



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ

Д-р Юлия Стоянова Мартева-Проевска

**ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА
КЪМ COLISTIN НА ПРОБЛЕМНИ
ГРАМ - ОТРИЦАТЕЛНИ БАКТЕРИИ, ИЗОЛИРАНИ В
УМБАЛ "АЛЕКСАНДРОВСКА" ЕАД**

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд за придобиване на
научна и образователна степен „Доктор”**

Направление 7.1 Медицина, Научна специалност „Микробиология”

Научни ръководители:

Доц. д-р Цветан Борисов Велинов, д.м.

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

Научно жури:

Чл. кор. проф. д-р Иван Гергов Митов, д.м.н.

Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, д.м.н.

Проф. д-р Ива Стефанова Христова, д.м.н.

Проф. д-р Енчо Запрянов Савов, д.м.н.

Проф. д-р Теменуга Жекова Сточева, д.м.

**София
2018**

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ДДМ - Дисково-Дифузионен Метод

МПК - минимална потискаща концентрация (Minimal Inhibitory Concentration)

МСП - Мутант селектиращ прозорец (Mutant Selection Window)

МХБ - Мюлер-Хинтън бульон

ARDS - Acute Respiratory Distress Syndrome (Остър Респираторен Дистрес Синдром)

BMD - Broth MicroDilution (микроразреждане в бульон)

CA - Categorical agreement (сходство по категория)

CBA - colistin base activity

CFU - colony forming units (колония формиращи единици)

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

CMS - Colistimethate sodium (лекарствената форма за парентерално приложение)

CRE - Carapenem Resistant Enterobacteriaceae (карбапенем резистентни *Enterobacteriaceae*)

Dab - Diamino butiric acid

EA - Essential agreement (съществено сходство)

EARS-Net - European Antimicrobial Resistance Surveillance - ne t

ERIC - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA - Food and Drug Administration

IS - Insertional Sequences

L-Ara4N - L-аминоарабиноза

KPC - Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase

MD - Major discrepancy (голямо несъответствие)

MDR - multidrug-resistant

MLTCol - MICROLATEST MIC Colistin

MMAD - mass median aerodynamic diameter (среден аеродинамичен диаметър на масата)

MPC - Mutant Prevention Concentration (мутант-превантивна концентрация)

NDM - New Delhi methalo β -lactamase

PEtN - фосфоетанол амин

PDR - pandrug-resistant

RIFLE - Risk-Injury-Failure-Loss-End stage renal disease

RPNP - Rapid Polymyxin NP test

SA Col - Screen agar colistin

SPM - Superpolymyxin Medium

ТКА - Time-kill Assays (Изпитване за време на убиване)

VAP - Ventilator-Associated Pneumonia (пневмония, свързана с апаратна вентилация)

VIM - Verona Integron-Borne Metalo- β -lactamase

VMD - Very major discrepancy (много голямо несъответствие)

XDR - extensively drug-resistant

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Една от главните опасности за човешкото здраве през 21 век се явява увеличаващата се резистентност към антимикробните препарати. Инфекциите, причинявани от резистентни бактерии допринасят за удължаване на болничния престой, по-високи разходи за хоспитализация, терапевтични неудачи, преждевременна смърт. Появилата се и бързо разпространяваща се резистентност към едни от резервните ни антибиотици, каквито са карбапенемите, налага използването на „забравени“ антибиотици или въвеждането на схеми за комбинирани терапии. От началото на 2017г. се наблюдава значително увеличение на честота на изолираните в УМБАЛ "Александровска" XDR Грам - отрицателни бактерии. Много сериозен проблем представляват карбапенем-резистентните щамове *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, голяма част от които са чувствителни само на colistin.

Colistin не е използван в продължение на десетилетия в България, поради което не са провеждани системни проучвания за чувствителността на изолираните щамове към него. Прави впечатление, че при пациенти с изолирани чувствителни на colistin микроорганизми, монотерапията с ниски дози от препарата, води до терапевтични неуспехи и чести решути на заболяването. Не са редки и случаите на бързо развитие на резистентност към colistin след подобно неуспешно терапевтично поведение. Всичко това показва, че начина на употреба на този резервен антибиотик, понастоящем, е нерационален и води до бързо селектиране на резистентност към него.

Неизяснените въпроси, свързани с употребата на colistin са много. Те касаят както методите за *in vitro* определяне на чувствителността към него, така и начините на приложение - под формата на моно- или комбинирана терапия. Проблемите, свързани с избора на подходяща комбинирана терапия са не по-малко. Съществуват различни подходи за оценка на комбинирания ефект на двойни и тройни антибиотични комбинации, но все още липсва консенсус относно, кой от тях е най-правилния.

Ранното диагностициране на резистентността в клиничната микробиологична лаборатория е изключително важно, както за правилното лечение, така и за ограничаване на разпространението на резистентните щамове.

Всичко това налага провеждане на задълбочени проучвания върху чувствителността към colistin при мултирезистентните Грам-отрицателни бактерии, проучване на диагностичните параметри на методите за *in vitro* определяне на чувствителността към този антибиотик и *in vitro* изследване на възможностите за подходяща комбинирана терапия на инфекциите, причинени от XDR Грам - отрицателни бактерии.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд е да се проучи чувствителността към colistin на проблемни Грам-отрицателни бактерии, изолирани от проби на пациенти на УМБАЛ "Александровска" ЕАД, да се оцени ефективността на различни *in vitro* методи за определяне на чувствителността към този антибиотик, да се изследват *in vitro* възможностите за комбинирана терапия с него, както и да се охарактеризират молекулярно-генетично colistin-резистентни изолати.

За осъществяване на тази цел си поставихме следните **задачи**:

1. Да се създаде колекция от щамове на клинично значими Грам-отрицателни бактерии с множествена антибиотична резистентност.
2. Да се определи чувствителността на колекциониранияте щамове към основни антибиотични класове чрез дисково-дифузионен метод и определяне на МПК.
3. Да се проучи чувствителността към colistin чрез референтния метод за BMD съгласно стандарт ISO 20776-1. Да се оцени ефективността на:
 - търговски кит за определяне на чувствителността към colistin чрез BMD (MICROLATEST MIC Colistin, Erba Lachema), на метода на разреждане в агар и на метода на пре-дифузия в агар и да се сравнят с тези на референтния метод.
 - Да се проучи ефективността на Rapid Polymyxin NP като бърз скрининг тест за откриване на резистентност към colistin
 - Да се проучи ефективността на Superpolymyxin Medium като скрийн агар за резистентност към colistin.
4. Да се определи мутант-превантивната концентрация на colistin при представителна част от изследваните щамове и да се изследва влиянието на други антибиотици върху нея.
5. Да се проучи ефекта на различни антибиотични комбинации с colistin при карбапенем-резистентни щамове *K. pneumoniae* чрез модифициран метод на шахматната дъска на El Azizi, ТКА (Time kill assay) и да се оценят възможностите на скринингов метод с пре-дифузия (разработен в лабораторията) за изследване на този ефект.
6. Да се определи спектъра на произвежданите карбапенемази при представителите на сем. *Enterobacteriaceae* и да се проучи клоналната свързаност на изолатите при видовете с установена резистентност към colistin.
7. Да се проучат известните до момента плазмидни и част от най-често срещаните хромозомни механизми на резистентност към colistin.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Бактериални щамове

1.1. Клинични изолати

В проучването бяха включени 210, неповтарящи се, клинично значими щамове *K. pneumoniae* (107), *E. coli* (41), *E. cloacae* complex (13), *A. baumannii* complex (28) и *P. aeruginosa* (21), изолирани в периода 2013г - 05/2018г в Централна лаборатория по микробиология на УМБАЛ "Александровска" ЕАД (96.7% (203/210) от тях от 01/2017г до 05/2018г). Критерий за селекция на щамовете бе установяването на множествена антибиотична резистентност, като в колекцията бяха включвани всички изолати с резистентност/намалена чувствителност към карбапенеми, тъй като инфекциите, причинени от тях са показани за лечение с colistin.

1.2. Еталонни щамове - за контрол на качеството на извършените тестове бяха използвани *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* NCTC 13846, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2. Идентификация на клиничните изолати

Биохимичната идентификация на включените в проучването щамове беше направена с идентификационни панели на системите BBL Crystal E/NF Identification system (Becton-Dickinson), MicroLatest (Erba Lachema) или Vitek MS (bioMerieux, France), в съответствие с препоръките на производителя.

3. Методи за определяне на чувствителността към антимикробни средства

3.1. Дисково-дифузионен метод на Bauer-Kirby - тестовете бяха извършени и интерпретирани в съответствие с препоръките на EUCAST (www.eucast.org).

3.2. Определяне на МПК чрез градиентен МПК метод - методът беше използван за определяне на МПК на Tigecycline, посредством MIC Test Strip Tigecycline (Liofilchem). Извършването на тестовете и отчитането на резултатите бе направено в съответствие с препоръките на производителя.

3.3. Доказване на продукция на широкоспекърна β -лактамаза (ESBL) - посредством двойно-дисковия тест за синергизъм, съобразно инструкциите на EUCAST (EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms of clinical and/or epidemiological importance).

3.4. Доказване на продукция на карбапенемаза - беше използван търговския кит на Rosco diagnostica A/S, Denmark - MBL, KPC and OXA-48 Confirm kit. Тестовете бяха извършени и интерпретирани съобразно инструкциите на производителя.

3.5. Определяне на МПК чрез метода на микроразреждане в бульон (BMD)

Методът беше използван за определяне на референтната МПК на colistin. Извършването на тестовете беше направено в съответствие с препоръките на

обединената работна група на CLSI / EUCAST и ISO 20776-1, посредством лабораторно приготвени панели за BMD [ISO 20776-1].

3.6. Определяне на МПК чрез метода на разреждане в агар

Определянето на МПК чрез разреждане в агар бе извършено в съответствие с препоръките на EUCAST [EUCAST *E.Def* 3.1, 2000]. Методът беше използван за определяне на МПК на следните антибиотици - ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, aztreonam, colistin, ceftriaxon.

3.7. Определяне на МПК на colistin чрез MICROLATEST MIC COLISTIN (Erba Group - Erba Lachema, Czech Republic) - всички тестове бяха извършени в съответствие с препоръките на производителя.

3.8. Определяне на чувствителността към colistin по метода на пре-дифузия - тестовете бяха извършени и интерпретирани с търговски китове на Rosco Diagnostica A/S в съответствие с препоръките на производителя.

3.9. Rapid Polymyxin NP тест (RPNP) - тестовете бяха извършени и интерпретирани в съответствие с оригиналния протокол [Nordmann *et al.*, 2016b]

3.10. SuperPolymyxin Medium (SPM), използвана като скрийн агар colistin

Средата бе приготвена съгласно методологията, описана от Nordmann *et al.*, 2016, но без добавяне на Daptomycin и Amphotericin B [Nordmann *et al.*, 2016a].

4. Методи, свързани с определяне на мутант-превантивна концентрация

4.1. Определяне на мутант-превантивна концентрация на colistin

Определянето на MPC (colistin) бе направено за *K. pneumoniae*, *A.baumannii* complex, *P. aeruginosa*, *E. coli* и *E. cloacae* complex в съответствие с методиката, описана от Blondeau (2009).

4.2 Определяне на влиянието на комбинираното приложение на антибиотици върху мутант-превантивна концентрация на colistin

Методът беше използван за изследване на влиянието на rifampicin (1.7 mg/l) и meropenem (6.8 mg/l) върху MPC на colistin при *K. pneumoniae*.

5. Тестове за изследване на комбинираното действие на антибиотици colistin

5.1. Скрининг тест за синергизъм с colistin с пре-дифузия

Методът е разработен в лабораторията и дава възможност за едновременно изследване за синергизъм с colistin на голям брой антибиотици. Тестовете бяха извършени по следния начин: Дискове colistin от 10µg (BD) се поставят върху повърхността на неинокулиран Мюлер-Хинтън агар (максимум 9 диска на петра, един от които - в центъра) и се инкубират при 35±1°C за 2 часа (първи период на пре-дифузия), след което се изваждат от термостата и се оставят на стайна температура за още 2 часа (втори период на пре-дифузия). След като изтекат двата периода на пре-дифузия, дисковете се отстраняват. От чиста, 18-24 часова

култура на изследвания щам се приготвя суспензия с мътна от 0,5 MF. За всеки изследван щам, с тампон, по начин, аналогичен на този, използван при дисково-дифузионния метод се инокулират 2 петри с Мюлер-Хинтън агар - едната с пре-дифузия на colistin (петра №1), а другата (петра №2) - без предварителна обработка. Върху инокулираните петри, паралелно, се поставят дискове, съдържащи антибиотиците, с които ще се търси синергизъм, като на петра №1 те се поставят точно върху местата на отстранените дискове colistin. Мястото на един диск colistin на петра №1 се оставя празно, с цел да се определи инхибирането, получено от пре-дифузията на colistin самостоятелно. Петритата се инкубират в термостат, при аеробни условия и температура $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ за 18 - 24 часа. На следващия ден, диаметрите на зоните на инхибиране на комбинациите с colistin (петра №1), на всички антибиотици самостоятелно (петра №2) и на colistin, след пре-дифузия (петра №1) се измерват. За всяка една комбинация се определя разликата (Δ , mm) между диаметъра на зоната на инхибиране на комбинацията и диаметъра на зоната на инхибиране на по-активния от двата антибиотика. Интерпретацията на получените резултати се прави както следва:

- ✓ ако Δ е (-2), (-1), 0, 1 или 2 mm $\rightarrow$ индиферентност на комбинацията
- ✓ ако Δ е (-3) или (-4) mm $\rightarrow$ възможен антагонизъм
- ✓ ако Δ е $\leq$ (-5) mm $\rightarrow$ антагонизъм
- ✓ ако Δ е 3 или 4 mm $\rightarrow$ възможен синергизъм
- ✓ ако $\Delta \geq 5$ mm $\rightarrow$ синергизъм

5.2. Микродилуционен метод на El-Azizi

Тестовите бяха извършени в стерилни 96-ямкови плаки (Dinatech S.A.), в съответствие с оригиналния протокол на метода, предложен от *El-Azizi* (2016), но без определяне на минималните бактерицидни концентрации за антибиотиците и изследваните комбинации.

Методът на El-Azizi беше използван за определяне на ефекта на следните двойни комбинации с colistin: colistin - meropenem; colistin - rifampicin, colistin - gentamicin и на тройните комбинации: colistin - rifampicin - meropenem, colistin - rifampicin - gentamicin, colistin - meropenem - gentamicin. Антибиотиците бяха изследвани в следните концентрации: colistin 0.007 - 8 mg/l (за colistin-чувствителни щамове) и 0.125 - 128 mg/l (за colistin-резистентни щамове), meropenem 0.06 - 64 mg/l, gentamicin 0.03 - 32 mg/l и rifampicin 0.125 - 128 mg/l.

5.3. Time-kill assays (ТКА)

Експериментите бяха извършени в съответствие с методологията описана от *Lagerbäck et al.*(2016) и *Tangdän et al.* (2014), но с малко модификации.

6. Молекулярно – генетични изследвания

6.1. Екстракция на ДНК

6.1.1. ДНК екстракция за извършване на real-time PCR - ДНК екстракцията за извършване на real-time PCR тестовете бе направена с DNA SorbA kit (*Sacace Biotechnologies, Italy*), в съответствие с инструкциите на производителя. ДНК екстрактите бяха съхранявани във фризер при температура (-20°C).

6.1.2. Термоекстракция на ДНК

За извършване на част от PCR тестовете бе използван термоекстракт на ДНК в Tris-EDTA (TE) buffer (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 8 - 8.3), получен чрез загряване при 100°C за 10 min. След охлаждане термоекстрактите бяха съхранявани във фризер при температура (-20°C).

6.2. Real-time PCR за доказване на основните групи карбапенемази

За доказване на основните групи карбапенемази (KPC, VIM, OXA, NDM, IMP) бяха използвани китове за Real-time PCR на *Sacace Biotechnologies, Italy* - **MDR KPC/OXA Real-TM kit** и **MDR MBL (VIM, IMP, NDM) Real-TM kit**. Тестовете бяха извършени с ДНК екстракти, получени чрез DNA SorbA kit (*Sacace Biotechnologies, Italy*), в съответствие с инструкциите на производителя. RT-PCR амплификацията бе извършена в термосайкълър SaCycler 96 Real time PCR System, Model: SaCycler-96 5X, *Sacace Biotechnologies*.

6.3. Multiplex PCR за доказване на основните групи карбапенемази

За извършване на реакциите бяха използвани термоекстракти от изследваните щамове и праймери, предложени от *Poirel et al. (2011)*.

6.4. PCR за доказване на гени на често срещани β-лактамази

При представителна част от включените в проучването щамове бяха извършени PCR реакции за откриване на гени на често срещани β-лактамази - *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* и *bla_{CMY}*. Реакциите бяха извършени по методология, описана от *Markovska et al. (2008)* и *Schneider et al. (2014)*.

6.5. PCR за доказване на плазмидно кодирани гени за резистентност към colistin

За откриване на плазмидно кодирани гени за резистентност към colistin (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*) беше използван мултиплекс PCR, предложен от *Lescat et al. (2018)*.

6.6. PCR за амплифициране на хромозомно кодирани гени, свързани с развитие на резистентност към colistin и секвениране - Гените бяха амплифицирани чрез полимеразо-верижна реакция, посредством праймери, предложени от *Jayol et al. (2014)* и *Cannatelli et al. (2013)*.

6.7. ERIC-PCR за епидемиологично типизиране

Реакцията беше извършена съобразно методологията, използвана от *Markovska et al. (2008)*. Ивиците от ERIC-PCR бяха анализирани визуално. За определяне на филогенетичното родство между проучените клинични щамове и за построяване

на дендрограмите (филогенетични дървета) бе използван UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average clustering algorithm) with Dice coefficient и за построяване на дендрограмата Phylodendron (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>). Изолати с коефициент на сходство над 0.8 се приемаха за един клон.

7. Статистически анализи - бяха използвани основно методите на дескриптивната статистика.

Резултатите от изследване на чувствителността към colistin чрез различните методи бяха сравнени и анализирани спрямо референтния метод. При анализа на данните бяха изчислени следните показатели:

Essential agreement (EA) (съществено сходство) - беше изчислен като % от изолатите с МПК в рамките на ± 1 двукратно серийно разреждане в сравнение с референтния метод, спрямо общия брой изследвани щамове [ISO 20776-2]. Броят на тестовете, използвани за тези изчисления при търговския кит на Erba Lachema и метода на разреждане в агар, е по-малък от общия брой изследвани щамове, поради различия в диапазона на изследваните концентрации.

Categorical agreement (CA) (сходство по категория) - беше изчислен като % от изолатите с резултати в една и съща категория с референтния метод, спрямо общия брой изследвани щамове [ISO 20776-2].

Very major discrepancy (VMD) (Много голямо несъответствие) - налице е в случаите, при които изолати се определят като чувствителни с оценявания метод, но резистентни с референтния. Изчисленията се правят спрямо броя на резистентните изолати, определени чрез референтния метод [ISO 20776-2].

Major discrepancy (MD) (Голямо несъответствие) - налице е в случаите, при които изолати са определят като резистентни с оценявания метод, но чувствителни с референтния. Изчисленията се правят спрямо броя на чувствителните изолати, определени чрез референтния метод [ISO 20776-2].

За извършване на част от статистическите анализи беше използван софтуер SPSS 16.0. Наличието на корелацията между резултатите, получени чрез количествените методи за определяне на чувствителността към colistin беше оценена чрез корелационния коефициент на Spearman (Spearman's correlation coefficient). Статистическата значимост на резултатите, получени в групите на colistin-резистентните и colistin-чувствителните щамове беше оценена чрез метода на Mann-Whitney.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Характеристика на включените в проучването клинични изолати

В хода на проучването беше създадена колекция от 210, неповтарящи се, клинично значими щамове *K. pneumoniae* (n=107), *E. coli* (n=41), *E. cloacae* complex (n=13), *A. baumannii* complex (n=28) и *P. aeruginosa* (n=21), изолирани в периода 2013г - 05/2018г в Централна лаборатория по микробиология на УМБАЛ "Александровска"ЕАД. 96.7 % (203/210) от тях бяха изолирани в периода от 01/01/2017г до 31/05/2018г. Критерий за селекция на щамовете бе установяването на множествена антибиотична резистентност, като бяха включвани всички изолати с нечувствителност към карбапенеми, тъй като инфекциите, причинени от тях са показани за лечение с colistin. Преобладаващата част от щамовете (96,7%, 203/210) бяха изолирани от проби на хоспитализирани пациенти - в 99% от случаите (201/203) от пациенти на УМБАЛ "Александровска" и в два случая - от пациенти на болница "св.И.Рилски". Категоризирането на щамовете като multidrug resistant (MDR), extensively drug resistant (XDR) и pandrug resistant (PDR) бе направено в съответствие с дефинициите на Magiorakos et al.(2012), а именно:

MDR - нечувствителни (R, I) към поне един антибиотик в 3 или повече антимикробни категории; XDR - нечувствителни (R, I) към поне един антибиотик от всички, с изключение на две или по-малко категории; PDR - нечувствителни към всички антибиотици от всички антимикробни категории. Характеристиката на изследваните щамове е представена в Таблица 1.

2. Определяне на чувствителността на колекционираниите щамове към основни антибиотични класове чрез дисково-дифузионен метод и определяне на МПК.

Първоначалното определяне на чувствителността на изследваните щамове бе направено чрез рутинно използвания в лабораторията дисково-дифузионен метод на Бауер-Кърби. Впоследствие, за част от изпитваните антибиотици (Ceftriaxon, Ceftazidime, Cefepime, Aztreonam, Imipenem, Meropenem, Gentamicin, Tobramycin, Amikacin) бе определена МПК чрез метода на разреждане в агар. Чувствителността на всички изследвани щамове към colistin бе определена първоначално чрез микроразреждане в бульон посредством търговския кит на ErbaLachema, а впоследствие и с референтния метод за BMD, съгласно препоръките на ISO 20776-1. Интерпретацията на получените резултати беше направена в съответствие с препоръките на EUCAST. Резултатите за Cefoperazone/sulbactam бяха интерпретирани съобразно препоръките на производителя.

Таблица 1. Характеристика на включените в проучването клинични изолати (210)

показател	Общо	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i> complex	<i>A. baumannii</i> complex	<i>P. aeruginosa</i>
	210	107 (51%)	41 (19.5%)	13 (6.2%)	28 (13.3%)	21 (10%)
2013	1 (0.5%)	1 (0.9%)	-	-	-	-
2014	2 (0.9%)	2 (1.9%)	-	-	-	-
2015	4 (1.9%)	4 (3.7%)	-	-	-	-
2017	164 (78.1%)	69 (64.5%)	36 (87.85)	12 (92.3%)	28 (100%)	19 (90.5%)
2018	39 (18.6%)	31 (29%)	5 (12.25)	1 (7.7%)	-	2 (9.5%)
MDR	76 (36.2%)	31 (29%)	41 (100%)	4 (30.8%)	-	-
XDR	134 (63,8%)	76 (71%)	-	9 (69.2%)	28 (100%)	21
PDR	-	-	-	-	-	-
мъже	123 (58.6%)	62 (57.94%)	23 (56.1%)	8 (61.5%)	20 (71.4%)	10 (47.6%)
жени	87 (41.4%)	45 (42.06%)	18 (43.9%)	5 (38.5%)	8 (28.6%)	11 (52.4%)
амбулаторни	7 (3.3%)	2 (1.9%)	2 (4.9%)	2 (15.4%)	-	1 (4.8%)
стационарни	203 (96.7%)	105 (98.1%)	39 (95.1%)	11 (85.6%)	28 (100%)	20 (95.2%)
урина	127 (60.5%)	70 (65.4%)	35 (85.4%)	10 (76.9%)	2 (7.1%)	10 (47.6%)
кръв	8 (3.8%)	4 (3.7%)	2 (4.9%)	1 (7.7%)	-	1 (4.8%)
ETA, БАЛ,sp	53 (25.2%)	21 (19.6%)	3 (7.3%)	-	21 (75%)	8 (38%)
Wd/dr/as/ps	15 (7.1%)	8 (7,5%)	1 (2.4%)	1 (7.7%)	4 (14.3%)	1 (4.8%)
фецес	2 (0.95%)	2 (1,9%)	-	-	-	-
Ab	2 (0.95%)	1 (0,9%)	-	-	1 (3.6%)	-
bi	1 (0.5%)	-	-	-	-	1 (4.8%)
други	2 (0.95%)	1 (0,9%)	-	1 (7.7%)	-	-

Легенда: ETA=ендотрхеален аспират, BAL - бронхоалвеоларен лаваж, ЦВП - връх от централен венозен път, pf - плеврален пунктат, ab - ексудат от коремна кухина, bi - жлъчка, wd - раневи секрет, as - абсцес, ps - гной, dr - секрет от дрен

2.1. *K. pneumoniae*

Антибиотичната чувствителност на включените в проучването 107 щама *K. pneumoniae* е представена в Таблица 2.

