МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ

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

Дисертационен труд
за придобиване на научна и образователна степен „доктор”
на

д-р ЮЛИЯ СТОЯНОВА МАРТЕВА-ПРОЕВСКА

Направление 7.1 Медицина
Научна специалност „Микробиология”

Научни ръководители:

Доц. д-р Цветан Борисов Велинов, д.м.

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

София
2018

СЪДЪРЖАНИЕ: 2
ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ..... 6
I. ВЪВЕДЕНИЕ 8
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 10
1. Характеристика на полимиксините 10
1.1. Химична структура 10
1.2. Биосинтеза на полимиксините 11
1.3. Антимикробен спектър 13
1.4. Механизъм на действие 13
2. Механизми на резистентност 16
2.1. Хромозомно кодирани механизми на резистентност към полимиксини 16
2.1.1. Модификации на липид А 17
2.1.2. Модификация на сърцевинния олигозахарид (Kdo) 23
2.1.3. Модификация на дължината на О-антигена 23
2.1.4. Свръхпродукция на капсулен полизахарид и отделяне на свободни капсулни полизахариди 24
2.1.5. Промяна в експресията на външно мембранни протеини и ефлуксни помпи 24
2.1.6. Хопаноиди 25
2.1.7. Хетерорезистентност 25
2.1.8. Адаптивна резистентност 26
2.2. Плазмидно-медиирана резистентност към полимиксини 26
3. Генетични методи за определяне на резистентността към полимиксини ... 31
4. Епидемиология на резистентността към полимиксини 32
5. Определяне на чувствителността към colistin *in vitro* 33
5.1. Проблеми, свързани с определяне на чувствителността към colistin 33
5.2. Лабораторни методи за определяне на чувствителността към colistin 36
5.2.1. Методи с разреждане в бульон 36
5.2.2. Метод с разреждане в агар 38
5.2.3. Дисково-дифузионен метод на Bauer-Kirby 38
5.2.4. Градиентен МПК метод (Е-тест) 38
5.2.5. Дифузионен метод с пре-дифузия 39
5.2.6. Автоматизирани системи 40
5.3. Гранични стойности при определяне на чувствителността към colistin 41
5.4. Контрол на качеството на тестовете 41
5.5. Други методи за откриване на резистентност към colistin/полимиксини ... 41
5.5.1 Rapid Polymyxin NP test (RPNP) 41
5.5.2 Superpolymyxin medium 42
5.5.3 Micromax test 42
5.5.4. Капилярна електрофореза 43
6. Мутант превантивна концентрация - Mutant prevention concentration (MPC) и хипотеза за мутант секциониращия прозорец (МСП) 43
7. Клинична употреба и особености при приложение на полимиксините 48
7.1. Фармакокинетика и фармакодинамика 48
7.2. Клинична употреба и индикации 51
7.3. Дозировка и начини на приложение 51

7.4.	Особености при приложение на colistin при лечение на пневмония, свързана с апаратна венилация	54
7.5.	Особености при приложение на colistin при лечение на менингит/вентрикулит	56
7.6.	Токсичност и странични действия	57
7.7.	Предозиране	59
7.8.	Лекарствени взаимодействия	59
7.9.	Комбинирана терапия с colistin	60
8.	Методи за *in vitro* изследване на комбинираното действие на антибиотиците	62
8.1.	Метод на шахматната дъска	62
8.2.	Метод на шахматната дъска с гранични антибиотични концентрации (break-point checkerboard)	63
8.3.	MCBT (Multiple Combination Bactericidal Test)	63
8.4.	Модифициран метод на шахматната дъска на El Azizi	64
8.5.	Time kill assays (TKA)	64
8.6.	Методи, основани на използването на Е-тест	65
III.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	68
IV.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	70
1.	Бактериали щамове	70
1.1.	Клинични изолати	70
1.2.	Еталонни щамове	70
2.	Идентификация на клиничните изолати	70
3.	Методи за определяне на чувствителността към антимикробни средства	70
3.1.	Дисково-дифузионен метод на Bauer-Kirby	70
3.2.	Градиентен МПК метод	71
3.3.	Доказване на продукция на широкоспектърна β-лактамаза (ESBL)	71
3.4.	Доказване на продукция на карбапенемаза	71
3.5.	Определяне на МПК чрез метода на микроразреждане в бульон (BMD)	71
3.6.	Определяне на МПК чрез метода на разреждане в агар	74
3.7.	Определяне на МПК на colistin чрез MICROLATEST MIC COLISTIN	79
3.8.	Определяне на чувствителността към colistin чрез метода на пре-дифузия (Rosco Diagnostica A/S)	80
3.9.	Rapid Polymyxin NP test (RPNP)	80
3.10.	Superpolymyxin medium, използвана като screen agar colistin (SA Col)	83
4.	Методи, свързани с определяне на мутант превантивна концентрация	85
4.1.	Определяне на мутант превантивна концентрация (MPC) colistin	85
4.2.	Определяне на влиянието на комбинираното приложение на антибиотици върху MPC на colistin	86
5.	Тестове за изследване на комбинираното действие на антибиотици с colistin	88
5.1.	Скрининг тест за синергизъм с colistin с пре-дифузия	88
5.2.	Микродилуционен метод на El-Azizi	89
5.3.	Time kill assays (TKA)	91
6.	Молекулярно - генетични изследвания	93
6.1.	Екстракция на ДНК	93
6.1.1	ДНК екстракция за извършване на Real-time PCR (RT-PCR)	93
6.1.2	Термоекстракция на ДНК	93

