CTX-M-15-продуциращи ST416 *Klebsiella pneumoniae* доказват два FII_K плазмиди, pKDOI и pKPN-CZ, носители на голям набор от гени, кодиращи резистентност към токсични съединения, метали и антимикробни лекарства и показващи нови характеристики, свързани с

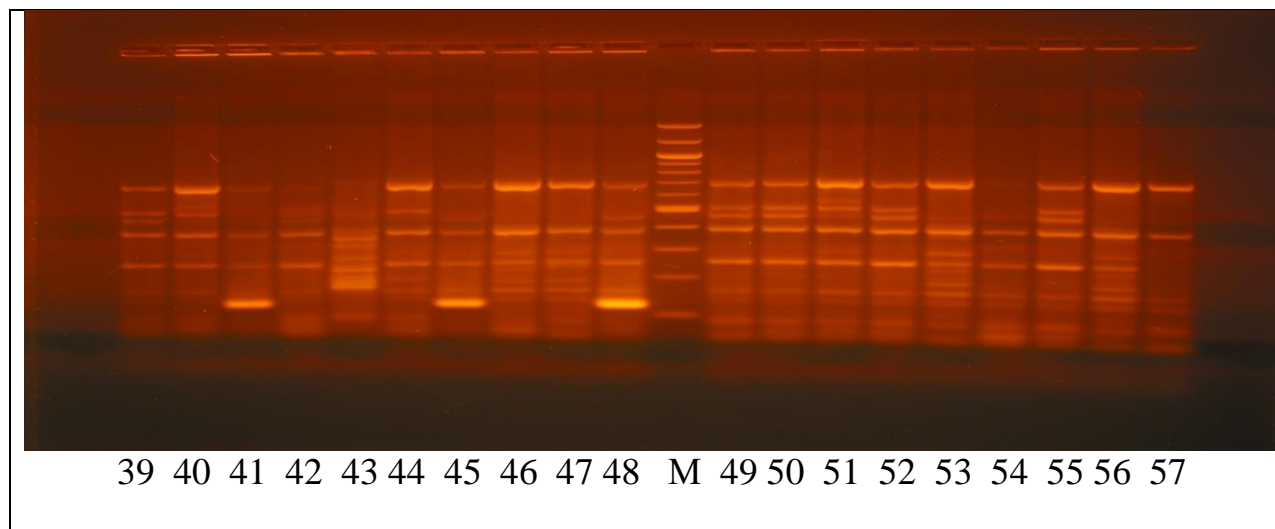
адаптацията на бактериите в човешкия организъм като гостоприемник (Dolejska M, 2013).

В заключение, в настоящото проучване при положителните за *bla*_{СТХ-М-15} изолати се доказва присъствие на IncF и нетипируеми плазмиди, а при положителни за *bla*_{СТХ-М-3} – присъствие на плазмиди от IncL/M. Проведените успешни конюгационни експерименти с *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{СТХ-М-3} позитивни изолати от нашата колекция потвърдиха плазмидната локализация на тези гени. В положителни за *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{КРС-2} изолати *K. pneumoniae* се установиха IncFII плазмиди. В единствения изолат ко-продуцент на *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{ОХА-48} се доказва наличие на IncR плазмид.

4.6. Епидемиологично типизиране

Проучени бяха общо 159 изолата *K. pneumoniae*, изолирани в периода януари 2014 - декември 2017г. от различни пациенти, хоспитализирани в 24 клиници (6 интензивни и 18 не- интензивни звена) на УМБАЛ „Света Марина“, Варна. Петдесет и четири от изолатите *K. pneumoniae* са от пациенти в интензивни клиници, а 105 - от не-интензивни звена.

Всички изолати *K. pneumoniae* бяха типизирани чрез ERIC- PCR. Репрезентативни изолати от всеки ERIC бяха подложени на мултилокусно секвениране. За всеки изолат бяха генерирани разпознаваеми ERIC профили, съставени от 5 до 10 бенда. За клон приехме изолати с разлика в ERIC профилите до 2 ивици. Идентифицирани бяха 17 основни ERIC типа и 4 подтипа със следните означения: ERIC A, A1, B, D, D1, E, F, G, H, I, K, L, M, O, P, P1, P2, S, T, W, X (Таблица 11, Фигура 12). Всички ERIC типове (с изключение на F, O, W) са представени от клонални групи, съставени от 2 до 64 щамове всеки. Типовете F, O, W и Uni са представени от единични изолати.



Фигура 11. ERIC профили на изолатите *K. pneumoniae*.

Клон А - позиции 46, 47, 53, 54, 56 ; клон Р – позиции 39, 42, 44, 49, 50, 52, 55; клон К – позиции 41, 45, 48; клон Х – позиции 40, 51, 57; М - маркер

ERIC тип А, съответстващ на секвенциален тип **ST15**, беше доминиращ, доказан в 40.3% (n=64) от всички изолати *K. pneumoniae*. Първият изолат от този тип беше доказан за през март 2014 г. в ИДО. Изолати с този профил се срещат през целия проучван период, като се намират в общо 20 клиники. Един изолат *K. pneumoniae*, получен от ръце на персонал в КАИЛ през февруари 2016г., също демонстрира ERIC профил А. В клиниките по Хирургия, Интензивна кардиохирургия, Съдова хирургия, Кардиология, Ендокринология, Гастроентерология и Инфекциозна клиника бяха доказани единични изолати *K. pneumoniae* от ERIC тип А, а в останалите клиники изолируемостта беше по-интензивна (от 2 до 12 изолата). ERIC тип А се идентифицира доминиращо в КАИЛ (n=8) и клиниката по нефрология (n=7), което представлява 12.5% и 10.9% съответно от изолатите с този профил (5% и 4.4% от цялата колекция съответно). През различни интервали от време се наблюдава струпване от 2 или 3 изолата от тип А.: през март 2014г. се доказват 3 изолата в КАИЛ, през декември същата година - 3 изолата в Клиниката по Неврология; септември 2016г. - 3 изолата в Клиниката по Неврология; януари 2017г. - 3 изолата в Детска клиника, а през март 2017 - 2 изолата в клиниката по Кардиохирургия. Интензивно детско отделение, Вътрешна клиника и Детска клиника са представени с по 6 изолата, което е 9.4% от типа и 3.8% от цялата колекция. Изолатите *K. pneumoniae* от интензивните клиники (КАИЛ, n=8; ИДО, n=6; ИКО, n=3; ИНО, n=5; Интензивен съдов сектор, n=2 и Интензивен кардиохирургичен сектор, n=1) оформят най-високият дял (39%, n=25) в тип А и 15.7% в цялата колекция К.

pneumoniae. ERIC тип A1 (един бенд разлика от A), представен от 3 изолата *K. pneumoniae*, се доказва в клиниката по Кардиохирургия през месец март 2016г. (2 изолата) и в Клиниката по Детска онкохематология през месец май на същата година.

Според вида на клиничните проби се установи следното разпределение на изолатите с ERIC тип A (MLST 15): с най-висок относителен дял са изолатите от урина, 39%, (n=25), следвани от инвазивните изолати (n=23) (от кръв, n=22 и ликвор, n=1) - 35.9%, секрети от респираторен тракт (n=9) - 14% и раневи секрети (n=6) - 9.4%. Над 50% от инвазивните изолати в настоящата колекция (54.8%, 23/42) се представят с ERIC профил A.

Изолатите с ERIC типове A и A1 (**ST15**) представляват 42.1% (n=67) от всички *K. pneumoniae* изолати. Тези изолати са продуценти на CTX-M-15 ESBL; някои от тях на KPC-2 карбапенемаза (30.3%, n=20) и само един изолат е продуцент на OXA-48 карбапенемаза. В тази група изолати, честотата на *qnr* гените е ниска: *qnrB9* - 7.5 % (n=5) и *qnrB1* 8.9% (n=6) (таблица 11).

ERIC тип P, идентифициран като **MLST 11**, е втория по честота тип, доказан в 18.3% (n=29). С най-голяма интензивност този клон се установява в Клиниките по Нефрология (27.6%, n=8) и Урология (24%, n=7), но изолати с ERIC профил P има и във Вътрешна клиника (10.3%, n=3), а в клиниките по Кардиохирургия, Хематология, КАИЛ, ИДО, ИНО и Хемодиализа се срещат като единични изолати. За първи път *K. pneumoniae* с ERIC профил P е изолиран през август 2015 г. в клиника по Урология. По късно през март 2016г. в клиниката по Хематология бе доказан карбапенем-резистентен инвазивен изолат със същия профил от кръв и ранев секрет, но продуциращ NDM-1. Последният изолат с идентичен ERIC профил също е NDM-1 продуцент, но получен от хемокултура на кърмаче от ИДО през декември 2017 г.

Най-висок относителен дял на изолатите *K. pneumoniae*, демонстриращи ERIC профил P установяваме в групата на тези от урини (55.2%, n=16), следвани от тези от раневи секрети (17.2%, n=5) и кръв и респираторни секрети съответно (по 13.8% (n=4)).

Близките ERIC типове P1 и P2 (MLST 11) се установяват в единични изолати от урина и ранев секрет на пациенти, хоспитализирани в КАИЛ през януари 2017г. и Неврохирургия през март 2017 г.

Всички изолати *K. pneumoniae* с ERIC профили P, P1 и P2 (общо 31) са ESBL-продуценти, като в 80.7% (n=25) беше доказана CTX-M-15 ESBL, в 12.9% (n=4) - CTX-M3, а в 9.7% (n=3) - NDM-1 метало-карбапенемаза и CMY-4 AmpC ензимите (Таблица 19). В тази група изолати се установи по-висока честота на *qnr* гени: *qnrB9* - 19.4% (n=6), *qnrB4* - 32.3% (n=10) и *qnrB1* - 3.23% (n=1) (таблица 11).