Таблица 2. Антибиотична чувствителност на включените в проучването 107 щама *K. pneumoniae*

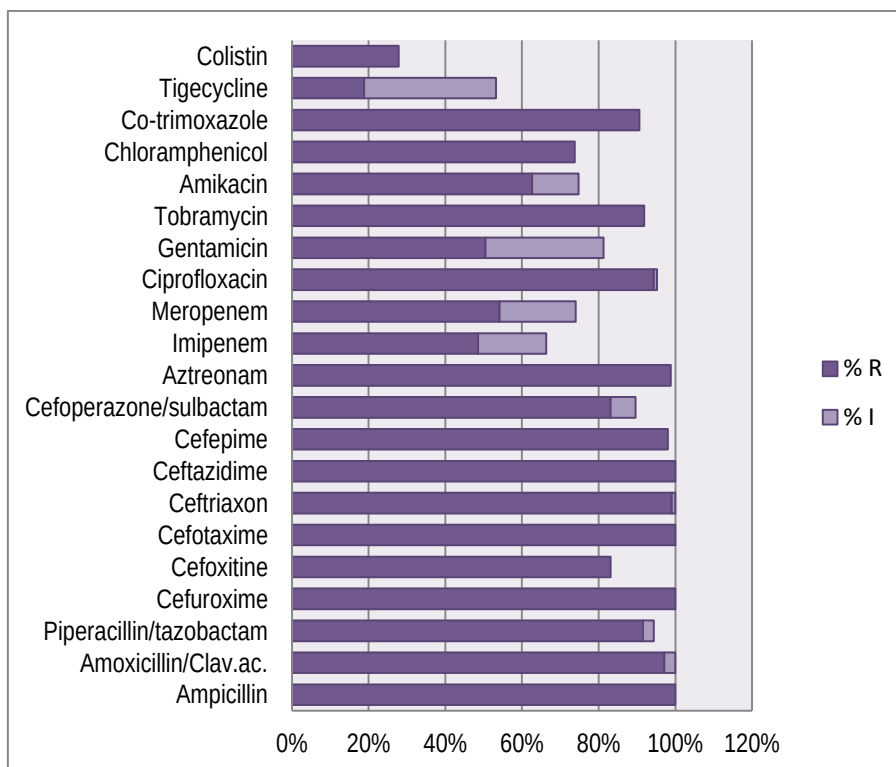
Антибиотик	брой	Диапазон µg/ml	МПК ₅₀ µg/ml	МПК ₉₀ µg/ml	S (n, %)	I (n, %)	R (n, %)
Ampicillin ¹	107	-	-	-	0	0	107 (100%)
Amoxicillin/Cl.ac. ¹	107	-	-	-	0	3 (2.8%)	104 (97.2%)
Piperacillin/tazobactam ¹	107	-	-	-	6 (5.6%)	3 (2.8%)	98 (91.6%)
Cefuroxime ¹	107	-	-	-	0	0	107 (100%)
Cefoxitine ¹	107	-	-	-	18 (16.8%)	0	89 (83.2%)
Cefotaxime ¹	107	-	-	-	0	0	107 (100%)
Ceftriaxone ²	107	2 - >256	>256	>256	0	1 (0.9%)	106 (99.1%)
Ceftazidime ²	107	16 - >256	>256	>256	0	0	107 (100%)
Cefepime ²	107	0.25 - >256	128	>256	2 (1.9%)	0	105 (98.1%)
Cefoperazone/sulbactam ⁵	107	-	-	-	11 (10.3%)	7 (6.5%)	89 (83.2%)
Aztreonam ²	94	0.25 - >256	>256	>256	1 (1.1%)	0	93 (98.9%)
Imipenem ²	107	0.06 - >256	8	64	36 (33.6%)	19 (17.8%)	52 (48.6%)
Meropenem ²	107	≤0.03 - >256	8	64	28 (26.2%)	21 (19.9%)	58 (54.2%)
Ciprofloxacin ²	107	0.03 - >32	>32	>32	5 (4.7%)	1 (0.9%)	101 (94.4%)
Gentamicin ²	107	0.5 - >128	8	>128	20 (18.7%)	33 (30.8%)	54 (50.5%)
Tobramycin ²	79	1 - >128	64	>128	7 (8.9%)	0	72 (91.1%)
Amikacin ²	107	1 - >128	32	>128	27 (25.2%)	12 (12.1%)	67 (62.7%)
Chloramphenicol ¹	107	-	-	-	28 (26.2%)	0	79 (73.8%)
Co-trimoxazole ¹	107	-	-	-	10 (9.3%)	0	97 (90.7%)
Tigecycline ⁴	90	0,25 - 8	1,5	3	42 (46,7%)	31 (34,4%)	17 (18,9%)
Colistin ³	104	≤0.125 - >128	1	8	75 (72.1%)	0	29 (27.9%)

¹чувствителността е определена чрез ДДМ, ²чувствителността е определена чрез метода на разреждане в агар, ³чувствителността е определена чрез BMD, ⁴чувствителността е определена чрез MIC strip, ⁵чувствителността е определена чрез ДДМ, като интерпретацията е направена в съответствие с препоръките на производителя (Pfizer)

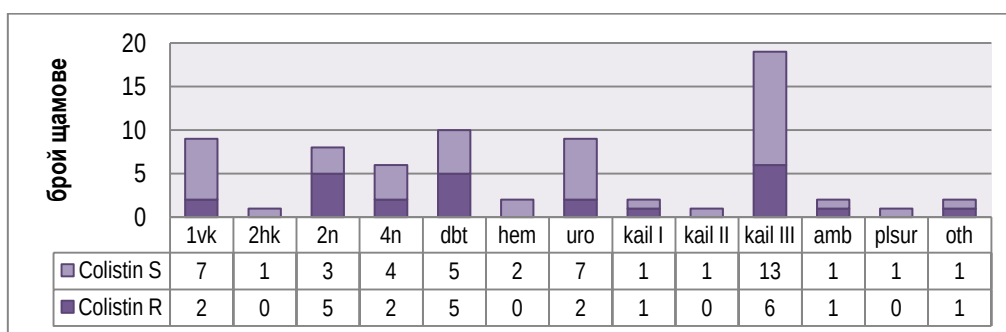
Установено бяха много високи нива на резистентност към почти всички антибиотични класове - β-лактамни антибиотици, хинолони, аминогликозиди (Фигура 1). Чувствителност към карбапенеми е налице при по-малко от 35% от изследваните щамове (33.6% към Imipenem и 26.2% към Meropenem). Чувствителност към Tigecycline беше установена при 46.7% от щамовете.

За периода 2013г - 2016г бяха изолирани единични карбапенем-нечувствителни изолати (седем) *Enterobacteriaceae*, предимно от пациенти с предхождаща хоспитализация в други болници. Рязко увеличение, предимно на броя на карбапенем нечувствителните *K. pneumoniae*, изолирани в болницата, бе установено в началото на 2017г. За период от 17 месеца техният брой достигна 72. Общо за целият период 79 изолата – 73.8%. Изолирани са от пациенти на различни клиники, като най-голям е техният

брой в едно от отделенията на КАИЛ - КАИЛ III (19), ДБТ (10), Клиники по кардиология и Урология (по 9), Нефрологично-трансплантационна клиника (8), Клиника по нефрология (6). В четири случая, щамове са изолирани от амбулаторни пациенти (2) или от пациенти на други болници (2) (Фигура 2). Резистентност към colistin при *K. pneumoniae* чрез референтния метод за BMD бе установена при 29 щамове (27.9%, 29/104). Нивото на резистентност към colistin е по-високо при карбапенем нечувствителни щамове (32.9%, 25/76) в сравнение с карбапенем-чувствителните (14.3%, 4/28).



Фигура 1. Антибиотична резистентност (% I+R) на изследваните щамове *K. pneumoniae* (107)



Легенда: 1vk - Клиника по кардиология; 2hk - Клиника по хирургия; 2n - Нефрологично-трансплантационна клиника; 4n - Клиника по нефрология; dbt - Диспансер бъбречна трансплантация; hem - Клиника по хематология; uro - Клиника по урология; amb - амбулаторни; plsur - Пластична хирургия; oth - пациенти на "св.И.Рилски"

Фигура 2:Разпределение по клиники на карбапенем нечувствителни щамове *K. pneumoniae* (72), изолирани в периода 01/2017 - 05/2018

2.2. *E. coli*

Антибиотичната чувствителност на включените в проучването 41 щамове *E. coli* е представена в Таблица 3.

Таблица 3. Антибиотична чувствителност на 41 щамове *E. coli*, включени в проучването

Антибиотик	брой	Диапазон µg/ml	МПК ₅₀ µg/ml	МПК ₉₀ µg/ml	S (n, %)	I (n, %)	R (n, %)
Ampicillin ¹	41	-	-	-	0	0	41(100%)
Amoxicillin/Cl.ac. ¹	41	-	-	-	7 (17,1%)	3 (7,3%)	31 (75,6%)
Piperacillin/tazobactam ¹	41	-	-	-	22 (53,75)	6 (14,6%)	13 (31,7%)
Cefuroxime ¹	41	-	-	-	0	0	41 (100%)
Cefoxitin ¹	41	-	-	-	32 (78%)	0	9 (22%)
Cefotaxime ¹	41	-	-	-	0	0	41 (100%)
Ceftriaxone ²	41	16 - >256	256	>256	0	0	41 (100%)
Ceftazidime ²	41	2 - >256	64	256	0	3 (7,3%)	38 (92,7%)
Cefepime ²	41	0,5 - >256	16	128	2 (4,9%)	9 (22%)	30 (73,1%)
Cefoperazone/sulbactam ⁴	41	-	-	-	27 (65,9%)	7 (17,1%)	7 (17,1%)
Aztreonam ²	36	8 - 256	32	128	0	0	36 (100%)
Imipenem ²	41	0.06 - 16	0,25	4	35 (85,4%)	4 (9,8%)	2 (4,9%)
Meropenem ²	41	≤0.03 - 16	0,06	4	36 (87,8%)	3 (7,3%)	2 (4,9%)
Ciprofloxacin ²	41	≤0.03 - >32	>32	>32	6 (14,6%)	3 (7,3%)	32 (78,1%)
Gentamicin ²	41	1 - >128	2	>128	26 (63,5%)	1 (2,4%)	14 (34,1%)
Tobramycin ²	35	1 - >128	16	>128	12 (34,3%)	1 (2,8%)	22 (62,9%)
Amikacin ²	41	4 - 64	8	32	25 (61%)	10 (24,4%)	6 (14,6%)
Chloramphenicol ¹	39	-	-	-	33 (84,6%)	0	6 (15,4%)
Co-trimoxazole ¹	41	-	-	-	13 (31,7%)	0	28 (68,3%)
Colistin ³	41	≤0.125 - 16	≤0,125	1	40 (97,6%)	0	1 (2,4%)

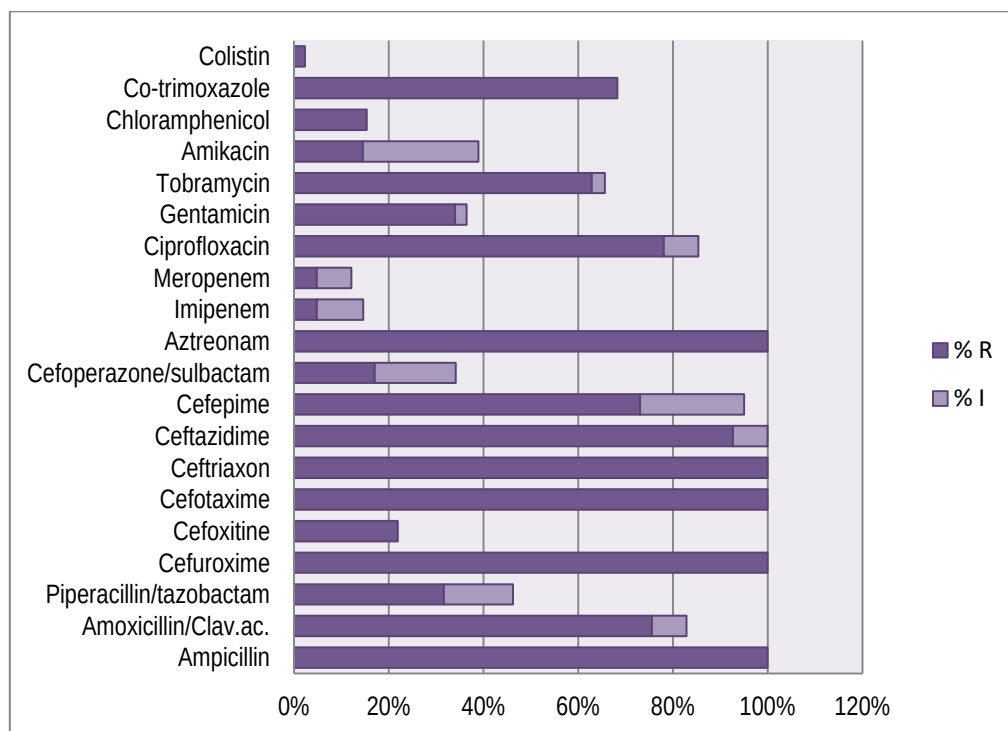
¹чувствителността е определена чрез ДДМ, ²чувствителността е определена чрез метода на разреждане в агар, ³чувствителността е определена чрез BMD, ⁴чувствителността е определена чрез ДДМ, като интерпретацията е направена в съответствие с препоръките на производителя (Pfizer)

Всички изследвани щамове *E. coli* са продуценти на широкоспектрни β-лактамази (ESBL). В допълнение, резистентност/намалена чувствителност към карбапеними беше установена при шест щамове, изолирани през 2018г. Относително по-ниски са нивата на резистентност (% I+R) към Piperacillin/Tazobactam (46.3%), Cefoperazone/sulbactam (34.2%), Gentamicin (36.5%), Amikacin (39%), Chloramphenicol (15.4%). Само 14,6% изследваните щамове са чувствителни на Ciprofloxacin. Резистентност към colistin беше установена при един щам *E. coli*, изолиран през 2018г. Сумарно, антибиотичната резистентност (%I+R) на изследваните щамове *E. coli* е представена на Фиг. 3.

2.3. *E. cloacae* complex

Преобладаващата част от изследваните щамове *E. cloacae* complex - 9 (69.23%) са XDR. Установени бяха много високи нива на резистентност към почти всички изследвани антибиотици - 100% (I+R) към пеницилини,

цефалоспорины, piperacillin/tazobactam, Ciprofloxacin. Малка част от изследваните щамове запазват чувствителността си към gentamicin (7.7%),



Фигура 3: Антибиотична резистентност (%I+R) на изследваните щамове *E. coli* (41)

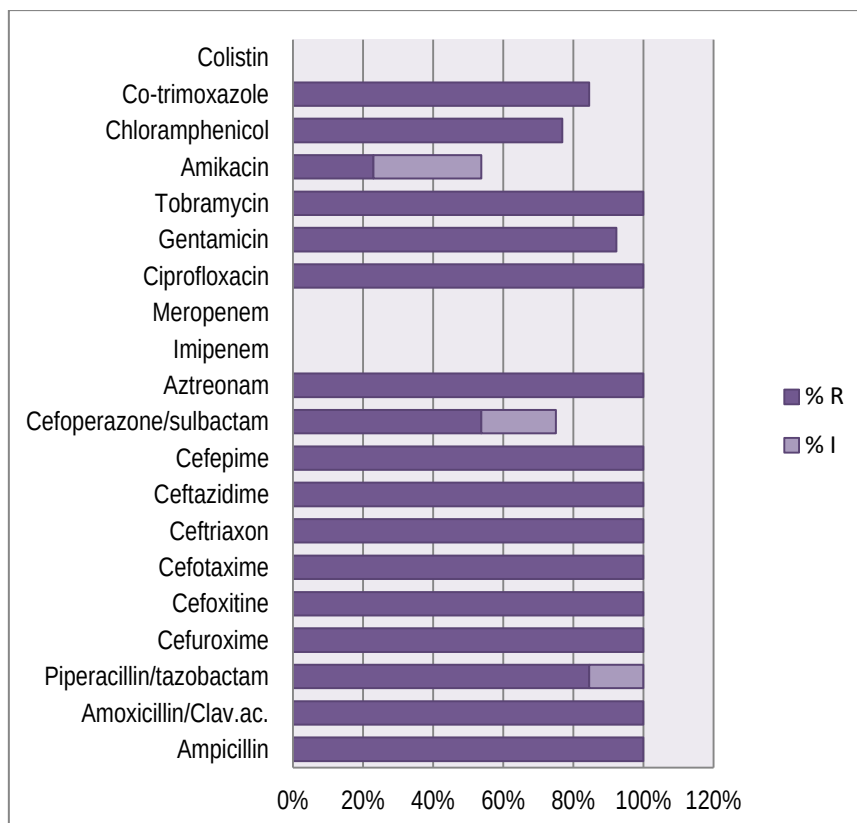
Таблица 4. Антибиотична чувствителност на включените в проучването 13 щамове *E. cloacae* complex

Антибиотик	брой	Диапазон µg/ml	МПК ₅₀ µg/ml	МПК ₉₀ µg/ml	S (n, %)	I (n, %)	R (n, %)
Ampicillin ¹	13	-	-	-	0	0	13 (100%)
Amoxicillin/Cl.ac. ¹	13	-	-	-	0	0	13 (100%)
Piperacillin/tazobactam ¹	13	-	-	-	0	2 (15,4%)	11 (84,6%)
Cefuroxime ¹	13	-	-	-	0	0	13 (100%)
Cefoxitine ¹	13	-	-	-	0	0	13 (100%)
Cefotaxime ¹	13	-	-	-	0	0	13 (100%)
Ceftriaxone ²	13	>256	>256	>256	0	0	13 (100%)
Ceftazidime ²	13	256 - >256	>256	>256	0	0	13 (100%)
Cefepime ²	13	16 - >256	256	>256	0	0	13 (100%)
Cefoperazone/sulbactam ⁴	13	-	-	-	3 (21,3%)	3 (21,3%)	7 (53,8%)
Aztreonam ²	12	64 - >256	256	>256	0	0	13 (100%)
Imipenem ²	13	0.06 - 2	0,5	0,5	13 (100%)	0	0
Meropenem ²	13	0,06 - 2	0,06	0,25	13 (100%)	0	0
Ciprofloxacin ²	13	2 - >32	>32	>32	0	0	13 (100%)
Gentamicin ²	13	2 - >128	>128	>128	1 (7,7%)	0	12 (92,3%)
Tobramycin ²	13	8 - >128	128	>128	0	0	13 (100%)
Amikacin ²	13	4 - >128	16	>128	6 (46,15%)	4 (30,76%)	3 (23,07%)
Chloramphenicol ¹	13	-	-	-	3 (23,1%)	0	10 (76,9%)
Co-trimoxazole ¹	13	-	-	-	2 (15,4%)	0	11 (84,6%)
Colistin ³	13	≤0.125 - 2	0,25	1	13 (100%)	0	0

¹чувствителността е определена чрез ДДМ, ²чувствителността е определена чрез метода на разреждане в агар, ³чувствителността е определена чрез BMD, ⁴чувствителността е определена чрез ДДМ, като интерпретацията е направена в съответствие с препоръките на производителя (Pfizer)

amikacin (46.15%), chloramphenicol (23.1%), co-trimoxazole (15.4%), cefoperazone/sulbactam (21.3%).

При един щам беше установена резистентност към карбапеними чрез ДДМ, а впоследствие, чрез фенотипни методи беше доказано вероятно наличие на карбапенемаза. МПК imipenem / меропенем бяха в границите на чувствителните - 2 µg/ml. Не беше установена резистентност colistin. (Таблица 4, Фигура 4).



Фигура 4. Антибиотична резистентност (%I+R) на изследваните щамове *E. cloacae* complex (13)

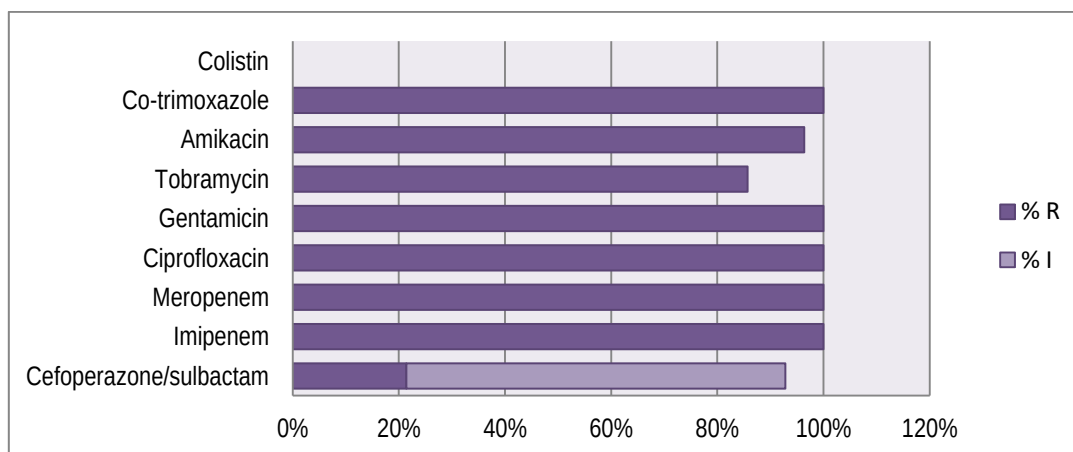
2.4. *A. baumannii* complex

Всички изследвани щамове *A. baumannii* complex са XDR, резистентни на карбапеними, хинолони. Малка част от тях притежават чувствителност към cefoperazone/sulbactam (7.2%) и някои аминогликозиди – 14.3% (tobramycin) и 3.6% - към amikacin. Не беше установена резистентност към colistin (Таблица 5, Фигура 5).

Таблица 5. Антибиотична чувствителност на включените в проучването 28 щама *A. baumannii* complex

Антибиотик	брой	Диапазон µg/ml	МПК ₅₀ µg/ml	МПК ₉₀ µg/ml	S (n, %)	I (n, %)	R (n, %)
Cefoperazone/sulbactam ⁴	28	-	-	-	2 (7.2%)	20 (71.4%)	6 (21.4%)
Imipenem ²	28	16 - 128	64	64	0	0	28 (100%)
Meropenem ²	28	16 - >256	32	256	0	0	28 (100%)
Ciprofloxacin ²	28	>32	>32	>32	0	0	28 (100%)
Gentamicin ²	28	8 - >128	>128	>128	0	0	28 (100%)
Tobramycin ²	28	1 - >128	>128	>128	4 (14.3%)	0	24 (85.7%)
Amikacin ²	28	2 - >128	>128	>128	1 (3.6%)	0	27 (96.4%)
Co-trimoxazole ¹	28	-	-	-	0	0	28 (100%)
Colistin ³	28	≤0.125 - 1	0,5	1	28 (100%)	0	0

¹чувствителността е определена чрез ДДМ, ²чувствителността е определена чрез метода на разреждане в агар, ³чувствителността е определена чрез BMD, ⁴чувствителността е определена чрез ДДМ, като интерпретацията е направена в съответствие с препоръките на производителя (Pfizer)



Фигура 5. Антибиотична резистентност (%I+R) на изследваните щамове *A. baumannii* complex (28)

2.5. *P. aeruginosa*

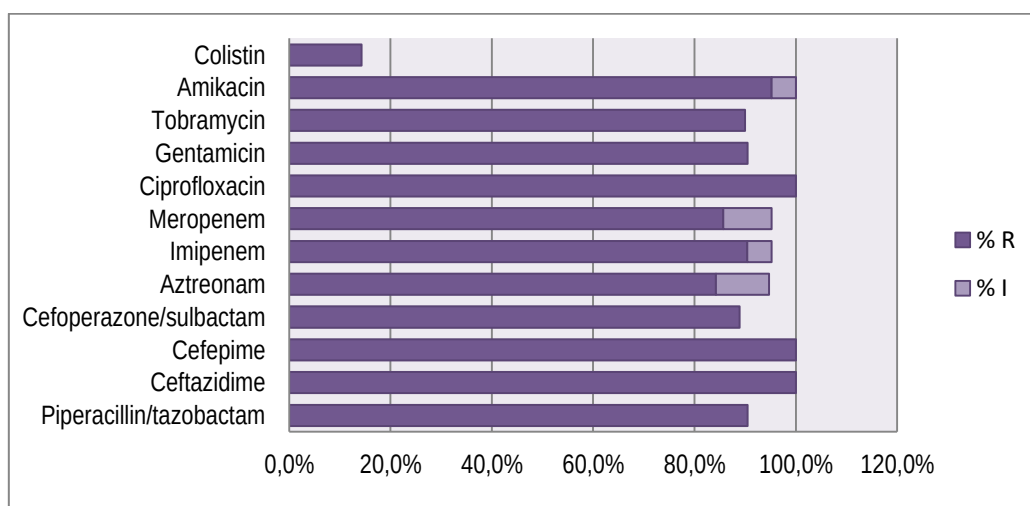
В проучването бяха включени 21 щама *P. aeruginosa*. Резултатите, получени при изследване на чувствителността им са представени в Таблица 6.