6.2. Real-time PCR за доказване на основните групи карбапенемази 94
6.3. Multiplex PCR за доказване на основните групи карбапенемази 94
6.4. PCR за доказване на гени на често срещани β-лактамази 96
6.5. PCR за доказване на плазмидно кодирани гени за резистентност към colistin 97
6.6. PCR за амплифициране на хромозомно кодирани гени, свързани с развитие на резистентност към colistin и секвениране 98
6.7. ERIC-PCR за епидемиологично типизиране 100
6.8. Електрофореза 101
7. Статистически анализи 101

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ 103
1. Характеристика на включените в проучването клинични изолати 103
2. Определяне на чувствителността на изследваните щамове към основни антибиотични класове чрез дисково-дифузионен метод и определяне на МПК 105
2.1. *K. pneumoniae* 105
2.2. *E. coli* 107
2.3. *E. cloacae* complex 108
2.4. *A. baumanni* complex 109
2.5. *P. aeruginosa* 111
2.6. Обобщено представяне на чувствителността 112
2.7. Обсъждане 113
3. Проучване на чувствителността към colistin чрез референтия метод за BMD съгласно стандарт ISO 20776-1. Оценка на ефективността на търговски кит за определяне на чувствителността към colistin (MICROLATEST MIC Colistin, Erba Lachema) чрез BMD, на метода на разреждане в агар и на метода на пре-дифузия в агар. Проучване на ефективността на RPNP и на Superpolymixin medium. 116
3.1. Референтен BMD метод 116
3.2. MICROLATEST MIC COLISIN 117
3.3. Метод на разреждане в агар 118
3.4. Определяне на чувствителността към colistin чрез метода на пре-дифузия 119
3.5. Обсъждане 120
3.6. Проучване на ефективността на RPNP като бърз скрининг тест за откриване на резистентност към colistin 122
3.7. Проучване на ефективността на Superpolymyxin Medium като screen agar за резистентност към colistin 123
3.8. Обсъждане 124
4. Определяне на мутант-превантивната концентрация (Mutant prevention concentration, MPC) на colistin при представителна част от изследваните щамове и изследване на влиянието на други антибиотици върху нея..... 127
5. Проучване на ефекта на различни антибиотични комбинации с colistin при карбапенем-резистентни щамове *K. pneumoniae* 131
5.1. Скрининг тест за синергизъм с colistin 131
5.2. Микродилуционен метод на El-Azizi 132
5.3. Time-kill assays (TKA) 134
5.4. Сравнение на резултатите 136
5.5. Обсъждане 137
6. Определяне на спектъра на произвежданите карбапенемази при

представителите на сем. *Enterobacteriaceae* и проучване на клоналната свързаност на изолатите при видове с установена резистентност към colistin……..... 140
6.1. *K. pneumoniae*……..... 140
6.1.1. Проучване на спектъра на произвежданите карбапенемази……..... 140
6.1.2. Епидемиологично типизиране 143
6.2. *E. coli* 145
6.2.1. Проучване на спектъра на произвежданите карбапенемази 145
6.2.2. Епидемиологично типизиране 146
6.3. *E. cloacae* complex 149
6.4. Обсъждане 149
7. Проучване на генетични механизми на резистентност към colistin 153