ERIC типове D и D1 (**MLST 35**) доказани в 4.4% (n=8) от всички изолати *K. pneumoniae*, се установяват в периода 2014 – 2016г. в следните клиници: КАИЛ, Интензивно неврологично отделение, Клиники по хематология, вътрешни болести, кардиология и нефрология (таблица 19). Всички изолати *K. pneumoniae* ST35 са продуценти на CTX-M-15, а един е ко-продуцент и на KPC-2 карбапенемаза.

ERIC тип I, съответстващ на **MLST 395** (n=7), беше установен само през 2016г. в Клиниката по вътрешни болести (n=3), но така също като единични изолати в КАИЛ и клиници по Кардиология и Нефрология. Всички изолати бяха положителни за *qnr S1*, и *bla_{CTX-M}*, а един изолат и за *bla_{KPC-2}*.

Изолати *K. pneumoniae* с ERIC профил H (**MLST 147**), доказани в 3.8% (n=6), се установяват в целия проучван период (2014 – 2017) в следните клиници: КАИЛ (n=2), клиници по Хирургия, Хематология, Урология и Ревматология по един изолат. Първият изолат с този профил бе идентифициран през октомври 2014г. в клиниката по Хирургия и беше потвърден като ко-продуцент на две карбапенемази KPC-2 и VIM-1 метало-карбапенемаза. *Bla_{VIM-1}* бе доказан също и в изолат *K. pneumoniae*, но през март 2015г. в КАИЛ, демонстриращ същия ERIC профил. В тази групата изолати бяха идентифицирани и гени, кодиращи ESBLs: CTX-M-15 (n=3), CTX-M-3 (n=1), SHV-12 (n=2).

ERIC тип T (**MLST 76**), представляващ 3.8% (n=6) от всички проучвани изолати *K. pneumoniae* бе доказан в периода 2014 – 2015г. В КАИЛ (n=1), Интензивно неврологично отделение (n=1), Интензивна кардиология (n=1), Интензивно детско отделение (n=1), Клиника по Нефрология (n=1) и Клиника по Неврология (n=1). Всички шест изолата са продуценти на CTX-M-15 и KPC - 2 карбапенемаза, а два са позитивни за *qnr B9*.

ERIC типовете M, K и X (съответно **MLST 659, 340, 307**) са представени от малък брой (5-6) изолати *K. pneumoniae*, получени от пациенти, хоспитализирани в различни клиници на болницата. Тези изолати се асоциират само с продукцията на CTX-M ESBLs, но не и с карбапенемази. Нито един от тези ERIC типове не персистира през целия период на проучването, а се ограничава само в рамките на определена година: M - през 2014г., K - през 2016г. и X - през 2017г. (таблица 11.)

ERIC тип E (**MLST 37**) с 4 изолата беше доказан през април 2014г. в КАИЛ в един изолат, а през юни и юли 2016г. - в Детско Отделение и в Клиниката по Детска онко-хематология. Тези изолати се асоциираха с продукцията на CTX-M ензими.

Представени от единични изолати, ERIC типовете G (**MLST 151**) и S (**MLST 1350**), подобно на A, D, H, I и T, също се асоциират с продукцията на KPC-2 карбапенемазата.

Резултатите от мулти-локусно секвениране показаха съществуването на 17 ST типа, много добре корелиращи на съответните ERIC типове (таблица 11, фигура 12).

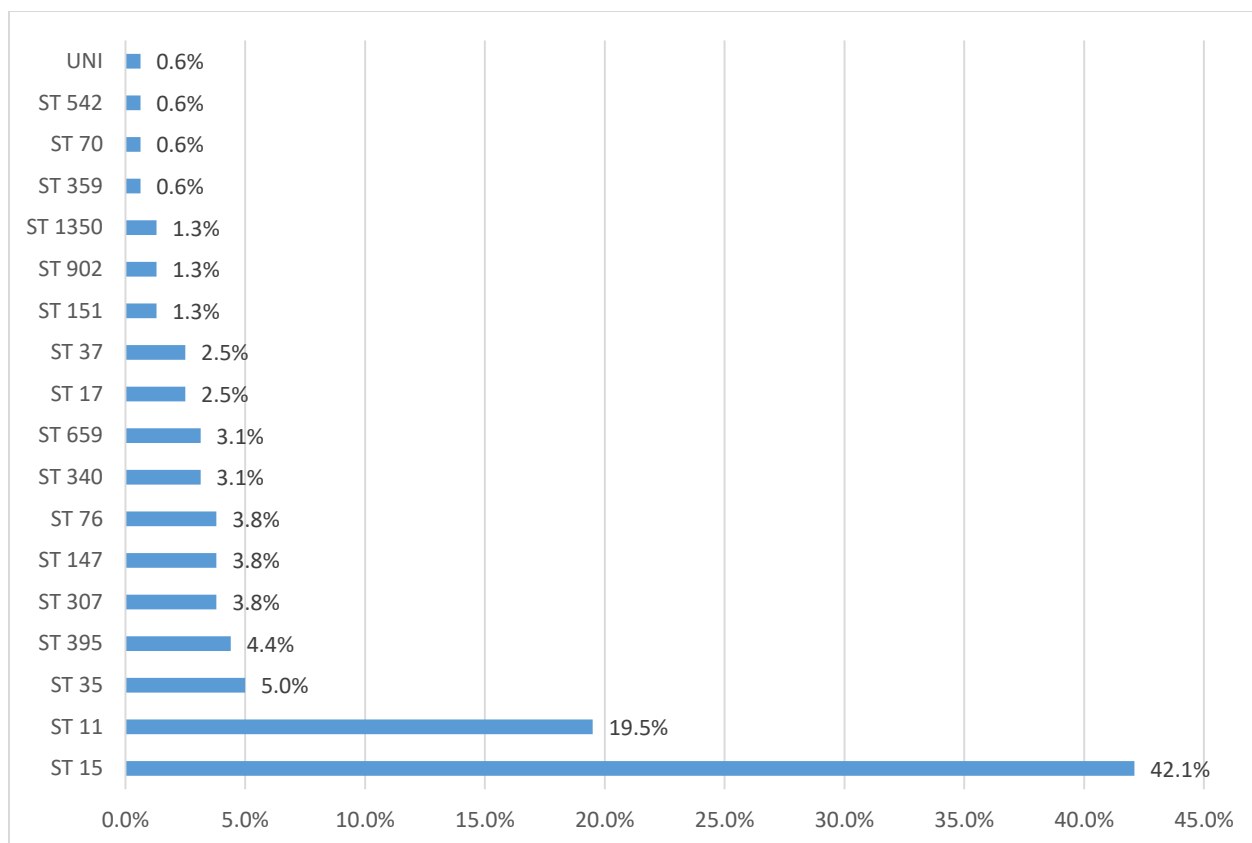
Таблица 11. Разпределение на 159 изолата *K. pneumoniae* според ERIC профила, MLST, година на изолиране, клиничен материал, клиника, носителство на ESBL и карбапенемазни гени и детерминанти на хинолонова резистентност.

ERIC тип	MLS T	Дата на изолиране	Материал	Клиника	ESBL и карбапенемазни гени	Детерминанти на хинолонова резистентност
A (n=64)	15	2014 - 2017	Кръв (n=22)	КАИЛ (n=8)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=64)	<i>Oqx A</i> (n=64)
				ИДО (n=6)		
				И Съд.Хир. (n=2)		
			Урина (n=25)	ИНО (n=5)	<i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=5)	<i>Oqx B</i> (n=56)
				ИКО (n=3)		
				И Кардиохирур. (n=1)		
			Рани (n=6)	Нефрология (n=7)	<i>bla</i> _{SHV} (n=48)	<i>Qnr B1</i> (n=3)
				Урология (n=2)		
				ВО (n=6)		
			ДС (n=9)	ДО (n=6)	<i>bla</i> _{KPC-2} (n=20)	<i>Qnr B9</i> (n=5)
				Хематология (n=3)		
				ДОХ (n=1)		
			Ликвор (n=1)	Диализа (n=2)	<i>bla</i> _{OXA-48} (n=1)	
				Хирургия (n=1)		
				Съдова хирургия (n=1)		
Ръце на персонал (n=1)	Инфекц. к-ка (n=1)					
	Кардиология (n=1)					
	Гастроентерология (n=1)					
	Ендокринология (n=1)					
	Неврология (n=4)					
	Ръце на персонал КАИЛ (n=1)					

A1 n=3	15	2014 - 2017	Рана (n=2) Урина (n=1)	Кардиохирургия (n=2) Хематология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=3) <i>bla</i> _{SHV} (n=2)	<i>Oqx A</i> (n=3) <i>Oqx B</i> (n=3) <i>Qnr B1</i> (n=3)
B (n=4)	17	2014, 2017	Урина (n=3) Рана (n=1)	ВО (n=1) Хематология (n=1) Кардиохирургия (n=1) Гастроентерология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=2) <i>bla</i> _{SHV} (n=4)	<i>Oqx A</i> (n=2) <i>Oqx B</i> (n=2) <i>Qnr B9</i> (n=2)
P (n=29)	11	2015 – 2017	Кръв (n=4) ДС(n=4) Урина (n=16) Рани n=5	КАИЛ (n=1) ИДО (n=1) ИНО (n=2) Хематология (n=2) Урология (n=7) Нефрология (n=8) Кардиохирургия (n=2) Хемодиализа (n=1) ВО (n=3) Онкология (n=1) Гастроентерология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=24) <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=4) <i>bla</i> _{CMY-4} (n=3) <i>bla</i> _{SHV} n=24 <i>bla</i> _{NDM-1} (n=3)	<i>Oqx A</i> (n=29) <i>Oqx B</i> (n=24) <i>Qnr B9</i> (n=6) <i>Qnr B4</i> (n=10) <i>Qnr S1</i> (n=3)
P1 (n=1)	11	2017	Урина (n=1)	КАИЛ (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=1) <i>bla</i> _{SHV} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Qnr B1</i> (n=1)
P2 (n=1)	11	2017	Рана (n=1)	Неврохирургия (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1) <i>bla</i> _{SHV} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Oqx B</i> (n=1)
D (n=7)	35	2014 - 2016	Урина (n=4) Кръв (n=1) ДС (n=2)	КАИЛ (n=2) ИНО (n=1) Хематология (n=1) ВО (n=1) Нефрология (n=1) Кардиология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=7) <i>bla</i> _{SHV} (n=6) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=4) <i>Oqx B9</i> (n=4) <i>Qnr B1</i> (n=1)
D1 (n=1)	35	2014	ДС (n=1)	ИНО (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Oqx B9</i> (n=1)
E	37	2014-2016	Урина	ДО (n=2)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=3)