Установени бяха много високи нива на резистентност към почти всички изследвани антибиотици. Всички, включени в проучването щамове са резистентни/нечувствителни към ciprofloxacin, ceftazidime, ceferime, amikacin. Нечувствителност към карбапенеми (%I+R) бе установена при 95.2%, а към piperacillin/tazobactam при 90.5% от изолатите. Чувствителността към gentamicin и tobramycin бе ниска - съответно 9.5% и 10%. При 3 щаме (14.3%) бе установена резистентност към colistin. Сумарно, данните за антибиотичната резистентност на изследваните щамове *P. aeruginosa* е представена на Фигура 6.

Таблица 6. Антибиотична чувствителност на 21 щамове *P. aeruginosa*, включени в проучването

Антибиотик	брой	Диапазон µg/ml	МПК ₅₀ µg/ml	МПК ₉₀ µg/ml	S (n, %)	I (n, %)	R (n, %)
Piperacillin/tazobactam ¹	21	-	-	-	2 (9,5%)	0	19 (90,5%)
Ceftazidime ²	21	16 - >256	256	>256	0	0	21 (100%)
Cefepime ²	21	8 - >256	64	256	0	0	21 (100%)
Cefoperazone/sulbactam ⁴	18	-	-	-	2 (11,1%)	0	16 (88,9%)
Aztreonam ²	19	1 - >256	128	256	1 (5,3%)	2 (10,5%)	16 (84,2%)
Imipenem ²	21	2 - 256	32	256	1 (4,8%)	1 (4,8%)	19 (90,4%)
Meropenem ²	21	2 - >256	32	256	1 (4,8%)	2 (9,5%)	18 (85,7%)
Ciprofloxacin ²	21	2 - >32	32	>32	0	0	21 (100%)
Gentamicin ²	21	4 - >128	>128	>128	2 (9,5%)	0	19 (90,5%)
Tobramycin ²	20	2 - >128	>128	>128	2 (10%)	0	18 (90%)
Amikacin ²	21	16 - >128	64	>128	0	1 (4,8%)	20 (95,2%)
Colistin ³	21	0,5 - >128	1	8	18 (85,7%)	-	3 (14,3%)

¹чувствителността е определена чрез ДДМ, ²чувствителността е определена чрез метода на разреждане в агар, ³чувствителността е определена чрез BMD, ⁴чувствителността е определена чрез ДДМ, като интерпретацията е направена в съответствие с препоръките на производителя (Pfizer)



Фигура 6. Антибиотична резистентност (%I+R) на включените в проучването щамове *P. aeruginosa* (21)

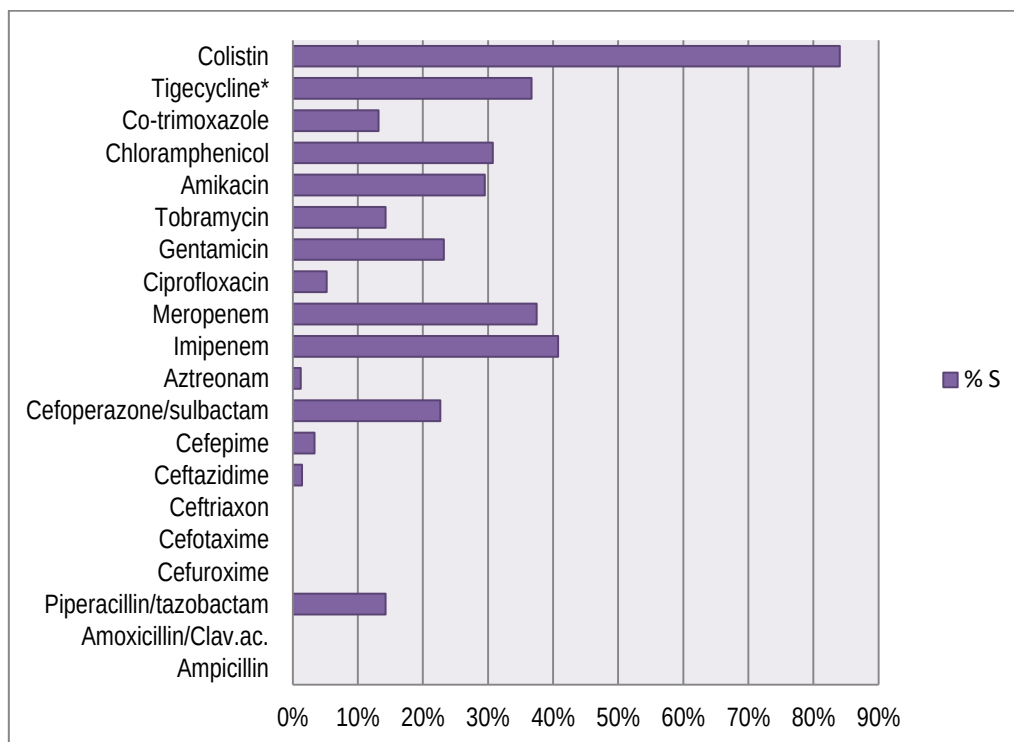
2.6. Обобщено представяне на чувствителността на всички включени в проучването щамове към изследваните антибиотици

Резултатите от антимикробната чувствителност (%S) на всички, включени в проучването щамове са представени на Фигура 7.

2.7. Обсъждане

Включените в колекцията Грам-отрицателни бактерии показаха изключително високи нива на резистентност към повечето изследвани антибиотици. Една от малкото терапевтични възможности за лечение на

инфекции, причинени от такива изолати, понастоящем, е colistin, поради което считаме, че е важно да се проучи чувствителността към този антибиотик именно при мултирезистентни щамове.



*Чувствителността към tigecycline е представителна само за включените в проучването щамове *K. pneumoniae*

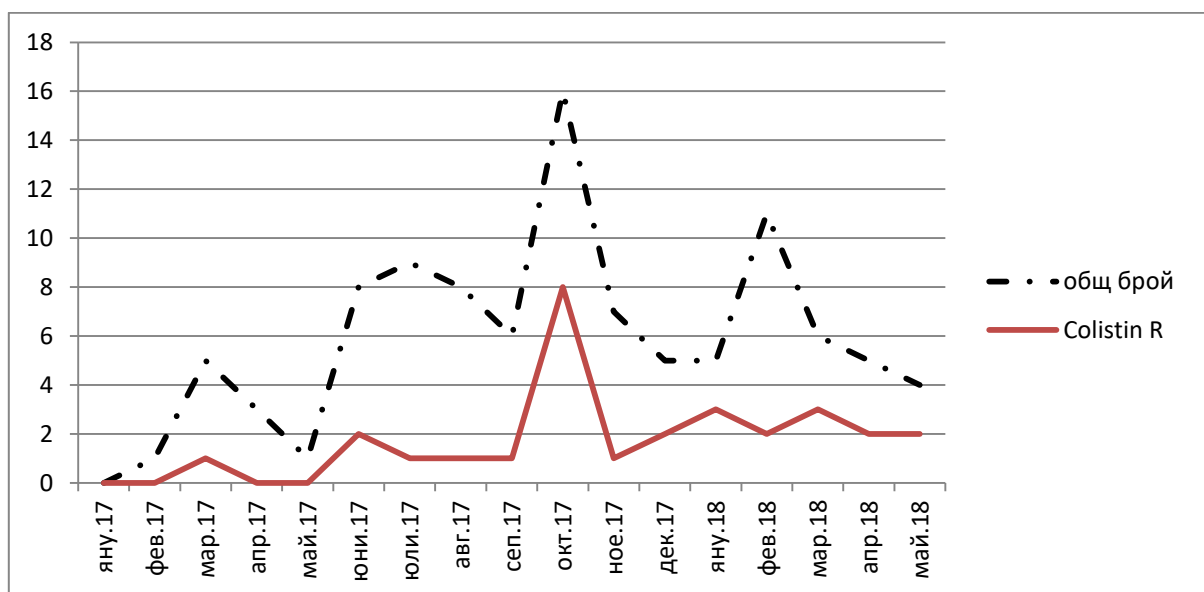
Фигура 7. Обобщение на чувствителността (%S) на включените в проучването щамове (210) към антимикробни средства.

В България, резистентността към антибиотици при *K. pneumoniae* от години е висока. По данни на годишния доклад на *EARS-Net* за 2016г., докладваните от България инвазивни изолати *K. pneumoniae* са резистентни към трето-генерационни цефалоспорици, хинолони и аминогликозиди в съответно 72.5%, 55.6% и 64.4%, а при 45.9% от щамове е налице комбинирана резистентност и към трите антибиотични класа [Surveillance report of AMR in Europe 2016]. От 2014г се наблюдава увеличение на резистентността на *K. pneumoniae* и към карбапенеми, като през 2016г. тя е била 4.4% [Surveillance report of AMR in Europe 2016]. Рязко и бързо увеличение на броя на изолираните карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* в болницата беше установено от началото на 2017г. Част от тези щамове бяха изолирани от амбулаторни пациенти и пациенти, хоспитализирани в друга болница, което показва, че проблемът вероятно е много по-широко разпространен, не само в болниците, но и в обществото.

Антибиотичната резистентност в България при *E. coli* е висока, но в много по-малка степен от тази при *K. pneumoniae*. По данни на годишния доклад на EARS-Net за България за 2016г., 42.4% от докладваните инвазивни изолати *E. coli* са резистентни на хинолони, 41.6% - на трето-генерационни цефалоспорици, 34.8% на аминогликозиди, като при 22.1% от щамове е налице комбинирана резистентност и към трите антибиотични класа. Резистентни на карбапенеми са 0.9% от изолатите [Surveillance report of AMR in Europe, 2016]. Тревога буди факта, че от началото на 2018г. (само за 4 месеца) в болницата са изолирани 6 щамове *E. coli* с намалена чувствителност/резистентност към карбапенеми, което показва, че много вероятно предстои увеличаване на резистентността и към тях. Резистентността на *A. baumannii* complex към антибиотици от години е повод за сериозни притеснения. През 2016г., 74.8% от докладваните от България инвазивни *Acinetobacter spp* са резистентни към карбапенеми, 81% към аминогликозиди, 67.9% - към хинолони, като комбинирана резистентност към трите антибиотични класа е установена при 72.4% [Surveillance report of AMR in Europe, 2016]. *P. aeruginosa* е патоген с вродена резистентност към много антибиотици, спрямо който има малко терапевтични възможности. По данни от доклада на EARS-Net за 2016г., 40% от докладваните от България инвазивни изолати *P. aeruginosa* са резистентни към piperacillin/tazobactam, 38.7% към хинолони, 38.9% към ceftazidime, 30.4% - към карбапенеми, 50.6% - към аминогликозиди, като при 35.7% от щамове е налице комбинирана резистентност [Surveillance report of AMR in Europe, 2016]. Всичко това, както и резултатите от настоящото проучване, показват наличие на тревожно високо ниво на антибиотична резистентност при ключови Грам-отрицателни патогени в България. Най-сериозен е проблемът при *K. pneumoniae*. Непрекъснато нарастващата антибиотична резистентност, особено към карбапенеми, доведе до подновяване на употребата на полимиксини в клиничната практика [Falagas et al., 2005]. Както се очакваше, резистентността към този резервен клас антибиотици също нарастна [Poirel et al., 2017]. По данни от годишния доклад на EARS-Net за 2016г., резистентни на colistin са 8.5% от изследваните щамове *K. pneumoniae*, 4% от *A. baumannii* и по-малко от 1% от *P. aeruginosa*. По-голяма част от тях са изолирани в Гърция и Италия [Surveillance report of AMR in Europe, 2016]. Въпреки, че поради относително малкия брой изследвани щамове (*K. pneumoniae* 27.6%, *A. baumannii* 51.3% и *P. aeruginosa* 51.3%), относително високия % изолати от региони с високо ниво на резистентност и значителните технически трудности при определяне на чувствителността към colistin, се препоръчва тези данни да бъдат интерпретирани внимателно, тъй като може да не са

представителни за Европа като цяло, налице е ясна тенденция за увеличаване на резистентността към colistin [Surveillance report of AMR in Europe 2016]. Това се потвърждава и от публикуваните множество съобщения за епидемични взривове от карбапенем-резистентни и colistin-резистентни щамове в Европа [Mezzatesta et al., 2011, Monaco et al., 2014, Pena et al., 2014, Giani et al., 2015, Bathoorn et al., 2016] и Северна Америка [Marchaim et al., 2010]. Рисков фактор за развитието на резистентност е употребата на colistin [Poirel et al., 2017], особено, ако е под формата на монотерапия и при субоптимално дозиране [Durante-Mangoni, 2015], което за съжаление, е обичайна практика в България.

Посредством референтния метод за BMD, установихме 33 изолата (15.94%) с резистентност към colistin - основно *K. pneumoniae* (29/104), но също и *P. aeruginosa* (3/21) и *E. coli* (1/41). Първият colistin резистентен изolat от настоящето проучване беше изолиран през месец март 2017г. По-голямата част от colistin-резистентните *K. pneumoniae* (79.31%) бяха изолирани в периода 10/2017 - 05/2018г, което съвпада и с увеличената употреба на colistin (Фигура 8).



Фигура 8. *K. pneumoniae* - графично представяне на броя на colistin-R щамове, спрямо общия брой, изолирани в периода 01/2017 - 05/2018г

Високо ниво на резистентност към colistin (63%, 24/38) при КРС-2 продуциращи *K. pneumoniae* е установено и при проучване на щамове, изолирани във Варна и Плевен в периода 2012 - 2015г [Markovska et al., 2015]. Резистентност към colistin при КРС-2 положителни *K. pneumoniae* е регистрирана и във Военно Медицинска Академия в София [Savov et al., 2017]. Тези данни, както и резултатите от нашето проучване, показват, че

резистентността към colistin при карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* в България се повишава и ако не бъдат взети мерки, тази тенденция ще продължи с бързи темпове. В настоящото проучване не бяха установени резистентни на colistin щамове *A. baumannii* complex. Това е в съответствие с резултатите, получени при изследване на 226 карбапенем-нечувствителни щамове *A. baumannii*, изолирани в 4 големи университетски болници в страната през периода 2014-2016г. [Стратева и съавт., 2017]. Резистентност към colistin при *A. baumannii* в България, обаче, е докладвана от Dobrewski и съавт. (2006) при 3 (16.7%) от изследваните от този колектив изолати [Dobrewski et al., 2006]. В настоящото проучване не бяха установени и резистентни на colistin представители на *E. cloacae* complex, вероятно поради малкия брой изолати или принадлежността им към генен клъстер с по-висока чувствителност към colistin [Guérin et al., 2016].

В заключение, бяха колекционирани 210 щамове с множествена антибиотична резистентност. Те показаха много високи нива на резистентност към почти всички изследвани антибиотици. Тревожно висока беше резистентността към карбапенеми на колекционираните щамове *K. pneumoniae* (73.8%), *A. baumannii* complex (100%), *P. aeruginosa* (95.2%), *E. coli* (14.6%). Част от тези щамове бяха изолирани от амбулаторни пациенти и пациенти, хоспитализирани в друга болница, което показва, че проблемът вероятно е много по-широко разпространен, не само в болниците, но и в обществото.

Резистентност към colistin беше установена при 29 щамове *K. pneumoniae* (27.9%), 3 щамове (14.3%) *P. aeruginosa* и един щам *E. coli* (2.4%). Нивото на резистентност към colistin е по-високо при карбапенем-нечувствителните щамове (32.9%) *K. pneumoniae* в сравнение с карбапенем-чувствителните (14.3%).

3. Оценка на различни методи за определяне чувствителността към colistin в сравнение с референтния метод за BMD

3.1. Референтен BMD метод

Определянето на МПК на colistin чрез референтния метод за BMD беше направено при всички, включени в проучването изолати (210). Феноменът на "пропуснати ямки" (skip wells, sw) беше наблюдаван често, (при около 20% от щамовете), особено при *K. pneumoniae*, което наложи многократно повторение на част от тестовете. При един щам (92K), при неколкостранно изследване бяха наблюдавани едновременно по няколко "пропуснати ямки". Съгласно инструкциите за отчитане на тестовете за BMD [стандарт ISO 20776-1] такива резултати не могат да бъдат интерпретирани, поради което този щам беше изключен от последващите анализи. Два други щамове *K.*

pneumoniae (11K и 24K), също бяха изключени от анализите, тъй като при неколкото им изследване бяха получени противоречиви резултати, с вариации на МПК и за двата щамове от 1 до 8 mg/l (като във всички случаи, МПК, получени за контролните щамове на съответните плаки бяха в допустимия диапазон). Разпределението на МПК за останалите 207 щамове е представено в таблица 7. МПК₅₀ и МПК₉₀ на изследваните щамове са съответно 0.5 mg/l и 32 mg/l.

На базата на резултатите, получени от референтния метод за BMD, 15.94% (33/207) от изследваните щамове са резистентни на colistin. Най-високи нива на резистентност се наблюдават при *K. pneumoniae* (27.9%, 29/104), следвани от *P. aeruginosa* (14.3%, 3/21) и *E. coli* (2.4%, 1/41). 86.2% (25/29) от colistin-резистентните *K. pneumoniae* са едновременно резистентни и на карбапенеми. Не бяха установени щамове, резистентни на colistin при *A. baumannii* complex и *E. cloacae* complex.

Таблица 7: Разпределение на МПК на Colistin при 207 Грам-отрицателни бактерии, получени чрез референтния метод за BMD

Микроорганизъм	Общо	МПК на Colistin (mg/l)											
		≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
<i>K. pneumoniae</i>	104	4	16	33	18	4	1	3	6	6	9	2	2
<i>E. coli</i>	41	24	6	4	6	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i> complex	13	2	6	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i> complex	28	2	4	14	8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	21	-	-	8	5	5	-	1	-	1	-	-	1
Общо	207	32	32	61	39	10	1	4	7	7	9	2	3

3.2. MIKROLATEST MIC Colistin (Erba Lachema) (MLTCol)

В анализите бяха включени резултатите, получени за 207 щамове, изследвани чрез двата теста за BMD. Essential agreement (EA) между резултатите от референтния BMD метод и търговския кит на ErbaLachema беше изчислено на базата на 154 резултата с референтни МПК на colistin в диапазона 0.25 - 16 mg/l (поради различия в обхвата на изследваните концентрации при двата теста). EA беше установено в 90.91% от случаите (140/154). Categorical agreement (CA) бе наблюдавано в 98.55% (204/207), Major discrepancies (MD, големи несъответствия) - 3 (1.7%, 3/174), като не бяха установени Very major discrepancies (VMD, много големи несъответствия). Корелационният коефициент на Spearman за резултатите от двата теста $\rho=0.553$, $p<0.01$ (Фигура 9).

3.3. Метод на разреждане в агар

МПК на 156 щамове бяха определени и чрез метода на разреждане в агар. EA между МПК, определени чрез референтния BMD метод и метода на разреждане в агар беше изчислен на базата на 129 резултата с референтни

МПК на colistin в диапазона 0.25 - >128 mg/l (поради различия в обхвата на изследваните концентрации при двата теста).

		МПК Референтен BMD (mg/l)											
		≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
МПК MLTCol (mg/l)	≤0.25	8											
	0.5	16	25	27	13								
	1	6	4	29	16	4							
	2	2	3	5	8	5							
	4				2	1		2					
	8						1	1	4		1		
	16							1	1	1	1		
	>16								2	6	7	2	3

Броят на щамове с МПК, съответстваща точно на референтните е маркиран в тъмно сиво, докато броя на щамове с МПК с ЕА от +/- 1 двукратно серийно разреждане - в светло сиво. Големите несъответствия са обозначени с кръг. Дебелите линии маркират граничните стойности за colistin по EUCAST (чувствителен ≤ 2 mg/l и резистентен >2 mg/l)

Фигура 9: Корелация между МПК, определена чрез MLTCol и референтният BMD

ЕА беше установено в 84.50% от случаите (109/129). СА бе наблюдавано в 96.79% (151/156), MD (големи несъответствия) - 1 (0.72%, 1/138), а VMD (много големи несъответствия) - 4 (22.22%, 4/18). Корелационният коефициент на Spearman за резултатите от двата теста $\rho=0,590$, $p<0.01$ (Фигура 10).

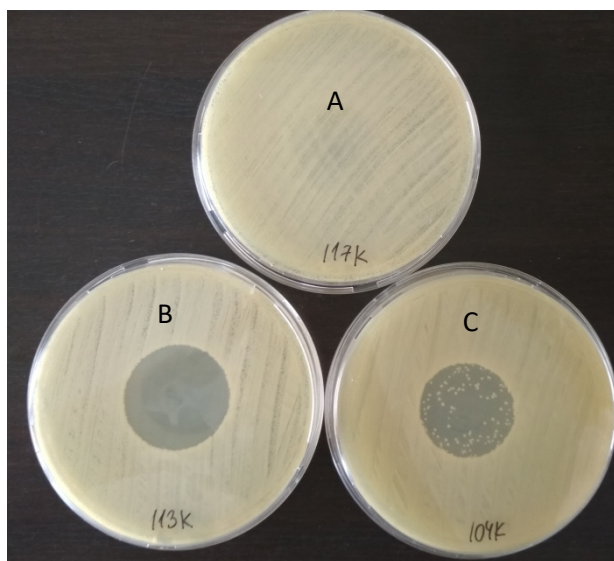
		МПК Референтен BMD											
		≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
МПК ADM Col	≤0.25	13		1	1								
	0.25		1										
	0.5	13	17	31	13	3			1				
	1	1	3	12	13	1		1			1		
	2			5	5	4		1					
	4												
	8							1	1				
	16				1					1			
	32								1				
МПК ADM Col	64										2		
	128									2	3		
	>128												3

Броят на щамове с МПК, съответстващи точно на референтните е маркиран в тъмно сиво, докато броя на щамове с МПК с ЕА от +/- 1 двукратно серийно разреждане - в светло сиво. Големите несъответствия са обозначени с кръг, а много големите несъответствия с триъгълник. Дебелите линии маркират граничните стойности за colistin по EUCAST (чувствителен ≤ 2 mg/l и резистентен >2 mg/l)

Фигура 10: Корелация между МПК, определена чрез ADM Col и референтния BMD

3.4. Определяне на чувствителността към colistin чрез метода на пре-дифузия (Rosco-Diagnostica A/S)

С теста за пре-дифузия на Rosco Diagnostica A/S бяха изследвани общо 210 щамове. В хода на изследванията бяха наблюдавани 3 типа резултати - липса на зона на инхибиране (А), голяма, добре очертана зона на инхибиране (В) и голяма зона на инхибиране с различен брой колонии в нея (С) (Фигура 11). В инструкцията за употреба, производителят не упоменава точно как би трябвало да се интерпретират резултатите от тип С. Колонии от вътрешността на зоните на инхибиране бяха субкултивирани и МПК на тези субпопулации бяха определени чрез референтния метод за BMD - във всички случаи те бяха в диапазона от 8 до 128 mg/l. За по-добро разграничаване, щамове, при които беше наблюдаван резултат от тип С ще бъдат обозначавани в анализите и дискусията като хетерорезистентни. И при трите щамове (11K, 24K и 92K), изключени от анализите, поради наличие на няколко пропуснати ямки или противоречиви резултати при многократни изследвания с референтния метод за BMD беше наблюдаван този феномен, поради което считаме, че те са хетерорезистентни. По отношение на останалите 207 щамове, СА беше наблюдавано 95.17% от изследваните щамове (197/207). Резултат от хетерорезистентен тип С бе наблюдаван при 19 щамове *K. pneumoniae*. 52.63% от тях (10/19) се определят като резистентни чрез референтния BMD метод, докато другите 9 - като чувствителни (голямо несъответствие). Един щам *P. aeruginosa* с МПК 8 mg/l бе определен от теста с пре-дифузия като чувствителен (зона на инхибиране 21mm), което беше категоризирано като VMD (много голямо несъответствие) $\rho = -0.427$, $p < 0.01$. (Таблица 8).



Фигура 11: Представя различните типове растеж, наблюдавани при извършване на теста с пре-дифузия на Rosco Diagnostica:

А - липсва зона на инхибиране, обикновено при щамове с високо ниво на резистентност,

В - голяма, добре очертана зона на инхибиране (най-често с диаметър 25 - 32 mm) при colistin чувствителни щамове,

С - голяма зона на инхибиране с различен брой колонии в нея. Подобни щамове ще бъдат обозначавани като хетерорезистентни (hR)

Таблица 8. Сравнение на резултатите, получени от референтния метод за BMD и теста с пре-дифузия на Rosco-diagnostica A/S при 207 щама Грам (-) бактерии

Микроорганизъм	Брой щамове	Референтен МПК BMD	Тест с пре-дифузия на Rosco Diagnostica		
		категория	S	hR*	R
<i>K. pneumoniae</i>	104	S (n=75)	66	9 (MD)	-
		R (n=29)	-	10	19
<i>E. coli</i>	41	S (n=40)	40	-	-
		R (n=1)	-	-	1
<i>E. cloacae</i> complex	13	S (n=13)	13	-	-
		R (n=0)	-	-	-
<i>A. baumannii</i> complex	28	S (n=28)	28	-	-
		R (n=0)	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	21	S (n=18)	18	-	-
		R (n=3)	1 (VMD)	-	2

* hR= хетерорезистентни = щамове, при които е наблюдавана голяма зона на инхибиране с различен брой колонии в нея.
MD = голямо несъответствие, VMD = много голямо несъответствие; несъответствията са маркирани в сиво.