VI. ИЗВОДИ 159
VII. Справка за приносите на дисертационния труд 162
VIII. БИБЛИОГРАФИЯ 164
IX Публикации и научни прояви свързани с дисертационният труд 181

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ДДМ - Дисково-Дифузионен Метод

МПК - минимална потискаща концентрация (Minimal Inhibitory Concentration)

МСП - Мутант селекциониращ прозорец (Mutant Selection Window)

МХБ - Мюлер-Хинтън бульон

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

BMD - Broth MicroDilution (микроразреждане в бульон)

CA - Categorical agreement (сходство по категория)

CBA - colistin base activity

CFU - colony forming units (колония формиращи единици)

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

CMS - Colistimethate sodium (лекарствената форма за парентерално приложение)

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

Dab - Diamino butiric acid

EA - Essential agreement (съществено сходство)

EARS-Net - European Antimicrobial Resistance Surveillance - ne t

ERIC - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA - Food and Drug Administration

IS - Insertional Sequencies

L-Ara4N - L-аминоарабиноза

KPC - Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase

MD - Major discrepancy (голямо несъответствие)

MDR - multidrug-resistant

MLTCol - MICROLATEST MIC Colistin

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

MPC - Mutant Prevention Concentration (мутант-превантивна концентрация)

NDM - New Delhi methalo β-lactamase

PEtN - фосфоетанол амин

PDR - pandrug-resistant

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

RPNP - Rapid Polymyxin NP test

SA Col - Screen agar colistin

SPM - Superpolymyxin Medium

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

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

VIM - Verona Integron-Borne Metalo-β-lactamase

VMD - Very major discrepancy (много голямо несъответствие)

XDR - extensively drug-resistant

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Бързото увеличение на антибиотичната резистентност и липсата на нови антибиотици представлява изключително сериозен световен проблем [*Bergen et al., 2012*]. СЗО определя антибиотичната резистентност като една от трите най-големи заплахи за човешкото здраве [*Bergen et al., 2012*]. Особена тревога буди широкото разпространение на мултирезистентни Грам (-) бактерии - по-специално *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*. Тези микроорганизми, срещу които в близките години не се очаква откриване на нови ефективни антибиотици, са поставени от IDSA (Infectious Disease Society of America) в списъка с най-опасните човешки патогени [*Bergen et al., 2012*]. Счита се, че инфекциите, причинени от мултирезистентни Грам - отрицателни бактерии са причина за повече от 700 000 смъртни случая годишно, като до 2050г. се очаква техния брой да достигне 10 000 000 [*WHO. Antimicrobial resistance*]. От години, карбапенемите се използват като последно средство за лечение на тежки инфекции, причинени от мултирезистентни щамове. С появата и бързото разпространение на карбапенемаза-продуциращи представители на сем. *Enterobacteriaceae, Acinetobacter spp* и *P. aeruginosa,* резистентни на почти всички налични антибиотици, се стигна не само до подновяване на употребата на colistin в хуманната медицина, но и до включването му от СЗО в списъка на изключително важните антибиотици [*Schwarz & Johnson, 2016*]. Акуратното определяне на чувствителността към полимиксини е много важно, тъй като инфекциите с colistin - резистентни Грам - отрицателни бактерии са съпроводени с по-голяма смъртност [*Capone et al., 2013*].

В продължение на десетилетия обаче, colistin sulfate, заедно с други антибиотици се използва от много държави в животновъдството и в рибните ферми като добавка към храната на животните, тъй като се счита, че подобрява здравето и стимулира растежа им [*Liu et al., 2016*]. Световната потребност от colistin в селското стопанство се очаква да се повиши до 16 500 тона през 2021г, със среден годишен ръст от 4.75% [*Liu et al., 2016*]. Непрекъснато увеличаващата се значителна употреба на colistin във ветеринарния сектор, вероятно е довела до селективен натиск и значително увеличаване на резистентността към colistin, включително и до появата на плазмидно кодирани гени за резистентност. Като се има предвид бързото разпространение на други механизми на резистентност (New Delhi methalo β-lactamase, NDM), с появата на преносима резистентност към colistin, прогресията на *Enterobacteriaceae* от extensively

drug-resistant (XDR) към pandrug resistant (PDR) е неизбежна и в крайна сметка ще стане глобална [*Schwarz & Johnson, 2016*].