(n=4)			(n=2) Кръв (n=1) рана (n=1)	Д Хематология (n=1) КАИЛ (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=3) <i>bla</i> _{SHV} (n=3) <i>bla</i> _{OXA-1} (n=3)	<i>Oqx B</i> (n=3)
F (n=1)	359	2014	Кръв (n=1)	Кардиохирургия (n=1)	<i>bla</i> _{SHV-12} (n=1) <i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Oqx B</i> (n=1)
G (n=2)	151	2014	ДС (n=2)	ИНО (n=2)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=2) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=2)	<i>Oqx A</i> (n=2) <i>Oqx B</i> (n=2) <i>Qnr B1</i> (n=1)
H (n=6)	147	2014 - 2017	Урина (n=3) Рани (n=3)	КАИЛ (n= 2) Хирургия (n=1) Хематология (n=1) Урология (n=1) Ревматология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=3) <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=1) <i>bla</i> _{SHV-12} (n=2) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=1) <i>bla</i> _{VIM-1} (n=2)	<i>Oqx A</i> (n=5) <i>Oqx B</i> (n=5) <i>Oqx B1</i> (n=3) <i>Qnr S1</i> (n=2)
I (n=7)	395	2016	Урина (n=4) Рани (n=2) ДС (n=1)	ВО (n=3) КАИЛ (n=2) Нефрология (n=1) Кардиология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=6) <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=6) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=7) <i>Oqx B</i> (n=7) <i>Qnr S1</i> (n=7)
K (n=5)	340	2016	Рани (n=1) Урина (n=1) ДС (n=1) Кръв (n=2)	Съдова Хирургия (n=1) ВО (n=1) КАИЛ (n=3)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=5) <i>bla</i> _{SHV} (n=5)	<i>Oqx A</i> (n=5) <i>Oqx B</i> (n=5) <i>Qnr B9</i> (n=5)
L (n=2)	902	2014	Кръв (n=1) Рана (n=1)	Нефрология (n=1) Перитонеална диализа (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1) <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=1) <i>bla</i> _{SHV} (n=1) <i>bla</i> _{OXA-1} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Qnr B1</i> (n=1)

M (n=5)	659	2014	Урина n=5	Урология (n=3) ВО (n=1) Хематология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=5)	<i>Oqx A</i> (n=3) <i>Oqx B</i> (n=3) <i>Qnr B9</i> (n=3)
O (n=1)	70	2014	Кръв (n=1)	ИДО (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	<i>Qnr B9</i>
S (n=2)	1350	2014	Кръв (n=2)	ИНО (n=1) ИКО (n=1)	<i>bla</i> _{KPC-2} (n=2)	<i>Qnr B9</i> (n=2)
T (n=6)	76	2014 - 2015	Кръв (n=4) Ликвор (n=1) Урина (n=1)	КАИЛ (n=1) ИНО (n=1) ИКО (n=1) ИДО (n=1) Нефрология (n=1) Неврология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=6) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=6)	<i>Qnr B9</i> (n=2)
W (n=1)	542	2014	ДС (n=1)	ДО (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	
X (n=6)	307	2017	Урина (n=2) Рана (n=1) ДС (n=3)	КАИЛ (n=2) Нефрология (n=1) Кардиохирургия (n=1) ДО (n=1) Перитонеална диализа (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=5) <i>bla</i> _{SHV-11} (n=1)	<i>Qnr B1</i> (n=6)
Uni (n=1)		2016	кръв(n=1)	хематология(n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Oqx B</i> (n=1)



Фигура 12. Разпределение на ST типове сред колекция от 159 клинични изолата *K. pneumoniae* според резултата от MLST.

Обсъждане

В последните години все по-често се появяват научни съобщения за вътреболнични инфекции и взривове предизвикани от мултирезистентни клонално свързани бактериални изолати. Международните високорискови клонове *Klebsiella pneumoniae* са сред най-честите и клинично значими вътреболнични патогени. Гените, кодиращи резистентност към бета-лактамни антибиотици и специално карбапенеми, са локализирани предимно върху плазмиди, често асоциирани с някои “успешни” *K. pneumoniae* секвенцилни типове (MLSTs) (напр. *K. pneumoniae* ST258, ST11), което изключително благоприятства тяхната дисеминация (REF) .

В настоящата работа за целите на епидемиологичния анализ са проучени общо 159 изолата *K. pneumoniae*, от които 38 карбапенем-резистентни. Всички карбапенем-резистентни изолати с изключение на 5 са продуценти на KPC-2 карбапенемаза. За широка дисеминация на KPC-2 карбапенемази, предимно асоциирани с *K. pneumoniae* ST258 клон се

съобщава в много проучвания, идващи от различни части на света (САЩ, Средният Изток, Южна Америка, Китай и Европа). Някои автори заключват, че почти всички КРС взривове в Европа са свързани с ST258 *K. pneumoniae*. В нашето проучване този ST тип не беше установен. В допълнение, другият секвенциален тип - ST11, също асоцииран с КРС карбапенемази и разпространен в Китай и други Азиатски страни, беше доказан в 31 изолата, от които само три са носители на bla_{NDM-1} , но не и на bla_{KPC-2} . ST11 клона има само 1 алел разлика с ST258, което обяснява високата разпространяемост и на двата клона.

Доминиращият ендемичен ST-тип сред КРС-2 продуциращите *K. pneumoniae* в настоящото проучване е ST15. Този тип представлява 41.5% от цялата колекция изолати (n=66), като се установява в различни клиники на болницата. Относителният дял на КРС-2 продуцентите от клон ST15 е 30% (n=20), от които 60% (12/20) са инвазивни изолати от КАИЛ, Клиника по Неврология, ИНО, ИДО, ИКО, Интензивно отделение към клиника по Кардиохирургия и Интензивен Съдов Сектор. В допълнение към ST258 и ST11, ST15 *K. pneumoniae* също е известен като “успешен” интернационален клон, престаивител на комплекс 23 (Wang Q, 2013). Той по-често е доказван като носител на bla_{CTX-M} (специално $bla_{CTX-M-15}$), но също и NDM, VIM и OXA-48 гени (Wang Q, 2013; Rodrigues C, 2014; Melegh S, 2014, Poirel, 2011c; Potron A, 2013a; Lam MMC, 2019). Автори от Унгария съобщават за асоциация на ST15 с CTX-M-15 продуциращи ciprofloxacin-резистентни *K. pneumoniae* (Damjanova, 2008). Това съобщение е в унисон с нашите резултати, които установяват, че всички изолати, отнасящи се към ST15 са носители на $bla_{CTX-M-15}$ и на различни детерминанти на хинолонова резистентност (*Oqx A*, *Oqx B*, *Qnr B1*, *Qnr B9*). В този смисъл високото ниво на CTX-M-15 ензимите в нашето проучване и тяхното разпространение се асоциират с присъствието на ендемичния интернационален клон ST-15, който освен CTX-M-15 ензимите ко-продуцира и SHV-28 и КРС-2 ензими. Този резултат показва способността на ST15 изолатите лесно да придобиват различни детерминанти на резистентност. Дисеминацията на $bla_{CTX-M-15}$ се медираат също и от други, не толкова широко разпространени ST типове – ST35, 395, 340, 659, 307, 151. Подобно на $bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-3}$ дисеминацията също се асоциира с няколко различни ST типа: ST37, 395.

Доминиращият ST15 клон, установен още в началото на 2014г., персистира през целия 4 годишен проучван период. Разпространен е в почти всички клиники, но най-много в интензивните болнични звена. Изразения потенциал на ST15 клона да се разпространява сред пациенти от интензивни клиники е демонстриран в предишни проучвания. От друга страна, доказването на 30% от изолатите ST15 *K. pneumoniae* в проби кръв,

категорично демонстрира инвазивния потенциал на този клон. Идентифицирането на изолат *K. pneumoniae* ST15 от ръце на персонал, доказва медицинския персонал като важен фактор за вътреболничната дисеминация на нозокомиалния патоген. Именно вътреболнично придобиване и разпространение чрез ръцете на медицинските работници (или контаминирани болнични източници) е едно от възможните обяснения на епидемичния процес в болницата, свързан с този ST тип. В допълнение, освен *K. pneumoniae* ST15, доминиращ сред инвазивните изолати (кръв и ликвор) от това проучване, в по-малка степен асоциирани с инвазивни изолати са също ST11 (9.5%) и ST76 (11.9%). В подобно проучване, автори от САЩ докладват ST307 (15.0%) като най-честият ST сред изолатите от кръв, а ST258 (28.3%) преобладаващ сред уропатогените (Mendes RE, 2019). В нашето проучване *K. pneumoniae* ST307 се доказва в едва 3.8% от изолатите (n=6) от урини, респираторни секрети и рани, като липсват инвазивни изолати от този секвенциален тип. *K. pneumoniae* ST307 беше установен през 2017г. в различни клиники на болницата (КАИЛ, Нефрология, Кардиохирургия, Детско отделение и Клиника перитонелна диализа). През целия проучван период не бяха доказани изолати *K. pneumoniae* от ST258 типа.

