



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-СОФИЯ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ**

**Петя Борисова Станкова**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ, МИКРОБИОЛОГИЧНИ И  
ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ НА ЧРЕВНОТО  
НОСИТЕЛСТВО НА КАРБАПЕНЕМАЗА И  
ШИРОКОСПЕКТЪРНИ БЕТА-ЛАКТАМАЗА ПРОДУЦЕНТИ**

**Дисертационен труд**

**За придобиване на научна и образователна степен „Доктор”**

**Научна специалност „Микробиология”**

**Научни ръководители:**

**Проф. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм  
Чл-кор. Проф. Д-р Иван Гергов Митов, дмн**

София

2020

## **Благодарност**

Бих искала да изкажа сърдечни благодарности на научните си ръководители:

Проф. Митов, благодаря Ви за възможността, която ми предоставихте да изработя и напиша този дисертационен труд и за цялата подкрепа, която ми оказахте.

Проф. Марковска, благодаря Ви за това, че повярвахте в мен, за всичките знания и умения, които ми помогнахте да придобия, както и за търпението, което проявихте към мен и ценните съвети, които никога няма да забравя.

Благодаря на колегите от Катедрата по медицинска микробиология към МФ, МУ-София за ведрата атмосфера и готовността за съдействие, както и на колегите от София, Варна, Пловдив, Плевен и Бургас за колекциониранияте изолати.

Бих искала да посветя този дисертационен труд на баща ми - Борис Петров Станков, който завинаги ще остане в сърцето ми, както и на майка ми – Светлина Великова Станкова.

Мамо, благодаря ти за всичко!

# Съдържание:

<b>1. ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	9
<b>2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР</b> .....	11
2.1. Разред „ <i>Enterobacterales</i> ”.....	11
2.1.1. <i>E. coli</i> .....	15
2.1.2. Род <i>Klebsiella</i> .....	18
2.1.3. Род <i>Enterobacter</i> .....	21
2.1.4. <i>Citrobacter freundii complex</i> .....	23
2.2. Бета-лактамази.....	23
2.2.1. Клас А.....	23
2.2.2. Клас В.....	29
2.2.3. Клас С AmpC β-лактамази.....	30
2.2.4. Клас D.....	31
2.3. Разпространение на ESBL в обществото.....	31
2.4. Разпространение на ESBL в болниците.....	32
2.5. Разпространение на ESBL и карбапенемази в България.....	34
2.6. Методи за детекция на ESBL, AmpC и карбапенемаза продуценти – (EUCAST guideline, 2017).....	35
2.6.1. Препоръчителни методи за откриване на ESBLs в <i>Enterobacteriaceae</i> .....	35
2.6.2. Методи за доказване на карбапенемази при сем. <i>Enterobacteriaceae</i> .....	38
2.6.3. Препоръчителни методи за откриване на придобити AmpC в <i>Enterobacteriaceae</i> .....	42
2.7. Чревният тракт - резервоар на ESBL (широкоспектърни бета-лактамаза) и карбапенемаза продуциращи ентеробактерии.....	44
2.7.1. Честота на чревното носителство на ESBL/карбапенемаза продуценти.....	45
2.7.2. Фактори, свързани с носителството на ESBL/карбапенемаза продуценти.....	49
<b>3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	59
<b>4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	60
4.1. Бактериални изолати.....	60
4.2. Идентификация на чревните изолати.....	61
4.2.1. Референтни шамоте.....	61
4.2.2. Хранителни среди.....	62
4.2.3. Реактиви.....	62
4.3.1. Методи за идентификация.....	62
4.3.1.1. Мануални методи.....	62
4.3.1.2. Идентификация чрез MALDI-TOF (BioMerieux, France).....	63
4.3.1.3. Идентификация чрез автоматизирана система Phoenix 100 (Becton Dickinson).....	64
4.3.2. Молекулярно-генетичен метод за идентификация чрез <i>hps60</i> секвениране.....	64
4.4. Методи за определяне на чувствителността към антимикробни средства.....	65
4.4.1. Антибиотични субстанции и дискове.....	65
4.4.2. Дифузионно-дисков метод на Bauer-Kirby.....	65

4.4.3. Определяне на MIC чрез градиентен MIC метод.....	65
4.4.4. SuperPolymyxin Medium (SPM), използвана като скрийн агар за colistin.....	65
4.4.5. Определяне на MIC на Colistin чрез (Liofilchem, Italy) -SensiTest Colistin.....	66
4.5. Фенотипни методи за доказване на щамове, продуценти на бета-лактамази.....	66
4.5.1. Фенотипни методи за доказване на продуценти на широкоспектърни бета-лактамази – двойно-дисков синергичен тест.....	66
4.6. Фенотипни методи за доказване на продуценти на карбапенемази.....	67
4.6.1. Модифициран Hodge-test (МНТ).....	67
4.6.2. КРС, MBL, OXA-48 disk kit (acc. to EUCAST), (Liofilchem, Italy).....	67
4.7. Методи за доказване на хиперпродукция на AmpC ензими.....	67
4.8. Молекулярно-генетична идентификация на видовете ESBL/CRE/AmpC ензими.....	68
4.8.1. Полимераза-верижна реакция (PCR).....	68
4.9. ДНК секвениране.....	72
4.9.1. Потвърждаване на продукцията на ESBL и определяне на спектъра на продуцирани бета-лактамази чрез изоелектрично фокусиране (IEF).....	73
4.9.1.1. Материали за изоелектрично фокусиране.....	73
4.9.1.2. Ензимни екстракти .....	74
4.9.1.3. Тест за ензимна активност.....	74
4.9.1.4. Техника.....	74
4.9.1.5. Bioassay – биологичен тест за $\beta$ -лактамазна хидролитична активност.....	75
4. 10. Епидемиологичен анализ .....	75
4.10.1. ERIC-PCR.....	75
4.10.2. Мултилокусно секвениране Multi Locus Sequence Typing (MLST) .....	76
4.10.3. Доказване на O25b-ST131 клона при изолатите <i>E.coli</i> .....	79
4.10.4. Филотипиране на изолатите <i>E. coli</i> .....	79
4.11. Статистически анализ.....	80
<b>5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ</b> .....	<b>81</b>
5.1. Бактериални изолати.....	81
5.2. Видова идентификация.....	82
5.3. Молекулярно-генетична идентификация с <i>hsp60</i> секвениране.....	83
5.4. Чувствителност.....	86
5.4.1. Антимикробна устойчивост, разпределена по видове бактериални изолати.....	88
5.4.2. Устойчивост на бактериалните изолати при хоспитализирани пациенти и здрави индивиди.....	93
5.5. Сравнение на фенотипни методи за определяне на продукцията на широкоспектърните $\beta$ -лактамази.....	95
5.5.1. Двойно – дисков синергичен метод (DDST).....	95
5.6. Фенотипни методи за определяне на продукцията на карбапенемази .....	96
5.6.1. Модифициран Hodge-test (МНТ).....	96
5.6.2. КРС, MBL, OXA-48 disk kit (acc. to EUCAST), (Liofilchem, Italy).....	97
5.7. Охарактеризиране групите ESBL, CARBA, AmpC ЧРЕЗ PCR.....	97
5.7.1. Полимераза-верижна реакция с SHV, CTX-M, TEM и OXA типове специфични	

праймери. ....	97
5.7.2. Полимеразо-верижна реакция с KPC, NDM, OXA-48, VIM, IMP групово специфични праймери за охарактеризиране на типа на карбапенемазата. ....	98
5.7.3. Полимеразо-верижна реакция с DNA, CMY, MOX, FOX, ACC, типово специфични праймери за охарактеризиране на AmpC продуценти. ....	99
5.8. Нуклеотидно секвениране. ....	101
5.9. Охарактеризиране на групите бета-лактамази чрез изоелектрично фокусиране (IEF)....	105
5.10. Епидемиологично типизиране. ....	115
5.10.1. <i>K. pneumoniae</i> .....	115
5.10.2. <i>E. coli</i> .....	121
5.10.3. <i>Enterobacter spp</i> .....	130
<b>6. ИЗВОДИ</b> .....	134
<b>7. ПРИНОСИ</b> .....	137
8. Списък с публикации , свързани с дисертационния труд.....	139
9. Участия в симпозиуми и конгреси, свързани с дисертационния труд.....	139
10. Участия в проекти, свързани с дисертационния труд.....	140
11. Литература.....	141

## **Използвани съкращения:**

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

МБАЛ - многопрофилна болница за активно лечение

МДЛ - Медико-диагностична лаборатория

МНТ - Модифициран Hodge-test

МЦ - Медицински център

НЦЗПБ - Национален център по заразни и паразитни болести

УМБАЛ - Университетска многопрофилна болница за активно лечение

УМБАЛСМ- Университетска многопрофилна болница за активно лечение и спешна медицина

5NO - nitroholine

ACC  $\beta$  -лактамази- Ambler class C -1

AMI - amikacin

Amp C - Extended-spectrum cephalosporin-resistant class C

APBA -аминофенил борна киселина

ATCC - American Type Culture Collection

AUG - amoxicilin/clavulanic acid

BD - Becton, Dickinson and Company

CAZ - ceftazidime

CC - клонален комплекс

CDT - комбинирания диск тест

CFU - Colony-forming unit

CHL - chloramphenicol

CIP - ciprofloxacin

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute

CLX - cloxacillin

CMY - class C active on cephamycins

COL - colistin

CTX - cefotaxime

CTX-M - Cefotaxime–hydrolyzing  $\beta$ –lactamase

DDM - Disk diffusion method

ddNTP - Dideoxynucleotide triphosphates

DDST - Double-disk synergy test

dNTP - Deoxynucleotide triphosphate

DPA - дипиколинова киселина  
EAEC - Дифузно-адхерентни *Escherichia coli*  
ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control  
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid  
EPEC - Ентеропатогенни *Escherichia coli*  
ERIC - PCR-Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction  
ESBL - Extended spectrum beta-lactamase  
ESKAPE - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* u *Enterobacter spp.*  
ETEC - Ентеротоксигенни *Escherichia coli*  
EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
ExPEC - екстраинтестинални патогенни *Escherichia coli*  
FEP - cefepime  
FOS - fosfomicin  
FOX - ceftoxitin  
GEN - gentamicin  
GES - Guiana extended spectrum  
IBC - Integron borne cephalosporinase  
IEF - Isoelectric focusing  
IMI - Imipenem–hydrolyzing  $\beta$ -lactamase  
IMP - imipenem  
IRT - Inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases  
KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase  
LB - Luria Berthrani broth  
LEV - levofloxacin  
LT - Thermolabile  
MALDI-TOF - Matrix-assisted laser desorption/ionization  
MBLs - Metallo- $\beta$ -lactamases  
MDR - Multidrug resistance  
MER - meropenem  
MIC - Minimum Inhibitory Concentration  
MLST - Multi Locus Sequence Typing  
NCBI - National Center for Biotechnology Information  
NDM - New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase

NIT - nitrofurantoin  
NMC-A - not metalloenzyme carbapenemase  
OXA - Oxacillin-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase  
РВА - фенил борна киселина  
PCR - Polymerase Chain Reaction  
PER - *Pseudomonas* extended resistant  
pI - Isoelectric point  
PIP/TAZ - piperacillin/tazobactam  
R+ - трансконюгант  
rRNA - Ribosomal ribonucleic acid  
SHV - sulf-hydryl variable active site  
SME - *S. marcescens* enzyme  
SPM - SuperPolymyxin Medium  
SXT - co-trimoxazole  
SHEC - Ентерохеморагични *Escherichia coli*  
TEM - Temoniera enzyme  
TIGE - tigecycline  
TOB - tobramycin  
VIM - Verona integron metallo- $\beta$ -lactamase

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Едни от най-често изолираните микроорганизми в микробиологичните лаборатории са представителите на разред *Enterobacterales*. Те са предимно условно пагогенни и причиняват, както нозокомиални, свързани с медицинското обслужване инфекции като уроинфекции, раневи, съдечно съдови, инфекции на меките тъкани, сепсис, катетър-свързани инфекции, пневмония, така и инфекции в обществото. Като облигатно патогенни ентеробактериите се асоциират с диарийни заболявания, чернодробни абсцеси, дизентерия, хранителни токсикоинфекции, коремен тиф и др. В резултат на увеличаване селективен антибиотичен натиск в болниците и обществото, както и проблемите с контрола на вътреболничните инфекции, в последните години една от най-големите опасности за общественото здраве и човечеството въобще, е нарастващата антибиотичната резистентност на клинично-значимите микроорганизми. Съществува реалната опасност за връщане към предантибиотичната ера като едни от най-засегнатите представители са ентеробактериите. Бета-лактамите, с тяхната добра поносимост, бактерициден ефект и широк спектър са най-често използваните антибиотици. Това обуславя лесното и бързо възникване на резистентност. Най-честият механизъм на устойчивост при тях е продукцията на ензими, които ги разграждат (бета-лактамази). Най-проблемни са тези, които повлияват цефалоспорините трета генерация (широко-спектърни бета-лактамази (ESBL)) и карбапенемите (карбапенемази). Продукцентите на карбапенемази и широкоспектърни бета-лактамази от сем. *Enterobacteriaceae* се доказват с нарастваща честота в целия свят (Ghafourian et al., 2015). ESBL продуцентите са най-често резистентни на всички бета-лактами, с изключение на карбапенемите и комбинациите с инхибитор, а произвеждащите карбапенемаза, обикновено на всички бета-лактами. Голям терапевтичен проблем е локализацията на гените, кодиращи ги на мобилни генетични елементи като транспозони, интегрони, конюгативни плазмиди, заедно с гени за устойчивост към други групи като аминогликозиди, хинолони и антифолатни агенти (Brolund A et al., 2016). Това води до появата на изключително резистентни и панрезистентни изолати, които бързо се разпространяват. Допълнителен проблем представлява затрудненото откриване на продуцентите на тези ензими. В Европа процентите на продуцентите на ESBL се различават значително за *E. coli* и *K. pneumoniae* в зависимост от регионите, с много ниски проценти, наблюдавани в страните от Северна Европа и много по-високи проценти, наблюдавани в Източна и Южна Европа държави (Jones RN et al., 2014). По най-нови данни от 2018г на European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), (ECDC, 2018) разпространението на резистентни на трета генерация цефалоспорини за *E. coli*, България е на първо място с

38.7%, следвана от Кипър - 37.1% и Италия - 28.7% (ECDC, 2018). Резистентността към цефалоспорини трета генерация при инвазивни *K. pneumoniae* отново ни поставя на първо място с 77.7%, следвани от Гърция - 70.7% и Полша - 64.6% (ECDC, 2018). При разпространението на инвазивни карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, България все още е на пето място сред европейските държави с 21.2%, след Гърция - 63.9%, Румъния - 29.5%, Италия - 26.8% и Кипър - 21.8% (ECDC, 2018).

Гастроинтестиналният тракт на хората и животните е един от основните резервоари на ESBL продуценти, като в последните години се увеличава носителството и на карбапенемаза продуциращите ентеробактерии. Чревното носителство е един от основните фактори за разпространението на гени за резистентност, както в болничните заведения, така и в обществото (Prevel et al., 2019). Общото годишно увеличение на разпространението на чревното носителство на продуценти на широкоспектърни бета-лактамази е оценено на приблизително 5%, което съответства на постоянното нарастване на честотата на ESBL-продуциращи *Enterobacteriaceae* инфекции (Karanika S et al., 2016). Тези наблюдения мотивират многобройни проучвания, насочени към идентифициране на източника на ESBL продуциращи *Enterobacteriaceae* и водещи до чревна колонизация с тези организми.

Рисковите фактори за колонизация с полирезистентните микроорганизми включват: увеличената консумация на антимикробни средства – предимно карбапенеми и цефалосполини трета генерация, продължителния болничен престой, инвазивните процедури, престоя в интензивни отделения, имунодефицитните състояния (Swaminathan M et al., 2013; Akova M et al., 2012; Wiener-Well Y et al., 2010; Ben-David D et al., 2011). Продължителността при безсимптомното носителство може да бъде много голяма, до няколко години, преместването на болните от една болница в друга или между отделните страни спомага за разпространението на ESBL и карбапенемаза продуцентите, в някои случаи това са специфични високо вирулентни и епидемични клонове – ST131 *E. coli*, ST11, ST15 и ST258 *K. pneumoniae* и др. Проблемната терапия и високата смъртност при инфекции с ESBL и карбапенемаза продуцентите, доказва необходимост от по-подробното им проучване.

## 2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### 2.1. Разред „*Enterobacterales*“

Разред „*Enterobacterales*“ е голяма и разнообразна група от Грам-отрицателни, факултативно анаеробни, неспорообразуващи, пръчковидни бактерии. Те принадлежат на:

**Class:** Gammaproteobacteria,

**Phylum:** Proteobacteria,

**Domain:** Bacteria

Членовете на тази група обитават редица различни екологични ниши и са открити в почвата, водата, растенията, насекомите, гастроинтестиналния тракт на животните и хората. Биохимичното разнообразие и големият брой микроорганизми в този разред затруднява групирането. Филогенетичните връзки на членовете на „*Enterobacterales*“ се определят главно според 16S rRNA (Adeolu M et al., 2016).

Разред „*Enterobacterales*“ съдържа 60 рода, включително наскоро описания род *Chania* и предложения за включване род „*Atlantibacter*“. Според новата рекласификация от 2016г тези родове са обединени в 7 основни семейства - *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* и *Budviciaceae* с типов род *Enterobacter* (Adeolu et al., 2016).

Семейство *Erwiniaceae* е представено от **родове:**

- *Erwinia*
- *Buchnera*
- *Pantoea*
- *Phaseolibacter*
- *Tatumella*
- *Wigglesworthia*

Семейство *Pectobacteriaceae* е представено от **родове:**

- *Pectobacterium*
- *Brenneria*
- *Dickeya*
- *Lonsdalea*

- *Sodalis*

Семейство *Yersiniaceae* е представено от родове:

- *Yersinia*
- *Chania*
- *Ewingella*
- *Rahnella*
- *Rouxiella*
- *Samsonia*
- *Serratia*

Семейство *Hafniaceae* е представено от родове:

- *Hafnia*
- *Edwardsiella*
- *Obesumbacterium*

Семейство *Morganellaceae* е представено от родове:

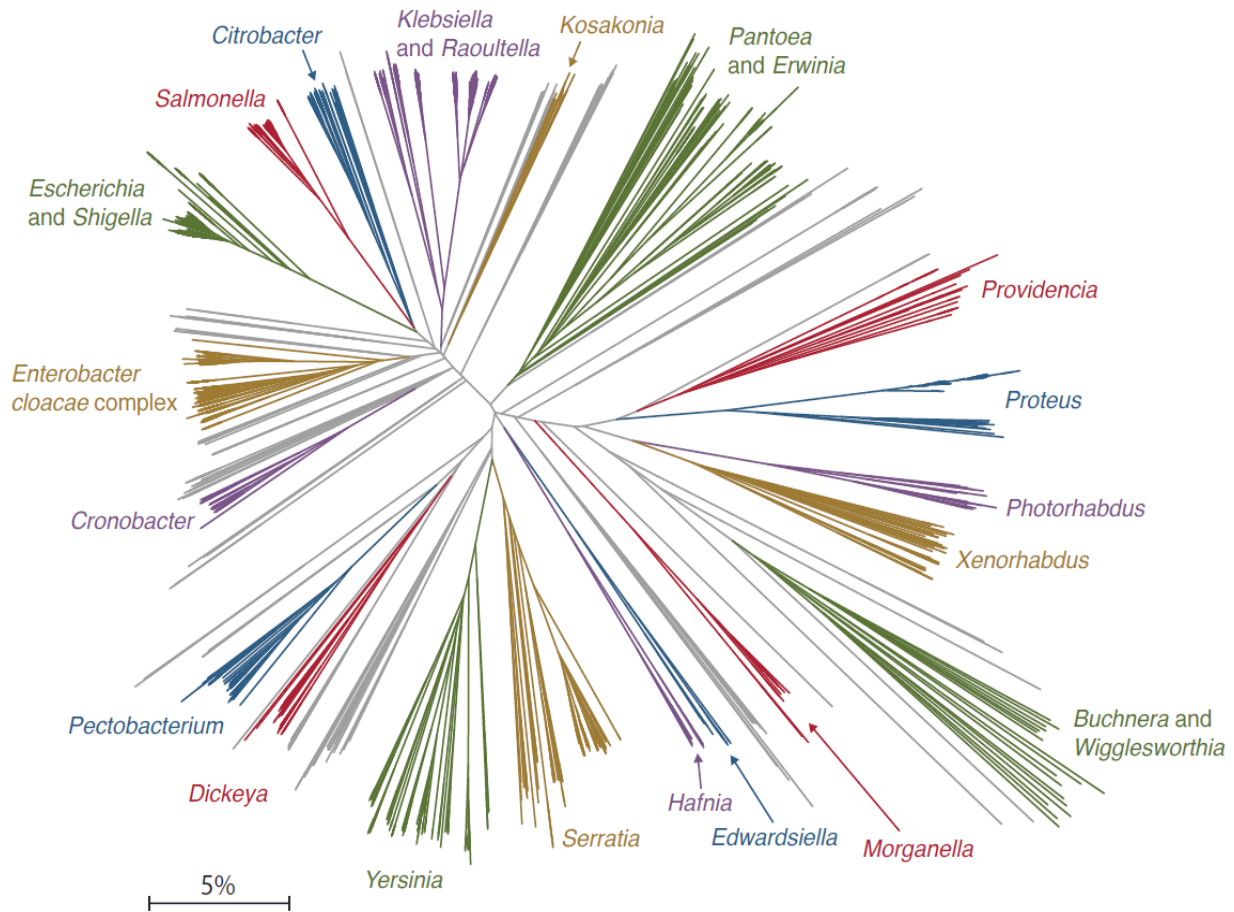
- *Morganella*
- *Arsenophonus Cosenzaea*
- *Moellerella*
- *Photorhabdus*
- *Proteus*
- *Providencia*
- *Xenorhabdus*

Семейство *Budviciaceae* е представено от родове:

- *Budvicia*
- *Leminorella*
- *Pragia*

Разред *Enterobacterles*, е една от таксономично най-разнообразните бактериални фамилии, признати до момента (Adeolu M et al., 2016). Редица различни родове в сем. *Enterobacteriaceae* са добре известни (а именно *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia spp*,

*Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Citrobacter* и др. (Naushad et al., 2014; Octavia & Lan, 2014; Zhang & Qiu, 2015; Zhang et al., 2016). На **Фиг.1** е показано генетичното отстояние при основните родове в разред *Enterobacterales*.



**Фигура 1.** Генетично отстояние при основните родове в разред *Enterobacterales* (<https://github.com/rrwick/Bacsort>)

Семейство *Enterobacteriaceae* е представено от :

**Род *Escherichia* и родове:**

- *Atlantibacter*
- *Biostraticola*
- *Buttiauxella*
- *Cedecea*
- *Citrobacter*
- *Cronobacter*

- *Enterobacillus*
- *Enterobacter*
- *Franconibacter*
- *Gibbsiella*
- *Izhakiella*
- *Klebsiella*
- *Kluuyvera*
- *Kosakonia*
- *Leclercia*
- *Lelliottia*
- *Mangrovibacter*
- *Pluralibacter*
- *Pseudocitrobacter*
- *Raoultella*
- *Rosenbergiella*
- *Saccharobacter*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Shimwellia*
- *Siccibacter*
- *Trabulsiella*
- *Yokenella*

### **Клинична значимост**

Някои от представителите на сем. *Enterobacteriaceae* са облигатно патогенни за човека, като напр. видовете: *Salmonella enterica*, *Shigella spp.* и *Yersinia spp.*, други са условно патогенни като *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.* и др. (Livermore et al., 2012).

Тяхната резистентност към бета-лактамните антибиотици е основен проблем за общественото здраве и бързото им откриване е от важно значение за правилното управление на инфекциите - както за правилната антимикуробна терапия, така и за контрола на инфекции (Rood IGH et al, 2017). Разпространението на полирезистентни ентеробактерии води до по-

високи нива на заболяемост, смъртност и свързани със здравеопазването разходи (Ghafourian S et al., 2015).

*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Enterobacter spp.* са сред най-честите проблемни Грам-отрицателни бактерии, поради продукцията на бета-лактамази, като бета-лактамази с широк спектър (ESBL) и карбапенемази, които могат да придадат резистентност съответно към цефалоспорини и карбапенеми (Mojić MF et al., 2020).

### 2.1.1. *E. coli*

*E. coli* е пръчковиден, Грам-отрицателен бактерий от семейство *Enterobacteriaceae*. Обитава главно долните отдели на чревния тракт на топлокръвни животни и хора и се изхвърля в околната среда чрез фекалии или отпадни води. Наличието на *E. coli* в околната сред е индикатор за фекално замърсяване.

За първи път е описан от Теодор Ешерих през 1885 г., като микроорганизмите са били приемани за безвредна, нормална чревна флора. След това е установено, че те се асоциират с широк диапазон от заболявания, като представителите на този вид могат да са коменсални *E. coli* (нормална микрофлора в долните отдели на чревния тракт) и да причиняват в нетипични, най-често стерилни ниши заболявания - екстраинтестинални *E. coli* (причинители са на урогенитални инфекции, неонатални менингити и голямо разнообразие от вътреболнични инфекции) и причинители на диарийни заболявания (асоциират се с определени серотипове) (Jafari M et al., 2012 ; Dale and Woodford, 2015).

*E. coli* е един от най-добре проучените бактерии. Повечето щамове от *E. coli* са подвижни перитрихи, притежават микрокапсули и адхезивни фимбрии. Видовата идентификация на *E. coli* се определя от: ферментацията на глюкоза, лактоза, трехалоза и ксилоза, продукцията на индол от триптофан, липсата на продукция на H<sub>2</sub>S, ДНКаза или фенилаланин дезаминаза и неизползването на цитрата като единствен въглероден източник. Може да расте бързо при оптимални условия на растеж, възпроизвежда се за ~ 20 минути, участва в производството на значителен брой ензими, витамин К и други метаболитни продукти, обект е на промишлената микробиология. Анализ на геномната последователност на *E. coli* за първи път е съобщен през 1997г. (Tenaillon et al., 2016). Оттогава повече от 4800 генома на *E. coli* са секвенирани (Tenaillon et al., 2016). Характеристиките на *E. coli*, като напр., че е бързорастящ, го правят подходящ за изследване еволюцията на микроорганизмите. Дългосрочно експериментално еволюционно изследване на *E. coli*, включващо повече от над 50 000 генерации продължава и понастоящем (Tenaillon et al., 2016).

*E. coli* – като причинител на диарийни заболявания води до повече от 2 милиона смъртни случая всяка година (Xu Y et al., 2018). Има шест добре проучени групи *E. coli*, 1) ентерохеморагични *E. coli* (ЕНЕС), 2) ентеропатогенни *E. coli* (ЕРЕС), 3) ентеротоксигенни *E. coli* (ЕТЕС), 4) ентероагрегативни *E. coli* (ЕАЕС), 5) дифузно адхерентни *E. coli* (ДАЕС) и 6) ентероинвазивни *E. coli* (ЕИЕС). (Xu Y et al., 2018). Тези щамове са класифицирани според факторите на патогенност и механизма, по който причиняват диарията (Xu Y et al., 2018).

**Ентерохеморагичните *E. coli*** могат да причиняват тежък хеморагичен колит и усложнения като хемолитично-уремичен синдром (Xu Y et al., 2018), водещи до остра бъбречна недостатъчност и често до смърт. *E. coli* O157: H7, най-известният серотип на ЕНЕС, причинява водни и хранителни натравяния в много страни. Честотата на не - O157 ЕИЕС се увеличава през последните години, включително тези от серотипове O26, O45, O103, O111, O121 и O145 (Fargokh C et al., 2013). **Ентеропатогенните *E. coli*** причиняват водниста диария при малки деца, включително могат да доведат до тежка опасна за живота дехидратация, като заразяването е предимно със храна и вода (Fargokh C et al., 2013). **Ентеротоксигенните *E. coli*** се асоциират с диарийен синдром при малки деца и възрастни в тропичния и субтропичния климат, както и при пътуващите. Те продуцират термолабилен токсин (*LT*), който е сходен по действие и аминокиселинна последователност с холерния токсин на *Vibrio cholerae*, както и термостабилен токсин (*ST*), които действат на тънките черва и са причина за обилна водниста диария. Най - често срещаните O антигени при тях са O6, O8, O25, O78, O128, O153 (Logan N et al., 2011). **Ентероинвазивните *E. coli*** предизвикват много сходно с дизентерията заболяване чрез директно проникване на микроорганизма в ентероцитите, инвазия и деструкция на чревната лигавица на дебелите черва. Те имат най-голяма генетична близост с *Shigella spp.* Инфекцията засяга, както възрастни, така и деца. Често изолатите са с O антигените: O28, O112, O121, O124, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159, O167, O173, O164 и др. (Mahon CR et al., 2007). Гените *ipaH* и *VirF*, свързани с инвазията, се намират във вирулентен плазмид (pInv) от 140 MDa, който кодира система за секреция тип III (Vidal M et al., 2005). **Ентерoadхерентните *E. coli*** включват две групи микроорганизми - дифузно адхерентни и ентероагрегативни. Ентероагрегативните са открити последни и се асоциират с персистираща до хронична водниста диария с повръщане и дехидратация. Те са на второ място по причиняване на диария на пътуващите след ЕТЕС. Агрегативността се дължи на агрегативен прикрепващ фактор (AAF), след което се образува биофилм. Бактериите секретират още антиагрегативен фактор, наречен dispersin (*aap*), който подпомага движението на бактериите към повърхността на клетките за специфична агрегация (Croxen&Finlay, 2010).

Някои щамове *E. coli* могат да причинят различни от чревните заболявания и се наричат екстраинтестинални патогенни *E. coli* (ExPEC). ExPEC включват уропатогенните *E. coli* и *E. coli* K1, причиняващ неонатален менингит. (Dale and Woodford, 2015). *E. coli* е най-честия и разпространен причинител на уроинфекции при човека, в над 80% при тези, асоциирани с обществото (Logan N et al., 2011). Щамовете *E. coli*, които причиняват уроинфекции, обикновено са част от чревната микрофлора и съществуват най-често като преобладаваща популация. Факторите на вирулентност при уропатогенните *E. coli* са обусловени от F1 или P пилите, чрез които те се прикрепват за епителните клетки на лигавицата и не могат да се изхвърлят с урината. Други фактори на вирулентност, които притежават са цитолизините - напр. хемолизина, който води до появата на бета-хемолиза при посявка на кръвен агар (Logan N et al., 2011). *E. coli* е част от нормалната чревна флора на топлокръвните животни, и той е подложен на антибиотичен натиск, в резултат на употребата на антибиотици в животновъдството (Looft T et al., 2012). Това води до хипотезата, че моделите на антибиотична резистентност на щамовете *E. coli* от различни гостоприемници могат да бъдат използвани за проследяване на произхода на гостоприемника (Harwood VJ et al., 2014). Природните среди, като вода, почви и особено пречиствателните станции, се считат за бактериални генетични реактори, в които се осъществява активен генетичен обмен. Гените, кодиращи антибиотичната резистентност, често се свързват с подвижни генетични елементи, като плазмиди и транспозони, които могат да се обменят между бактерии принадлежащи към различни филогенетични родове (Wellington EM et al., 2013). Много проучвания съобщават за мултирезистентни щамове *E. coli*, открити в околната среда, показващи възможни рискове за общественото здраве, произтичащи от човешки дейности (Dhanji H et al., 2011; Jang J et al., 2013).

*E. coli* се серотипизира въз основа на три вида соматични (O), капсулни (K) и флагеларни (H) антигени (Logan N et al., 2011). Това е от особено значение за *E. coli* като причинител на диарийни заболявания – определени серотипове се свързват с определена ентерогрупа. Според вирулентността си *E. coli* е класифициран и в няколко филогенетични групи: A, B1, B2 и D (Clermont O et al., 2000). Щамовете, принадлежащи към различна филогенетична група, показват различна патогенност (Gordon, 2004; Meric et al. 2013). Филогенетичните групи от *E. coli* показват също така различни нива на резистентност към антибиотици (Tenailon O et al., 2010; Brisse S et al., 2012). Групите A и B1 се асоциират по-често с коменсалните *E. coli*, а B2 и D с ExPEC (Pitout J, 2012). Всичките групи могат да причиняват диарийни заболявания. Все пак има случаи, когато B2 и D щамове се откриват и при здрави индивиди (Bailey JK et al, 2010). Въз основа на мултилокусно секвениране (MLST)

и данни за последователността на генома към основните филогенетични групи (т.е. А, В1, В2 и D), бяха включени новите групи С, Е, F, които са сравнително редки (Clermont O et al., 2013; Singh T et al., 2017)

Щамовете *E. coli* се различават и по други фенотипни характеристики, като способност за образуване на биофилми и използване на въглеродни източници (Cooper VS et al., 2000). В резултат на това и в комбинация с геномната рекомбинация, *E. coli* има невероятна способност да колонизира различни ниши и да оцелява там (Cooper VS et al., 2000).

Един от най-честите механизми на резистентност на *E. coli* е продукцията на ESBL - CTX-M-, SHV- и TEM ензими (D'Andrea MM at al., 2013). Най-често срещаните CTX-M ESBL, открити при хора по целия свят са CTX-M-15, който принадлежи към групата CTX-M-1, последван от CTX-M-14, принадлежащи към групата CTX-M-9 (D'Andrea MM at al., 2013). Другите CTX-M групи са по-географски ограничени, като CTX-M-2 групата обикновено се съобщава от Южна Америка и Япония, групата CTX-M-8 от Южна Америка и CTX-M-25 група от Израел (D'Andrea MM at al., 2013).

Хоризонталният трансфер на гените играе важна роля в придобиването на *bla*<sub>ESBL</sub> при *E. coli*, предимно чрез IncF плазмиди (Doi Y et al., 2012). За разпространението на продуцентите на CTX-M-15 играе голяма роля разпространението на вирулентни интернационални клонове като ST131. *E. coli* ST131 е преобладаващ в много страни в развития свят и е свързан с мултилекарствена резистентност и вирулентност, има способността лесно да се колонизира и (Doi Y et al., 2012) да се предава сред хората. Поради това се счита за най-значимият високорисков клон сред произвеждащите ESBL *E. coli* (Mathers AJ at al., 2015).

### **2.1.2. Под *Klebsiella***

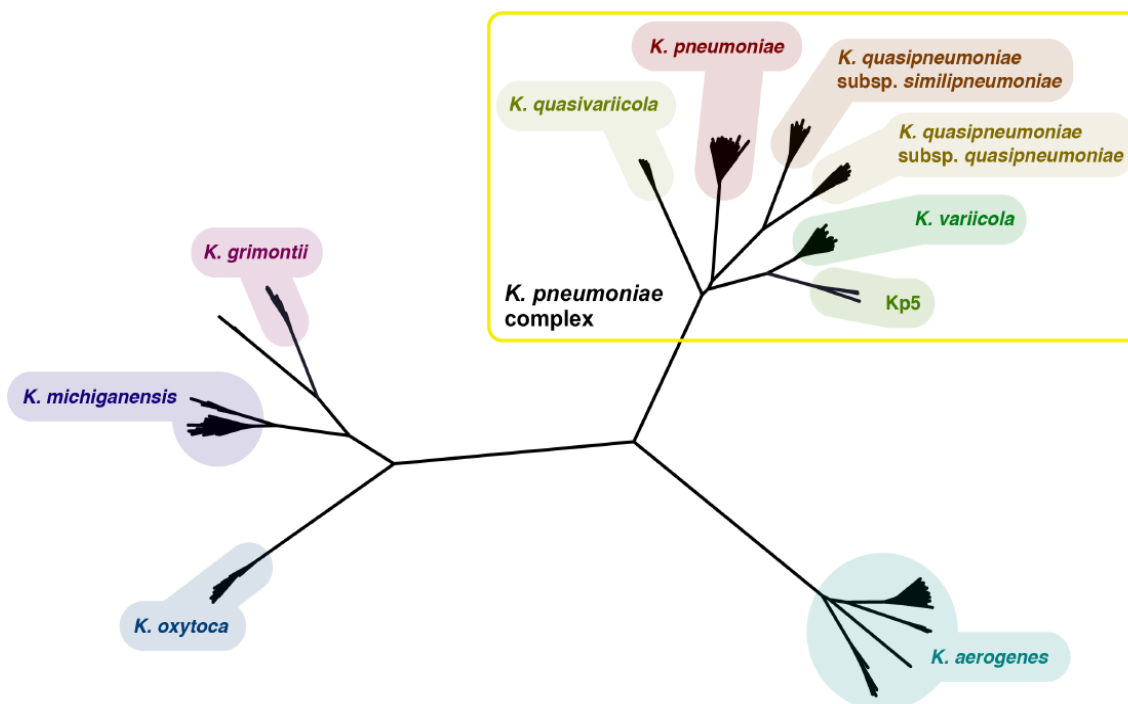
Още в края на 19 век (1882г.) А. Fritsch изолира капсулен бактерий от грануляционна тъкан и в секрет от горни дихателни пътища на болен, страдащ от риносклерома. Същата година Carl Friedlander изолира подобен микроорганизъм и от болен с пневмония, затова и първоначалното наименование на този микроорганизъм е *Bacillus Friedlander*. Десет години по-късно R. Abel установява причинителя на озената, а E. Klebs прави задълбочено проучване на тези бактерии и в негова чест родът е назван *Klebsiella* (Chong Y et al., 2018). До средата на 20 век клемсиелите не представляват особен медицински интерес, поради факта, че риносклерома и озена са редки заболявания, както и клемсиелната пневмония. С въвеждането на пеницилина и по-късно на други широкоспектърни антибиотици, етиологичната структура на инфекциите постепенно се променя и тези микроорганизми започват да придобиват все по-

голямо значение и постепенно се превръщат в едни от проблемните бактерии в медицинската практика (Chong Y et al., 2018).

Boye и Hansen чрез секвениране на 16S rDNA на род *Klebsiella* определят таксономичните отношения в рода заедно с други *Enterobacteriaceae* и род *Klebsiella* е разделен на 5 клъстера Клъстер I - *K. oxytoca*, Клъстер II - *K. terrigena*, Клъстер III - *K. planticola* и *K. ornithinolytica*, Клъстер IV- *Enterobacter aerogenes* (*K. mobilis*), Клъстер V- *K. pneumoniae* (Boye K & Hansen DS, 2003). *E. aerogenes* и *Klebsiella mobilis* се приемат за хомотипни синоними и *E. aerogenes* дори е бил включен като член на род *Klebsiella* в Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd, тъй като е по-близо до *K. pneumoniae*, отколкото до *E. cloacae* (Brady C et al., 2013). Съвременната класификация на род *Klebsiella* включва (Brisse S et al., 2014, Passet V, 2018).

- *K. aerogenes*, предишно наименование *Enterobacter aerogenes*
- *K. granulomatis*
- *K. oxytoca*
- *K. michiganensis*
- *K. pneumoniae* (type-species)
  - *K. p. subsp. ozaenae*
  - *K. p. subsp. pneumoniae*
  - *K. p. subsp. rhinoscleromatis*
- *K. quasipneumoniae*
  - *K. q. subsp. quasipneumoniae*
  - *K. q. subsp. similipneumoniae*
- *K. grimontii*
- *K. variicola*
- *K. Planticola*

Генетичните отстояния са показани на **Фиг. 2.**



**Фигура 2. Генетично отстояние при 9 вида *K pneumoniae***

*K. pneumoniae* е Грам-отрицателен бактерий. Представителите на този род демонстрират вариабилни биохимични реакции: използват цитрата като единствен въглероден източник, не продуцират  $H_2S$ , хидролизират уреята. Всички дават отрицателна реакция с метил - род тест и положителна с Фогес - Проскауер тест, с някои изключения (*K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *K. grimontii*) не произвеждат индол.

Повечето от видовете се откриват в околната среда и растенията. *K.pneumoniae* видовете могат да колонизират стомашно-чревния тракт и назофаринкса. Животните могат да бъдат асимтомни носители. С инфекции при човека се свързват основно *K. pneumoniae* видовете (предимно *K. pneumoniae sensu stricto* в 80-85% и на много по-рядко *K. variicola* и *K. quasipneumoniae* ) и на второ място *K. oxytoca*. Изолатите *K. pneumoniae* са условно патогенни и могат да причинят различни вътреболнични инфекции, напр. пневмония, уроинфекции и инфекции на кръвообращението, предимно при тежко болни и имунокомпрометирани пациенти. Те често са мултирезистентни. Съществуват и представители, които могат да причинят тежки инфекции, включително пиогенен чернодробен абсцес, ендофталмит и менингит – напр.: хипервирулентните *K. pneumoniae* K1 изолати (Chong et al., 2018).

*K. pneumoniae* изолатите представляват голям проблем предимно чрез продукцията на ESBL и/или карбапенемаза. Комбинацията на гените за бета-лактамази със гени, кодиращи

устойчивост и към другите групи антимикробни средства прави инфекциите голям терапевтичен проблем. *K. pneumoniae* е част от ESKAPE патогените: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*, които са разпределени в тази група според нарастващата им резистентност към антимикробни средства (Chong et al., 2018). Те са водеща причина за нозокомиални инфекции (Davin-regli A et al., 2019). В последните години нараства резистентността на *K. pneumoniae* към карбапенемите. От ~9 000 инфекции, дължащи се на карбапенем-резистентни ентеробактерии, видовете *Klebsiella* са отговорни за около 80% от тях (ECDC, 2014). Много често гените, кодиращи карбапенемази са разположени плазмидно, което увеличава вероятността за пренос. *K. pneumoniae* карбапенемазе (КРС)  $\beta$ -лактамазите са карбапенемази от клас А, със серин в активния център, и са най-честите карбапенемази, откривани при *K. pneumoniae*. Често се установява и другия вид серин активна карбапенемаза – ОХА-48, както и металобета-лактамазата NDM-1 (Kelly AM et al., 2017).

*K. pneumoniae* се характеризира още и с увеличаваща се устойчивост към colistin. Тя може да се дължи на мутации в регулаторните гени като *mgrB*, които регулират модифицирането на бактериалния липид А (Poirel et al., 2014), или двукомпонентните системи PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ. Плазмид-медираната резистентност се дължи на продукцията на ензими фосфоетаноламин трансферази, които модифицират липополизахаридите. Те се кодират от *mcr* гените. През 2015 г. беше открита медирана от плазмид резистентност към colistin в изолат *E. coli* в Китай (Liu Y et al., 2016), представен от генът *mcr-1*. Разпространението на *mcr-1* в *K. pneumoniae* изолати в Китай е рядкост и той се открива по-често в *E. coli* (Quan J et al., 2017). Първият доклад за *mcr-1* в *E. coli* в САЩ е през 2016 г. (McGann P et al., 2016). През септември 2016 г. е установен и такъв изолат *K. pneumoniae* (Chen X et al., 2017).

### 2.1.3. Род *Enterobacter*

Родът *Enterobacter* включва факултативно анаеробни Грам-отрицателни бактерии, подвижни перитрихи и принадлежат към семейство *Enterobacteriaceae*. Понастоящем над 20 вида принадлежат към рода *Enterobacter*. Тези видове са описани в околната среда и са докладвани като опортюнистични патогени по растения, животни и хора.

За първи път е описан през 1960 г., като таксономията на рода е променяна непрекъснато.

Към днешна дата в рода *Enterobacter* има над 20 вида: *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. solvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E.*

*radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae* и *E. turicensis*. Седем от тези видове са групирани в *Enterobacter cloacae complex*: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori* и *E. nimipressuralis*. Тази номенклатура се основава на фенотипни и особено на генотипни характеристики, определени от хибридизациите на ДНК-ДНК на целия геном.

Благодарение на използването на съвременни молекулярни техники, родът е претърпял модификации в класификацията и няколко вида са прехвърлени към и от този род. Например четири вида, първо идентифицирани като *Enterobacter* са прекласифицирани към рода *Kosakonia* (*E. cowanii*, *E. arachidis*, *E. oryzae*, и *E. radicinintans*), *E. intermedium* е прекласифициран в род *Kluuvera*, и *E. sakazakii* е прекласифициран в род *Cronobacter* (Brady C et al., 2013). Освен това все още се обсъжда таксономично положение на *E. aerogenes*. От 1971 г. предложението за прекласификация в род *Klebsiella* като *K. aerogenes*, *K. mobilis* или *K. aeromobilis*, поради неговата подвижност остава неуредена (Diene SM et al., 2013). Фенотипните разлики между *E. aerogenes* и род *Klebsiella* включват подвижност и наличието на орнитин декарбоксилаза и липсата на уреазна активност в *E. aerogenes*. Резултат от анализ на последователност на пълния геном потвърждава, че най-близкият до *E. aerogenes* вид е *K. pneumoniae* (Diene SM et al., 2013). По настоящем се приема наименованието *K. aerogenes* (Tindall B et al., 2017). Анализ на мултилокусната последователност (MLST) на гените, отчасти и секвенирането на 16S rRNA наскоро позволиха характеризирането на нови видове *Enterobacter*, изолирани при човешки инфекции или от растения (Sutton GG et al., 2018). Цялогеномните последователности на различните *Enterobacter spp.* са позволили преоценка на рода (Sutton GG et al., 2018). *E. cloacae complex cluster III* е предложено да се преименува на *E. cloacae spp. hoffmannii*, *E. hormaechei spp. hormaechei*, *E. hormaechei spp. oharae*, *E. hormaechei spp. steigerwaltii* се запазва и *E. xiangfangensis* е предложено да бъде подвид *E. hormaechei spp. xiangfangensis* (Sutton GG et al., 2018).

Родът *Enterobacter* се свързва с различни екологични местообитания. Тези бактерии се срещат в почвата и водата и се считат за фитопатогени за различни видове растения (Singh N et al., 2018). Освен това, *Enterobacter* може да бъде част от естествената микробиота на червата на животните и човека. Само някои подвидове/видове са били свързани с нозокомиални инфекции и огнища (Akbari M et al., 2016). Видове от род *Enterobacter* са членове на ESKAPE групата, които са описани като водеща причина за резистентни нозокомиални инфекции (Davin-regli A et al., 2019). *E. aerogenes*, *E. cloacae* и *E. hormaechei* представляват най-често изолираните видове, описани при клинични инфекции, особено при имунокомпрометирани пациенти и тези, хоспитализирани в интензивни отделения (Anastay M et al., 2013). Тези патогени често са свързани с мултирезистентност (MDR), поради адаптацията им към

болничната среда и способността им лесно да придобият множество генетични подвижни елементи, съдържащи гени за устойчивост и вирулентност. Те са с вродена устойчивост към ampicillin, amoxicillin, цефалоспорини от първо поколение и sefoxitin, поради продукцията на AmpC бета-лактамаза. Ензимите са индуцибелни и силни индуктури са клавулановата киселина, цефалоспорините. При някои изолати, в резултат на промени в AmpD гена тази продукция става конститутивна. Производството на бета-лактамази с разширен спектър, карбапенемази при тези бактерии затрудняват значително лечението им (Davin-Regli A et al., 2015).

#### **2.1.4. *Citrobacter freundii* complex**

Родът *Citrobacter* се състои от Грам-отрицателни, факултативни анаеробни, подвижни бактерии, с растеж на средата на Simmons (оттук и името му). Тези бактерии обикновено се намират във вода, почва, храна и чревните пътища на животни и хора. Има 11 генетично обособени вида в рода *Citrobacter* (Brenner DJ et al., 1993). Това са: *C. koseri* (по-рано описан като *C. diversus*), *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. freundii*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlakii* и трите неназовани групи (*Citrobacter* видове 9, 10 и 11). Комплексът *freundii* обхваща последните споменати осем вида *Citrobacter*. *Citrobacter* са свързани с различни инфекциозни заболявания. Наред с други, се съобщава за придобити в болницата бактериемии, ендокардити, инфекции на пикочните пътища, неонатален менингит и мозъчен абсцес. Етиологичното значение на *Citrobacter* при диарични заболявания е посочено като възможно в някои проучвания, но все още не е доказано (Zhou W et al., 2019).

## **2.2. Бета-лактамази**

Бета-лактамите са едни от най-често използваните антимикробни средства. Резистентността към тези антимикробни средства включва предимно продукцията на бета-лактамази, ензими които ги разграждат или промяна в пеницилин-свързващите протеини или пермеабилитетни промени. Бета-лактамазите са класифицирани в структурни класове (според Ambler) и функционални групи (на Bush-Jacoby-Medeiros) – **Табл. 1.**

**2.2.1. Клас А** ензимите притежават серин в активния център и са представени от класически бета-лактамази като **TEM** и **SHV** семействата. SHV-1, -11 и TEM-1, -2 са тясно спектърни бета-лактамази, които инактивират пеницилините и цефалоспорините първа генерация и се инхибират от бета-лактамазните инхибитори. SHV-1 ензимите се локализируют

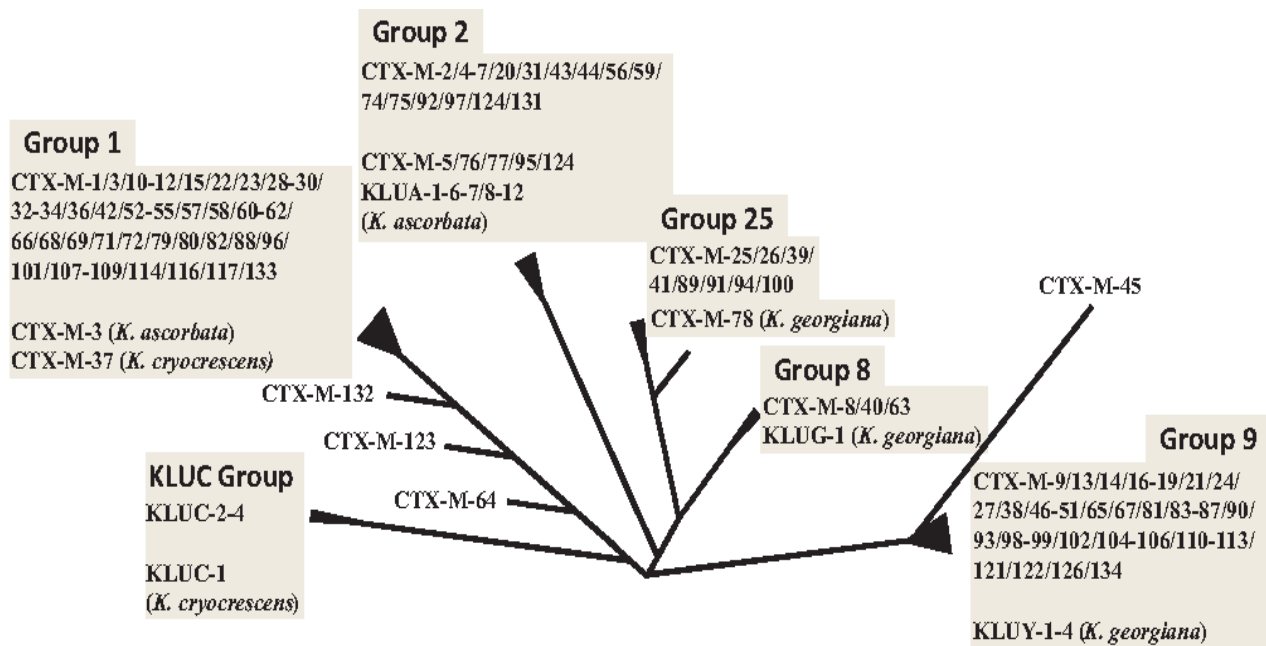
хромозомно при *K. pneumoniae*, в резултат на което те са с вродена резистентност към ampicillin (Bradford P et al., 2001; Ghafourian S et al., 2015). Останалите представители от семействата на TEM и SHV, са в състояние да инактивират включително и цефалоспорините трета генерация и затова са наречени бета-лактамази с разширен спектър (ESBL). Те се получават в резултат на различен брой точкови мутации на основните ензими. Клас А ензимите включат още и резистентните към инхибитори бета-лактамази най-често това са TEM варианти с понижена чувствителност към клавуланова киселина, сулбактам и тазобактам. Продуценти на TEM и SHV ESBL са широко разпространени до 2000 г, понастоящем те се докладват като единични изолати.

**CTX-M-групата бета-лактамази** са група ESBL, които се различават генетично от TEM и SHV ESBL. Като ново семейство CTX-M ESBL за първи път са докладвани през 1989г. в Германия - CTX-M-1 (cefotaximase-Munich) (Bauernfeind A et al. 1990). Тези ензими са все по-често докладвани през 90-те години на миналия век и до началото на 2000-те надминават TEM и SHV ESBLs като най-често идентифицираната група от ESBL. Шест групи от CTX-M ESBL са разпознати: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 и KLUC, като всяка група се различава с 10% по отношение на аминокиселинната последователност (D'Andrea MM et al., 2013) – **Фиг 3**.