3.5. Обсъждане

Въпреки, че полимиксините са открити преди повече от 60 години, все още не е установен оптималния метод за определяне на чувствителността към тях (Poirel et al., 2017).

В настоящото проучване, определянето на чувствителността към colistin и чрез двата варианта на BMD беше придружено от сериозни затруднения, особено по отношение на *K. pneumoniae*. Феноменът на пропуснати ямки беше наблюдаван доста често, което наложи многократно изследване на част от щамове. Съществени различия в МПК, определени чрез BMD (със смяна на интерпретацията от чувствителен към резистентен), поради което два щама бяха изключени от финалните анализи в настоящото проучване, е наблюдавано и в проучване на Turlej-Rogacka et al. (2017) при многократно изследване на два colistin чувствителни щама *K. pneumoniae* [Turlej-Rogacka et al., 2017].

Резултатите, получени от MIKROLATEST MIC Colistin (Erba Lachema) показаха добра корелация с референтния BMD метод и съответстват на критериите на ISO 20776-2 за акуратност на тестовете за изследване на чувствителност (EA и CA $\geq 90\%$, като MD и VMD $\leq 3\%$)(ISO 20776-2). Тези резултати са сходни с получените в други проучвания по отношение на други търговски китове за определяне на чувствителността към colistin чрез BMD (Таблица 9), поради което считаме, че теста може да се използва надеждно в рутинната диагностична работа.

Методът на разреждане в агар показва по-слаба корелация с референтния метод по отношение на определяне на чувствителността към colistin в сравнение с търговския кит на Erba Lachema. EA бе установено при 84.5% от

изследваните щамове, СА в 96.79%, с 4 много големи несъответствия и 1 голямо несъответствие. Независимо, че други проучвания установяват по-добра корелация между методите на разреждане в агар и микроразреждане в бульон [Lo-Ten-Foe et al., 2007; Behera et al., 2009], установените от нас резултати, както и голямата трудоемкост на метода ни карат да считаме, че не е подходящ за определяне на чувствителността към colistin в ежедневната диагностична практика.

Таблица 9. Сравнение на резултатите, получени при оценка на търговски тестове за определяне на чувствителността към colistin чрез BMD

Тест	Брой щамове	Col S	Col R	EA	CA	VME	ME	Reference
SENSITITRE Custom plate ¹	185	52	133	-	97.80%	3%	0%	Jayol 2018
	75	39	36	96%	95%	0*	4*	Matuschek, 2017
	76	51	25	89.50%	90.10%	6 (11.8%)	1 (4%)	Chew 2016
SENSITITRE RUO plate ¹	106 CRKpn	78	28	94.30%		14.30%		Richter 2017
MICRONAUT-S ²	75	39	36	96%	89%	2*	6*	Matuschek, 2017
MICRONAUT-MIC Strip ²	75	39	36	99%	91%	2*	5*	Matuschek, 2017
SENSITEST ³	75	39	36	88%	89%	1*	7*	Matuschek, 2017
	353	216	137	96%	98.90%	1.46%	0.92%	Carretto, 2018
MICROSCAN ⁴	76	51	25	ND	88.20%	1 (4%)	8 (15.8%)	Chew 2016
	185	52	133	ND	91.90%	11.30%	0	Jayol 2018
UMIC ⁵	75	39	36	82%	92%	3*	3*	Matuschek, 2017
MIKROLATEST MIC Colistin ⁶	207	174	33	90.91%	98.6%	0	1.7%	настоящо проучване

* VME и ME докладвани като брой, а не като %;

Производители: ¹ThermoFisher Diagnostics; ²Merlin Diagnostica; ³Liofilchem; ⁴Beckman Coulter; ⁵Biocentric; ⁶Erba Lachema

Китът за откриване на резистентност към colistin при *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp* с пре-дифузия на ROSCO DIAGNOSTICA A/S, освен от производителя, е оценен само в няколко проучвания. Първоначалната пре-дифузия дава възможност за хомогенна дифузия на високо-молекулните антибиотици в средата, в резултат на което става възможно разграничаването на щамове с намалена чувствителност към тези агенти [Silveira et al 2014]. Boyen et al., (2010), при изследване на 157 щама *E. coli*, изолирани от свине, установяват добра корелация с СА от 95.5% между пре-дифузионния метод и метода на разреждане в агар. В друго проучване, обаче, при изследване на 75 щама *A. baumannii* не се установява корелация между пре-дифузионния метод и BMD [Herrera et al., 2011]. В настоящото проучване бе установено СА от 95.17% между теста с пре-дифузия на ROSCO Diagnostica A/S и референтния BMD. Несъответствия между двата метода

бяха установени при един щам *P. aeruginosa* с МПК=8 mg/l, определен погрешно като чувствителен и при девет хетерорезистентни щама *K. pneumoniae*. По-високите МПК на колонииите от зоните на инхибиране потвърждават хетерорезистентността на щамовете. Резултатите, получени от нас показват, че теста с пре-дифузия открива по-добре някои от хетерорезистентните на colistin щамове определени чрез BMD като чувствителни. Неудобство на тест-протокола е необходимостта от продължителна пре-дифузия (около 20 часа), което води до забавяне на крайния резултат [Boyen et al., 2010].

3.6. Проучване на ефективността на Rapid Polymyxin NP като бърз скрининг тест за откриване на резистентност към colistin

RPNP тестът (Фигура 12) беше оценен при изследване на 158 щама от сем. *Enterobacteriaceae* - *K. pneumoniae* (n=104), *E. coli* (n=41) *E. cloacae complex* (n=13). 30 от тях бяха резистентни на colistin, на базата на резултатите, получени от референтния метод за BMD.



Фигура 12. Rapid Polymyxin NP

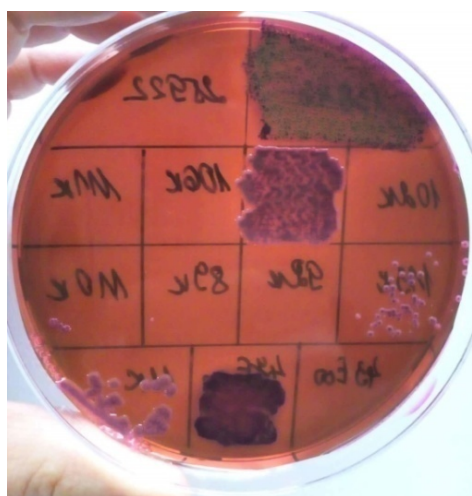
RPNP теста беше положителен при 28 от тях (27 щама *K. pneumoniae* и един *E. coli*). В повечето случаи - 85.71% (24/28) положителния резултат беше наблюдаван след 2 часа инкубиране. При четири щама *K. pneumoniae* (два от тях с МПК от 8 mg/l, а другите два - с 16 mg/l), положителен резултат бе наблюдаван след 4 часа инкубиране. В сравнение с референтния метод за BMD, специфичността и чувствителността на RPNP в настоящето проучване са съответно 100% и 94%.

RPNP тест е нов тест за бърза детекция на резистентност към colistin/polymyxin B, който може да се извършва директно от хемокултури [Jayol et al., 2016]. Това е изключително важно в ежедневната диагностична работа, при която от лабораториите се очаква да дават не само бързи, но и надеждни резултати. Според авторския колектив, разработил метода, в сравнение BMD, чувствителността и специфичността на Rapid Polymyxin NP теста са съответно 99.3% и 95.4% [Nordaman et al., 2016b]. В настоящето проучване, не бяха установени фалшиво положителни резултати (специфичност 100%) и при щамове с високи МПК, тестът беше положителен

рамките на 2 часа. Такава висока специфичност е установена също и в други проучвания [Simar et al., 2017, Poirel et al., 2018]. Чувствителността, обаче, показва много значими вариации - от 99.3% - 100% [Nordmann et al., 2016, Poirel et al., 2018] до 25% [Simar et al., 2017]. Фалшиво негативен резултат в настоящето проучване беше наблюдаван при част от хетерорезистентните изолати, предимно с ниски МПК на colistin. Други автори също подчертават възможни проблеми при откриване на такъв тип щамове чрез RPNP [Nordmann et al., 2016b; Jayol et al., 2016]. Въпреки това, тестът може да бъде много полезен в рутинната диагностична работа - положителния резултат е доказателство за резистентност към полимиксини, но негативен резултат е препоръчително да бъде потвърден с BMD (самостоятелно или в комбинация с други методи).

3.7. Проучване на ефективността на Superpolymyxin Medium (Nordaman et al., 2016b) като скрийн агар за резистентност към colistin (SA Col)

При оценка на ефективността на Superpolymyxin Medium като SA Col (Фигура 13) бяха анализирани резултатите, получени при изследване на 207 щамове - 174 от тях, colistin - чувствителни и 33 - colistin - резистентни, на базата на референтния метод за определяне на чувствителността към colistin.



Фигура 13: Superpolymyxin Medium, използвана като SA Col

На всяка петра като контролни щамове са използвани *E. coli* ATCC 25922 (col-S) и *E. coli* NCTC 13846 (col-R). Резултатите на изследваните щамове се приемат за валидни, само ако контролните щамове дават очаквания резултат - липса на растеж за *E. coli* ATCC 25922 и конфлуентен растеж за *E. coli* NCTC 13846. Тестът се приема за положителен при наличие на растеж (конфлуентен или изолирани колонии) в инокулираната зона.

Съвпадение в резултатите беше установено в 92.75% (192/207). Тестът беше положителен при всички colistin-резистентни щамове (или под формата на конфлуентен растеж или като изолирани колонии). При 15 от colistin-чувствителните по референтния BMD метод щамове *K. pneumoniae* тестът бе положителен, под формата на растеж на различен брой колонии върху скрийн агара (Таблица 10). Колониите бяха субкултивирани на агар на McConkey. МПК на colistin на тези субпопулации бяха определени чрез референтния метод за BMD, при което се установи, че варират от 4 до 128

mg/l, поради което считаме, че тези щамове са хетерорезистентни на colistin (Таблица 10). При трите щама *K. pneumoniae* (11K, 24K и 92K), изключени от анализите за оценка на методите за определяне на чувствителността към colistin, бе установен растеж под формата на единични колонии върху SPM, което потвърждава установената при тях (с теста на Rosco diagnostica) хетерорезистентност (Таблица 10).

Таблица 10. Щамове с противоречиви резултати, получени от различните методи за установяване на резистентност към colistin

Щам	REF МПК mg/l	МПК MLTCol mg/l	Резултат от теста с пре- дифузия (Rosco diagnostica A/S)	МПК на субпопулациите, изолирани от зоните на инхибиране (mg/l)	RPNP	SA Col Наблюдаван растеж	МПК на субпопулациите, изолирани от SA Col (mg/l)
11K*	1 - 8	1 - 4	hR	8	(-)	20 колонии	8
12K	1	1	hR	32	(-)	13 колонии	32
15K	0.5	0.5	S	-	(-)	15 колонии	32
19K	1	2	hR	128	(-)	1 колония	128
20K	0.5	1	hR	8	(-)	3 колонии	8
24K*	1 - 8	1 - 16	hR	8	(-)	20 колонии	32
25K	0.5	1	hR	128	(-)	30 колонии	128
30K	0.5	1	S	-	(-)	3 колонии	32
45K	0.25	1	S	-	(-)	7 колонии	4
47K	≤ 0.125	≤ 0.25	S	-	(-)	5 колонии	64
51K	1	1	hR	64	(-)	1 колония	128
53K	1	0.5	S	-	(-)	3 колонии	16
74K	0.5	1	hR	32	(-)	1 колония	64
86K	0.25	0.5	hR	8	(-)	5 колонии	4
92K*	msw	msw	hR	16	(+)	3 колонии	16
97K	0.25	1	S	-	(-)	1 колония	128
101K	0.25	2	hR	64	(-)	20 колонии	64
110K	1	2	hR	8	(-)	3 колонии	msw

RPNP - Rapid Polymyxin NP test, SA Col - the Superpolymyxin medium, използвана като скрийн агар, hR - хетерорезистентни (голяма зона на инхибиране с различен брой колонии в нея), msw = multiple skip wells (наличие едновременно на няколко пропуснати ямки), * щамът е изключен от анализите при сравнение на изпитваните методи, поради получени противоречиви резултати при многократно изследване с референтния метод (11K и 24K) или поради получаване на резултати, които не могат да се интерпретират (92K).

3.8. Обсъждане

Superpolymyxin medium е среда, създадена с цел скрининг за полимиксин-резистентни Грам-отрицателни бактерии във фецес [Nordmann et al., 2016a]. Специфичността и чувствителността ѝ са 100% [Nordmann et al., 2016a].

В настоящото проучване, посредством тази среда бяха открити 15 хетерорезистентни щама *K. pneumoniae*, определени като чувствителни чрез BMD и RPNP, а шест от тях - и от теста с пре-дифузия на Rosco Diagnostica

A/S. Ако към броя на щамове, резистентни на colistin, определени чрез референтния BMD метод се добавят и установените чрез SA Col хетерорезистентни щамове, резистентността при *K. pneumoniae* ще се повиши от 27.9% на 42.3%.

Въпреки, че хетерорезистентност към полимиксини е докладвана също и при *A. baumannii* (Li et al., 2006, Moffat et al., 2010, Barin et al., 2013) и *Enterobacter spp* (Landman et al., 2013), в настоящето проучване не бяха установени хетерорезистентни изолати от посочените видове, вероятно поради малкия брой изследвани щамове.

Беше установено, че някои colistin хетерорезистентни щамове могат да не бъдат открити чрез използване само на препоръчвания BMD метод [Meletis et al., 2011; Landman et al., 2013; Jayol et al., 2015, Band et al., 2018]. В настоящето проучване, агар-базираните методи (теста с пре-дифузия на Rosco Diagnostica и Superpolimyxin Medium, използвана като screen agar colistin) откриха хетерорезистентни субпопулации в щамове, определени като чувствителни чрез BMD. Доколкото ни е известно, за първи път в България се докладват хетерорезистентни изолати *K. pneumoniae*. С цел подобряване на откриването на хетерорезистентни щамове в ежедневната диагностична работа, считаме, че би било от полза да се използват комбинация от тестове - например BMD и Suprepolymyxin medium като скрийн-агар за резистентност към colistin. Въпреки, че клиничното значение на хетерорезистентността е все още неясно, тя вероятно играе роля в развитието на резистентността [Meletis et al., 2011, El-Halfawy & Valvano, 2015] и в случаите, в които остане неразпозната може да доведе до терапевтичен провал, което е демонстрирано в експериментални условия чрез инфекция при мишки от Band и съавт.(2018) [Band et al., 2018]. За съжаление, липсват общоприети препоръки относно дефиницията и методите за откриване на хетерорезистентност [El-Halfawy & Valvano, 2015]. Най-широко използвания понастоящем метод - population analysis profile (анализ на популационния профил) е трудоемък, за извършването му са необходими няколко дни и на практика много трудно може да бъде внедрен от диагностичните микробиологични лаборатории [Band et al., 2018]. Установеното от нас за пореден път подчертава спешната нужда от прецизни, точни и лесни за изпълнение методи (или комбинация от методи) за откриване не само на резистентност към colistin, но също и на хетерорезистентност към този антибиотик, които да могат да бъдат използвани в ежедневната диагностична работа.

Резултатите, получени от MIKROLATEST MIC Colistin (*Erba Lachema*) показваха добра корелация (CA 98.55%) с референтния BMD метод, поради което считаме, че теста може да се използва надеждно в рутинната

диагностична работа. Методът на разреждане в агар показва по-слаба корелация с референтния метод и не е подходящ за определяне на чувствителността към colistin в ежедневната диагностична практика. Тестът с пре-дифузия на ROSCO Diagnostica A/S показва СА 95.17% с референтния метод, сходно с посоченото от производителя (96,8%), но установихме, че открива по-добре някои от хетерорезистентните на colistin щамове, определени чрез BMD като чувствителни. Неудобство на тест-протокола е необходимостта от продължителна пре-дифузия (около 20 часа), което води до забавяне на крайния резултат.

В настоящото проучване, при сравнение с референтния метод, специфичността на RPNP беше 100%, чувствителността 94%, но тестът беше фалшиво негативен при част от хетерорезистентните изолати с ниски МПК. Въпреки това, считаме, че RPNP може да бъде много полезен в рутинната диагностична работа - положителния резултат (получен в рамките на 2h) е доказателство за резистентност към полимиксини, но отрицателния е препоръчително да бъде потвърден с BMD (самостоятелно или в комбинация с други методи). Посредством Superpolymyxin medium, използвана като Screen agar colistin, бяха открити допълнително 15 хетерорезистентни щамове *K. pneumoniae*, определени като чувствителни чрез BMD и RPNP, а шест от тях - и от теста с пре-дифузия на Rosco Diagnostica A/S. Това са и първите докладвани в България хетерорезистентни щамове *K. pneumoniae*. Установихме, че някои colistin хетерорезистентни щамове могат да не бъдат открити чрез използване само на препоръчвания понастоящем BMD метод.

В заключение, резултатите получени чрез MIKROLATEST MIC Colistin (*Erba Lachema*) показаха добра корелация с референтния BMD метод, за разлика от разреждането в агар. Специфичността на RPNP в настоящото проучване беше 100%, чувствителността 94%, но тестът бе фалшиво негативен при част от хетерорезистентните изолати с ниски МПК. Агар-базираните методи (теста с пре-дифузия на Rosco Diagnostica и Superpolymyxin Medium, използвана като screen agar colistin) откриват по-добре хетерорезистентни субпопулации. За по-точно определяне на чувствителността към colistin би било по-добре да се използват комбинация от тестове - например BMD и Suprepolymyxin medium като скрийн-агар за резистентност към colistin.

4. Определяне на мутант-превантивната концентрация (Mutant prevention concentration, MPC) на colistin при представителна част от изследваните щамове и изследване на влиянието на други антибиотици върху нея.

Класическите *in vitro* тестове за изследване на чувствителността към антимикробни средства се базират на определяне на МПК чрез използване на стандартизиран бактериален инокулум от $\sim 10^5$ CFU/ml [Blondeau, 2009]. При някои инфекции, обаче, много пациенти могат да бъдат инфектирани със значително по-голям брой микроорганизми ($\geq 10^9$ CFU/ml), отколкото инокулума, който се използва при класическите *in vitro* тестове, което от своя страна поставя въпроса за необходимостта от изследване на чувствителността и с по-големи микробни инокулуми [Blondeau, 2009]. Определянето на мутант превантивната концентрация (MPC) е сравнително нов метод за изследване на антимикробната чувствителност, предложен от Dong et al., (1999), при който се взема под внимание възможността за наличие на резистентни към даден антибиотик мутанти в бактериални популации с висока численост [Dong et al., 1999a]. Според Blondeau (2009), цел на определянето на MPC е да се установи антибиотичната концентрация, необходима за предотвратяване на развитието на всички едно-стъпални мутанти в чувствителна популация от $> 10^{10}$ клетки. [Blondeau, 2009]. Измерванията на MPC са приложими само за микроорганизми, при които чрез класическите методи за определяне на чувствителността е установено, че са чувствителни към изследвания антибиотик [Blondeau, 2009].

Мутант-превантивните концентрации (MPC) на colistin в настоящото проучване бяха определени при 40 щамове - *K. pneumoniae* (18), *E. coli* (6), *E. cloacae* complex (6), *A. baumannii* complex (5) и *P. aeruginosa* (5) (Таблица 11). Установените MPC при всички изследвани видове значително надвишават МПК, като особено високи са те по отношение на *K. pneumoniae* - MPC₅₀ е 128 mg/l, а MPC₉₀ е > 128 mg/l. Подобни високи MPC на colistin спрямо *K. pneumoniae* са установени и в други проучвания [Poudyal et al., 2008, Choi et al., 2014]. MPC на colistin за *A. baumannii* complex и *P. aeruginosa* в настоящото проучване са по-ниски, в сравнение с установените от други автори [Cai et al., 2010, Choi et al., 2014], вероятно, поради малкия брой изследвани щамове.

В настоящото проучване, MPC на colistin при *E. coli* и *E. cloacae* complex са в диапазона, съответно 8 - 16 mg/l и 8 - 64 mg/l. Не бяха открити други проучвания върху MPC на colistin при *E. coli* и *E. cloacae* complex.

Установените високи MPC и съотношения MPC/МПК при всички изследвани видове показват голяма ширина на МСП (мутант-селекциониращ прозорец), особено при *K. pneumoniae*, което крие голям риск от селектиране на полимиксин-резистентни, едно-стъпални мутанти при монотерапия с colistin [Cai et al., 2010, Choi et al., 2014], дори и при използване на препоръчаните понастоящем дозови режими [Nation et al., 2017].

Според *Drlica* и *Zhao* (2007), съществуват 2 стратегии за стесняване на МСП [*Drlica and Zhao, 2007*]. Първата цели минимализиране на времето, през което серумните антибиотични концентрации са в МСП чрез използване на по-високи дози и/или подходящи модификации в дозовите режими [*Drlica and Zhao, 2007*]. Установените в настоящото проучване MPC на colistin надвишават значително постижимите серумни / тъканни концентрации [*Nation et al., 2017*], а също и токсичните [*Falagas & Kasiakou, 2006, Sorli et al., 2013*], поради което тази стратегия е неприложима [*Drlica and Zhao, 2007*]. В подобни случаи, *Drlica* и *Zhao* (2007) препоръчват да се използва друг подход, чрез който се цели стесняване на МСП посредством комбинация от антибиотици [*Drlica and Zhao, 2007*]. Двойната антибиотична комбинация дава възможност за стесняване / затваряне на МСП чрез използване на умерени антибиотични концентрации, дори ако двата антибиотика поотделно имат много високи MPC [*Drlica and Zhao, 2007*].

Таблица 11. MPC на colistin спрямо 40 Грам (-) бактерии

Микроорганизъм	Брой	МПК mg/l			MPC mg/l			Съотношение
		диапазон	МПК ₅₀	МПК ₉₀	диапазон	MPC ₅₀	MPC ₉₀	
<i>K. pneumoniae</i>	18	≤0,125 - 2	0,5	1	32 - >128	128	>128	64 - ≥ 512
<i>E. coli</i>	6	≤0,125 - 1	≤0,125	1	8 - 16	8	16	16 - ≥ 128
<i>E. cloacae</i> complex	6	≤0,125 - 2	0,25	2	8 - 64	16	64	8 - 256
<i>A.baumannii</i> complex	5	0,25 - 1	0,5	1	4 - 16	8	16	8 - 32
<i>P. aeruginosa</i>	5	0,5 - 2	1	2	8 - 16	16	16	8 - 32

МПК - минимална инхибираща концентрация, MPC - мутант превантивна концентрация

Съотношение MPC/МПК - дава информация за размера на мутант-селекционирания прозорец

При 18 щама *K. pneumoniae* беше проучено влиянието на rifampicin и меропенем върху мутант превантивната концентрация на colistin. Бяха използвани фиксирани концентрации на rifampicin и меропенем от съответно 1,7 mg/l и 6,8 mg/l. Концентрациите бяха подбрани така, че да съответстват на средните, свободни, несвързани с плазмените протеини концентрации на тези антибиотици в плазмата при стабилно състояние (steady-state) [*Lagerbäck et al., 2016*].

В присъствие на rifampicin, MPC на colistin се понижиха значително при 94.44% от изследваните щамове, като MPC₅₀ (128 mg/l) и MPC₉₀ (>128 mg/l) достигнаха, съответно 4 и 16 mg/l (Таблица 12). При 1 щам (95K) не бе установена промяна в MPC на colistin. Добавянето на меропенем предизвиква минимално понижение на MPC на colistin при част от изследваните щамове (до 32 mg/l), като MPC₅₀ и MPC₉₀ запазиха стойностите от съответно 128 и >128 mg/l (Таблица 12). При 3 щама (16K, 18K и 29K), чувствителни на

meropenem, не бе установен растеж, дори и при концентрация на colistin от 0.125 mg/l. Инхибирането в тези случаи, обаче, най-вероятно се дължи на самостоятелното действие на meropenem, а не на понижението на MPC на colistin под влияние на комбинацията.