В унисон с множество проучвания, които доказват *K. pneumoniae* ST15 широко разпространен в Европа и свързан с продукция на карбапенемази като KPC-2, OXA-48, VIM-1) (Esteban-Cantos, 2017; Melegh, 2014; Potron, 2013; Rodrigues, 2014), нашите резултати демонстрират, че в групата на карбапенем-нечувствителните изолати (n=38), най-висок е относителният дял на ST15 (52.6%), на второ място е *K. pneumoniae* ST76 (15.8%), следвани от единични карбапенем-нечувствителни изолати, отнасящи се към ST1350, ST151, ST35, ST147 и ST395. ST76 е single locus variant на *K. pneumoniae* ST495, доказан в Гърция през 2009 - 2010г. и асоцииран с продукцията на KPC-2 карбапенемаза (Giakkouri P, 2011).

Резултатът от настоящото проучване по отношение на превалиращия ST15 клон, е в унисон с по-ранно проучване, проведено в България (2012 – 2015г.): доминиращ клон също е ST15, следван от ST76, а доминиращата карбапенемаза е KPC-2 (Markovska, 2015). Единственият изолат *K. pneumoniae* в настоящото проучване, носител на *bla*_{OXA-48}, се отнася към ST15. Този резултат е в контраст с резултатите за широко дисеминиране на OXA-48 продуценти в Европейски страни (Полша, Германия) и Турция Есе, 2018; Kaase, 2016 .

В проучваната колекция, от всички карбапенем-нечувствителни изолати *K. pneumoniae*, само два са продуценти на VIM-1 металокарбапенемаза и принадлежат към ST147. В нашата болница VIM-1

продуциращи *K. pneumoniae* за първи път бяха доказани през 2012г. (Markovska, 2013). За подобни щамове в Гърция съобщава Paragiannitsis и колектив (Paragiannitsis, 2013).

Втори по честота на разпространение в настоящото проучване е *K. pneumoniae* ST11 тип (19.5%), който основно се асоциира с носителство на *bla*_{CTX-M-15} и само в 3 изолата - с *bla*_{NDM-1}. Този клон се появява в болницата през 2015 г., разпространявайки се в много клиници, но най-вече в Нефрология и Урология като изолатите са предимно от проби урина. Този клон персистира до 2017г. В научната литература *K. pneumoniae* ST11 е известен като един от основните патогенни клонове *K. pneumoniae*, широко разпространен в страни от Азия, Латинска Америка, САЩ и Европа (Чехия, Испания, Гърция, Швейцария) (Sun, 2015; Pitout, 2015). В допълнение, *K. pneumoniae* ST11 се асоциира с вътреболнични инфекции с различна анатомична локализация като уроинфекции, бактериемии, инфекции на долен респираторен тракт и др. (Ko, 2010). Някои автори докладват за хипервирулентни щамове *K. pneumoniae* ST11, продуциращи капсулен полизахарид, сидерофори и адхезивни фактори като тип1 и тип 3 пили, а други за изолати *K. pneumoniae* от същия тип - носители на гени, кодиращи множествена лекарствена резистентност (Zhan, 2017; Lee CR, 2018; Dong, 2018; Liu J, 2018; Dsouza, 2017). В скорошно проучване на Fu и кол. в Китай, като водещ тип сред КРС-продуциращите *K. pneumoniae* се съобщава ST11 (87.1%). Същите автори доказват, че КРС-продуциращите *K. pneumoniae* ST11 в 100% се асоциират с IncFII плазмиди. За сравнение, в КРС-продуциращи *K. pneumoniae*, принадлежащи клон ST11, тези плазмиди се установяват в 16% , а при непродуциращите КРС едва в 7.5% (Fu P, 2019). В сходно на нашето проучване, проучване на Тео и кол. върху разпространението на различни MLST типове в бактериални видове от семейство *Enterobacteriaceae* се установява, че colistin-резистентните *K. pneumoniae* се отнасят към девет различни типа - ST11, 15, 20, 273, 392, 513, 719, 841, 978, от които ST11 и ST20 са най-честите (Тео JQ, 2019), което е в съответствие с нашите резултати. В проучване на Carrasco-Anabalón и кол. се доказват десет различни MLST типа, като доминиращите са ST258 и ST1161, а резистентността към colistin в колекцията изолати достига 73% (Carrasco-Anabalón S, 2018).

Подобно доказателство за асоцииране на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae* с различни ST типове дават също китайски учени, които изследват 170 карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* и установяват 16 различни секвенциални типа, като най-често идентифицираният е ST15 (41.76%). В допълнение, тези автори съобщават, че карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, продуциращи OXA-232 карбапенемаза се

отнасят към ST15, докато продуцентите на NDM-1 и KPC-2 към ST37 и ST11 съответно (Tian D, 2018). По подобие на нашите резултати, проучване в Китай върху 38 карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* установява носителство на *bla*_{KPC-2} гени в 89.5%, в 7.9% - на *bla*_{IMP-4}, както и разпространение на пет секвенциални типа (ST23, ST15, ST1373, ST1415), от които ST11 доминиращ (86.8%) (Lin D, 2018). Сред резултатите от нашето проучване прави впечатление, че генът *bla*_{KPC-2}, кодиращ KPC-2 карбапенемазата се асоциира с шест различни секвенциални типа: ST15, ST76, ST1350, ST151, ST35 и ST395. Предаването на *bla*_{KPC-2} основно се свързва с пренос на IncFIIAs плазмиди. Дисеминацията на *bla*_{KPC-2} съдържащи плазмиди между различни клонове *K. pneumoniae* или внасянето на нови карбапенем-резистентни ST типове с висок епидемичен потенциал може да бъде възможно обяснение на развитието на епидемичния процес в болницата. Трябва да се подчертае, че високият селективен натиск в Българските болници също може да допринесе за по-нататъшната експанзия на някои от клоновете. Употребата на цефалоспорици от трета генерация в България е най-високата от всички Европейски страни (<http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-latest-data-antibiotic-consumption-eu-2017>).

В настоящата работа установихме едва три карбапенем-нечувствителни изолата *K. pneumoniae*, които са положителни за *bla*_{NDM-1} и се отнасят към ST11 типа. Понастоящем този ген е широко дисеминиран в световен мащаб, което се обяснява с неговата плазмидна локализация (Voulgaris E, 2014). През 2011-2012г. в Гърция са описани два взрива от вътреболнични инфекции, причинени от *K. pneumoniae*, продуциращи NDM-1 и принадлежащи към MLST11. Същите автори съобщават и за други секвенциални типове, също асоциирани с NDM-1 метало-карбапенемазата, но представени спорадично - ST15, ST70, ST258 и ST1883 (Politi L, 2019). Автори от Китай съобщават за епидемичен взрив сред новородени, предизвикан от NDM-1-продуциращи *K. pneumoniae* ST1419 (Yu J, 2017). На Балканите също има документирани взривове от клонално свързани NDM-1 продуциращи *K. pneumoniae*. Автори от Албания докладват за colistin резистентен щам *Klebsiella pneumoniae* ST15, също продуциращ NDM-1 (Tafaj S, 2018). В България NDM-1 продуциращи изолати *K. pneumoniae* ST11 за първи път са описани от Тодорова (2016) и Костянев (2016) (Kostyanev, 2016.; Todorova, 2016). По-късно Савов и кол. съобщават първия поликлонален вътреболничен взрив, причинен от NDM-1 продуциращи *K. pneumoniae* изолати в България, принадлежащи към 4 секвенциални типа - ST11, ST16, ST15 и ST391, като ST11 е доминиращият (Savov E, 2018). В настоящото проучване, установихме, че в допълнение на продукцията на NDM-1, трите изолата ко-

продуцират СТХ-М-15 и СМУ-4 (AmpC тип бета-лактамаза), резултат съобщен за изолати *K. pneumoniae* от Чехия (Studentova, 2015). Може да се предположи, че комбинацията от трите различни ензима в тези изолати, допринася за тяхната дисеминация.

Алармиращ резултат от настоящата работа е доказването на четири едновременно резистентни на карбапенеми и colistin изолати *K. pneumoniae*, получени от инвазивни инфекции (сепсиси и инфекции на ЦНС). В тези случаи дори colistin, който се приема като медикамент на последен избор при инфекции, причинени от множествено и екстензивно резистентни *K. pneumoniae*, е неефективен. Тези четири изолатата се отнасят към доминиращите типове ST15 (n=3) и ST11 (n=1).

В заключение, епидемиологичното типизиране чрез ERIC PCR и MLST доказва широко вътреболнично разпространение на няколко клона множествено резистентни *K. pneumoniae* в УМБАЛ „Света Марина“ в периода 2014 – 2017г., продуциращи СТХ-М-15 ESBL. Беше установено, че ST15, съответстващ на ERIC тип А е доминиращият тип, персистиращ през целия проучван период (2014-2017г.), следван от ST11 (ERIC тип Р), който се появява през 2015г. и присъства до края на периода. Доминиращият ST15 тип демонстрира висок епидемичен и инвазивен потенциал и потенциал за крос-трансмисия и персистиране. Карбапенемаза-продуциращите изолати *K. pneumoniae* в това проучване се асоциират с няколко различни секвенциални типа: ST15, ST76, ST11, ST1350, ST151, ST35, ST395 и ST147. ST15 е носител на *bla*_{KPC-2} и *bla*_{OXA-48}, ST76, ST1350, ST151, ST35 и ST395 – на *bla*_{KPC-2}, ST11 - *bla*_{NDM-1}, а ST147 – на *bla*_{VIM-1}.