Тези ензими споделят два общи признака: гените, които ги кодират вероятно произхождат от хромозомата на различни видове от род *Kluyvera*, който принадлежи към семейство *Enterobacteriaceae*, но рядко причиняват инфекции при хора, и тези ESBL преференциално хидролизират цефотаксим, с което се различават от TEM и SHV ESBLs. Интересното е, че *Kluyvera spp.* обикновено са чувствителни на цефалоспорини трета генерация, въпреки продукцията на CTX-M ензими (Canton R et al., 2012). Преносът на *bla*<sub>CTX-M</sub> гените се приема, че се дължи на мобилни генетични елементи (MGEs) като *ISEcp1* или *ISCR1*, които мобилизират тези генетични детерминанти в *Kluyvera* и ги пренасят към плазмидите и чрез тях в много видове ентробактерии. Някои от тези MGE осигуряват активни промоторни последователности, които позволяват засилена експресия на *bla*<sub>CTX-M</sub>, като по този начин придават клинично значимо ниво на резистентност към цефалоспорините трета генерация (Poirel L et al., 2005). CTX-M група ESBL сега са най-често срещаните ESBL в световен мащаб, докладват се както в развиващите се, така и в развитите страни (D'Andrea MM et al., 2013). Локализацията им е както плазмидна – напр. IncF, така и понякога се интегрират и в хромозомата (D'Andrea MM et al., 2013). Прескачането се подпомага от IS елементите. *E. coli* е най-често срещаният гостоприемник, следван от *K. pneumoniae*.

**Таблица 1. Класификация на бета-лактамазите**

Bush-Jacoby Group 2009	Bush-Jacoby Medeiros Group 1995	Ambler Class	Distinctive Substrate(s)	Inhibited by CA/TZB EDTA		Defining Characteristics	Representative Enzyme(s)
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater Hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyses cephamycins	<i>E.coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino- $\beta$ -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino- $\beta$ -lactams (ceftoaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino- $\beta$ -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime and ceftiofime	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyses cloxacillin or oxacillin and oxyimino- $\beta$ -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyses cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyses cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino- $\beta$ -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	3	B	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1



**Фигура 3.** Основни CTX-M групи (D'Andrea MM at al., 2013)

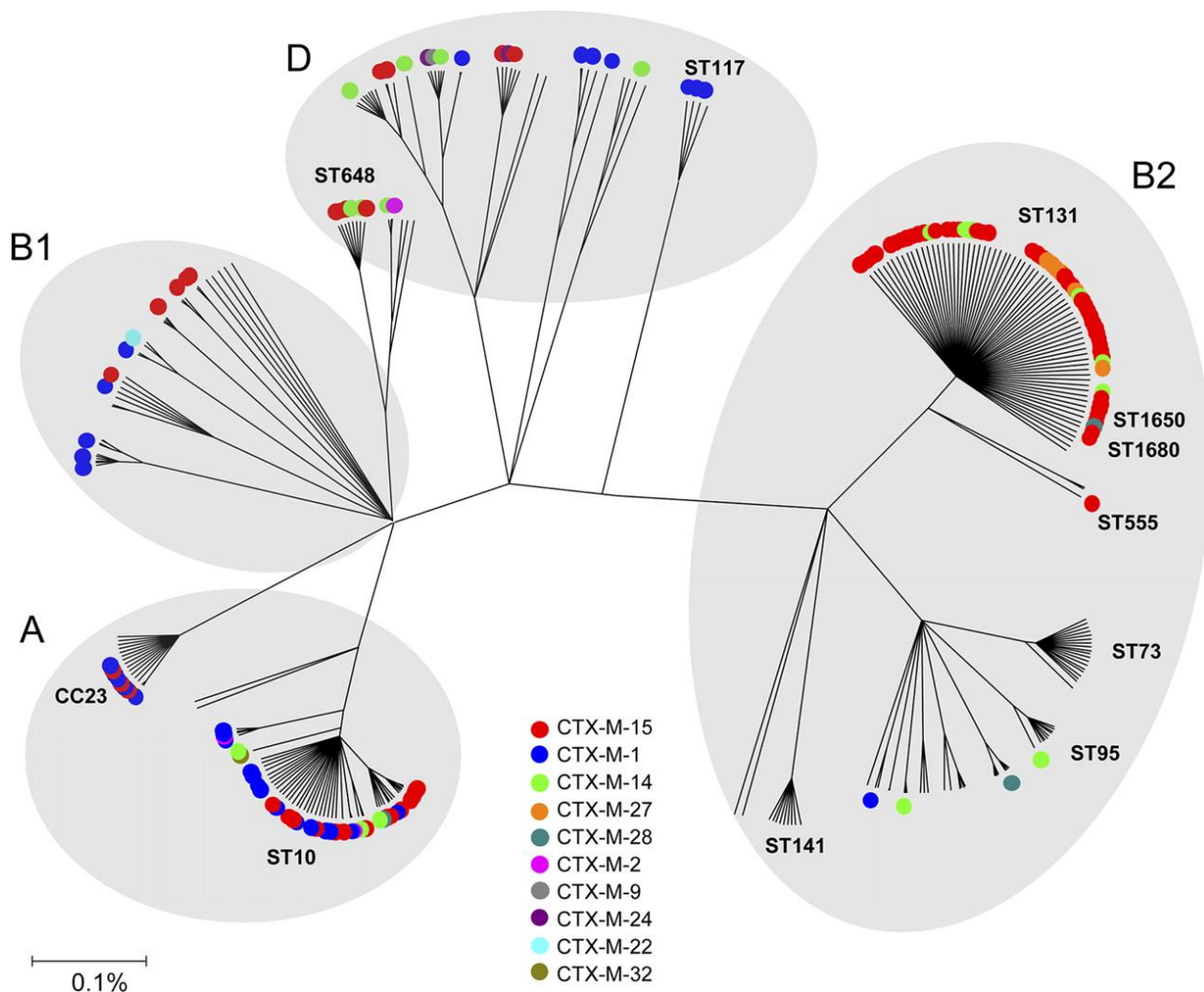
Типични примери за плазмидно разпространение са пандемичното разпространение на CTX-M-15 от IncFII плаزمиди (Coque TM et al., 2008; Partridge SR et al., 2011), разпространението на CTX-M-3 в Полша и други източно-европейски страни, дължащо се от IncL/M плазмиди (Baraniak A et al., 2002), разпространението на CTX-M-65 в Китай чрез F33: A-: B-тип плазмиди (He L et al., 2013) и разпространението на CTX-M-14 в Испания и Обединеното кралство чрез IncK плазмиди (Dhanji H et al., 2012).

От друга страна, свързването на CTX-M-кодиращи плазмиди с много успешни вирулентни клонални линии на *E. coli* и *K. pneumoniae* генерира редица така наречени "високорискови" мултирезистентни и вирулентни клонинги (Woodford N et al., 2011), които допринасят за бързото и глобално разпространение на ESBL от тип CTX-M. Най-парадигматичните примери са представени от пандемичният клон *E. coli* ST131 (филогенетична група B2), който допринася значително за глобалното разпространение на CTX-M-15 и се свързва с екстраинтестинални инфекции, включително инфекция на пикочните пътища, бактериемия (Peirano G et al., 2012) и менингит (Brisse S et al., 2012). *E. coli* ST131 е преобладаващ в много страни в развития свят и е свързан с мултилекарствена резистентност и вирулентност, както и има способността лесно да колонизира (Logan N et al., 2011) да се предава сред хората. Поради това се счита за най-значимият високорисков клон сред произвеждащите ESBL *E. coli* (Mathers AJ at al., 2015). *E. coli* клонове от клонални

комплекси ST405 и ST38 (филогенетична група D) са свързани с разпространението, както на CTX-M-15, така и на CTX-M-9 група ензими (главно CTX-M-9 и CTX-M-14), съответно (Naseer and Sundsfjord, 2011). В допълнение, *E. coli* ST10 (филогенетична група A), който е типичен член на микробиотата на червата на човека, но също е отговорен за чревни и извънчревни инфекции наскоро е свързан с разпространението на различни CTX-M групи (CTX-M-1, CTX-M-2 и CTX-M-9 групи). Определени ST типове се асоциират с определена филогрупа –

**Фиг 4.** Същата фигура показва и спектъра на CTX-M ензимите, произвеждани от тези щамове. Най-често срещаният CTX-M ESBL, открит при хора по целия свят е CTX-M-15, който принадлежи към групата CTX-M-1 (D'Andrea MM et al., 2013). Към тази група принадлежи и по-рядко изолирания ензим CTX-M-3. За разлика от CTX-M-1 и CTX-M-3 продуцентите, които показват устойчивост предимно към cefotaxime, изолатите, които произвеждат CTX-M-15 имат увеличени МПК на ceftazidime. Следващ по-честота е CTX-M-14 ензима, принадлежащ към групата CTX-M-9 (D'Andrea MM at al., 2013). Другите CTX-M групи са географски ограничени, като CTX-M-2 групата обикновено се съобщава от Южна Америка и Япония, групата CTX-M-8 от Южна Америка и CTX-M-25 група от Израел (D'Andrea MM at al., 2013). Освен TEM, SHV и CTX-M група ESBL, някои други групи от ESBL се идентифицират спорадично, но те остават сравнително редки (напр: GES, VEB, PER, SFO група ESBL).

Карбапенемазите от клас А могат да са: хромозомно кодирани (NMC-A, IMI – 1, SME) или плазмидни – (KPC, IMI – 2, GES). Клас А карбапенемазите най – често се срещат в *K. pneumoniae*, *E. cloacae* и *S. marcescens*. Характерно за тях е, че всички те ефективно хидролизират карбапенемите и инхибират клавулановата киселина и тазобактам. Биват 9 типа и се отнасят към 2f функционалната подгрупа на бета - лактамазите (Queenam A. M et al., 2007, Maurer F et al., 2015). IMI (“imipenem–hydrolyzing  $\beta$ -lactamase”) и NMC-A (“not metalloenzyme carbapenemase”) са изолирани от *E. cloacae* в САЩ, Франция и Аржентина (Miriagou V et al., 2010). IMI – 1 и NMC-A имат 97% идентичност със SME – 1 (Queenam A. M et al., 2007). SME – 1 ензимът (*S. marcescens* enzyme) за пръв път е изолиран в Англия през 1982г. от 2 изолата на вида (Queenam A. M et al., 2007, Fairfax MR et al, 2011). SME – 2 и SME – 3 бета – лактамазите се получават в следствие на точкова мутация. Тези ензими са изолирани от щамове *S. marcescens* на много места в САЩ. Гените на тези 3 бета – лактамази са хромозомно разположени. Ензимите хидролизират пеницилини, ранните цефалоспорини, aztreonam и карбапенемите, но не и широкоспектърни цефалоспорини и ceftazidime.



**Фигура 4. Филогенетично разпределение на ензимите CTX-M в *E. coli***

Sylvain Brisse et al. *J. Clin. Microbiol.* 2012;  
doi:10.1128/JCM.00919-12

**KPCs** (*K. pneumoniae* carbapenemase) са клинично най – често срещаните ензими от клас А карбапенемазите. Имат приблизително 45% аминокиселинно сходство със Sme – бета – лактамазите (Naas T et al., 1994, Miriagou V et al., 2010). Тези ензими се характеризират с плазмидна локализация и широко разпространение. Те не се инхибират от EDTA, а от борониева киселина и продуцентите им хидролизират всички бета-лактами.

Първият KPC продуцент – KPC–1, е идентифициран в *K. pneumoniae* през 1996 г. в Северна Каролина (Yigit H et al., 2001, Maurer F et al., 2015), като за няколко години вече се разпространява и в Пуерто Рико, Колумбия, Израел, Китай, Гърция, Южна Америка. KPC–2 е идентифицирана през 2003 г. в Балтимор в резултат на точкова мутация в KPC–1 (Miriagou V et al., 2010). KPC–2 е изолирана през 2004 в Ню Йорк, а през 2005 г. във Франция от пациент, който е бил в Ню Йорк на лечение (Bratu S et al., 2005). Изолати са докладвани и от Шотландия – KPC–4 карбапенемаза, Колумбия, Израел и Китай. Пренасянето чрез плаزمиди

на гените КРС определя най-бързото им разпространение от цялата 2f подгрупа. КРС – продуцентите се докладват най-често сред вътреболнични изолати *K. pneumoniae*. Изолати, придобити в обществото са открити в Израел преди няколко години. В даден географски район се срещат няколко клона на КРС (Nordmann P et al., 2012). Смъртността при инфекции с КРС – продуценти е много висока (> 50 %), което показва важността на скрининга за продуценти на тези ензими (Nordmann P et al., 2012). Гени, кодиращи IMI-2  $\beta$ -лактамаза, са открити в плазмид в *Enterobacter asburiae* в изолат от САЩ и на плазмид в *E. cloacae* в изолат от Китай (Nordmann P et al., 2012). GES/ IBC семейството  $\beta$  – лактамази за пръв път е описано през 2001 г. с доклад за IBC – 1 (“integron borne cephalosporinase”) от изолат *E. cloacae* в Гърция (Giakkoupi P et al., 2000, Miriagou V et al., 2010) и GES-1 (“Guiana extended spectrum”) от изолат *K. pneumoniae* от френска Гвиана (Poirel L et al., 2002). Макар и да се изолират сравнително рядко GES ензими се докладват от цял свят.

**2.2.2. Клас В** ензимите са металоензими, които съдържат цинков йон в активния им център. Повечето метало-бета-лактамази (MBL) са в състояние да хидролизират всички класове  $\beta$ -лактами без монобактамите и не се инхибират от повечето инхибитори на бета-лактамази като clavulanova киселина, sulbactam, tazobactam и avibactam. Най-често срещаните метало-бета-лактамази са VIM (Verona integron metallo- $\beta$ -lactamase) и IMP. Наскоро се появи и New Delhi MBL (NDM – 1). NDM, VIM и IMP са сред най-важните клинично значими метало-бета-лактамази с карбапенемазна активност. Механизмът на действие на хидролиза зависи от взаимодействието на бета – лактамните антибиотици с цинковите йони в активния център на ензима. Те са обособени в клас В по Ambler или в група 3 по Bush въз основа на субстратния профил, чувствителността им към EDTA и други хелатни агенти и липсата на инхибиране от вещества, които дезактивират сериновите ензими като борониева киселина. Първите изучени метало-бета-лактамази са хромозомно кодирани и се срещат в *Stenotrophomonas maltophilia* (Nordmann P et al., 2012). В последните години се наблюдава сериозно увеличаване на разпространението на метало-бета-лактамазите чрез подвижни генетични елементи – напр. клас 1 интегрони (Tsakris A et al., 2007, Nordman P et al., 2014). VIM – 1 ензимът за пръв път е изолиран през 1997г. във Верона, Италия, а VIM – 2 през 1996г. във Франция (Miriagou V et al., 2010). VIM – 2 е най-често докладваната MBL в световен мащаб (Bush K et al., 2010). Изолати, експресиращи VIM-2, могат да са чувствителни на aztreonam (Miriagou V et al., 2010).

IMP – 1 е открита върху интегрон от изолат *S. marcescens* в Япония (Bush K et al., 2010). Този ензим хидролизира пеницилини, цефалоспорини и карбапенеми, инхибира се от EDTA, но не

и от клавуланова киселина. NDM – 1 MBL е изолирана за пръв път през 2008 г. от пациент в Швейцария, който преди това е хоспитализиран в Ню Делхи, Индия (Maurer F et al., 2015). Основен резервоар е Индия, Шри Ланка, Пакистан (Maurer F et al., 2015) като напоследък се приема че Балканските страни са възможен втори резервоар (Nordmann P et al., 2012). От средата на 2010г. NDM – 1 продуценти са докладвани от всички континенти. Тези продуценти се характеризират с много високи нива на резистентност, голяма част от които са чувствителни само на tigecycline, colistin и отчасти на fosfomycin. NDM – 1 MBL най-често се докладват при изолати *E. coli* и *K. pneumoniae*. Сред метало-бета-лактамазните продуценти преобладават болнични мултирезистентни щамове *K. pneumoniae*. Смъртността при инфекции, предизвикани от тях може да достигне до 67 % (Nordmann P et al., 2012).

### 2.2.3. Клас С AmpC β-лактамази

Към клас С спадат хромозомните и плазмидни AmpC ензими. Нарастващото разпространение на щамове, произвеждащи ESBL, понастоящем е свързано с производството на AmpC β-лактамази. Тези ензими са индуцибелни цефалоспоринази, принадлежащи към Ambler Клас С (Oliveira C et al., 2019) с хидролитична активност срещу пеницилини и цефалоспорини до 3-та генерация и sefoxitine и чувствителност към цефалоспорини от четвърто поколение (seferime и ceftrirom). AmpCs се различават от ESBL в хидролитичното им действие върху цефамицините (sefoxitin и cefotetan) и нечувствителността към клавуланова киселина. За разлика от ESBLs ензимите, AmpCs се инхибират само от cloxacillin или борониева киселина (Oliveira C et al., 2019).

При видовете *Enterobacter spp.*, *C. freundii*, *M. morgani*, *H. alvei* и др. AmpC ензимите са хромозомно кодирани. Те са индуцибелни и силни индуктури са клавулановата киселина и цефалоспорините първа и трета генерация. Индукцията води до хиперпродукция на ензима и така изолатите загубват чувствителността си към цефалоспорини до 3-та генерация и sefoxitine. При някои изолати, в резултат на промени в AmpC гена тази продукция става конститутивна. В последствие гените, кодиращи тези ензими намират път към плазмидите и чрез тях се разпространяват в изолати *E. coli*, *K pneumoniae*, *P. mirabilis* и др. (Jacoby G.A et al., 2009). Основните групи плазмид-медиранни AmpC ензими са CMY, DHA, FOX, MOX, MIR, ACC и др. Те могат да съществуват съвместно с ESBL ензими, като напр. в *E. coli*, увеличавайки тяхната експресия CMY-1 е открит в Южна Корея (1989) и е първата плазмид-медиран AmpC (Jacoby G.A et al., 2009). CMY-2 ензимът се счита за най-разпространения вариант (Jacoby G.A et al., 2009; Oteo J et al., 2010).

**2.2.4. Клас D** включва OXA ензимите, които могат да бъдат тясноспектърни OXA-1 и OXA-10, които хидролизират cloxacillin, широкоспектърни варианти, членовете на които са в състояние да разграждат пеницилини, цефалоспорини включително и трета генерация. Клас D включва и 2 типа ензими с карбапенемазна активност: OXA-48 и OXA-48 like ензимите. Тези карбапенемази са обединени в 9 подгрупи. Тези ензими могат да се продуцират от ентеробактериите и *A. baumannii*. Първата OXA карбапенемаза е изолирана през 1985 г. от щам *A. baumannii* от пациент в Единбург, Шотландия (Bush K et al., 2010). Първият съобщен щам с OXA – 48 тип карбапенемаза е *K. pneumoniae*, продуциращ OXA–48, който е плазмидно кодиран (Турция, 2003г.). Оттогава OXA–48 продуцентите често са докладвани като източник на нозокомиални инфекции в Турция (Albiger B et al., 2015). Разпространението на тези продуценти вече включва Европа, южните и източните части на Средиземноморието и Африка. OXA–181 е аналог на OXA–48 възникнал в резултат на точкова мутация. Идентифицирана е в щамове от Индия, Испания, Холандия, Франция, Германия, Англия (Albiger B et al., 2015). Характерно за OXA–48/OXA–181 е, че слабо хидролизират карбапенемите и широкоспектърни цефалоспорини като ceftazidime и aztreonam. Активността им се инхибира от клавулановата киселина или EDTA (Nordman P et al., 2012)

### **2.3. Разпространение на ESBL/карбапенемаза продуценти в обществото**

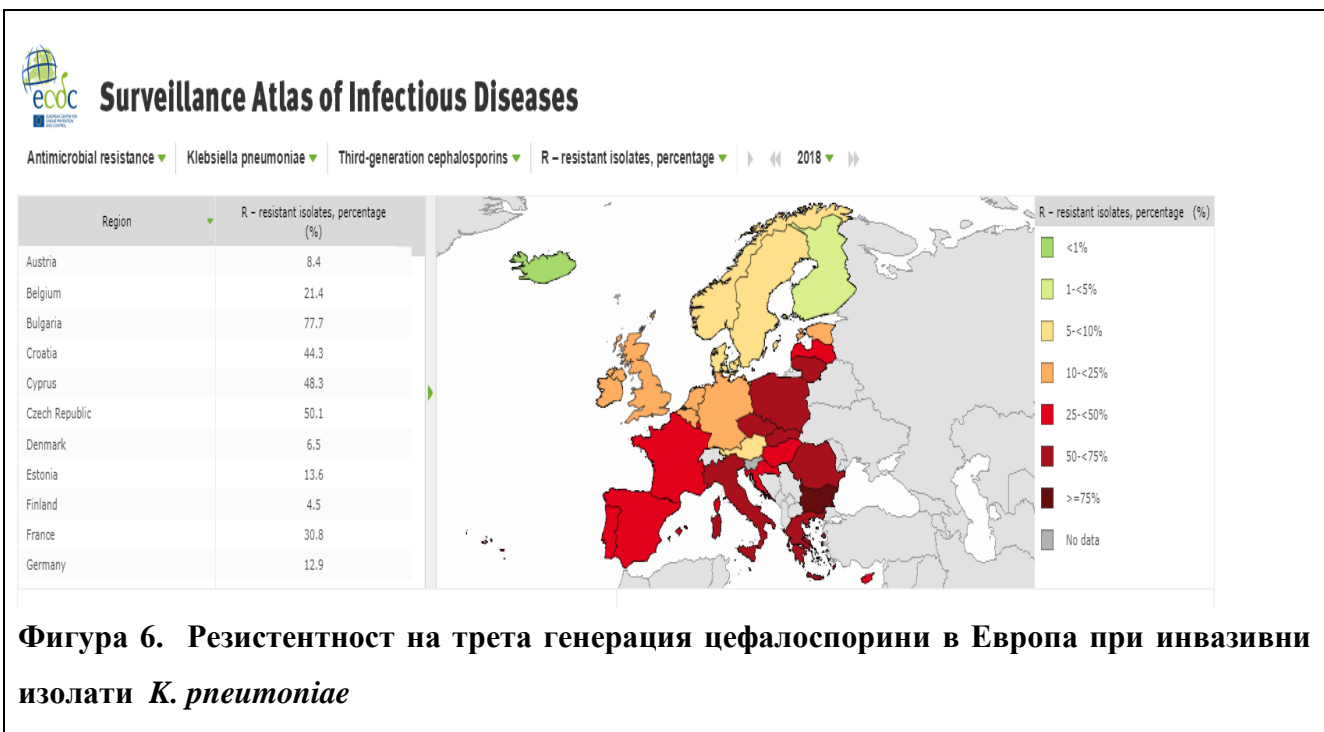
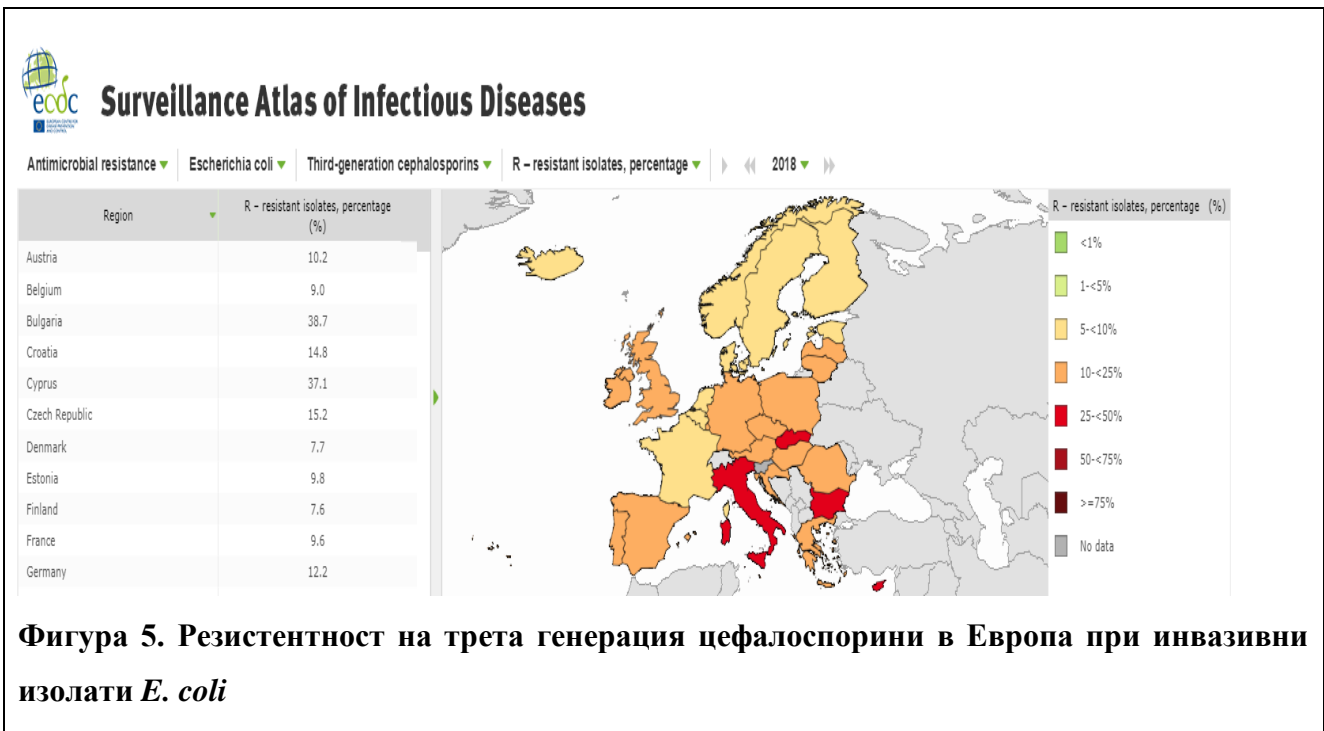
През първото десетилетие от появата на ESBL-продуциращи *Enterobacteriaceae* се счита че те се срещат предимно в болници или други здравни и социални заведения като старчески домове (Jacoby GA et al., 1997). Въпреки това, докладите за инфекции с ESBL *E. coli*, възникващи сред пациенти без предишна хоспитализация, посещение в клиники за хемодиализа или получаване на домашни грижи, започна да се появява в началото на века (Arpin C et al., 2007). Всъщност това разпространение и изобилието от *E. coli*, произвеждащи ESBL, е една от определящите характеристики на епидемиологията на ESBL в развития свят през 21 век. Първите основни доказателства за тази епидемиологична промяна са представени в проучване в болница в Севиля, Испания между 2001 и 2002 г. Почти половината от случаите на инфекция с *E. coli*, произвеждащи ESBL, наблюдавани в болницата, представляват инфекции, възникнали в общността (Rodriguez-Bano J et al., 2004). Рисковите фактори за производството на ESBL включват: захарен диабет, скорошна употреба на флуорохинолони и прием в болница в рамките на предходната година. Подобни наблюдения са направени по същото време в Обединеното кралство (Woodford N et al., 2004), Италия (Brigante G et al.,

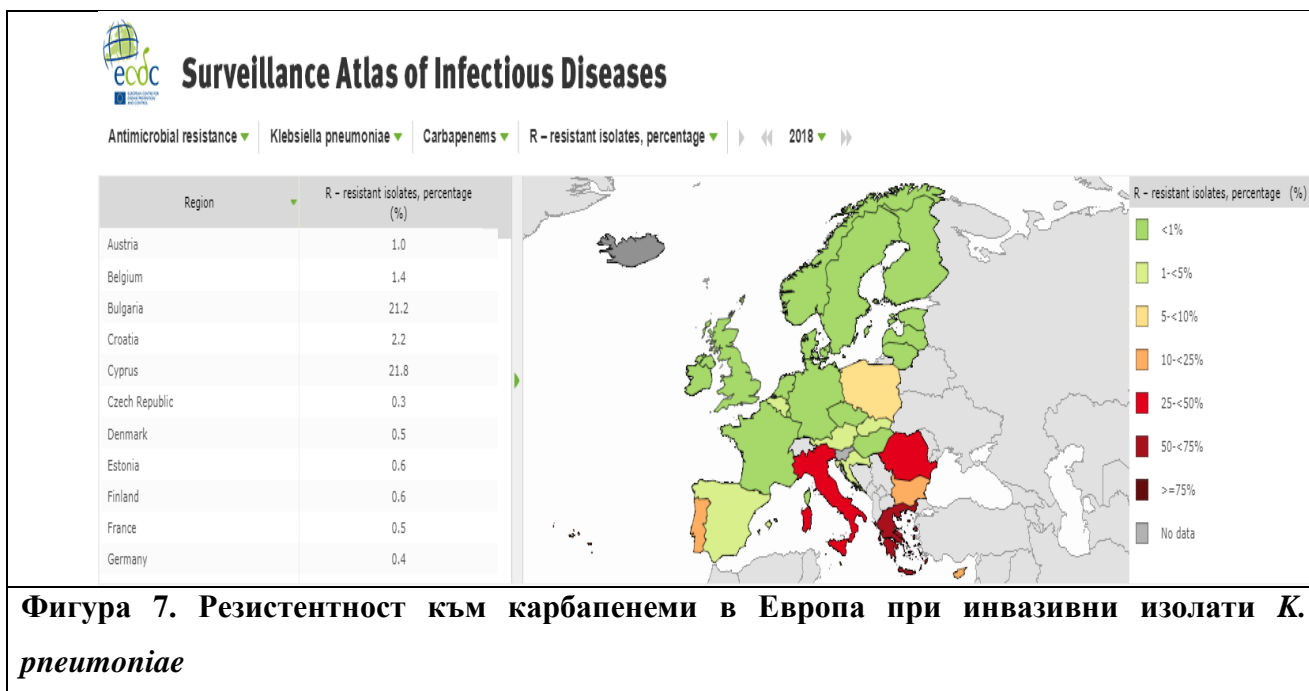
2005) и други страни, свързани с появата на СТХ-М продуцираща *E. coli* в обществото. Това явление се наблюдава по-късно в САЩ, както и в Северна Каролина (Doi Y et al., 2013), (Freeman JT et al., 2009). В последното проучване по-голямата част са ST131 и са носители на *bla*<sub>СТХ-М-15</sub>, демонстрирайки, че *E. coli* ST131 е движеща сила за разпространение на ESBL в общността (Doi Y et al., 2013), в допълнение към болниците и домовете за възрастни хора, които са били и продължават да бъдат другата основна екологична ниша при хората (Banerjee R et al., 2013).

#### 2.4. Разпространение на ESBL/карбапенемаза продуценти в болниците

Темповете на производство на ESBL постоянно се увеличават през последното десетилетие както за *E. coli*, така и за *K. pneumoniae* в развитите страни. Процентът на ESBL сред уropатогенни *E. coli* в американските болници се увеличава от 7.8% през 2010 г. до 18.3% през 2014 г., и достига 27.7% за нозокомиални щамове през 2014 г., по-голямата част от които произвеждат СТХ-М-15. Намалява и чувствителността срещу не-бета-лактамни средства, с чувствителност към флуорохинолони обикновено под 30% (Castanheira M et al., 2015). По-малко от 10% от *E. coli* и *K. pneumoniae* произвеждат ESBL в Канада, но показателите се увеличават (Denisuik AJ et al., 2013). В Япония, процентът на на ESBL е около 30% за *E. coli* и 10% за *K. pneumoniae* при използване на нивата на резистентност към cefotaxime (Japan Nosocomial Infections Surveillance. Annual open report 2014 (all facilities). 2016). Процентите са по-ниски в Австралия и Нова Зеландия, вариращи между 10 и 15% за тези видове (Mendes RE et al., 2013).

В Европа процентите на производителите на ESBL се различават значително за *E. coli* и *K. pneumoniae* в зависимост от регионите, с много ниски проценти, наблюдавани в страните от Северна Европа и много по-високи проценти, наблюдавани в Източна и Южна Европа държави (Jones RN et al., 2014). По данни от 2018 г. на ECDC, разпространението на резистентни на трета генерация цефалоспорини за инвазивни изолати *E. coli*, България е на първо място с 38.7%, следвана от Кипър - 37.1% и Италия - 28.7% за 2018г. (Фиг.5). Резистентността към цефалоспорини трета генерация при инвазивни изолати *K. pneumoniae* отново поставя България на първо място с 77.7%, за 2018 г. следвани от Гърция - 70.7% и Полша - 64.6% (Фиг.6). При разпространението на карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, България все още е на пето място сред европейските държави с 21.2%, след Гърция - 63.9%, Румъния - 29.5%, Италия - 26.8% и Кипър - 21.8% (Фиг.7).





## 2.5. Разпространение на ESBL и карбапенемази в България

Първата широкоспектрна бета-лактамаза в нашата страна беше докладвана през 1992г. (Keuleyan E et al., 1992). В проучване проведено в периода 1994 – 1997 г. в Националния онкологичен център 4.4% от 2 746 щамове показват позитивни резултати за ESBL продукция (Sabtcheva S et al., 2003). В него са доказани PER-1, SHV-2, SHV-5, SHV-12, TEM-3, TEM-15 ензимите при щамове *P. rettgeri*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* (Sabtcheva S et al., 2002). В следващите години бяха доказани щамове *K. pneumoniae*, продуценти на SHV-12 ензими (Jacoby G et al., 2003) в една болница в София.

При мащабно проучване на широкоспектрните бета - лактамази за периода 1996 - 2003 г. бяха доказани продуценти на TEM-139, SHV-2, SHV-5, SHV-12, CTX-M-3 и CTX-M-15 ензими в девет медицински центъра в София, Плевен, Стара Загора (Markovska R et al., 2008; Jacoby G et al., 2003). След появата на CTX-M-3 и CTX-M-15 ензимите през 2001 и 2002г. техният брой бързо се увеличи, като през 2008-2009г преобладаващ тип за България бяха CTX-M-15 ензимите (Markovska R et al., 2012).

В България в последните години бяха установени и продуценти на карбапенемази (NDM-1, VIM-1, KPC-2, OXA-48), (Markovska R et al., 2015; Poirel L et al., 2014; Todorova B et al., 2016). В болница “Света Марина” беше доказано разпространение на клон KPC-2 ST15 *K. pneumoniae*, и единични продуценти на OXA-48, KPC-2 и VIM-1 продуциращи *K. pneumoniae* (Markovska R et al., 2015), в София беше установен клон NDM-1 *E. coli* (Poirel L et al., 2014) и NDM-1 *K. pneumoniae* (Todorova B et al., 2016) и пак във Варна KPC-2 ST131 *E. coli* (Markovska R et al., 2017). В различни болници в страната се появяват изолати *P. mirabilis* – CMY-99, VIM-1 и SHV-12 продуценти (Markovska R et al., 2017). От две университетски болници във Варна бяха изследвани 27 *K. pneumoniae* и 16 *E. coli*, продуценти на ESBL (изолирани 2006, 2009) (Markovska R et al., 2008). При 97% от изолатите беше доказана продукцията на CTX-M. Изолатите *E. coli*, произвеждащи основно CTX-M-15 принадлежаха към два клона, от които един основен. Преобладаване на CTX-M продуцентите беше установено и при проучване на 51 щамове *K. pneumoniae* и 118 *E. coli* от три болнични заведения в София за периода 2008-2009 (Иванова Д и сътр., 2010). Бяха доказани и за пръв път в страната продуценти на CTX-M-1 и CTX-M-14 ензимите (Ivanova D et al., 2010).

В мащабно проучване върху 193 щамове (изолирани от 2001 до 2009) (Markovska R et al., 2008) в шест различни болнични заведения във София, Варна и Плевен бе доказано продуцирането основно на CTX-M-15 ензим, както и в проучване от 2003-2009г. с преобладаване на клона *E. coli* ST131 (Markovska R et al., 2012). В последната година бяха установени продуценти на карбапенемази от VIM и KPC групите (Markovska R et al., 2013). През 2013-2015г. бяха установени KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae* изолати, принадлежащи предимно на един клон ST15 във МБАЛ „Света Марина”- Варна (Markovska R et al., 2013; Markovska R et al., 2015). Продуценти на NDM-1 ензима от щамове *E. coli* бяха доказани в България (Poirel L et al., 2014), както и карбапенемазата OXA-48 от щамове *K. pneumoniae* в една болница в София (Markovska R et al., 2015, Sabtcheva S et al., 2015).

## **2.6. Методи за детекция на ESBL, AmpC и карбапенемаза продуценти – (EUCAST guideline, 2017)**

### **2.6.1. Препоръчителни методи за откриване на ESBLs в *Enterobacteriaceae***

В много области, детекцията и характеризирането на ESBLs е препоръчително или задължително за контрола на инфекциите. Препоръчителната стратегия за откриване на ESBL в *Enterobacteriaceae* е установяване на не-чувствителност към оксиимино-цефалоспорини, последвано от фенотипни (и в някои случаи генотипни) тестове за потвърждение.

Препоръчва се скрининг с гранични стойност  $> 1$  mg/L за cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime и cefpodoxime, в съответствие с указанията, издадени от EUCAST и CLSI (EUCAST guideline, 2017). Cefpodoxime е най-чувствителният цефалоспорин за откриване на продукция на ESBL и може да бъде използван за скрининг. Въпреки това, той е по-малко специфичен от комбинацията на cefotaxime (или ceftriaxone) и ceftazidime (EUCAST guideline, 2017) и само последните се използват при тестването за потвърждение на продукция на ESBL.

При представителите на сем. *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Raoultella spp.*, *P. mirabilis*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*) след установяване на устойчивост към някой от индикаторните антибиотици може да се приложи комбинирания диск тест - ceftazidime и ceftazidime/clavulanic acid, cefotaxime и cefotaxime/clavulanic acid. Може да бъде използван и двойно-дисквия тест за синергизъм.

При *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Hafnia alvei*), поради наличието на хромозомната AmpC  $\beta$ -лактамаза при тези видове е подходящо използването на ceferime и ceferime/clavulanic acid. Тъй като ceferime е стабилен към хидролиза на AmpC, той може да се използва при фенотипно изследване с клавуланова киселина.

### **Фенотипни методи за потвърждение на ESBL**

#### **А Комбиниран диск тест (CDT)**

Използват се дискове, съдържащи само цефалоспорин (cefotaxime, ceftazidime, ceferime) и дискове в комбинация с клавуланова киселина. Зоната на инхибиране на диска цефалоспорин 3/4та генерация/клавуланова киселина се сравнява със зоната около диска само с цефалоспорин 3/4та генерация. Тестът е положителен, ако диаметърът на зоната на инхибиране е  $\geq 5$  mm с клавуланова киселина, отколкото без (EUCAST guideline, 2017).

#### **Б. Двойно-диск тест за синергизъм (DDST)**

Дискове, съдържащи цефалоспорини 3/4та генерация (cefotaxime, ceftazidime, ceferime) се поставят върху петри до диск с клавуланова киселина (amoxicillin/clavulanic acid). Резултата е положителен, когато зоните на инхибиране около който и да е от цефалоспориновите дискове се увеличават или има "дупка на ключалката" в посока на диска, съдържащ клавуланова киселина. Разстоянието между дисковете е 20-30 мм от център до център и са оптимални с цефалоспоринови дискове 30  $\mu$ g;

#### В. Градиентен тест метод

ESBL градиентните тестове се интерпретират според инструкциите на производителя. Тестът е положителен, ако се наблюдава  $\geq$  от 8-кратно намаляване в MIC на цефалоспорина комбиниран с клавуланова киселина в сравнение с MIC на цефалоспорин самостоятелно или ако е налице зона или деформирана елипса. Резултатът от теста е неопределен, ако лентата не може да бъде разчетена, поради растеж отвъд MIC обхвата на лентата. Във всички останали случаи резултатът от теста е отрицателен. Според производителя, ESBL тест за градиент трябва да се използва само за потвърждаване на производството на ESBL и не е надежден за определяне на MIC.

#### Г. Микроразреждане на бульон

Микроразреждането на бульон се осъществява с катион - коригиран бульон Mueller-Hinton, съдържащ двукратни серийни разреждания на cefotaxime, ceftazidime и cefepime в концентрации от 0,25 до 512 mg/L, със и без клавуланова киселина при фиксирана концентрация от 4 mg/L. Тестът е положителен, ако  $\geq$  8-кратно намаление, наблюдавано в MIC на всички цефалоспорини, комбинирани с клавуланова киселина в сравнение с MIC само на този цефалоспорин, в противен случай резултатът от теста се интерпретира като отрицателен (EUCAST guideline, 2017).

#### Д. Биохимични (колориметрични) тестове

Тестът за ESBL NDP (Nordmann/Dortet/Poirel) е описан първо през 2012 г. и използва cefotaxime като антимикробен индикатор, с тазобактам като инхибитор (Nordmann P et al., 2012). Провежда се в 96 ямкови плаки или в отделни епруветки. Промяна на цвета от червено до жълто е положителен тест. Тестът може да се използва директно с проби на пациент (Dortet L et al., 2015). Описан е с отлична чувствителност и специфичност.

Тестовите за потвърждение на ESBL, които използват cefotaxime като индикатор цефалоспорин, могат да бъдат невярно положителни за щамове *K. oxytoca* с хиперпродукция на хромозомни K1 (подобни на OXY)  $\beta$ -лактамази. Подобен фенотип може да се срещне и при *P. vulgaris*, *P. penneri*, *C. koseri* и *Kluyvera spp.* и при някои видове, свързани с *C. koseri*, като *C. sedlakii*, *B. farmers* и *C. amalonaticus*, които имат хромозомни  $\beta$ -лактамази, които са инхибирани от клавуланова киселина. Друга възможна причина за фалшиво-положителни резултати е хиперпродукция на SHV-1-, TEM-1- или OXA-1 подобни на  $\beta$ -лактамази с широк спектър, комбинирани с променена проницаемост. Подобни проблеми с фалшиво-положителни резултати от теста за K1-продуциращ *K. oxytoca* или за OXA-1 продуцирането

на *E. coli* може да възникне и при използване на потвърдителни тестове само въз основа на ceferime (EUCAST guideline, 2017).

### **Фенотипно откриване на ESBL в присъствието на други β-лактамази, които маскират синергизма (EUCAST guideline, 2017)**

Неопределени резултати от градиентните тестове и фалшиво-отрицателни резултати от CDT, DDST и градиентните тестове могат да бъдат резултат от високо ниво на експресия на AmpC β-лактамази, които маскират наличието на ESBL (EUCAST guideline, 2017). Изолати с високо ниво на експресия на AmpC β-лактамази обикновено показват високи нива на резистентност към цефалоспоринови от трето поколение. В допълнение, наличието на резистентност към цефамидини, например ceftazidime с MIC >8 mg/L може да е показател за високо ниво на експресия на AmpC β-лактамази, с изключение на ACC β-лактамази. За да се потвърди наличието на ESBL в изолати с високо ниво на експресия на AmpC β-лактамази, се препоръчва да се извърши допълнителен тест за потвърждение на ESBL с ceferime като индикатор цефалоспорин, тъй като ceferime обикновено не се хидролизира от AmpC β-лактамази. Цефепимът може да се използва във всички CDT, DDST и градиентни тестове (EUCAST guideline, 2017). Алтернативните подходи включват използването на cloxacillin, който е добър инхибитор на AmpC ензимите. Наличието на ESBL може също да се маскира от карбапенеми като MBL или KPCs (но не и ензими, подобни на OXA-48) и/или пермеабилитентни промени. В такива случаи трябва да се използват молекулярните методи за откриване на ESBL (EUCAST guideline, 2017).

### **Генотипно потвърждение**

Златен стандарт е генотипното потвърждаване на наличието на ESBL гени, вариращи от PCR и секвениране до секвениране на целия геном.

### **2.6.2. Методи за доказване на карбапенемази при сем. *Enterobacteriaceae* (EUCAST guideline, 2017).**

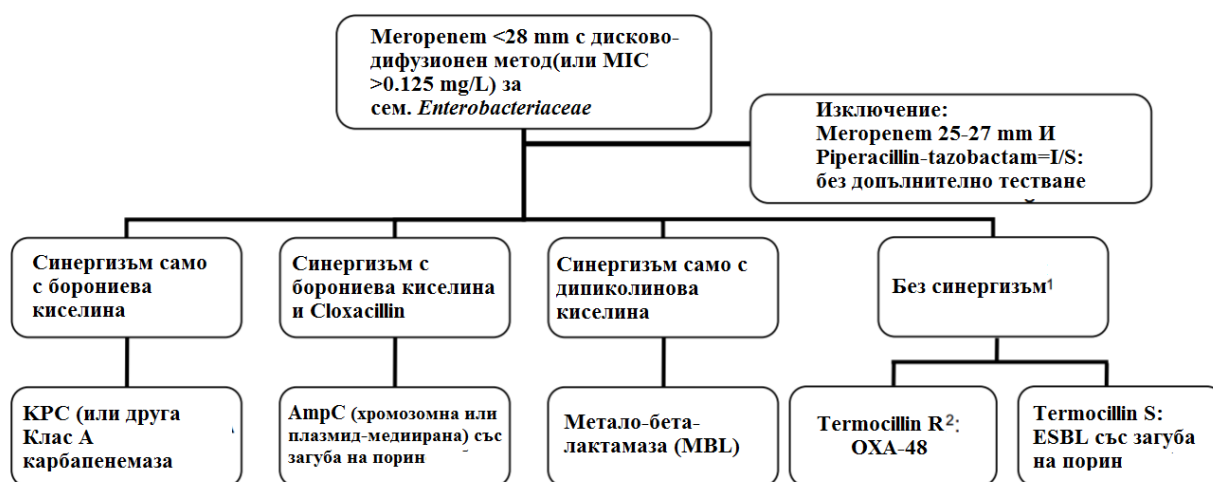
#### **1. Скрининг за доказване производството на карбапенемази**

За целта се използват MICs за карбапенеми като meropenem съчетава най-добрата чувствителност и специфичност. Ertapenem е с най-висока чувствителност, но има ниска специфичност, особено при видове като *Enterobacter spp.*, до сравнително ограничената нестабилност към β-лактамази с разширен спектър (ESBL) и AmpC β-лактамази със загуба на порин. Гранични стойности за откриване на предполагаеми продуценти на карбапенемаза са:

при meropenem MIC (mg/L) >0.125 и диаметър на зоната на диска <28, а при ertapenem MIC (mg/L) >0.125 и диаметър на зоната на диска <25.

## 2. Тестване на комбинация от дискове

Комбинираният дисков тест-метод се предлага в търговската мрежа от няколко производители и е първият фенотипен тест, който е наличен (MAST, UK; Rosco, Дания). Дисковете съдържат меропенем ± различни инхибитори. Накратко, борониевата киселина инхибира клас А карбапенемази, а дипиколинова киселина и етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA) инхибира карбапенемазите от клас В. Cloxacillin, който инхибира AmpC β-лактамазите, се добавя към тестовете, за да отдиференцира хиперпродукцията на AmpC плюс загубата на порин и производството на карбапенемаза. Най-добрият алгоритъм за интерпретация на тези инхибиторни тестове е описан на **Фиг.8** и **Табл. 2**. Основният недостатък на тези методи е, че те отнемат около 18-20 часа, поради което са въведени нови методи.



**Фигура 8.** Алгоритъм за детекция на карбапенемази

<sup>1</sup> Комбинацията от няколко карбапенемази също може да допринесе за липса на синергизъм - напр. MBL и KPC в комбинация. В такива случаи обикновено е необходимо молекулярно тестване.

<sup>2</sup> Високото ниво на устойчивост към темоцилин (> 128 mg / L, диаметър на зоната <11 mm) е фенотипен маркер за OXA-48.

Алгоритъмът в таблицата прави разлика между метало-β-лактамази, карбапенемази от клас А, карбапенемази от клас D и не-карбапенемази (ESBL и/или AmpC плюс загуба на порин).

Понастоящем няма налични инхибитори за ензими, подобни на OXA-48. Високо ниво устойчивост (MIC >128 mg/ L) към temocillin е предложен като фенотипен маркер за предполагаеми OXA-48-подобни производители на карбапенемаза. Присъствието на OXA-48 ензимите трябва да бъде потвърдено с други методи.

Според EUCAST guideline, 2017г не се препоръчва използването на класическия Hodge тест, тъй като резултатите са трудни за интерпретация, специфичността е лоша, а чувствителността е неоптимална (EUCAST guideline, 2017).

Описани са нови модификации на техниката, но те са по-трудни за използване в рутинните клинично-микробиологични лаборатории и не решават всички проблеми на чувствителността и специфичността. Модифицирания Hodge тест се прави като се прави разреждане 1:10 на стандартизирана до 0.5MF стандарт бульонна култура на *E. coli* ATCC 25922 на повърхността на Mueller-Hinton agar и се поставя диск мерорепем. Тестваните щамове се посяват като се изтеглят щрихи от диска мерорепем към края на петритото. След 18-24 часа култивиране издаването на растежа на контролния щам *E. coli*, около щрихата, като триъгълник, в зоната на инхибиране е положителен резултат за наличие на карбапенемаза.

**Таблица 2. Интерпретация на фенотипни тестове (карбапенемази в Bold шрифт) чрез дисково-дифузионни методи. Точните дефиниции са описани в различните търговски продукти.**

Бета-лактамази	Синергизъм, наблюдаван като увеличение зоната на диаметъра (mm) с 10µg Мерорепем диск				Termocillin MIC>128mg/L или диаметър на зона<11 mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
<b>MBL</b>	+	-	-	-	<b>Варибилен</b>
<b>KPC</b>	-	+	-	-	<b>Варибилен</b>
<b>MBL + KPC<sup>2</sup></b>	<b>Варибилен</b>	<b>Варибилен</b>	+	-	<b>Варибилен</b>
<b>OXA-48-like</b>	-	-	-	-	Да
AmpC + porin loss	-	+	-	+	<b>Варибилен</b>
ESBL + porin loss	-	-	-	-	Не

Съкращения: MBL = метало- $\beta$ -лактамаза, KPC = *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, DPA = дипиколинова киселина, EDTA = етилендиаминтетраоцетна киселина, APBA = аминокфенил борна киселина, PBA = фенил борна киселина, CLX = клоксацилин.

<sup>1</sup> Тестът за чувствителност към темоцилин се препоръчва само в случаите, когато не се открие синергизъм, за да се разграничат ESBL + загубата на порин и OXA-48-подобни ензими

### 3. Биохимични (колориметрични) тестове

Тестът CarbaNP е бърз (<2 h) тест за откриване на хидролиза на карбапенеми, който води до промяна на рН, което води до промяна на цвета от червено към жълто с разтвор на фенол род (Nordmann P et al., 2012; Dortet L et al., 2012). Carba NP тестът е валидиран с бактериални култури, растящи на Mueller-Hinton агар, кръвен агар, триптиказни соеви агарови среди и повечето селективни среди, използвани при скрининг на карбапенемаза продуценти. Carba NP тестът не трябва да се прилага с бактериални колонии от средите на Дригалски или МакКонки. Тестът има висока чувствителност и специфичност.

Производно от теста CarbaNP е тестът на Blue-Carba (BCT), който е биохимичен тест за бързо (<2 h) откриване на производството на карбапенемаза. Той се основава на *in vitro* хидролизата на *imipenem* чрез бактериални колонии (директна инокулация), която се открива чрез промени в рН стойностите, разкрити от индикатора бромтимол блу (син до зелен/жълт или зелен до жълт). В голямо проучване, извършено от Pasteran et al. (Pasteran F et al., 2015), но проведено в една лаборатория, е установено, че тестът има отлична чувствителност към ензимите от клас А и В, но неоптимална чувствителност за откриване на ензими OXA-48.

Третият биохимичен тест е  $\beta$  CARBA тест <sup>TM</sup>, който също може да се извърши за <2h. Тестът се провежда чрез смесване на 1 до 3 колонии в реагентите. Отчитанията трябва да се правят след максимум 30 минути инкубация. Промяната на цвета в жълто, оранжево или лилаво показва положителна реакция. Едно проучване установява, че препоръчаното от производителя време за 0,5 часа инкубация е твърде кратко за шамове, произвеждащи OXA-48. Друго проучване на  $\beta$  Carba test <sup>TM</sup> показва отлична ефективност за откриване на CRE и по-специално OXA-48. Възможността за откриване на други карбапенемази от клас А, обаче следва да бъде допълнително проверена и някои фалшиво-положителни резултати се проявяват с други  $\beta$ -лактамази, като свръхпродукция на K1  $\beta$ -лактамаза в *K. oxytoca* (Noël A et al., 2017).

#### 4. Карбапенем инактивационен метод (СІМ тест)

Принципът на този метод е да се открие ензимната хидролиза чрез инкубиране на карбапенем с антибактериална суспензия. СІМ тестът използва дискове за тестване на чувствителност към антибиотици на равни части. След два часа инкубация на бактерии с тегорепет диск, дискът се поставя върху агар, инокулиран с *E. coli* ATCC 25922. Тестът СІМ има променлива производителност при различни проучвания (van der Zwaluw K et al., 2015; Yamada K et al., 2016 ;Tijet N et al., 2016;), но остава възможна алтернатива, макар и с отрицателната прогноза. Един основен недостатък на тази техника е, че тя изисква обикновено най-малко 18 часа за получаване на резултатите.

#### 5. Детекция на карбапенеми чрез хидролиза с MALDI-TOF

Принципът е да се открие чрез (MALDI -TOF) намаляването или изчезването на определени специфични пикове на карбапенеми в мас-спектър, като бактериалната суспензия предварително се инкубира с карбапенем. Спектрите се измерват след изсушаване между  $m/z$  160 и 600, използвайки масспектрометър Microflex LT (Hrabák J et al., 2012). Методът има добра чувствителност и специфичност, но с изключение на ОХА-48-групата ензими. За да се промени този проблем,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  може да бъде добавен към реакцията, което е показано в едно проучване за подобряване на откриването на ОХА-48 (Papagiannitsis CS et al., 2015).