Таблица 12. Влияние на Rifampicin и Meropenem върху MPC на colistin при 18 щамове *K. pneumoniae*

	МПК Mem, mg/l	МПК Col, mg/l	МРС Col, mg/l	МРС/МПК Col	МРС Col в присъствие на Rif*, mg/l	МРС Col в присъствие на Rif* / МПК Col	МРС Col в присъствие на Mem**, mg/l	МРС Col в присъствие на Mem** / МПК Col
3K	16	2	>128	>64	8	4	128	64
4K	8	1	>128	>128	4	4	128	128
5K	8	1	128	128	2	2	128	128
10K	32	0.25	64	256	2	8	32	128
16K	0.06	≤ 0.125	64	≥512	4	≥32	≤ 0.125***	***
18K	0.06	0.5	128	256	4	8	≤ 0.125***	***
21K	8	1	128	128	4	4	128	128
29K	0.06	1	128	128	4	4	≤ 0.125***	***
50K	8	0.5	>128	>256	16	32	32	64
66K	16	1	>128	>128	4	4	>128	>128
81K	16	0.5	>128	>256	4	8	>128	>256
84K	64	0.5	32	64	4	8	32	64
95K	16	0.5	128	256	128	256	128	256
97K	16	0.25	128	512	4	16	128	512
99K	128	0.5	32	64	2	4	32	64
103K	64	1	64	64	4	4	64	64
114K	64	0.5	>128	>256	2	4	>128	>256
119K	64	0.25	128	512	4	16	128	512

* Концентрацията на Rifampicin е фиксирана на 1.7 mg/l; **Концентрацията на Meropenem е фиксирана на 6.8 mg/l; *** Понижението на MPC в този случай се дължи на действието на Meropenem самостоятелно

Съществуват малко проучвания, които изследват влиянието на различни антибиотици върху MPC на colistin. *Choi et al.* (2014b) проучват влиянието на ciprofloxacin (0.5 и 2 mg/l), imipenem (1 и 16 mg/l), tetracycline (1 mg/l) и rifampicin (4 mg/l) върху MPC (colistin) при *K. pneumoniae* (5 щамове), *A. baumannii* (5 щамове) и *P. aeruginosa* (5 щамове). Комбинираното приложение на colistin и ciprofloxacin предизвиква понижението на MPC на colistin само при ciprofloxacin-чувствителни изолати, но не и при ciprofloxacin-резистентни, независимо от нивото им на резистентност към този антибиотик [*Choi et al.*, 2014b]. Според *Choi et al.* (2014), комбинацията от colistin и imipenem може да намали риска от появата на резистентност към imipenem и colistin само при imipenem-чувствителни щамове. Подобен ефект беше наблюдаван и в нашето проучване при изследване на ефекта на meropenem върху MPC на colistin. Драматично намаление на MPC на colistin беше установено само при три

меропенем-чувствителни щамове *K. pneumoniae*, докато в останалите случаи не бе регистрирана промяна или бе наблюдавано само минимално понижаване на MPC (Таблица 12). В тези случаи, обаче, считаме, че причина за наблюдаваното понижаване на MPC е самостоятелното действие на меропенем. Комбинираното приложение на colistin и tetracycline (1mg/l) не води до понижаване на MPC на colistin, поради което Choi et al., (2014b) считат, че тази комбинация не е в състояние да предотврати появата на едно-стъпални colistin-резистентни мутанти [Choi et al., 2014b]. Добавянето на rifampicin (4 mg/l) предизвиква понижаване на MPC на colistin при всички (с изключение на един) изследвани от Choi et al. щамове *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [Choi et al., 2014b]. Понижаването на MPC е най-изразено при *A.baumannii* (от 128 (>128) mg/l до 16-32 mg/l) и в по-малка степен при *K. pneumoniae* (от > 128 mg/l до 32-64 mg/l) и *P. aeruginosa* (от 64-128 mg/l до 32-64 mg/l) [Choi et al., 2014b]. В нашето проучване, понижаване на MPC на colistin в присъствие на rifampicin бе наблюдавано при 17 от изследваните 18 щамове (94.44%) *K. pneumoniae*, като то бе значително понижаване, отколкото установеното от Choi et al. - MPC₅₀ (128 mg/l) и MPC₉₀ (>128 mg/l) се понижиха до съответно 4 и 16 mg/l. Този ефект бе наблюдаван и при по-ниска концентрация на rifampicin (1,7 mg/l).

Следователно, комбинирано приложение на colistin и rifampicin би могло да допринесе за намаляване на риска от селектиране на едно-стъпални colistin-резистентни мутанти при лечение на инфекции, причинени от *K. pneumoniae*, докато комбинацията с меропенем не.

В заключение, мутант превантивните концентрации на colistin за всички включени в проучването видове значително надвишават МПК, установени чрез BMD, като особено високи са по отношение на *K. pneumoniae* - MPC₅₀ е 128 mg/l, а MPC₉₀ >128 mg/l. Установените високи MPC и съотношения MPC/МПК при всички изследвани видове показват голяма ширина на МСП, особено при *K. pneumoniae*, което крие голям риск от селектиране на полимиксин-резистентни, едно-стъпални мутанти при монотерапия с colistin, дори и при използване на препоръчваните понастоящем дозови режими. Комбинирано приложение на colistin и rifampicin би могло да допринесе за намаляване на риска от селектиране на едно-стъпални colistin-резистентни мутанти при лечение на инфекции, причинени от *K. pneumoniae*, докато комбинацията с меропенем не.

5. Проучване на ефекта на различни антибиотични комбинации с colistin при карбапенем-резистентни щамове *K. pneumoniae* чрез скрининг тест за синергизъм с предифузия, метод на El Azizi и ТКА (Time kill assay)

Ефектът на различни антибиотични комбинации с colistin беше проучен при 50 карбапенем-резистентни щамове *K. pneumoniae*, 34% (17/50) от които са едновременно и colistin-резистентни.

5.1. Скрининг тест за синергизъм с colistin

Посредством скрининг теста бяха изследвани ефектите на 16 двойни комбинации с colistin (Таблица 13).

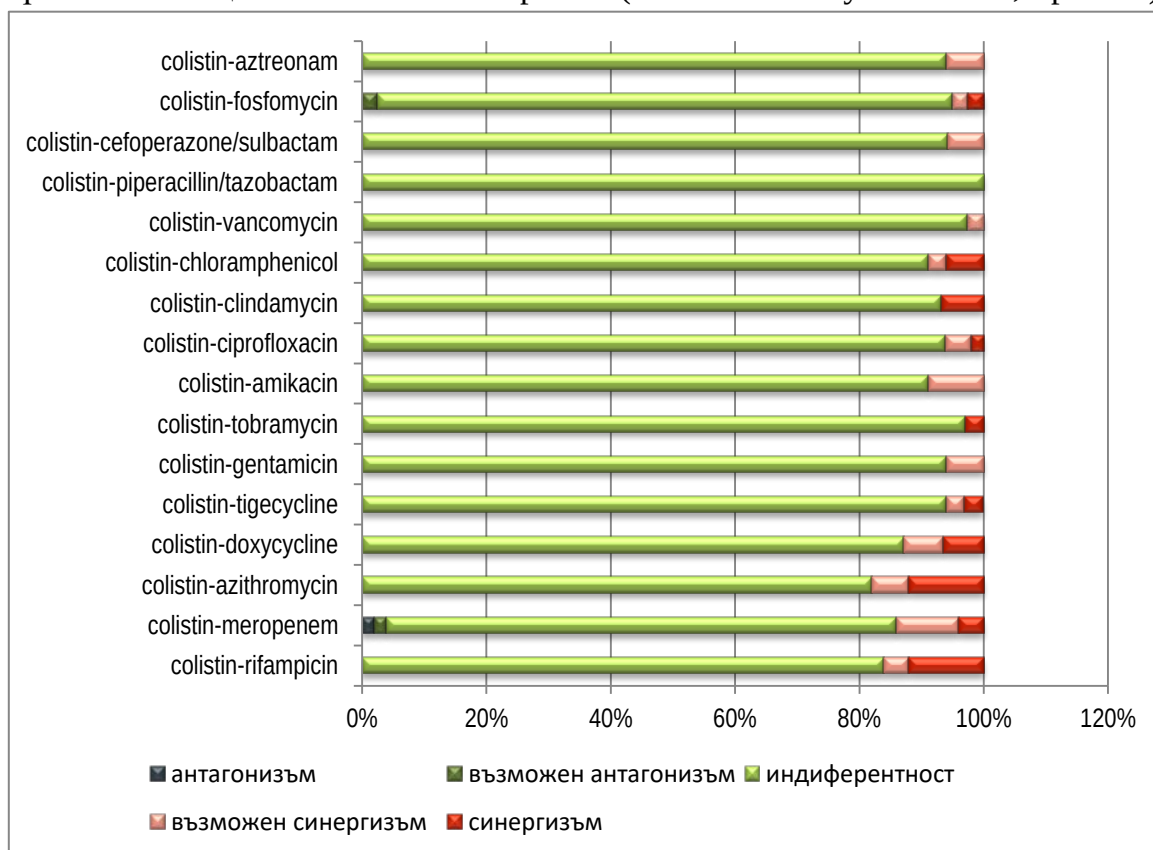
Таблица 13. Резултати от скрининг тест за синергизъм с colistin при *K. pneumoniae*

Комбинация, брой изследвани щамове	Брой щамове със съответната разлика (Δ, mm) между диаметъра на зоните на инхибиране на комбинацията и по-активния антибиотик в нея самостоятелно																			
	A	BA		И				BC		C										
	-5	-	-	-	-	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		24
		4	3	2	1															
Col - Rif (50)	1				3	27	10	2	1	1			1		1		2	1		1
Col - Mem (50)			1	1	1	3	27	7	3	2	3	1	1							
Col - Azi (50)						4	24	8	5	2	1	1		2			1	2		
Col - Cli (44)					1	8	24	6	2				1	1		1				
Col - Dox (47)						9	28	3	1	1	2	1		1	1					
Col - Tig (34)							12	16	4	1					1					
Col - Gm (50)						2	29	12	4	1	2									
Col - NN (34)						1	26	4	2				1							
Col - AN (34)						1	18	9	4	1	1									
Col - Cip (49)					1	8	33	3	1	2			1							
Col - Chl (34)							17	12	2	1			1		1					
Col - Van (39)					1	6	28	2	1	1										
Col - Tzp (34)							26	6	2											
Col - Scf (35)						1	25	6	1	2										
Col - Atm (34)							22	10		1	1									
Col - Fos (10)				1		1	18	16	2	1				1						

Зоните на инхибиране на антибиотиците самостоятелно и от пре-дифузията на colistin самостоятелно се измерват и сравняват с диаметъра на зоната на инхибиране на съответната комбинация. Определя се разликата (Δ) между зоната на инхибиране на комбинацията и тази на по-активния от двата антибиотика самостоятелно. Резултатите те се интерпретират по следния начин: Δ от -2, -1, 0, 1 или 2 $\rightarrow$ индиферентност (И); $\Delta = (-3$ или $-4) \rightarrow$ възможен антагонизъм (BA); Δ of $\geq (-5) \rightarrow$ антагонизъм (A); $\Delta = 3$ или $4 \rightarrow$ възможен синергизъм (BC); $\Delta \geq 5 \rightarrow$ синергизъм (C)

В по-голямата част от случаите комбинациите бяха индиферентни (Фигура 14). Синергизъм и възможен синергизъм беше установен основно с azithromycin (18%), rifampicin (16%), meropenem (14%), doxycycline (12,8%) (Таблица 15). В преобладаващата част от случаите, синергизъм с colistin бе наблюдаван предимно при colistin - резистентни изолати (Таблица 16). Разпределението на получените резултати в групите на colistin чувствителните и colistin резистентните щамове бе статистически значимо

при комбинациите colistin-rifampicin (Mann-Whitney $U=148.5$, $p<0.01$),



Фигура 14: Ефект на различни антибиотични комбинации с colistin спрямо 50 карбапенем-резистентни щама *K. pneumoniae*, определен чрез скрининг-теста за синергизъм с colistin

Таблица 14. Резултати от 3 двойни и 3 тройни комбинации с colistin, получени при изследване на 50 щама *K. pneumoniae*, чрез метода на El-Azizi

Комбинация, (брой щамове)	Разпределение на щамове, в зависимост от получения код на взаимодействие на комбинацията (IC)												
	А		И			С							
	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Col - Rif (50)			10	18	4	1	2	1	1	5	3	3	2
Col - Mem (50)		1	6	30	9	1	2		1				
Col - GM (50)		1	5	22	12	2	7	1					
Col - Rif - Mem (50)		1	3	40	4	1	1						
Col - Mem - GM (50)	2	1	8	32	7								
Col - Rif - GM (50)			5	40	5								

За микродилуционен метод на El-Azizi: За всяка комбинация се определя код на взаимодействие (IC) в съответствие с оригиналния протокол. А (антагонизъм) - МПК на по-активния от двата антибиотика в комбинацията се е повишил с две или повече двукратни серийни разрежания, И (индиферентност) – МПК на по-активния антибиотик в комбинацията е непроменен или се е увеличил/намалил с едно двукратно серийно разреждане; С (синергизъм) - МПК на по-активния антибиотик в комбинацията е намаляла с две или повече двукратни серийни разрежания в сравнение с МПК самостоятелно. За тройните комбинации се прилага същото правило, но сравненито се прави с двойните комбинации, които съдържат най-активния антибиотик. (El-Azizi, 2016)

Таблица 15. Сравняване на резултатите от скрининг теста за синергизъм с colistin и метода на El-Azizi

Комбинация	Скрининг тест за синергизъм с colistin						Метод на El-Azizi			
	брой	A	BA	И	BC	C	брой	A	И	C
Colistin - Rifampicin	50	0	0	42 (84%)	2 (4%)	6 (12%)	50	0	32 (64%)	18 (36%)
Colistin - Meropenem	50	1 (2%)	1 (2%)	41 (82%)	5 (10%)	2 (4%)	50	1 (2%)	45 (90%)	4 (8%)
Colistin - Azithromycin	50	0	0	41 (82%)	3 (6%)	6 (12%)	-	-	-	-
Colistin - Doxycycline	47	0	0	41 (87.2%)	3 (6.4%)	3 (6.4%)	-	-	-	-
Colistin - Tigecycline	34	0	0	32 (94.1%)	1 (2.9%)	1 (2.9%)	-	-	-	-
Colistin - GentaМПКin	50	0	0	47 (94%)	3 (6%)	0	50	1 (2%)	39 (78%)	10 (20%)
Colistin - Tobramycin	34	0	0	33 (97.1%)	0	1 (2.9%)	-	-	-	-
Colistin - Amikacin	34	0	0	32 (94.1%)	2 (5.9%)	0	-	-	-	-
Colistin - Ciprofloxacin	49	0	0	46 (93.9%)	2 (4.1%)	1 (2%)	-	-	-	-
Colistin - Clindamycin	44	0	0	41 (93.2%)	0	3 (6.8%)	-	-	-	-
Colistin - Chloramphenicol	34	0	0	31 (91.2%)	1 (2.9%)	2 (5.9%)	-	-	-	-
Colistin - Vancomycin	39	0	0	38 (97.4%)	1 (2.6%)	0	-	-	-	-
Colistin - Piperacillin/tazobactam	34	0	0	34 (100%)	0	0	-	-	-	-
Colistin - Cefoperazone/sulbactam	35	0	0	33 (94.3%)	2 (5.7%)	0	-	-	-	-
Colistin - Fosfomycin	40	0	1 (2.5%)	37 (92.5%)	1 (2.5%)	1 (2.5%)	-	-	-	-
Colistin - Aztreonam	34	0	0	32 (94.1%)	2 (5.9%)	0	-	-	-	-
Colistin-Meropenem-GentaМПКin	-	-	-	-	-	-	50	3 (6%)	47 (94%)	0
Colistin-Meropenem-Rifampicin	-	-	-	-	-	-	50	1 (2%)	47 (94%)	2 (4%)
Colistin-Rifampicin-Gentamicin	-	-	-	-	-	-	50	0	50 (100%)	0

colistin-azithromycin (Mann-Whithney $U=154$, $p<0.01$), colistin-doxycycline (Mann-Whithney $U=144$, $p<0.01$), colistin-aztreonam (Mann-Whithney $U=56$, $p<0.01$), colistin-tigecycline (Mann-Whithney $U=56$, $p<0.01$), colistin-gentamicin (Mann-Whithney $U=231$, $p<0.05$), colistin-chloramphenicol (Mann-Whithney $U=58$, $p<0.05$), colistin-ciprofloxacin (Mann-Whithney $U=214.5$, $p<0.05$).

5.2. Метод на El-Azizi

Методът беше използван за изследване на 3 двойни и 3 тройни комбинации с colistin: colistin-rifampicin, colistin-meropenem, colistin-gentamicin, colistin-meropenem-rifampicin, colistin-meropenem-gentamicin, colistin-rifampicin-gentamicin.

Както и при скрининг теста с предифузия, в повечето случаи комбинациите бяха индиферентни. Синергизъм в двойните комбинации беше установен при 36% от щамовете с rifampicin (18/50), в 20% с gentamicin (10/50) и в 8% с meropenem (4/50). Трите тройни комбинации, при сравнение на ефекта със

съответните двойни, в почти всички случаи бяха индиферентни. Само при 2 щамове (4%) бе установен синергизъм на комбинацията colistin-меропенем-rifampicin (Таблицы 14 и 15).

Синергизъм бе установен предимно при colistin резистентни щамове (Таблица 16). Разпределението на получените резултати в групите colistin чувствителните и colistin резистентните щамове се различава статистически значимо за комбинациите colistin-rifampicin (Mann-Whitney U=58.5, p<0.01) и colistin-gentamicin (Mann-Whitney U=161, p<0.01).

Таблица 16. Разпределение на резултатите, получени от скрининг теста за синергизъм с colistin и метода на El-Azizi за част от антибиотичните комбинации, в зависимост от чувствителността на щамове към colistin

комбинация (тест/метод)	Тип на щам	Антагонизъм	Възможен антагонизъм	Индиферент ност	Възможен синергизъм	Синергизъм
		N, %	N, %	N, %	N, %	N, %
Colistin - Rifampicin (скрининг тест)	Colistin S (n ₁ =33)	0	0	33 (100%)	0	0
	Colistin R (n ₂ =17)	0	0	9 (52.9%)	2 (11.8%)	6 (35.3%)
	Общо (n=50)	0	0	42 (84%)	2 (4%)	6 (12%)
Colistin - Rifampicin (метод на El-Azizi)	Colistin S (n ₁ =33)	0		30 (90.9%)		3 (9.1%)
	Colistin R (n ₂ =17)	0		2 (11.8%)		15 (88.2%)
	Общо (n=50)	0		32 (64%)		18 (36%)
Colistin - Meropenem (скрининг тест)	Colistin S (n ₁ =33)	0	1 (3%)	30 (90.9%)	2 (6.1%)	0
	Colistin R (n ₂ =17)	1 (5.9%)	0	11 (64.7%)	3 (17.6%)	2 (11.8%)
	Общо (n=50)	1 (2%)	1 (2%)	41 (82%)	5 (10%)	2 (4%)
Colistin - Meropenem (метод на El-Azizi)	Colistin S (n ₁ =33)	1 (3%)		31 (94%)		1 (3%)
	Colistin R (n ₂ =17)	0		14 (82.4%)		3 (17.6%)
	Общо (n=50)	1 (2%)		45 (90%)		4 (8%)
Colistin - Gentamicin (скрининг тест)	Colistin S (n ₁ =33)	0	0	33 (100%)	0	0
	Colistin R (n ₂ =17)	0	0	14 (82.4%)	3 (17.6%)	0
	Общо (n=50)	0	0	47 (94%)	3 (6%)	0
Colistin - Gentamicin (метод на El-Azizi)	Colistin S (n ₁ =33)	1 (3%)		30 (90.9%)		2 (6.1%)
	Colistin R (n ₂ =17)	0		9 (52.9%)		8 (47.1%)
	Общо (n=50)	1 (2%)		39 (78%)		10 (20%)
Colistin - Azithromycin (скрининг тест)	Colistin S (n ₁ =33)	0	0	32 (97%)	1 (3%)	0
	Colistin R (n ₂ =17)	0	0	9 (52.9%)	2 (11.8%)	6 (35.3%)
	Общо (n=50)	0	0	41 (82%)	3 (6%)	6 (12%)
Colistin - Doxycycline (скрининг тест)	Colistin S (n ₁ =32)	0	0	32 (100%)	0	0
	Colistin R (n ₂ =15)	0	0	9 (60%)	3 (20%)	3 (20%)
	Общо (n=47)	0	0	41 (87.2%)	3 (6.4%)	3 (6.4%)
Colistin - Tigecycline (скрининг тест)	Colistin S (n ₁ =28)	0	0	28 (100%)	0	0
	Colistin R (n ₂ =6)	0	0	4 (66.7%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)
	Общо (n=34)	0	0	32 (94.1%)	1 (2.9%)	1 (2.9%)
Colistin - Ciprofloxacin (скрининг тест)	Colistin S (n ₁ =33)	0	0	33 (100%)	0	0
	Colistin R (n ₂ =16)	0	0	13 (81.2%)	2 (12.5%)	1 (6.2%)
	Общо (n=49)	0	0	46 (93.9%)	2 (4.1%)	1 (2%)
Colistin - Aztreonam (скрининг тест)	Colistin S (n ₁ =28)	0	0	28 (100%)	0	0
	Colistin R (n ₂ =6)	0	0	4 (66.7%)	2 (33.3%)	0
	Общо (n=34)	0	0	32 (94.1%)	2 (5.9%)	0
Colistin - Chloramphenicol (скрининг тест)	Colistin S (n ₁ =28)	0	0	27 (96.4%)	1 (3.6%)	0
	Colistin R (n ₂ =6)	0	0	4 (66.7%)	0	2 (33.3%)
	Общо (n=34)	0	0	31 (91.2%)	1 (2.9%)	2 (5.9%)

n - общ брой изследвани щамове; n₁ - брой colistin чувствителни щамове; n₂ - брой colistin резистентни щамове

5.3. Time-kill assays (ТКА)

ТКА бяха извършени за изследване на ефекта от комбинацията colistin-rifampicin при пет щамове *K. pneumoniae*. Синергизъм беше установен при четири от тях. Във всички случаи, след първоначалното инхибиране на растежа, както от colistin самостоятелно, така и под влияние и на комбинацията от двата антибиотика беше наблюдавано възобновяване на растежа. Количеството на бактериите след 24 часова инкубация в присъствие на изследваните антибиотици надвишаваше изходния инокулум и независимо от наблюдавания синергизъм при четири от тях, комбинацията не доведе до бактериостатичен или бактерициден ефект (Таблица 17).