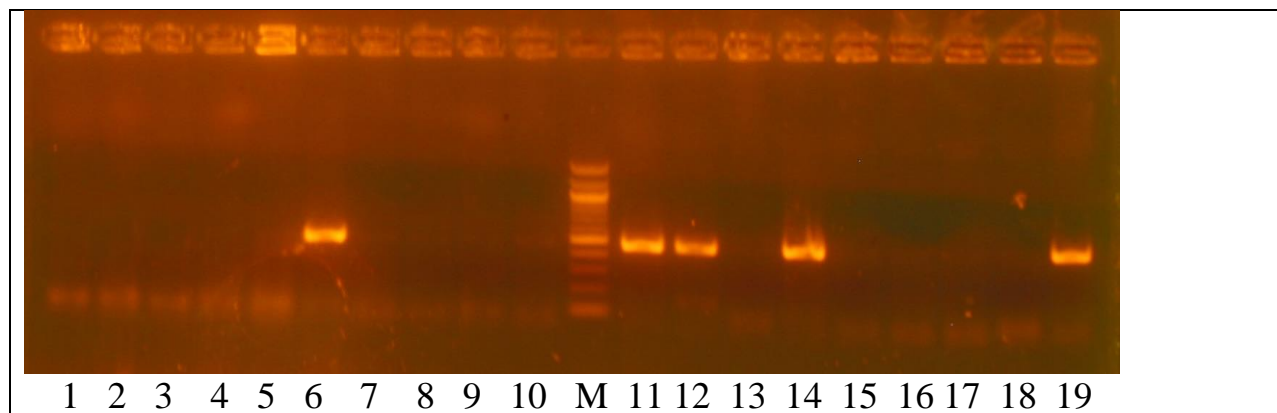
4.7. Доказване на гени, кодиращи хинолонова резистентност

4.7.1. Доказване на гени, кодиращи плазмидна хинолонова резистентност

Всички 159 изолатата бяха подложени на детекция чрез PCR за гените *qnr A*, *qnr B*, *qnr C*, *qnr D*, *qnr S*, *qep A*, *oqxAB* и *aac (6')-Ib-cr*.

При всички 159 изолатата *K. pneumoniae* бяха установени различни детерминанти на плазмид-медирана хинолонова резистентност (PMQR).

QnrB генът беше доказан в 39.6% (n=63) от изолатите. Чрез секвениране бяха идентифицирани следните три алелни варианта: *qnrB9* - 47.6% (n=30), *qnrB1* - 36.5% (n=23) и *qnrB4* – 17.5% (n=11) (фигура 13). По един изолат от групите, положителни за *qnrB1* и *qnrB4*, показва наличие на втори *qnr* алел - *qnrA1* и *qnrS1*.



Фигура 13. PCR за детекция на *qnr B* гена. М – маркер; позиции № 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17 и 18 - клинични изолати *K. pneumoniae*, отрицателни за *qnr B*. Изолати на позиции № 6, 11, 12, 14 и 19 – положителни за наличие на *qnr B* ген.

Тринадесет изолата *K. pneumoniae* (8.2%) бяха положителни за *qnrS1*.

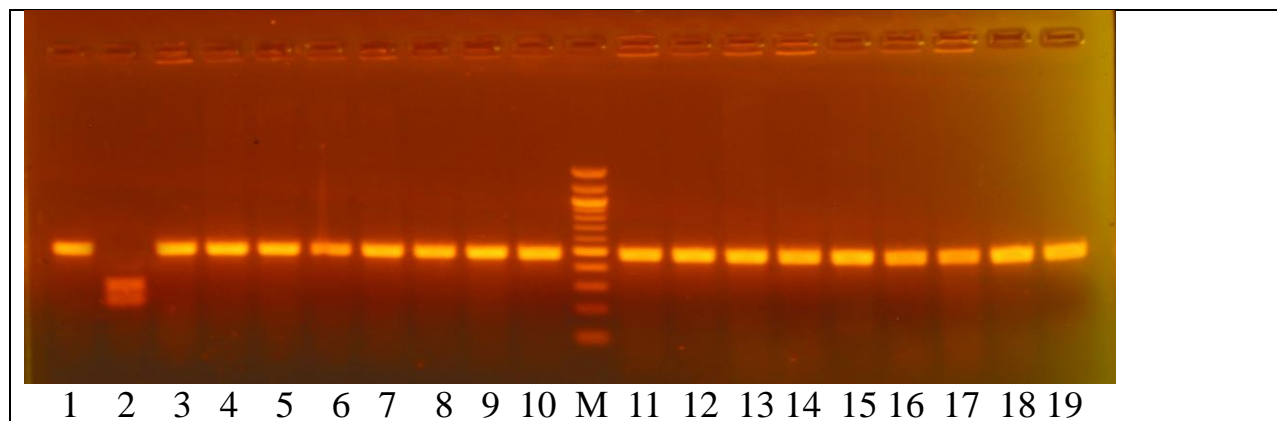
В единични изолати установихме *qnrA1* в комбинация с *qnrB1*, както и асоциация на *qnrB4* с *qnr S1* (Таблица 13). Нашето проучване не установи носителство на *qnrC* и *qnrD* гени в проучваните изолати *K. pneumoniae*.

OqxA генът бе доказан в 100% от изолатите (n=159), а *oqxB* - в 93% (n=148). Не бяха идентифицирани изолати, носители на *QepA*.

При 159 изолата *K. pneumoniae* беше приложен PCR метод за детекция на *aac (6')-Ib* гена, кодиращ аас (6')-Ib ацетилтрансферазата. В 84 % (n=134) от изследваните изолати беше идентифициран аас(6')-Ib. PCR експериментите с 11 трансконюганта, потвърдиха присъствието на гена аас(6')-Ib в седем от тях (R+3, R+6, R+10, R+45, R+56, R+57, R+81).

При 6 изолата *K. pneumoniae* бе доказан алелния вариант на гена - *aac(6')-Ib-cr* (фигура 14).

На таблица 13 е показано разпространението на PMQR гени спрямо продуцираните ESBL/AmpC ензими и ERIC профилите на проучваните 159 клинични изолата *K. pneumoniae*.



Фигура 14. PCR и рестрикция на клинични изолати *K. pneumoniae* за доказване на *aac(6')-Ib-cr* гените. Позиция М – маркер. Позиции № 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19 – изолати, положителни за *aac(6')-Ib*. Позиция № 2 – изолат, положителен за *aac(6')-Ib-cr* ген.

4.7.2. PCR метод за детекция на мутации в *gyrA* и *parC* гените, асоциирани с хромозомно медирана хинолонова резистентност.

Общо 159 изолата *K. pneumoniae* бяха изследвани за наличие на мутации в гените, медиращи хромозомната хинолонова резистентност (QRDR, Quinolone Resistance Determinant Region). В 71% от тях (n=113) бяха установени субституции в QRDR за *gyrA* и/или *parC*. При 5% от изолатите (n=8) бяха доказаха мутации само в *gyrA* гените, а в 66% (n=105) – в *gyrA* и *parC* едновременно. Изолати *K. pneumoniae* с мутации само в *parC* гените не бяха установени.

В *gyrA* гените бяха установени следните 5 субституции: Ser83Phe, Asp87Ala, Ser83Ile, Asp87Tyr, Asp87Asn. В 63 изолата идентифицирахме двойни субституции: Ser83Phe + Asp87Ala. Субституцията Ser83Ile открихме в 44 изолата (27.7%) В единични изолати бяха доказани Ser83Phe (n=3), Asp87Asn (n=1) и Asp87Tyr (n=1). В *parC* гените беше идентифицирана само една субституция - Ser80Ile в 66% от изолатите (n=105), като при всички изолати тази мутация бе установена съвместно с различни замени в *gyrA* гените (Таблица 13). На таблица 12 е представена асоциацията между генетичните механизми на хинолонова резистентност (хромозомна и плазмидно-медирана), заедно с отражението им върху Минималните потискащи концентрации на хинолоновите антибиотици, ESBL продукцията и ERIC профила на изследваните изолати *K. pneumoniae*.