#### 6. Тестове за страничен поток

Наскоро е описан нов имунохроматографски анализ на страничния поток. Тестът се основава на имунологично улавяне на ОХА-48 епитопи с използване на колоидни златни наночастици, свързани с нитроцелулозни мембрани в устройството за страничен поток. Принципът на теста е като моноклонални анти-ОХА-48 антители, които са избрани като специфични улавящи реагенти за директна идентификация на ОХА-48 - като ензими (Pasteran F et al., 2016). Анализът отнема около четири минути (Dortet L et al., 2016).

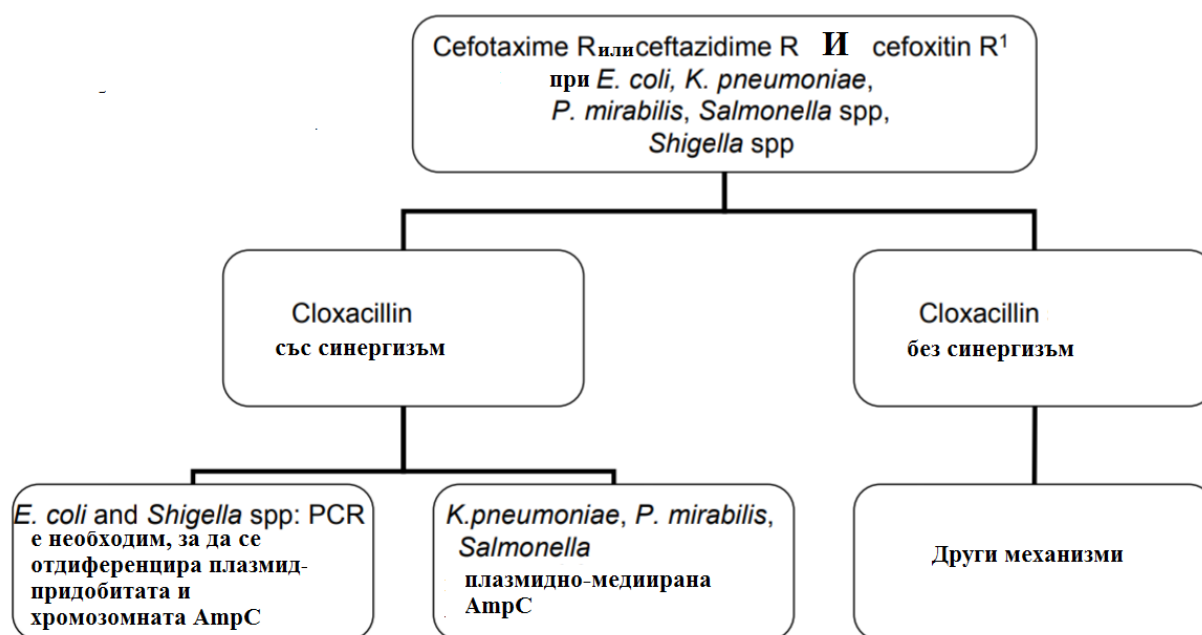
#### **2.6.3. Препоръчителни методи за откриване на придобити AmpC в *Enterobacteriaceae* (EUCAST guideline, 2017)**

Cefoxitin MIC > 8 mg/L (размер на зоната <19 mm), комбиниран с фенотипна резистентност към ceftazidime и/или cefotaxime (дефиниран чрез гранични стойности) може да се използва като фенотипни критерии за изследване на производството AmpC в група 1 *Enterobacteriaceae*, въпреки че тази стратегия не открива АСС-1, а плазмид-медирана AmpC, която не хидролизира cefoxitin (Bauernfeind A et al., 1999). Трябва да се отбележи, че

цефокситиновата резистентност може да се дължи и на поринов дефицит. На **Фиг. 9** е показан алгоритъма за AmpC детекция.

<sup>1</sup> Cefoxitin 'R' е при MIC > 8 mg/L или диаметър на зоната <19 mm. За cefotaxime и ceftazidime 'R' е резултатът, получен чрез използване на текущите cut-off стойности по EUCAST.

Фенотипните тестове за потвърждение на AmpC обикновено се основават на инхибирането на AmpC от всички производни на cloxacillin или борониева киселина. Производните на борониева киселина също инхибират клас А карбапенемази, както и някои пеницилинази от



**Фигура 9. Алгоритъм за AmpC детекция**

клас А като K1 и *K. oxytoca*. Използването на на тези методи е рядко, като са описани търговски достъпни тестове като Mast “AmpC, диск за откриване” (чувствителност 96-100%, специфичност 98% -100%), градиентен тест за откриване на AmpC, който понастоящем се предлага само от bioMérieux (чувствителност 84-93%, специфичност 70-100%) и Роско дискове с cefotaxime-cloxacillin и ceftazidime-cloxacillin (чувствителност 96%, специфичност 92%). За *E. coli*, тестовете за потвърждение на AmpC не могат да разграничават придобитите AmpC и конститутивно хиперпродукция на хромозомния AmpC. Наличието на придобити видове AmpCs също може да бъде потвърдено чрез PCR-базирани методи или чрез метода на базата на ДНК microarray (EUCAST guideline, 2017).

## 2.7. Чревният тракт - резервоар на ESBL (широкоспектърни бета-лактамаза) и карбапенемаза продуциращи ентеробактерии

Чревния тракт е един от основните резервоари за разпространение на широкоспектърни бета-лактамази (ESBL) и карбапенемази от сем. *Enterobacteriaceae*. Те се доказват с нарастваща честота в целия свят, както в развиващите се, така и в развитите страни. Основните рискови фактори за увеличаване на разпространението им чрез чревния тракт са: неправилната употребата на антимикробни средства, продължителния болничен престой, инвазивните процедури, престоя в интензивни отделения, имунодефицитните състояния, съпътстващите заболявания, употребата на инхибитори на протонната помпа, диария. Бързото увеличаване на микроорганизмите, произвеждащи бета-лактамази и респективно нивата на колонизация с тях вероятно е многофакторно като допринасящи източници още са животните (както консумацията на месо, така и отглеждането им като домашни любимци), околната среда, пътуванията до развиващите се страни и директно предаване в рамките на домакинствата и обществото, също така и вегетарианската диета.

Контрола на инфекциите с ESBLs/карбапенемаза продуцентите, поради многофакторната природа на широкото им разпространение, проблемната терапия, високата смъртност, заедно с трудностите на лабораторната им идентификация поставя сериозен проблем пред клиницистите и микробиолозите и налагат детайлно проучване на пътищата на предаване на ESBL и карбапенемаза продуцентите .

Разпространението на ESBL/карбапенемаза продуциращи ентеробактерии е от първостепенно значение, тъй като инфекциите, причинени от тях, водят до увеличаване на разходите за здравеопазване, продължителност на престоя в болниците и смъртността (Maslikowska JA et al., 2016). Увеличената честота на тези продуценти на първо място се дължи на клонални огнища в здравните заведения (в миналото произвеждащи TEM- и SHV ензими, а сега CTX-M и/или карбапенемазите NDM, KPC, VIM, OXA и др.) (Tacconelli E et al., 2014). Фекалното носителство на ESBL/карбапенемаза продуциращи *Enterobacteriaceae* често предхожда или следва появата на инфекции, причинени от полирезистентните ентеробактерии. Чревната микробиота се счита за основен източник на разпространението на ESBL произвеждащи ентеробактерии (Carlet J, 2012) . Промени в състава на чревната флора, най-често в резултат на употреба на антибиотици може да доведе до появата на силно устойчиви бактерии, включително полирезистентни, които могат да останат безсимптомно с месеци в червата на носителя, и така да бъдат пренесени в обществото от човек на човек.

Много доклади подчертават голямото значение на доказването на чревните носители на тези устойчиви микроорганизми (Ríos E et al., 2017; Miró E et al., 2005; Luvsansharav U-O et al., 2012; Wickramasinghe NH1 et al., 2012). Тези наблюдения мотивират многобройни проучвания, насочени към идентифициране на източника на ESBL/карбапенемаза произвеждащи *Enterobacteriaceae* и проследяване на нивата на чревната колонизация с тези организми.

### 2.7.1. Честота на чревното носителство на ESBL/карбапенемаза продуценти

Много доклади установяват значими разлики в честотата на фекалното носителство на ESBL/карбапенемаза според географския регион, в зависимост от това къде и кой е изследван - пациенти или здрави доброволци, вида на отделението – интензивно или не, продължителност на болничния престой. **Рисковите фактори** за високи нива на ESBL/карбапенемаза продуценти при фекалното носителство включват: неправилната употреба на антимикробни средства – увеличената консумация предимно на карбапенеми и цефалосполини трета генерация, продължителен болничен престой, престой в интензивни отделения, инвазивни процедури, имунодефицитни състояния, употреба на инхибитори на протонната помпа, диария (Hu Y et al., 2020).

Чревната колонизация с ESBL продуценти в световен мащаб е по-висока в Азия и Африка (варира от 46% до 15%) и по-ниска в Централна (3%), Северна (4%), и Южна Европа (6%) и Америка (2%), (Karanka S et al., 2016). Спектърът на продукцията на ESBL ензими също показва известни географски различия. В Южна Швеция при пациенти в различни болнични отделения и здрави доброволци през 2010г, чревната колонизация е била 3% при амбулаторни пациенти и 6.8% при болнични пациенти, предимно *E. coli*. Доминиращите ензими са били CTX-M-1 и CTX-M-9 (Strömdahl H et al., 2011). Доклад от 2011г показва, че нивото на носителство на тези продуценти сред пациенти в Белгия е било 11.6%. *E. coli* е бил от най-често срещания вид, в 39.87%, следван от *Klebsiella pneumoniae* в 4.9%. Сред различните ESBL типове най-преобладаващия е бил CTX-M (62%), като 75% от CTX-M са били от група 1 (Schoevaerdt D et al., 2012). Скорошно проучване показва, че 9% (360/4006) от пациентите в болница в Лондон, Обединеното кралство, са били носители на ESBL-продуциращи *Enterobacteriaceae*. *E.coli* е бил най-разпространеният изолат в 77.8%. Отново най-разпространеният ESBL-тип е бил CTX-M, като 57.9% са били CTX-M-15 и 20.7% CTX-M-9 (Otter JA et al., 2019). В Мадрид, Испания, разпространението на носителството на ESBL-продуценти при 10 673 пациенти, приети в университетска болница е било 7.7%. Повечето от изолатите са били *E.coli* (77,5%), следвани от *K.pneumoniae* (20,71%). Осемдесет и осем

(10.41%) от ESBL-произвеждащите ентеробактерии са били едновременно производители на ESBL и карбапенемаза - 1.83% при *E. coli* и 42.86% сред изолатите *K. pneumoniae*. Отново преобладават цефотаксимазите 52,15% са били CTX-M-15 и 91,38% от карбапенемазите са били OXA-48 (Díaz-Agero Pérez C et al., 2018). Честотата на разпространение на ESBL продуцентив Германия, установена при многоцентрово проучване, обхващащо шест германски болници е било 9.5% (416/4376). *E. coli* е бил преобладаващият вид (79.1%), а CTX-M-1 (67.3%) и CTX-M-9 групата (16.8%) са били най-честите бета-лактамази. Пет пациенти (0.11%) са били колонизирани с ентеробактерии, произвеждащи карбапенемаза (VIM-1, NDM-1, IMP-8), (Hamprrecht A et al., 2016). Подобен процент се установява в проучване, включващо четири болници в Холандия - 8,2% (111/1351). Преобладаващите изолати са били *E. coli* в 74%, а най-разпространения ESBL-тип - CTX-M, като 48% са били от група 1, а 11 % от група 9 (Platteel TN et al., 2014). При двумесечно проучване върху пациенти в португалска болница, приети в рамките на 48 часа и такива, хоспитализирани повече от 48 часа се установява, че разпространението на продуцентите на ESBL при приемане в болница е било 17% и 24% сред пациенти, хоспитализирани за > 48 часа, докато разпространението на продуцентите на карбапенемаза-резистентни изолати е било 3% и в двата случая. Повечето от изолатите са били *E. coli* (54%) и *K. pneumoniae* (41%). Най-често идентифицираният ESBL е бил CTX-M-15 (n = 17/34; 50%), последван от CTX-M-27 (n = 10; 29%). Доказва се, че единичен изолат, е продуцирал, както KPC-3, така и GES-5 карбапенемази, а три изолата са били копродуценти на ESBL (CTX-M-15) и карбапенемаза (KPC-3 или OXA181), (Aires-de-Sousa M et al., 2019). Това проучване е едно от малкото докладващи наличие на карбапенемаза продуценти. При проучване в Барселона, Испания за фекално носителство на ESBL продуценти е било установено, че щамовете, продуциращи ESBL, са били 3.3% предимно CTX-M и *E. coli* (Miró E et al., 2005). Много висок процент карбапенемаза продуценти се установява в болница в Гърция между септември 2010г. и февруари 2012г като част от активна програма за наблюдение на карбапенем-резистентни ентеробактерии - 51,3% от събраните проби са били положителни за карбапенемаза продуценти като KPC са били преобладаващи в 57% (Pournaras S et al., 2013).

Извън Европа процентите на чревна колонизация с ESBL продуценти са много високи, както за болниците, така и за обществото. Висок процент ESBL носителство (85%) се доказва в университетска болница в Мароко, предимно CTX-M-15 и 14% карбапенем-резистентни ентеробактерии, предимно OXA-48 (Girlich D et al., 2014). В Египет от 100 скринирани пациенти, 68 са били колонизирани с ESBL щамове, 89% от които носители на CTX-M гена, 5 от тях карбапенемаза-продуценти (Abdallah HM et al., 2017). При три-годишно

проучване на разпространението на носителството на ESBL в Канадски болници са били установени следните проценти: (2007:3.4%, 2008:4.9%, 2009:4.3%) при изолати *E. coli* (Simner PJ et al., 2011). Проучване в болница в Камерун доказва ниво на ESBL носителство в 55.3 % (67/121) (Lonchel CM et al., 2012). В Китай се установява 8.5% карбапенем-резистентни ентеробактерии, в болниците, предимно КРС произвеждащи ST11 *K. pneumoniae*. Това е и ST типа, характерен за болничните изолати *K. pneumoniae*, което потвърждава връзката между причинените инфекции и носителството (Liu Q et al., 2019). По-висок процент се установява в Израел за 2011г – 12% карбапенем резистентни ентеробактерии (Ben-David D et al., 2011).

Освен в болниците увеличени нива на фекална колонизация се доказва в лечебните заведения за дългосрочна грижа (Woerther PL et al., 2013; Nicolas-Chanoine MH et al., 2013). В такава болница в САЩ са били установени 18.9% носители на карбапенем резистентни ентеробактерии (Prasad N et al., 2016).

Трябва да се има предвид, че често фекалното носителство продължава много дълго време, включително няколко години. Нивата на колонизация с ESBL и карбапенемаза продуценти дават представа за разпространението на тези ензими. При всяко постъпване в болница на такива хора може да започне разпространението на вътреболнична инфекция (Woerther PL et al., 2013).

Освен при пациенти е полезно да се изследва и фекалното носителство на ESBL/карбапенемаза продуцентите и при **здрави хора в обществото**. Чревна носителство на ESBL-продуценти в обществото за първи път се съобщава в Испания и Полша, през 2001 и 2002 г. съответно (Franczek R et al., 2003; Mirelis B et al., 2003). Проучвания в **Европа** доказват, че нивата на чревна колонизация с ESBL не са толкова високи, спрямо другите континенти. В Унгария при здрави индивиди фекалното носителство на ESBL-продуценти е било 3.0% (Ebrahimi F et al., 2016). Изследване в Португалия на здрави хора е доказало фекална колонизация в 2 % от *E.coli* щамове, като те са произвеждали CTX-M-14 и CTX-M-27 (Rodrigues C et al., 2016). Този процент е значително по-нисък, от този установен в болниците в Португалия (17%/24% (Aires-de-Sousa M et al., 2019)), което показва значително по-малко повлияване на обществото в тази страна. Подобно изследване за разпространение на ESBL продуценти в Англия показва нива на разпространение в 11.3% общо, като са включени 2 групи от населението, от източен и от северен Бирмингам, като преобладаващия изолат е бил *E.coli*, а преобладаващия ESBL-тип - CTX-M-15 (Wickramasinghe NH1 et al., 2012), но за разлика от Португалия, в Англия нивото на колонизация е било много по-високо в обществото в сравнение с болниците – 11.3% срещу 9% (Otter JA et al., 2019). Носителството при здрави индивиди в изследвания, проведени в Швейцария е било 5.8% (Geser N et al.,

2011). В проучване сред здрави индивиди в Париж за 5-годишен период (0.6% през 2006 г. срещу 6% през 2011 г.), се наблюдава 10-кратно увеличение на процента на здрави носители на ESBL-продуциращи *E.coli*. Преобладавали са основните типове, докадвани и в другите страни : CTX-M-15 (n = 7) и CTX-M-1 (n = 7) са 37% , CTX-M-14 (n = 4) - 21% и CTX-M-2 (n = 1) - 5% (Nicolas-Chanoine MH et al., 2013).

Чревното носителство, в обществото, в **Африка** е проучено много слабо. Нивата са от 7,3% в Тунис през 2010 г. (Ben Sallem R et al., 2012) и 10,0% в Сенегал (Ruppé E et al., 2009) до 30,9% в Нигерия (Woerther PL et al., 2011) и 63,3% в Египет през 2011г. (Abdul Rahman EM et al., 2011). Преобладаващите продуценти в последното проучване са били CTX-M-1 и CTX-M-15. Ниски са били нивата на носителството на ESBL продуценти при студенти в Камерун - 6.7% и в Ливан - 1,8% (Lonchel SM et al., 2012). Установява се, че финансово по-бедната част от населението е била особено засегната в Мадагаскар през 2009 г. с 10.1% ESBL-продуценти (Herindrainy P et al., 2011).

В **Азия**, подобно на нивата на фекалното носителство на ESBL продуцентите в болниците, се доказва и висока честота на колонизация с тези продуценти и в обществото. Данните от Тайланд показват значителен брой (58,2%) на ентеробактерии, произвеждащи CTX-M бета-лактамаза. Повечето от тях са били от CTX-M група 1 (86.6%), а останалите от CTX-M-9 (11.0%). По-голямата част от бактериите, произвеждащи CTX-M бета-лактамаза, са били *E. coli* (85.1%) (Sasaki T et al., 2010). В друго проучване от Тайланд повечето идентифицирани продуценти са били от група CTX-M-9 в 60.6%, следвани от CTX-M-1 група в 38.7% (Luvsansharav U-O et al., 2012; Luvsansharav UO et al., 2011).

Отново в Азия големи разлики се отчитат в две проучвания от Китай, вариращи от 7% в провинция Шънян през 2007 г. до 50% в провинция Фудзиен, през 2009 (Li B et al., 2011; Tian SF et al., 2008). Данните от това проучване показват преобладаването на CTX-M-14 ензимите. Интересното е, че CTX-M-15, преобладаващ при клиничните изолати, се нарежда на второ място и в двете проучвания от Китай, от 2007г. и от 2009г. В Япония нивата на фекално носителство са много по-ниски. Проучване в периода 2009-2010 сред здрави доброволци показва 6.4% ниво на носителство на ESBL, като 92.9% са били CTX-M продуценти. Най-преобладаващия тип е бил CTX-M-14 (38.5%), следван от CTX-M-2 (30.8%) и по 15.4% за CTX-M-15 и CTX-M-8. Повечето от изолатите са били *E.coli* (84.6%), следвани от *K.pneumoniae* (15.4%), (Luvsansharav UO et al., 2011).

Нивата на фекално носителство са проучени при бедни деца от градски райони в **Южна Америка**. Нивото на носителството на ESBL-продуцентите е било едва 0,1% през 2002 г., до 1,7% през 2005 г. и достига 12,4% през 2011г (Bartoloni A et al., 2013). Нарастваща

тенденция в честотата на фекалното носителство на CTX-M-продуценти също се наблюдава през последните две десетилетия при здрави деца, живеещи в малки градски райони на Боливия (0% през 1992 г., срещу 0.1% през 2002 г. до 1.6% през 2005 г. срещу 12% през 2011 г.), (Bartoloni A et al., 2013). От 60 деца, 58 (97%) са били колонизирани с CTX-M-продуциращи *E. coli*, като CTX-M-1 (43%), CTX-M-9 (43%), CTX-M-8 (12%) и CTX-M-2 (3%). Тези констатации подчертават важноста на резервоара на общността в еволюционната динамика на производството на CTX-M продуцентите.

Мащабно проучване, обхващащо целия свят за периода 1978-2015 година разкрива, че 14% от здравите индивиди са били колонизирани с ESBLs с тенденция към нарастване с времето (Karanika S et al., 2016).

По отношения на видовия и ензимния спектър на фекалното носителство на ESBL произвеждащи ентеробактерии можем да обобщим, че основните видове които се изолират са *E. coli* и на второ място *K. pneumoniae* (Woerther PL et al., 2013; Hu Y et al., 2020; Jones RN et al., 2003). В проучванията най-често доказваният ензим е CTX-M-14 и CTX-M-15 (Hu Y et al., 2020; D'Andrea MM et al., 2013; Freeman JT et al., 2008).

Много малко доклади дават информация за клоновете ентеробактерии, които се разпространяват при фекалните носители. Едно от малкото такива проучвания е на Baraniak A et al (Baraniak A et al., 2013). Авторите установяват широко разпространение на ST15, CC17 и ST147 изолати *K.pneumoniae* при фекално носителство на продуценти на ESBL при хора от 4 рехабилитационни центъра. Тези клонове са често срещани и при клиничните изолати (Baraniak A et al., 2013).

От особено епидемиологично значение е разпространението на ESBL (основно CTX-M-15)-продуциращия клон *E.coli* ST131, който се характеризира с висок коефициент на ко-резистентност към флуорохинолони и други класове на антимикробни агенти (Doi Y et al., 2017). Този клон се доказва и в Испания. ESBL носители са били 8,6% и *E. coli* (предимно CTX-M от клонален комплекс 131), като изследваната популация е включвала хоспитализирани и нехоспитализирани пациенти (Ríos E et al., 2017). Авторите са установили и 1.7% карбапенемаза продуценти предимно при хоспитализирани пациенти, които са били ST11 *K. pneumoniae* (Ríos E et al., 2017).

### **2.7.2. Фактори, свързани с носителството на ESBL/карбапенемаза продуценти**

Обзор, използващ метаанализ, е бил направен за периода от 2014-2019г, за фекално носителство в населението, като са били включени петнадесет проучвания, обхващащи 11480

здравя индивида. Според събраните данни разпространението на резистентни *Enterobacteriaceae* е било 14%. Доказани са основните рискови фактори за разпространението на чревното носителство на ESBL продуциращи *E. coli* като това са: антибиотична употреба, симптоми на диария, пътуване до Южна Азия, а при пътуващи към тези фактори се добавя и вегетарианска диета (Hu Y et al., 2020). Доказани са и допълнителни фактори, влияещи на разпространението на носителството: тютюнопушене, отглеждане на домашни любимци, ниво на образование, предшестваща хоспитализация, употребата на инхибитори на протонната помпа, хронични заболявания, пътувания до Югоизточна Азия и Африка.

Бързото разпространение на микроорганизмите, произвеждащи ESBL и респективно нивата на колонизация вероятно е многофакторно като допринасящи източници още са животните (както консумацията на месо, така и отглеждането им като домашни любимци), околната среда, пътуванията до развиващите се страни и директно предаване в рамките на домакинствата и обществото (Doi Y et al., 2017).

**Консумацията на животински продукти** е един от важните фактори за разпространение на фекалното носителство на ESBL/карбапенемаза продуценти. Повече от три четвърти от всички антимикробни средства се използват при отглеждане на животни и птици с цел предотвратяване на инфекции или с цел растеж (Overdevest I et al., 2011; Geser N et al., 2012). Това води до засилен селективен натиск и повишена честота на полирезистентни ентеробактерии. Човешки дейности, такива свързани със земеделието и производството на храни, могат да бъдат в основата на разпространението на ESBL-продуцентите (Egea P et al., 2012; Overdevest I et al., 2011).

Предаването на ESBL изолати от животни на хора чрез храната е потвърдено чрез установено клонално родство на шамовете, изолирани от животни, в сравнение с тези от хората (Day MJ et al., 2016). Предаването на детерминантите на резистентност може да се осъществи и чрез определени плазмиди.

Проучване на плазмидни последователности показва, че почти идентичен плазмид, в този случай на IncI1 групата е открит при множество хора и птичи шамове, което предполага, че плазмидите могат да пренасят гени, кодиращи ESBL от животните към хората. Този факт е допълнително подкрепен от скорошно европейско проучване, където IncI1 плазмиди, носещи *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, са били често идентифицирани в *E. coli*, изолиран от хора и животни (Day MJ et al., 2016). Произвеждащи ESBL *E. coli* обикновено се идентифицират при животни, отглеждани за производство на храни в Европа. Много важен е фактът, че над 90% от месото от домашни птици, продавани на дребно в Южна Испания, през 2010 г., са били продуценти на ESBL *E. coli*., спрямо малко над 60% през 2007г. (Egea P et al., 2012). Високите нива на носителство на

ESBL продуценти се потвърждават и в проучване в Холандия проведено през 2009г на месни пакетирани продукти, което показва, че почти 79.8% от пилешките проби съдържат ESBL продуценти, повечето от които са били *E. coli*, докато процентите са били много по-ниски при говеждото 4.7% и свинското месо 1.8% (Overdevest I et al., 2011). CTX-M-1 е бил най-разпространения ензим в изолатите от пробите пилешко месо (Overdevest I et al., 2011). Изненадваща е степента на колонизация в Швейцария през 2012 г. - над 15% при прасета и 63% при пилета са били положителни, въпреки строгата антибиотична политика в тази страна (Geser N et al., 2012). *E. coli* е бил от преобладаващите колонизиращи видове, като CTX-M ензимите са били преобладаващите ESBL. Данните са много по-оскъдни за Съединените щати, но процентите на замърсяване с ESBL-произвеждащи *Enterobacteriaceae* изглеждат много по-ниски, отколкото в Европа. Произвеждащи CTX-M *E. coli* са били установени в 7% от месните продукти, закупени в три държави от Средния Запад през 2012г. (Mollenkopf DF et al., 2014). Интересен факт е, че над 50% от тях са били *E. coli*, произвеждаща CMY-2, придобит тип AmpC бета-лактамаза.

**Домашните любимци** все повече привличат вниманието като потенциален източник на *Enterobacteriaceae*, произвеждащи ESBL, поради тяхната физическа близост и чести близки контакти с техните собственици. При наблюдение на болни кучета и котки в цяла Европа, 3.6% са пренасяли *Enterobacteriaceae*, произвеждащи ESBL във фецеса, повечето от които са били носители на *bla*<sub>CTX-M</sub>, като най-чест е бил CTX-M-15 (Bogaerts P et al., 2015). ESBL-продуцентите са били много повече в Холандия - приблизително една четвърт от изследваните кучета, като преобладаващия тип е бил CTX-M-1 (Hordijk J et al., 2013). Шест месечно проучване отново в Холандия установява, че над 80% от изследваните кучета са били носители на *Enterobacteriaceae*, продуциращи ESBL (Dahmen S et al., 2013), което предполага, че много собственици на кучета са периодично изложени на риск от носителство на тези бактерии. Проучване при кучета в Турция е установило 22.2% фекалното носителство на ESBLs, повечето CTX-M-15, следвани от TEM и CMY ензими (Aslantaş Ö et al., 2017). Друго изследване в Обединеното Кралство отново при кучетата показва честота от 18.3% полирезистентни изолати при *E. coli*, като преобладаващия тип ESBL е бил CTX-M -1 (Wedley AL1 et al., 2017). Установява се предаване от домашни любимци на хора, като то е било потвърдено и молекулярно-генетично. Десет от 177 (5.6%) ESBL-произвеждащи изолати *E. coli*, девет щама от кучета и един щам от кон, са принадлежали на клона B2-O25b-ST131. Девет от тях са били продуценти на CTX-M-15, докато един щам е продуцирал SHV-12. Анализът на макрорестрикция показва клъстерообразуване на шест животински CTX-M-15 произвеждащи ESBL щамове от пет различни европейски държави, заедно с човешки

контролен щам, съставляващ група от клонално свързани щамове със стойност на сходство 87.0% (Ewers C et al., 2010). В друго проучване също е бил намерен *E. coli* ST131 сред домашни животни (Platell JL et al., 2011).

Някои от проучванията установяват, че ESBL-продуциращите *E. coli*, изолирани от котки и кучета принадлежат към различни ST типове, но носят *bla*<sub>CTX-M</sub> гени на плазмиди, характерни за клиничните изолати, като напр. IncF и IncI1 (Dahmen S et al., 2013). В САЩ, 3.1% от болните кучета и котки са пренасяли *E. coli*, продуцираща ESBL с преобладаване на *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, носещ плазмиди IncF и IncI1 (Shaheen BW et al., 2011).

В друго проучване е бил направен скрининг за ESBL продуциращи Грам-отрицателни бактерии при домашни любимци, живеещи в района на Париж във Франция. Бил е установен висок процент на *K. pneumoniae*, продуциращ CTX-M-15. Типирането на последователността разкрива, че повечето от тези изолати са принадлежали към клона ST274, който не е обичаен за клиничните изолати. Тези констатации подчертават, че домашните любимци могат да бъдат резервоари за CTX-M-15 продуциращи *K. pneumoniae*, развиващи се отделно от човешкия резервоар на продуценти на CTX-M-15 (Poirel L et al., 2013).

**Предаването от човек на човек**, особено в домакинството, след предшестваща хоспитализация, също е много важен фактор за разпространение на произвеждащи ESBL *Enterobacteriaceae*. Някои проучвания изследват разпространението на CTX-M-продуценти в домакинствата, като демонстрират висока скорост на предаване (Hilty, M et al., 2012). През 2008г. е бил описан първия случай за разпространение на ESBL-продуценти между членове в семейството (Rodriguez-Bano J et al., 2008) и проучването показва, че контакт с пациенти с инфекции на уринарния тракт, причинени от ESBL-продуциращи бактерии е рисков фактор за чревното носителство (Valverde A et al., 2008).

Когато членове на семействата на пациенти в Испания, носители на ESBL произвеждащи *Enterobacteriaceae*, са изследвани за чревно носителство, 9 от 54 изследвани са били колонизирани. Изолатите от роднините са били идентични епидемиологично на тези от съответните пациенти (Veldman K et al., 2013). В Холандия, 84 членове на семействата на 74 пациенти ESBL носители, се проследяват 18 месеца с периодичен фекален скрининг. Резултатите показват, че повече от половината роднини придобиват ESBL-продуциращи *Enterobacteriaceae* в някакъв момент (Haverkate MR et al., 2016). Обширно огнище на CTX-M-15, произвеждащи *E. coli* ST131 е било съобщено в САЩ, където две деца са имали инфекция на уринарния тракт и в следствие седем други членове на семейството (6 хора и едно куче) са били колонизирани от същия щам (Madigan T et al., 2015). Ограничените доказателства

предполагат, че веднъж въведено в домакинствата, предаването от човек на човек може да бъде средство за разпространението на бактерии, произвеждащи ESBL в обществото.

**Замърсяването на околната среда** с произвеждащи ESBL *Enterobacteriaceae* все повече се съобщава, както в развиващите се страни, така и в развития свят. Особен интерес представляват отпадните води, които имат широк потенциал за замърсяване на околната среда (Bréchet C et al., 2014). В продължително проучване на различни източници на отпадни води във Франция, са били установени ESBL произвеждащи *E. coli*, предимно носещи *bla*<sub>CTX-M</sub>, като CTX-M-1 е бил най-разпространен в 50%, следван от CTX-M-15 в 25% и CTX-M-14 в 10% са били открити в повечето проби, като значително по-високи проценти се отчитат в болничните отпадни води, отколкото в битовите (Bréchet C et al., 2014). Това вероятно отразява по-високите проценти на разпространение на ESBL сред болните от населението, както и разликата в нивата на селективен натиск от остатъчни антибиотици в отпадните води (Hocquet D et al., 2016). Открити са ST типове в отпадни води, които са често срещани при хората. Например *E. coli* ST131 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> е бил преобладаващият клон сред произвеждащите ESBL *Enterobacteriaceae*, открити в отпадни води в пречиствателна станция в Чехия (Dolejska M et al., 2011).

Ролята на замърсяването на водата като основен резервоар за разпространение на ESBL-продуценти е добре описан. Това е било установено в Китай, като в в отпадни води се доказват родове *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* и *Aeromonas* и предимно *bla*<sub>CTX-M</sub> гени (Lu S et al., 2010). В Бразилия най-честия ESBL продуцент в отпадните води е бил *K. pneumoniae*, последвана от *Enterobacter cloacae* и *E. coli*, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> и *bla*<sub>CTX-M</sub> се доказват в 82%, 48% и 67% от изолатите, съответно (Chagas TP et al., 2011). ESBL-продуценти са били изолирани и от сондажни води в Никарагуа (Amaya E et al., 2012) и от различни други водоеми в Швейцария (Zurfluh K et al., 2013), Обединеното кралство (Dhanji H et al., 2011), Португалия (Tasão M et al., 2012), дори морска вода от плажове в Алжир (установени *E. coli*, носещи *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, разположен на IncII плазмид), (Alouache S et al., 2012) и вода от Антарктида показват наличие на ESBL продуценти (*E. coli*, носещи *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>), повечето принадлежащи на ST типове, характерни за клиничните изолати), (Hernández J et al., 2012), което предполага, че резервоара на тези бактерии в действителност е огромен (**Фиг. 10**). Допълнителен аспект на проблема са градските пречиствателни станции. Доказано е, че те са горещи точки за устойчиви на антибиотици бактерии и гени, които се разпространяват в околната среда (Rizzo L et al., 2013). В тази среда се доказва много по-бърз обмен на гени на резистентност.

В обобщение, от проучените статии може да се каже, че най-често срещаните изолати, отговорни за фекалното замърсяване в различни водоеми са *E. coli*, но в значителна част и *K. pneumoniae* и *E. cloacae complex*, а най-честата широкоспектърна бета-лактамаза е СТХ-М от група 1, основно СТХ-М-1,-15, които са чести и в чревния тракт на хора и животни (Karaniка S et al., 2016).

Друг рисков фактор, който е разгледан като потенциален екологичен източник на продуценти на ESBL, са **дивите животни, особено мигриращите птици**. В изследване на трупове на диви птици в Холандия, предимно представляващи водни видове, като чайки и водоплаващи птици, 12.3% от фекалните проби са били с ESBL-продуцираща *E. coli*. Изолатите *E. coli*, устойчиви на cefotaxime, са били идентифицирани при 65 птици (15,7%) от 21 различни вида. Общо са били открити 65 cefotaxime-резистентни *E. coli* ESBL/AmpC гени, включващи главно варианти на *bla*<sub>СТХ-М</sub> и *bla*<sub>СМУ-2</sub> (Veldman K et al., 2013).

Проучване в 9 европейски страни (Stedt J et al., 2015) доказва, че бактериите, продуциращи ESBL, често се откриват в чайки (906 от 3158 проби, 28.7%), със значителни различия в процентите на разпространение между страните. Най-високи нива са били установени в Испания (74,8%), Холандия (37,8%) и Англия (27,1%). Дания и Полша представляват другата крайност, без нито една положителни проба. При проучването на СТХ-М изолатите са били идентифицирани 13 различни варианта, като най-често се откриват *bla*<sub>СТХ-М-1</sub> и *bla*<sub>СТХ-М-14</sub>. В пробите от Англия, Испания и Португалия доминира *bla*<sub>СТХ-М-14</sub>, докато в останалите страни от извадката *bla*<sub>СТХ-М-1</sub> (с изключение на Швеция, където доминира *bla*<sub>СТХ-М-15</sub>) е най-често откритият генотип, модел, подобен на този, известен от проучвания на човешки материали. Данните показват, че разпространението на ESBL в околната среда е високо от антропогенни източници и широко разпространената поява на резистентни бактерии при обикновените видове мигриращи птици, използващи градски и селскостопански райони, предполага, че гените за резистентност към антибиотици могат да се разпространяват и чрез птици (Stedt J et al., 2015).

Въпреки че общият пренос е труден за количествено определяне, птиците, които могат свободно да мигрират между градски и земеделски земи могат да играят важна роля за разпространението на произвеждащи ESBL бактерии в географски райони и екологични ниши (Doi Y et al., 2017; Guenther S et al., 2012).

**Международните пътувания**, особено медицинския туризъм, могат да послужат като основен източник на въвеждане и разпространение на полирезистентни ентеробактерии.

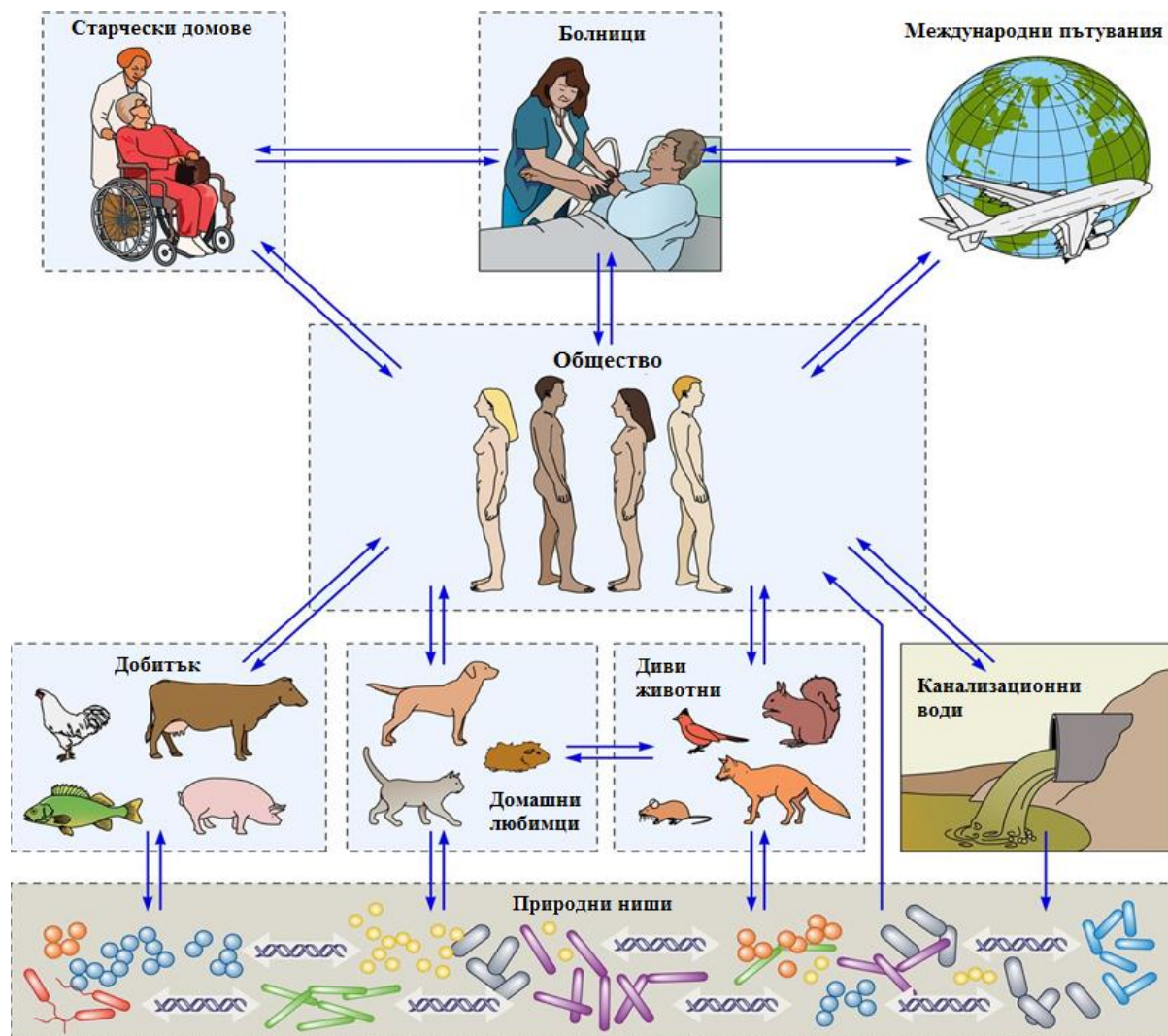
Над 1 милиард души преминават международните граници за туризъм всяка година и се очаква броят им да расте. В мета-анализ на проучвания, отчитащи фекална колонизация на

здравни индивиди с произвеждащи ESBL *Enterobacteriaceae*, сборната оценка на разпространението на колонизацията е висока в развиващите се региони: 46% в Западен Тихи океан, 22% в Югоизточен Азия и 22% в Африка. От друга страна, колонизацията с ESBL продуциращи ентеробактерии в развитите региони е много по-ниска: 4-6 % в Европа и 2% в Америка (Karanika S et al., 2016). Тези различия обясняват защо международните пътувания могат да играят важна роля за разпространението на тези проблемни микроорганизми в развиващите се и развитите страни, като се създава възможност тези микророрганзми да бъдат транспортирани от колонизирани пътници. Първото проучване в подкрепа на тази хипотеза е от Канада. В двугодишно проучване, в което са разгледани рисковите фактори за предаване на продуценти на широкоспектърни бета-лактамази, се установява, че международните пътувания са основен рисков фактор за предаването им (Laupland KB et al., 2008). Подобно проучване от САЩ определи пътуванията до Индия като силен рисков фактор за появата на инфекция с *E. coli*, продуцираща ESBL (Banerjee R et al., 2013). Действителните рискове от колонизация с ESBL по време на пътуванията до развиващия се свят са оценени в няколко проучвания, използващи скрининг преди пътуване и след пътуване. Тези проучвания показват високи проценти на колонизация след завръщане от Индия или друга страна от Южна Азия, варираща до 70% положителни от завърналите се пътници (Kantele A et al., 2015).

Други често идентифицирани рискови фактори включват диария на пътника, употреба на антибиотици и дължина на пътуването. Медицински туризъм, където пациенти от развитите страни пътуват до страни с по-ниски медицински разходи, за да получават здравни грижи и операции, може също да играят роля при вноса на многорезистентни бактерии, включително производителите на ESBL (Chen LH et al., 2013). Въпреки това, продължителното носителство след завръщане в развития свят е рядко, като повечето от пътуващите губят чревното носителство до 3 месеца след връщане (Pires J et al., 2016). Независимо от това, големината на риска за придобиване и броят на пътуващите, правят пътуванията до развиващите се страни важен източник на носителство на ESBL продуценти в развитите страни (**Фиг.10**).

Систематичният скрининг за чревно носителство на ESBL/карбапенемаза продуциращи ентеробактерии все още се счита за стандарт за намаляване честотата на клиничните изолати притежаващи тези ензими в болниците (Lowe CF et al., 2013), но той е доста скъп. Прието от експертите е, че най-добрия начин за идентификация на откритите ензими при скрининга е съчетаването на фенотипните методи с молекулярно-генетични такива (Maurer F et al., 2015).

Данните за микробиотичната модулация на червата (селективна деконтаминация или фекална трансплантация) за ликвидиране на чревно носителство на ESBL/карбапенемаза продуциращи ентеробактерии, са оскъдни.



Paul-Louis Woerther et al. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013;  
doi:10.1128/CMR.00023-13

Journals.ASM.org

This content may be subject to copyright and license restrictions.  
Learn more at [journals.asm.org/content/permissions](https://journals.asm.org/content/permissions)

Clinical Microbiology  
Reviews

**Фигура 10.** Представяне на основните храносмилателни или екологични резервоари на ESBL, към които принадлежи човешката общност

За селективната деконтаминация на чревния тракт като превантивна мярка има някои съобщения които показват, че използването на антибиотици самостоятелно или на пробиотици не е дало обещаващи резултати (G Catho & B Huttner, 2019). Данните за използването на нерезорбиращи се антибиотици като аминогликозиди и колистин показат

добри краткосрочни резултати, но повечето хора остават носители в края на първата година (Singh R et al., 2018). Правят се опити за намаляване на остатъчни количества на антибиотичените вещества в чревния тракт в хода на антибиотична терапия. Такова проучване има за ciprofloxacin, като таблетки с активен въглен, използвани при мишки, са намалили количеството на остатъчния ciprofloxacin (Khoder M et al., 2010).

По-добри са данните за ефекта на фекалната трансплантация. Тя е одобрена за използване при лечение на рецидивиращи *Clostridioides difficile*, но ерадикирането на изолатите, произвеждащи ESBL/карбапенемаза от чревния тракт все още се проучва. В проучване от 2018г авторите докладват за деколонизация в 20% (3 от 15 ESBL носители) при първата трансплантация и в 40% след втората (Singh R et al., 2018). За съжаление, изследването не включва контролна група. По-ново проучване от 2019г проведено в Швейцария, Израел, Холандия и Франция включва контролна група и изследва ефекта на използването на антибиотиците colistin и neomycin, след които се прави фекалната трансплантация. Установена е ерадикация на ESBL продукцията от 41% при изследваната група и 27% при контролната (Huttner BD et al., 2019). От друга страна увеличаването на броя на трансплантациите увеличава нивото на деколонизация (G Catho & B Huttner, 2019).

Затова по-голямо значение придобиват мерките за контрол на инфекциите. Препоръчва се систематичен скрининг за чревно носителство на ESBL-E, спазване на хигиенните норми в интензивните отделения и ограничаване на емпиричната антимикробна терапия (Prevel R et al., 2019). За контрола на разпространението на ESBL в болниците е важно стриктното спазване на мерки за контрол на инфекциите (Siegel JD et al., 2007) от всичките медицински и немедицински служители. Съществуват основателни епидемиологични доказателства, които показват, че полирезистентните микроорганизми се пренасят от едно лице на друго чрез ръцете. Те лесно се замърсяват по време на процеса на грижи или от контакт с повърхности на околната среда в непосредствена близост до пациента. В много части на света миенето на ръце остава липсващо (Halder AK et al., 2010). Миенето на ръцете е един от важните начини за контрол на разпрстранението на ESBL/карбапенемаза продуциращи ентеробактерии в обществото и болниците.

Липсват систематизирани адекватни препоръки за превенцията на разпространението на чревно носителство в обществото. Препоръките могат да бъдат насочени на няколко нива. Първото е да се опита да се намали разпространението на резистентни бактерии в околната среда, където те циркулират. Методи за намаляване на устойчивите бактерии в отпадните води включват оптимизиране на процедурите за дезинфекция и управление на отпадъчните води и оборския тор. Втората препоръка е да се приложат мерки, насочени към

пациентите. Един от основните двигатели на бактериална резистентност е селективния натиск на антимикробната терапия върху чревните бактерии (Pitout JD et al., 2009), затова разработването на рационална антибиотична политика, намаляване на антибиотиците в храната (месото) е от съществено значение, третата група препоръки са свързани с предотвратяването на лесното пренасяне на ентеробактериите. В болниците се разпространяват определени високоепидемични клонове, които попадайки в стомашно-чревния тракт на пациентите се внасят в обществото и разпространяват между болниците при преместването на пациентите от една болница на друга. В тази група може да включим и животните и птиците в обкръжението на човека - особено домашните любимци, които могат да бъдат колонизирани. Мерките за контрол на инфекциите са от основно значение. Последната група фактори е свързана с пътуванията на хората, особено международните и с цел лечение. За съжаление, въпреки използването на различни стратегии, е отчетено постоянно повишаване на процента на чревното носителство на ESBL/карбапенемаза продуциращите ентеробактерии (Karanika S et al., 2016; Woerther PL et al., 2013), което способства за нарастването на антимикробна резистентност. Тя остава основна заплаха в световен мащаб. В резултат на това са необходими спешни стратегии за борба с антимикробната резистентност.

В заключение, контрола на ESBL/карбапенемаза инфекциите, поради многофакторната природа на широкото им разпространение, проблемната терапия, високата смъртност при инфекции с тези продуценти, заедно с трудностите на лабораторната идентификация на ESBLs и карбапенемаза продуцентите поставя сериозен проблем пред клиницистите и микробиолозите и налагат детайлно проучване на пътищата на предаване на ESBL и карбапенемаза продуцентите, нивото на чревно носителство на тези продуценти, както и най-добрите мерки за съответната държава, които могат да бъдат приложени.

### 3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Целта** на настоящият дисертационен труд е да се изследва честотата на чревно носителството на широкоспектърни бета-лактамаза и/или карбапенемаза-продуциращи *Enterobacterales* при хоспитализирани пациенти и здрави индивиди, да се проучат основните механизми на бета-лактамна резистентност и клоналната свързаност на изолатите.

За реализиране на тази цел си поставихме следните **ЗАДАЧИ**:

1. Да се колекционират цефалоспорин трета генерация и/или карбапенем-резистентни Грам-отрицателни изолати от хоспитализирани пациенти и здрави индивиди.
2. Да се извърши точна видова идентификация на колекционираните изолати чрез конвенционални микробиологични, мас-спектрометрични и молекулярно-генетични методи.
3. Да се проучи чувствителността на колекционираните изолати към набор от антимикробни средства - общо, по бактериални видове и хоспитализирани пациенти спрямо здрави индивиди.
4. Да се определи механизма на бета-лактамна резистентност при колекционираните изолати - продукция на широкоспектърни бета-лактамази (ESBLs), карбапенемази и/или AmpC ензими и да се охарактеризират типовете ензими чрез фенотипни, електрохимични и молекулярно-генетични методи.
5. Да се определи нивото на фекалното носителство на ESBL/карбапенемази продуценти при пациенти в болниците и в обществото (при здрави хора, деца и възрастни, изследващи се за работа или прием в детска градина).
6. Да се проучи епидемиологичната връзка между колекционираните щамове.

## 4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 4.1. Бактериални изолати

Беше изследвано чревното носителство на суспектни за продукция на ESBL/карбапенемаза изолати (резистентни на цефалоспорин 3та генерация изолати), като фекални проби на хоспитализирани пациенти, изследвани по друг повод и фекални проби на здрави индивиди, изследвани за детска градина и здравни книжки, бяха посявани на селективна среда – Мак Конки агар с 1 mg/L cefotaxime, както и на среда CHROM agar KPC media (Vecton Dickinson). Хоспитализираните пациенти бяха от: МБАЛ ”Света Марина” Варна (n= 158), УМБАЛ д-р Г.Странски-Плевен (n=71), УМБАЛ „Св.Георги”- Пловдив (n=102), УМБАЛ ”Александровска София (n=120), II-ра МБАЛ-София (n=82), УМБАЛСМ ”Н.И. Пирогов” (n=47). Пробите от здравите индивиди бяха от: МЦ ”Екзакта Медика-Плевен (n=126), МДЛ „Лина”- Бургас (n=244), МДЛ ”Медирс”- София (n=170), МЦ ”Торакс-София (n=52), МДЛ ”Лора”- София (n=125).

Проучването обхващаше периода 12.2017-12.2018. **Таблица 3** показва обхванатите пациенти и лечебни заведения, както и броя изолирани цефалоспорин 3та генерация резистентни изолати.

**Таблица 3. Разпределение на изследваните пациенти по обхванати лечебни заведения за периода 12.2017-12.2018 и брой изолирани цефалоспорин 3та генерация резистентни изолати**

Лечебни заведения	Общ брой изследвани	Общ брой изолати*
МБАЛ”Света Марина” Варна	158	63
УМБАЛ д-р Г.Странски-Плевен	71	26
МЦ”Екзакта Медика-Плевен	126	25
УМБАЛ„Св.Георги”- Пловдив	102	58
МДЛ„Лина”-Бургас	244	56

УМБАЛ”Александровска София	120	32
И-ра МБАЛ-София	82	21
УМБАЛСМ”Н.И. Пирогов	47	10
МДЛ”Медирс”-София	170	49
МЦ”Торакс-София	52	6
МДЛ”Лора”-София	125	27
<b>Общо</b>	<b>1297</b>	<b>373</b>

\*, цефалоспорин 3та генерация резистентни изолати

## 4.2. Идентификация на чревните изолати

Биохимичната идентификация на включените в проучването щамове беше осъществена чрез конвенционални тестове и потвърдена с идентификационни панели на системите Phoenix 100 (Becton Dickinson) и MALDI-TOF (Biomerieux).

### 4.2.1. Референтни щамове

За определяне на изоелектричните точки бяха използвани щамове, продуциращи известни  $\beta$ -лактамази, получени от MICOER Institute–Prof. A. Bauernfeind :

R + (трансконюгант) *E. coli* (TEM-1 ) – pI 5.4

R + *K. pneumoniae* (KPC-2) – pI 6.7

*K. pneumoniae* (SHV – 1) – pI 7.6

R + *E. coli* (SHV - 12) – pI 8.2

R+ *K pneumoniae* (CTX-M-3) – pI 8.6

R + *E. coli* (CTX-M-15) – pI 8.8

Контролът на тестовете за определяне на антибиотична чувствителност беше чрез дифузионен дисков метод според EUCAST, 2017. Беше използван еталонен щам *E. coli* ATCC 25922.

За SPM теста бяха използвани щамове *E.coli* NCTC 13846, *E.coli* ATCC 25922.

За изоелектричното фокусиране и като положителна контрола за MALDI-TOF също беше използван контролен щам *E.coli* ATCC 25922.