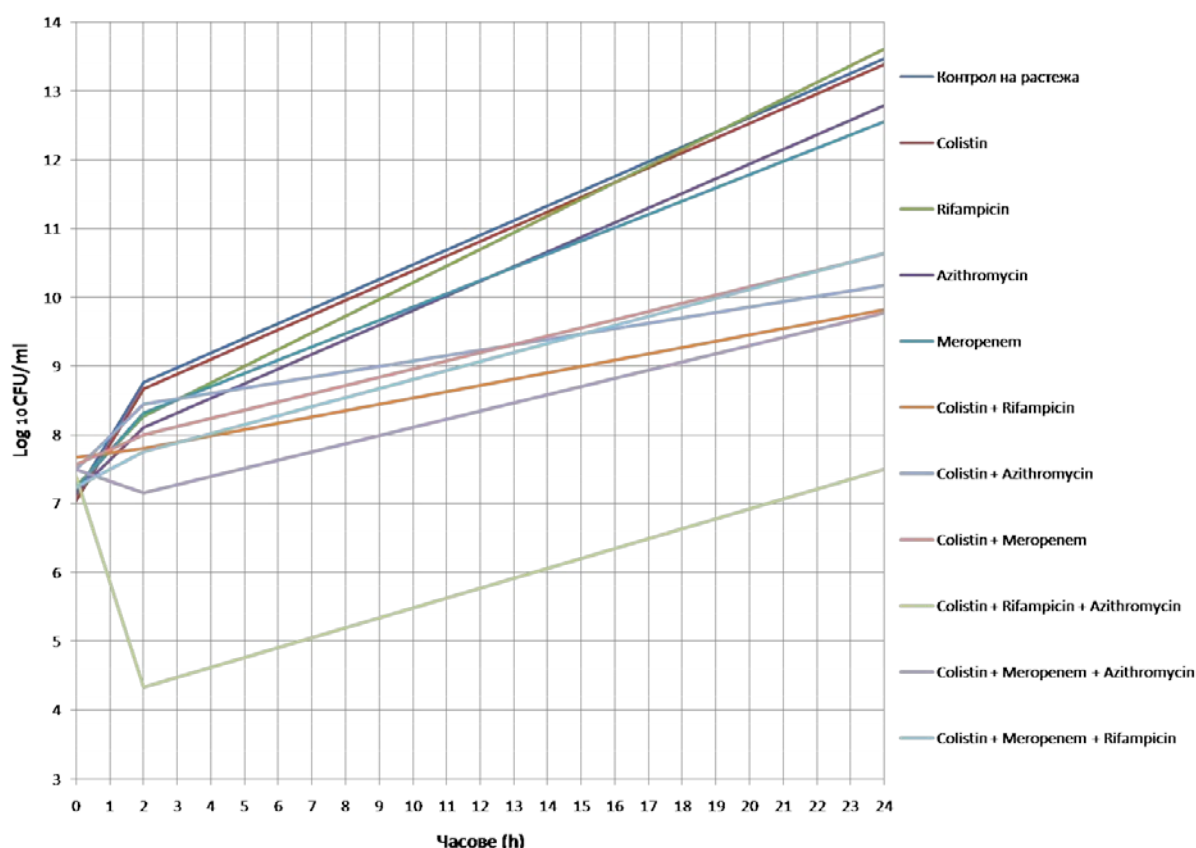
Таблица 17. Сравнение на резултатите, получени при изследване на ефекта на комбинацията colistin-rifampicin чрез 3 метода при 5 карбапенем-резистентни щамове *K. pneumoniae*

Щам	Резултат от скрининг-теста за синергизъм с colistin с предифузия	Резултат от микродилуционния метод на El-Azizizi	Time-kill experiments			
			Δ (24h-0h) между ефекта на комбинацията и самостоятелно $\log_{10}$ CFU/ml	Δ в количеството на бактериите на 24h под въздействие на комбинацията спрямо изходния инокулум (0h), $\log_{10}$ CFU/ml	Бактериостатичен ефект на комбинацията	Бактерициден ефект на комбинацията
24K*	И	И	-7.475 (C)	1.813	не	не
32K*	С	С	-4.208 (C)	2.139	не	не
70K*	С	С	-3.497 (C)	2.185	не	не
81K	И	И	1.002 (И)	3.328	не	не
92K*	С	С	-5.572 (C)	1.378	не	не

С - синергизъм; И - индиферентност; * - щам, резистентен на colistin

При един от colistin-резистентните щамове *K. pneumoniae* (32K) чрез ТКА беше изследван ефекта на три двойни комбинации (colistin-rifampicin, colistin-azithromycin, colistin-meropenem) и три тройни (colistin-rifampicin-meropenem, colistin-rifampicin-azithromycin, colistin-meropenem-azithromycin). Щамът е с високо ниво на резистентност към всички изследвани антибиотици. МПК за тези антибиотици са както следва: colistin 64 mg/l, meropenem 128 mg/l, rifampicin > 64 mg/l, azithromycin 8 mg/l. При проведените ТКА нито един от антибиотиките самостоятелно не доведе до инхибиране на растежа и кривите на убиване за всеки един тях не се различават съществено от тази за контрол на растежа без антибиотик (Фигура 15). И при трите двойни комбинации беше установен синергизъм в сравнение с ефекта на антибиотиките при самостоятелно им приложение, като най-изявен беше при комбинацията colistin-rifampicin. И при трите двойни комбинации, обаче не беше наблюдаван бактериостатичен или бактерициден ефект, тъй като на 24 час

бактериалният инокулум надвишаваше изходния (Фигура 15). От трите тройни комбинации най-силен инхибиращ ефект имаше комбинацията от colistin-rifampicin-azithromycin. На втория час от инкубиране в присъствие и на трите антибиотика беше установено значимо инхибиране на бактериалния растеж. След 24 часа инкубиране в присъствие на colistin-rifampicin-azithromycin бактериалният инокулум беше приблизително равен на изходния, т.е. липсваше бактериостатичен или бактерициден ефект на комбинацията. Но въпреки това, взаимодействието беше синергично, за разлика от това при другите две тройни комбинации, при които беше налице индиферентност, в сравнение със съответните двойни комбинации (Фигура 15).



Фигура 15: Резултати от Time-kill експерименти с изследване на ефекта на 3 двойни и три тройни комбинации с colistin спрямо кармабенем-резистентен и colistin-резистентен щам *K. pneumoniae* (32K)

5.4. Сравнение на резултатите, получени от използваните методи

Два от методите (скрининг-тест за синергизъм с colistin и метода на El-Azizi) бяха използвани за изследване на ефекта на комбинациите colistin-rifampicin, colistin-meropenem и colistin-gentamicin спрямо всички 50 щама *K. pneumoniae*. Съвпадение в резултатите, получени от двата метода беше установено в 80% за комбинациите colistin-rifampicin и colistin-meropenem

(40/50) и в 84% за комбинацията colistin-gentamicin (42/50). При пет щама беше изследван ефекта на комбинацията colistin-rifampicin и с трите използвани метода. Съвпадение в получените и от трите метода резултати беше установено при четири щама (80%) (Таблица 17)

5.5. Обсъждане

Полимиксините са една от малкото, понастоящем, терапевтични възможности за лечение на инфекции, причинени от карбапенемаза продуциращи Грам-отрицателни бактерии [Falagas et al., 2005]. Наличието на хетерорезистентност към colistin при *K. pneumoniae* [Meletis et al., 2011; Band et al., 2018] и определените високи мутант превантивни концентрации при този патоген [Poudyal et al., 2008, Choi & Ko, 2014], потвърдени и в настоящото проучване, показват наличието на голям риск от селектиране на резистентност при монотерапия с colistin. Предотвратяване или поне забавяне на развитието на този процес е възможно да се постигне чрез комбинирана терапия [Choi & Ko, 2014]. Colistin се използва често като част от ефективни комбинации, тъй като увеличава пермеабилитета на други антибиотици през външната мембрана на Грам-отрицателните бактерии [Tangdän, 2014b].

Съществуват различни подходи за оценка на комбинирания ефект на двойни и тройни антибиотични комбинации, но все още липсва консенсус относно, кой от тях е най-правилния [Doern, 2014]. Според Doern (2014), основните проблеми, свързани с този тип изследвания са следните. От една страна, налице са много *in vitro* проучвания, които анализират различни синергични антибиотични комбинации, но почти нито едно от тях не прави връзка с ефектите от тези комбинации *in vivo* [Doern, 2014]. От друга, тъй като липсва консенсус, относно "златния стандарт" при тестовете за синергизъм, на практика е трудно да се прецени, кои от получените резултати са верни [Doern, 2014]. Същевременно, бързо нарастващата антибиотична резистентност и липсата на терапевтични възможности за лечение на инфекциите, причинени от изключително резистентни Грам-отрицателни бактерии налагат необходимостта микробиологичните лаборатории да извършват тестове за синергизъм. Използваните понастоящем методи (метод на шахматната дъска, ТКА) са изключително сложни, скъпи и трудоемки [Elemat et al., 2010; Doern, 2014]. Поставени сме в уникална ситуация, при която трябва бързо да се намерят подходящи комбинации между антибиотици, спрямо които бактериите са вече резистентни. Скрининг-тестът за синергизъм с colistin с пре-дифузия, разработен в лабораторията, дава възможност за бърз скрининг на голям брой антибиотични комбинации за възможен синергизъм с colistin. При извършване на теста се прилага

техниката на пре-дифузия, подобно на някои Е-тест базирани методи за търсене на синергизъм [Sopirala et al., 2010], но вместо Е-тестове се използват стандартните антибиотични дискове за ДДМ. Периодът на пре-дифузия е удължен (4 часа), което дава възможност за по-добра дифузия на високомолекулни антибиотици като colistin. Техниката на пре-дифузия се използва и в някои търговски китове (ROSCO-Diagnostica A/S). Методът е бърз и лесен за изпълнение, и може да се използва в ежедневната диагностична практика. Резултатите, получени от него могат да подпомагат микробиолозите при избора на антибиотични комбинации, в обстановка на спешност, при полирезистентни изолати, когато много бързо трябва да се предложи вариант за лечение или преди да се изследват с някой от другите съществуващи методи.

В настоящото проучване, чрез скрининг теста бе установен синергизъм / възможен синергизъм предимно с azithromycin (18%), rifampicin (16%), meropenem (14%) и doxycycline (12.8%). На базата на резултатите от скрининг теста, определянето на чувствителността на щамове, а също и обзора на литературата избрахме три комбинации (colistin-rifampicin, colistin-meropenem и colistin-gentamicin), които да бъдат изследвани с метода на El-Azizi. Този нов метод е вариант на метода с шахматната дъска и се основава на микроразреждане в бульон, като дава възможност на една плака да се изследват, както чувствителността на микроорганизмите към три антибиотика, така и ефектите на три двойни и една тройна комбинация между тях [El-Azizi, 2016]. В сравнение с методите на класическата шахматната дъска и ТКА, методът на El-Azizi е по-бърз, по-икономичен и по-лесен. [El-Azizi, 2016]. В настоящото проучване, чрез метода на El-Azizi, синергизъм на комбинацията colistin-rifampicin бе установен при 36% от изследваните щамове (18/50). Комбинацията colistin-meropenem бе синергична при четири щамове (8%), а комбинацията colistin-gentamicin - при 10 щамове (20%). Тази комбинация, обаче, би трябвало да се използва много внимателно, поради нефротоксичността на двата антибиотика. Като цяло, съвпадение в получените резултати от двата метода бе наблюдавано в 80% за комбинациите colistin-rifampicin и colistin-meropenem (40/50) и в 84% за комбинацията colistin-gentamicin (42/50) (при изчисление на % на съвпадение на резултатите между тестовите, комбинациите с установен синергизъм/възможен синергизъм и антагонизъм/възможен антагонизъм от скрининг теста бяха сумирани и са съпоставени съответно на броя на комбинациите със синергизъм и антагонизъм от теста на El-Azizi). В настоящото проучване, ефектът на комбинацията colistin-rifampicin беше изследвана и чрез ТКА при пет от щамове. Синергизъм бе наблюдаван при

четири от тях. Съвпадение на резултатите от трите метода бе установено при 4 щамове (80%).

Синергизъм между полимиксините и rifampicin по отношение на мултирезистентни Грам-отрицателни бактерии се установява в много проучвания чрез използване на различни методи [Bratu et al., 2005; Urban et al., 2010, Elemam et al., 2010; Tangdän et al., 2014a; Lagerbäck et al., 2016]. Синергизъм между colistin и azithromycin спрямо *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* е демонстриран от Lin et al. през 2015г [Lin et al., 2015]. В настоящото проучване, интерес буди факта, че синергизъм на colistin с посочените по-горе антибиотици, беше установен основно при част от colistin-резистентните щамове *K. pneumoniae*. Elemam и сътр. (2010), установяват, че комбинациите polymyxin B-rifampicin и polymyxin B-doxycycline са синергични при полимиксин-резистентни КРС-продуциращи *K. pneumoniae* [Elemam et al., 2010]. Индиферентност на комбинацията colistin-rifampicin спрямо colistin-чувствителни, но синергизъм при colistin-резистентни КРС-продуциращи щамове *K. pneumoniae* е докладвано от Gaibani и сътр. (2014) [Gaibani et al., 2014]. В същото проучване е установен също и много изразен *in vitro* пост-антибиотичен ефект по отношение на colistin-резистентните *K. pneumoniae*, който се удължава допълнително при добавяне на tigecycline [Gaibani et al., 2014]. За съжаление, точния механизъм на синергизъм, установен в настоящото проучване и защо се наблюдава само при част от colistin-резистентните щамове *K. pneumoniae* остава неясен.

Съществуват малко проучвания за ефекта на различни тройни антибиотични комбинации при карбапенем-резистентни щамове *K. pneumoniae*. Tangdän и сътр., (2014a) установяват, че комбинацията colistin-rifampicin-meropenem има синергичен и бактерициден ефект и е била с най-голяма ефективност при ТКА спрямо четири металобеталактамаза-продуциращи щамове *K. pneumoniae* (VIM и NDM) [Tangdän, 2014a]. Diep и сътр., (2017) установяват синергизъм на комбинацията polymyxin B-rifampicin-meropenem по отношение на два КРС-продуциращи щамове *K. pneumoniae* [Diep et al., 2017]. Lagerbäck и сътр. (2016), обаче, при оценка на комбинираното приложение на colistin, rifampicin и meropenem спрямо осем NDM-положителни *K. pneumoniae*, установяват, че комбинацията от colistin и rifampicin е ефективна и трябва да се проучи ефективността ѝ *in vivo*, включително да се разгледа и възможността и за клиничната ѝ оценка, но добавянето на меропенем не води до значимо усиление на ефекта [Lagerbäck et al., 2016]. Подобен резултат беше установен и в нашето проучване при изследване на ефекта на комбинацията colistin - meropenem - rifampicin чрез метода на El-Azizi спрямо 50 карбапенем-резистентни щамове *K. pneumoniae*. Синергичен ефект на тройната комбинация

при сравнение с ефекта на двойната комбинация colistin-rifamicin беше установен само при два щамма (4%).

Аналогичен беше и резултата, получен чрез ТКА при един карбапенем- и colistin-резистентен щам *K. pneumoniae*. Много обещаващ положителен ефект беше наблюдаван по отношение на комбинацията colistin-rifampicin-azithromycin, което би могло да бъде обект на допълнителни проучвания.

В заключение, на базата на проведенните тестове за синергизъм, считаме, че комбинираното приложение на colistin основно с rifampicin, но също и с azithromycin, meropenem, doxycycline или gentamicin би могло да бъде от полза при лечение на инфекции, причинени от карбапенем-резистентни и colistin резистентни *K. pneumoniae*. Комбинацията с gentamicin, обаче, би трябвало да се използва много внимателно, поради нефротоксичността на двата антибиотика.

Скрининг-тестът за синергизъм с colistin с пре-дифузия показва висока съпоставимост с варианта на метода на шахматната дъска и дава възможност за бърз скрининг на голям брой антибиотични комбинации. Той е бърз и лесен за изпълнение и може да подпомага микробиолозите при избора на антибиотични комбинации, които да се изследват с някой от другите съществуващи методи.

Налице е спешна нужда от стандартизиране на тестовете за синергизъм и изготвяне на препоръки за диагностичните лаборатории.

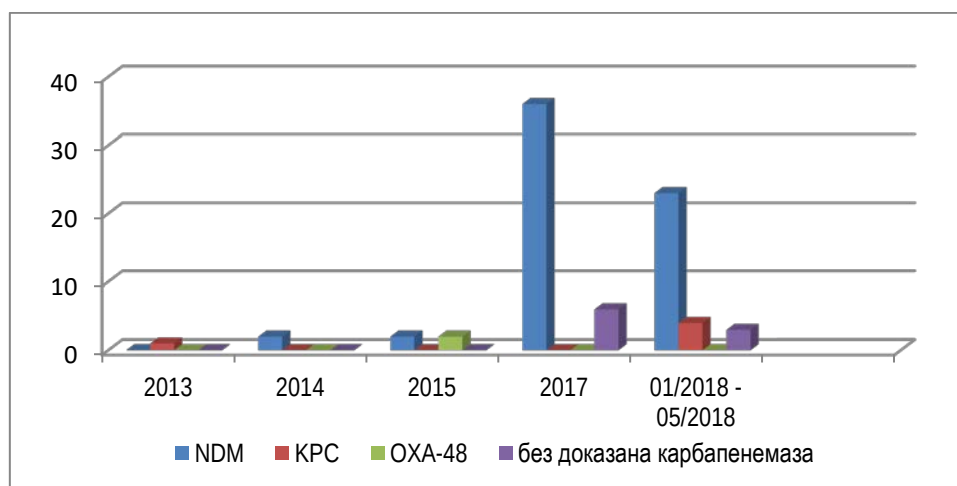
6. Определяне на спектъра на произвежданите карбапенемази при представителите на сем. *Enterobacteriaceae* и проучване на клоналната свързаност на изолатите при видовете с установена резистентност към colistin.

6.1. Определяне на спектъра на произвежданите карбапенемази при *K. pneumoniae* и проучване на клоналната свързаност на изолатите

6.1.1. Определяне на спектъра на произвежданите карбапенемази при *K. pneumoniae*

От включените в проучването 107 щамма *K. pneumoniae*, 79 бяха нечувствителни към карбапенеми (73.8%). За периода 2013 - 2016г бяха установени само седем карбапенем-резистентни щамма, докато останалите 91.1% (72/79) бяха изолирани от 01/2017 до 05/2018г. (Фигури 16). За доказване на производството на карбапенемази първоначално беше използван RT-PCR. Впоследствие всички резултати бяха потвърдени и чрез multiplex PCR (Фигура 17).

В преобладаващата част от случаите (79,7 %, 63/79), резистентността към карбапенеми на колекционираниите щамове *K. pneumoniae* се дължеше на продукцията на NDM. При два щамове, изолирани през 2015 беше доказана продукция на OXA-48. От началото на 2018г бяха изолирани и четири щамове, продуценти на KPC. В девет от случаите производството на карбапенемаза не бе установено, тъй като RT-PCR и multiplex PCR за *bla*_{NDM}, KPC, OXA-48, VIM, IMP бяха негативни.

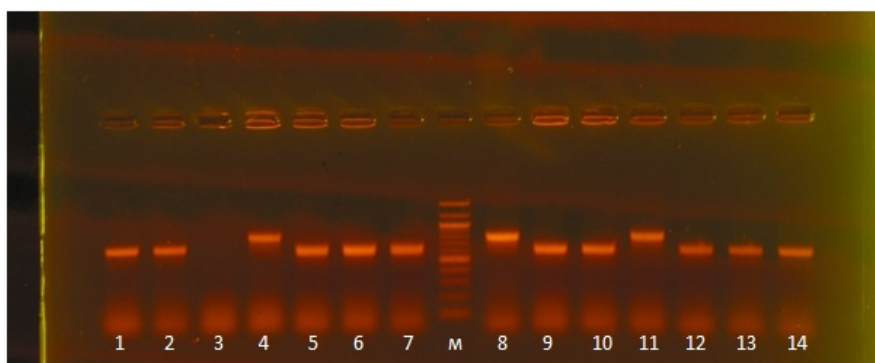


Фигура 16. Графично представяне на разпределението на включените в проучването карбапенем не-чувствителни щамове *K. pneumoniae* според вида на установената група карбапенемаза и по години

Първият карбапенемаза продуциращ щам *K. pneumoniae*, включен в проучването беше изолиран през 2013г. от проби на пациент, преведен в болницата след продължителна хоспитализация в Гърция. Щамът беше KPC-положителен.

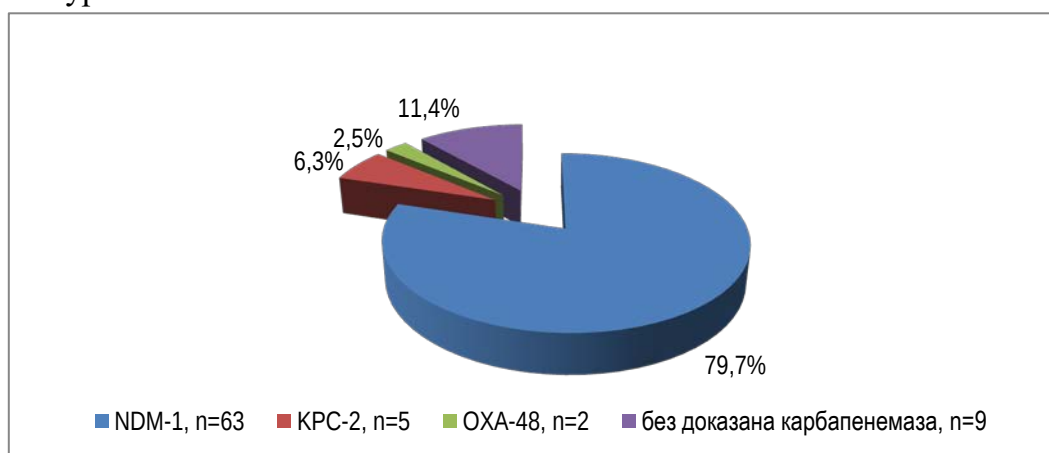
Първите два NDM-положителни щамове *K. pneumoniae* в болницата бяха изолирани през март и август 2014г, от материали на пациенти с предхождаща хоспитализация в други болници в страната. Включени са в настоящото проучване с номера 47К и 48К.

Щамове бяха изпратени за допълнително проучване и охарактеризиране в Университета в Антверпен [Kostyanov et al., 2016]. При направените проучвания беше установено и при двата щамове, наличие на *bla*_{NDM-1}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{CTX-M-15}, а при единия от тях и на *bla*_{TEM-1}. Щамове принадлежат към ST11, едно-локусен вариант на пандемичния клон ST258 и имат сходство от 97,2% [Kostyanov et al., 2016].



Фигура 17. Агарозна гел-електрофореза на PCR-продукти от multiplex PCR на щамове *K. pneumoniae* за доказване на основните класове карбапенемази. Позиции 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14 - фрагменти от ~ 600 bp (NDM); позиции 4, 8 и 11 - фрагменти от ~ 800 bp (KPC); позиция 3 - няма амплифициран ген; М- маркер (Ladder 100 bp)

При представителен брой от щамове ($n=18$) с доказана продукция на карбапенемаза беше извършено секвениране, което показва, наличие на bla_{NDM-1} , bla_{KPC-2} , bla_{OXA-48} . Разпределението на изолатите, според установения механизъм на резистентност към карбапенеми е предствено на Фигура 18.



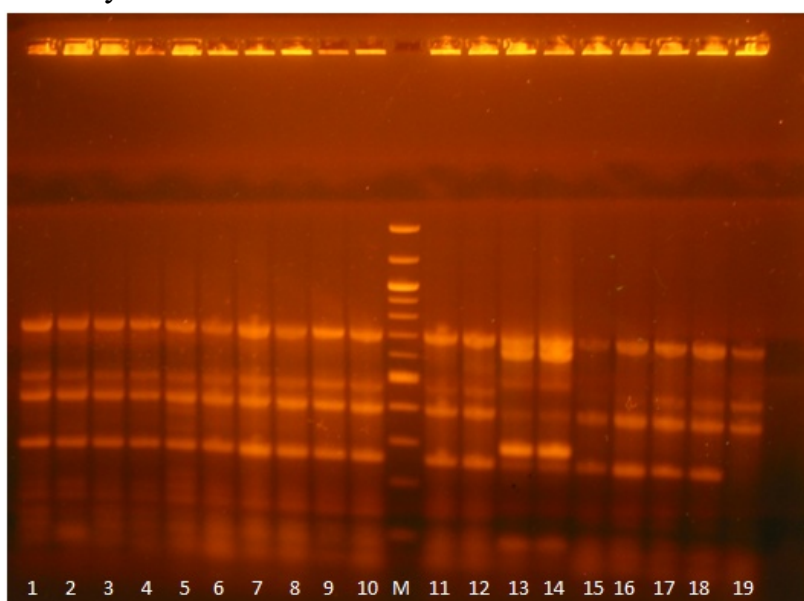
Фигура 18. Разпределение на изолатите според установения механизъм на резистентност към карбапенеми при 79 щамове *K. pneumoniae*

Седемнадесет от карбапенем резистентните изолати *K. pneumoniae* (12 NDM-1, два KPC-2 и три щамове без доказана карбапенемаза) бяха охарактеризирани и за наличието на ESBL и AmpC ензими. Всички щамове бяха SHV-положителни. При девет от NDM-1 продуциращите изолати беше установено наличие на $bla_{CTX-M-15}$, като при седем от тях - едновременно и на bla_{CMY-4} . При един от NDM-1 положителните изолати не беше установено наличие на CTX-M и CMY β -лактамази, а при другите два, освен bla_{NDM-1} , bla_{SHV} - допълнително наличие на $bla_{CTX-M-3}$ и bla_{CMY-4} . При двата KPC-2 положителни щамове не беше установено наличие на CTX-M и CMY ензими. При трите щамове

без доказана продукция на карбапенемаза, освен *bla_{SHV}* беше установено наличието на *bla_{CTX-M-15}*, а при един от изолатите и *bla_{CMY-4}*.

6.1.2. Епидемиологично типизиране на *K. pneumoniae*

Епидемиологичното типизиране беше направено чрез ERIC-PCR. Посредством ERIC-PCR бяха генерирани профили с 5 до 12 ивици (Фигура 19), които съответстваха на 10 ERIC типа. Клъстерният анализ с UPGMA показва, че коефициента на сходството на отделните ERIC типове се движи от 0.28 до 0.95, като 10-те ERIC типа се групираха в 8 клона (Фигури 20 и 21). 77.6% от изследваните щамове попадат в доминиращия ERIC тип Р, а 80.4% (86/107) в доминиращия клон Р (Таблица 18). Коефициентът на сходство между отделните субклонове Р и Р1 беше 0.95.