Група изолати (n, брой)	Мутации в QRDR		Nx	Cip	Lev	PMQR	ESBLs	ERIC
	<i>gyrA</i>	<i>Par C</i>						
Първа (n=63) 39.6%	Ser83Phe / Asp87Ala	Ser80Ple	≥256 (33) (25)	32 (58) 8-16(5)	16- 32 12-16 6-8 (5)	<i>oqxAB + qnrB9</i> (5) <i>oqxAB + qnrB4</i> (3) <i>oqxAB + qnrB1</i> (1) <i>oqxAB + qnrS1</i> (1) <i>oqxAB + aac(6')-Ib-cr</i> (3) <i>oqxAB</i> (50)	CTX-M15 (61) CTX-M-3 (5) KPC-2 (15) NDM-1 (3) OXA-48(1)	A (59) P (4)
Втора (n=44) 27.7%	Ser83Ple	Ser80Ple	256 (44) (35) (6)	32 (43) 16 (1)	32 8-16	<i>oqxAB + qnrB9</i> (10) <i>oqxAB + qnrB4</i> (7) <i>oqxAB + qnrB1</i> (5) <i>oqxAB + qnrS1</i> (11) <i>oqxAB + aac(6')-Ib-cr</i> (1) <i>oqxAB</i> (10)	CTX-M15 (39) CTX-M-3 (7) DHA-1 (5) KPC-2(4) VIM-1(2)	P (23), P2 (2), K (5). I (7), H (3). A (1) X (3)
Трета (n=3) 1.9%	Ser83Phe	-	256 (3) (1) (2)	16 (1) 12 (2)	12 6-8	<i>oqxAB</i> (2) <i>oqxAB +aac(6')- Ib-cr</i> (1)	CTX-M-3 (3)	E (3)
Четвърта (n=2) 1.26	Asp87Asn	-	256 (2) (2)	6-8 (2)	1.5-3	<i>oqxAB + qnrB1</i> (1) <i>oqxAB</i> (1)	CTX-M-15 (2)	A (2)
Пета (n=1) 0.6%	Asp87Tyr	-	256 (1) (1)	32 (1)	32	<i>oqxAB + qnrB1</i> (1)	CTX-M-15 (1)	A (1)

Шеста (n= 46) 28.9%	-	-	256 (20)	32 -8 (24)	32-16	<i>oqxAB +qnrB9</i> (15)	CTX-M15 (37)	A (3),A1 (2),B (2),B1(2),D (7),D1 (1),E(1)
			24-12 (13)	3-6 (10)	6-8			
				1.5-2 (6)	1-2	<i>oqxAB +qnrA</i> (1)	KPC-2 (13)	P (1),L (2),S (2),T (5),W (1) X (3),Уникален профил (1)
					0.75	<i>oqxAB +qnrS1</i> (2)		
			(4)			<i>oqxAB+</i>		
			6-8 (9)	0.5 (2)	0.5	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (1)		
			(7)			<i>oqxAB</i> (14)		
			3 (4)	0.04 (1)	0.25			
			(1)					

Таблица 12. Разпределение на 159 изолата *K. pneumoniae* според установените мутации в *gyrA* и *parC*, PMQR гени, МПК на хинолони, вид ESBL и ERIC профил.

Таблица 13. Разпространение на PMQR гени спрямо ESBL/AmpC ензими и ERIC профилите на 159 клинични изолата *K. pneumoniae*.

PMQR/ (брой)	Детерминанти на бета-лактамна резистентност (брой)										ERIC
	CTX- M-15	CTX- M-3	CTX- M-15 CTX- M-3	DHA -1	KPC -2	KPC-2 CTX- M-15	KPC -2 VIM -1	VIM -1	NDM- 1 CMY- 4 CTX- M-15	OXA-48 CTX- M-15	
<i>qnrB1</i> (22)	17	1	1			1	1			1	L(2)G(1)H(3)A(5)X(6) D(1)P(1)B(1)L(1)uni(1) P(10)
<i>qnrB4</i> (10)	1	1		4					3		P(10)
<i>qnrB4+</i> <i>aac(6)ib-cr</i> (1)	1										P(1)
<i>qnrB9</i> (30)	22	1			2	5					A(5)B(2)D(4)D1(1)K(5)M(2) O(1)P(6)S(2)T(2) F(1)
<i>qnrA1+</i> <i>qnrB1</i> (1)	1										P(1)
<i>qnrB4+</i> <i>qnrS1</i> (1)				1							P(1)
<i>qnrS1</i> (12)	5	1	5					1			H(3) P(2) I(7)
<i>aac(6)ib-cr</i> (5)	1	1							3		P(3) E(2)

Обсъждане

Хинолоните ciprofloxacin и levofloxacin са сред най-често използваните антимикробни лекарствени средства за лечението на инфекции, причинени от бактериални видове, отнасящи се към семейство *Enterobacteriaceae*. Плазмид-медираната хинолонова резистентност (PMQR) е доказана в много представители на това семейство, особено сред *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. и *Salmonella* spp. (Yanat, 2017). Различни автори докладват, че PMQR детерминантите се асоциират предимно с ниско ниво на резистентност към хинолони, но водят до селектиране на изолати с хромозомни мутации и впоследствие до неуспех на антибиотичната терапия (Hooper, 2015; Martinez-Martinez, 2008).

В нашето проучване беше установено присъствие на *OqxA* ген в 100% и *OqxB* в 93% от изпитваните изолати. В научната литературата има множество съобщения за широкото разпространение на *oqxAB* сред MDR клинични изолати *K. pneumoniae* (Сао Х, 2014). Генът *oqxAB* е докладван в 87.5% от изолатите *K. pneumoniae*, получени от пациенти в болници в Тайван, Австралия, Аржентина, Белгия, Турция, Южна Африка и САЩ още през 1996-97г. (Perez F, 2013). *OqxAB* е установен в 100% както при резистентни, така и при чувствителни на хинолони КРС-продуциращи *K. pneumoniae* изолати от Охайо (Perez F, 2013).

В епидемиологично проучване, проведено в Китай се съобщава за 67% резистентност на *K. pneumoniae* към ciprofloxacin и присъствие на *oqxAB* гена във всички изолати (Yuan JY, 2012). При проучване върху 22 щамове ciprofloxacin-нечувствителни инвазивни *K. pneumoniae* в болница в Корея от 2005 до 2010 г., *oqxAB* се открива в 50% от изолатите (Yang HY, 2014). Други автори проучват нозокомиални уроинфекции и установяват *oqxA* и *oqxB* съответно в 56.7 и 54.6% сред ESBL- продуциращи *K. pneumoniae* (Goudarzi M, 2015).

Сред 74 карбапенемаза-продуциращи *K. pneumoniae* от болница в Китай, изолирани в периода 2012 - 2014г., *oqxAB* е открит в 48 хинолон-резистентни и 2 хинолон-чувствителни изолата, като авторите са идентифицирали няколко варианти - *oqxA11*, *oqxB13*, *oqxB27* и *oqxB28* (Cheng L, 2016).

Унгарски автори в проучване върху инвазивни ципрофлоксацин-резистентни изолати *E. coli* и ципрофлоксацин-резистентни, ESBL-продуциращи *Klebsiella* spp. доказват *oqxA* и *oqxB* съответно в 48% и 40% от изолатите (Domokos J, 2016). Ferjani и кол. установяват *oqxAB* в 65% от изолатите *K. pneumoniae* в тунизийска болница (Ferjani S, 2015), като тези гени имат както хромозомна, така и плазмидна локализация. Авторы от Индия при секвениране на целия геном на хипермукозен, MDR, биофилм-продуциращ изолат *K. pneumoniae*, доказват *OqxAB* в хромозомата (Rafiq Z, 2016). *OqxAB* е доказан в IncR плазмид заедно с *bla_{NDM-1}* в карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae*, изолирани от урина на пациенти, хоспитализирани в Алжирска университетската болница през 2014 г. (Abderrahim A, 2017; Li J, 2019)

Проучвания от последните години откриват, че *OqxAB* гените са хромозомно локализирани при *K. pneumoniae* и *Raoultella* spp. изолатите (Wong M, 2015). Тези автори предполагат, че най-вероятно тези видове са прогенитори на плазмид медираната *oqxAB*. Различни плазмиди се докладват да пренасят *oqxAB* гена - IncF, IncH, IncHI2 and IncX (Li J, 2019). Свърхекспресията на *oqxAB* гена може да доведе до мултирезистентен фенотип, като трябва да се отбележи, че при плазмидно предаване генът е свърхекспресиран – над 80 пъти над нивото му, ако е локализиран в хромозомата (Wong M, 2015). В настоящият дисертационен труд не беше установена плазмидна локализация на този ген.

Друг механизъм, обуславящ резистентността към флуорхинолони е свързан с продукцията на ензима *aac(6')-Ib-cr*. Това е бифункционален ензим, който засяга главно ciprofloxacin, причинявайки предимно ниско ниво на резистентност, а също и аминогликозидите tobramycin и amikacin (Jacoby, 2014).

В нашето проучване *aac(6')-Ib-cr* се доказва едва в шест изолата, като четири от тях бяха носители на *qnr B4* ген. В противовес на това, чилийски автори установяват в 71% от проучваните изолати *K. pneumoniae* (всички носители на *bla_{TEM}* и *bla_{SHV}*) продукцията на *aac(6') Ib-cr*, а в 57% - наличие на *qnr* ген (A, B, C, D или S) (Carrasco-Anabalón S, 2018).

Подобна находка е съобщена от Hamed SM и кол., които проучват 169 изолата Грам-отрицателни бактерии. Авторите доказват PMQR детерминанти в 56.8%, като тези гени са по-честа находка сред ентеробактериите (66.7%), отколкото сред неферментиращите глюкоза микроорганизми (7.1%). Гените *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS*, *qnrB* и *qnrA* са доказани съответно в 51.1%, 31.2%, 7.1% и 0.7%. *Qnr* в комбинация с *aac(6') - Ib-cr* се доказват при 21.9% от изолатите (Hamed SM, 2018).

Сходни с нашите резултати са тези и от проучване в болница в Шри Ланка върху карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae*, сред които 10 изолата *Klebsiella pneumoniae*. Гените, кодиращи ESBLs (*bla_{TEM-1}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{SHV-11}*, *bla_{CTX-M-15}*) и *bla_{OXA-181}*, кодиращ оксацилиназа с карбапенемазна активност, PMQR детерминантите - *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* и *oqxAB* присъстват във всичките 10 щама *K. pneumoniae*. В допълнение, авторите установяват мутации в QRDR (*gyrA* (Ser83Ile) и *parC* (Ser80Ile)) (Zhu C, 2018).