#### **4.2.2. Хранителни среди**

За изолация, биохимична идентификация, изпитване на чувствителност към антимикробни лекарствени средства и съхраняване на проучените щамове бяха използвани следните хранителни среди: Селективна среда МакКонки агар (Oxoid, UK) с 1 mg/L cefotaxime, МакКонки агар (Oxoid, UK), CHROM agar KPC media (Becton Dickinson, UK), SuperPolimyxin Medium агар (SPM), (Levin), Мюлер-Хинтон II агар (Oxoid, UK), Клиглер агар, среда за доказване на L-аргинин, L-лизин и L- орнитин, среда на Симонс с цитрат, среда за доказване на индол и подвижност, среда за доказване на уреазна активност, среда за доказване на фенилаланин-деаминазна активност, триптично-соев бульон, skim milk, получени от Бул Био - НЦЗПБ, Becton Dickinson и Елта 90.

#### **4.2.3. Реактиви**

Използвани бяха следните реактиви: 1% тетраметил р-фенилендиамин дихидрохлорид, 3% водороден перексид, реактиви за MALDI-TOF, 10% железен трихлорид, реактив на Ковач, Pharmalyte pH 3 – 10 (LKB, България), глицерин, TEMED (ISN), Ammoniumperoxodisulfate 1 mol/L ортофосфорна киселина, разтвор 1 mol/L натриева основа, 1 mol/L HCl, разтвор на акриламид (Applichem GmbH) съдържащ 30 % акриламид и 1 % бисакриламид, 87 % разтвор на глицерол (ISN), 1 % разтвор на амониев персулфат (Applichem GmbH), Миоглобин (ISN) 1% разтвор в дестилирана вода

#### **4.3.1. Методи за идентификация**

##### **4.3.1.1. Мануални методи**

Всички 373 изолата за периода 2017/2018г бяха първоначално идентифицирани с конвенционални тестове (BioMerieux, France). За първоначална идентификация на видовете от разред *Enterobacteriales* използвахме биохимични методи за идентификация – усвояване на глюкоза и лактоза до киселина и отделяне на газ в средата на Клиглер, продукция на индол от триптофан, уреазна активност, усвояване на цитрат от средата на Симонс, декарбоксилиране на аминокиселините лизин и орнитин.

#### 4.3.1.2. Идентификация чрез MALDI-TOF (Biomerieux, France)

Системата MALDI-TOF (Biomerieux) бе използвана като потвърдителен метод при изолатите, първоначално идентифицирани като *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Hafnia spp.*, *Morganella spp.* по конвенционалните методи. Системата за микробна идентификация, базирана на маспектрометрична иновативна технология MALDI-TOF (MALDI- Лазерна десорбционна йонизация с помощта на матрица, TOF -time-of-flight) за микробна идентификация е базирана на маспектрометрична иновативна технология MALDI-TOF. Пиковите на спектъра се сравняват с тези характерни за вида, рода или семейството микроорганизми. Системата съчетава висока резолюция и чувствителност (gt; 10k Dalton) на маспектрометрията, за получаване на добри резултати. Обширната база данни на системата позволява за няколко минути да се идентифицира голям брой клинично значими видове бактерии (повече от 1000 щам), плесени, дрожди и е единствената, която прави идентификация на *Mycobacterium*. Работните слайдове са за еднократна употреба, като на едни слайд могат да се направят 48 идентификации. Методът на идентификация не изисква използването на различни биохимични тестове. Всеки слайд е с уникален баркод, което свежда до минимум ръчното въвеждане на данни. Подготовката на пробите, включително и екстракцията се осъществява директно върху работния слайд. Готовата за няколко минути идентификация позволява да се съкрати и времето за определяне на чувствителността на дадения микроорганизъм. Вграденият софтуер позволява да се направят много и различни отчети, в зависимост от нуждите. По този начин могат да се индикират и да бъдат своевременно предотвратени вътреболничните инфекции.

За целта бе използвана 24 часова, чиста бактериална култура. Една колония се втрива внимателно в определената ямка на 48-ямковата плака. След което се закапва 1µl от Матрикса, който е предоставен готов за употреба от BioMerieux. Изчаква се да изсъхне. Ако щам е мукозен, след това се накапва и 0.5µl CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, която също е готова за употреба и предоставена от BioMerieux. В средата на първата 16-ка на 48-ямковата плака се втрива 24-часов контролен щам на *E. coli* 25922, след което той също се закапва с Матрикса в същото количество. Всяка 48-ямкова плака е разделена на 3 квадрата по 16 ямки, в средата, на които задължително се слага положителната контрола. Един квадрат от 16 ямки може да се използва само веднъж. След като плаката изсъхне се поставя в апарата и след няколко часа/минути апарата автоматично отчита вида на бактериалния щам, изразен в %.

#### 4.3.1.3. Идентификация чрез автоматизирана система Phoenix 100 (Becton Dickinson)

Изолатите изпратени от Варна бяха предварително идентифицирани с автоматизираната система Phoenix 100 (Becton Dickinson). Панелите NMIC/ID на Phoenix 100 идентифицират 161 различни бактериални Грам - отрицателни вида, които съставляват повечето от клинично значимите Грам - отрицателни стриктни аеробни и факултативно анаеробни бактерии. Идентификацията се основава на метаболитната активност на тестваните бактериални изолати, като всеки панел съдържа 45 микроямки с лиофилизирани биохимични субстрати и 2 ямки за контрол на флуоресценцията. В панелите има 16 ензимни субстрата, 23 субстрата за източник на въглерод и 5 теста за утилизация и потискане на растежа.

Според инструкциите на производителя, бактериална суспензия с гъстота 0.5 по McFarland се приготвяше в ID и AST бульонна среда и се инокулираше в панела. Информацията от данните за идентификацията се обработваха софтуерно от EpiCenter Version V6.12A/V5.21A (Becton Dickinson).

#### 4.3.2. Молекулярно-генетичен метод за идентификация чрез *hsp60* секвениране.

Молекулярно – генетичният метод *hsp60* секвениране, бе използван за определяне видовата принадлежност на проучваните клинични изолати в *E. cloacae* complex и *Citrobacter spp.* и *Klebsiella spp.* *Hsp60-F* (5'-GGTAGAAGAAGGCGTGGTTGC-3') и *Hsp60-R* (5'-ATGCATTCGGTGGTGATCATCAG-3') бяха използвани за амплификация на 341-bp фрагмент на *hsp60* гена (Hoffmann H&Roggenkamp A, 2003).

PCR реакцията протече в 30 цикъла при следните условия: 30 сек. на 95°C за денатурация, 30 сек. на 59°C за свързване и 30 сек. на 72°C за елонгация.

Пречистване на PCR продукта с цел последващо секвениране по Sanger бе извършено чрез Rapid PCR Cleanup Enzyme Set ( ExoSAP, Applied Biosystems,USA) и секвениран в двете посоки по Sanger: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer, на секвенатор модел: Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer.

Анализът на секвенциите беше направен чрез Chromas Lite версия 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Australia), DNAMAN версия 8 (Lynnon Corporation, USA) и NCBI nucleotide BLAST.

#### **4.4. Методи за определяне на чувствителността към антимикробни средства**

##### **4.4.1. Антибиотични субстанции и дискове**

**Антибиотични субстанции:** Бяха използвани: cefotaxime (ISN, Germany), colistin sulfate (Sigma-Aldrich), nitrocefin (Becton Dickinson)

**Антимикробни дискове:** Бяха използвани: amoxicillin/ clavulanic acid 30µg (AMC), ceftazidime 10 µg (CAZ) , cefotaxime 5 µg (CTX), cefepime 30 µg (FEP), ceftazidime 10 µg (IMP), meropenem 10 µg (MEM), piperacilin/tazobactam 36 µg (PIP/TAZ), chloramphenicol µg (CHL), tigecycline 15 µg (Tige), gentamicin 10 µg (GEN), amikacin 30 µg (AMK), tobramycin 10 µg (TOB), trimethoprim/sulfamethoxazole 25 µg (SXT), ciprofloxacin 5 (CIP), levofloxacin 5 µg (LVX), fosfomycin 200 µg (FOS), Nitrofurantoin 100 µg (NF), 5-nitrox 30 µg (5NO). Всички дискове бяха на OXOID, UK. Съдържанието на антибиотика в дисковете съответстваше на изискванията на EUCAST, 2018.

##### **4.4.2 Дифузионно-дискос метод на Bauer-Kirby**

Техника: Петритата за определяне на чувствителността съдържаха 25 ml Мюлер -Хинтон II агар (BD) с дебелина на слоя 4 мм. Бактериалният инокулум бе подготвен от 24 часова агарова култура на изследваните щамове и стандартизиран до  $10^8$  CFU/ml (0.5 Mac Farland). Посявката на петрита бе по метода чрез памучен тампон, с трикратно завъртане на 60 °C. Антибиотичните дискове се поставяха на 1.5 см от ръба на петритата и те се култивираха на 35°C за 18-24 часа. Тестовите бяха извършени и интерпретирани в съответствие с препоръките на EUCAST, 2018 ([www.eucast.org](http://www.eucast.org))

##### **4.4.3. Определяне на MIC чрез градиентен MIC метод**

Методът беше използван за определяне на MIC на tigecycline, посредством MIC Test Strip (Liofilchem, Italy). Извършването на тестовите и отчитането на резултатите бе направено в съответствие с препоръките на производителя.

##### **4.4.4. SuperPolymyxin Medium (SPM), използвана като скрийн агар за colistin**

Средата бе предоставена от Александровска болница като е направена съгласно методологията, описана от Nordmann et al., 2016, но без добавяне на Daptomycin и

Amphotericin B. Средата съдържа ЕМВ агар (Levin) 15g с крайна концентрация 3.75%, dH<sub>2</sub>O 400ml и colistin sulfate 70µl в крайна концентрация 3.5mg/ml.

Всяка петра скрийн-агар colistin може да се използва еднократно. Задължително се използват положителна контрола *E.coli* NCTC 13846 и отрицателна *E.coli* ATCC 25922. Приготвя се суспензия с мътнина 0.5McF. Посредством тампон, за всеки шам и за контролите се инокулира сектор от агара с размери 15-20mm. Петритата се инкубират в термостат при температура 35 °C за 24 часа. Тестът за всички изследвани щамове се счита за валиден, само ако контролните щамове дават очаквания резултат-липса на растеж за отрицателната контрола и наличие на конфлуентен растеж за положителната. Тестът се приема за положителен при наличие на растеж в инокулирания за съответния шам сектор-под формата на конфлуентен растеж или изолирани колонии. Тестът е негативен при липса на растеж.

**4.4.5. Определяне на MIC на colistin чрез (Liofilchem, Italy)-SensiTest colistin** е търговски кит за определяне на MIC на colistin чрез broth microdilution method. Представява стрип, съставен от 8 полистиренови ямки с плоско дъно, които съдържат лиофилизиран colistin с концентрации от 0.25 до 16ml/L (в стрипа е включена и ямка без антибиотик за контрол на растежа). Всички тестове бяха извършени в съответствие с препоръките на производителя.

От чиста култура от изследвания шам се приготвя суспензия с мътнина 0.5 McF в стерилен физиологичен разтвор. 60µl от тази суспензия се инокулира в 13ml стерилен катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон (Biolab Zrt.). От така приготвения инокулум, след добро хомогенизиране, във всички ямки от стрипа се накапват по 100 µl. Инокулираният стрип се поставя в полиетиленова торбичка и се инкубира в термостат при 35° C за 16-20 часа в аеробна атмосфера. На следващия ден се отчита MIC. Тестът се счита за валиден, ако е налице растеж в ямката за контрол на растежа. MIC е най-ниската концентрация на антибиотика, при която няма растеж.

#### **4.5. Фенотипни методи за доказване на щамове, продуценти на бета-лактамази**

##### **4.5.1 Фенотипни методи за доказване на продуценти на широкоспектърни бета-лактамази – двойно-дискосинергичен тест**

Производството на широкоспектърна бета-лактамаза беше доказано посредством двойно-дискосинергичен тест за синергизъм. Бяха използвани дисковете amoxicillin/clavulanic 30µg, cefotaxime 5 µg, ceftazidime 10 µg, cefepime 30 µg.

#### 4.6. Фенотипни методи за доказване на продуценти на карбапенемази

##### 4.6.1. Модифициран Hodge-test (МНТ)

Техника: приготвя се 0.5 McFarland разреждане на *Escherichia coli* ATCC 25922 в 5 ml физиологичен разтвор. Разреждане 1:10 се инокулира върху петри с Mueller Hinton agar. В центъра на петрито се поставя диск meropenem 10 µg. Изпитваните щамове се посяват в права линия (по хода на радиуса) от ръба на диска до ръба на петрито и се инкубират на 35-37°C за 16–24 часа. След 16-24 часа, МНТ позитивният тест показва детелинообразно деформиране на зоната на задържан растеж на *Escherichia coli* около диска по протежение на тествания щам. Отрицателният тест не показва растеж на *Escherichia coli* 25922 по протежение на тествания щам в зоната на дисковата дифузия.

##### 4.6.2. КРС, MBL, OXA-48 disk kit (acc. to EUCAST), (Liofilchem, Italy).

Тестовите бяха направени и отчетени съобразно инструкциите на производителя.

Прави се суспензия с изследвания щам във физиологичен разтвор - 0,5 по McF. Поставят се антибиотични дискове с meropenem, както и meropenem + phenylboronic acid, meropenem + EDTA, meropenem + cloxacillin, temocillin 30µg. За наличие на метало бета-лактамаза се приема увеличението на зоната с  $\geq 5$  мм на диска meropenem с EDTA, при увеличение на зоната с  $\geq 4$  мм при диска с борониева киселина спрямо диска meropenem се касае за карбапенемази от клас А – напр. КРС. Увеличението на зоната с  $\geq 5$ мм при комбинирания със cloxacillin и с  $\geq 4$  мм при комбинирания с phenylboronic acid диск показва наличието на AmpC продуцент или на переабилитетни промени. Липсата на синергизъм и зона около диска temocillin (<11 мм) е суспектно за OXA-48/OXA-48-like ензими.

#### 4.7. Методи за доказване на хиперпродукция на AmpC ензими

Изолатите *E. coli* и *K. pneumoniae* резистентни на ceftazidime бяха приемани като суспектни за продуценти на плазмидна AmpC. По отношение на *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*. и *Hafnia* и др. С наличие на хромозомни AmpC ензими като евентуални хиперпродуценти или такива с дерепресирана продукция на AmpC ензими, се приемаха изолатите, резистентни на всички бета-лактами с изключение на карбапенемите и цефалоспорините четвърта генерация. Зона на задържка с диаметър  $\geq 24$  см. около диска ceftazidime 30µg се приемаше за суспектна за наличие на плазмидни AmpC β-лактамази или за свръхпродукция на хромозомни такива.

## 4.8. Молекулярно-генетична идентификация на видовете ESBL/CRE/AmpC ензими.

### 4.8.1. Полимераза-верижна реакция (PCR)

Принцип: Полимераза-верижната реакция (PCR) представлява метод за размножаване на търсен фрагмент ДНК, който служи за матрица. Двойно - верижната ДНК се денатурира термично, възникващите единични вериги се хибридизират с два къси олигонуклеотида, които служат като стартери (праймери) на синтезата на ДНК, и маркират точно интересувашата ни последователност. В резултат на този метод може точно да се охарактеризират изследваните бета-лактамази и карбапенемази, използвайки специфични за отделните групи праймери

- За тясносектърни и ESBL (-SHV, -TEM, -CTX-M, OXA-3 гр.)
- За AmpC ензими (DHA, -FOX, -MOX, -CMY, -EBS, -ACC)
- За карбапенемази (KPC, -NDM, -OXA-48, -VIM, -IMP).

#### Техника:

**ДНК екстракти:** Щамовете бяха култивирани на МакКонки агар. Две - три еднакви колонии се ресуспендираха в Tris-EDTA (TE) буфер (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH ~8.0-8.3) и се центрофугираха на 10 000 rpm за 5 мин. Супернатантата се отпипетираше и утайката се ресуспендираше отново в Tris-EDTA буфер. Пробите се нагряваха за 10мин на 100°C. Термоекстрактите бяха съхранявани във фризер на -30°C.

Апарати: PCR-амплификацията беше проведена в следните термосайклъри: GenePro Thermal Cycler модел: TC-E-96G (BIOER, Hangzhou. Китай) и LifeECO модел: TC-96/H(b)C (BIOER, Hangzhou. China).

Полимераза-верижната реакция беше изпълнена в обем 25 µl, като вземахме 1.2 µl от така обработените термоекстракти. Реакционната смес включваше 1x reaction buffer (съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl), 1.5 или 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (GenetBio, Korea), 10-15 pmol от всеки праймер, 0.75 U Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea).

Използваните праймери, температурите на свързване както и размерите на амплификационните продукти са представени в **Таблица 4**. Всички използвани праймери са от публикувани статии (**Таблица 4**) и са синтезирани от Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK, или Alpha DNA, USA или Metabion, Germany.

**Таблица 4. Праймери използвани в PCR реакциите.**

Праймер		Т на хибридизация	Очакван размер	Литература
SHV	SHV-A: actgaatgaggcgcttcc SHV-B: tcccgcagataaatcacc	61°C	297 bp	Markovska R, 2008
CTX-M	CTX-M-V: cvatgtgcagyaccagtaa CTX-M-R: argtsaccagaaymagcgg	61°C	585 bp	Markovska R, 2008
OXA III group	OXA-1-V: ccggagcctcattaattg OXA-1-R: aggggagccaaaaagcttg	58°C	963bp	Markovska R, 2008
CMY	CMY F - aacacactgattgcgtctgac CMY R - ctgggcctcatcgtcagtta	61°C	1,226 bp	Pérez-Pérez F, 2002
DHA	DHA F : aac ttt cac agg tgt gct ggg t DHA R: ccg tac gca tac tgg ctt tgc	63°C	405 bp	Pérez-Pérez F, 2002
FOX	FOX F : aac atg ggg tat cag gga gat g FOX R : caa agc gcg taa ccg gat tgg	63°C	190 bp	Pérez-Pérez F, 2002
EBS	EBCF: tcg gta aag ccg atg ttg cgg EBC R: ctt cca ctg cgg ctg cca gtt	64°C	302 bp	Pérez-Pérez F, 2002
MOX	MOX F: gct gct caa gga gca cag gat MOX R: cac att gac ata ggt gtg gtg c	64°C	520 bp	Pérez-Pérez F, 2002
ACC	ACCF: aac agc ctc agc agc cgg tta ACCR: ttc gcc gca atc atc cct agc	64°C	346 bp	Pérez-Pérez F, 2002
ACT	F: ttg aac tgc tat tac gga aga t R: gca atg ttt tac trc agc gc	52°C	1133 bp	Rottman M, 2002
TEM	TEM-A ataaaattcttgaagac TEM-B ttaccaatgcttaatca	43°C	1075 bp	Markovska R, 2008
KPC	F - cgtctagtctgctgtcttg R - cttgtcatcctgttaggcg	57°C	798 bp	Poirel L, 2011
NDM	F - ggtttggcgatctggtttc R - cggaatggctcatcacgatc	57°C	621 bp	Poirel L, 2011

OXA-48	F- gcgtgggtaaggatgaacac R- catcaagttcaaccaaccg	57°C	438 bp	Poirel L, 2011
VIM	F-gatggtgtttggctgcata R- cgaatgcgagcaccag	54°C	390 bp	Poirel L, 2011
IMP	F - ggaatagagtggttaaytctc R - ggtttaayaaaacaaccacc	54°C	270bp	Poirel L, 2011

Праймерите за *bla*<sub>МОХ</sub> амплифицират гените за МОХ, CMY-1, CMY-8 до CMY-11 ензими. Праймерите за *bla*<sub>CMY</sub> амплифицират гените за LAT, CMY-2 до CMY-7 ензими, докато EBS праймерите амплифицира *bla*<sub>MIR/ACT</sub>. (Perez-Perez, 2002)

Multiplex PCR CTX-M/SHV : Амплификацията беше извършена за 30 цикъла:

- денатурация на 95°C за 45 сек.
- хибридизация - 61°C за 45 сек.
- удължаване на 72 °C за 45 сек.;

Multiplex PCR DNA/CMY : Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

- денатурация на 94°C за 30 сек.
- хибридизация (свързване на праймерите) - 61°C за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 1 мин;

Multiplex PCR MOX/FOX/ACC : Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

- денатурация на 94°C за 30 сек.
- хибридизация (свързване на праймерите) - 64°C за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 45 сек.;

PCR EBS : Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

- денатурация на 94°C за 30 сек.
- хибридизация (свързване на праймерите) - 64°C за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 45 сек.;

PCR TEM: Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

- денатурация на 94°C за 30 сек.
- хибридизация (свързване на праймерите) - 49°C за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 1 мин

PCR OXA-1: Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

- денатурация на 94°C за 30 сек.

- хибридизация (свързване на праймерите) - 61°C за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 1 мин

Праймерите за детекция на основните класове карбапенемази бяха според Poirel L, 2011

Multiplex PCR carba 1 (KPC, NDM, OXA-48): Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

- денатурация на 95°C за 30 сек.
- хибридизация (свързване на праймерите) - 57°C за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 45 сек.;

Multiplex PCR carba 2 (VIM, IMP): Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

- денатурация на 95°C за 30 сек.
- хибридизация (свързване на праймерите) - 54°C за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 45 сек.;

Всички продукти от PCR бяха анализирани електрофоретично на 1.5% агарозен гел. Агароза Standard EEO (Applchem, Germany; Serva, Germany или SeaKem LE Agarose, LONZA, Rockland, ME) беше разтопявана в 100 ml 1x TAE (40mM Tris, 20mM оцетна киселина, 1mM EDTA) буфер в микровълнова фурна на 200 W за около 2 min до достигане на хомогенна стопилка. След това беше добавян етидиев бромид до крайна концентрация 0.5 µg/ml. Агарозата се изливаше във ваничка за хоризонтална електрофореза, поставена в камера за електрофореза. Поставяше се гребен за електрофореза. След полимеризиране на агарозата в електрофоретичната вана се наливаше 1x TAE буфер, гребенът се отстраняваше и се накапваха пробите. Предварително 10 µl от PCR-продукт се смесваха с 1-2 µl 6x DNA Loading Dye (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada) или Gel Loading Dye (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA). Във всяка електрофореза се оставяше един старт, в който се накапва молекулен маркер PCR Sizer 100 bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada). Електрофорезата се провеждаше за 50 до 90 минути при 400 mA и 120V. Амплификационните продукти бяха визуализирани на UV-лъчев трансилюминатор TFX-35M (Vilber Lourmat, France).

#### 4.9. ДНК секвениране

**Техника:** Гените бяха амплифицирани по описания вече начин за изпълнение на полимеразо-верижна реакция. Използваните праймери за амплификация са представени в **Таблица 5**. Пречистване на PCR продукта с цел последващо секвениране по Sanger бе извършено чрез Rapid PCR Cleanup Enzyme Set (ExoSAP, Applied Biosystems, USA) и секвениран по Sanger: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer, на секвенатор модел: Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer.

**Таблица 5. Праймери използвани при нуклеотидното секвениране**

ESBL	Праймери	Температура на хибридизация	Ампликон	
SHV	SHV-H: aacgccgggttattct SHV-E: ttacgcttgccagtgtc	58°C	930bp	Markovska R, 2008
CTX-M-1 group	CTX-M-1/P1c: tcgtctctccagaataagg CTX-M-1/P2c: aaggagaaccaggaaccacg	56°C	1100bp	Markovska R, 2008
CTX-M-9 group	F: agggaaactgatgtaac R: agatacgtgatctgatcc	52°C	1000bp	Markovska R, 2015
CMY-2 group	CMY-2-K – ggtgcaaatcaaca cac CMY- CMY-2-M - actgcagcaacgacgggc	61°C	1400bp	Markovska R, 2017
OXA III group	OXA-1-V: ccggagcctcattaattg OXA-1-R: aggggagccaaaagcttg	58°C	963bp	Markovska R, 2008
TEM	TEM-A: ataaaattcttgaagac TEM-B: ttaccaatgcttaatca	43°C	1075bp	Markovska R, 2008
DHA	DHA-1A: ctgatgaaaaaatcgttatc DHA-1B: attccagtgcactcaaaaata	52°C	1116 bp	Yan J, 2002
KPC	KPC1F - gctacacctagctccaccttc KPC-R -tcctagcctaaatgtgact	56°C	~1000bp	Moland et al., 2003
NDM	NDM-F-actgctcgcaaagcccag NDM-R-ctcatgtttgaattcgccc	61.5°C	~1000bp	Rasheed J, 2013

**Техника:** Гените бяха амплифицирани по описания вече начин за изпълнение на полимеразо-верижна реакция. Използваните праймери за амплификация са представени в **Таблица 4**. Пречистване на PCR продукта с цел последващо секвениране по Sanger бе извършено чрез Rapid PCR Cleanup Enzyme Set (ExoSAP, Applied Biosystems, USA) и секвениран по Sanger: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer, на секвенатор модел: Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer.

Използваните праймери за амплификация на широкоспектърните бета-лактамази, OXA, CMY, DHA, KPC и NDM обхващаха целия ген. (Markovska, 2013; Markovska, 2017a; Rasheed JK, 2013). Анализът на секвенциите беше направен чрез Chromas Lite версия 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Australia), DNAMAN версия 8 (Lynnon Corporation, USA) и програмата BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### **4.9.1. Потвърждаване на продукцията на ESBL и определяне на спектъра на продуцираните бета-лактамази чрез изоелектрично фокусиране (IEF)**

Изоелектричното фокусиране (IEF) е високочувствителен електрохимичен метод за разделяне и характеризиране на протеини, в зависимост от тяхната изоелектрична точка. Разделянето се извършва в полиакриламиден гел, съдържащ амфотерни молекули с ниска молекулна маса (амфолити), под действието на електрично поле. IEF се прилага за доказване на бета-лактамази, които като всички протеини имат различно рН и съответно различна изоелектрична точка. С този метод потвърждавахме ензимния спектър на изолатите, както и експресията на съответния, доказан с PCR, ензим.

##### **4.9.1.1 Материали за изоелектрично фокусиране**

- електродни ленти от филтърна хартия (размери 10-280-1 мм), Serva
- филтърни хартии (5-10 мм) (Serva) за нанасяне на пробите върху гела
- стъкла (120-280 мм), гумена пластинка 0.5 мм и щипки за приготвяне на камера за изливане на гела
- електроден разтвор за анода – 1 mol/L ортофосфорна киселина
- електроден разтвор за катода - 1 mol/L натриева основа
- 1 mol/L HCl
- Амфолити: Pharmalyte 3-10, LKB, България
- Разтвор на акриламид (Applichem GmbH) съдържащ 30% акриламид и 1%

бисакриламид

- 87 % разтвор на глицерол (ISN)
- 1 % разтвор на амониев персулфат (Applichem GmbH)
- TEMED (ISN)
- Миоглобин (ISN) 1 % разтвор в дестилирана вода
- Nitrocefin (Becton Dickinson) – разтвор 500 mg/L
- Установка за хоризонтална електрофореза и електрически генератор, произведени в Развойна Техническа База – Медицински университет, София
- Охлаждаща система с течаща вода, произведена в Развойна Техническа База – Медицински университет, София.

#### **4.9.1.2. Ензимни екстракти**

За получаване на ензимните екстракти донорните щамове и получените трансконюганти бяха култивирани в 100 ml Tryptic Soy Broth (Difco) на водна баня с разклащане при температура 37°C, до гъстота 10<sup>9</sup> CFU/ml. Клетките бяха отделени чрез центрофугиране на 8000 rpm за 20 минути. Получените утайки бяха ресуспендирани с 1% глицин и след това лизирани чрез многократно замразяване на -70°C и размразяване. За получаване на ензимните екстракти центрофугирахме в хладилна центрофуга на 14000 rpm за 30 min при 4°C. Те бяха съхранявани на -20°C.

#### **4.9.1.3. Тест за ензимна активност**

Бета-лактамазната активност на екстрактите беше проверявана чрез добавяне на 5 µl от екстракта на всеки щам към 30 µl от разтвор на Nitrocefin 500 mg/L. Отчита се времето за промяна на цвета от жълт в червен. Ако то беше между 5 сек. и 1 мин., тестът беше интерпретиран като положителен и екстрактът можеше да бъде фокусиран.

#### **4.9.1.4. Техника**

Изоелектричното фокусиране беше извършено по модифицирания от А. Bauernfeind (Bauernfeind, 1990) метод на Matthew (Matthew, 1975). В резултат на предварителни собствени проучвания бяха направени някои изменения в протокола.

Полиакриламидния гел беше приготвен от:

- 20.5 ml дестилирана вода
- 8.6 ml разтвор на акриламид съдържащ 30 % акриламид и 1 % бисакриламид
- 1 ml Pharmalyte pH 3 – 10
- 4 ml глицерин

- 25  $\mu$ l TEMED
- 0.85 ml Ammoniumperoxodisulfate

Сместа се инжектираше между две стъкла с ограничител гумена пластинка. Плаката полимеризираше за половин час. Пробите се нанасяха върху филтърните хартийки, разположени близо до анода. Миоглобинов разтвор, използван за контрол на фокусирането се поставяше на 4 места близо до катода и анода, отляво и отдясно на плаката. Електродни ленти, напоени с фосфорна киселина и натриева основа се поставяха върху повърхността на плаката до анода и катода. За по-добър контакт на стъклото с охлаждащата система се слагаше няколко капки петролиум. Параметрите на режима на тока бяха установени на: max 14 mA, 1000 V , за приблизително 2 часа при непрекъснато охлаждане с течаща вода. Електрофорезата протичаше, докато се слоят двете миоглобинови ивици отгоре и отдолу на гела. След фокусирането, анодната лента се заменяше с лента, напоена с HCl за неутрализация.

Визуализирането на ивиците на  $\beta$ -лактамазите се извършваше с разтвор на Nitrocefin (BD) 500 mg/L. Изоелектричните точки на изследваните ензимни екстракти бяха определени чрез сравняване с  $\beta$  лактамази с известни pI , използвани като контроли.

#### **4.9.1.5. Bioassay – биологичен тест за $\beta$ -лактамазна хидролитична активност**

Методът беше използван за доказване на хидролитичната активност на различните  $\beta$ -лактамази. Bioassay беше провеждан според методиката на Bauernfeind et al (Bauernfeind A, 1999). Полиакриламидният гел беше покриван с 100 ml Tryptic Soy Agar (Difco) (50%), съдържащ съответния антибиотик: CTX в концентрация 2  $\mu$ g/ml или CAZ в концентрация 1  $\mu$ g/ml беше инкубиран на 35°C за 2 часа. Към 94 ml TSA (50%) добавяхме 12 ml TSB, съдържащ чувствителен на съответния антибиотик щам *E. coli* (ATCC 25922), стандартизиран до 10<sup>8</sup> CFU/ml и сместа се изливаше върху култивираната вече плака. След инкубиране 18-20 часа на 35°C наличието на растеж на щама определяше ивиците, разградили антибиотика.

## **4. 10. Епидемиологичен анализ**

### **4.10.1 ERIC-PCR**

**Принцип:** При ERIC-PCR се използват праймери, амплифициращи постоянни вътрегенни последователности, характерни за семейство *Enterobacteriaceae* (Versalovic J, 1991). Броят и размерите на фрагментите се установяват при агарозна гел-електрофореза, оцветяване на гела с ethidium bromide и чрез наблюдение с UV трансилюминатор.

**Техника:** Извличането на тотална ДНК беше направено с кит GFX Genomic Blood Purification Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) според указанията на производителя. Бактериите бяха култивирани в TSB бульон за една нощ. Един ml от културата беше центрофугирана на 11 000 оборота за 5 мин. Утайката беше ресуспендирана в 60µl Proteinase K буфер (Tris-HCl pH 8.0; SDS; EDTA). Впоследствие беше прибавяна 10µl Proteinase K с концентрация 20 mg/ml. След 15 мин. престой на 55°C беше добавян 500µl extraction solution. Реакционната смес престояваше 10 мин. и беше пренасяна в GFX колонките. Те бяха центрофугирани на 11 000 оборота. Колонките бяха промивани първо с 500µl extraction solution и после с 500 µl washing буфер (етанол, Tris-EDTA). ДНК беше елюирана с 100 µl TE буфер загрят на 70°C.

При ERIC-PCR метода бяха използвани следните праймери:

ERIC1R – ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C

ERIC2 AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC

(Amersham Pharmacia Biotech или Metabion).

ERIC PCR беше изпълняван в обем 25 µl, като вземахме 4 µl от ДНК екстрактите. Реакционната смес включваше 1x reaction buffer (съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 0,4 mM dNTP mix (ABBiogyne), 50 pmol от ERIC 1R и от ERIC 2, 1.5 U Taq полимераза (ABBiogyne).

Амплификацията беше извършвана на апарат Bioer: денатурация на 94°C за 5 мин., 94°C за 30 сек., хибридизация на 26 °C за 30 сек., удължаване на 72 °C за 1 мин. 30 сек. за 5 цикъла. Следват 30 цикъла денатурация на 94°C за 30 сек., хибридизация на 45°C за 30 сек. и удължаване на 72°C за 1 мин. 30 сек. След амплификацията 18 µl от всяка реакционна смес бяха подложени на електрофореза (установка за хоризонтална електрофореза Bio Rad) в 2 % агарозен гел при 120 V за 120 мин. Продуктите бяха визуализирани на UV трансилуминатор (Vilbert Lourmat) с 0.5 µg/ml етидиев бромид. Размерът на продукта беше определян чрез сравняване с ДНК маркер: PCRSizer 100bp DNA Ladder (100bp-1517bp) (New England Biolabs). Разлика от 2 ивички между изолатите определяше наличието на отделни ERIC типове, а разлика от една ивичка на подтипове.

#### **4.10.2 Мултилокусно секвениране Multi Locus Sequence Typing (MLST)**

Принцип: MLST е метод, при който чрез ДНК секвениране на седем постоянно присъстващи гени (“house-keeping”) се определят отделните седем алела. Специфичната комбинация на алелите на локусите определят секвенционния тип (ST).

Техника: Беше изолирана ДНК на проучваните изолати по описаният по горе начин. Амплифицирани бяха чрез стандартна PCR реакция седемте постоянно присъстващи гена – *gap*, *inf*, *mdh*, *pgi*, *pho*, *rpo*, *ton* според Diancourt et al. J Clin Microbiol. 2005. Праймерите и температурата на свързване е показана на **Таблица 6**. Чрез ДНК секвениране (и в двете посоки) на получените ампликони се установява точният алел в сайта за MLST на *K pneumoniae* (<https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Комбинацията от седемте алела дава точния секвенционен тип – пак в сайта на Pasteur института ([https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst\\_klebsiella\\_seqdef&page=profiles](https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef&page=profiles)).

Чрез PCR реакция бяха амплифицирани и седемте постоянно присъстващи гена при *E.coli*- *adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*, които са показани на **Таблица 7**. Беше направено и MLST на изолатите *Enterobacter spp.* на седемте постоянно присъстващи гена- *dna*, *fus*, *gyr*, *rpl*, *leu*, *pur*, *rpo*, показани на **Таблица 8**.

**Таблица 6. Праймери, използвани при MLST *K.pneumoniae***

Ген	Последователност на праймерите	Темп на свързване
<i>rpoB</i>	<b>F:</b> GGCGAAATGGCWGAGAACCA <b>R:</b> GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	59°C
<i>gapA</i>	<b>F:</b> TGAAATATGACTCCACTCACGG <b>R:</b> CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	64°C
<i>mdh</i>	<b>F:</b> CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG <b>R:</b> CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	64°C
<i>pgi</i>	<b>pgi2F:</b> CTGCTGGCGCTGATCGGCAT <b>pgi2R:</b> TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT	64°C
<i>phoE</i>	<b>F:</b> ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG <b>R:</b> TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	59°C
<i>infB</i>	<b>F:</b> CTCGCTGCTGGACTATATTCG <b>R:</b> CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	59°C
<i>tonB</i>	<b>F:</b> CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT <b>R:</b> ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	64°C

**Таблица 7. Праймери, използвани при MLST *E.coli***

Ген	Последователност на праймерите	Темп на свързване
<i>adk</i>	<b>F:</b> TCATCATCTGCACTTTCCGC <b>R:</b> CCAGATCAGCGCGAACTTCA	60°C
<i>fumC</i>	<b>F:</b> TCACAGGTCGCCAGCGCTTC <b>R:</b> TCCCGGCAGATAAGCTGTGG	64°C
<i>gyrB</i>	<b>F:</b> TCGGCGACACGGATGACGGC <b>R:</b> GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	68°C
<i>icd</i>	<b>F:</b> ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCA CA <b>R:</b> GGACGCAGCAGGATCTGTT	60°C
<i>mdh</i>	<b>F:</b> AGCGCGTTCTGTTCAAATGC <b>R:</b> CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT	60°C
<i>purA</i>	<b>F:</b> TCGGTAACGGTGTGTGCTG <b>R:</b> CATACGGTAAGCCACGCAGA	64°C
<i>recA</i>	<b>F:</b> CGCATTCGCTTTACCCTGACC <b>R:</b> AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG	60°C

**Таблица 8. Праймери, използвани при MLST *Enterobacter spp.***

Ген	Последователност на праймерите	Темп на свързване
<i>dna</i>	<b>F:</b> TCATCATCTGCACTTTCCGC <b>R:</b> CCAGATCAGCGCGAACTTCA	60°C
<i>fus</i>	<b>F:</b> TCACAGGTCGCCAGCGCTTC <b>R:</b> TCCCGGCAGATAAGCTGTGG	60°C
<i>gyr</i>	<b>F:</b> TCGGCGACACGGATGACGGC <b>R:</b> GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	60°C

<i>rpl</i>	<b>F:</b> ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA <b>R:</b> GGACGCAGCAGGATCTGTT	60°C
<i>leu</i>	<b>F:</b> AGCGCGTTCTGTTCAAATGC <b>R:</b> CAGG TTCAGAACTCTCTCTGT	60°C
<i>pyr</i>	<b>F:</b> TCGGTAACGGTGTTGTGCTG <b>R:</b> CATACGGTAAGCCACGCAGA	60°C
<i>rpo</i>	<b>F:</b> CGCATTCGCTTTACCCTGACC <b>R:</b> AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG	60°C

#### 4.10.3. Доказване на O25b-ST131 клона при изолатите *E.coli*

Доказването беше извършено чрез PCR с праймери O25pabB F и O25pabB R на 347bp (Clermont O et al., 2009)

<b>Pab</b>	O25pabB F: TCCAGCAGGTGCTGGATCGT O25pabB R: GCGAAATTTTTCGCCGTA CTGT	57°C
------------	---	------

PCR pab : Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

- денатурация на 94°C за 30 сек.
- хибридизация (свързване на праймерите) - 64°C за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 45 сек.;

#### 4.10.4. Филотипиране на изолатите *E. coli*

Главните филогенетични групи (A, B1, B2 и D) бяха определени чрез квадриплекс PCR (*chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*) Таблица 9.

Multiplex PCR VFR : Амплификацията беше извършена за 30 цикъла:

- денатурация на 94°C за 30 сек.
- хибридизация - 58°C за 10 сек.
- удължаване на 72 °C за 30 сек.;

**Таблица 9. Праймери, използвани при филоטיפиране на изолатите *E. coli***

Ген	Последователност на праймерите	Темп на свързване	Ампликони (bp)
<b><i>chuA</i></b>	5'-atggtaccggacgaaccaac-3' 5'- tgccgccagtaccsaagaca-3'	58°C	288
<b><i>yjaA</i></b>	5'-caaacgtgaagtgtcaggag-3' 5'-aatgcgttctcaacctgtg-3'	58°C	211
<b>TspE4. C2</b>	5'-cactattcgtaaggtcatcc-3 5'-agtttatcgctgcgggtcgc-3'	58°C	152

#### **4.11. Статистически анализ**

Статистически значимите разлики бяха оценени с chi-square тест или теста на Fisher (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>)

## 5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 5.1. Бактериални изолати

За периода 12.2017-12.2018г беше изследвано чревното носителство на суспектни за продукция на ESBL/карбапенемаза изолати при 1297 лица от София, Пловдив, Плевен, Варна и Бургас. Разпределението на пациентите и съответния брой изолати по здравни лечебни заведения и вида на изследваните - хоспитализирани пациенти или здрави индивиди - е представено на **Табл. 10**.

Обхванатите **хоспитализирани пациенти** бяха 580. От селективните хранителни среди бяха установени 210 цефалоспорин трета генерация резистентни изолати (36.2%). Общо изследваните деца и възрастните бяха 166 и 414 съответно, като установените изолати при деца /възрастни бяха съответно: 81/129 (48.7% / 31.2%).

Обхванатите **амбулаторни пациенти** бяха 717. От селективните хранителни среди бяха установени 163 изолати цефалоспорин трета генерация резистентни (22.7%). Общо изследваните деца и възрастни бяха 408 и 309 съответно, като установените изолати при деца /възрастни бяха съответно: 95/68 (23.3% / 22.0%).

**Таблица 10. Разпределение на пациентите и съответния брой изолати по лечебни заведения и вида на изследваните (хоспитализирани пациенти или здрави индивиди, деца или възрастни)**

Лечебно заведение/МДЛ	Общ брой изследвани	Брой (възрастни и/деца)	Брой хоспитализиран и/зdravi	Брой изолати
МБАЛ"Света Марина" Варна	158	158/0	158/0	61
УМБАЛ д-р Г. Странски- Плевен	71	3/68	71/0	25
МЦ"Екзакта Медика" Плевен	126	65/61	0/126	22
УМБАЛ"Св.Георги" Пловдив	102	4/98	102/0	58

МДЛГ"Лина"- Бургас	244	244/0	0/244	36
УМБАЛ "Александровска" София	120	120/0	120/0	28
П-ра МБАЛ-София	82	82/0	82/0	21
УМБАЛСМ"Н.И. Пирогов"	47	47/0	47/0	12
МДЛГ"Медирс"- София	170	0/170	0/170	49
МЦ"Торакс - София	52	0/52	0/52	6
МДЛГ"Лора"- София	125	0/125	0/125	28
<b>Общо</b>	<b>1297</b>	<b>723/574</b>	<b>580/717</b>	<b>346</b>

## 5.2. Видова идентификация

На базата на конвенционалните микробиологични техники бяха установени 373 изолата от разред *Enterobacterales*.

При последващото определяне на чувствителността, 19 *Enterobacter spp.* и 8 *Citrobacter spp.* показаха чувствителност на цефалоспорините трета генерация и бяха изключени от проучването, като общата бройка изолати беше променена на 346. *Enterobacter spp.* и *Citrobacter spp.* са продуценти на вродени AmpC ензими, а наличието на cefotaxime индуцира експресията на AmpC гените, което обяснява растежа на тези изолати на селективната среда. Така процентът на установените суспектни за продукция на ESBL изолати беше 27%, като *E. coli* беше 61.5%, а *Klebsiella spp.* 24.2%. От тях 14 изолата (13 *Klebsiella pneumoniae* и 1 изolat *E. coli*) растяха и на селективната CHROM agar KPC среда и бяха приети като суспектни за продукция на карбапенемаза.

Изолирани бяха и 50 неферментативни бактерии, които в последствие бяха определени като: 48 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Pseudomonas oleovorans*, 1 *Acinetobacter baumannii*. Поради чувствителност към ceftazidime, 45 *Pseudomonas aeruginosa* и 1 *Pseudomonas oleovorans* не бяха включени в проучването. Поради малкия брой неферментативни изолати (1 *A. baumannii* и 3 *P. aeruginosa*), отговарящи на критериите за селекция, те бяха изключени от изследването.

Биохимичната идентификация на щамовете беше направена мануално, чрез стандартни пъстри редици или с автоматизираните системи (Phoenix, BD) или с MALDI-TOF, Biomerieux. Със системата Phoenix бяха проучени 63 изолата, при което не се установи разлика с конвенционалната идентификация. При 182 изолата (*K. pneumoniae* n=30, *K. oxytoca* n= 10, *E. coli* n=93, *Enterobacter spp.* n=24, *Citrobacter spp.* n=16, *M. morgani* n=5, *H. alvei* n=4) допълнително беше направена идентификацията с MALDI-TOF. MALDI-TOF потвърди идентификацията за изолатите *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *C. freundii complex*, *M. morgani*, *H. alvei*, като съществената разлика беше, че всички *Enterobacter cloacae complex* (мануална или Phoenix идентификация) бяха уточнени като *Enterobacter hormaechei* чрез MALDI-TOF.

### 5.3. Молекулярно-генетична идентификация с *hsp60* секвениране

Беше направено и сравнение на идентификацията чрез MALDI-TOF с молекулярно-генетична идентификация чрез *hsp60* секвениране. Бяха тествани всичките изолати от *Enterobacter cloacae complex* n=24, *Citrobacter freundii complex* n=16, както и *K. oxytoca* изолатите. При всички *C. freundii complex* изолати беше потвърдена принадлежността към *C. freundii complex* групата. При три изолата беше установена специфичния вид от тази група – *Citrobacter braakii*, но за улеснение в настоящото проучване ще запазим името *C. freundii complex*. Молекулярно-генетичната идентификация установи наличието на 4 вида *Enterobacter* – *E. hormaechei* n=19, *E. soli* n=1, *E. kobei* n=1, *E. asburiae* n=3. От тях само *E. soli* не влиза в групата на *E. cloacae complex*. При 19-те *E. hormaechei* изолати бяха установени три подвида както следва:

cluster III – отговарящ на *E. hormaechei* spp. *hofmanii* (идентичен на AJ543864) – 7 изолата

cluster VIII – отговарящ на *E. hormaechei* spp. *steigerwaltii* (идентичен на AJ543908) – 10 изолата

*E. hormaechei* spp. *xiangfangensis* – 2 изолата

За улеснение в настоящата работа ще използваме името *E. cloacae complex*. Три изолата *K. oxytoca* бяха идентифицирани като *Klebsiella michiganensis*.

Финалното разпределение на изолатите по видове беше следното: *Klebsiella spp.* (84) (*K. pneumoniae* n=74, *K. oxytoca* n= 7, *K. michiganensis* n=3), *E. coli* (213), *Enterobacter spp.* (24), *Citrobacter spp.* (16), *M. morgani* (5), *H. alvei* (4). **Таблица 11** показва разпределението на видовете, според мястото, от където са изолирани, респ. по лечебни заведения.

**Таблица 11. Разпределение на изолатите по видове и лечебни заведения**

Център	<i>Eco</i> (213)	<i>Kleb</i> <i>spp.</i> (84)	<i>Ent</i> <i>spp.</i> (24)	<i>Cit</i> <i>spp.</i> (16)	<i>Mm</i> (5)	<i>Hal</i> (4).
МБАЛ "Света Марина" Варна	34	15	6	4	2	0
УМБАЛ д-р Г.Странски-Плевен	16	8	3	0	0	0
МЦ "Екзакта Медика-Плевен	14	2	4	1	0	0
УМБАЛ „Св.Георги”-Пловдив	25	26	2	5	0	0
МДЛ „Лина”-Бургас	31	2	1	2	0	0
УМБАЛ "Александровска София	16	7	3	1	1	0
П-ра МБАЛ-София	11	8	2	0	0	0
УМБАЛСМ "Н.И. Пирогов	2	10	0	0	0	0
МДЛ "Медирс"-София	39	5	1	2	2	0
МЦ "Торакс-София	5	0	0	0	0	1
МДЛ "Лора"-София	20	2	2	1	0	3

Съкращения: *Eco*-*Escherichia coli*, *Kleb spp.*- *Klebsiella spp*, *Ent spp.* - *Enterobacter spp.*, *Cit spp.*- *Citrobacter spp.*, *Mm*- *M. morganii*, *Hal*- *H. alvei*

### Обсъждане

Процентът на установените цефалоспорин трета генерация резистентни изолати, 27% (346 от 1297), беше сравнително висок. Той е сходен с този, установен при подобно проучване в Португалия (Aires-de-Sousa M et al., 2019) и е много по-висок от нивата (около 10%) в подобни проучвания в други европейски страни (Strömdahl H et al., 2011; Schoevaerdt D et al., 2012; Otter JA et al., 2019; Díaz-Agero Pérez C et al., 2019; Hamprecht A et al., 2016; Platteel TN et al., 2015). Резултатите показват наличието на висок риск от разпространение на

проблемни изолати в болниците и в обществото и потвърждават факта, че чревния тракт е значим резервоар на ESBL/карбапенемаза продуценти. Увеличаването на цефалоспорин трета генерация резистентните изолати в чревния тракт може да се обясни и с нарастването на общата антибиотична консумация в България и по специално на тази на цефалоспорините, тя е на трето място в Европа (ECDC. Antimicrobial consumption in Europe. 2018). Увеличената употреба на цефалоспорини, предимно трета генерация се наблюдава не само в болниците, но и в обществото, особено след въвеждането на таблетната форма на cefixime (напр. Rancef като търговско наименование) и cefpodoxime. Необходимо е внимателно да се прецизира терапията с цефалоспорини трета генерация и хинолони, за да се намали рискът от увеличаване на нивото на тези продуценти.

Цефалоспорин трета генерация резистентните изолати при чревните носители бяха предимно от разред *Enterobacterales*, като преобладаваше *E. coli* (61.5%), следвано от *Klebsiella spp.* (24.2%). Интересен беше факта, че не беше установен нито един изолат от род *Proteus* и само единичен изолат *A. baumannii*. Вероятно предаването при тях е предимно по контактен път и чрез контаминирани повърхности.

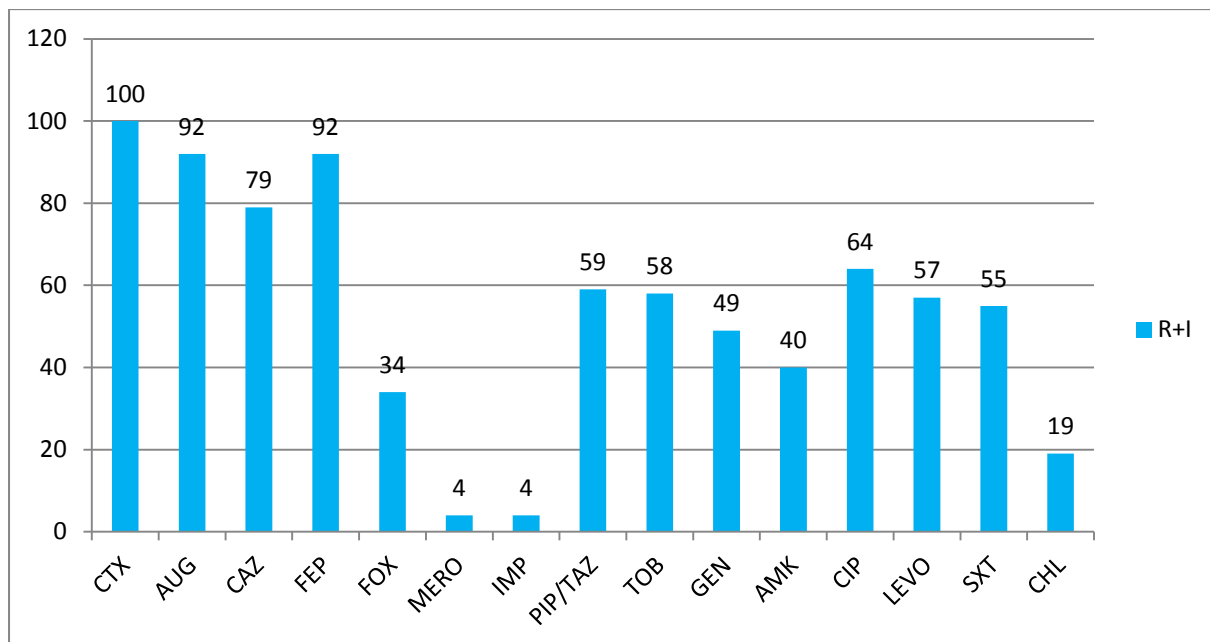
*Hsp60* методът за молекулярно-генетична идентификация е подходящ за видовата и подвидовата идентификация на *Enterobacter spp.*, както и на *K. oxytoca*. При *hsp60* секвенирането се получи интересен резултат за изолатите *K. oxytoca*. При седем от тях идентификацията се потвърди, докато другите три бяха доказани като *K. michiganensis*. Резултатите показват, че при 5 изолата (20.8%) MALDI-TOF дава неточна идентификация, основно при *E. asburiae* изолатите. Този резултат се потвърждава и от други проучвания (De Florio et al., 2018). Резултатите показват важната роля на молекулярно-генетичната идентификация при *K. oxytoca* и род *Enterobacter spp.*.

### **Заклучение:**

Процентът на установените цефалоспорин трета генерация резистентни изолати (27%) при 1297 проучените чревни носители беше висок. Те бяха предимно от разред *Enterobacterales*, като преобладаваше *E. coli* n=213 (61.5%), следвано от *Klebsiella spp.* n=84 (24.2%), *Enterobacter spp.* n=24 (7%), *Citrobacter spp.* n=16 (5%), *M. morgani* n=5 (1%), *H. alvei* n=4 (1%). *Hsp60* методът за молекулярно-генетична идентификация е подходящ за видовата и подвидовата идентификация на *Enterobacter spp.*, както и е възможно да е подходящ за идентификация на *K. oxytoca/K. michiganensis*. Необходимо е последващо проучване.