Фигура 19. Агарозна гел-електрофореза на PCR продукти от ERIC-PCR на щамове *K. pneumoniae*. Позиции 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17 и 18 - ERIC тип Р, позиции 13 и 14 - ERIC тип В, позиция 19 - ERIC тип С; М- маркер (Ladder 100bp)

Доминиращият клон Р включва 86 щам, изолирани в периода 2013 - 2018. В преобладаващата част от случаите (84.9%, 73/86), щамове са нечувствителни към карбапенеми. 62 (84.9%, 62/73) от тях са NDM-1 продуценти, 5 (6.8%, 5/73) – KPC-2, а при останалите 6 щам (8.2%, 6/73) не е доказана продукция на карбапенемаза. Освен с високо ниво на резистентност към карбапенеми, щамове от доминиращия клон се характеризират и с висока честота на резистентност/ хетерорезистентност към colistin. 82.9% (39 от 47 щам) от colistin резистентните / хетерорезистентни щамове попадат в клон Р. Изолирани са от пациенти на почти всички структури на болницата, а също и от амбулаторни пациенти и хоспитализирани в друга болница, което показва тяхното много широко разпространение. Втори по честота е ERIC

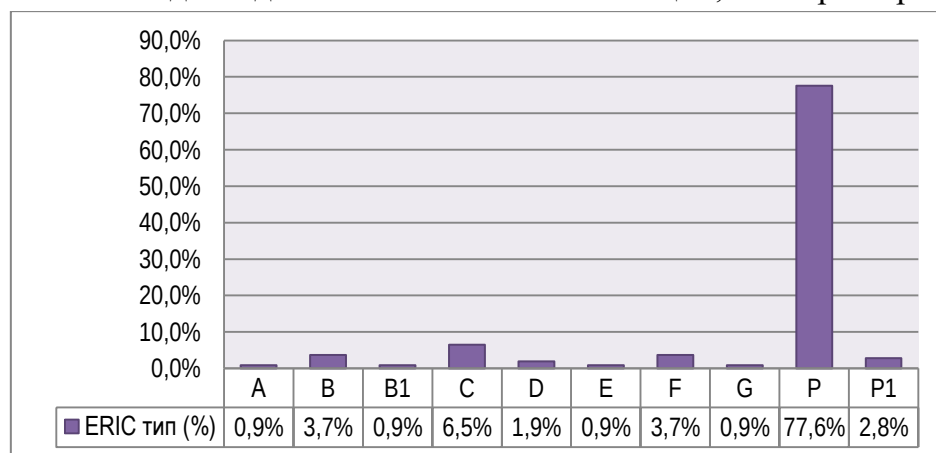
тип С, към който спадат 7 (6,5%) от изследваните щамове, изолирани през 2017г и 2018г. Преобладаващата част от щамове от този тип са карбапенем-

Таблица 18. Характеристика на ERIC типове на *K. pneumoniae* (n=107)

ERIC тип	Година ^{брой}	Общ брой	Чувствителност към карбапенеми	Карбапенемази брой	Colistin		
					S, n (%)	hR*, n (%)	R, n (%)
A	2017 ¹	1	S, n=1 R, n=0	- -	1 (100%) -	- -	- -
B	2015 ¹ , 2017 ¹ , 2018 ²	4	S, n=2 R, n=2	- OXA-48 ¹	1 (100%) -	- 2 (100%)	1 (100%) -
B1	2017 ¹	1	S, n=1 R, n=0	- -	- -	1 (100%) -	- -
C	2017 ⁵ , 2018 ²	7	S, n=5 R, n=2	- NDM-1 ¹	3 (60%) 2 (100%)	1 (20%) -	1 (20%) -
D	2017 ²	2	S, n=2 R, n=0	- -	2 (100%) -	- -	- -
E	2017 ¹	1	S, n=1 R, n=0	- -	1 (100%) -	- -	- -
F	2015 ¹ , 2017 ³	4	S, n=3 R, n=1	- OXA-48 ¹	1 (33.3%) 1 (100%)	- -	2 (66.7%) -
G	2017 ¹	1	S, n=0 R, n=1	- -	- 1 (100%)	- -	- -
P	2013 ¹ , 2014 ² , 2015 ² , 2017 ⁵³ , 2018 ²⁵	83	S, n=12 R, n=71	- NDM-1 ⁶¹ , KPC-2 ⁴	11 (91.7%) 35 (49.3%)	1 (8.3%) 12 (16.9%)	- 24 (33.8%)
P1	2017 ¹ , 2018 ²	3	S, n=1 R, n=2	- NDM-1 ¹ , KPC-2 ¹	- 1 (50%)	1 (100%) -	- 1 (50%)

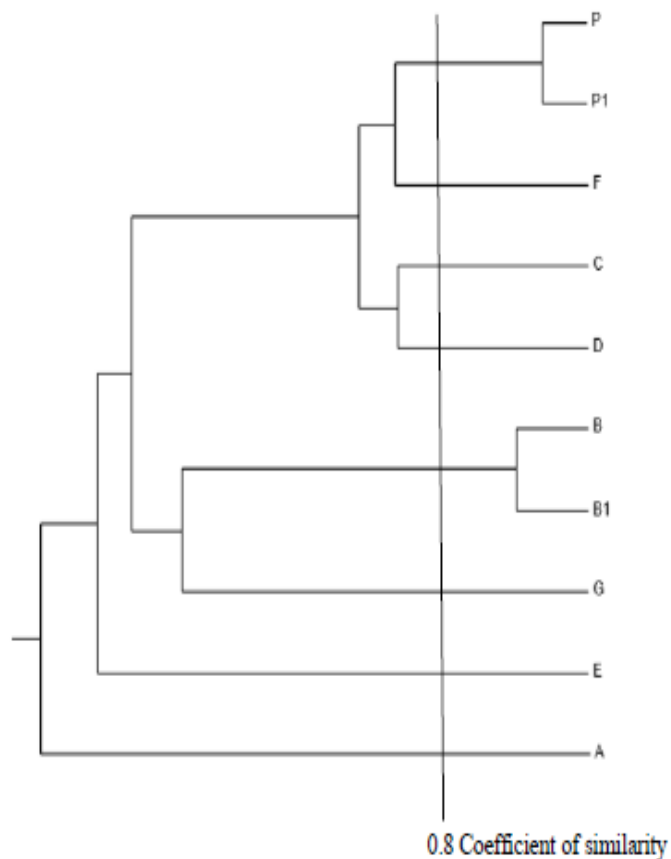
*Като hR (хетерорезистентни) се обозначават щамове, чувствителни на colistin чрез метода на микроразреждане в бульон, но с наличие на резистентни субпопулации, установени чрез Screen agar colistin

чувствителни (71.4%, 5/7). Продукция на NDM е установена при един от карбапенем-резистентните изолати. Трети по честота е ERIC тип F (4 щам), изолирани в периода 2015г - 2017г. Щамове от този тип са предимно карбапенем-чувствителни (75%, 3/4), но 50% (2/4) са резистентни към colistin. Към този клон спада и един OXA-48 положителен щам, изолиран през 2015г.



Фигура 20: % разпределение на клоновете *K.pneumoniae*, определени чрез ERIC_PCR

Останалите ERIC типове са представени от 1 до 3 щамове. Като цяло, карбапенемаза-продуциращи *K. pneumoniae* се установяват в пет ERIC типа - В, С, F, Р и Р1 и съответно четири клона В, С, F, Р.



Фигура 21. Дендрограма, представяща клоналната свързаност на ERIC типовете, установени за проучените щамове *K. pneumoniae*

6.2. Определяне на спектъра на произвежданите карбапенемази при *E. coli* и проучване на клоналната свързаност на изолатите

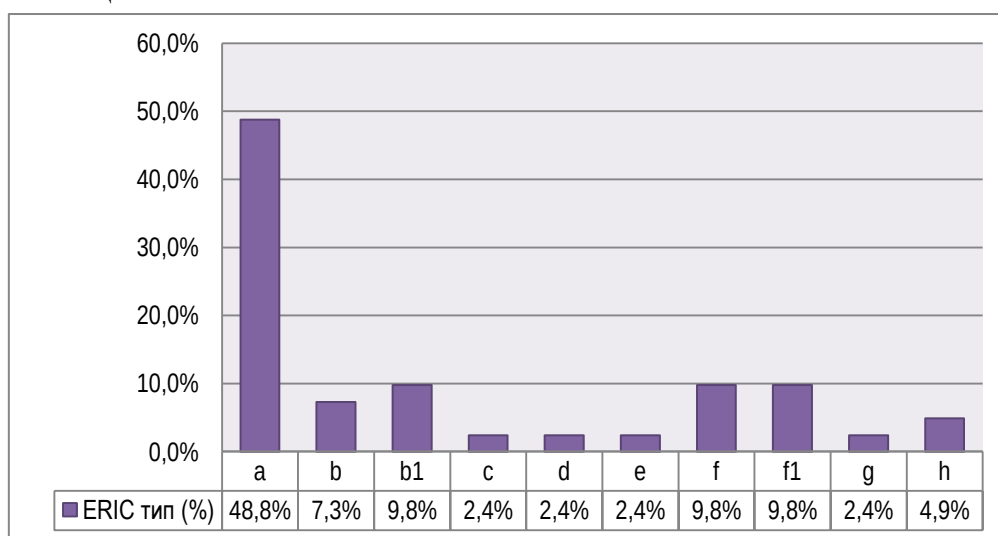
6.2.1. Определяне на спектъра на произвежданите карбапенемази при *E. coli*

В края на 2017г и през първите 5 месеца на 2018г бяха изолирани шест щамове *E. coli* с намалена чувствителност / резистентност към карбапенеми. Посредством RT-PCR, а впоследствие и чрез multiplex PCR, при два от щамове беше доказано наличието на *bla*_{NDM} (43Есо и 47Есо), при други два - гени за *bla*_{KPC} (42Есо и 45Есо). В два от случаите (44Есо и 46Есо) RT-PCR и multiplex PCR реакциите бяха негативни. Посредством секвениране беше

установено, че 43Есо е носител едновременно на *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{CMY-4}, а 47Есо на *bla*_{NDM-1} и *bla*_{CTX-M-3}.

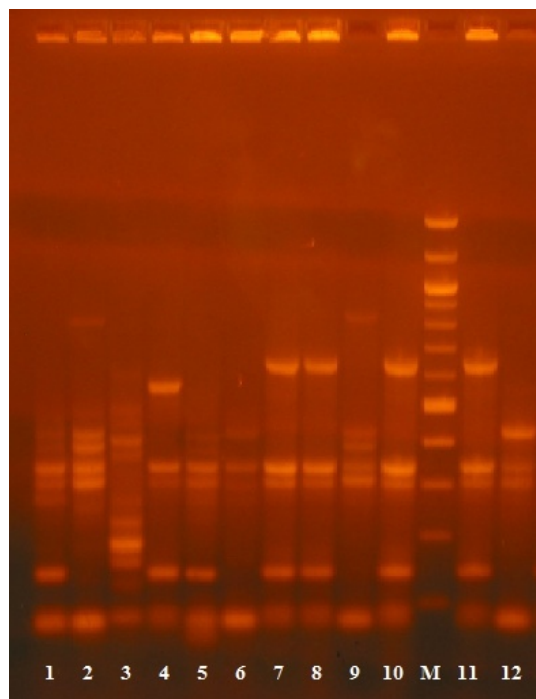
6.2.2. Епидемиологично типизиране при *E. coli*

Посредством ERIC-PCR бяха установени 10 различни ERIC типа, обособяващи 8 клона (с над 80% сходство) (фигури 22, 23 и 24). Преобладават изолатите от ERIC тип "а" - 48.8% (20/41). Към този ERIC тип спадат 19 щамове, изолирани в периода 2017г и един през 2018г. Изолирани са от пациенти на 7 клиники на болницата, а също и от амбулаторни пациенти. 19 от щамове произвеждат широкоспектърна β-лактамази (ESBL), а един от тях (47Есо) е карбапенем и colistin резистентен, NDM-1 продуцент. Интерес представлява факта, че този изолат е от пациент, при който един месец по-рано е изолиран карбапенем резистентен, NDM-1 положителен щам *K. pneumoniae* (92К). Това показва, че в този случай е възможно да е осъществен *in vivo* междувидов пренос на карбапенемазните гени от *K. pneumoniae* в *E. coli*. В следващите по честота ERIC типове "f", "f1" и "b1" се включват по четири щамове. Към ERIC тип "f" (9.8%, 4/41) спадат щамове, изолирани от 4 различни клиники на болницата, като един от тях е карбапенем резистентен с доказано наличие на *bla*_{NDM-1}. Към ERIC тип "f1" (9.8%, 4/41) спадат щамове, изолирани от пациенти на две от структурите на болницата. Един от изолатите е резистентен на карбапенеми, но при него не беше доказана продукцията на карбапенемаза. ERIC тип "b1" (9.8%, 4/41), включва четири щамове *E. coli*, изолирани само от една клиника на болницата (Хематология), като два от изолатите са карбапенем резистентни с доказана KPC-2 продукцията. В останалите случаи ERIC типовете са представени само от 1 или 2 щамове.



Фигура 22. % разпределение на клоновете *E. coli*, определени чрез ERIC-PCR

Характеристиката на установените ERIC типове при *E. coli* е представена в Таблица 19.

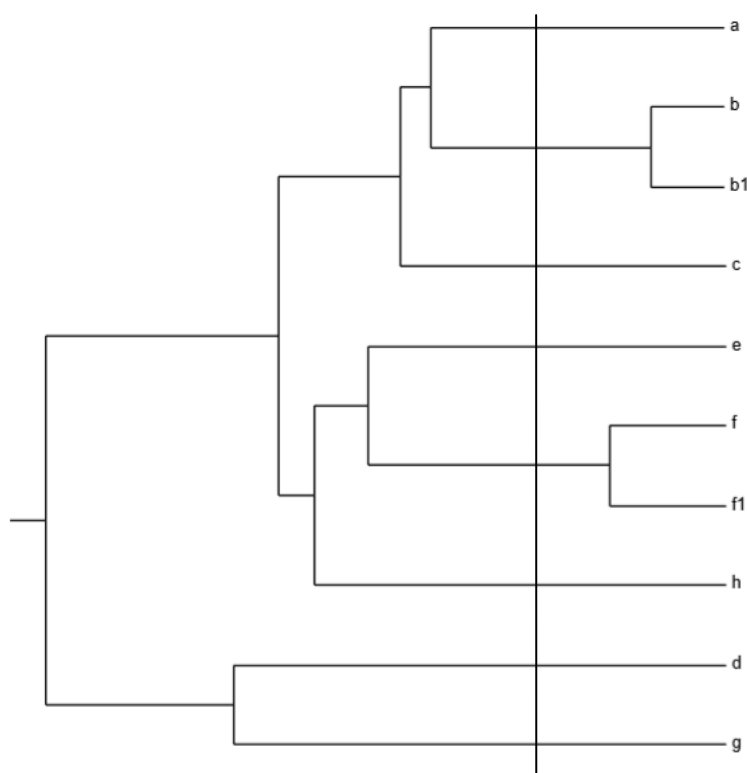


Фигура 23. Агарозна гел-електрофореза на PCR продукти на ERIC-PCR от щамове *E. coli*. Позиции: 1, 5 - ERIC тип "a", позиции 2, 9 - ERIC тип "f", позиции 6 и 12 - ERIC тип "f1", позиции 7, 8, 10 и 11 - ERIC тип "b1", позиция 3 - ERIC тип "h", позиция 4 - ERIC тип "b", M – маркер (Ladder 100 bp)

Таблица 19. Характеристика на ERIC типовете на *E. coli*

ERIC тип	година	Брой щамове	Чувствителност към карбапенеми	карбапенемази	Colistin	
					S, n (%)	R, n (%)
a	2017 ¹⁹ , 2018 ¹	20	S, n=19	-	19 (100%)	-
			R, n=1	NDM-1 ¹	-	1 (100%)
b	2017	3	S, n=3	-	3 (100%)	-
			R, n=0	-	-	-
b1	2017 ² , 2018 ²	4	S, n=1	-	1 (100%)	-
			R, n=3	KPC-2 ²	3 (100%)	-
c	2017	1	S, n=1	-	1 (100%)	-
			R, n=0	-	-	-
d	2017	1	S, n=1	-	1 (100%)	-
			R, n=0	-	-	-
e	2017	1	S, n=1	-	1 (100%)	-
			R, n=0	-	-	-
f	2017 ³ , 2018 ¹	4	S, n=3	-	3 (100%)	-
			R, n=1	NDM-1 ¹	1(100%)	-
f1	2017 ³ , 2018 ¹	4	S, n=3	-	3 (100%)	-
			R, n=1	-	1(100%)	-
g	2017	1	S, n=1	-	1 (100%)	-
			R, n=0	-	-	-
h	2017	2	S, n=2	-	2(100%)	-
			R, n=0	-	-	-

Проведеното епидемиологично типизиране при *E. coli* показва доминиране на един широко разпространен клон. В началото на 2018г в този клон се появява и *bla*_{NDM-1} положителен и colistin резистентен щам, при който вероятно е осъществен *in vivo* междувидов трансфер на карбапенемазни гени от *K. pneumoniae*.



0.8 coefficient of similarity

Фигура 24. Дендрограма, представяща клоналната свързаност на включените в проучването щамове *E. coli* (41)

6.3. Молекулярно-генетично характеризиране на карбапенем-резистентни щамове *E. cloacae* complex

При един щам *E. cloacae* complex с МПК на Imipenem и Meropenem 2 mg/l, посредством RT-PCR и multiplex PCR бе доказано наличието на *bla*_{OXA-48}. Щамът беше позитивен и за *bla*_{CTX-M-15}.

6.4. Обсъждане

Резистентността към карбапенеми при *Enterobacteriaceae* може да се дължи на загуба на порини при щамове с високо ниво на продукция на широкоспектърни β -лактамази (ESBL и AmpC) или на производството на

карбапенемази [Livermore 2012]. Карбапенемазите са разнообразна група от биохимично различни ензими, които принадлежат класове А, В и D по класификационната схема на Ambler. Най-широко разпространените понастоящем карбапенемази от клас А са KPC ензимите [Nordmann et al., 2009]. Установени са за първи път през 1997г в Северна Каролина, САЩ. Причиняват големи епидемични взривове в САЩ през 2005 и 2006г. Освен в САЩ, са широко разпространени в Израел, Гърция, Италия, Китай, Бразилия [Nordmann et al., 2009]. Свързват се основно с клонално разпространение на *K. pneumoniae*, ST258 [Woodford et al., 2011]. Карбапенемазите от клас В са представени основно от ензимите IMP, VIM и NDM [Livermore 2012]. IMP са изолирани в края на 80те години на миналия век в Япония [Livermore 2012]. Установени са в различни части на света, но като цяло разпространението им е по-ограничено [Livermore 2012]. VIM ензимите са изолирани за първи път през 1997г в щам *P. aeruginosa* в Италия [Lauretti et al., 1999]. Впоследствие се разпространяват и сред представителите на *Enterobacteriaceae*, особено - *K. pneumoniae* [Livermore 2012]. Широко разпространени са в Гърция [Vatopoulos, 2008]. Много сериозен световен проблем понастоящем са NDM-ензимите [Johnson and Woodford, 2013]. Открити са през 2008г в карбапенем-резистентен щам *K. pneumoniae*, изолиран в Швеция от пациент с предхождаща хоспитализация в Индия [Yong et al., 2009]. Впоследствие, за кратък период от време се появяват множество съобщения за изолиране на NDM-положителни бактерии в целия свят [Johnson and Woodford, 2013]. Счита се, че техен първичен източник (резервоар) е Индийският субконтинент [Johnson and Woodford, 2013]. Някои автори посочват Балканите като втори възможен резервоар за разпространение на NDM в Европа [Johnson and Woodford, 2013], предимно чрез транс-граничен трансфер на пациенти [Savov et al., 2017]. Карбапенемазите от клас D са представени основно от OXA-48 [Livermore 2012]. Открити са за първи път през 2001г в Турция [Poirel et al., 2004]. Разпространени са широко в Средния Изток и Северна Африка [Poirel et al., 2012]. Периодично се появяват съобщения за епидемични взривове в различни части на Европа [Livermore 2012].

Независимо от многобройните съобщения за бързо разпространение на карбапенемаза-продуциращи бактерии в целия свят [Nordmann et al., 2011], в продължение на дълги години имаше само единични публикации за откриване на такива щамове в България.

Първите три VIM-1 и CMY-99 продуциращи щамове *P. mirabilis* бяха изолирани в края на 2011 и началото на 2012г в УМБАЛ "Александровска" [Schneider et al., 2014]. Впоследствие бе установено широко разпространение на този мулти-резистентен клон на *P. mirabilis* в България, като за периода

2012 - 2015г бяха охарактеризирани общо 19 щамове от пациенти на 7 болници в София, Варна и Плевен [Markovska et al., 2016].

През 2012г във Варна, при вътреболничен взрив са изолирани 7 щамове *K. pneumoniae*, ко-продуценти на KPC-2, VIM-1 и CTX-M-15 [Markovska et al., 2014]. Впоследствие, разпространението на KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae* продължава, като за периода 2012 - 2015г са изолирани и охарактеризирани още 38 щамове, предимно във Варна, но също и в Плевен [Markovska et al., 2015]. Преобладаващата част от щамове принадлежат към ST15, но са установени също и представители на ST101, ST258, ST76, ST1350 и ST151 [Markovska et al., 2015]. През 2016г KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae* са регистрирани и в София [Savov et al., 2017].

Три случая на OXA-48 продуциращи *K. pneumoniae* в България бяха установени през 2012г и 2014г [Markovska et al., 2015, Sabtcheva et al., 2015, Sirakov et al., 2016].

Първите NDM-положителни щамове в България са изолирани през 2012г при вътреболничен взрив, причинен от карбапенем-резистентни *E. coli* във Военно Медицинска Академия, София [Poirel et al., 2014]. Това е и първият, описан в света взрив от NDM-1 продуциращи *E. coli* [Poirel et al., 2014]. Установено е, че всички щамове са клонално свързани, принадлежат към ST101 и освен на NDM-1, са носители също и на CTX-M-15 и RmtB, което обуславя и високо ниво на резистентност към всички аминогликозиди [Poirel et al., 2014].

Скоро след това бяха докладвани спорадични случаи на инфекции с NDM-положителни *K. pneumoniae* в три големи болници в София [Kostyanov et al., 2016; Todorova et al., 2016], два от които бяха установени в УМБАЛ "Александровска" през 2014г [Kostyanov et al., 2016]. През 2015 - 2016г е регистриран поликлонален вътреболничен взрив, причинен от NDM-1-продуциращи *K. pneumoniae* във Военно Медицинска Академия, София [Savov et al., 2018]. Преобладават щамове, принадлежащи към клонален тип ST11, но друга част от тях спадат към ST15, ST16 и ST391. Счита се, че много вероятно този взрив е резултат от вътреболничен трансфер [Savov et al., 2017]. Освен това, клоналният тип ST11 е идентичен с установения при голям вътреболничен взрив в Гърция, което показва, че този клон е широко разпространен в Балканския регион [Savov et al., 2017].

В настоящото проучване, два от NDM-1 положителните щамове *K. pneumoniae* са изолирани през 2014 [Kostyanov et al., 2016], два - през 2015, а всички останали - от началото на 2017. Появата на NDM-продуциращи *K. pneumoniae* в болницата е най-вероятно в резултат на междуболничен трансфер, тъй като първите регистрирани от началото на 2017г щамове бяха

изолирани от проби на пациенти, взети в деня на хоспитализация. Допълнително, по анамнестични данни бе установена предхождаща им хоспитализация в други големи болници в София. Впоследствие, разпространението им най-вероятно се дължи комбинация от между- и вътреболничен трансфер.

Големият брой NDM-1-продуциращи *K. pneumoniae*, изолирани в период от 17 месеца, а също и факта, че част от тях произлизат от пациенти с предхождаща хоспитализация в други големи болници в София, показва, че най-вероятно те са много по-широко разпространени, отколкото се предполага на базата на съществуващите към момента съобщения в литературата. За период от 3 месеца, в началото на 2018г в болницата бяха изолирани и четири KPC-2 продуциращи щамове *K. pneumoniae*, което показва тенденция за бързо разпространение и на този тип карбапенемази. Друг аспект на проблема е увеличаващия се брой на colistin резистентни изолати предимно при карбапенем резистентните *K. pneumoniae* (32.9%) в сравнение с карбапенем-чувствителните (14.28%), като 86.2% (25/29) от всички colistin - резистентни щамове *K. pneumoniae* са карбапенем резистентни. Високо ниво на резистентност към colistin при карбапенем резистентни щамове *K. pneumoniae* е установено и в други проучвания [Mezzatesta et al., 2011; Monaco et al., 2014; Pena et al., 2014; Giani et al., 2015; Markovska et al., 2015; Bathoorn et al., 2016; Savov et al., 2017; Otter et al., 2017]. В настоящото проучване не бяха установени резистентни на colistin KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae*.

За период от 5 месеца (от края на 2017 и в първите 4 месеца на 2018) бяха изолирани шест щамове *E. coli* с резистентност/намалена чувствителност към карбапенеми. Бяха доказани два типа карбапенемази - NDM и KPC, което показва, че гените, кодиращи тези ензими се разпространяват с бързи темпове и при други представители на *Enterobacteriaceae*.

В заключение, резистентността към карбапенеми на включените в проучването представители на сем. *Enterobacteriaceae* е най-висока при *K. pneumoniae* (73.8%). Дължи основно на широко разпространение на *bla*_{NDM-1} (79,7%). В единични случаи са установени *bla*_{OXA-48} (изолирани през 2015г), а от началото на 2018г е се появяват KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae*. 14,63% (6/41) от включените в проучването щамове *E. coli* са резистентни към карбапенеми. Резистентността се дължи на производство на NDM-1 (2) и KPC-2 (2) ензими. При един щам *E. cloacae complex* е доказано на носителство на *bla*_{OXA-48}. Епидемиологичното типизиране показва преобладаването на един клон *K. pneumoniae* – в 80,4% (86 от 107 изолата). Карбапенем-резистентните изолати на този клон бяха 84,9% (73 от 86) - 62

щамата *bla*_{NDM-1} положителни и 5 щамата *bla*_{KPC-2} положителни. Другите шест бяха без доказана карбапенемаза. Тридесет и девет щамата, 45.3% от този клон са резистентни и хетерорезистентни на colistin. Тридесет и два щамата, 37.2% от този клон бяха NDM положителни, както и колистин резистентни или хетерорезистентни. Всички KPC-2 продуциращи изолати бяха колистин чувствителни. Единични colistin-резистентни изолати принадлежат на други три клона.