Сходно на нашето проучване е и това в Китай: Y Liu и кол. проучват разпространението на детерминанти на плазмид-медираната хинолонова резистентност сред 35 хипервирулентни изолати *K. pneumoniae* серотип K1, изолирани през 2017г. В 51.4% от изолатите се доказват PMQR гени, като най-често откриваният ген е *qnrS1* (37.5%), следван от *aac(6')-Ib-cr* (15%) и *qnrB4* (2.5%). В някои от изолатите, носители на *qnr* гени, са установени една или повече мутации в *GyrA* или *ParC*, но резистентност към хинолони е доказана едва в 11.4% (Liu Y, 2019). Успешните конюгационни експерименти в това проучване демонстрират намалена чувствителност към хинолони и ко-трансфер на *bla_{CTX-M-15}* и *qnrS1* алелите (Liu Y, 2019).

През 2017г. Alborno et al. съобщават за нов член на семейството на PMQR, означен като *qnrE1*. Авторите предполагат мобилизация на този ген чрез ISEcp1 от хромозомата на *Enterobacter* spp. върху плазмиди в *K. pneumoniae*. (Alborno E, 2017).

По-късно други автори съобщават за идентификацията на *qnrE1* в *K. pneumoniae*, изолиран от папагал с респираторно заболяване. Пълното ДНК секвениране разкрива наличието на MDR IncMI плазмид в генома на изолата (Cunha MPV, 2017).

В настоящата работа *qnr* гени бяха доказани в 47.8 % (76/159) от всички тествани за детерминанти на PMQR изолати. *QnrB* гена е най-често доказваната *qnr* детерминанта на плазмидна хинолонова резистентност, идентифицирана в 39.6% (63/159) от всички изследвани изолати. Най-често доказваният алелен вариант е *qnrB9* (47.6%) , следван от *qnrB1* (36.5%).

За висока честота на разпространение на *qnr* гени сред чревни бактерии съобщават и автори от Венецуела. Те установяват 33.6% носителство на *qnrB* и само 0.9% на *qnrA*, като при изолатите *E. coli qnrB* присъства в 15.4%, а при *K. pneumoniae* – в 12.5% (García J, 2018).

Аналогично, проучвайки плазмид-медираната хинолонова резистентност в клинични изолати *Enterobacteriaceae*, автори от Иран идентифицират в щамове *K. pneumoniae qnrB* в 47.8%, *qnrS* – в 4.34% и *aac(6)-Ib-cr* – в 56.5% (Majlesi A, 2018).

Друго проучване в Иран на Izadi и кол., провеждано сред 130 болнични изолати *K. pneumoniae* (ESBL- и не-ESBL-продуциращи), колекционирани за 18-месечен период (2011-2012г.), установява 61% от изолатите положителни за различни *qnr* гени: *qnrA*, *qnrS*, и *qnrB* са установени в 10.8%, 15.4% и 20.8% съответно. Авторите установяват, че по-често хинолон-резистентните щамове *K. pneumoniae* са и ESBL-продуциращи, като сред ESBL-продуциращите *qnrB* вариантите се оказват най-чести (43%) (Izadi N, 2017).

В много случаи сред представителите на ентеробактериите, детерминантите на PMQR са комбинирани с мутации в QRDR. Много автори съобщават, че вероятно наличието на *qnr* гените повишава възможността за възникване на мутации в *gyr* гените в хода на лечение с флуорохинолони (Rodríguez-Martínez, 2016; Hooper, 2015).

Наличие на хромозомни мутации в детерминиращите хинолонова резистентност региони (QRDR) в настоящото проучване беше установено в 71% от тестваните изолати *K. pneumoniae*, като мутациите в *gyrA* и *parC* и самостоятелно в *gyrA* гените бяха доказани съответно в 66% и 5% от QRDR тестваните *K. pneumoniae*. Високото ниво на хромозомни мутации може да се свърже с наличието на PMQR детерминанти, основно *qnr* гени или наличието на *oqxAB*. Има проучвания, които установяват по-висока честота на мутации при *oqxAB* положителните, в сравнение с *qnr* положителните изолати (Li J, 2019).

Най-честата мутация в *gyrA* (n=63) е двойната субституция Ser83Phe /Asp87Ala, в комбинация с мутацията в *parC* Ser80Ile и наличие на *oqx AB*. Тези изолати са обединени в група 1 и демонстрират високо ниво на

резистентност към хинолони (таблица 12). Стойностите на МПК на nalidix acid са над 256 µg/ml, а на ciprofloxacin и levofloxacin от 8-32µg/ml и от 6-32 µg/ml съответно. В 96.8% изолатите от тази група са продуценти на СТХ-М-15, а 23.8% от тях са продуценти на КРС-2 карбапенемазата. В тази група установяваме сравнително ниско ниво на плазмидната резистентност, асоциирана с *qnr* гените (16%).

В група 2 са обединени 44 изолата *K. pneumoniae* с единична субституция в *gyrA* (Ser83Ile) и *parC* (Ser80Ile), в комбинация с *oqxAB* гени и продукция на СТХ-М ESBLs и ДНА-1 бета-лактамази. В 33 изолата (75%) бяха доказани *qnr* гени, с доминиране на *qnrS1* и *qnrB9*. По подобие на първа група, в тази група са отчетени също високи стойности на МПК на nalidix acid, ciprofloxacin и levofloxacin.

Група 3 е представена от три изолата с мутация само в *gyrA*, представена от единичната субституция Ser83Phe, наличие на *oqxAB* и при един изолат - *aac(6')-Ib-cr*. Asp87Asn и Asp87Tyr самостоятелни мутации в *gyrA* установихме в единични изолати от групи 4 и 5, в които присъстваха и ефлуксните помпи *oqxAB* и *qnrB1* гена (таблица 12). В унисон с установените от нас мутации, засягащи QRDR, Араújo и кол. проучват 40 резистентни към флуорохинолони *K. pneumoniae* и *E. coli*, изолирани от вътреболнични и придобити в обществото инфекции и установяват следните нуклеотидни субституции в *gyrA* (Ser83Ile, Val37Leu, Lys154Arg, Ser171Ala, Ser19Asn, Ile198Val, Ser83Tyr, Ser83Leu, Asp87Asn и Asp87Gly) и *parC* гените (Ser80Ile, Glu84Lys, Ala129Ser, Val141Ala и Glu84Gly) (Араújo BF, 2017).

В настоящото проучване хромозомни мутации, засягащи *gyrA* и *parC* гените, не бяха установени в 46 изолата в група 6. Хинолоновата резистентност в тези изолати се асоциира с присъствието на *oqxAB* (n=46) и *qnr* гени (A1, B1, B9, S1) (n=31) в 67.4%) (таблица 12). Именно в тази група попадат изолатите с най-ниско ниво на резистентност към флуорохинолони, вкл. такива, чувствителни на levofloxacin и ciprofloxacin.

В заключение, в изследваните изолати *K. pneumoniae* установихме широко разпространение на *oqxA* (100%), *oqxB* (93%) и *qnrB* (40%) в асоциация с *bla*_{СТХ-М-15}. Доминиращият *qnrB* ген беше представен от *qnrB9* (47.6%), следван от *qnrB1* (36.5%) и *qnrB4* (16%). В настоящото проучване *qnrS1*, *qnrA* и *Aac*-(6')-Ib-cr са слабо разпространени детерминанти на хинолонова резистентност. В над 70% от изолатите бяха доказани хромозомни мутации в *gyrA* и/или *parC* гените, като в 66% се установиха едновременни мутации в двата гена. Замените в позиции Ser83Phe /Asp87Ala, Ser83Ile, Asp87Asn, Asp87Tyr за *gyrA* и позиции Ser80Ile за *parC* бяха доказани в изолатите с високо ниво на резистентност.

4.8. Доказване на гени, кодиращи плазмидна колистинова резистентност

Общо 8 изолата *K. pneumoniae*, резистентни на colistin бяха подложени на детекция на *mcr* гените (*mcr1*, *mcr2*, *mcr3*, *mcr4*, *mcr5*). PCR експериментите при всички изпитани изолати бяха негативни.

Обсъждане

В глобален план проблемът с колистиновата резистентност сред Грам-отрицателните бактерии, включително *K. pneumoniae*, стои с особена острота. Доскоро причините за възникване на резистентност към colistin се свързваха основно с модификация на липополизахаридите от външната мембрана на бактериалната клетка (Ah YM, 2014). Различни автори съобщават за мутации в *mcrB* гена и за промени в двукомпонентните регулаторни системи PhoPQ и PmrAB с отношение към резистентността към colistin (Ah YM, 2014; Poirel, 2014; Cannatelli, 2013; Lopez-Camacho, 2014; Kocsis, 2016; Paul M, 2019)

В последните години редица автори идентифицират *mcr-1* гена, като детерминантата, кодираща плазмид-медирана резистентност към colistin (Quan, 2017; Liu, 2016)

В научната литература има множество съобщения за трансмисия на тази резистентност от животни върху хора, вкл. от хранителни продукти (месо) към хора. (Liu, 2016; Olaitan, 2015). Понастоящем се доказва широко разпространение на *mcr-1*-медираната резистентност към colistin сред ентеробактерии, изолирани от хранителни продукти, което се асоциира със значителен риск от разпространението на плазмидна колистинова резистентност в глобален мащаб (Gelbicova T, 2019). *Mcr-1* генът придобива все по-широко разпространение сред изолати *Escherichia coli* сред домашни животни (Liu, 2016; Kawahara, 2019). Междувидов трансфер на *mcr-1* се докладват от различни изследователи (Stoesser, 2016; Du, 2016). Хоризонталният трансфер на *mcr-1* гена особено към продуценти на карбапенемази в болнични условия може да доведе до изключителни терапевтични затруднения особено в случаи на тежки инфекции (Nordmann P, 2016; Nordmann and Poirel, 2016). Редица автори съобщават за клинично значими изолати *E. coli* и *K. pneumoniae*, носители на *mcr-1* ген и същевременно продуценти на VIM-1, KPC-2 и NDM-5 карбапенемази (Poirel L, 2016; Falgenhauer L, 2016; Du H, 2016).