## 5.4. Чувствителност

Чувствителността на 346 изолата ентеробактерии, резистентни на цефалоспоринови трета генерация, за периода 2017/2018г, е показана на **Фиг. 11**



**Фигура 11. Антимикробна устойчивост в % (R+I) при всички 346 изолати, резистентни на цефалоспоринови трета генерация, установена чрез дисково – дифузионен метод**

**Легенда:** cefotaxime (CTX), amoxicillin/clavulanic acid (AUG), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), cefoxitin (FOX), meropenem (MERO), imipenem (IMP) - включени са само резистентните изолати, piperacillin/tazobactam (PIP/TAZ), tobramycin (TOB), gentamicin (GEN), amikacin (AMI), ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LEVO), co-trimoxazole (SXT), chloramphenicol (CHL)

Устойчивостта към всички тествани цефалоспоринови трета генерация беше между 79 -100%. Резистентността към amoxicillin/clavulanic acid беше 92%, а към ciprofloxacin и levofloxacin 64% и 57%, съответно. Нива на устойчивост към аминогликозиди бяха 40% - 58%, към trimetoprim/sulfomethoxazole - 55% и към piperacillin/tazobactam – 59%. Четиринадесет изолата бяха резистентни на карбапенеми (4%), 13 *K. pneumoniae* и 1 *E. coli*. При определянето на чувствителността бяха открити още 25 изолата с интермедиерни нива на чувствителността само към imipenem (5 *K. pneumoniae*, 7 *E. coli* и 7 *Enterobacter* spp, 5 *S. freundii* complex и 1 изолат *M. morgani*, с вродена AmpC продукция), като зоните бяха по-малки от таргетните cut-off стойности за imipenem, но с модифицирания Hodge тест и дисковете KPC&MBL&OXA-48 disk kit (Liophilchem, Italy) те не бяха доказани като възможни карбапенемаза продуценти (**виж точка 5.6**).

От **Фиг. 11** се вижда, че при изследваните щамове, устойчивостта към всички тествани цефалоспоринови трета генерация е висока, което отговаря на критериите за селекция на изолатите. Резистентността към *ceferime* и *amoxicillin/clavulanic acid* също беше много висока. Установява се сравнително висока устойчивост към аминогликозиди и към *pipercillin/tazobactam*. Резултатът е интересен, защото този антибиотик се препоръчва от някои проучвания в случаите на инфекции, причинени от ESBL продуценти (Sharara S et al., 2019). Получените данни показват, че той може да се използва само, ако имаме потвърждение на чувствителността на съответния изолат. Щамовете са загубили във висока степен и чувствителността си към *trimetoprim/sulphamethoxazole* - 55%.

Устойчивостта към *ciprofloxacin* - 64% и *levofloxacin* - 57% е важен показател, поради значимостта на флуорохинолоните за терапия на инфекции, причинени от широк спектър микроорганизми, както и наличието на кръстосана резистентност между всички флуорохинолони. Поради анатомичните особености на жените, чревните изолати лесно могат да причинят уроинфекции. Хинолоните са на едно от първите места за лечение на неусложнени уроинфекции в обществото. Сравнително високите нива на резистентност към тази група при чревните носители би представлявало терапевтичен проблем. Това налага прецизиране на терапията и задължително установяване на чувствителността на изолатите преди започване на терапията. Високата устойчивост към не-бета-лактамните антибиотици (флуорохинолони, аминогликозиди и *co-trimoxazole*) се обяснява с факта, че гените за ESBL обикновено са разположени на плазмиди, носещи и други гени за устойчивост, напр. за аминогликозид-модифициращи ензими и *qnr* гени (Jacoby GA et al., 2014). Всеки един представител на тези групи може да упражни селективен натиск. Употребата и на флуорохинолони в България е висока, тя е на четвърто място в Европа (ECDC. Antimicrobial consumption in Europe. 2018).

От голямо значение е и установената резистентност към карбапенеми – 4% (14/346). Това е групата, която се използва като последно средство на избор при животозастрашаващи инфекции, причинени от ESBL продуценти и наличието на такъв тип устойчивост е голям проблем за терапията, тези щамове са обичайно резистентни на повечето групи антимикробни средства, с изключение на *colistin*, *tigecycline* и евентуално *fosfomycin* (iv приложение). Резистентността към карбапенеми в света се увеличава през последните десетилетия, като основната причина за това са нарастващото разпространение на карбапенемаза продуциращите ентеробактерии. Чревният тракт е един от важните фактори за това разпространение. Много висок процент карбапенемаза продуценти (51.3%) се установява при хоспитализирани пациенти в Гърция за периода 2010г.-2012г – с преобладаване на KPC

продуцентите - в 57% (Pournaras S et al., 2013). При двумесечно проучване върху пациенти в португалска болница, се установява, че разпространението на продуцентите на карбапенемаза-резистентни изолати е 3% (Aires-de-Sousa M et al., 2019). Извън Европа честотата на чревна колонизация с карбапенемаза продуценти е много по-висока, както за болниците, така и за обществото. При проучване на чревното носителство в Мароко са установени 14% карбапенем-резистентни ентеробактерии (Girlich D et al., 2013). В Китай се установява 8.5% карбапенем-резистентни ентеробактерии, в болниците (Liu Q et al., 2019). По-висок процент се установява в Израел за 2011г – 12% карбапенем резистентни ентеробактерии (Ben-David D et al., 2011). В болница в САЩ са установени 18.9% носители на карбапенем резистентни ентеробактерии (Prasad N et al., 2016). Трябва да се има предвид, че често фекалното носителство продължава много дълго време, включително няколко години. Нивата на колонизация с ESBL и карбапенемаза продуценти дава представа за разпространението на тези ензими. При всяко постъпване в болница на такива хора може за започне разпространението на вътреболнична инфекция (Woerther PL et al., 2013).

При предишно подобно проучване в две болници във Варна и София, за периода 2014г, нивата на устойчивост при 100 цефалоспорин трета генерация резистентни изолати от фекални проби бяха amoxicillin/clavulanic acid – 56%, ceftazidime – 80%, cefotaxime – 100% , cefoxitin – 11%, cefepime – 69%, piperacillin/tazobactam – 39%, imipenem – 3%, tobramycin – 57%, gentamicin – 53%, amikacin – 21%, trimethoprim/sulfamethoxazole – 56%, ciprofloxacin – 27%, levofloxacin – 15%.

**Таблица 12** сравнява нивата на устойчивост от двата периода. Статистически значимо нарастване на устойчивостта беше установено през втория период 2017/2018г за amoxicillin/clavulanic acid, cefepime, piperacillin/tazobactam, amikacin, както и флуорохинолоните. Увеличаването на устойчивостта през втория период на изследване може да се обясни с нарастването на общата антибиотична консумация, на цефалоспорините трета генерация, както и високата консумация на флуорохинолони в България (ECDC. Antimicrobial consumption in Europe. 2018).

#### **5.4.1. Антимикробна устойчивост, разпределена по видове бактериални изолати**

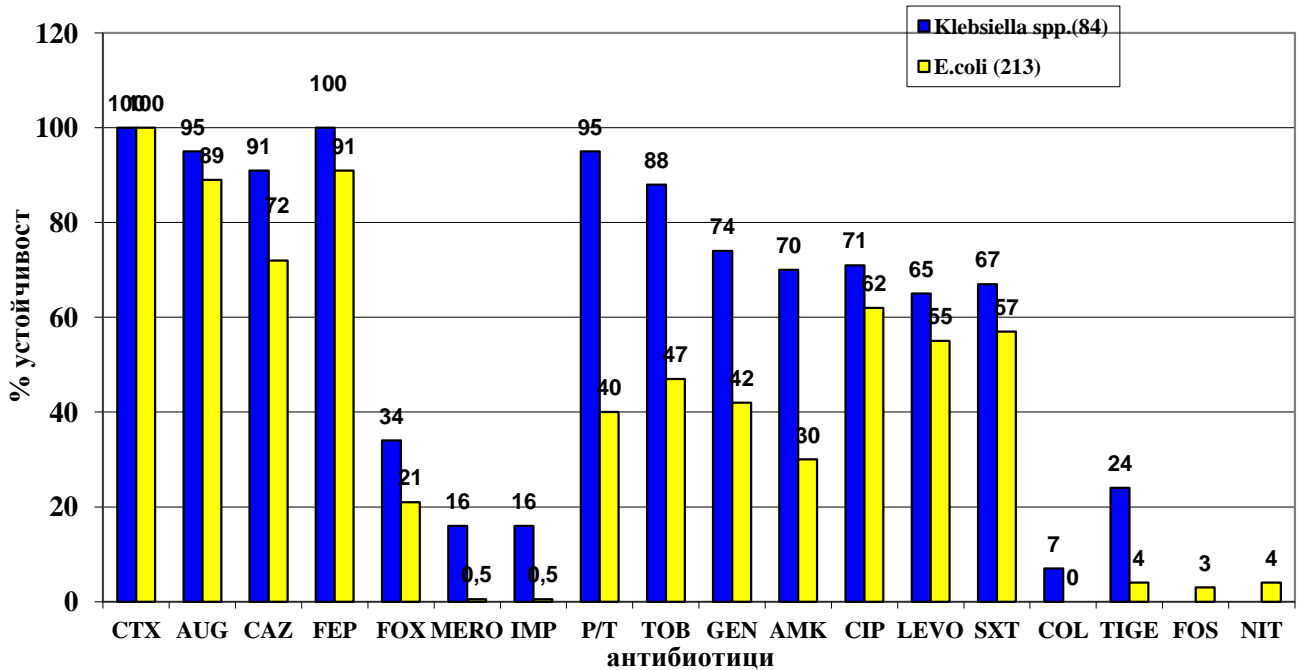
Анализът на антимикробната устойчивост на изолатите *Klebsiella spp* (n=84) и *E. coli* (n=213), показва значително по-високите нива на резистентност при почти всички изследвани групи антимикробни средства при *Klebsiella spp.*, особено по отношение на карбапенемите, аминокликозидите и piperacillin/tazobactam (**Фиг 12**).

**Таблица 12. Сравнение нивата на устойчивост от двата периода**

Антибиотик	2014 - % I+R	2017/2018- % I+R	p
cefotaxime	100	100	1.0
amox/clavulanic acid	56	92	<0.0001
ceftazidime	80	79	0.9595
cefepime	69	92	<0.0001
cefoxitin	11	34	<0.0001
meropenem	3	7	0.1703
imipenem	3	7	0.1703
piper/tazob	39	59	0.0002
tobramycin	57	58	0.8052
gentamicin	53	49	0.5623
amikacin	21	40	0.0003
ciprofloxacin	27	64	<0.0001
levofloxacin	15	57	<0.0001
co-trimoxazol	56	55	0.8474

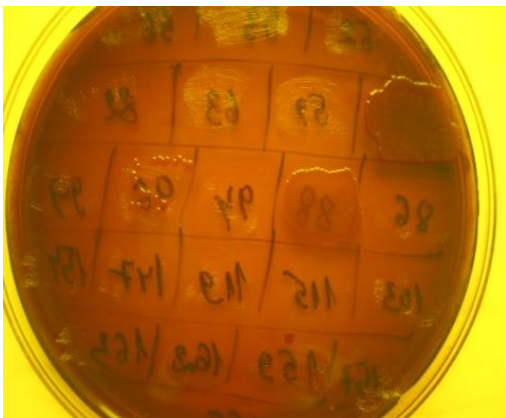
Изолатите *E. coli* бяха с много висока чувствителност към tigecycline (96%), карбапенеми (99.5%), colistin (100%), както и към fosfomycin (97%) и nitrofurantoin (96%).

Изолатите *E. coli* и *Klebsiella spp.* бяха посявани на селективната скрийн среда SPM (Фиг. 13) и установихме, че само 12 от изолатите *Klebsiella spp* растат на средата, като 6 от тях само с 1 колония. Всички изолати растящи на тази среда бяха тествани със SensiTest Colistin (Liofilchem, Italy). Всички изолати, показали наличие на 1 колония, бяха чувствителни на colistin с MIC  $\leq$  1 mg/L. Само 6 изолата *K pneumoniae* (7%), всички карбапенем резистентни, показаха MIC от 6 mg/L до >32 mg/L (Фиг. 14)



**Фигура 12. Антимикробна устойчивост в % (R+I) при изолатите *E.coli* (213) и *K.pneumoniae* (84), резистенти на цефалоспорици трета генерация**

**Легенда:** cefotaxime (CTX), amoxicilin/clavulanic acid (AUG), ceftazidime (CAZ), ceferime (FEP), cefoxitin (FOX), меропенем (MERO), имипенем (IMP) - включени са само резистентните изолати, piperacillin/tazobactam (PIP/TAZ), tobramycin (TOB), gentamicin (GEN), amikacin (AMI), ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LEVO), tigecycline (TIGE), установен при *K. pneumoniae* с MIC стрип, cotrimoxazole (SXT), fosfomycin (FOS) и nitrofurantoin NIT)само при *E. coli*, colistin (COL),установен със SPM, SensiTest colistin.



**Фиг.13** Селективната скрийн среда SPM SensiTest



**Фиг. 14** Определяне на MIC на Colistin чрез

По отношение на tigecycline, бяха проучени с МІС стрип всички изолати *Klebsiella spp* и бяха установени нива на устойчивост 24%. МІС на tigecycline варираше от 0,125 mg/L до 12 mg/L с МІС90 6 mg/L.

Изолираните от чревния тракт карбапенем резистентни щамове бяха предимно *K. pneumoniae* (n=14) и само един беше *E. coli*. Анализът на чувствителността показва много високата устойчивост на карбапенем резистентните изолати към всички тествани антимикробни средства, като запазената чувствителност беше само към colistin (9 от 14 тествани карбапенем резистентни изолати), tigecycline (8 от 14) и gentamicin (4 от 14). Colistin, tigecycline и gentamicin са възможна алтернатива за лечение при инфекции с карбапенем-резистентни изолати. Много важен факт е, че един от изолатите *K. pneumoniae* беше резистентен на всички тествани антимикробни средства, което не оставя никаква алтернатива при лечение. Всички карбапенем резистентни изолати, бяха от хоспитализирани болни, което показва значимостта на чревния тракт за разпространение на тези проблемни микроорганизми в болниците.

Анализът на чувствителността по бактериален вид демонстрира високата чувствителност на изолатите *E. coli* към fosfomycin и nitrofurantoin и възможността тези средства да се използват за лечение на неусложнени уроинфекции. Възможно е при неусложнени уроинфекции, причинени от ESBL/карбапенемаза продуциращи ентеробактерии (особено *E. coli*) да се прилага fosfomycin и да се избягва употребата на флуорохинолони като първа линия на терапия.

При предишно проучване от 2014г. бяха установени нивата на устойчивост на клинично значими изолати *K. pneumoniae* (n=108) и *E coli* (n=124), колекционирани от седем медицински центъра (София, Варна, Плевен, Пловдив и Стара Загора) (Markovska R et al., 2018). Сравнението на чувствителността на чревните изолати и на клинично значимите изолати *E. coli* показва увеличени нива на устойчивост за amikacin и комбинациите с бета-лактамазни инхибитори при фекалните изолати, докато при клиничните, увеличените нива бяха при флуорохинолоните, tobramycin и гентамицин. Интерес представлява факта, че нивата на устойчивост на чревните изолати *Klebsiella spp.* се доближават до нивата на клиничните изолати от 2014г, което потвърждава факта, че чревния тракт е важен резервоар за ESBL/карбапенемаза продуценти.

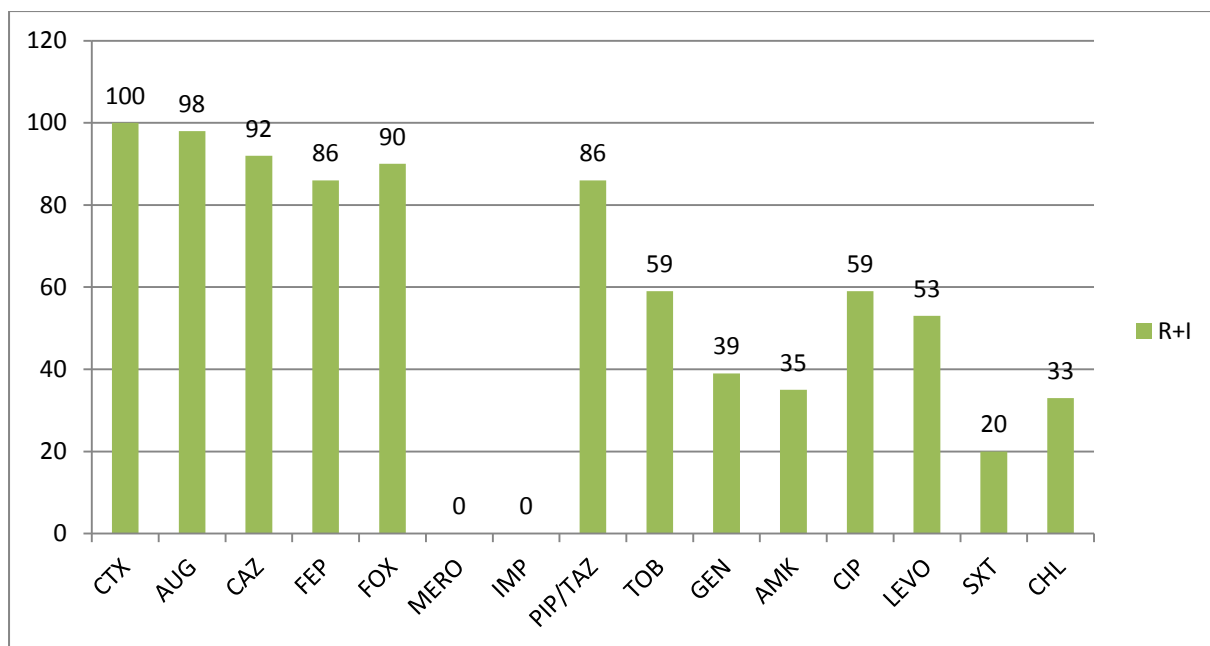
Устойчивостта при изолатите *Klebsiella spp.* е статистически по-висока от тази при *E. coli*, като най-значима е разликата по отношение на карбапенемите, piperacillin/tazobactam и аминогликозидите.-**Таблица 13**

Таблица 13 .Сравнение на нивата на устойчивост на *E.coli* и *Klebsiella spp.*

Антибиотик	<i>E coli</i> - % I+R	<i>Klebsiella spp</i> - % I+R	p
cefotaxime	100	100	0.9608
amox/clavulanic acid	89	95	0.1263
ceftazidime	<b>72</b>	<b>91</b>	<b>0.0003</b>
cefepime	<b>91</b>	<b>100</b>	<b>0.0060</b>
cefoxitin	<b>21</b>	<b>34</b>	<b>0.0352</b>
meropenem	<b>1</b>	<b>24</b>	<b>&lt;0.0001</b>
imipenem	<b>1</b>	<b>24</b>	<b>&lt;0.0001</b>
piper/tazob	<b>40</b>	<b>95</b>	<b>&lt;0.0001</b>
tobramycin	<b>47</b>	<b>88</b>	<b>&lt;0.0001</b>
gentamicin	<b>42</b>	<b>74</b>	<b>&lt;0.0001</b>
amikacin	<b>30</b>	<b>70</b>	<b>&lt;0.0001</b>
ciprofloxacin	62	71	0.1648
levofloxacin	55	65	0.1127
co-trimoxazol	57	67	0.1083
chloramphenicol	15	20	0.3961
tigecycline	24	4	

**Фиг. 15** показва антимикробната чувствителност на изолатите *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morganii* и *Hafnia alvei*.

Антимикробната устойчивост остава сравнително висока за видовете *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, както към цефалоспорини трета генерация, но със средни нива към аминогликозиди и флуорохинолони. Не беше установена резистентност към карбапенеми при тези видове.

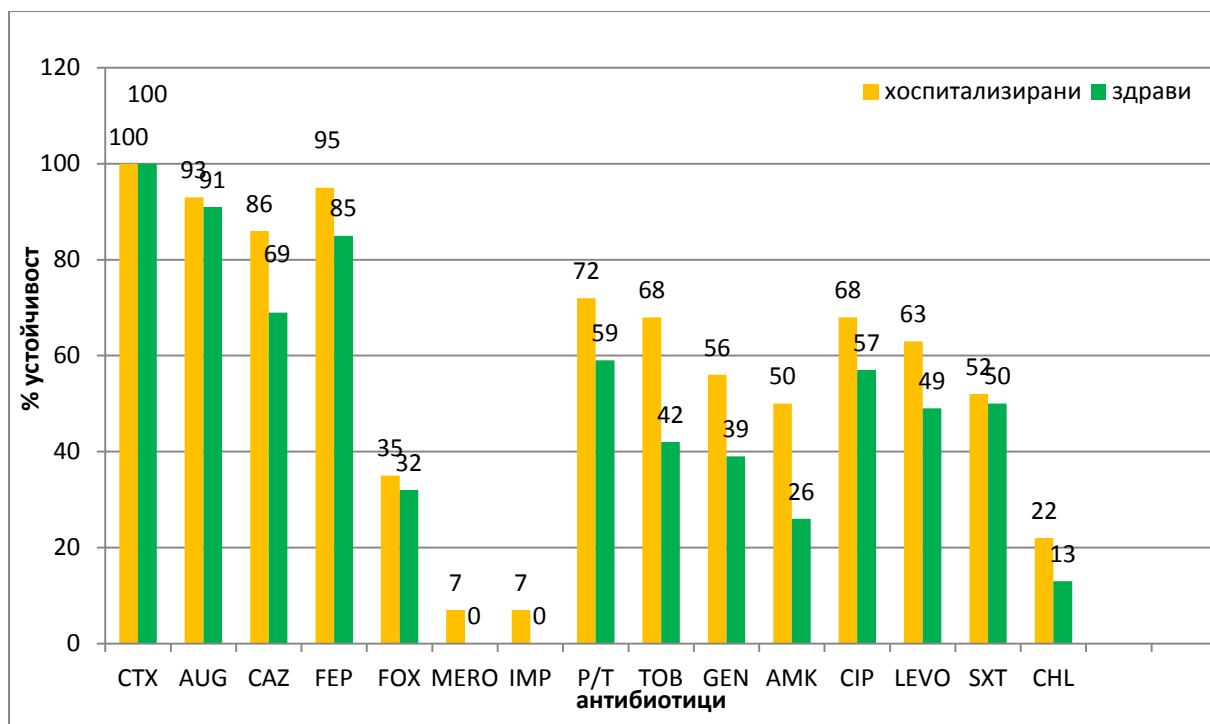


**Фиг. 15** Антимикробна устойчивост в % при *Enterobacter spp.* (24), *Citrobacter spp.* (16), *Morganella morganii* (5), *Hafnia alvei* (4), (установена чрез дисково – дифузионен метод)  
**Легенда:** cefotaxime (CTX), amoxicilin/clavulanic acid (AUG), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), cefoxitin (FOX), meropenem (MERO), imipenem (IMP), piperacillin/tazobactam (PIP/TAZ), tobramycin (TOB), gentamicin (GEN), amikacin (AMI), ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LEVO), co-trimoxazole (SXT), chloramphenicol (CHL)

#### 5.4.2. Устойчивост на бактериалните изолати при хоспитализирани пациенти и здрави индивиди

Устойчивостта на изолатите от хоспитализирани пациенти спрямо изолатите от изследваните здрави индивиди е представена на **Фиг.16**. Резистентност към карбапенеми беше установена само при хоспитализираните пациенти – 7% (14/206).

Анализът на антибиотичната чувствителност според произходът на материалите демонстрира по-висока устойчивост при изолатите от хоспитализирани пациенти спрямо изолатите от изследваните здрави индивиди (**Фиг.16**). Сериозен проблем представлява намалената чувствителност към карбапенеми, установена при хоспитализираните пациенти – 7%. По-високите нива на резистентност при хоспитализираните пациенти, вероятно се обуславя от разпространението на клонални изолати в болниците на фона на селективния антибиотичен натиск. Спазването на мерките за контрол на инфекциите е съществено за предотвратяване на разпространението на тези проблемни микроорганизми. Проблем



**Фиг. 16** Антимикробна устойчивост в % общо при хоспитализирани/здрави (206/140), установена чрез дисково – дифузионен метод

**Легенда:** cefotaxime (CTX), amoxicilin/clavulanic acid (AUG), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), cefoxitin (FOX), meropenem (MERO), imipenem (IMP) - включени са само резистентните изолати, piperacillin/tazobactam (PIP/TAZ), tobramycin (TOB), gentamicin (GEN), amikacin (AMI), ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LEVO), co-trimoxazole (SXT), chloramphenicol (CHL)

представлява и факта, че колонизацията на чревния тракт се задържа много дълго време, дори и над 1 година (Woerther PL et al., 2013), тоест след изписване от болницата пациентите стават източници на резистентни ентеробактерии, напр. в семейството (Hilty M et al., 2012).

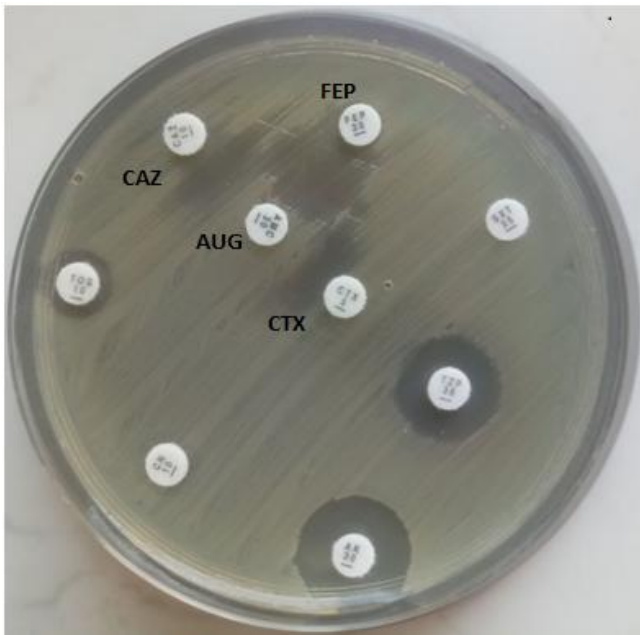
В литературата се предлагат много схеми за ерадикация на колонизацията с ESBL/карбапенемаза продуценти – използването на нерезорбиращи антибиотици като аминогликозиди и colistin показат добри краткосрочни резултати, но повечето хора остават носители в края на първата година (Siegel JD et al., 2007). Резултатите са противоречиви, като най-добрия начин за справяне с проблема е фекалната трансплантация и то повторена няколко пъти (G Catho & B Huttner, 2019; Singh R et al., 2018). Това е сравнително сложен метод и затова от основно значение е недопускането на разпространение на резистентни щамове и правилната антибиотична употреба (Siegel JD et al., 2007).

**В заключение**, устойчивостта на изолатите, резистентни на цефалоспорици трета генерация беше висока към amoxicillin/clavulanic acid и cefepime - 92%, сравнително висока към хинолони и piperacillin/tazobactam - около 60% и към аминогликозиди 40% - 58%. Четири процента от изолатите бяха резистентни на карбапенеми (14/346). Статистически значимо нарастване на устойчивостта при фекалните изолати беше установено за периода 2017/2018г в сравнение с периода 2014г за amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam, amikacin и флуорохинолоните. Изолатите *K. pneumoniae* бяха с много по-високи нива на устойчивост по отношение на повечето групи антимикробни средства от изолатите *E. coli*. Изолатите от хоспитализирани болни също показаха много по-висока устойчивост в сравнение с тези от здрави индивиди. Интерес представлява факта, че нивата на устойчивост на чревните изолати *Klebsiella spp.* се доближават до нивата на клиничните изолати *Klebsiella spp.* от 2014г, което потвърждава факта, че чревния тракт е важен резервоар за ESBL/карбапенемаза продуценти.

## **5.5 Сравнение на фенотипни методи за определяне на продукцията на широкоспектърните $\beta$ – лактамази**

### **5.5.1 Двойно – дисков синергичен метод (DDST)**

При DDST метод с дискове CAZ, CTX и FEP, разположени на 20 мм от диска AUG, беше установен синергичен ефект – **Фиг. 17** с поне един от дисковете при 261 от проучените изолати (75.7%). От последващите проучвания бяха установени 269 ESBL продуцента (виж. т. 5.8), като при 261 от тях беше установен синергичен ефект с дисковете, указани от EUCAST. Резултатите показват отлична увствителност на метода - 97%. Осемте изолата без синергизъм бяха – 1 *M. morgani*, 1 *C. freundii*, 2 *E. cloacae* complex, 2 *K. oxytoca* и 2 *K. michiganensis*. При всички карбапенемаза продуценти (виж. т. 5.8) липсваше синергизъм. От 24 *E. coli* и 1 *K pneumoniae* продуценти на плазмидни AmpC ензими, 20 бяха само с установен антагонизъм и 4 без синергизъм/антагонизъм.



**Фиг. 17** Синергичен ефект с CTX, FEP и CAZ

## 5.6 Фенотипни методи за определяне на продукцията на карбапенемази

### 5.6.1. . Модифициран Hodge-test (МНТ)

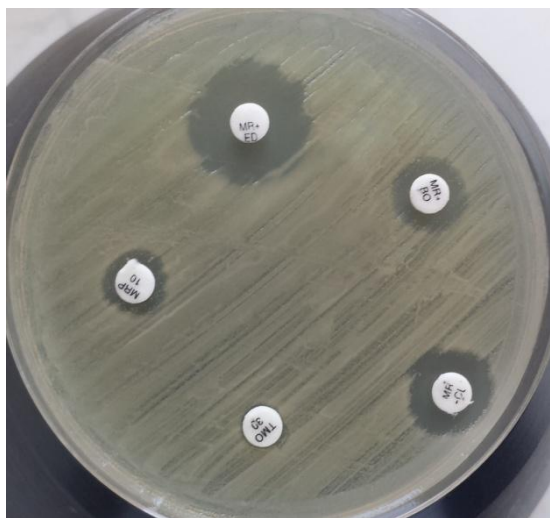
При 2 *K.pneumoniae* и 1 *E.coli* резистентни към имипенем и меропенем, Hodge теста беше положителен – **Фиг. 18**, докато при останалите 11 *K.pneumoniae*, резистентни към имипенем и меропенем, Hodge теста беше съмнителен/слабо положителен. При 25-те изолата с намалена зона на задръжка с диска имипенем, Hodge теста беше отрицателен.



**Фиг. 18** Положителен Hodge тест

### 5.6.2. KPC, MBL, OXA-48 disk kit (acc. to EUCAST), (Liofilchem, Italy).

При 11 от карбапенем-резистентните изолати *K.pneumoniae*, суспектни за продукция на карбапенемаза, се установи наличие на метало бета-лактамаза, имаше увеличение на зоната на диска меропенем с EDTA с  $\geq 5$  мм, в сравнение с диска меропенем. (Фиг. 19). При 3 от изолатите (2 *K. pneumoniae* и 1 *E. coli*) имаше увеличение на зоната с  $\geq 4$  мм при диска с борониева киселина спрямо диска меропенем, касаеше се за карбапенемази от клас А. OXA-48 продуценти не се доказаха. При 25-те изолата с намалена зона на задръжка само около диска имипенем комбинираните дискове не показаха наличие на карбапенемаза.



Фиг. 19 Положителен тест за MBL

### Заклучение

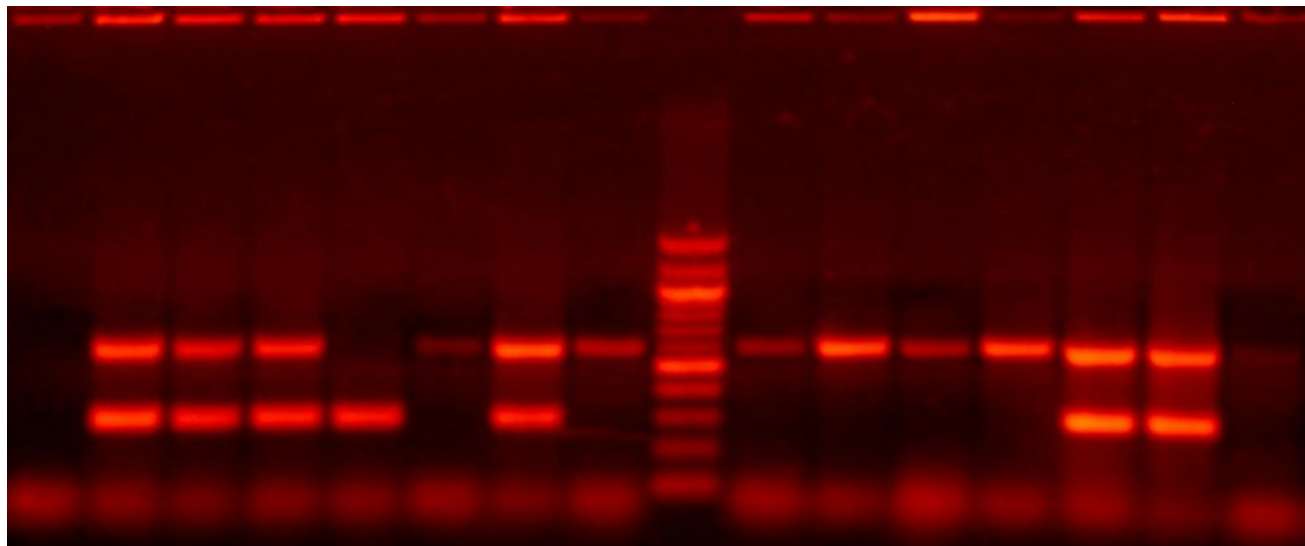
Дифузионно-дисквия синергичен метод с по-ниска концентрация на дисковете, съобразно изискванията на EUCAST и разстояние между тях 20мм работи много добре за откриване на ESBL продуценти, с чувствителност 97%.

## 5.7 Охарактеризиране на групите ESBL, CARBA, AmpC ЧРЕЗ PCR

### 5.7.1. Полимеразо-верижна реакция с SHV, CTX-M, TEM и OXA типове специфични праймери.

Всички изолати бяха тествани чрез Multiplex PCR за *bla*<sub>CTX-M</sub> и *bla*<sub>SHV</sub>. Размерите на амплифицираните продукти бяха 585bp за *bla*<sub>CTX-M</sub> и 297 bp за *bla*<sub>SHV</sub>. От тестваните 346 изолата, 278 (80%) бяха положителни за *bla*<sub>CTX-M</sub>, а 76 (22%) бяха положителни за *bla*<sub>SHV</sub> (Фиг. 20). Те включваха всички изолати *K. pneumoniae* и два изолата *E. coli*. *K. oxytoca* и *K. michiganensis* изолатите бяха отрицателни за SHV ензими. Положителните за CTX-M ензими

изолати бяха тествани с праймери за отделните групи СТХ-М, като 212 изолата бяха положителни със СТХ-М-Р1/Р2 праймерите и дадоха положителна реакция (~1100bp сегмент), което доказва наличието на СТХ-М 1-ва група, докато 52 изолата бяха положителни с СТХ-М-9 груповите праймери (~ 1000bp сегмент).



1 2 3 4 5 6 7 8 М 9 10 11 12 13 14 15

**Фиг. 20** Агарозна електрофореза на PCR продукти, след полимеразо-верижна реакция с *bla<sub>SHV</sub>* *bla<sub>CTX-M</sub>* специфичен праймер

Легенда: М-маркер – DNA ladder low 50bp, проба 1 е отрицателна контрола, проба 2 е положителна контрола за SHV и СТХ-М праймер, проби 3 и 4 са положителни и за двата праймера, проба 5 само за SHV, проба 6 само за СТХ-М, проба 7 и за двата праймера, проби 8,9,10,11 и 12 са положителни само за СТХ-М праймер, проби 13 и 14 за SHV и СТХ-М праймери, а проба 14 е отрицателна и за двата праймера. Ампликонът, съответстващ на SHV е с размер 287 bp, а на СТХ-М с размер 585 bp.

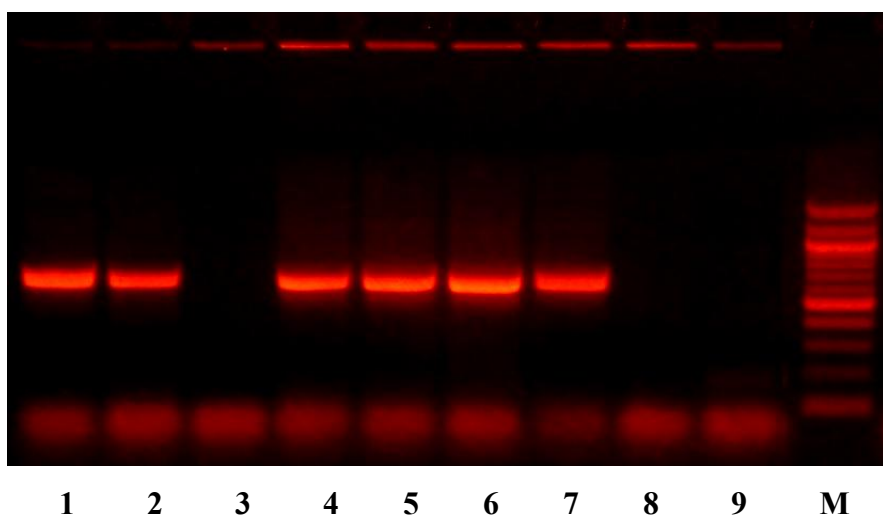
Бяха направени и PCR-и за охарактеризиране на *bla<sub>TEM</sub>* и *bla<sub>OXA</sub>* на всички изолати, като размерите на амплифицираните продукти бяха 1075bp за *bla<sub>TEM</sub>* и 1000bp за *bla<sub>OXA</sub>*. Сто двадесет и един изолата (35%) бяха положителни за TEM, а 67 (19%) за OXA III група типове специфични праймери. Изолатите позитивни за OXA-III групата бяха предимно OXA-1:

26 *E. coli*, 24 *K pneumoniae*, 7 *E. cloacae*, 8 *C. freundii* complex, 2 *M. morgani*.

### 5.7.2. Полимеразо-верижна реакция с KPC, NDM, OXA-48, VIM, IMP групово специфични праймери за охарактеризиране на типа на карбапенемазата.

Всички изолати с намалена чувствителност към дисковете imipenem и meropenem (n=39) бяха тествани чрез Multiplex PCR за *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* и *bla<sub>OXA-48</sub>*, както и чрез Multiplex

PCR за *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>. Размерите на амплифицираните продукти бяха 798bp за *bla*<sub>KPC</sub>, 621 bp за *bla*<sub>NDM</sub>, 438bp за *bla*<sub>OXA-48</sub>, 270bp за *bla*<sub>IMP</sub> и 390bp за *bla*<sub>VIM</sub>. От тестваните 39 изолата, 3 бяха положителни за *bla*<sub>KPC</sub>, а 11 бяха положителни за *bla*<sub>NDM</sub> (Фиг. 21). Тестваните изолати бяха отрицателни за *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub>. Двадесетте и пет изолата с интермедиерна зона на диска imipenem и отрицателни за модифицирания Hodge тест и комбинираният дискове (виж т 5.6) бяха негативни и при PCR теста.



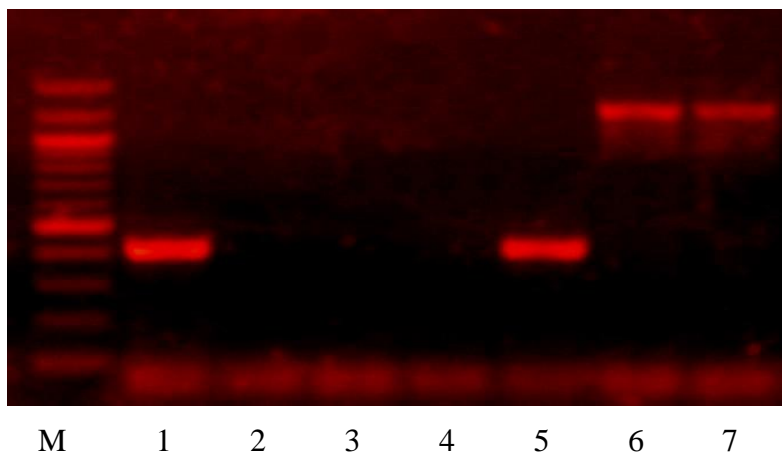
**Фиг. 21** Агарозна електрофореза на PCR продукти, след полимеразо-верижна реакция с *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub> специфичен праймер

Легенда: М-маркер – DNA ladder low 50bp, проба 1, 2, 4, 5, 6 и 7 са положителни за NDM праймер, проби 3, 8 и 9 са отрицателни за *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub>. Ампликонът, съответстващ на NDM е с размер 621 bp, на KPC с 798 bp, а на OXA-48 с 438bp.

### 5.7.3. Полимеразо-верижна реакция с ДНА, СМУ, МОХ, ФОХ, АСС, типово специфични праймери за охарактеризиране на AmpC продуценти.

Всички изолати, при които не беше установен синергизъм или с установен антагонизъм, както и всички *E. coli* и *K. pneumoniae*, устойчиви на FOX и тези с вродена AmpC продукция (всички *Enterobacter spp*, *M. morgani*, *C. freundii* complex, *H. alvei*) бяха тествани за AmpC продукция (n=118) чрез Multiplex PCR за *bla*<sub>DHA</sub> и *bla*<sub>CMY</sub> и Multiplex PCR за *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>FOX</sub> и *bla*<sub>ACC</sub>. Размерите на амплифицираните продукти бяха 405bp за *bla*<sub>DHA</sub>, 1226bp за *bla*<sub>CMY</sub>, 520bp за *bla*<sub>MOX</sub>, 190bp за *bla*<sub>FOX</sub> и 346bp за *bla*<sub>ACC</sub>. От тестваните 118 изолата, 26 бяха положителни за *bla*<sub>DHA</sub> (вкл. 5-те изолата *M. morgani*), 16 за *bla*<sub>CMY</sub>, 4 за *bla*<sub>ACC</sub> (четири изолата *H. alvei*) (Фиг. 22). Двадесет и два от 24-те изолата *E. cloacae* complex бяха положителни за *bla*<sub>EBS</sub>, което показва наличието на MIR/ACT семейството гени (сегмент ~302 bp). При 20 от

тях PCR реакцията със АСТ специфични праймери даде положителен резултат (сегмент ~1100bp). Тестваните изолати бяха отрицателни за *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>МОХ</sub>.

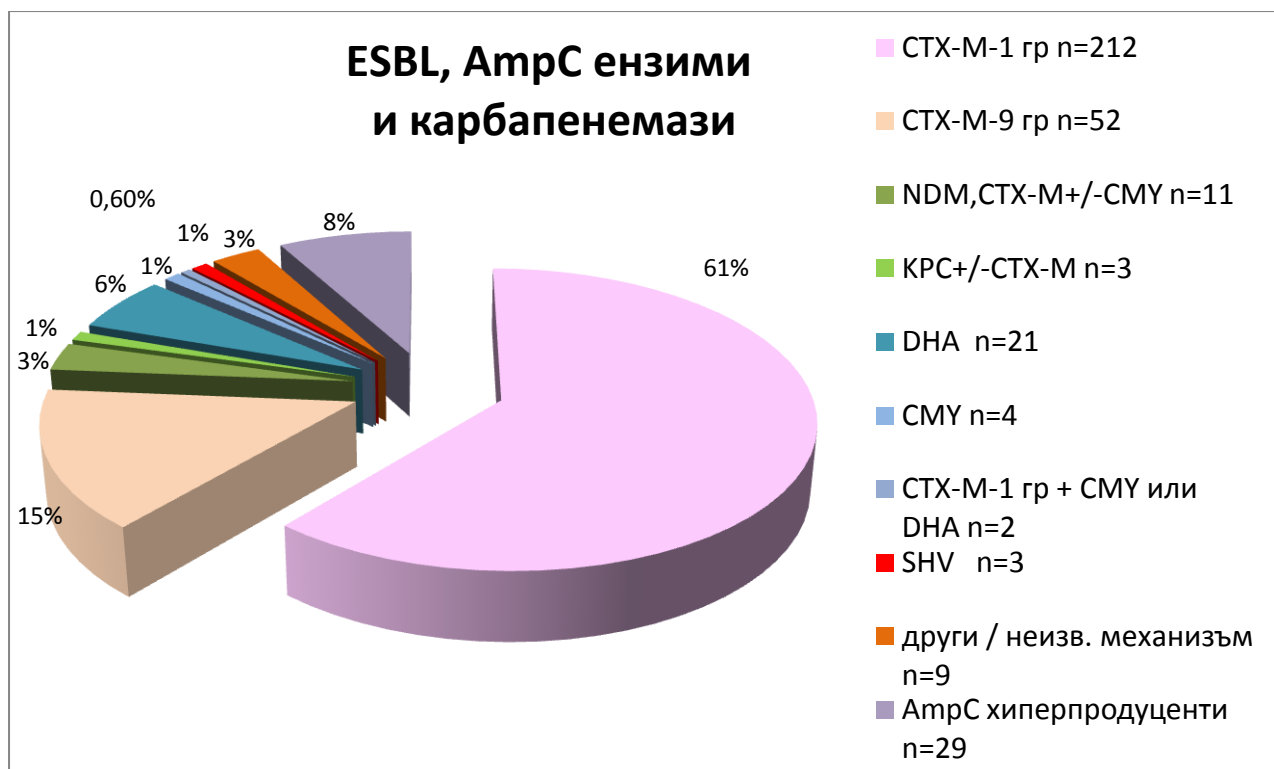


**Фиг. 22** Агарозна електрофореза на PCR продукти, след полимеразо-верижна реакция с *bla*<sub>DHA</sub> и *bla*<sub>CMY</sub> специфичен праймер

Легенда: М-маркер – DNA ladder low 50bp, проба 1 е положителна за DHA праймер, проба 2, 3 и 4, проба 5 е положителна за DHA, проба 6 и 7 са положителни за CMY праймер. DHA е на 405 bp, а CMY на 1226bp.

В резултат на направените PCR реакции, проучените 346 резистентни на цефалоспорини трета генерация изолати, бяха разделени на 4 основни групи – CTX-M-1 група продуценти 61%, CTX-M-9 група продуценти 15%, карбапенемаза продуценти (11 NDM и 3 KPC ) – 4%. Четвъртата група обхващаше плазмидните AmpC продуценти - (20 DHA и 4 CMY). Почти всички карбапенемаза продуценти бяха в комбинация със CTX-M и/или AmpC ензим. Двадесет и девет от тестваните изолати бяха определени като хиперпродуценти на AmpC ензим или дерепресирани мутанти.

**Фигура 23** представя графично разпределението на основните групи ESBL, AmpC и карбапенемаза ензими при проучените 346 изолата.



**Фиг. 23** Разпределение на ESBL, AmpC ензимите и карбапенемазите при установените 346 цефалоспорин резистентни изолати

## 5.8 Нуклеотидно секвениране

Ампликоните, получени при PCR реакциите с групово специфичните праймери бяха амплифицирани с праймери, обхващащи целия ген (Табл 5). На Таблица 14 са показани резултатите от секвенционните реакции, определени при различните видове ентеробактерии. На Таблица 15 е показано разпределението на идентифицираните бета-лактамази по бактериален вид и според произхода – хоспитализирани пациенти или здрави хора. На Таблица 16 е показано разпределението на идентифицираните бета-лактамази по бактериален вид и според произхода – деца или възрастни. При изолатите *M. morganii* секвенирането показва наличието *bla*<sub>DHA-1</sub> при 1 изолат, докато при другите бяха доказани AmpC ензими, характерни за вида *M. morganii*.

Секвенирането доказва наличието на ESBL при 269 изолата, при 14 на карбапенемаза и при 25 изолата наличие на плазмидни AmpC ензими. Двадесет и девет бяха хиперпродуцентите на вродени AmpC ензими, един изолат *K. pneumoniae* показва наличието на SHV-1, а един *K. oxytoca* на хромозомния, характерен за този вид OXY 3-5 ензим. Седем изолата не позитивираха при нито една PCR реакция и поради наличието на синергизъм в ДДС теста приехме, че се касае за неизвестен механизъм на резистентност.

**Таблица 14. ESBLs, CARBA и AmpC ензими според бактериалните видове при изолираните 346 цефалоспорин 3-та генерация резистентни изолати**

Бактериален вид	Брой	<i>E.coli</i> n=213	<i>Klebsiella spp.</i> n=84	<i>Enterobacter spp.</i> n=24	<i>C. freundii</i> complex n=16	<i>M. morgani</i> n=5	<i>H. alvei</i> n=4
<b>Бета-лактамази</b>							
CTX-M-15	134	91	27	7	8	1	
CTX-M-15+CMY-4	1	-	1	-	-	-	
CTX-M-15+DHA-1	1	1	-	-	-	-	
CTX-M-15like + CTX-M-3like **	5	-	5	-	-	-	
CTX-M-1	3	3	-	-	-	-	
CTX-M-3	70	37	32	1	-	-	
CTX-M-9	2	2	-	-	-	-	
CTX-M-14	22	20	1	1	-	-	
CTX-M-27	28	28	-	-	-	-	
SHV-12	3	2	-	-	1	-	
<b>Общо ESBL</b>	<b>269</b>						
NDM-1+CTX-M-15+CMY-4	9	-	9	-	-	-	
NDM-1+CTX-M-3+CMY-4	1		1				
NDM-1+CTX-M-3	1		1	-	-	-	
KPC-2	1	-	1	-	-	-	
KPC-2 +CTX-M-15	1	1	-	-	-	-	
KPC-2+CTX-M-3	1	-	1	-	-	-	
<b>Общо карбапенемази</b>	<b>14</b>						
DHA-1	21	19	1	-	-	1	
CMY-2	4	4	-	-	-	-	
<b>Общо плазмидни AmpC</b>	<b>25</b>						
Други*	2		2				
Неизвестен механизъм	7	5	2				
<b>AmpC хиперпродуценти</b>	<b>29</b>			15	7	3	4

\*, хиперпродукция на SHV-1 ензим, хиперпродукция на хромозомен OXY тип ензими при *K. oxytoca*,

\*\*, виж точка 5.9.

**Таблица 15. ESBLs, CARBA и AmpC ензими според бактериалните видове и според произхода (хоспитализирани/зdravi хора) при изолираните 346 цефалоспорин 3та генерация резистентни изолати**

Бактериален вид Бета-лактамази	Общ брой		<i>E.coli</i> n=213		<i>Klebsiella</i> spp. n=84		<i>Enterobacter</i> spp. n=24		<i>C. freundii</i> complex n=16		<i>M. morgani</i> n=5		<i>H. alvei</i> n=4	
	х	зд	х	зд	х	зд	х	зд	х	зд	х	зд	х	зд
CTX-M-15	84	50	46	45	24	3	7		6	2	1			
CTX-M-15+CMY-4	1				1	0								
CTX-M-15+DHA-1		1		1										
CTX-M-15like + CTX-M-3like **	5				5	0								
CTX-M-1		3		3										
CTX-M-3	45	25	18	19	26	6	1							
CTX-M-9	1	1	1	1										
CTX-M-14	8	14	7	13	1			1						
CTX-M-27	22	6	22	6										
SHV-12	1	2		2					1					
<b>Общо ESBL</b>	<b>167</b>	<b>102</b>												
NDM-1+CTX-M-15+CMY-4	9				9									
NDM-1+CTX-M-3+CMY-4	1				1									
NDM-1+CTX-M-3	1				1									
KPC-2	1				1									
KPC-2 +CTX-M-15	1		1											
KPC-2+CTX-M-3	1				1									
<b>Общо карбапенемази</b>	<b>14</b>													
DHA-1	5	16	5	14		1						1		
CMY-2	2	2	2	2										
<b>Общо плазмидни AmpC</b>	<b>7</b>	<b>18</b>												
Други*	1	1			1	1								
Неизвестен механизъм	3	4	1	4	2									
<b>AmpC хиперпродуценти</b>	<b>12</b>	<b>17</b>					8	7	3	4	1	2		4

\*, хиперпродукция на SHV-1 ензим, хиперпродукция на хромозомен OXY тип ензими при *K. oxytoca*,

\*\*, виж точка 5.9., х – хоспитализирани, зд - здрави хора

Таблица 16. ESBLs, CARBA и AmpC ензими според бактериалните видове и според произхода (деца/възрастни) при изолираните 346 цефалоспорин 3та генерация резистентни изолати

Бактериален вид Бета-лактамази	Общ брой		<i>E.coli</i> n=213		<i>Klebsiella</i> spp. n=84		<i>Enterobacter</i> spp. n=24		<i>C. freundii</i> complex n=16		<i>M. morganii</i> n=5		<i>H. alvei</i> n=4	
	д	в	д	в	д	в	д	в	д	в	д	в	д	в
CTX-M-15	54	80	38	53	12	15		7	4	4		1		
CTX-M-15+CMY-4		1				1								
CTX-M-15+DHA-1		1		1										
CTX-M-15like + CTX-M-3like **	3	2			3	2								
CTX-M-1	2	1	2	1										
CTX-M-3	47	23	22	15	25	7		1						
CTX-M-9		2		2										
CTX-M-14	14	8	13	7		1	1							
CTX-M-27	22	6	22	6										
SHV-12		3		2						1				
<b>Общо ESBL</b>	<b>139</b>	<b>130</b>												
NDM-1+CTX-M-15+CMY-4		9				9								
NDM-1+CTX-M-3+CMY-4		1				1								
NDM-1+CTX-M-3		1				1								
KPC-2		1				1								
KPC-2 +CTX-M-15		1		1										
KPC-2+CTX-M-3		1				1								
<b>Общо карбапенемази</b>		<b>14</b>												
DHA-1	12	9	12	7		1						1		
CMY-2	1	3	1	3										
<b>Общо плазмидни AmpC</b>	<b>13</b>	<b>12</b>												
Други*		2				2								
Неизвестен механизъм	3	4	2	3	1	1								
<b>AmpC хиперпродуценти</b>	<b>19</b>	<b>10</b>					9	6	4	3	2	1	4	

\*, хиперпродукция на SHV-1 ензим, хиперпродукция на хромозомен OXY тип ензими при *K. oxytoca*,

\*\*, виж точка 5.9. ; д – деца, в- възрастни

CTX-M-1 групата се раздели на четири подгрупи – изолати показващи наличие на *bla*<sub>CTX-M-15</sub> – 136, като два от тях носеха гени за плазмидни AmpC ензими - единия *bla*<sub>DHA-1</sub>, а другия *bla*<sub>CMY-4</sub>. Изолатите, носещи *bla*<sub>CTX-M-3</sub> бяха 70, изолатите, носещи *bla*<sub>CTX-M-1</sub> – 3. Пет изолата, показаха наличието на две pI при изоелектричното фокусиране отговарящи на CTX-M-3 и CTX-M-15. Изолатите от CTX-M-9 групата също се разделиха на три подгрупи, като групите и броя изолати са, както следва - *bla*<sub>CTX-M-27</sub> – 28 изолата, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> – 22 и *bla*<sub>CTX-M-9</sub> – 2 изолата. Положителните за ДНА носеха *bla*<sub>DHA-1</sub>, докато за CMY – *bla*<sub>CMY-2</sub>. Карбапенемаза продуцентите носеха *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=11), *bla*<sub>KPC-2</sub> (n=3), като при 13 от тях бяха в комбинация със CTX-M-15/CTX-M-3 ензими и/или CMY-4 (Табл 14). Всички изолати дали положителен резултат с OXA-III гр праймери показаха наличие на *bla*<sub>OXA-1</sub>, докато положителните за TEM – *bla*<sub>TEM-1</sub>. При положителните за SHV (извън *K. pneumoniae* ) три изолата притежаваха *bla*<sub>SHV-12</sub>, при репрезентативни изолати *K. pneumoniae* бяха секвенирани SHV ампликоните, при 20 CTX-M-3 продуцента беше установено наличие на *bla*<sub>SHV-1</sub>, при CTX-M-15 продуцентите *bla*<sub>SHV-1</sub> се амплифицираше при 8 и *bla*<sub>SHV-11</sub> при 12. Всички продуценти на NDM-1 ензими носеха *bla*<sub>SHV-11</sub>, а на KPC-2 и CTX-M-14 на *bla*<sub>SHV-1</sub>.