Проведеното епидемиологично типизиране при *E. coli* показва доминиране на един широко разпространен клон. В началото на 2018г в този клон се появява и *bla*_{NDM-1}

7. Проучване на генетичните механизми на резистентност към colistin

Генетичните механизми на резистентност към colistin бяха проучени чрез PCR тестове за доказване на плазмидно кодирани *mcr* гени и чрез PCR и секвениране на най-честите хромозомни, свързвани с резистентност към colistin - гените *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*.

Плазмидни механизми на резистентност към colistin

При всички 33 щамата (с установена резистентност към colistin) чрез референтния метод на микроразреждане в бульон, а също и при три от хетерорезистентните бяха извършени PCR тестове за откриване на плазмидно кодирани гени *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* и *mcr-5*. Не бяха установени плазмидно медиран механизми на резистентност към colistin при изследваните щамове *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* (Таблица 20).

Хромозомни механизми на резистентност към colistin

При 52 щамата *K. pneumoniae* (29 - резистентни на colistin по метода на микроразреждане в бульон, 18 хетерорезистентни и 5 чувствителни (избрани като контролни, за сравняване)) беше амплифициран гена *mgrB*. При два изолата не получихме амплификационен продукт, при 45 установихме сегмент с размер ~220 bp и при 5 - сегмент от ~ 1300bp. Посредством секвениране на гена *mgrB* бяха установени промени при 9 от colistin резистентните щамове *K. pneumoniae* (31 %). При два от тях (32K и 94K), праймерите не амплифицираха гена *mgrB*, което би могло да се дължи на делеция на целия *mgrB* locus или на инсерция в гена на много голям сегмент. При два щамата (67K и 69K), генът беше инактивиран от стоп кодон, а при 5 щамата бе доказано инактивиране посредством вмъкване на инсерционна последователност (IS903like или IS903B) в 144bp *mgrB* ген. При останалите colistin резистентни щамове, при хетерорезистентните и colistin-чувствителните контроли генът *mgrB* беше интактен (див тип) (Таблица 20).

При 23 щамата *K. pneumoniae* (13 резистентни на colistin по метода на микроразреждане в бульон, 2 чувствителни и 8 хетерорезистентни), подбрани

на случаен принцип, бяха секвенирани гените *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*. Не бяха установени промени в *pmrA*, *phoP*, *phoQ*.

При четири от изследваните щамове (два colistin-резистентни (67K и 72K), един - хетерорезистентен (30K) и един чувствителен (27K)) беше установена мутация в гена *pmrB*, която води до замяна на аминокиселината аргинин с глицин на 256 позиция в Pmr B (Таблица 20).

Обсъждане

Придобитата резистентност към colistin е най-често хромозомна и се дължи основно на модификация на липополизахарида (LPS) посредством добавяне на катионни групи (L-Ara4n и pEtN), пълна загуба на LPS, свръхпродукция на капсулни полизахариди и/или отделянето им извън клетката, специфични мутации на външно-мембранните протеини или свръхекспресия на ефлуксни помпи [Poirel et al., 2017]. Промените се извършват с участието на голям брой гени и оперони, които кодират ензими, осъществяващи директно процеса на модификация или посредством регулаторни гени на двукомпонентни системи (PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ, ParR/ParS, ColR/ColS, CprC/CprS) и техни регулатори (*mgrB*, *ctrAB*) [Poirel et al., 2017].

Хромозомните механизми на резистентност към полимиксини могат да се установят посредством секвениране на гените, отговорни за специфичните мутации. Според Poirel et al. (2017), обаче, приложението на молекулярно-генетичните техники за доказване на хромозомните механизми на резистентност е затруднено, а интерпретацията на получените резултати - несигурна, тъй като вероятно съществуват и други, неизвестни към момента хромозомни механизми на резистентност, а преценката, дали установените промени в протеини, които участват в биосинтезата на LPS действително водят до резистентност към полимиксини е трудна. В допълнение, нивото на експресия на съответните гени може да варира и по този начин да оказва сериозно влияние върху нивата на резистентност към полимиксини [Poirel et al., 2017]. Като имахме предвид това, в настоящото проучване избрахме да секвенираме само гените *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP* и *phoQ*, тъй като мутациите в тях са най-добре проучени и най-често се свързват с резистентност към полимиксини. Промени в гена *mgrB* бяха установени при 9 (31%) от colistin-резистентните *K. pneumoniae*. MgrB е малък трансмембранен протеин, който осъществява негативна обратна връзка в системата *phoPQ*. В литературата са описани множество промени - missense и nonsense мутации, делеции, инсерции, включително и пълна делеция на локуса *mgrB*, които водят до повишена експресия на *phoPQ* оперона, а това, от своя страна - до активиране на оперона *pmrHFIJKLM* и развитие на придобита резистентност към полимиксини [Poirel et al., 2017].

Таблица 20. Резултати от генетичните тестове за резистентност към colistin

Щам	Col	<i>mgrB</i>	<i>pmrA</i>	<i>pmrB</i>	<i>phoQ</i>	<i>phoP</i>	<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>
2K	R	IS903 like element	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
14K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
19K	hR	див тип									
20K	hR	див тип									
24K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
25K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
27K	S	див тип	див тип	мутация ¹	див тип	див тип					
28K	S	див тип									
30K	hR	див тип	див тип	мутация ¹	див тип	див тип					
32K	R	(-)*	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
41K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
45K	hR	див тип									
47K	hR	див тип									
51K	hR	див тип									
53K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
57K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
59K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
61K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
67K	R	Stop codon	див тип	R256G ¹	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
68K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
69K	R	Stop codon					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
70K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
72K	R	див тип	див тип	R256G ¹	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
73K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
74K	hR	див тип									
75K	S	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
77K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
83K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
86K	hR	див тип									
87K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
88K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
90K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
91K	R	IS903B					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
92K	hR	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
94K	R	(-)*					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
96K	S	див тип									
97K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
100K	R	IS903B	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
101K	hR	див тип									
104K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
108K	R	IS903B	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
109K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
110K	hR	див тип									
112K	R	IS903B					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
113K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
117K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
119K	S	див тип									
120K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
121K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
47Eco	R						(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8P	R						(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10P	R						(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11P	R						(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Легенда: R - резистентен; hR - хетерорезистентен = щам, чувствителен по BMD, но с наличие на растеж върху Superpolymyxin agar (SA Col); S - чувствителен; (-)* - прајмерите не амплифицираха гена; ¹ установена е мутация, която води до замяна на аргинин с глицин на 256 позиция; IS - инсерционна последователност; (-) - отрицателна PCR реакция;

Инактивирането на *mgrB* много често се дължи на различни инсерционни последователности (IS). IS са едни от най-просто устроените мобилни генетични елементи, широко разпространени сред всички живи организми [Vandecraen et al., 2017]. Представяват малки компактни елементи, които могат самостоятелно да се преместват, както в рамките на една ДНК молекула, така и между различни молекули [Vandecraen et al., 2017]. До момента са известни повече от 4500 вида IS, класифицирани в 29 семейства [Vandecraen et al., 2017]. IS предизвикват инактивиране/промяна в експресията на гени, свързани с вирулентността, резистентността към антимикробни средства, участват в модулиране на метаболитни функции, а появата им може да предизвиква също и промяна в експресията на съседни гени [Vandecraen et al., 2017]. При *K. pneumoniae*, инактивиране на гена *mgrB* може да възникне под влияние на различни IS. В настоящото проучване при пет щама беше установено инактивиране посредством мобилни елементи IS903 (2K, 91K, 100K, 108K, 112K). Тези IS принадлежат към семейството IS5 и са едни от честите причини за мутации в гена *mgrB*. Установени са от Aires et al. (2016), заедно с IS5, IS102, ISKpn26, IS10L, като причина за резистентност към colistin, посредством инактивиране на гена *mgrB* при 10 щама *K. pneumoniae* [Aires et al., 2016]. Uz Zaman et al. (2018) проучват възможните механизми на резистентност към colistin при 23 щама *K. pneumoniae*, изолирани в периода 2011 - 2015г [Uz Zaman et al., 2018]. Установяват, че при 18 от изследваните 23 щама причина за резистентността към colistin е мутация в *mgrB* - в 17 от случаите посредством IS (ISKpn14, ISKpn28, IS903), а в един случай - от ранен stop codon. IS903 е била причина и за възникване на резистентност към colistin по време на комбинирана терапия с colistin, meropenem и tigecycline [Cannatelli et al., 2014]. Счита се, че "гореща точка" точка за инсерция на IS903 е вероятно позиция (+70), тъй като в GenBank са депозирани секвенции от Гърция, Китай, Франция, при които е налице инсерция в тази позиция [Uz Zaman et al., 2018].

Инактивиране на гена *mgrB* може да възникне и под влияние на мутации, които водят до появата на stop codon. Otter et al. (2017), описват епидемичен взрив от 40 епидемиологично свързани NDM-1 положителни *K. pneumoniae* в две болници в Лондон през 2015г. [Otter et al., 2017]. Установяват високо ниво на резистентност към colistin (65.8%, 25/38). WGS показва три потенциални механизма на резистентност към colistin - два от тях се дължат на различни мутации в *mgrB* (ранен stop codon в *mgrB* - MgrB:C16 и MgrB:K3), а в един от случаите - на мутация в *phoQ* (L/Q субституция на аминокиселина в позиция 396 на PhoQ). Впоследствие два от colistin резистентните варианти (тези, с мутации в гена *mgrB*) се разпространяват клонално в двете болници.

Според *Otter et al.* установяването на клонално разпространение на щамове с мутационна (хромозомна) резистентност към colistin показва, че тези механизми на резистентност не трябва да се подценяват и може да представляват по-сериозна заплаха от плазмидно медираните [*Otter et al.*, 2017]. В настоящото проучване установихме инактивиране на гена *mgrB* посредством stop codon при два от colistin-резистентните щамове *K. pneumoniae* (67K и 69K).

В два от случаите (32K и 94K) гена *mgrB* не беше амплифициран. Това може да се дължи на много големи делеции или инсерции в гена. *Cienfuegos et al.* (2017), при проучване на 32 colistin-резистентни щамове *K. pneumoniae* в Колумбия установяват, че при 19 от тях липсва на амплификация на гена *mgrB*. Посредством WGS при 3 от тях е установена инсерция на 8,1-kb фрагмент в гена *mgrB*, съответстващ на ISKpn25. Инсерцирания регион показва 100% идентичност с няколко плаزمиди, поради което *Cienfuegos et al.* считат, че резистентността към colistin в тези случаи се медира от хромозомна интеграция на плазмидна ДНК [*Cienfuegos et al.*, 2017]. Установена е и клонална експанзия на резистентния щам [*Cienfuegos et al.*, 2017].

Kidd et al., (2017) установяват, че инактивирането на гена *mgrB* е съпроводено не само с развитие на резистентност към colistin, но също и с повишаване на вирулентността на *K. pneumoniae*, чрез проява на хипервирулентен фенотип [*Kidd et al.*, 2017]. Това е особено притеснително, тъй като в голяма част от colistin-резистентните щамове са налице промени в гена *mgrB* [*Kidd et al.*, 2017]. Според *Kidd et al.*, (2017), повишената вирулентност може да е едно от възможните обяснения на повишената смъртност, която се наблюдава при инфекции с colistin-резистентни щамове [*Kidd et al.*, 2017]. Установено е, че модификациите на липид А, възникнали в резултат на делеция на *mgrB* водят и до по-слаба и закъсняла възпалителна реакция, дължащо се на затруднено разпознаване на липид А от TLR4/MD-2 [*Kidd et al.*, 2017].

В настоящото проучване, най-честия механизъм на инактивиране на *mgrB* бе посредством инсерционни последователности (IS903), стоп кодон или големи промени на локуса *mgrB*. При четири от изследваните щамове беше установена мутация в гена *pmrB*, която води до замяна на аминокиселината аргинин с глицин на 256 позиция в *PmrB*. Мутацията е установена, както при colistin - резистентни щамове (67K и 72K), така и при хетерорезистентни (30K) и colistin - чувствителни (27K) щамове, което показва, че не се отразява на фенотипа и появата ѝ не води развитие на резистентност към colistin. Подобни резултати имат и други автори. *Haeili et al.* (2017) установяват че R256G замяната не се отразява на фенотипа [*Haeili et al.*, 2017].

При голяма част от colistin резистентните щамове не бяха установени други промени в изследваните от нас хромозомни механизми на резистентност, поради което считаме, че най-вероятно фенотипната резистентност към colistin при тези клинични изолати може да се дължи на комбинация от механизми на резистентност, включително и дефекти във външно-мембранните протеини или промени в ефлуксните помпи, съчетани със структурна модификация на LPS [Poirel et al., 2017].

През 2015г се появява първото в света съобщение за откриване на плазмидно кодиран ген (*mcr-1*) за резистентност към полимиксини при *E. coli* [Liu et al., 2016], последвано множество съобщения за разпространението на този механизъм на резистентност и при други представители на сем. *Enterobacteriaceae* в повече от 30 държави в 5 континента [Schwarz et al., 2016]. Генът се локализира основно на конюгативни плаزمиди от различни репликационни типове, включително IncI2, IncHI1, IncP, IncX4 и IncHI2, които се пренасят с много висока честота [Zhi et al., 2016, Schwarz et al., 2016]. Много от тези плазмиди носят и други гени за резистентност, включително гени за ESBL и карбапенемази [Schwarz et al., 2016, Poirel et al., 2016]. През 2016 - 2018г са открити още седем плазмидно кодирани гени за резистентност към полимиксини - *mcr-2* [Xavier et al., 2016], *mcr-3* [Yin et al., 2017], *mcr-4* [Carattoli et al., 2017], *mcr-5* [Borowiak et al., 2017], *mcr-6* [AbuOun et al., 2017], *mcr-7.1* [Yang et al., 2018], *mcr-8* [Wang et al., 2018]. Тези гени кодират производството на фосфостаноламин трансферази, които модифицират LPS с фосфостаноламин, в резултат на което се развива резистентност към полимиксини. Счита се, че откриването на плазмидно кодирани гени за резистентност към полимиксини е сигурен белег на резистентност или намалена чувствителност към тези антибиотици. В настоящото проучване при изследване на 33 colistin резистентни щамове и на три хетерорезистентни, не бяха установени известните към началото на 2018г пет плазмидно кодирани механизми (*mcr-1*, -2, -3, -4, -5) на резистентност към полимиксини при colistin-резистентните *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P.aeruginosa*.

В заключение, резистентността към colistin на включените в проучването щамове се дължи на хромозомни мутации в *mgrB* гена. В 31% от изследваните *K. pneumoniae* са установени промени в гена, предимно инактивиране *mgrB* от IS903, наличие на стоп кодон или вероятна голяма инсерция или делеция на целия локус *mgrB*. Не бяха установени промени в гените *pmrA*, *phoP*, *phoQ*. Установените мутации в гена *pmrB* при 4 от изследваните щамове не водят до развитие на резистентност към colistin. Резистентността при останалите colistin резистентни щамове най-вероятно се дължи на комбинация от механизми на резистентност или мутации в някои от

другите хромозомни гени. В настоящото проучване не бяха установени щамове с плазмидно кодираните *mcr-1*, -2, -3, -4, -5 гени за резистентност към полимиксини.

V. ИЗВОДИ

1. Колекционирани са 210 щамове, от 5 вида, с множествена антибиотична резистентност, изолирани от хоспитализирани (203) и амбулаторни (7) пациента.
2. Установено беше високо ниво на резистентност към карбапенеми - *K. pneumoniae* (73.6%), *A. baumannii* complex (100%), *P. aeruginosa* (95.2%), *E. coli* (14.6%). Резистентност към colistin чрез референтния метод бе установена при 29 щамове *K. pneumoniae* (27,9%), 3 щамове *P. aeruginosa* (14,3%) и един щам *E. coli* (2,4%). Нивото на резистентност към colistin бе по-високо при карбапенем-нечувствителните щамове *K. pneumoniae* (32,9%) в сравнение с карбапенем-чувствителните (14,28%).
3. При сравняването на четирите метода за определяне на чувствителността беше установено:
 - 3.1. MIKROLATEST MIC Colistin (*Erba Lachema*) показва добра корелация с референтния BMD метод (категорийно съответствие в 98.55%), докато методът на разреждане в агар имаше по-слаба корелация и не е подходящ за определяне на чувствителността към colistin в ежедневната диагностична практика.
 - 3.2. Rapid polymyxin NP, в настоящото проучване, показва специфичност 100% и чувствителност 94% спрямо референтния метод, но тестът беше фалшиво негативен при част от хетерорезистентните изолати с ниски МПК. Препоръчително е отрицателния резултат да бъде потвърден с BMD (самостоятелно или в комбинация с други методи).
 - 3.3. Тестът с пре-дифузия на ROSCO Diagnostica A/S имаше категорийно съвпадение с референтния метод в 95,17%, като той открива по-добре част от хетерорезистентните на colistin щамове, определени чрез BMD като чувствителни.
 - 3.4. Средата Superpolymyxin medium показва много добри резултати при използването ѝ като скрийн агар. С нея бяха открити допълнително 18 хетерорезистентни щамове *K. pneumoniae*. В резултат на комбинираното използване на двата метода (BMD и Superpolymyxin medium като скрийн агар), резистентността към колистин се увеличи до 43,9% при изолатите *K. pneumoniae*.

4. Мутант-превантивните концентрации на colistin за всички включени в проучването видове значително надвишаваха МПК, установени чрез BMD, като особено високи са по отношение на *K. pneumoniae* - MPC₅₀ е 128 mg/l, а MPC₉₀ >128 mg/l, което крие висок риск от селектиране на полимиксин-резистентни мутанти при монотерапия с colistin. Комбинирано приложение на colistin и rifampicin води до намаляване на мутант-превантивната концентрация на colistin, за разлика от комбинацията с meropenem.
5. Скрининг-тестът за синергизъм с colistin показва съвпадение на резултатите с модифицирания метод на шахматната дъска (в 80% за комбинациите colistin-rifampicin и colistin-meropenem, и в 84% за colistin-gentamicin) и дава възможност за бързо изследване на ефекта на голям брой антибиотични комбинации. Установена беше по-висока честота на синергизъм на комбинациите с colistin при colistin-резистентни щамове в сравнение с colistin-чувствителни.
6. Беше установено, че комбинациите на colistin основно с rifampicin – в 36%, но също така и с azithromycin, meropenem, doxycycline или gentamicin могат да имат синергичен ефект и евентуално да бъдат използвани за лечение на инфекции, причинени от карбапенем- и colistin - резистентни изолати *K. pneumoniae*.
7. Резистентността към карбапенеми на включените в проучването представители на сем. *Enterobacteriaceae* бе най-висока при *K. pneumoniae* (73.8% (79/107)). Дължи основно на широко разпространение на NDM-1 (79,7% (63/79)). В единични случаи са установени OXA-48 и KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae*. Карбапенем-резистентните изолати *E. coli* са 14,6% (6/41). Резистентността се дължи на производство на NDM-1 и KPC-2 ензими. При един щам *E. cloacae* complex е доказано на носителство на bla_{OXA-48}.
8. Проведеното епидемиологично типизиране установи широкото разпространение на един клон *K. pneumoniae* – в 80% (86/ 107 изолата), като 85% (73/86) от изолатите са карбапенем резистентни. Два изолата от този клон принадлежаха на ST11 типа. Той произвеждаше предимно NDM-1 72% (62/86) и KPC-2 (5/86). Тридесет и девет щамове, 45.3% от този клон са резистентни или хетерорезистентни на colistin. Единични colistin-резистентни изолати принадлежат на други три клонове. Проведеното епидемиологично типизиране при *E. coli* показва доминиране на един

широко разпространен клон. В началото на 2018г в този клон се появява и *bla*_{NDM-1}.

9. Резистентността към colistin на проучените щамове се дължеше основно на хромозомни мутации. В 31% (9 от 29 изолата *K pneumoniae* с високо ниво на резистентност) бяха установени промени в гена *mgrB*, предимно инактивиране от IS903, наличие на stop codon или вероятна инсерция или делеция на целия локус. Не бяха установени промени в гените *pmrA*, *pmrB* (с изключение на 4 изолата), *phoP*, *phoQ*. Установената замяна R256G при четири изолата не се асоциираше с резистентност към колистин. В настоящото проучване не бяха установени щамове с плазмидно кодираните *mcr* гени за резистентност към полимиксини.

VI. Справка за приносите на дисертационния труд

Приноси с оригинален характер

1. Бяха проучени 210 Грам-отрицателни бактерии с множествена антибиотична резистентност, като бяха установени високи нива на резистентност към карбапенеми и колистин, особено при изолатите *K. pneumoniae*.
2. Проучен беше механизма на резистентност към colistin на колистин резистентни изолати *K. pneumoniae*, като за първи път в България се доказват изолати с промени в *mcrB* гена като основен механизъм на колистинова резистентност.
3. Установена беше по-висока честота на синергизъм на комбинациите с colistin при colistin-резистентни щамове в сравнение с colistin-чувствителни.
4. Проведеното епидемиологично типизиране установи широкото разпространение на един клон *K. pneumoniae* – в 80%, като 85% от представителите са карбапенем резистентни. Два изолата от този клон принадлежаха на ST11 типа. Той произвеждаше предимно NDM-1 – в 72% и KPC-2 – в 5.8%. Тридесет и девет щамове, 45.3% от този клон са резистентни или хетерорезистентни на colistin.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдени бяха установените от други автори високи MPC на colistin за *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*.
2. Потвърдено беше намаляването на MPC в присъствие на rifampicin при *K. pneumoniae*.
3. Потвърден беше възможния синергизъм на комбинациите на colistin с rifampicin, azithromycin, doxycycline, meropenem.
4. Бяха оценени четири метода за определяне на чувствителност към colistin.
 - 4.1 MIKROLATEST MIC Colistin (*Erba Lachema*) имаше добра корелация с референтния BMD метод.
 - 4.2 Rapid polymyxin NP показва специфичност 100% и чувствителност 94% спрямо референтния метод, но тестът бе фалшиво негативен при част от хетерорезистентните изолати с ниски МПК.
 - 4.3 Тестът с пре-дифузия на ROSCO Diagnostica A/S показва категорично съвпадение с референтния метод в 95,17%, като открива по-добре част от хетерорезистентните на colistin щамове, определени чрез BMD като чувствителни.

4.4 Средата Superpolymyxin medium показва много добри резултати при използването ѝ като скрийн агар. С нея бяха открити допълнително 18 хетерорезистентни щамове *K. pneumoniae*.

Приноси с научно-приложен характер

1. Апробирано беше използването на Superpolymyxin medium като Screen agar colistin в допълнение към BMD, с цел подобряване на откриването на хетерорезистентните на colistin щамове.
2. За първи път в България беше разработен е протокол за определяне на мутант превантивна концентрация.
3. Разработен беше протокол за Time kill assay.
4. Внедрен беше модифицирания метод на шахматната дъска на El-Azizi за определяне на ефекта от комбинираното действие на двойни и тройни антибиотични комбинации.
5. Апробиран беше скрининг тест за възможен синергизъм на отделни антимикробни средства с colistin.

Публикации, свързани с дисертацията:

Kostyanov T, T Strateva, BB Xavier, **Y Marteva-Proevska**, C Lamens, B Markova, H Goossens, S Malhotra-Kumar. Detection and characterization of two NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from Bulgaria. J Antimicrob Chemother. 2016 May, 71 (5), pp.1428–1430.

Мартева-Проевска Ю, Ц Велинов. Полимиксини - механизми на резистентност и проблеми, свързани с лабораторното определяне на чувствителността към тях. Медицински преглед. 2018, 54 (2), 9 - 18.

Мартева-Проевска Ю, Ц Велинов. Colistin - фармакокинетика, фармакодинамика, клинично приложение. Съвременна медицина 2018, 62 (1), 46-56.

Marteva-Proevska Y, T Velinov, R Markovska, D Dobrikova, I Pavlov, L Boyanova, I Mitov. Antibiotic combinations with colistin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* - *in vitro* assessment. Journal of IMAB. 2018 **Article in press**

Участия в научни прояви:

Marteva-Proevska Y, Velinov T, Markovska R, Dobrikova D, Pavlov I, Boyanova L, Mitov I. Colistin resistance among multidrug resistant Gram-negative bacteria in a Bulgarian University Hospital. International Scientific Conference Kliment's days SU- Kliment Ohridski ,Sofia 2018 (Poster)