В настоящото проучване не беше доказано присъствие на *mcr* гени. В този смисъл, резистентността към colistin в изпитваните изолати *K. pneumoniae* е в резултат от действието на други, вероятно хромозомни механизми.

В заключение, въпреки широкото разпространение на *mcr* гени в глобален план, в изследваните от нас изолати *K. pneumoniae* тези гени, асоцииращи се с плазмид-медирана резистентност към colistin не бяха доказани.

5. Изводи

Анализът на резултатите, получени в нашите изследвания и сравняването им с литературните данни ни дават основание да направим следните изводи:

1. Изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства установи висок процент на резистентност към цефалоспорици от III генерация (54.8%) в проучваната колекция от 1084 изолата *Klebsiella pneumoniae*. Резистентните на цефалоспорици трета генерация изолати демонстрираха във висока степен резистентност към представители и на други антибиотични групи – piperacillin/tazobactam(96.5%), ciprofloxacin (96.5%), trimethoprim/sulphamethoxazole (63.0%) и gentamicin (69.3%). Значително по-високи нива на резистентност бяха установени при изолати *K. pneumoniae* от кръв и урина в сравнение с тези от раневи секрети и секрети от респираторния тракт. В групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, единствено ceftazidime/avibactam и amikacin демонстрираха най-добра in vitro активност.
2. Проведеният двойно-дискос синергистичен тест с цефалоспорици трета генерация и amoxicillin/clavulanic acid (20/10) за детекция на ESBL в изолати от *K. pneumoniae*, както и модифицираният Hodge тест, показаха сравнително добра чувствителност (81 % и 92% съответно).
3. Чрез метода на IEF в проучваните изолати се установи разнообразие от β -лактамази, включително и ко-продукция на няколко ензима. IEF в комбинация с биологичния тест за хидролитична активност потвърди в групата на проучваните изолати *K. pneumoniae* продукцията на два вида ESBLs (представени предимно от CTX-M и при един изолат от SHV тип). В част от изолатите бяха доказани карбапенемази от KPC групата, VIM и OXA-48. AmpC ензими (DNA) бяха доказани както самостоятелно продуцирани така и в комбинация с CTX-M. При четири изолата се установи продукция на два вида CTX-M ензими.
4. Основният механизъм на резистентност към цефалоспорици от трета генерация в настоящата колекция от изолати *K. pneumoniae* се асоциира с продукцията на ESBLs в 96.9%, като най-чести са CTX-M бета-лактамазите в 93%, с водещото значение на CTX-M-15 (81.1%), следван от CTX-M-3 (9.4%). Резистентността към карбапенемни антибиотици се медира от продукцията на карбапенемази, като KPC-2 е най-често продуцираната бета-лактамаза с карбапенемна активност (21%). В единични изолати са доказани NDM-1 и VIM-1 метало-карбапенемази.
5. При положителните за *bla*_{CTX-M-15} изолати се доказва присъствие на IncF и нетипируеми плазмиди, а при положителни за *bla*_{CTX-M-3} –

присъствие на IncL/M плазмиди. Проведените успешни конюгационни експерименти с *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{CTX-M-3} позитивни изолати потвърдиха плазмидната локализация на тези гени. В положителни за *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{KPC-2} изолати *K. pneumoniae* се установиха IncFII плазмиди. В единствения изолат ко-продуцент на *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{OXA-48} се доказва наличие на IncR плазмид.

6. Епидемиологичното типизиране чрез ERIC PCR и MLST доказва широко вътреболнично разпространение на няколко клона множествено резистентни *K. pneumoniae*, продуциращи CTX-M-15 ESBL. ST15, съответстващ на ERIC тип А, е доминиращият секвенциален тип, персистиращ през целия проучван период (2014-2017г.), следван от ST11 (ERIC тип Р), появяващ се през 2015г. и присъстващ до края на проучвания период. Доминиращият ST15 тип демонстрира висок епидемичен и инвазивен потенциал и потенциал за крос-трансмисия и персистиране. Карбапенемаза-продуциращите изолати *K. pneumoniae* се асоциират с няколко различни STs: ST15, ST76, ST11, ST1350, ST151, ST35, ST395 и ST147. ST15 е носител на *bla*_{KPC-2} и *bla*_{OXA-48}, ST76, ST1350, ST151, ST35 и ST395 – на *bla*_{KPC-2}, а ST11 и ST147 – на *bla*_{NDM-1} и *bla*_{VIM-1} съответно.
7. В изследваните изолати *K. pneumoniae* се установи широко разпространение на *oqxA* (100%), *oqxB* (93%) и *qnrB* (40%) в асоциация с *bla*_{CTX-M-15}. Доминиращият *qnrB* ген беше представен от *qnrB9* (47.6%), следван от *qnrB1* (36.5%), *qnrB4* (16%) и слаба разпространеност на *qnrS1*, *qnrA* и Aac-(6')-Ib-cr. В над 70% от изолатите бяха доказани хромозомни мутации за *gyrA* и/или *parC* гените, като в 66% се установиха едновременни мутации в двата гена. Субституциите в позиции Ser83Phe /Asp87Ala, Ser83Ile, Asp87Asn, Asp87Tyr за *gyrA* и позиции Ser80Ile за *parC* бяха доказани в изолатите с високо ниво на хинолонова резистентност.
8. В изследваните от нас изолати *K. pneumoniae* не бяха доказани *mcr* гени, асоцииращи се с плазмид-медирана резистентност към colistin.

6. Справка за приносите на дисертационния труд.

Приноси с оригинален характер

1. Извършено е детайлно проучване на плазмидните и хромозомни механизмите на резистентност към хинолони в голяма колекция от клинични изолати *K. pneumoniae*, като бяха доказани предимно *qnrB* гени, единични изолати с *qnrA* и *qnrS* алели и слаба разпространеност на Aac-(6')-Ib-cr. В над 70% от изолатите бяха доказани хромозомни мутации в *gyrA* и/или *parC* гените.
2. Проучена е MLST структурата на колекция от 159 изолати *K. pneumoniae*, събрани в рамките на 4 годишен период от пациенти на УМБАЛ "Света Марина" - Варна, като е установено разнообразие от циркулиращи секвенциални типове на фона на широко доминиране и персистиране на "успешния" международен клон *K. pneumoniae* ST15 и в по-малка степен на ST11.

Приноси с потвърдителен характер

1. Установено е доминиращото участие на ESBLs при развитието на резистентност към цефалоспорини от III-та генерация в клинични изолати *K. pneumoniae*.
2. Потвърдено е широкото разпространение на CTX-M β -лактамазите, в частност на CTX-M-15 и в по-малка степен на CTX-M-3 ESBL в *K. pneumoniae*.
3. Резистентността към карбапенемни антибиотици в проучваната колекция от изолати *K. pneumoniae* се медира от продукцията на карбапенемази от различни класове (клас А - KPC-2, Клас В - NDM-1, VIM-1 и клас D - OXA-48), с водещата роля на KPC-2 ензимите.
4. Потвърждава се ролята на хоризонталното вътревидово плазмидно предаване за разпространението на ESBLs и гените, кодиращи карбапенемази.
5. Потвърдено е значението на клоналното вътреболнично разпространение на *K. pneumoniae* в епидемиологията на инфекциите, причинени от този микроорганизъм.

Приноси с научно-приложен характер

1. Оценена е чувствителността на фенотипните тестове за детекция на ESBLs при изолати *K. pneumoniae*, резистентни на III-та генерация цефалоспорини.
2. Анализирани са чувствителността на колекция от карбапенем-резистентните изолати *K. pneumoniae* към новия за клиничната практика антибиотик ceftazidime-avibactam, както и към colistin и tigecycline, всички смятани за алтернатива за лечение на инфекции, причинени от множество резистентни *K. pneumoniae*.

7. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд

Публикации в научни списания

1. R. Markovska, T. Stoeva, L. Boyanova, D. Pencheva, E. Keuleyan, M. Murjeva, M. Sredkova, D. Ivanova, G. Lazarova, **G. Nedelcheva**, R. Kaneva, I. Mitov. Dissemination of succesful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. *Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases* 2017 Dec; 89(4):310-313

2. **Г. Неделчева**, Т. Стоева, Р. Марковска, Д. Димитрова, П. Станкова, И. Митов. Антибиотична чувствителност на клинично значими изолати *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ - Варна за периода 2014-2017г. *Обща медицина*, 2019; 3: 9-16

3. **Г. Неделчева**, М. Божкова, Р. Марковска, Д. Димитрова и Т. Стоева. In vitro чувствителност към colistin и ceftazidim/avibactam на карбапенем-резистентни *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти в интензивни и неинтензивни клиници на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. *Медицински преглед*, 2019;55(3): 31- 37

Съобщения, изнесени на научни форуми

Nedelcheva G, Markovska R, Bozhkova M, Dimitrova D, Stoeva T: **Antimicrobial susceptibility of clinically significant isolates of *Klebsiella pneumoniae* recovered from patients, hospitalized in Varna University hospital, period 2014–2017** 28-th Annual Assembly of IMAV and 5-th International Meeting of Alumni Club at Medical University Varna 13 - 16 May 2018, *Varna, Bulgaria*.

Г. Неделчева, М. Божкова, Р. Марковска, Д. Димитрова, Т. Стоева. **In vitro чувствителност към colistin и ceftazidime/avibactam на карбапенем - резистентни *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти на УМБАЛ „Света Марина“ – Варна.** 17 национален конгрес по Клинична микробиология и Инфекции на БАМ 9-11 май 2019г., София