## 5.9. Охарактеризиране на групите бета-лактамази чрез изоелектрично фокусиране (IEF)

Изоелектрично фокусиране и биологичен тест бяха извършени при 52 репрезентативни щама. (*K. pneumoniae* –15 и *E. coli* –29, *E. cloacae* complex – 4, *S. freundii* complex– 3, *H. alvei* - 1), подбрани според нуклеотидното секвениране и микробния вид (Табл. 17)

Изоелектричното фокусиране показа, че щамовете притежават 8 различни β-лактамази с хидролитична активност. Броят бета-лактамази установен при изоелектричното фокусиране отговаряше на броят, установени чрез PCR реакциите и секвенирането, при всички изследвани изолати с две изключения. Фокусирането не успя да докаже наличието на NDM-1 ензимите. Изолатите с неизвестен механизъм показаха наличието на бета-лактамаза с pI 7.8/pI8.0, която нямаше CTX хидролитична активност. Може да се обсъжда евентуален AmpC продуцент, но резултатите изискват по-нататъшни проучвания. Полученните данни показват, че всички основни плазмидни AmpC, ESBL

ензими и карбапенемази се експресират и произвеждат в достатъчно ниво, за да се докажат при фокусирането.

При фокусирането установихме бета-лактамази от CTX-M тип. Те се фокусираха в pI 8.8, 8.4, 8.2 и 8.1 и имаха CTX активност при биологичния тест. На pI 8.8 отговарят CTX-M-15 ензимите, на pI 8.4 отговарят CTX-M-3, на pI 8.2 - CTX-M-27 ензимите, а на pI 8.1 - CTX-M-14 ензимите. SHV-12 ензимите се фокусират в pI 8.2, а DHA-1 и CMY-4 в pI 7.8 и pI 9.2.

Останалите тясно-спектърни ензими /без хидролитична активност/ бяха с pI 5.4, pI 7.4, pI 7.6 отговарящи на TEM-1, OXA-1 и SHV-1 ензимите. AmpC хиперпродуцентите показаха наличието на ивици с pI 7.7/ pI 7.8 (2 изолата *H. alvei*, 1 изолат *M. morgani*, 3 изолата *E. cloacae* complex (*E. hormaechei*), pI 8.6 (2 изолата *C. freundii*). На pI 7.7 отговаря ACC-1 ензима (Bauernfeind A et al, 1999). Плазмидните ACC ензими се приемат произлезли от хромозомните ензими, вродени при *H. alvei* (Bauernfeind A et al, 1999). По принцип AmpC ензимите са с pI над 8, но има изключение като ACC и FOX ензимите (Jacoby A et al, 2009). Вероятно изоелектричната точка 7.7/7.8 при изолатите *E. hormaechei* се свързва с ACT ензимите, докато при *M. morgani* с хромозомните AmpC ензими на този вид (Power P et al, 2006). pI 8.6 отговаря на хромозомните AmpC ензими (*C. freundii*) при тези видове (Jacoby A et al, 2009).

**Таблица 17. Бета лактамази, според изоелектричната им точка**

Продуценти на :	Брой изследвани	Изоелектрични точки / ESBL/AmpC/карбапенемази
CTX-M-15	12	pI <b>8.8</b>
CTX-M-15+CMY-4	1	pI <b>8.8</b> , 9.2
CTX-M-15+DHA-1	1	pI 7.7, <b>8.8</b>
CTX-M-15like + CTX-M-3like	5	pI <b>8.4</b> , <b>8.8</b>
CTX-M-1	2	pI <b>8.4</b>
CTX-M-3	7	pI <b>8.4</b>
CTX-M-9	2	pI <b>8.1</b>
CTX-M-14	5	pI <b>8.1</b>
CTX-M-27	6	pI <b>8.2</b>

SHV-12	2	pI <b>8.2</b>
NDM-1+CTX-M-15+CMY-4	5	pI <b>8.8</b> , 9.2
NDM-1+CTX-M-3+CMY-4	1	pI <b>8.4</b> , 9.2
NDM-1+CTX-M-3	1	pI <b>8.4</b>
KPC-2	1	pI <u>6.7</u>
KPC-2 +CTX-M-15	1	pI <u>6.7</u> , <b>8.8</b>
KPC-2+CTX-M-3	1	pI <u>6.7</u> , <b>8.4</b>
DHA-1	3	pI 7.7
CMY-2	2	pI 9.0
AmpC хиперпродуценти	8	8.6, 8.8, 8.4
Неизвестен механизъм	9	7.8/8.0
SHV-1	2	7.6

Легенда: pI, изоелектрична точка, **bold**-CTX хидролитична активност, underline-IMP хидролитична активност

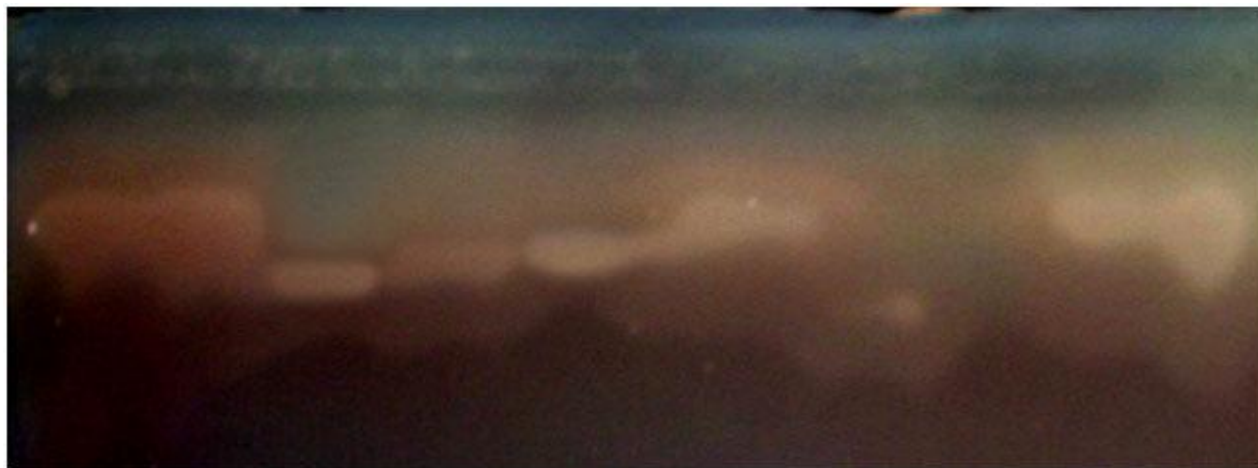


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

#### Фигура 24 Изоелектрично фокусиране

Легенда: Позиции №1 контролен щам CTX-M-15, KPC-2, TEM-1 (pI 8.8, 6.7, 5.4), Позиция 2- *K. pneumoniae*, продуцент на CTX-M-15, CTX-M-3 и SHV-1 с pI 8.8, 8.4 и 7.6. Позиция 3- *E. coli*, продуцент на CTX-M-14 с pI 8.1. Позиция 4- *E. coli*, продуцент на CTX-M-27 с pI 8.2. Позиция 5- *K. pneumoniae*, продуцент на CTX-M-3 с pI 8.4. Позиция 6- *E. coli*, продуцент на CTX-M-3 с pI 8.4. Позиция 7- *E. coli*, продуцент на CTX-M-15 с pI 8.8. Позиция 8- *E. coli*, с pI 7.6. Позиция 9- *E. coli*, продуцент на DHA-1 с pI 7.7. Позиция 10- *E.*

*coli*, продуцент на СТХ-М-15 с рI 8.8. Позиция 11- *K. pneumoniae*, продуценти на СТХ-М-15 и СТХ-М-3 с рI 8.8 и 8.4.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

### Фигура 25 Биологичен тест

Всички изолати хидролизират cefotaxime, с изключение на изолат 9, който е ДНА-1 продуцент.

### Обсъждане

Процентът на ESBL продуцентите при всички изследвани беше сравнително висок - **20.7%** (269/1297), като преобладаваха *E. coli* - **70.2%** (189/269), *Klebsiella spp.* **24.5%** (66/269), *Enterobacter spp* 3.3% (9/26), *C. freundii* complex 3.3% (9/269), *M. morgani* 0.3% (1/269) (Табл 5.). Честотата на плазмидните AmpC ензими беше - **1.9%** (25/1297), като преобладаваха *E. coli* n= 23 (92%) и по един изолат бяха *K. pneumoniae* и *C. freundii* complex. Два изолата бяха едновременно продуценти на СТХ-М и AmpC ензим. Карбапенемаза продуцентите бяха - **1%** (14/1297), предимно *K. pneumoniae* n=13 и 1 *E. coli*. Делът на ESBL продуценти в България при здравите индивиди беше **14%** (102/707), докато при пациентите в болници беше **28%** (167/590). Разликата е статистически значима с  $p < 0.0001$ . Карбапенемаза продуцентите също бяха изолирани само от хоспитализирани - 2% (14/580) срещу 0% (0/707). Разликата е статистически значима с  $p < 0.0001$ . При AmpC продуцентите не се наблюдаваха статистически значими различия - здрави хора 2.5% (18/707) срещу хоспитализирани 1.1% (7/590), като  $p = 0.08$ . При децата нивото на ESBL продуцентите беше статистически значимо по-високо отколкото при възрастните - **24%**

(139/574) срещу 18% (130/723) ,  $p=0.005$ , като разлика при AmpC продуцентите не се наблюдаваше 2% (13/574) и 1.6% (12/723),  $p = 0.43$ . Този факт е много тревожен и може да се свърже с евентуално по-висока антибиотична употреба при децата. Чревната колонизация с ESBL продуценти в световен мащаб е по-висока в Азия и Африка (варира от 46% до 15%) и по-ниска в Централна (3%), Северна (4%), и Южна Европа (6%) и Америка (2%) (Karaniка S et al., 2016). Установеното ниво на ESBL чревно носителство при хоспитализираните пациенти в България 28% е по-високо от това в други Европейски страни, като напр.: от Белгия (11.6%), Германия (9.5%), Южна Швеция (6.8%), Англия (Лондон) (9%), Испания (7.7%), Холандия (8,2%), (Strömdahl H et al., 2011; Hamprecht A et al., 2016; Schoevaerdt D et al., 2012; Otter JA et al., 2019; Díaz-Agero Pérez C et al., 2018; Platteel TN et al., 2014). Сходен на установения в България процент се докладва от автори в Португалия - 24% сред пациенти, хоспитализирани за > 48 часа (Aires-de-Sousa M et al., 2019). Високото ниво на ESBL продуценти в чревния тракт е много важно като прогностичен маркер за развитие на инфекции в болниците и в обществото в България. Високото ниво на ESBL продуценти в болниците е в съответствие с високите нива на цефалоспорин трета генерация резистентни инвазивни изолати. Според данните на ECDC за 2018г. България е на първо място с най-висок процент ESBL произвеждащи инвазивни *E. coli* и *K pneumoniae* – 38.7% и 77.7% съответно.

По отношение на чревната колонизация на здрави хора, процентът на изолираните ESBL в другите страни в Европа е много нисък. В Унгария при здрави индивиди фекалното носителство на ESBL-продуценти е било 3% (Ebrahimi F et al., 2016). Изследване в Португалия на здрави хора е доказало фекална колонизация в 2 % (Rodrigues C et al., 2016). Носителството при здрави индивиди в изследвания, проведени в Швейцария е 5.8% (Geser N et al., 2011). В проучване сред здрави индивиди в Париж за 5-годишен период (0.6% през 2006 г. срещу 6% през 2011 г.), се наблюдава 10-кратно увеличение на процента на здрави носители на ESBL-продуциращи *E. coli* (Nicolas-Chanoine MH et al., 2013). Процентът, установен в настоящето проучване - 14% при здравите хора е много по-висок от данните за Европа и е сходен с този, получен в подобно изследване за разпространение на ESBL продуценти в Англия, който показва нива на разпространение в 11.3% (Wickramasinghe NH1 et al., 2012). Интересен факт е, че в Англия нивото на колонизация е много по-високо в обществото в сравнение с болниците – 11.3%

срещу 9%. Процентът на чревно носителство на ESBL продуценти в Азиатските страни е значително по-висок, напр. в Тайланд е установен значителен брой (58.2%) на ентеробактерии, произвеждащи CTX-M бета-лактамаза (Sasaki T et al., 2010). В Китай, в провинция Фудзиен, през 2009, се установява до 50% носителство на ESBL (Li B et al., 2011). По-високият процент на чревно носителство на ESBL продуценти в болниците и обществото може да се обясни с високата употреба предимно на цефалоспорини трета генерация. България е на трето място по употреба на цефалоспорини (ECDC, Antimicrobial consumption, 2018г). Важно значение имат и хинолоните. Те се използват като първа линия терапия при уроинфекции. Тяхната употреба може да селектира резистентни мутанти не само по отношение на хинолоните, но и по отношение на цефалоспорините трета генерация, поради локализацията на детерминантите на резистентност на мобилни елементи. Преобладаването на *E. coli* при чревните ESBL продуценти е добре известен факт, докладван от много автори (Strömdahl H et al., 2011; Hamprecht A et al., 2016; Schoevaerdt D et al., 2012; Díaz-Agero Pérez C et al., 2018; Otter JA et al., 2019). Установеният висок процент на носителство на ESBL продуценти показва повишената възможност за развитие на инфекция в обществото, необходимо е да се вземат спешни мерки за правилна антибиотична употреба и лечение на инфекциите, особено уроинфекциите след лабораторно потвърждение на чувствителността.

По отношение на AmpC продуцентите малко проучвания докладват колонизация с такива продуценти (Hazirolan G et al., 2018). Установяват се DHA-1 и CMY-2 (Pan F et al., 2019, Garrido A et al., 2014).

Анализът на изолатите показва, че разпределението на доказаните ESBL/AmpC/карбапенемаза продуценти при пациенти в болниците бяха **81%** (167/205), **3%** (7/205), **7%** (14/205) от изследваните 346 изолата, докато при здравите индивиди беше **72%** (102/141), **13%** (18/141), **0 %** (0/141) съответно (**Таблица 15**). Хиперпродуцентите на вродени AmpC ензими преобладаваха при здравите хора с 12% (17/141), докато при пациентите бяха 6% (12/205). Много доклади показват ролята на болниците като резервоар на гени на резистентност, на ESBL/карбапенемаза продуценти (Otter JA et al., 2019; Díaz-Agero Pérez C et al., 2018; Platteel TN et al., 2014; Aires-de-Sousa M et al., 2019). Най-вероятно в условията на засилен антибиотичен натиск в чревния тракт се селектират резистентни мутанти, също така при широкото разпространение на

клонални вътреболнични щамове, чревният тракт може да се посели с резистентни бактерии и да стане източник за тяхното разпространение в самите болници и в обществото след изписването на болния. Важен е също така факта, че фекалната колонизация се задържа месеци, до години (Jørgensen S et al., 2017). В чревния тракт ESBL продуцентите на 4-тия месец са 61%, 56% на 7-мия, 48% - 10-тия месец, 39% - 13-тия месец, 19% след 2 години, и 15% след три и повече (Jørgensen S et al., 2017). Много автори докладват връзката между инфекция с ESBL продуценти и увеличена колонизация на чревния тракт с тях – напр. при уроинфекции се увеличава процентът на ESBL продуцентите във чревния тракт (Karaniка S et al., 2016; Doi Y et al., 2017). Интерес представлява преобладаването на AmpC продуцентите при здрави хора, предимно DHA-1. Този резултат е в съответствие с установеното преобладаване на AmpC хиперпродуцентите в чревния тракт на здравите хора, в сравнение с пациентите.

Делът на ESBL продуценти при изследваните деца беше **24%** (139/574), докато при възрастните беше **18%** (130/723). Разликата е статистически значима с  $p = 0.006$ . Доказаните ESBL/AmpC/карбапенемаза продуценти при децата бяха **80%** (139/174), **7%** (13/174), **0%**, докато при възрастните бяха **76%** (130/172), **7%** (12/172), **8%** (14/172) съответно (**Таблица 16**). Само възрастните са колонизирани с карбапенемаза продуценти 2% (14/723).

Разпределението на ESBL/AmpC/карбапенемаза продуцентите при цефалоспорин трета генерация резистентните изолати бяха **84%** (269/346), с плазмидна AmpC продукция – **12%** (25/346), AmpC хиперпродуценти – **8%** (29 /346) и карбапенемаза продуценти- **4%** (14/346).

При ESBL продуцентите преобладаваха **CTX-M-15 - 39%** (134/346), следвани от **CTX-M-3 20 %** (70/346), **CTX-M-27 – 8%** (28/213) и **CTX-M-14 – 6%** (22/346). CTX-M-1, CTX-M-9 и SHV-12 бяха установени при единични изолати. Плазмидните AmpC ензими, продуцирани самотоятелно, включваха предимно **DHA-1 - 6%** (21/346) и **CMY-2 - 1%** (4/346).

От таблицата се вижда, че 183 ESBL продуцента, 23 AmpC, един изолат произвеждащ комбинация от AmpC и ESBL и само 1 карбапенемаза продуцент (KPC-2) бяха доказани при *E. coli*, като пет изолата бяха с неизвестен механизъм на бета-лактамна резистентност. При *E. coli* преобладаваха CTX-M-15 **43%** (91/213), CTX-M-3 **17%** (37/213), CTX-M-27 –

**13%** (28/213) и СТХ-М-14 – **9%** (20/213). Двадесет и четири изолата (11%) бяха продуценти на ДНА-1 или СМУ-2. От тях един изолат произвеждаше едновременно ДНА-1 и СТХ-М-15 ензим и КРС-2 продуцента също произвеждаше СТХ-М-15.

При *Klebsiella spp.* преобладаваха СТХ-М-3 ензимите 38% (32/84), следвани от СТХ-М-15 32% (27/84). Интерес представлява факта, че пет от изолатите произвеждаха едновременно и двата ензима. Само един изолат произвеждаше ДНА-1 ензим. Почти всички карбапенемаза продуценти бяха *K. pneumoniae* (n=13), като преобладаваше продукцията на NDM-1 (n=11), само два изолата произвеждаха КРС-2.

Преобладаващия тип ESBL при фекалните изолати беше **СТХ-М-15 (39%)**, като той се асоциираше със всички видове микроорганизми без *H. alvei* (**Табл. 14**). В световен мащаб това е най-често доказан тип СТХ-М ESBL (Hu Y et al., 2020). Той принадлежи към СТХ-М-1 групата (D'Andrea MM et al., 2013). В други проучвания върху чревното носителство тази група преобладава – напр. в Белгия 75% от ензимите са от СТХ-М-1 групата (Schoevaerdt D et al., 2012), 57.9% в Англия (Otter JA et al., 2019), 52.15% в Испания (Díaz-Agero Pérez C et al., 2018), 67.3% от ензимите са от СТХ-М-1 групата в Холандия (Platteel TN et al., 2014). СТХ-М-15 ензимите се доказват за пръв път в България през 2002г (Markovska R et al, 2004), след само 2-3 години те стават преобладаващи при клиничните изолати (Markovska R et al, 2008, Markovska et al, 2014). Много важен е фактът, че установяваме продуцентите на тези ензими не само в болниците 24% (84/134), но и при здравите хора – в 15% (50/346), и при деца и при възрастни (**Таблица 15 и Таблица 16**). Този тип ензими се доказват във всички проучени лечебни заведения.

В настоящото проучване дялът на СТХ-М-3 продуцентите беше 22%. Този ензим се асоциираше предимно с *K. pneumoniae*, като всички три изолата *K. michiganensis* го произвеждаха. СТХ-М-3 продуценти се изолираха предимно от пациенти, но това се свързва с факта, че *K. pneumoniae* изолатите бяха предимно от хоспитализирани (**Таблица 15 и Таблица 16**). Интерес представлява факта, че при клинични изолати *K. pneumoniae*, установени в 6 българските болници, преобладават СТХ-М-15 продуцентите (87%) и само 9% носят СТХ-М-3, докато при *K. pneumoniae* от чревно носителство преобладава СТХ-М-3 – 38% , а СТХ-М-15 бяха 32%.

Дялът на представителите на СТХ-М-9 групата в нашето изследване беше 15 % (52/346), **Фиг. 24**, като основно бяха представени от СТХ-М-27 (8%) и СТХ-М-14 (6%).

CTX-M-27 се доказва за първи път в България. Появата му при изолати от чревния тракт говори за възможността да бъде установен и при клиничните изолати. Тези ензими се установяват често при чревните носители (Flament-Siomon SC et al., 2020). По-висок процент на CTX-M-27 – 29% беше установен в Португалия (Aires-de-Sousa M et al., 2019). И в други проучвания процентното съотношение е по-високо в сравнение с нашите данни - 20.7% CTX-M-9 в Англия (Otter JA et al., 2019), 16.8% в Германия (Hamprrecht A et al., 2016). а в Холандия установения процент е по-нисък - 11 % от група CTX-M-9 (Platteel TN et al., 2014), както и в проучване в Египет, като 4 (6.2%) от изолатите са били продуценти на CTX-M-14 и един на CTX-M-27 (Abdallah HM et al., 2017) и в Тайланд са били 11.0% от CTX-M-9 групата (Sasaki T et al., 2010).

Установените карбапенемази бяха 4% от резистентните на цефалоспорини трета генерация изолати (11 изолата NDM-1 (10 изолата NDM-1 в комбинация с CTX-M-15 и CMY-4; 1 NDM-1 + CTX-M-3 и 3 изолата KPC-2 (1 KPC-2; 1 KPC-2 в комбинация с CTX-M-15; 1 KPC-2 + CTX-M-3) и 1% от цялата бройка изследвани. Те се асоциират с възрастни хоспитализирани пациенти. Процентът е сходен с проучването в Португалия (3%). Доказва се, че единичен изолат, произвеждащ, както KPC-3, така и GES-5 карбапенемази, а три изолата са копродуценти на ESBL (CTX-M-15) и карбапенемаза (KPC-3 или OXA181) (Aires-de-Sousa M et al., 2019). Спектърът на установените карбапенемази в настоящото проучване отговаря на спектъра на установените карбапенемази в клинични изолати – предимно NDM-1 в последните години и в по-малка степен KPC-2. Лечебните заведения, в които се установяват карбапенемази са УМБАЛСМ”Н.И.Пирогов” и УМБАЛ”Александровска” - София. Много висок процент карбапенемаза продуценти се установява в болница в Гърция между септември 2010 г. и февруари 2012 г като част от активна програма за наблюдение на карбапенем-резистентни ентеробактерии – 51.3% от събраните проби са положителни за карбапенемаза продуценти като KPC са преобладаващи в 57% (Pournaras S et al., 2013). В Испания 91.38% от карбапенемазите са OXA-48 (Díaz-Agero Pérez C et al., 2018). В Германия 0.11% са колонизирани с ентеробактерии, произвеждащи карбапенемаза (VIM-1, NDM-1, IMP-8) (Hamprrecht A et al., 2016). В Мароко 14 % са карбапенем-резистентни ентеробактерии, предимно OXA-48 (Girlich D et al., 2014). Три от 5 карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* са били продуценти на  $bla_{NDM}$  и 2 изолата на  $bla_{VIM}$  в проучване в Египет (Abdallah HM et al., 2017).

В Китай се установяват 8.5% карбапенем-резистентни ентеробактерии, в болниците, предимно КРС произвеждащи ST11 *K. pneumoniae* (Liu Q et al., 2019). По-висок процент се установява в Израел за 2011г – 12% карбапенем резистентни ентеробактерии (Ben-David D et al., 2011). Освен в болниците, увеличени нива на фекална колонизация се доказват в лечебните заведения за дългосрочна грижа (Woerther PL et al., 2013; Nicolas-Chanoine MH et al., 2013). В такава болница в САЩ са установени 18.9% носители на карбапенем-резистентни ентеробактерии (Prasad N et al., 2016).

## **Заклучение**

Направен е анализ на нивата и спектъра на ESBL, AmpC и карбапенемаза продуцентите при 346 цефалоспорин трета генерация резистентни изолати от разред *Enterobacteriales*.

Процентът на ESBL продуцентите при всички изследвани беше сравнително висок -20.7%, като преобладаваха *E. coli* - 70.2% , *Klebsiella spp* 24.5%, *Enterobacter spp* 3.3%, *C. freundii* complex 3.3%, *M. morgani* 0.3%. Честотата на плазмидните AmpC ензими беше – 1.9%, като преобладаваха *E. coli*. Карбапенемаза продуцентите бяха - 1%, предимно *K. pneumoniae* n=13 и 1 *E. coli*.

Делът на ESBL продуценти в България при здравите индивиди беше 14%, докато при пациентите в болници беше 28%,  $p < 0.0001$ . Карбапенемаза продуцентите бяха изолирани предимно от хоспитализирани. При AmpC продуцентите не се наблюдаваха статистически значими различия здрави/ хоспитализирани.

При децата нивото на ESBL продуцентите беше по-високо, отколкото при възрастните – 24% срещу 18%,  $p = 0.005$ , като значима разлика при AmpC продуценти не се наблюдаваше. Карбапенемаза продуцентите бяха изолирани от възрастни.

При ESBL продуцентите преобладаваха CTX-M-15 - 39%, следвани от CTX-M-3 - 20% , CTX-M-27 – 8% и CTX-M-14 – 6%. При единични изолати бяха установени CTX-M-1, CTX-M-9 и SHV-12. Плазмидните AmpC ензими, продуцирани самостоятелно, включваха DHA-1.6% (21/346) и CMY-2.1% (4/346). При карбапенемаза продуцентите преобладаваха 11 изолата NDM-1 (n=11), като 9 от тях ко-продуцираха CTX-M-15 и CMY-4. Три изолата произвеждаха КРС-2.

## 5.10. Епидемиологично типизиране

### 5.10.1. *K. pneumoniae*

Всички 346 изолати от фекални проби бяха типизирани чрез ERIC-PCR. За всеки изолат бяха генерирани разпознаваеми ERIC профили, съставени от 7 до 14 бенда. За клон приехме изолати с разлика в ERIC профилите до 1 ивица.

При изолатите *Klebsiella spp* бяха идентифицирани 33 ERIC типа с от 1 до 13 представителя. Всички изолати *K. michiganensis* имаха еднакъв ERIC тип. Всички седем *K. oxytoca* имаха уникален ERIC тип. Дванадесет изолата *K. pneumoniae* имаха уникален тип, а останалите 13 ERIC типа имаха от 2 до 13 представителя – общо 62 изолата. От всеки ERIC тип бяха избрани репрезентативни за лечебно заведение и вид бета-лактамаза изолати, за които бяха определени MLST типовете. **Таблица 18** показва броят на представителите на отделните клъстери и броят проучени с MLST, както и лечебните заведения, в които са установени.

**Таблица 18. Разпределение на ERIC и MLST типовете при проучените 74 *K. pneumoniae* изолати по лечебни заведения**

ERIC тип брой	Брой, проучени с MLST анализ	Проучени лечебни заведения	MLST тип
b n=11 b'' n=2	7	<b>PD</b> (11), <b>PIR</b> (1), <b>PNa</b> (1)	353
p n=12	6	<b>PIR</b> (8), <b>Alx</b> (3), <b>BS</b> (1)	11
s n=7	4	<b>VAR</b> (6), <b>PD</b> (1)	37
a n=5	3	<b>PD</b> (5)	1198
h n=5	3	<b>VAR</b> (4), <b>LR</b> (1)	280
w n=5	3	<b>IG</b> (2), <b>PD</b> (1), <b>VAR</b> (1), <b>MD</b> (1)	34
m n=4	2	<b>IG</b> (3), <b>VAR</b> (1)	15
t n=3	2	<b>PD</b> (2), <b>IG</b> (1)	1569
c n=2	1	<b>PD</b> (2)	17
n n=2	1	<b>PIR</b> (1), <b>Alx</b> (1)	258
r n=2	1	<b>IG</b> (2)	253
e n=2	1	<b>PNb</b> (1), <b>Alx</b> (1)	449
uni n=12 (8+4 нетипабилни)	1 1 1 1	<b>PD</b> (1) <b>PD</b> (1) <b>Alx</b> (1) <b>PD</b> (1)	429 16 627 20

1	<u>MD</u> (1)	14
1	<b>VAR</b> (1)	215
1	<b>Alx</b> (1)	1563
1	<u>MD</u> (1)	2449
1	<u>LR</u> (1)	нетип.
1	<u>MD</u> (1),	нетип.
1	<b>VAR</b> (1)	нетип.
1	<u>MD</u> (1),	нетип.

Използвани съкращения: VAR=МБАЛ"Света Марина" Варна, PNB=УМБАЛ д-р Г.Странски-Плевен, PNa=МЦ"Екзакта Медика"- Плевен, PD=УМБАЛ,,Св.Георги"- Пловдив, BS=МДЛ,,Лина"-Бургас, Alx=УМБАЛ"Александровска" - София, IG=II-ра МБАЛ-София, PIR=УМБАЛСМ"Н.И. Пирогов", MD=МДЛ"Медирс"-София, Tor=МЦ"Торакс" - София, LR=МДЛ"Лора"-София

С **bold** са означени лечебните заведения, от които са проучени хоспитализирани пациенти, underline тези, от които са проучени здрави хора.

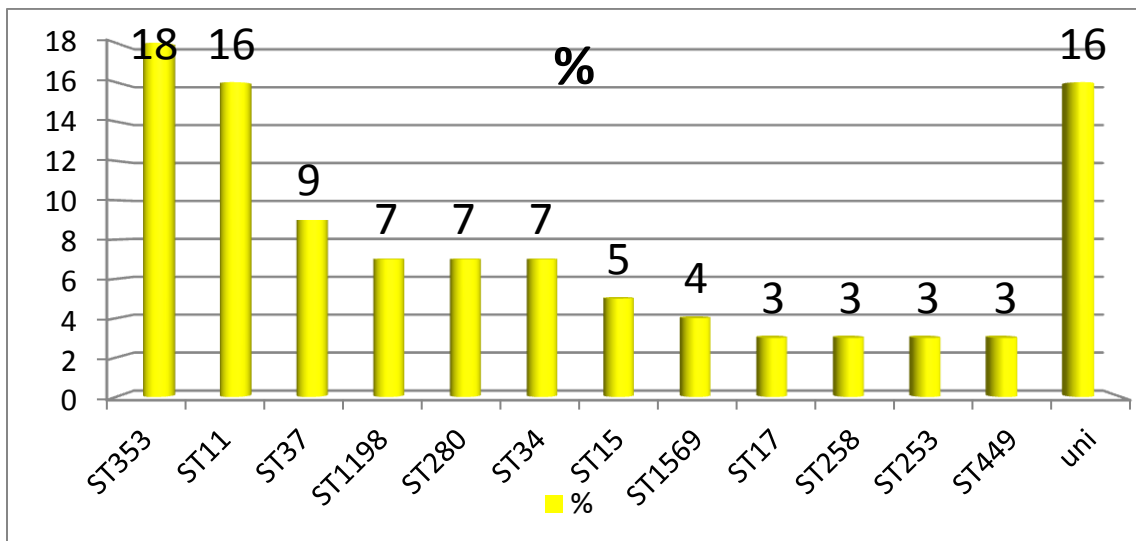
**Таблица 19** представя разпределението на изолатите според изследвания контингент (хоспитализирани/здрави) и установените бета-лактамази във всеки MLST тип.

**Таблица 19. Разпределение на ERIC, MLST типовете при проучените *K. pneumoniae* изолати, както и разпределение на изолатите според изследвания контингент (хоспитализирани/здрави) и установените бета-лактамази във всеки MLST тип.**

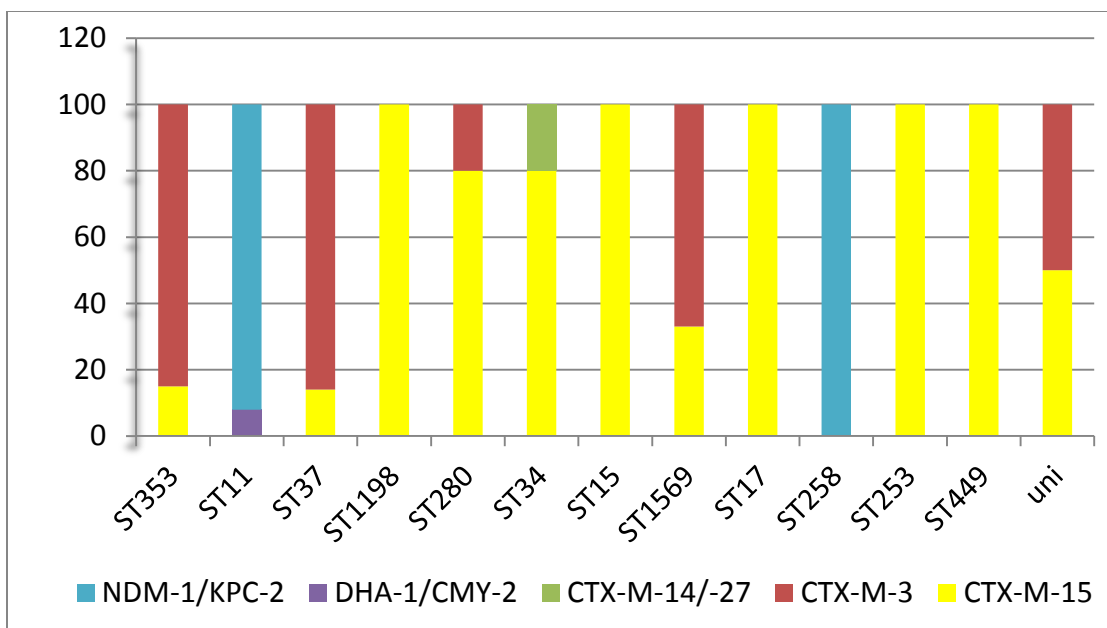
ERIC тип брой	MLST тип	Хоспитализирани (n=73)	Здрави (n=11)	Бета-лактамаза(брой)
b n=11 b" n=2	353	13	1	CTX-M-3 (11) CTX-M-3 I/CTX-M-15 I (3)
p n=12	11	11	1	NDM-1/CTX-M-15(3)/CMY-4 (11) DHA-1 (1)
s n=7	37	7	-	CTX-M-3 (6) CTX-M-15 (1)
a n=5	1198	5	-	CTX-M-15 (5)
h n=5	280	4	1	CTX-M-15 (4) CTX-M-3 (1)
w n=5	34	4	1	CTX-M-15 (4) CTX-M-14 (1)
m n=4	15	4	-	CTX-M-15 (4)
t n=3	1569	3	-	CTX-M-3 (2), CTX-M-15 (1)

c	n=2	17	2	-	CTX-M-15/CTX-M-3 like (1), CTX-M-15 (1)
n	n=2	258	2	-	KPC-2 (1) KPC-2+CTX-M-3 (1)
r	n=2	253	2	-	CTX-M-15 (2)
e	n=2	449	1	-	CTX-M-15/CTX-M-3 like (1) CTX-M-15/CMY-4 (1)
uni	n=12	429	1	-	CMY-4/CTX-M-15
		16	1	-	CTX-M-15
		627	1	-	SHV-1
		20	1	-	CTX-M-3
		14	-	1	CTX-M-15
		215	1	-	CTX-M-31/CTX-M-151
		1563	1	-	CTX-M-15
		2449	-	1	CTX-M-3
		нетип.	1	-	CTX-M-15
		нетип.	-	1	CTX-M-3
		нетип.	-	1	CTX-M-3
		нетип.	-	1	CTX-M-3

Анализът на ERIC и MLST типове при изолатите *K. pneumoniae* показва, че спектъра на MLST типове е голям, като осем MLST типа имаха  $\geq 3$  представителя и обхващаха 54 от изолатите - (73%) - **Фиг 26.** **Фигура 27** показва видовете ензими при съответните MLST типове.



**Фигура 26.** MLST типове при *K. pneumoniae* (74)



**Фигура 27. Видове ензими според MLST типове при *K. pneumoniae***

**ERIC тип b (Табл 19, Фиг.28)**, съответстващ на секвенционен тип **ST353**, беше доминиращ, доказан в 18% (n=13/74) от всички изолати *K. pneumoniae*. Този тип беше установен в УМБАЛ”Св.Георги”- Пловдив, УМБАЛСМ”Н.И.Пирогов” и УМБАЛ д-р Г. Странски - Плевен. Преобладаващият тип ESBL беше CTX-M-3 (85%) - **Фиг 27**. Този ST тип е доказан в проучване в Китай (Zhang et al., 2017), като всички изолати са били носители на KPC-2 карбапенемаза. Това е от важно значение и показва възможността на този клон да придобива други бета-лактамази, вкл. карбапенемази. Този клон е докладван и като носител на CTX-M-15 ензими (Ghebremedhin B et al, 2014).

**ERIC тип p (Фиг.28)**, идентифициран като **MLST 11**, е втория по честота тип, доказан в 14% (n=11). На този тип принадлежаха почти всички карбапенемаза продуценти - NDM-1 в комбинация с CTX-M-15 и CMY-4 (**Фиг.27**), като всички те са от хоспитализирани пациенти от УМБАЛСМ”Н.И.Пирогов” и УМБАЛ”Александровска”- София, само един от ST11 клона продуцираше DHA-1 и беше установен във фекална проба от здрав индивид в МДЛ”Лина”- Бургас.

Този MLST тип е интернационален и свързан с преноса на карбапенемази, често металобета-лактамази и карбапенемази от клас A (Pitout J.D et al., 2015).

В Европа, разпространение на NDM-1 произвеждащи ST11 *K. pneumoniae* изолати са докладвани в Гърция (Voulgari et al., 2014; Protonotariou E et al., 2019) и Полша (Baraniak et al., 2016). Studentova et al., 2015 също идентифицира два случая на NDM-1 продуцираща ST11 *K. pneumoniae* в Чехия.

В България откриването на NDM-1 ST11 *K. pneumoniae*, беше описано най-напред от Todorova et al., 2016, Kostyanev T et al., 2016. Savov E, 2018, съобщава за болнично огнище в България, причинено от продуценти на NDM-1 ST11 *K. pneumoniae*. Проучване през 2018г на клинични изолати в болници в София, Плевен, Пловдив и Варна доказва наличието на продуциращи NDM-1 *K. pneumoniae* принадлежащи към MLST типа ST11 (Markovska et al., 2019). Те са били в комбинация с CTX-M-15 и плазмидната AmpC - CMY-4. Това е установено и при изолатите в Чехия (Studentova et al., 2015), но не и при полските и гръцките изолати (Baraniak et al., 2016; Voulgari et al., 2014). Можем да предположим, че комбинацията от три различни ензими (карбапенемаза, AmpC и ESBL) в същите изолати, допринасят за тяхното устойчиво разпространение. В проучването на Markovska et al., 2019 се докладва вероятното местоположение на *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> и *bla*<sub>CMY-4</sub> върху преносими плаزمиди от A/C репликон тип. Разпространението на *bla*<sub>NDM-1</sub> ген от IncA/C е докладвано и преди от няколко автори (Mulvey et al., 2011; Giske et al., 2012; Todorova et al., 2016). Установяването на този клон *K. pneumoniae*, продуценти на NDM-1, ESBL и плазмидна AmpC ензими при чревните носители е от голямо значение. Поради наличието на три различни бета-лактамази тези изолати са изключително резистентни като два от тях са панрезистентни, а останалите изключително резистентни. Наличието на този клон в чревния тракт прави тези пациенти вектори за разпространение на тези изключително проблемни за лечение микроорганизми.

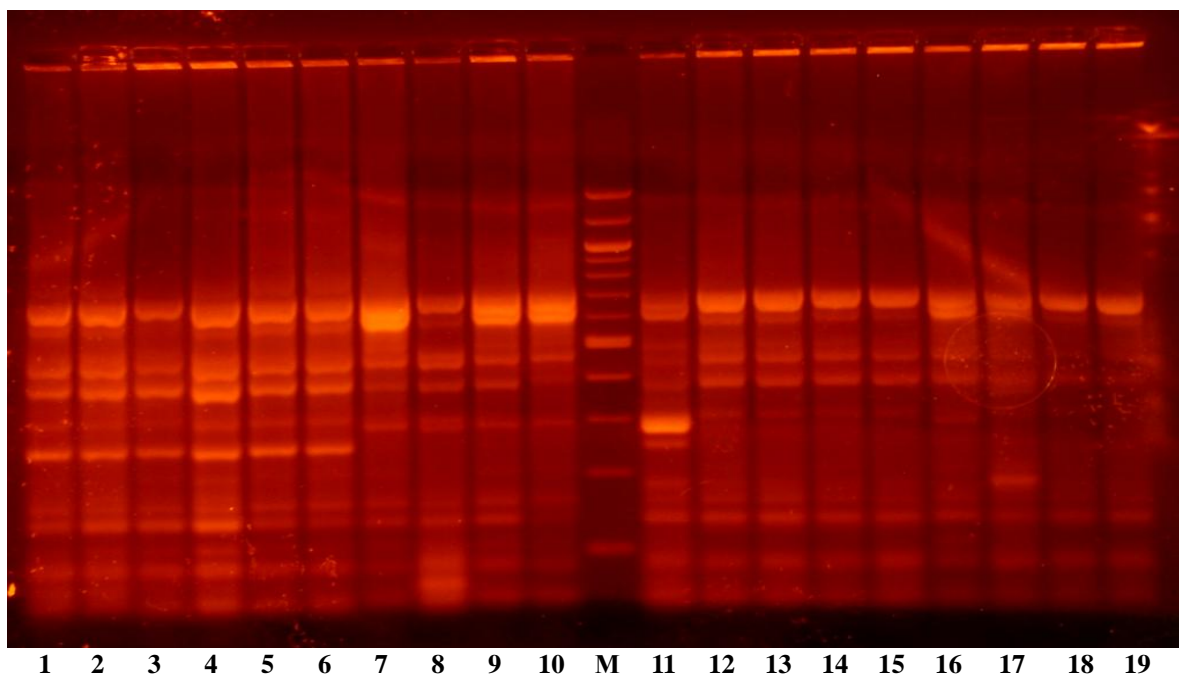
**ERIC тип s (MLST 37)** е третият по честота, доказан в 7 изолата, всичките установени при пациенти в болници. Този тип беше доказан в МБАЛ"Света Марина" Варна и УМБАЛ"Св.Георги"-Пловдив Преобладаващия ESBL за този MLST тип беше CTX-M-3 (85%)- **Фиг. 27**. Отново в проучването от Китай (Zhang R et al., 2017), този MLST тип е доказан като преносител и на карбапенемази, както KPC-2, така и NDM-1, което е предпоставка за бъдещото им разпространение и в други страни. Този тип се доказва и в България при 3 изолата, един от които продуцент на KPC-2 (Markovska R et al., 2019).

**ERIC** типове **a, h, w и m** (съответно **MLST 1198, 280, 34, 15**) са представени от малък брой (по 4 и повече) изолати *K. pneumoniae*, като **ST15** е представен само от изолати от пациенти в болници от II-ра МБАЛ-София и МБАЛ”Света Марина” Варна, като всички те бяха продуценти на СТХ-М-15 ензима (**Фиг.27**). Представителите на **ST15** клона са съобщавани като продуценти на СТХ-М-15 или карбапенемазни в световен мащаб (Breures et al., 2013; Esteban-Cantos et al., 2017; Melegh et al., 2014; Morris D et al., 2016). Изолати от този клон са докладвани и в България, установени от клинични изолати в болници във Варна, Плевен, Пловдив и София (Markovska et al., 2017).

**ERIC** типове **t, c, n, r, d, e, f, g, I, y** (съответно **MLST 1569, 17, 258, 253, 429, 449, 16, 627, 20, 1563**) са установени отново само при пациенти, но не и при здрави индивиди (**Табл. 10**). ST16, ST17 се доказват като асоциирани с СТХ-М-15 при предишно проучване в България (Markovska et al., 2017), както и при 2 изолатата (ST16) в по-скорошно проучване в България (Markovska et al., 2019), като са установени в клинични изолати от пациенти в болници.

MLST типа **ST258** е продуцент на карбапенемазата от клас А - КРС-2, като двата такива изолатата са изолирани от УМБАЛ”Александровска” - София и УМБАЛСМ”Н.И. Пирогов”. ST258 *K. pneumoniae*, произвеждащи КРС-2, са открити по време на няколко европейски проучвания (Baraniak et al., 2017; Logan и Weinstein, 2017; Kaase et al., 2016; Pitout J et al., 2015). Съобщено е, че този клон носи различни карбапенемазни гени като *bla*<sub>КРС</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>ОХА-48</sub> и *bla*<sub>NDM</sub> (Lu et al., 2018; Solgi et al., 2018; Wang et al., 2015).

Единични ST типове **14** и **2449** са установени само при изолати от здрави хора в МДЛ”Медирс”- София (**Табл. 19**). В литературата ST14 многократно се съобщава като един от най-често срещаните видове NDM-позитивни *K. pneumoniae* щамове (Giske CG et al., 2012; Jain A et al., 2014; Yoon EJ et al., 2018; Wu W et al., 2019).



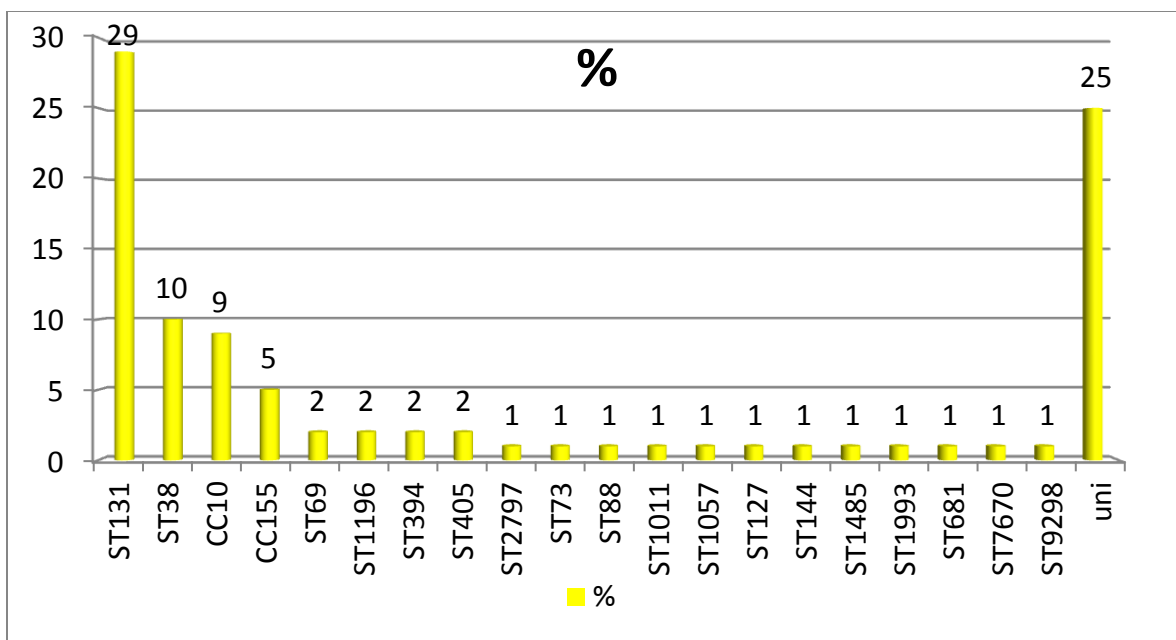
**Фигура 28.** ERIC профили на изолатите *K. pneumoniae*

Легенда: Клон р - позиции 1, 2, 3, 4, 5, 6 ; клон а – позиции 7, 9, 10, 16; клон в – позиции 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19; позиции 8-d, позиции 11-с, М - маркер

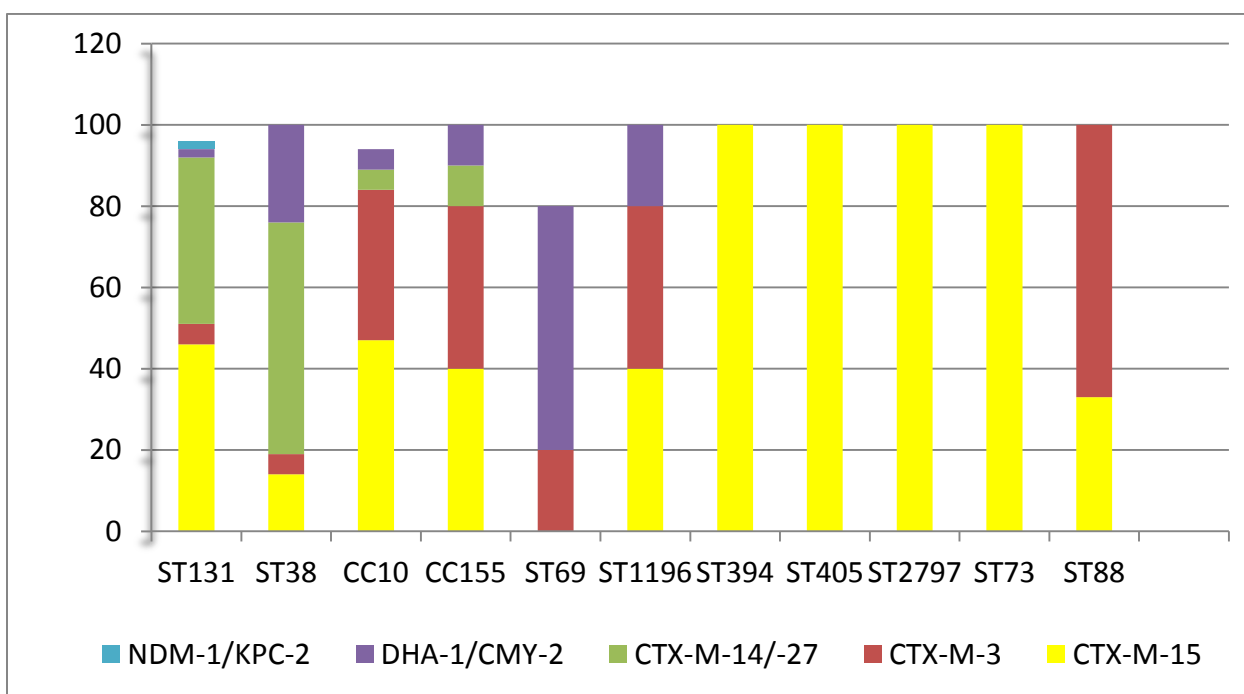
### 5.10.2 *E. coli*

При изолатите *E. coli* (n=213) бяха идентифицирани 83 ERIC типа със следните означения: ERIC 1, 2, A, A1, A2, A3, A4, A5, B, D, E, F, F1, G, H, I, J, K, L, M, N, O, Q, R, S, S2, T, U, V, W, X, Y, Z. Петдесет и четири изолата имаха уникален ERIC тип, докато останалите 29 ERIC типа имаха от 2 до 61 представителя и бяха 75% от изолатите.

На **Фиг. 29** са показани MLST типовете при *E.coli*, а на **Фиг. 30** – ензимите при съответните MLST типове.



Фигура 29. MLST типове при *E.coli* (213)



Фигура 30. Бета лактамази според най-разпространените MLST типове ( $\geq 3$ ) при *E.coli* (213)

**Таблица 20** показва броят на представителите на отделните клъстери и броят проучени с MLST, както и лечебно заведение, в което са установени. MLST типове на репрезентативни изолати от всеки ERIC тип с по-голям брой представители бяха определени чрез мултилокусно секвениране.

**Таблица 20** Разпределение на ERIC, MLST типове, при проучените *E. coli* изолати по лечебни заведения

ERIC тип	Брой изследвани	MLST тип	Клонален комплекс	Проучени лечебни заведения (брой)
A n=48 A1 n=3 A2 n=3 A3 n=1 A4 n=3 A5 n=3	23 1 1 1 1 1	131	131	<b>IG</b> (6), <b>Alx</b> (8), <b>BS</b> (6), <b>LR</b> (3), <b>MD</b> (5), <b>PIR</b> (1), <b>PD</b> (3), <b>PNb</b> (14), <b>PNa</b> (4), <b>VAR</b> (11)
S n=21	12	38	38	<b>PD</b> (3), <b>IG</b> (1), <b>Alx</b> (3), <b>BS</b> (1), <b>LR</b> (4), <b>MD</b> (6), <b>VAR</b> (3)
X n=9	5	4981	10	<b>BS</b> (8), <b>IG</b> (1)
F n=6	3	155	155	<b>VAR</b> (3), <b>PD</b> (2), <b>MD</b> (1)
K n=5	3	69	69	<b>PNa</b> (2), <b>VAR</b> (2), <b>BS</b> (1)
H n=5	3	1196	-	<b>PD</b> (3), <b>VAR</b> (1), <b>LR</b> (1)
Y n=5	3	4238	10	<b>MD</b> (3), <b>LR</b> (1), <b>Alx</b> (1)
M n=4	2	394	394	<b>BS</b> (4)
W n=4	2	405	405	<b>VAR</b> (2), <b>Alx</b> (1), <b>LR</b> (1)
F1 n=4	2	56	155	<b>PNa</b> (1), <b>LR</b> (1), <b>VAR</b> (2)
J n=3	3	10	10	<b>PNa</b> (1), <b>PD</b> (1), <b>LR</b> (1)
E n=3	2	2797	-	<b>MD</b> (1), <b>BS</b> (2)
I n=3	2	73	73	<b>PNa</b> (1), <b>BS</b> (1), <b>Tor</b> (1)
Z n=3	2	88	23	<b>PD</b> (3)
R n=2	1	1011	-	<b>PD</b> (1), <b>VAR</b> (1)
P n=2	1	1057	14	<b>BS</b> (2)
L n=2	1	127	-	<b>PD</b> (2)
T n=2	1	144	-	<b>PD</b> (2)
N n=2	1	1485	648	<b>VAR</b> (2)
B n=2	1	1993	-	<b>LR</b> (1), <b>PD</b> (1)
V n=2	1	34	10	<b>LR</b> (1), <b>PD</b> (1)
U n=2	1	681	-	<b>VAR</b> (2)
O n=2	1	7670	-	<b>BS</b> (2)
D n=2	1	9298	-	<b>PNa</b> (1), <b>BS</b> (1)
UNI n=54	14 (7+7нетип.)	2178 2617 295	- 59 23	<b>Tor</b> <b>PNa</b> <b>MD</b>

		648	648	<u>BS</u>
		8578	12	<u>PNa</u>
		93	168	<u>PNa</u>
		95	95	<b>PNb</b>

Използвани съкращения: VAR=МБАЛ"Света Марина" Варна, PNb=УМБАЛ д-р Г. Странски -Плевен, PNa=МЦ"Екзакта Медика"- Плевен, PD=УМБАЛ"Св.Георги"- Пловдив, BS=МДЛ,,Лина"-Бургас, Alx=УМБАЛ"Александровска" София, ПГ=II-ра МБАЛ - София, PIR=УМБАЛСМ"Н.И. Пирогов", MD=МДЛ"Медирс"- София, Тор=МЦ"Торакс"- София, LR=МДЛ"Лора"- София

С **bold** са означени центрове, от които са проучени хоспитализирани пациенти, underline центрове, от които са проучени здрави хора.

**Таблица 21** показва разпределението на ERIC и MLST типове спрямо според изследвания контингент (хоспитализирани/зdravi) и бета-лактамази

**Таблица 21** Разпределение на ERIC, MLST типове, клонален комплекс, филотип, според изследвания контингент (хоспитализирани/зdravi) и вида на бета-лактамазите при проучените *E. coli*

ERIC тип	MLST тип	СС	Фило група	Хоспитал изирани n=103	Зdravi n=110	Бета-лактамаза
A n=48 A1 n=3 A2 n=3 A3 n=1 A4 n=3 A5 n=3	131	131	B2	43	18	CTX-M-15(28), CTX-M-3(6) CTX-M-27(22), CTX-M-14 (3), KPC-2 (1), CMY-2 (1)
S n=21	38	38	D	10	11	CTX-M-15 (3), CTX-M-3 (1) CTX-M-14 (8), CTX-M-27 (4) DHA-1 (5)
X n=9	4981	10	A	1	8	CTX-M-15 (5), CTX-M-3 (2) CTX-M-9 (1), unknown (1)
F n=6	155	155	B1	5	1	CTX-M-15 (3), CTX-M-3 (3)
K n=5	69	69	D	2	3	DHA-1 (3), CTX-M-3 (1), unknown (1)
H n=5	1196	-	B1	4	1	CTX-M-15 (2), CTX-M-3 (2),

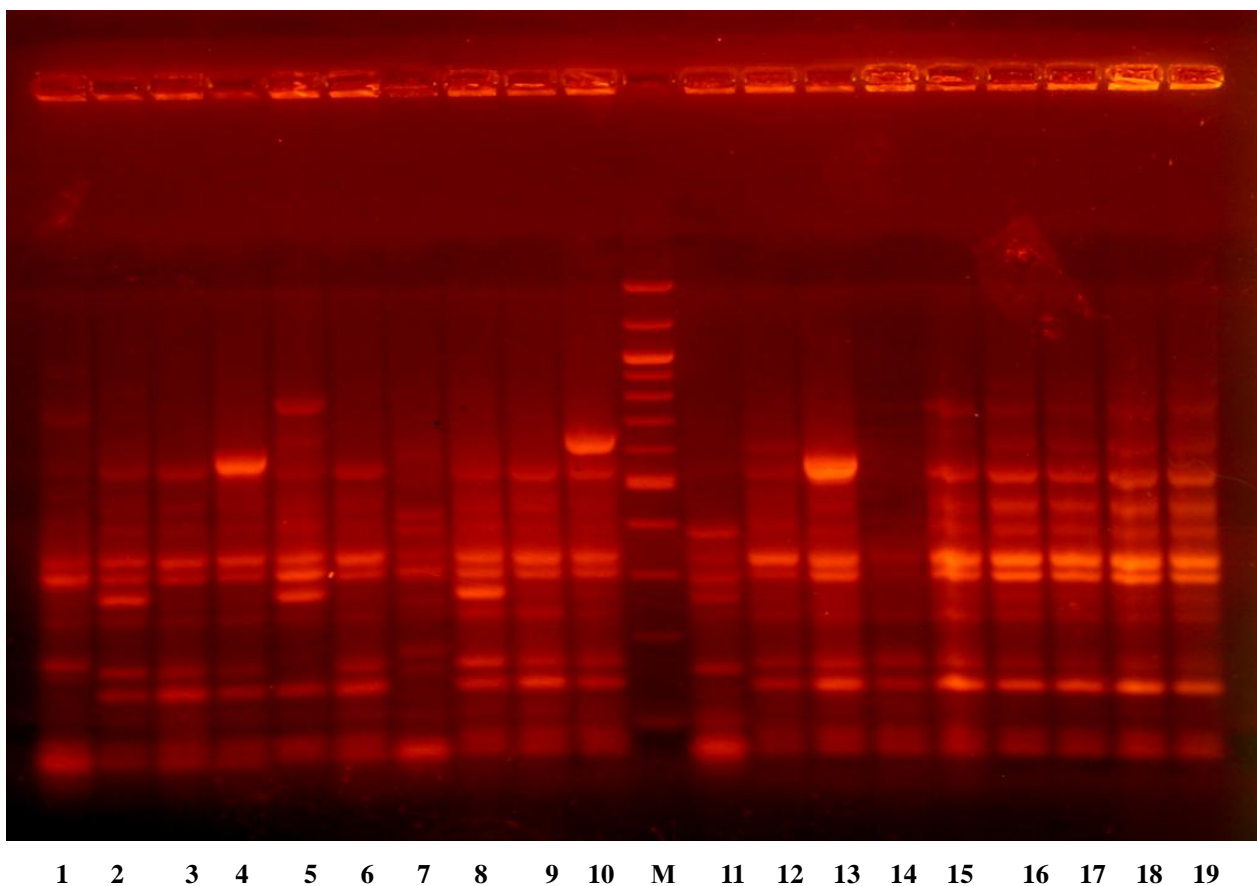
						DHA-1 (1)
Y n=5	4238	10	A	1	4	3 CTX-M-3 (3), CTX-M-15 (1), DHA-1(1)
M n=4	394	394	D	-	4	CTX-M-15 (4)
W n=4	405	405	D	3	1	CTX-M-15 (4)
F1 n=4	56	155	B1	2	2	CTX-M-14 (1), CTX-M-1 (1), CTX-M-3 (1), DHA-1 (1)
J n=3	10	10	A	1	2	CTX-M-15 (2), CTX-M-3 (1)
E n=3	2797	-	B1	-	3	CTX-M-15 (2), CTX-M-1 (1)
I n=3	73	73	B2	-	3	CTX-M-15 (2), unknown (1)
Z n=3	88	23	A	3	-	CTX-M-3 (2), CTX-M-15 (1)
R n=2	1011	-	D	2	-	CTX-M-14 (1), CTX-M-9 (1)
P n=2	1057	14	B2	-	2	CTX-M-15 (2)
L n=2	127	-	B2	2	-	CTX-M-15 (2)
T n=2	144	-	B2	2	-	CTX-M-15 (2)
N n=2	1485	648	B1	2	-	CTX-M-3 (2)
B n=2	1993	-	B2	1	1	CTX-M-15 (1), CTX-M-3 (1)
V n=2	34	10	A	1	1	CTX-M-15 (1), CTX-M-3 (1)
U n=2	681	-	B2	2	-	CTX-M-3 (1), CTX-M-15 (1)
O n=2	7670	-	B1	-	2	DHA-1 (2)
D n=2	9298	-	B2	-	2	CTX-M-15 (1), CMY-2 (1)
UNI n=54	2178	-	B1	-	1	CTX-M-14
	2617	59	B1	-	1	CTX-M-14
	295	23	B1	-	1	CTX-M-3
	648	648	B1	-	1	DHA-1
	8578	12	B2	-	1	SHV-12
	93	168	A	-	1	SHV-12
	95	95	B2	1	-	CTX-M-14

Съкращения: СС – клонален комплекс

При изолатите *E.coli* преобладаващ **ERIC тип беше А (Фиг. 31) - 29%** (61/213), представен от **ST 131** и свързан с вирулентния филотип В2. Този клон преобладаваше при клиничните изолати с **42%** (43/103), , като те бяха доказани във всички проучени болници, а при здравите хора беше **16%** (18/110), изолирани от всички проучени центрове. Най-разпространения тип бета-лактамаза при клона ST131 беше CTX-M-15 (**46%**), следван от CTX-M-27 (**36%**), CTX-M-3 (**10%**), CTX-M-14 (5%)- **Фиг. 30.** Един от изолатите от този клон беше карбапенемаза продуцент (KPC-2) и също продуцираше CTX-M-15.

Клонална група ST131 на *E. coli* е разпространена в целия свят и изолатите причиняват придобити в общността и вътреболнични инфекции (Can F et al., 2015; Nicolas-Chanoine

МН et al., 2017). Този клон е отговорен за бързото увеличаване на резистентността към бета-лактами при *E. coli*, главно поради производството на СТХ-М-15 ензими (Nicolas-Chanoine МН et al., 2017). Клиничното му значение се подчертава от много проучвания,



**Фигура 31. ERIC профили на изолатите *E. coli***

Легенда: Клон А - позиции 3, 4, 5, 4, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19, като 4 и 13 бяха означени като А'; клон Б – позиции 2 и 7; позиция 1-Е, позиция 6-В, а позиция 10 е Е, М - маркер

които демонстрират високия му потенциал за вирулентност (Can F et al., 2015). В проучване в 2 болници в Испания и Франция се докладват сходни на установените в настоящето проучване резултати - високото разпространение на ST131, продуциращ предимно СТХ-М-15, следвани от СТХ-М-14 и СТХ-М-27 (Flament-Simon SC et al., 2020). Този интернационален клон притежава разнообразни гени за кодиране на фактори на

вирулентност (VF) (Blanco et al., 2013). Анализът на секвенцията на целия геном (WGS) разкри, че изолатите от ST131 клона принадлежат на три различни подкласа (А, В и С), характеризиращи се с различни алели на *fimH* гена (Petty et al., 2014; Ben Zakour et al., 2016). Подклад С2 (известен още като подклон Н30Rх), свързан с производството на СТХ-М-15, е най-разпространеният ST131 (Banerjee et al., 2013; Price et al., 2013; Dahbi et al., 2014 ; Peirano et al., 2014; Sauget et al., 2016). Към него принадлежи O25bST131 изолатите, които се характеризират с производство на СТХ-М-15, OXA-1 и вирулентната В2 филогрупа (Rogers BA et al., 2011). O25bST131 клона *E. coli* е високо вирулентен, пандемичен клон, свързан с придобити в общността и вътреболнични инфекции (Rogers BA et al., 2011). От ST131 изолатите от настоящото проучване, 42 принадлежаха на високо вирулентния и пандемичен клон O25B2ST131. Към този клон принадлежеше и единствения *E. coli*, продуцент на KPC-2 ензим. O25B2ST131 продуценти са били доказани и в предишно проучване в България (Markovska R et al., 2012).

В последните години все по-често се доказват представители на ST131, които произвеждат СТХ-М-27. Те принадлежат на клъстера С1-М27, и се доказват първо в Япония (Matsumura et al., 2016, 2017), а след това в други страни (Тайланд, Австралия, Канада, САЩ, Франция, Италия, Германия, Холандия и Испания) (Blanc et al., 2014; Birgy et al., 2016; Bevan et al., 2017; Merino et al., 2018; Peirano and Pitout, 2019). Повишеното разпространение на СТХ-М-27 е доказано и в проучването в двете болници в Испания и Франция (Flament-Simon SC et al., 2020). В проучването FUT1, Birgy et al. (2020) също показва нарастващата тенденция на СТХ-М-27 ензим.

Първото съобщение за KPC-2, произвеждаща *E. coli* е докладвано от Navon-Venezia et al. през 2006 г. (Navon-Venezia S et al., 2006). Подобни щамове *E. coli* ST131, произвеждащи KPC-2, са били открити във Франция, Турция, Китай, Италия. (Sun Y et al., 2016; Naas T et al., 2011; Can F et al., 2015; Cai JC et al., 2014; Piazza A et al., 2016). В България за първи път такъв изолат е доказан през 2017г. (Markovska R et al., 2017). Появата на *bla*<sub>KPC</sub> в *E. coli*, е потенциална заплаха за обществото и болниците.

Втория по честота **ERIC тип беше S - 10%** (21/213), представен от **ST 38**, като беше разпределен по равно в двете изследвани групи – хоспитализирани пациенти и здрави. Този клонален комплекс обикновено се свързва с филотип D, което отговаря на настоящите резултати (Clermont O et al, 2015). Този ST тип е често срещан при ESBL

продуциращи *E. coli* (Peirano and Pitout, 2019). Този MLST тип беше изолиран от болниците в Пловдив, Варна, УМБАЛ"Александровска" - София и II-ра МБАЛ-София, както и от здрави носители в МДЛ"Лина"- Бургас, МДЛ"Лора"- София и МДЛ"Медирс"- София. Най-разпространения ESBL тип при този клонален комплекс беше CTX-M-14 (38%), следван от CTX-M-27 (19%), CTX-M-15 (14%). Преобладаващ тип ST 38 е доказан в проучване на изолати *E. coli* от хора и животни в Германия (Pietsch M et al., 2018).

Клонален комплекс **10**, който е и третият по честота в настоящото проучване, беше представен от **ERIC типове: X, J, Y, V** отговарящи на MLST типове: **ST4981** (n=9), **ST4238** (n=5), **ST10** (n=3), **ST34** (n=2), (общо 19 изолата). Те всички отговаряха на филотип A и процентно бяха повече при изследваните здрави хора - 15%, изолирани от МДЛ"Лина"-Бургас, МДЛ"Лора"- София, МДЛ"Медирс"- София и МЦ"Екзакта Медика"- Плевен, спрямо хоспитализираните с 4% от София (II-ра МБАЛ; УМБАЛ"Александровска") и Пловдив. ESBLS, които преобладаваха бяха CTX-M-15 (43%), следван от CTX -M-3 (38%). В проучване в Китай е доказано, че изолати от този клон са били носители и на метало-бета-лактамазата NDM-1 (Zhang R et al., 2017), което е предпоставка за бъдещото му разпространение.

Следващия по честота клонален комплекс беше **CC155**, който беше представен от **ERIC типове: F (Фиг. 19) и F1**, отговарящи на MLST типове: **ST155 и ST56**. Този комплекс отговаряше на филотип B1. Изолатите преобладаваха в болниците (7%), отколкото при здравите индивиди (3%). По литературни данни B1 филотипа се асоциира по-скоро с колонизация, отколкото с причиняване на заболявания, което е в противоречие с получените от нас данни. Бяха установени в болниците във Варна (n=5) и Пловдив (n=2), а изолатите при здравите индивиди бяха от МЦ"Екзакта Медика"- Плевен (n=1), МДЛ"Медирс"- София (n=1), МДЛ"Лора"- София (n=1).

**ERIC тип K** беше представен от MLST типа **ST69** и филотип D. Той беше представен от 5 изолата, 2 от болницата във Варна, 2 от здрави носители в Плевен и 1 от здрав индивид в Бургас. При ST69 преобладаващ ензим беше плазмидния AmpC - DNA-1. Този клон е открит и в проучване в болници в Испания и Франция (Flament-Simon SC et al., 2020), като също е асоцииран с филотип D.

**ERIC тип M** беше представен от **ST394**, принадлежащ към филогрупа D, като всички представители на този клон бяха изолирани от здрави носители от Бургас и носеха

CTX-M-15 ензимите. В проучване в Пакистан, ST394 е преобладаващ, като е съдържал много ентероагрегативни гени характерни за диарогенните *E. coli* и алела за fimH30, свързан преди това с успеха на ST131 (Zahra R et al., 2018).

**ERIC тип H** беше представен от MLST тип **ST1196**, свързан с филогрупа B1 и установен основно в хоспитализирани пациенти от болниците във Варна и Пловдив. Само един изолат беше от здрав индивид от София. Ензимите от този ST тип бяха от CTX-M 1-ва група и един плазмиден AmpC продуцент - DHA-1. Този клон е установен и в проучване в Мианмар, но там е бил продуцент на метало-бета-лактамазата NDM-5 (Aung MS et al., 2018)

На **ERIC типа W** отговаряха 4 изолата от **ST405** MLST тип, който също е доказан като често срещан тип в други проучвания (Brisse et al., 2012; Naseer et al., 2012; Peirano et al., 2012; Izdebski et al., 2013; Peirano and Pitout, 2019). И четирите изолата бяха продуценти на CTX-M-15, като 3 от тях бяха изолирани в болници във Варна и София, а само един от здрав носител в София. Този ST тип се доказва в България като носител на NDM-1 ензим и причинител на епидемичен взрив (Poirel L et al., 2014).

Клоналният комплекс **ST648** също представлява интерес. Той е изолиран в различни проучвания при клинични изолати (Schaufler K et al., 2019; Peirano G et al., 2019). В настоящото проучване този клонален комплекс е представен от **MLST тип 1495** от два изолата от Варна и тип **ST648** от изолат от здрав носител от Бургас. Антимикробната резистентност, идентифицирана в ST648, включва резистентност към флуорохинолони, цефалоспорини от трето поколение и други антибиотици (Johnson JR et al., 2017). Мобилните генетични елементи допринесоха за скорошното му разпространение, което вероятно се дължи не само на пренасянето на гени за резистентност, но и на плазмиди, носещи разширен спектър на бета-лактамаза (ESBL), наскоро се свързват с повишен потенциал за вирулентност в щамове *E. coli* ST131 и ST648 (McNally A et al., 2016; Schaufler K et al., 2016).

Няколко публикации съобщават за честата поява на щамове ST131 и ST648, произвеждащи ESBL, в популации от диви птици и домашни птици, вероятно насочващи към повишена способност за колонизиране на ESBL *E. coli* в червата на птиците (Guenther S et al., 2012; Hasan B et al., 2015; Mora A et al., 2010).

От важно значение е и **ERIC типа I**, представен от **ST73** (n=3), филогрупа B2, от здрави носители от Плевен, Бургас и София и продуциращ CTX-M-15 ензима. Той се свързва с пандемично разпространение на ExPEC *E. coli* клонална група O6-B2-ST73. Открит е, както при хора, така и при птици (Cunha MPV et al., 2017; Riley LW et al., 2014). Бил е един от основните ST типове и в проучването в болниците в Испания и Франция (Flament-Simon SC et al., 2020).

**ERIC типа Z** (n=3) е представен от MLST типа **ST88**, филогрупа A, разпространен в болницата в Пловдив и продуцент на CTX-M ензими от 1-ва група. Той е бил разпространен в болница в Испания (Flament-Simon SC et al., 2020), също така е бил доказан и в проучване в Нидерландия за 2014-2016г (van de Bunt G et al., 2019).

### 5.10.3 *Enterobacter spp.*

ERIC анализът показва наличието на 16 ERIC типа и съответно 10 MLST типа. **Табл 22** показва разпределението на MLST и ERIC типовете според центъра, от който са изолирани

**Таблица 22** Разпределение на ERIC, MLST типовете, вида на бета-лактамазите, проученото лечебно заведение, при проучените *Enterobacter spp*

ERIC тип Брой	Вид	MLST тип	Бета- лактамаза(брой)	Проучен център (брой)
A n=5 A' n=2	<i>E steigerwaltii</i>	90	CTX-M-15 (6), AmpC (1)	<b>VAR</b> (4), <b>ПГ</b> (2), <b>Alx</b> (1)
V' n=3	<i>E hoffmanii</i>	128	AmpC (3)	<b>PD</b> (2), <b>BS</b> (1)
B n=2	<i>E hoffmanii</i>	118	AmpC (2)	<b>PNa</b> (2)
Uni n=10 (7+3 нетипабилни)	<i>E asburiae</i>	24	AmpC (1)	<b>MD</b> (1)
	<i>E hoffmanii</i>	104	AmpC (1)	<b>PNb</b> (1)
	<i>E steigerwaltii</i>	124	AmpC (1)	<b>PNa</b> (1)
	<i>E xiangfangensis</i>	148	AmpC (1)	<b>Alx</b> (1)
	<i>E xiangfangensis</i>	200	CTX-M-3 (1)	<b>Alx</b> (1)
	<i>E hoffmanii</i>	286	CTX-M-15 (1)	<b>VAR</b> (1)
	<i>E steigerwaltii</i>	1116	AmpC (1)	<b>VAR</b> (1)
	<i>E steigerwaltii</i>	ND	AmpC (1)	<b>PNb</b> (1)
	<i>E kobei</i>	ND	AmpC (1)	<b>PNb</b> (1)
	<i>E. soli</i>	нетип.	CTX-M-14 (1)	<b>PNa</b> (1)
W n=2	<i>E. asburiae</i>	нетип.	AmpC (2)	<b>LR</b> (2)

Легенда: *E hoffmanii*= *E. hormaechei* spp. *hoffmanii*  
*E steigerwaltii*= *E. hormaechei* spp. *steigerwaltii*,  
*E xiangfangensis*= *E. hormaechei* spp. *xiangfangensis*

С **bold** са означени лечебните заведения, от които са проучени хоспитализирани пациенти, underline лечебните заведения, от които са проучени здрави хора.

Използвани съкращения: VAR=МБАЛ"Света Марина" Варна, PNB=УМБАЛ д-р Г.

Странски-Плевен, PNA=МЦ"Екзакта Медика"- Плевен, PD=УМБАЛ"Св.Георги"-Пловдив, BS=МДЛ"Лина"- Бургас, Alx=УМБАЛ"Александровска"- София, PG=II-ра МБАЛ-София, PIR=УМБАЛСМ"Н.И. Пирогов", MD=МДЛ"Медирс"- София, Tor=МЦ"Торакс"- София, LR=МДЛ"Лора"- София

**MLST типа ST90** (n = 7), при *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* изолатите, беше най-често срещан ST в нашата колекция. В настоящото проучване той беше доказан само сред хоспитализирани пациенти в болници в София и Варна и беше продуцент главно на CTX-M-15 ензима. MLST анализът на *Enterobacter* видовете се прави за първи път в България. В световен мащаб също така са сравнително малко съобщенията за разпространение на отделните клонове.

MLST типа ST90 се доказва в много страни и се разделя на 3 подгрупи: ST90A, ST90B и ST90C (Peraino G et al., 2018). Той е доказан и като преносител на различни карбапенемази (Peraino G et al., 2018). ST90C е продуцирал *bla<sub>VIM-1</sub>* (n = 7) в проучване в Гърция, на IMP-4 в Австралия, на KPC-2 в Канада и NDM-1 в Румъния. ST90B е бил доказан в Европа - Обединеното кралство и в Португалия. Подгрупа А е доказана също в Обединеното кралство (Peraino G et al., 2018). Клонът ST90 е преобладаващ в проучване в Англия като продуцент на IMP-4 (Roberts LW et al., 2020). Проучване и в Полша доказва широкото му разпространение (Izdebski R et al., 2018).

Следващия по честота ST тип в настоящото проучване е **ST128** *E. hormaechei* spp. *hoffmanii*, който доказахме при хоспитализирани в Пловдив и при здрав носител от Бургас. Този ST тип е бил доказан в единичен случай при пациентка от болница в Китай, като изолата е бил ко-продуцент на карбапенемазите NDM-1 и KPC-2 (Li X et al., 2018).

Интересен представител, който открихме беше *E. hormaechei* spp. *xiangfangensis* от MLST типа **ST200**. Той беше от пациент от "Александровска" болница и беше продуцент на CTX-M-3 ензима. В болници в Мианмар този ST тип е бил открит в 16 изолата *E.*

*hormaechei* spp. *xiangfangensis*, и те са били устойчиви на аминокликозиди и кодиращи 16S rRNA метилази: ArmA, RtmC и RtmE, продуциращи метало-бета-лактамазите NDM-1 и NDM-4. Тези изолати са били клонално разпространени в цялата страна (Oshiro S et al., 2020). Нашият изолат също беше резистентен на всички аминокликозиди.

За останалите ST типове няма литературни данни.

Изолатите от *C. freundii complex*, *M. morgani* и *H. alvei* показаха разнообразен спектър от ERIC типове, като не открихме съвпадение между никой от тях.

Ако се разгледат филогрупите поотделно представителите на вирулентните групи B2 и D бяха 38% и 16% съответно, докато представителите на B1 и A (асоциират се колонизация) бяха 26% и 18%.

## **Заклучение**

При изследваните 346 изолата ентеробактерии беше установен широк клонален спектър. При изолатите *Klebsiella* spp бяха идентифицирани 30 ERIC типа с от 1 до 13 представителя. Всички изолати *K. michiganensis* имаха еднакъв ERIC тип. Всички седем *K. oxytoca* имаха също уникален ERIC тип. Анализът на MLST типовете при изолатите *K. pneumoniae* показва, че спектъра на MLST типовете е голям, като осем MLST типа (ST353, ST11, ST37, ST1198, ST280, ST34, ST15, ST1569) имаха  $\geq 3$  представителя и обхващаха 54 от изолатите (73%). NDM-1 продуцентите принадлежаха на ST11 клона, а KPC-2 на ST258. DHA-1 продуцента принадлежеше на същия клон. И двата клона се доказват в България като продуценти на карбапенемази при клинични изолати (Markovska R et al, 2019). CTX-M-15 продуцентите принадлежаха на ST1198, ST280, ST34, ST15 и единични изолати от ST17, ST253, ST16, ST14, ST1563 клоновете. CTX-M-3 продуцентите принадлежаха основно на ST353, ST37 и единични изолати ST1569, ST20, ST2449. От тях ST15, ST16, ST37 са описвани в България при клинични изолати (Markovska R et al, 2017). ST11, ST15, ST258 са високоепидемични интернационални клонове, носещи ESBL/карбапенемази и представляващи голям терапевтичен проблем (Peirano G& Pitout J). Резултатите показват предимно клоналното разпространение при карбапенемаза продуцентите.

При изолатите *E. coli* бяха идентифицирани 83 ERIC типа, от които 54 изолата имаха уникален ERIC тип, докато останалите 29 ERIC типа, обхващащи 159 изолата (75%) имаха от 2 до 61 представителя и бяха 75% от изолатите. Преобладаващите MLST

типове бяха ST131, ST38, CC10 (ST10, ST34, ST4238, ST4981), CC155 (ST56, ST155), ST69, ST1196, ST394, ST405, ST2797, ST73, ST88 ( $\geq 3$  представителя) – обхващащи 141 изолата (66%). ST131, ERIC тип А, А1-А5 беше 29% от *E. coli* изолатите и се асоциираше предимно с хоспитализирани болни и продуценти на СТХ-М-15, СТХ-М-27 и в по-малка степен на СТХ-М-3 и СТХ-М-14 ензими. Те бяха изолирани от всички проучени центрове. От ST131 изолатите 42 принадлежаха на високо вирулентния и пандемичен клон O25B2ST131. Към този клон принадлежеше и единствения *E. coli*, продуцент на KPC-2 ензим.

Втори по честота бяха представителите на ST38 комплекса. Те бяха свързани предимно с продукция на ензимите от СТХ-М-9 групата (СТХ-М-14/СТХ-М-27) и DHA-1. С продукция на СТХ-М-15 ензими се свързват още представителите на CC10, ST394, ST405, CC155 клоновете. СТХ-М-3 се произвежда от изолати принадлежащи на ST131, CC10, ST155, ST1196, CC1485, ST4981, ST88. DHA-1 ензимите се продуцираха от ST38, ST69, ST7670. Представителите на клонален комплекс 10, ST394, ST1198, ST73 се изолираха предимно от здрави индивиди, докато при ST1196, ST88 от хоспитализирани.

ERIC анализът при *Enterobacter spp.*, показва наличието на 16 ERIC и 10 MLST типа. Преобладаваше ST90 клона (7/24), който се асоциираше с продукция на СТХ-М-15 ензими и беше доказан само сред хоспитализирани пациенти.

Широкият спектър на клонове асоцииран и с ESBL и AmpC продукцията показва, че не само клоналното разпространение, но и хоризонталния плазмиден или на различни мобилни елементи трансфер, играе съществено значение при разпространението на продуцентите на тези ензими.

## 6. ИЗВОДИ:

1. Беше проучено чревното носителство на ESBL, AmpC и карбапенемаза продуциращи представители на разред *Enterobacterales* при здрави индивиди (n=717) и хоспитализирани пациенти (n=580) от 7 лечебни заведения и 5 диагностични центрове в 5 града в България за периода 2017-2018г.
2. Беше установен висок процент резистентни на цефалоспорин трета генерация изолати - 346 (27% от всички изследвани). Преобладаваха *E. coli* (61.5%), следвани от *Klebsiella spp.* (24.2%), *Enterobacter spp.* (7%), *Citrobacter spp.* (5%), *M. morganii* (1%), *H.alvei* (1%).
3. Устойчивостта на проучваните изолати беше много висока към amoxicillin/clavulanic acid и seferime - 92%, а също и към хинолони и piperacillin/tazobactam - около 60% и към аминогликозиди 40% - 58%. Четири процента от изолатите бяха резистентни на карбапенеми. Изолатите *K. pneumoniae* бяха с много по-високи нива на устойчивост по отношение на повечето групи антимикробни средства от изолатите *E. coli*. Един от тях беше панрезистентен. Изолатите от хоспитализирани болни показаха много по-висока устойчивост в сравнение с тези от здрави индивиди.
4. Процентът на ESBL продуцентите при всички изследвани беше сравнително висок -20.7%, като преобладаваха *E. coli* - 70.2% , *Klebsiella spp* 24.5% и единични изолати *Enterobacter spp* 3.3%, *C. freundii complex* 3.3%, *M. morganii* 0.3%. Процентът на плазмидните продуценти на AmpC ензими беше – 1.9%, като преобладаваха *E. coli*. Карбапенемаза продуцентите бяха - 1%, предимно *K. pneumoniae* (n=13) и 1 *E. coli*.
5. Анализът на разпространението показва, че ESBL продуцентите в България преобладават при хоспитализирани болни 28% срещу 14% при здравите,  $p < 0.0001$  и при децата 24% срещу 18%,  $p = 0.005$ . Карбапенемаза продуцентите бяха изолирани от хоспитализирани възрастни. При AmpC продуцентите не се наблюдаваха статистически значими различия здрави/хоспитализирани и деца/възрастни.

6. При ESBP продуцентите преобладаваха CTX-M-15 - 39%, следвани от CTX-M-3 - 20 %, CTX-M-27 – 8% и CTX-M-14 – 6%. CTX-M-1, CTX-M-9 и SHV-12 бяха установени при единични изолати. Плазмидните AmpC ензими, продуцирани самотоятелно, включваха DHA-1, 6% и CMY-2, 1%. При карбапенемаза продуцентите преобладаваха 11 изолата NDM-1, като 9 от тях ко-продуцираха CTX-M-15 и CMY-4. Три изолата произвеждаха KPC-2.
7. Епидемиологичното типизиране показва, че спектъра на MLST типовете при *Klebsiella spp* е голям (26), като осем MLST типа (ST353, ST11, ST37, ST1198, ST280, ST34, ST15, ST1569) имаха  $\geq 3$  представителя и обхващаха 73% от изолатите. Всички изолати *K. michiganensis* имаха еднакъв ERIC тип. Всички седем *K. oxytoca* имаха уникални ERIC типове. NDM-1 продуцентите принадлежаха на ST11 клона, а KPC-2 на ST258. DHA-1 продуцентът принадлежеше на ST11 клона. CTX-M-15 продуцентите принадлежаха предимно на ST1198, ST280, ST34 и ST15 клоновете. CTX-M-3 продуцентите принадлежаха основно на ST353 и ST37.
8. При изолатите *E. coli* бяха идентифицирани 83 ERIC типа, от които 54 изолата имаха уникални ERIC типове, докато останалите 29 ERIC типа, имаха от 2 до 61 представителя.
  - a. Преобладаващите MLST типове бяха ST131, ST38, CC10, CC155, ST69, ST1196, ST394, ST405, ST2797, ST73, ST88 – обхващащи 66% от изолатите .
  - b. ST131 беше доказан в 29% от изолатите и се асоциираше предимно с хоспитализирани болни и продуценти на CTX-M-15, CTX-M-27 и в по-малка степен на CTX-M-3 и CTX-M-14 ензими. Те бяха изолирани от всички проучени центрове. Към този клон принадлежеше и единствения *E. coli*, продуцент на KPC-2 ензим.
  - c. С продукция на CTX-M-15 ензими се свързваха още представителите на CC10, ST394, ST405, CC155 клоновете. CTX-M-3 се произвеждаше и от изолати принадлежащи на CC10, ST155, ST1196, CC1485, ST4981, ST88. DHA-1 ензимите се продуцираха от ST38, ST69, ST7670, докато CTX-M-27/CTX-M-14 от представителите на ST38 комплекса. Представителите на клонален комплекс 10, ST394, ST1198, ST73 се изолираха предимно от здрави индивиди, докато при

ST1196, ST88 от хоспитализирани. ДНА-1 продуцентите бяха от ST38 и ST69 клоновете.

9. ERIC анализът при *Enterobacter spp.* показва наличието на 16 ERIC и 10 MLST типа. Преобладаваше ST90 клон (7/24), който се асоциираше с продукция на CTX-M-15 ензими и беше доказан само сред хоспитализирани пациенти.
10. Широкият спектър на клонове асоцииран и с ESBL и AmpC продукцията показва, че не само клоналното разпространение, но и хоризонталния плазмиден или на различни мобилни елементи трансфер, играе съществено значение при разпространението на продуцентите на тези ензими

## 7. ПРИНОСИ

### Приноси с оригинален характер

1. За първи път в България беше направено мащабно проучване на чревното носителство на ESBL/AmpC/карбапенемаза продуценти. Бяха обхванати хоспитализирани пациенти от 7 болници в София, Варна, Плевен и Пловдив, както и здрави индивиди от София, Плевен и Бургас. Беше определена и анализирана чувствителността на изолатите.
2. Доказа се, че чревното носителство е един от основните резервоари за пренос на продуценти на широкоспектърни бета-лактамази, като се установи сравнително висок за Европа процент на носителство сред всички изследвани индивиди (20.7%). Беше проучен спектъра на ESBL, AmpC и карбапенемаза продуцентите.
3. CTX-M-27 ензима беше доказан за първи път в български изолати *E. coli*, преобладаващо от клона ST131.
4. Беше доказана чревна колонизация с карбапенемаза продуценти при хоспитализирани възрастни, предимно NDM-1 произвеждащи ST11 *K. pneumoniae* и KPC-2 продуценти от ST258 *K. pneumoniae* клона.
5. Доказа се по-високото ниво на разпространение на носителство на ESBL продуценти при хоспитализираните спрямо здравите индивиди и при деца спрямо възрастните.
6. Беше направен детайлен анализ на MLST типовете на ESBL/AmpC/карбапенемаза продуциращите *E. coli* и *K. pneumoniae* фекални изолати. CTX-M-15 продуциращите *K. pneumoniae* принадлежаха предимно на ST1198, ST280, ST34 и ST15 клоновете. CTX-M-3 продуцентите принадлежаха основно на ST353 и ST37.
7. Високо вирулентният *E. coli* ST131 беше доказан в 29% предимно при хоспитализирани болни и продуцираните ензими бяха CTX-M-15, CTX-M-27 и в по-малка степен на CTX-M-3 и CTX-M-14 ензими.
8. За първи път в България беше определен MLST типа при *Enterobacter spp.*, като се установи преобладаване на ST90 типа.

### **Приноси с потвърдителен характер**

9. Беше потвърдено широкото *разпространение* на CTX-M-15 продуцентите.
10. Беше потвърдена **асоциацията** на NDM-1 и KPC-2 със съответно ST11 и ST258 клоновете
11. Беше потвърдено, че чревните ESBL продуценти са предимно *E. coli* и в по-рядко *K. pneumoniae*.

### **Приноси с приложен характер**

12. Доказа се висока чувствителност (97%) за откриване на ESBL продуценти на дифузионно-дисквия синергичен метод, извършен с по-ниска концентрация на дисковете и разстояние между тях от 20 мм.
13. Доказа се, че *hsp60* секвенирането е подходящ метод както за доказване на подвидовата идентификация на *Enterobacter spp*, така и за разграничаване на *K.michiganensis* от *K.oxytoca*.
14. MALDI-TOF не разграничава успешно *E. hormaechei* от *E. asburiae*.

## 8. Списък с публикации, свързани с дисертационния труд:

1. **П. Станкова**, Р. Марковска, Л. Боянова, И. Митов. Чревният тракт – резервоар на широкоспектърни бета-лактамаза и карбапенемаза продуциращи ентеробактерии, Медицински преглед, 56, 2020, № 3
2. **П. Станкова**, Р. Марковска, Л. Боянова, И. Митов. Антибиотична чувствителност на чревни изолати, суспектни за продукция на ESBL/карбапенемаза от разред *Enterobacterales*, изолирани от хоспитализирани пациенти и здрави индивиди за периода 2017-2018, Съвременна медицина 64(1) 2020
3. Markovska R, Keuleyan E, **Stankova P**, Boyanova L, Stoeva T, Murjeva M, Sredkova M, Ivanova D, Lazarova G, Nedelcheva G, I Mitov. Antimicrobial susceptibility of clinically significant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* resistant to cephalosporins third generation collected from patients in Bulgarian hospitals. Comptes rendus de l'academie bulgare des sciences. 2018; 71(8):1130-38 IF<sub>2018</sub>-0,321

## 9. Участия в симпозиуми и конгреси, свързани с дисертационния труд:

1. **Stankova P**, Markovska R, Stoeva T, Ivanova D, Dimitrova D, Bozhkova M, Nedelcheva G, Boyanova L, Mitov I. Fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among hospitalized patients in two hospitals in Varna and Sofia 14<sup>th</sup> Congress of Microbiologists in Bulgaria with international participation, Hisarya October 10<sup>th</sup>-13<sup>th</sup>, 2018
2. **П. Станкова**. Съвременни аспекти при чревното носителство на широкоспектърни бета-лактамаза и карбапенемаза продуциращи ентеробактерии Симпозиум "Акад. Чудомир Начев", 2018 БАН
3. Markovska R, **Stankova P**, Stoeva T, Ivanova D, Dimitrova D, Pencheva D, Kaneva R, Mitov I Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Bulgarian hospitals 29<sup>th</sup> ECCMID, Amsterdam, Netherlands 13-16 April 2019

4. R. Markovska, T. Stoeva, **P. Stankova**, L. Boyanova, E. Keuleyan, M. Sredkova, M. Murjeva, G. Lazarova, D. Ivanova, D. Dimitrova, K. Mihova, R. Kaneva, I. Mitov. Mechanisms of beta-lactam resistance among third-generation cephalosporin resistant isolates from family *Enterobacteriaceae* different from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria 10<sup>th</sup> Balcan Congress of Microbiology, Sofia, November 16<sup>th</sup> - 18<sup>th</sup>, 2017

## **10. Участия в проекти, свързани с дисертационния труд:**

**Участник в проект** по Договор № Д-232/2017 г. от конкурс „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения - 2017” на тема: „Чревно носителство на широкоспектърни бета-лактамаза и/или карбапенемаза-продуциращи *Enterobacteriaceae* при хоспитализирани, амбулаторни пациенти и здрави хора - деца и възрастни”.

## 11. Литература:

1. **Иванова Д**, Р.Марковска, Б.Маркова, М.Лесева, И.Митов. Молекулярно-генетично типирание на клинично значими щамове *E.coli* и *K.pneumoniae*, продуциращи широкоспектърни бета-лактамази (ESBL) в три софийски болници. 8ми Нац. Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите. Пловдив, 2010. 22-25.04.2010 г. стр 17
2. **Abdallah HM**, Alnaiemi N, Reuland EA, Wintermans BB, Koek A, Abdelwahab AM, Samy A, Abdelsalam KW, Vandembroucke-Grauls CMJE. Fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Egyptian patients with community-onset gastrointestinal complaints: a hospital -based cross-sectional study. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Jun 13;6:62
3. **Abdul Rahman EM**, El-Sherif RH. High rates of intestinal colonization with extended-spectrum lactamase-producing Enterobacteriaceae among healthy individuals. *J Investig Med*. 2011 Dec;59(8):1284-6. doi: 10.2130/JIM.0b013e318238748e.
4. **Abraham S**, Chapman TA, Zhang R, Chin J, Mabbett AN, Totsika M, et al. Molecular characterization of Escherichia coli strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1027-30.
5. **Adeolu M** et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. (2016)
6. **Aires-de-Sousa M**, Lopes E, Gonçalves ML, Pereira AL, Machado E Costa A, de Lencastre H, Poirel L. Intestinal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae at admission in a Portuguese hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Dec 24. doi: 10.1007/s10096-019-03798-3.
7. **Akbari M**, Bakhshi B, Peerayeh SN. Particular distribution of Enterobacter cloacae strains isolated from urinary tract infection within clonal complexes. *Iran. Biomed. J*. Vol. 20 (1), January 2016, 49-55
8. **Akova M**, Daikos GL, Tzouveleki L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(5):439-48.
9. **Albiger B**, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL; European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill*. 2015 Nov 12;20(45).

10. **Alouache S**, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C, Bakour R. Antibiotic resistance and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes Environ.* 2012;27(1):80-6. Epub 2011 Nov 16.
11. **Amaya E**, Reyes D, Paniagua M, Calderón S, Rashid MU, Colque P, Kühn I, Möllby R, Weintraub A, Nord CE. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in León, Nicaragua. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Sep;18(9):E347-54. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03930.x. Epub 2012 Jun 28.
12. **Aminshahidi M**, Amir Arastehfar, Gholamreza Pouladfar, Esmayil Arman, Fereshteh Fani, Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* with High Rate of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production: Two Predominant Etiological Agents of Acute Diarrhea in Shiraz, Iran *Microb Drug Resist.* 2017 Dec 1; 23(8): 1037–1044. Published online 2017 Dec 1. doi: 10.1089/mdr.2017.0204
13. **Anastay M**, Lagier E, Blanc V, Chardon H. Épidémiologie des bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries dans un hôpital du sud de la France, 1999-2007 [Epidemiology of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) Enterobacteriaceae in a General Hospital, South of France, 1999-2007]. *Pathol Biol (Paris).* 2013;61(2):38-43. doi:10.1016/j.patbio.2012.03.001
14. **Arens S**, Verbist L. Differentiation and susceptibility of *Citrobacter* isolates from patients in a university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 1997;3(1):53-57. doi:10.1111/j.1469-0691.1997.tb00251.x
15. **Arpin C**, Coulange L, Dubois V, et al. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains in various types of private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3440-3444. doi:10.1128/AAC.01431-06
16. **Aslantaş Ö**, Yilmaz EŞ ,Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC  $\beta$ -lactamase (pAmpC) producing *Escherichia coli* in dogs *J Vet Med Sci.* 2017 Jun 16;79(6):1024-1030.
17. **Aung MS**, San N, Maw WW, et al. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenemase Genes in Clinical Isolates of *Escherichia coli* in Myanmar: Dominance of bla<sub>NDM-5</sub> and Emergence of bla<sub>OXA-181</sub>. *Microb Drug Resist.* 2018;24(9):1333-1344. doi:10.1089/mdr.2017.0387
18. **Bailey JK**, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol.* 2010 Sep;48(9):3455–6.
19. **Banerjee R**, Johnston B, Lohse C, Porter SB, Clabots C, Johnson JR. *Escherichia coli* sequence type 131 is a dominant, antimicrobial-resistant clonal group associated with healthcare and elderly hosts. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(4):361-369. doi:10.1086/669865
20. **Banerjee R**, Strahilevitz J, Johnson JR, Nagwekar PP, Schora DM, Shevrin I, Du H, Peterson LR, Robicsek A Predictors and molecular epidemiology of community-onset extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in a Midwestern

community. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013 Sep;34(9):947-53. doi: 10.1086/671725. Epub 2013 Jul 17.

21. **Baraniak A**, Izdebski R, Fiett J, Sadowy E, Adler A, Kazma M, Salomon J, Lawrence C, Rossini A, Salvia A, Vidal Samsó J, Fierro J, Paul M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, Lammens C, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Carmeli Y, Gniadkowski M; MOSAR WP2 and WP5 Study Groups. Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Apr;57(4):1992-7. doi: 10.1128/AAC.02571-12. Epub 2013 Feb 12.
22. **Baraniak A**, Izdebski, R., Fiett, J., Gawryszewska, I., Bojarska, K., Herda, M., et al., 2016. NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012-14: inter-regional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 85–91.
23. **Baraniak A**, Izdebski, R., Zabicka, D., Bojarska, K., Górska, S., Literacka, E., Fiett, J., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., 2017. KPC-PL2 Study Group. Multiregional dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258/ST512 genotypes in Poland, 2010-14. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 1610–1616.
24. **Baraniak A**, Fiett, J., Sulikowska, A., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., 2002. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 151–159
25. **Bartoloni A**, Pallecchi L, Riccobono E, Mantella A, Magnelli D, Di Maggio T, Villagran AL, Lara Y, Saavedra C, Strohmeyer M, Bartalesi F, Trigoso C, Rossolini GM. 2013. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. *Clin. Microbiol. Infect.* 19:356–361
26. **Bauernfeind A**, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 1990;18(5):294-298. doi:10.1007/BF01647010
27. **Bauernfeind A**, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. 1999. A novel type of AmpC  $\beta$ -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1924-31.
28. **Ben Sallem R**, Ben Slama K, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, Sáenz Y, Ruiz-Larrea F, Boudabous A, Torres C. Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Jul;31(7):1511-6. doi: 10.1007/s10096-011-1471-z. Epub 2011 Nov 8
29. **Ben-David D**, Masarwa S, Navon-Venezia S, Mishali H, Fridental I, Rubinovitch B, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in post-acute-care facilities in Israel. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America.* 2011;32(9):845–53.

30. **Bevan ER**, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017 May 25 ahead of print.
31. **Bogaerts P**, Huang TD, Bouchahrouf W et al. Characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from diseased companion animals in Europe. *Microb Drug Resist* 2015; 21:643–50.
32. **Bok E**, Mazurek J, Myc A, Stosik M, Wojciech M, Baldy-Chudzik K, Comparison of Commensal *Escherichia coli* Isolates from Adults and Young Children in Lubuskie Province, Poland: Virulence Potential, Phylogeny and Antimicrobial Resistance, *Int J Environ Res Public Health.* 2018 Apr; 15(4): 617. Published online 2018 Mar 28. doi: 10.3390/ijerph15040617.
33. **Boye K**, & Hansen, D. S. (2003). Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. *International Journal of Medical Microbiology*,2003; 292(7-8), 495-503.
34. **Bradford PA**. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 2001 Oct;14(4):933-51.
35. **Brady C**, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst Appl Microbiol.* 2013 Jul;36(5):309-19. doi: 10.1016/j.syapm.2013.03.005.
36. **Bratu S**, D.Landman, M.Alam, E. Tolentino, and J. Quale, 2005. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Feb; 49(2): 776–778.
37. **Bréchet C**, Plantin J, Sauget M, Thouverez M, Talon D, Cholley P, Guyeux C, Hocquet D, Bertrand X.Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment.*Clin Infect Dis.* 2014 Jun;58(12):1658-65. doi: 10.1093/cid/ciu190. Epub 2014 May 1.
38. **Brenner DJ**, Grimont PA, Steigerwalt AG, Fanning GR, Ageron E, Riddle CF. Classification of citrobacteria by DNA hybridization: designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter*

- werkmanii sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.* 1993;43(4):645-658. doi:10.1099/00207713-43-4-645
39. **Breurec S**, Guessennd N, Timinouni M, Le TA, Cao V, Ngandjio A, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(4):349–55
  40. **Brigante G**, Luzzaro F, Perilli M, et al. Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(2):157-162. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.013
  41. **Brisse S**, Diancourt L, Laouénan C, et al. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2974-2981. doi:10.1128/JCM.00919-12
  42. **Brisse S**, Passet, V., & Grimont, P. (2014). Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp.nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp.quasipneumoniae subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. similipneumoniae subsp.nov., and demonstration that . *Int J of Systematic and Evolutionary Microbiology*,2014; 64, 3146–3152
  43. **Brolund A**, MscPharm . Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective *Infect Ecol Epidemiol.* 2014 Oct 1;4.
  44. **Brolund A**, Sandegren L Characterization of ESBL disseminating plasmids. *Infect Dis (Lond).* 2016;48(1):18-25. doi: 10.3109/23744235.2015.1062536. Epub 2015 Jul 1.
  45. **Bush K**, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 969–76.
  46. **Bush K**, Jacoby GA The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. Doi Y et al. *J Travel Med.* (2017) Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:969–76.
  47. **Cai JC**, Zhang R, Hu YY, et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:1146–1152.
  48. **Can F**, Azap OK, Seref C, et al. Emerging *Escherichia coli* O25b/ST131 clone predicts treatment failure in urinary tract infections. *Clin Infect Dis.* 2015;60:523–527.
  49. **Canton R**, A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero<sup>1</sup>, and T. M. Coque<sup>1,2</sup>. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe, 2014
  50. **Cantón R**, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M- Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* 2012 Apr 2;3:110.
  51. **Carlet J**. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. 2012 *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 1:39. doi:10.1186/2047-2994-1-39

52. **Castanheira M**, Deshpande LM, Woosley LN, Serio AW, Krause KM, Flamm RK. Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including Enterobacteriaceae molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(12):3346-3354. doi:10.1093/jac/dky344
53. **Chagas TP**, Seki LM, Cury JC, Oliveira JA, Dávila AM, Silva DM, Asensi MD. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol.* 2011 Sep;111(3):572-81. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05072.x. Epub 2011 Jul 4.
54. **Chen LH**, Wilson ME. The globalization of healthcare: implications of medical tourism for the infectious disease clinician. *Clin Infect Dis* 2013; 57:1752–9.
55. **Chen X**, Zhao X, Che J, et al. Detection and dissemination of the colistin resistance gene, *mcr-1*, from isolates and faecal samples in China. *J Med Microbiol.* 2017;66(2):119-125. doi:10.1099/jmm.0.000425
56. **Chong Y**, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol.* 2018;61:185-188. doi:10.1016/j.meegid.2018.04.005
57. **Clermont O**, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):58-65. doi:10.1111/1758-2229.12019
58. **Clermont O**, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):58-65. doi:10.1111/1758-2229.12019  
emother. 56, 618–622.
59. **Clermont O**, Dhanji H, Upton M, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(2):274-277. doi:10.1093/jac/dkp194
60. **Cooper VS**, Lenski RE. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature.* 2000;407(6805):736-739. doi:10.1038/35037572
61. **Coque T.M**, Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Canton, R., Nordmann, P., 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* 14,195–200.
62. **Croxen MA**, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jan;8(1):26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265. Review. Erratum in: *Nat Rev Microbiol.* 2013 Feb;11(2):141.
63. **Cunha MPV**, Saidenberg AB, Moreno AM, et al. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178970. Published 2017 Jun 8. doi:10.1371/journal.pone.0178970

64. **Dahmen S**, Haenni M, Châtre P, Madec JY. Characterization of blaCTX-M IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Dec;68(12):2797-801. doi: 10.1093/jac/dkt291. Epub 2013 Jul 12.
65. **Dale AP**, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *J Infect.* 2015;71(6):615-626. doi:10.1016/j.jinf.2015.09.009
66. **D'Andrea MM**, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013 Aug;303(6-7):305-17
67. **Davin-Regli A**, Lavigne JP, Pagès JM. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(4):e00002-19. Published 2019 Jul 17. doi:10.1128/CMR.00002-19
68. **Davin-Regli A**, Pagès JM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.* 2015 May 18;6:392. doi: 10.3389/fmicb.2015.00392.
69. **Day MJ**, Rodríguez I, van Essen-Zandbergen A, Dierikx C, Kadlec K, Schink AK, Wu G, Chattaway MA, DoNascimento V, Wain J, Helmuth R, Guerra B, Schwarz S, Threlfall J, Woodward MJ, Coldham N, Mevius D, Woodford N. Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2016 May;71(5):1178-82. doi: 10.1093/jac/dkv485. Epub 2016 Jan 23.
70. **De Florio L**, Riva E, Giona A, Dedej E, Fogolari M, Cella E, Spoto S, Lai A, Zehender G, Ciccozzi M, Angeletti S. MALDI-TOF MS Identification and Clustering Applied to *Enterobacter* Species in Nosocomial Setting. *Front Microbiol.* 2018 Aug 14;9:1885
71. **Dhanji H**, Murphy NM, Akhigbe C, Doumith M, Hope R, Livermore DM, Woodford N. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Mar;66(3):512-6. doi: 10.1093/jac/dkq472. Epub 2010 Dec 15.
72. **Dhanji H**, Khan, P., Cottell, J.L., Piddock, L.J., Zhang, J., Livermore, D.M., Woodford, N., 2012. Dissemination of pCT-like IncK plasmids harboring CTX-M-14 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase among clinical *Escherichia coli* isolates in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3376–3377.
73. **Diancourt L**, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4178-4182. doi:10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005
74. **Díaz-Agero Pérez C**, López-Fresneña N, Rincon Carlavilla AL, Hernandez Garcia M, Ruiz-Garbajosa P, Aranaz-Andrés JM, Maechler F, Gastmeier P, Bonten MJM, Canton R. Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: a prevalence survey in a Spanish University Hospital. *BMJ Open.* 2019 Mar 1;9(3):e024879. doi: 10.1136/bmjopen-2018-024879.

75. **Diene SM**, Merhej V, Henry M, et al. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new "killer bugs" are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol.* 2013;30(2):369-383. doi:10.1093/molbev/mss236
76. **Doi Y**, Adams-Haduch JM, Peleg AY, D'Agata EM. The role of horizontal gene transfer in the dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in an endemic setting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(1):34-38. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.020
77. **Doi Y**, Iovleva A, Bonomo RA The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med.* 2017 Apr 1;24(suppl\_1):S44-S51. doi: 10.1093/jtm/taw102. Review.
78. **Doi Y**, Park YS, Rivera JI, et al. Community-associated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis.* 2013;56(5):641-648. doi:10.1093/cid/cis942
79. **Dolejska M**, Frolkova P, Florek M et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:2784–90.
80. **Ebrahimi F**, Mózes J, Mészáros J, Juhász Á, Majoros L, Szarka K, Kardos G. Asymptomatic faecal carriage of ESBL producing enterobacteriaceae in Hungarian healthy individuals and in long-term care applicants: A shift towards CTX-M producers in the community. *Infect Dis (Lond).* 2016 Jul;48(7):557-9. 4
81. **ECDC.** (2014). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>.
82. **ECDC.** Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Surveillance report. 2018. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2018.pdf>
83. **Egea P**, López-Cerero L, Torres E, Gómez-Sánchez Mdel C, Serrano L, Navarro Sánchez-Ortiz MD, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *Int J Food Microbiol.* 2012 Oct 1;159(2):69-73. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.002. Epub 2012 Aug 9.
84. **Esteban-Cantos A**, Aracil B, Bautista V, Ortega A, Lara N, Saez D, et al. The Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* population is distinct and more clonal than the Carbapenem-susceptible population. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(4).
85. **Ewers C**, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, Fruth A, Beutlich J, Guerra B, Wieler LH, Guenther S. 2010. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:651–660.

86. **Fairfax MR**, Queenan AM, Lephart PR, Kaye KS, Dror M, Arnous N, Salimnia TT, Mitchell RA, Alangaden G, Salimnia H. Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Nov;71(3):325-6.
87. **Farrokh C**, Jordan K, Auvray F, et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol*. 2013;162(2):190-212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008
88. **Flament-Simon SC**, García V, Duprilot M, Mayer N, Alonso MP, García-Meniño I, Blanco JE, Blanco M, Nicolas-Chanoine MH, Blanco J. High Prevalence of ST131 Subclades C2-H30Rx and C1-M27 Among Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Human Extraintestinal Infections in Patients From Two Hospitals of Spain and France During 2015 Published online 2020 Mar24. doi: 10.3389/fcimb.2020.00125 *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10: 125.
89. **Flament-Simon SC**, Nicolas-Chanoine MH, García V, Duprilot M, Mayer N, Alonso MP, García-Meniño I, Blanco JE, Blanco M, Blanco J Clonal Structure, Virulence Factor-encoding Genes and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli*, Causing Urinary Tract Infections and Other Extraintestinal Infections in Humans in Spain and France during 2016 Published online 2020 Apr 4. doi: 10.3390/antibiotics9040161
90. **Francizek R**, Sobieszcańska B, Grabowski M, Mowszet K, Pytrus T Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from hospitalized and healthy children. *Folia Microbiol (Praha)*. 2003;48(2):243-7.
91. **Freeman JT**, McBride SJ, Heffernan H, Bathgate T, Pope C, et al. (2008) Community-onset genitourinary tract infection due to CTX-M-15-producing *Escherichia coli* among travelers to the Indian subcontinent in New Zealand. *Clin Infect Dis*. 47: 689-692.
92. **Freeman JT**, Sexton DJ, Anderson DJ. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in community hospitals throughout North Carolina: a harbinger of a wider problem in the United States?. *Clin Infect Dis*. 2009;49(2):e30-e32. doi:10.1086/600046
93. **G Catho & B Huttner**. Strategies for the eradication of extended-spectrum beta-lactamase or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae intestinal carriage, *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2019;Aug;17(8):557-569
94. **Garrido A**, Seral C, Gude MJ, et al. Characterization of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases in fecal colonizing patients in the hospital and community setting in Spain. *Microb Drug Resist*. 2014;20(4):301-304.
95. **Geser N**, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res*. 2012 Mar 7;8:21. doi: 10.1186/1746-6148-8-21.
96. **Geser N**, Stephan R, Korczak BM, Beutin L, Hächler H. Molecular identification of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase genes from Enterobacteriaceae isolated from healthy human carriers in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1609-12. doi: 10.1128/AAC.05539-11. Epub 2011 Dec 12.

97. **Ghafourian S**, Nourkhoda Sadeghifard, Sara Soheili, Zamberi Sekawi Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology *Curr Issues Mol Biol.* 2015;17:11-21.
98. **Ghebremedhin B**, Ibukun A, Odugbemi T, König W. Multidrug-resistant CTX-M-15 carrying *K. pneumoniae* isolates and their virulence in Nigeria *International Journal of Infectious Diseases* 21(S1):95 April 2014
99. **Girlich D**, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P High rate of faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a university hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Apr;20(4):350-4. doi: 10.1111/1469-0691.12325. Epub 2013 Aug 9..
100. **Giske C.G**, Fröding, I., Hasan, C.M., Turlej-Rogacka, A., Toleman, M., Livermore, D., Woodford, N., Walsh, T.R., 2012. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of bla<sub>NDM-1</sub> in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2735–2738.
101. **Guenther S**, Aschenbrenner K, Stamm I, Bethe A, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Batsajkhan N, Glupczynski Y, Wieler LH, Ewers C. Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. *PLoS One.* 2012;7(12):e53039. doi: 10.1371/journal.pone.0053039. Epub 2012 Dec 31.
102. **Guenther S**, Aschenbrenner K, Stamm I, Bethe A, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Batsajkhan N, Glupczynski Y, Wieler LH, Ewers C. 2012. Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. *PLoS One* 7:e53039. doi:10.1371/journal.pone.0053039.
103. **Halder AK**, Tronchet C, Akhter S, Bhuiya A, Johnston R, Luby SP. Observed hand cleanliness and other measures of handwashing behavior in rural Bangladesh. *BMC Public Health.* 2010 Sep 9;10:545. doi: 10.1186/1471-2458-10-545.
104. **Hamprecht A**, Rohde AM, Behnke M, Feihl S, Gastmeier P, Gebhardt F, Kern WV, Knobloch JK, Mischnik A, Obermann B, Querbach C, Peter S, Schneider C, Schröder W, Schwab F, Tacconelli E, Wiese-Posselt M, Wille T, Willmann M, Seifert H, Zweigner J; DZIF-ATHOS Study Group. Colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae on hospital admission: prevalence and risk factors. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Oct;71(10):2957-63. doi: 10.1093/jac/dkw216. Epub 2016 Jun 17.
105. **Harwood VJ**, Staley C, Badgley BD, Borges K, Korajkic A. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(1):1-40. doi:10.1111/1574-6976.12031
106. **Hasan B**, Olsen B, Alam A, Akter L, Melhus A. 2015. Dissemination of multidrug-resistant ESBL-producing *Escherichia coli* O25b-ST131 clone and role of

- house crow (*Corvus splendens*) foraging on hospital waste in Bangladesh. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2015.06.016.
107. **Haverkate MR**, Platteel TN, Fluit AC, Cohen Stuart JW, Leverstein-van Hall MA, Thijsen SFT, Scharringa J, Kloosterman RC, Bonten MJM, Bootsma MCJ. Quantifying within-household transmission of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Jan;23(1):46.e1-46.e7. doi: 10.1016/j.cmi.2016.08.021. Epub 2016 Sep 3.
  108. **Hazen T. H.** et al. Genomic diversity of EPEC associated with clinical presentations of differing severity. *Nat. Microbiol*. 1, 15014 (2016). Jan 18;1:15014. doi: 10.1038/nmicrobiol.2015.14.  
L., Partridge, S.R., Yang, X., Hou, J., Deng, Y., Yao, Q., Zeng, Z., Chen, Z., Liu, J.H., 2013. Complete nucleotide sequence of pHN7A8, an F33:A-B-type epidemic plasmid carrying blaCTX-M-65, fosA3 and rmtB from China. *J. Antimicrob. Chemother.* 68,46–50
  109. **Hazirolan G**, Mumcuoglu I, Altan G, Özmen BB, Aksu N, Karahan ZC. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and ampc beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in a turkish community. *Niger J Clin Pract*. 2018;21(1):81-86. doi:10.4103/njcp.njcp\_79\_17
  110. **Herindrainy P**, Randrianirina F, Ratovoson R, Ratsima Hariniana E, Buisson Y, Genel N, Decré D, Arlet G, Talarmin A, Richard V Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in community settings in Madagascar. *PLoS One*. 2011;6(7):e22738. doi: 10.1371/journal.pone.0022738. Epub 2011 Jul 29.
  111. **Hernández J**, Stedt J, Bonnedahl J, Molin Y, Drobni M, Calisto-Ulloa N, Gomez-Fuentes C, Astorga-España MS, González-Acuña D, Waldenström J, Blomqvist M, Olsen B. Human-associated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in the Antarctic. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Mar;78(6):2056-8. doi: 10.1128/AEM.07320-11. Epub 2012 Jan 13.
  112. **Hilty M.**, Betsch, B.Y., Bogli-Stuber, K., Heiniger, N., Stadler, M., Kuffer, M., Kronenberg, A., Rohrer, C., Aebi, S., Endimiani, A., Droz, S., Muhlemann, K., 2012. Transmission dynamics of extended-spectrum -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the tertiary care hospital and the household setting. *Clin. Infect. Dis.* 55, 967–975.
  113. **Hocquet D**, Muller A, Bertrand X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J Hosp Infect*. 2016 Aug;93(4):395-402. doi: 10.1016/j.jhin.2016.01.010. Epub 2016 Feb 1. Review.
  114. **Hoffmann H**, Roggenkamp A. Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Sep;69(9):5306-18
  115. **Hordijk J**, Schoormans A, Kwakernaak M, Duim B, Broens E, Dierikx C, Mevius D, Wagenaar JA. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -

- lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. *Front Microbiol.* 2013 Aug 16;4:242. doi: 10.3389/fmicb.2013.00242. eCollection 2013.
116. **Hu Y**, Matsui Y, W Riley L. Risk factors for fecal carriage of drug-resistant *Escherichia coli*: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020 Feb 11;9(1):31. doi: 10.1186/s13756-020-0691-3.
  117. **Huttner BD**, de Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine T, Zanichelli V, Kapel N, Bellanger A, Olearo F, Duval X, Armand-Lefevre L, Carmeli Y, Bonten M, Fantin B, Harbarth S; R-Gnosis WP3 study group. A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Jul;25(7):830-838
  118. **Izdebski R**, Baraniak A, Zabicka D, et al. VIM/IMP carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Poland: epidemic *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella oxytoca* lineages. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(10):2675-2681. doi:10.1093/jac/dky257
  119. **Jacoby G**, R. Vacheva-Dobrevsky 2003. Epidemiology of Extended Spectrum beta-Lactamases in Sofia, Bulgaria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 22: 385-388.
  120. **Jacoby GA**. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):161-82, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00036-08.
  121. **Jacoby GA**. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11(4):875-887. doi:10.1016/s0891-5520(05)70395-0
  122. **Jafari A**, Aslani MM, Bouzari S *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran *Iranian J Microbiol* 2012; 4( 3): 102-117
  123. **Jain A**, Hopkins KL, Turton J, Doumith M, Hill R, Loy R, Meunier D, Pike R, Livermore DM, Woodford N. 2014. NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases. *J Antimicrob Chemother* 69:1777–1784. doi:10.1093/jac/dku084.
  124. **Jang J** et al. J Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Appl Microbiol.* (2017)
  125. **Johnson JR**, Johnston BD, Gordon DM. 2017. Rapid and specific detection of the *Escherichia coli* sequence type 648 complex within phylogroup F. *J Clin Microbiol* 55:1116–1121. doi:10.1128/JCM.01949-16.
  126. **Jørgensen SB**, Søråas A, Sundsfjord A, Liestøl K, Leegaard TM, Jennum PA. Fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* after urinary tract infection - A three year prospective cohort study. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173510. Published 2017 Mar 7. doi:10.1371/journal.pone.0173510

127. **Jones RN**, Flonta M, Gurler N, Cepparulo M, Mendes RE, Castanheira M. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(4):429-436. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.008
128. **Jones RN**, Pfaller MA; MYSTIC Study Group (Europe). Antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. with resistance phenotypes consistent with an extended-spectrum beta-lactamase in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2003 Jul;9(7):708-12.
129. **Kaase M**, Schimanski, S., Schiller, R., Beyreiß, B., Thürmer, A., Steinmann, J., Kempf, V.A., Hess, C., Sobottka, I., Fenner, I., Ziesing, S., Burckhardt, I., von Müller, L., Hamprecht, A., Tammer, I., Wantia, N., Becker, K., Holzmann, T., Furitsch, M., Volmer, G., Gatermann, S.G., 2016. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in German hospitals. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 415–420.
130. **Kallonen T** et al. EPEC: a cocktail of virulence. *Nat Rev Microbiol.* (2016)
131. **Kantele A**, Lääveri T, Mero S, Vilkinen K, Pakkanen SH, Ollgren J, Antikainen J, Kirveskari J. Antimicrobials increase travelers' risk of colonization by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis*. 2015 Mar 15;60(6):837-46. doi: 10.1093/cid/ciu957. Epub 2015 Jan 21.
132. **Karanika S**, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Infect Dis*. 2016 Aug 1;63(3):310-8. doi: 10.1093/cid/ciw283. Epub 2016 May 3. Review. Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2016 Sep 15;63(6):851.
133. **Kelly AM**, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50(2):127-134. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.03.012
134. **Keuleyan E**, M Sredkova, D Ivanova, I Haydoushka, R Markovska, N Hadjieva, T Strateva, I Mitov. 2001. ESBLs producing Enterobacteriaceae from APUA Bulgaria Chapter survey. 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect*, 7, Suppl 1, Astr P1343/p 28
135. **Keuleyan E**, V Kaludova, R Marinova. 1992. Comparative susceptibility to  $\beta$ -lactams and spectra of  $\beta$ -lactamases in clinical Enterobacteriaceae strains. 4th Biennial Conference on Chemotherapy of Infectious Diseases and Malignancies, Prague, Czechoslovakia. Program and Abstracts, Abstr 217
136. **Khoder M**, Tsapis N, Domergue-Dupont V, Gueutin C, Fattal E. 2010. Removal of residual colonic ciprofloxacin in the rat by activated charcoal entrapped within zinc-pectinate beads. *Eur. J. Pharm. Sci.* 41:281–288.
137. **Kostyanov T**, Strateva, T., Xavier, B.B., Marteva-Proevska, Y., Lammens, C., Markova, B., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S., 2016. Detection and characterization of

- two NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from Bulgaria. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1428–1430.
138. **Lee C.R.**, Lee, J.H., P Laupland KB, Church DL, Vidakovich J, Mucenski M, Pitout JD (2008) Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *J Infect* 57: 441-448.
  139. **Li B**, Sun J-Y, Liu Q-Z, Han L-Z, Huang X-H, Ni Y-X. High prevalence of CTXM  $\beta$ -lactamases in faecal *Escherichia coli* strains from healthy humans in Fuzhou, China. *Scand J Infect Dis.* 2011;43:170–4.
  140. **Liu Q**, Liu L, Li Y, Chen X, Yan Q, Liu WE. Fecal Carriage and Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Among Hospitalized Patients in a University Hospital. *Infect Drug Resist.* 2019;12:3935–3942
  141. **Li X**, Zhu Y, Shen M, Du J, Zhang L, Wang D. Draft genome sequence of *Enterobacter cloacae* HBY, a ST128 clinical strain co-producing KPC-2 and NDM-1 carbapenemases. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;12:1-2. doi:10.1016/j.jgar.2017.10.022
  142. **Liu Y. Y**, Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., & et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 2016; 16, 161-168.
  143. **Livermore DM**. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012 Jun;27(2):128-42.
  144. **Logan N, A.** Hoffmaster, S. Shadomy, K. Stauffer (2011) *Manual of clinical microbiology*, 10th ed. Washington, DC, USA: ASM Press.
  145. **Logan, L.K.**, Weinstein, R.A., 2017. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. *J. Infect. Dis.* 215(Suppl. 1), S28–S36.
  146. **Lonchel CM**, Meex C, Gangoué-Piéboji J, Boreux R, Assoumou MC, Melin P, De Mol P. Proportion of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in community setting in Ngaoundere, Cameroon. *BMC Infect Dis.* 2012 Mar 9;12:53. doi: 10.1186/1471-2334-12-53.
  147. **Lonchel CM**, Melin P, Gangoué-Piéboji J, Assoumou MC, Boreux R, De Mol P. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Cameroonian hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Jan;32(1):79-87. doi: 10.1007/s10096-012-1717-4. Epub 2012 Aug 11.
  148. **Looff T**, Allen HK. Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut Microbes.* 2012;3(5):463-467. doi:10.4161/gmic.21288
  149. **Lowe CF**, Katz K, McGeer AJ, Muller MP. 2013. Efficacy of admission screening for extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae. *PLoS One* 8:e62678. doi:10.1371/journal.pone.0062678
  150. **Lu M.C**, Tang, H.L., Chiou, C.S., Wang, Y.C., Chiang, M.K., Lai, Y.C., 2018 May 9. Clonal dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: two

- distinct sublineages of Sequence Type 11 carrying blaKPC-2 and blaOXA-48. *Int. J. Antimicrob. Agents.* <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.04.023>. pii: S0924-8579(18) 30132-8.
151. **Luvsansharav U-O**, Hirai I, Nakata A, Imura K, Yamauchi K, Niki M, et al. Prevalence of and risk factors associated with faecal carriage of CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in rural Thai communities. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1769–74.
  152. **Luvsansharav UO**, Hirai I, Niki M, Nakata A, Yoshinaga A, Moriyama T, Yamamoto Y Prevalence of fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae among healthy adult people in Japan. *J Infect Chemother.* 2011 Oct;17(5):722-5. doi: 10.1007/s10156-011-0225-2. Epub 2011 Feb 26
  153. **Luvsansharav UO**, Hirai I, Niki M, Sasaki T, Makimoto K, Komalamisra C, Maipanich W, Kusolsuk T, Sa-Nguankiat S, Pubampen S, Yamamoto Y. Analysis of risk factors for a high prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in asymptomatic individuals in rural Thailand. *J Med Microbiol.* 2011 May;60(Pt 5):619-24. doi: 10.1099/jmm.0.026955-0. Epub 2011 Feb 3.
  154. **Madigan T**, Johnson JR, Clabots C, Johnston BD, Porter SB, Slater BS, Banerjee R. Extensive Household Outbreak of Urinary Tract Infection and Intestinal Colonization due to Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Clin Infect Dis.* 2015 Jul 1;61(1):e5-12. doi: 10.1093/cid/civ273. Epub 2015 Mar 31.
  155. **Mahon CR**, Lehman DC, Mansuelis G, *Textbook of Diagnostic microbiology*, Third edition, . St. Louis, MO, USA: Elsevier 2007
  156. **Markovska R**, E Keuleyan, I Schneider, B Markova, K Rachkova, M Sredkova, and A Bauernfeind. 2006-1. CTX-M-3 Extended Spectrum Beta-Lactamase producing *K. pneumoniae* and dissemination of the plasmidic blaCTX-M-3 in Bulgaria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25; 123-125
  157. **Markovska R**, E Keuleyan, M Sredkova, D Ivanova, B Markova, K Rachkova, E Dragijeva, I Haydouchka, T Kostyanev, I Mitov. 2006-2. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers among Enterobacteriaceae from patients in Bulgarian hospitals. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases* 34; 16-19
  158. **Markovska R**, I Schneider, D Ivanova, E Keuleyan, T Stoeva, M Sredkova, B Markova, K Bojkova, R Gergova, A Bauernfeind, I Mitov. 2012. High prevalence of CTX-M-15-producing O25b-ST131 *Escherichia coli* clone in Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist Microb Drug Resist.* 2012 Aug;18(4):390-5
  159. **Markovska R**, I Schneider, E Keuleyan, and A Bauernfeind. 2004 Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) CTX-M-15 producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Sofia, Bulgaria, *Clinical Microbiology Infection* 8, 752- 755
  160. **Markovska R**, K Rachkova, I Schneider, E Keuleyan and A. Bauernfeind (2005) “Multiresistant SHV-2 Producing *Salmonella Enterica* Serotype Corvallis In Bulgaria” *Journal of Chemotherapy* 17, 568-569

161. **Markovska R**, Keuleyan E, Ivanova D, Markova B, Proevska J, Leseva M, Sredkova M, Schneider I, Bauernfeind A and I. Mitov. Dissemination of CTX-M extended spectrum beta-lactamase producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* in four hospitals in Sofia and Pleven *Probl. Infect. Paras. Dis.* 2012; 40(1): 5-9
162. **Markovska R**, Schneider I, Ivanova D, Keuleyan E, Stoeva T, Sredkova M, Markova B, Bojkova K, Gergova R, Bauernfeind A, Mitov I. High prevalence of CTX-M-15-producing O25b-ST131 *Escherichia coli* clone in Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist.* 2012 Aug;18(4):390-5. doi: 10.1089/mdr.2011.0186. Epub 2012 Feb 21.
163. **Markovska R**, Schneider I, Stoeva T, Bojkova K, Boyanova L, Bauernfeind A, Mitov I. First identification of KPC-2 and VIM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Nov;77(3):252-3.
164. **Markovska R**, Schneider I, Keuleyan E., Sredkova M., Ivanova D., Markova B., Lazarova G, Dragijeva E., Savov E, Haydouchka I, Hadjieva N, Setchanova L, Mitov I., Bauernfeind A.. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Bulgarian hospitals. *Microb Drug Resist.* 14(2):119-128.
165. **Markovska R**, Stoeva T, Bojkova K, I Mitov. Investigation of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae among *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* strains in two university hospitals - Varna. *Medizinski pregled.* 2012; 48(1): 43-49
166. **Markovska R**, Stoeva T, Boyanova L, Stankova P, Pencheva D, Kaneva R, Mitev V, Mitov I. Isolation of *Escherichia coli* ST131 producing KPC-2 in Bulgaria. *Infect Dis (Lond).* 2017 May;49(5):429-431
167. **Markovska R**, Stoeva T, Schneider I, Boyanova L, Popova V, Dacheva D, Kaneva R, Bauernfeind A, Mitev V, Mitov I. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *APMIS.* 2015; 123(10):887-94
168. **Markovska R**, I. Schneider, E. Keuleyan, D. Ivanova, M. Leseva, T. Stoeva, M. Sredkova, A. Bauernfeind and I. Mitov. Dissemination of a multidrug-resistant VIM-1– and CMY-99-producing *Proteus mirabilis* clone in Bulgaria. *Microbial Drug Resistance* 2017; 23(3): 345-350.
169. **Maslikowska JA**, Walker SA, Elligsen M, Mittmann N, Palmay L, Daneman N, Simor A. Impact of infection with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella* species on outcome and hospitalization costs. *J Hosp Infect.* 2016 Jan;92(1):33-41. doi: 10.1016/j.jhin.2015.10.001. Epub 2015 Oct 22.
170. **Mathers AJ**, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jul;28(3):565-91
171. **Matthew M**, Harris A, Marshall M. and Ross G. 1975. The use of analytical isoelectric focussing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases. *J Gen Microbiol* 88: 169-178

172. **Maurer F**, Castelberg C, Quiblier C, Bloemberg G, Hombach M, Evaluation of Carbapenemase Screening and Confirmation Tests with Enterobacteriaceae and Development of a Practical Diagnostic Algorithm, *J Clin Microbiol*. 2015 January;53(1):95-104
173. **McGann P**, Snesrud E, Maybank R, et al. Erratum for McGann et al., *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *blaCTX-M* on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(8):5107. Published 2016 Jul 22. doi:10.1128/AAC.01353-160.5812/jjm.8(4)2015.15620
174. **McNally A**, Oren Y, Kelly D, Pascoe B, Dunn S, Sreecharan T, Vehkala M, Valimaki N, Prentice MB, Ashour A, Avram O, Pupko T, Dobrindt U, Literak I, Guenther S, Schaufler K, Wieler LH, Zhiyong Z, Sheppard SK, McInerney JO, Corander J. 2016. Combined analysis of variation in core, accessory and regulatory genome regions provides a super-resolution view into the evolution of bacterial populations. *PLoS Genet* 12:e1006280. doi:10.1371/journal.pgen.1006280.
175. **Melegh S**, Kovács K, Gám T, Nyul A, Patkó B, Tóth A, et al. Emergence of VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone in the clinical Centre University of Pécs, Hungary. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O27–29.
176. **Memariani M**, Shahin Najar Peerayeh, Taghi Zahraei Salehi, Seyyed Khalil Shokouhi Mostafavi Occurrence of SHV, TEM and CTX-M  $\beta$ -Lactamase Genes Among Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated From Children With Diarrhea Jundishapur J Microbiol. 2015 Apr; 8(4): e15620. Published online 2015 Apr 18. doi: 1
177. **Mendes RE**, Mendoza M, Banga Singh KK, et al. Regional resistance surveillance program results for 12 Asia-Pacific nations (2011). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5721-5726. doi:10.1128/AAC.01121-13
178. **Mirelis B**, Navarro F, Miró E, Mesa RJ, Coll P, Prats G. Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase. *Emerg Infect Dis*. 2003 Aug;9(8):1024-5.
179. **Miriagou V**, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske C, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini G, Tsakris A, Vatopoulos A and Cantón R Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues, *Clin Microbiol Infect*. 2010 Feb;16(2):112-22.
180. **Miró E**, Mirelis B, Navarro F, Rivera A, Mesa RJ, Roig MC, Gómez L, Coll P, Surveillance of extended-spectrum beta-lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Dec;56(6):1152-5.
181. **Mojica MF**, De La Cadena E, Hernández-Gómez C, Correa A, Appel TM, Pallares CJ, Villegas MV Performance of disk diffusion and broth microdilution for fosfomicin susceptibility testing of multi-drug resistant clinical isolates of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Jan 28. pii: S2213-7165(20)30004-7. doi: 10.1016/j.jgar.2020.01.003. [Epub ahead of print]

182. **Mollenkopf DF**, Cenera JK, Bryant EM, King CA, Kashoma I, Kumar A, Funk JA, Rajashekara G, Wittum TE. Organic or antibiotic-free labeling does not impact the recovery of enteric pathogens and antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from fresh retail chicken. *Foodborne Pathog Dis.* 2014 Dec;11(12):920-9. doi: 10.1089/fpd.2014.1808.
183. **Mora A**, Herrera A, Mamani R, López C, Alonso MP, Blanco JE, Blanco M, Dahbi G, García-Garrote F, Pita JM, Coira A, Bernárdez MI, Blanco J. 2010. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Appl Environ Microbiol* 76:6991–6997. doi:10.1128/AEM.01112-10
184. **Morris D**, O'Connor M, Izdebski R, Corcoran M, Ludden CE, McGrath E, et al. Dissemination of clonally related multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *Epidemiol Infect* 2016;144(2):443–8
185. **Mulvey M.R**, Grant, J.M., Plewes, K., Roscoe, D., Boyd, D.A., 2011. New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 103–106
186. **Naas T**, Cuzon G, Gaillot O, et al. When carbapenemhydrolyzing beta-lactamase KPC meets *Escherichia coli* ST131 in France. *Antimicrob Agents Chemother.*2011;55:4933–4934.
187. **Naas T**, Vandell L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Jun;38(6):1262-70.
188. **Naseer U**, Sundsfjord, A., 2011. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb. Drug Resist.* 17, 83–97.
189. **Naushad H. S**, Lee, B. & Gupta, R. S. (2014). Conserved signature indels and signature proteins as novel tools for understanding microbial phylogeny and systematics: identification of molecular signatures that are specific for the phytopathogenic genera *Dickeya*, *Pectobacterium* and *Brenneria*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 366–383.
190. **Navon-Venezia S**, Chmelnitsky I, Leavitt A, et al. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3098–3101.
191. **Nicolas-Chanoine MH**, Gruson C, Bialek-Davenet S, Bertrand X, Thomas-Jean F, Bert F, Moyat M, Meiller E, Marcon E, Danchin N, Noussair L, Moreau R, Leflon-Guibout V, 10-Fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Mar;68(3):562-8
192. **Nicolas-Chanoine MH**, Bertrand X, Madec JY *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul; 27(3): 543–574. doi: 10.1128/CMR.00125-13

193. **Nordmann P**, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V; European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012 May;18(5):432-8.
194. **Nordmann P**, Jayol A, Poirel L. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. *J Clin Microbiol.* 2016;54(5):1395-1399. doi:10.1128/JCM.00446-16
195. **Nordmann P**, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:821-30
196. **Octavia S. & Lan, R.** (2014). The Family Enterobacteriaceae, pp. 225–286. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria.*
197. **Oliveira C**, Amador P, Prudêncio C, Tomaz CT, Tavares-Ratado P, Fernandes R. ESBL and AmpC  $\beta$ -Lactamases in Clinical Strains of *Escherichia coli* from Serra da Estrela, Portugal. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(6):272. Published 2019 Jun 12. doi:10.3390/medicina55060272
198. **Oshiro S**, Tada T, Watanabe S, et al. Emergence and Spread of Carbapenem-Resistant and Aminoglycoside-Panresistant *Enterobacter cloacae* Complex Isolates Coproducing NDM-Type Metallo- $\beta$ -Lactamase and 16S rRNA Methylase in Myanmar. *mSphere.* 2020;5(2):e00054-20. Published 2020 Mar 11. doi:10.1128/mSphere.00054-20
199. **Oteo J**, Hernández-Almaraz JL, Gil-Antón J, Vindel A, Fernández S, Bautista V, et al. Outbreak of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Dec;29(12):1144-6.
200. **Otter JA**, Natale A, Batra R, Tosas Auguet O, Dyakova E, Goldenberg SD, Edgeworth JD. Individual- and community-level risk factors for ESBL Enterobacteriaceae colonization identified by universal admission screening in London. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Oct;25(10):1259-1265. doi:10.1016/j.cmi.2019.02.026. Epub 2019 Mar 6.
201. **Overdeest I**, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jul;17(7):1216-22. doi: 10.3201/eid1707.110209.
202. **Pan F**, Tian D, Wang B, Zhao W, Qin H, Zhang T, Zhang H. Fecal carriage and molecular epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from outpatient children in Shanghai. *BMC Infect Dis.* 2019 Aug 1;19(1):678. doi: 10.1186/s12879-019-4298-3.
203. **Parte A. C.** (2014). LPSN – list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* 42, D613–D616
204. **Partridge S.R**, Ellem, J.A., Tetu, S.G., Zong, Z., Paulsen, I.T., Iredell, J.R., 2011. Complete sequence of pJIE143, a pir-type plasmid carrying ISEcp1-blaCTX-M-15 from an *Escherichia coli* ST131 isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5933–5935.

205. **Passet V**, Brisse S. Description of *Klebsiella grimontii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018;68(1):377-381. doi:10.1099/ijsem.0.002517
206. **Peirano G** & Pitout J. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs.* 2019;79(14):1529-1541. doi:10.1007/s40265-019-01180-3
207. **Peirano G**, van der Bij AK, Gregson DB, Pitout JD. Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *J Clin Microbiol.* 2012 Feb;50(2):294-9.
208. **Peirano G**, Matsumura Y, Adams MD, et al. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp., 2008-2014. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(6):1010-1019. doi:10.3201/eid2406.171648
209. **Peralta G**, Lamelo M, Alvarez-Garcia P, Velasco M, Delgado A, Horcajada JP, et al. Impact of empirical treatment in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. bacteremia. A multicentric cohort study. *BMC Infect Dis* 2012; 12: 245.
210. **Pérez-Pérez FJ**, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2153-2162. doi:10.1128/jcm.40.6.2153-2162.2002
211. **Piazza A**, Caltagirone M, Bitar I, et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST3948 with KPC-2, KPC-3 and KPC-8 carbapenemases from a long-term care and rehabilitation facility (LTCRF) in Northern Italy. *Adv Exp Med Biol.* 2016;901:77–89.
212. **Pires J**, Kuenzli E, Kasraian S et al. Polyclonal intestinal colonization with extended-spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae upon traveling to India. *Front Microbiol* 2016; 7:1069.
213. **Pitout J.D**, Nordmann, P., Poirel, L., 2015. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5873–5884.
214. **Pitout J.D.** 2009. IPSAT P1A, a class A beta-lactamase therapy for the prevention of penicillin-induced disruption to the intestinal microflora. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 10:838–844.
215. **Pitout J.D.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Oct;10(10):1165–76.
216. **Platell J.L**, Cobbold RN, Johnson JR, Heisig A, Heisig P, Clabots C, Kuskowski MA, Trott DJ. 2011. Commonality among fluoroquinolone resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3782–3787

217. **Platteel TN**, Leverstein-van Hall MA, Cohen Stuart JW, Thijsen SF, Mascini EM, van Hees BC, Scharringa J, Fluit AC, Bonten MJ. Predicting carriage with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria at hospital admission: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Feb;21(2):141-6. doi: 10.1016/j.cmi.2014.09.014. Epub 2014 Oct 29.
218. **Poirel L**, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):447-450. doi:10.1128/AAC.49.1.447-450.2005
219. **Poirel L**, Nordmann P, Ducroz S, Boulouis HJ, Arné P, Millemann Y. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type ST274 in companion animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 May;57(5):2372-5. doi: 10.1128/AAC.02622-12. Epub 2013 Feb 19.
220. **Poirel L**, Savov E, Nazli A, et al. Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2472-2474. doi:10.1128/AAC.02571-13
221. **Poirel L**, Walsh T, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 70:119-123.
222. **Poirel L**, Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M., Ozdamar, M., Turkoglu, S., & et al. (2014). The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 2014; 3, 1-6.
223. **Poirel L**, Nordmann P, 2002, Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support, Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France, 3(2):117-27
224. **Pournaras S**, Zarkotou O, Poulou A, Kristo I, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2013 Sep;51(9):2986-90. doi: 10.1128/JCM.00901-13. Epub 2013 Jul 10.
225. **Power P**, Galleni M, Ayala JA, Gutkind G. Biochemical and molecular characterization of three new variants of AmpC beta-lactamases from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Mar;50(3):962-7. doi: 10.1128/AAC.50.3.962-967.2006. PMID: 16495258; PMCID: PMC1426437.
226. **Prasad N**, Labaze G, Kopacz J, Chwa S, Platis D, Pan CX, Russo D, LaBombardi VJ, Osorio G, Pollack S, Kreiswirth BN, Chen L, Urban C, Segal-Maurer S. Asymptomatic rectal colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and *Clostridium difficile* among residents of a long-term care facility in New York City. *Am J Infect Control.* 2016 May 1;44(5):525-32
227. **Prevel R**, Boyer A, M'Zali F, Lasheras A, Zahar JR, Rogues AM, Gruson D. Is systematic fecal carriage screening of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae still useful in intensive care unit: a systematic review. *Crit Care.* 2019 May 14;23(1):170. doi: 10.1186/s13054-019-2460-3.

228. **Protonotariou E**, Meletis G, Chatzopoulou F, Malousi A, Chatzidimitriou Skoura L. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST11 co-producing NDM-1 and OXA-48 carbapenemases in Greece. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19:81-82. doi:10.1016/j.jgar.2019.08.020
229. **Quan J**, Li, X., Chen, Y., Zhou, Z., Zhang, H., Sun, L., & et al. (2017). Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. *Lancet Infect Dis*,2017; 17(4), 400-410.
230. **Queenan AM\* and Bush K**, Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):440-58, table of contents.
231. **Rasheed JK**, Kitchel B, Zhu W, et al. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, United States. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(6):870-878. doi:10.3201/eid1906.121515
232. **Riley LW**. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.. *Clin Microbiol Infect*. 2014 May;20(5):380-90.
233. **Ríos E**, López MC, Rodríguez-Avial I, Culebras E, Picazo JJ. Detection of *Escherichia coli* ST131 clonal complex (ST705) and *Klebsiella pneumoniae* ST15 among faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Med Microbiol*. 2017 Feb;66(2):169-174
234. **Riveros M**, Wilfredo García, Coralith García, David Durand, Erik Mercado, Joaquim Ruiz, Theresa J. Ochoa Molecular and Phenotypic Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Bacteremic Children, *Am J Trop Med Hyg*. 2017 Nov 8; 97(5): 1329–1336. Published online 2017 Oct 9. doi: 10.4269/ajtmh.17-0066
235. **Rizzo L**, Maniaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ*. 2013 Mar 1;447:345-60. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032. Epub 2013 Feb 7. Review.
236. **Roberts LW**, Harris PNA, Forde BM, et al. Integrating multiple genomic technologies to investigate an outbreak of carbapenemase-producing *Enterobacter hormaechei*. *Nat Commun*. 2020;11(1):466. Published 2020 Jan 24. doi:10.1038/s41467-019-14139-5
237. **Rodrigues C**, Machado E, Fernandes S, Peixe L, Novais Â , An update on faecal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* by Portuguese healthy humans: detection of the H30 subclone of B2-ST131 *Escherichia coli* producing CTX-M-27.. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Apr;71(4):1120-2.
238. **Rodriguez-Bano J**, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Diaz de Alba P, Pascual A. 2008. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother*. 62:1142–1149

239. **Rodríguez-Baño J**, Navarro MD, Romero L, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1089-1094. doi:10.1128/jcm.42.3.1089-1094.2004
240. **Rogers BA**, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(1):1-14. doi:10.1093/jac/dkq415
241. **Rood IGH** et al. Review: Molecular detection of extended spectrum- $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a clinical setting. *Diagn Microbiol Infect Dis*. (2017)
242. **Rottman M**, Benzerara Y, Hanau-Berçot B, Bizet C, Philippon A, Arlet G. Chromosomal ampC genes in *Enterobacter* species other than *Enterobacter cloacae*, and ancestral association of the ACT-1 plasmid-encoded cephalosporinase to *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;210(1):87-92
243. **Ruppé E**, Woerther PL, Diop A, Sene AM, Da Costa A, Arlet G, Andremont A, Rouveix B. Carriage of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates among children living in a remote village in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jul;53(7):3135-7. doi: 10.1128/AAC.00139-09. Epub 2009 Apr 13.
244. **Sabtcheva S**, Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P, Lambert T., Aminoglycoside resistance gene ant(4')-IIb of *Pseudomonas aeruginosa* BM4492, a clinical isolate from Bulgaria, 2003, 47(5):1584-8
245. **Sabtcheva S**, Ivanov IN, Todorova B, Simeonov Y, Dobрева E, Ivanova K, Velinov T, Kantardjiev T. Detection and characterization of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* originated in Bulgaria. *J Chemother*. 2015 May 27:1973
246. **Sanger F**, Nicklen S, Coulson A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 5463-7
247. **Sasaki T**, Hirai I, Niki M, Nakamura T, Komalamisra C, Maipanich W, Kusolsuk T, Sa-Nguankiat S, Pubampen S, Yamamoto Y. High prevalence of CTX-M beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Apr;65(4):666-8. doi: 10.1093/jac/dkq008. Epub 2010 Jan 27.
248. **Savov E**, Politi, L., Spanakis, N., Trifonova, A., Kioseva, E., Tsakris, A., 2018. NDM-1 hazard in the Balkan States: evidence of the first outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *Microb. Drug Resist*. 24, 253–259.
249. **Schaufler K**, Semmler T, Pickard DJ, de Toro M, de la Cruz F, Wieler LH, Ewers C, Guenther S. 2016. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase-plasmids does not reduce fitness but enhances virulence in some strains of pandemic *Escherichia coli* lineages. *Front Microbiol* 7:336. doi:10.3389/fmicb.2016.00336.
250. **Schaufler K**, Semmler T, Wieler LH, et al. Genomic and Functional Analysis of Emerging Virulent and Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Lineage Sequence Type

648. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(6):e00243-19. Published 2019 May 24. doi:10.1128/AAC.00243-19
251. **Schoevaerdt D**, Verroken A, Huang TD, Frennet M, Berhin C, Jamart J, Bogaerts P, Swine C, Glupczynski Y. Multidrug-resistant bacteria colonization amongst patients newly admitted to a geriatric unit: a prospective cohort study. *J Infect.* 2012 Aug;65(2):109-18. doi: 10.1016/j.jinf.2012.02.004. Epub 2012 Feb 14.
252. **Shaheen BW**, Nayak R, Foley SL, Kweon O, Deck J, Park M, Rafii F, Boothe DM. Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Dec;55(12):5666-75. doi: 10.1128/AAC.00656-11. Epub 2011 Sep 26.
253. **Siegel JD**, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control.* 2007 Dec;35(10 Suppl 2):S165-93. Review. No abstract available.
254. **Simner PJ**, Zhanel GG, Pitout J, Taylor F, McCracken M, Mulvey MR, Lagacé-Wiens PR, Adam HJ, Hoban DJ; Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: results of the CANWARD 2007-2009 study. *Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA). Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011;69:326–34.
255. **Singh R**, de Groot PF, Geerlings SE, Hodiament CJ, Belzer C, Berge IJMT, de Vos WM, Bemelman FJ, Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation against intestinal colonization by extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: a proof of principle study. *BMC Res Notes.* 2018 Mar 22;11(1):190
256. **Singh T**, Shukla Das, V. G. Ramachandran, Sayim Wani, Dheeraj Shah, Khan A. Maroof, Aditi Sharma Distribution of Integrins and Phylogenetic Groups among Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Children <5 Years of Age in Delhi, India *Front Microbiol.* 2017; 8: 561. Published online 2017 Apr 10. doi: 10.3389/fmicb.2017.00561
257. **Slinger R** et al. Higher atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (a-EPEC) bacterial loads in children with diarrhea are associated with PCR detection of the EHEC factor for adherence 1/lymphocyte inhibitory factor A (efa1/lifa) gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* (2017)
258. **Solgi H**, Badmasti, F., Giske, C.G., Aghamohammad, S., Shahcheraghi, F., 2018 Mar 6. Molecular epidemiology of NDM-1- and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in an Iranian hospital: clonal dissemination of ST11 and ST893. *J. Antimicrob.*
259. **Stedt J**, Bonnedahl J, Hernandez J, Waldenström J, McMahan BJ, Tolf C, Olsen B, Drobni M Carriage of CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in gulls across Europe. *Acta Vet Scand.* 2015 Nov 2;57:74.

260. **Strömdahl H**, Tham J, Melander E, Walder M, Edquist PJ, Odenholt I. Eur Prevalence of faecal ESBL carriage in the community and in a hospital setting in a county of Southern Sweden *J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Oct;30(10):1159-62.
261. **Studentova V**, Dobiasova, H., Hedlova, D., Dolejska, M., Papagiannitsis, C.C., Hrabak, J., 2015. Complete nucleotide sequences of two NDM-1-encoding plasmids from the same sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1325–1328.
262. **Sun Y**, Li M, Chen L, et al. Prevalence and molecular characterization of carbapenemase-producing gram-negative bacteria from a university hospital in China. *Infect Dis (Lond)*. 2016;48:138–146.
263. **Sutton GG**, Brinkac LM, Clarke TH, Fouts DE. *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. Version 2. *F1000Res*. 2018; 7: 521. Published online 2018 Jun 29. doi: 10.12688/f1000research.14566.2
264. **Swaminathan M**, Sharma S, Poliansky Blash S, Patel G, Banach DB, Phillips M, et al. Prevalence and risk factors for acquisition of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the setting of endemicity. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2013;34(8):809–17.
265. **Tacão M**, Correia A, Henriques I. Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of bla(CTX-M)-like genes. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Jun;78(12):4134-40. doi: 10.1128/AEM.00359-12. Epub 2012 Apr 6.
266. **Tacconelli E**, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, Kahlmeter G, Pan A, Petrosillo N, Rodríguez-Baño J, Singh N, Venditti M, Yokoe DS, Cookson B; European Society of Clinical Microbiology. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jan;20 Suppl 1:1-55. doi: 10.1111/1469-0691.12427. Review.
267. **Tehrani KHME** et al  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: an update.. *Medchemcomm*. (2018)
268. **Tenaillon O**, Barrick JE, Ribeck N, et al. Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. *Nature*. 2016;536(7615):165-170. doi:10.1038/nature18959
269. **The EUCAST** guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0 (2017-07-11) [https://www.eucast.org/resistance\\_mechanisms/](https://www.eucast.org/resistance_mechanisms/)

270. **Tian SF**, Chen BY, Chu YZ, Wang S. 2008. Prevalence of rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among elderly people in community settings in China. *Can. J. Microbiol.* 54:781–785
271. **Tindall BJ**, Sutton G, Garrity GM. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Feb;67(2):502-504.
272. **Todorova B**, Sabtcheva, S., Ivanov, I.N., Lesseva, M., Chalashkanov, T., Ioneva, M., Bachvarova, A., Dobрева, E., Kantardjiev, T., 2016. First clinical cases of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from two hospitals in Bulgaria. *J. Infect. Chemother.* 22, 837–840
273. **Tsakris A**, Ikonomidis A, Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Markou F. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2007 ;60:136-9.
274. **Valverde A**, Grill F, Coque TM et al. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2796–9.
275. **van den Bunt G**, van Pelt W, Hidalgo L, Scharringa J, de Greeff S, Schürch A, Mughini-Gras L, Bonten MJM, Fluit A Prevalence, risk factors and genetic characterisation of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E and CPE): a community-based cross-sectional study, the Netherlands, 2014 to 2016 *Euro Surveill.* 2019 Oct 10; 24(41): 1800594. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.41.1800594
- 276.
277. **Veldman K**, van Tulden P, Kant A, Testerink J, Mevius D. Characteristics of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* from wild birds in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Dec;79(24):7556-61. doi: 10.1128/AEM.01880-13. Epub 2013 Sep 13.
278. **Versalovic J**, Koeuth T, McCabe ER, Lupski JR. Use of the polymerase chain reaction for physical mapping of *Escherichia coli* genes. *J Bacteriol.* 1991;173(17):5253-5255. doi:10.1128/jb.173.17.5253-5255.1991
279. **Vidal M**, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C, Vidal R. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5362-5.
280. **Voulgari E**, Gartzonika, C., Vrioni, G., Politi, L., Priavali, E., Levidiotou-Stefanou, S., Tsakris, A., 2014. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2091–2097.

281. **Wang J.T**, Wu, U.I., Lauderdale, T.L., Chen, M.C., Li, S.Y., Hsu, L.Y., Chang, S.C., 2015 Mar 20. Carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae in Taiwan. *PLoS One* 10 (3), e0121668.
282. **Wedley AL**, Dawson S2, Maddox TW3, Coyne KP1, Pinchbeck GL1, Clegg P4, Nuttall T2, Kirchner M5, Williams NJ6. Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics.. *Vet Microbiol.* 2017 Feb;199:23-30.
283. **Wellington EM**, Boxall AB, Cross P, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):155-165. doi:10.1016/S1473-3099(12)70317-1
284. **Wickramasinghe NH**, Xu L, Eustace A, Shabir S, Saluja T, Hawkey PM High community faecal carriage rates of CTX-M ESBL-producing *Escherichia coli* in a specific population group in Birmingham, UK . *J Antimicrob Chemother.* 2012 May;67(5):1108-13.
285. **Wiener-Well Y**, Rudensky B, Yinnon AM, Kopuit P, Schlesinger Y, Broide E, et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *The Journal of hospital infection.* 2010;74(4):344–9.
286. **Woerther PL**, Angebault C, Jacquier H, Hugede HC, Janssens AC, Sayadi S, El Mniai A, Armand-Lefèvre L, Ruppé E, Barbier F, Raskine L, Page AL, de Rekeneire N, Andremont A. Massive increase, spread, and exchange of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-encoding genes among intestinal Enterobacteriaceae in hospitalized children with severe acute malnutrition in Niger. *Clin Infect Dis.* 2011 Oct;53(7):677-85. doi: 10.1093/cid/cir522.
287. **Woerther PL**, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Oct;26(4):744-58.
288. **Wolf M**, Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* . *Clinical Microbiology Reviews.* 1997, 10(4):. 569–584
289. **Woodford N**, Ward ME, Kaufmann ME, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(4):735-743. doi:10.1093/jac/dkh42
290. **Woodford N**, Turton, J.F., Livermore, D.M., 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 736–755
291. **Wu W**, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- $\beta$ -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(2):e00115-18. Published 2019 Jan 30. doi:10.1128/CMR.00115-18

292. **Xu Y**, Sun H, Xiangning Bai, Shanshan Fu, Ruyue Fan, and Yanwen Xiong, Occurrence of multidrug-resistant and ESBL-producing atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in China *Gut Pathog.* 2018; 10: 8.
293. **Yigit H**, A.M. Queenan, G.J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J.W. Biddle, C.D. Steward, S. Alberti, K. Bush, and F.C. Tenover, 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):1151-61.
294. **Yoon EJ**, Yang JW, Kim JO, Lee H, Lee KJ, Jeong SH. 2018. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in South Korea: a report from the national laboratory surveillance system. *Future Microbiol* 13:771–783. doi:10.2217/fmb-2018-0022.
295. **Zahra R**, Javeed S, Malala B, Babenko D, Toleman MA. Analysis of *Escherichia coli* STs and resistance mechanisms in sewage from Islamabad, Pakistan indicates a difference in *E. coli* carriage types between South Asia and Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(7):1781-1785. doi:10.1093/jac/dky109
296. **Zhang R**, Liu L, Zhou H, et al. Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Strains in China. *EBioMedicine.* 2017;19:98-106. doi:10.1016/j.ebiom.2017.04.032
297. **Zhang Y. & Qiu, S.** (2015). Examining phylogenetic relationships of *Erwinia* and *Pantoea* species using whole genome sequence data. *Antonie van Leeuwenhoek* 108, 1037–1046.
298. **Zhang Y**, Fan, Q. & Loria, R. (2016). A re-evaluation of the taxonomy of phytopathogenic genera *Dickeya* and *Pectobacterium* using whole-genome sequencing data. *Syst Appl Microbiol* 39, 252–259.
299. **Zhou W**, Chen Q, Qian C, et al. In Vitro Susceptibility and Florfenicol Resistance in *Citrobacter* Isolates and Whole-Genome Analysis of Multidrug-Resistant *Citrobacter freundii*. *Int J Genomics.* 2019;2019:7191935. Published 2019 Nov 19. doi:10.1155/2019/7191935
300. **Zurfluh K**, Hächler H, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 2013 May;79(9):3021-6. doi: 10.1128/AEM.00054-13. Epub 2013 Mar 1.