В последните няколко години, в България също сме свидетели на увеличаване на резистентността към карбапенеми при мултирезистентните Грам-отрицателни бактерии [*Poirel et al*., 2014; *Markovska et al*., 2014, 2015, 2016; *Savov et al.,* 2017, 2018; *Kostyanev et al.*, 2016; *Todorova et al.,* 2016]. Липсата на терапевтични алтернативи наложи подновяване на употребата на colistin и в нашата страна. Използваните понастоящем дозови режими и терапевтични схеми, обаче водят много често до терапевтичен неуспех, дори и при colistin чувствителни изолати. Актуалността на проблема се подчертава и от установеното нарастване на резистентността към този антибиотик [*Poirel et al*., 2017]. Всичко това налага провеждане на задълбочени проучвания върху чувствителността към colistin при мултирезистентните Грам-отрицателни бактериии, проучване на диагностичните параметри на методите за определяне на чувствителността към този антибиотик и *in vitro* изследване на възможностите за подходяща комбинирана терапия на инфекциите, причинени от XDR Грам - отрицателни бактерии.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

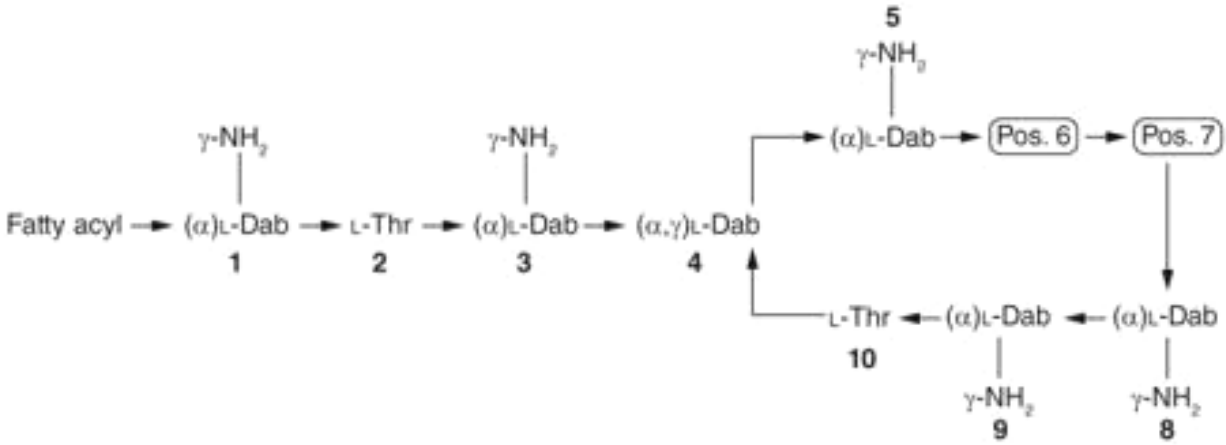
1. Характеристика на полимиксините

Полимиксините са нерибозомални циклични липопептидни антибиотици, открити през 1947г. [*Falagas et al., 2005*]. Имат сходна химична структура с катионните антимикробни пептиди (дефензини и грамицидини), които представляват първа линия на защита на еукариотните клетки срещу бактериална колонизация [*Poirel et al., 2017*]. Групата включва пет химично различни комплексни съединения (polymyxin A-E), от които в клиничната практика намират приложение само Polymyxin B и Polymyxin E (colistin) [*Li et al., 2006*]. Colistin (Polymyxin E) е изолиран през 1949г от *Bacillus (Paenibacillus) polymyxa var. colistinus* от японски колектив, ръководен от Koyama [*Li et al., 2001*]. Разрешен е за клинична употреба през 1959г. Първоначално се използва за лечение на инфекции, причинени от Грам - отрицателни бактерии. През 70те и 80те години на миналия век, поради проявените токсични свойства и наличие на по-безвредни алтернативи, употребата на colistin (полимиксините) постепенно намалява и парентералното му приложение е почти напълно преустановено [*Falagas et al., 2005*]. В следващите две десетилетия colistin се използва основно за лечение на белодробни инфекции, причинени от мултирезистентни Грам - отрицателни бактерии при пациенти с муковисцидоза [*Falagas et al., 2005*]. От 2000г, с появата и бързото разпространение на мултирезистентни Грам - отрицателни патогени в световен мащаб, интересът към полимиксините се поднови и по настоящем са една от малкото терапевтични възможности за лечение на инфекции, причинени от мултирезистентни *Pseudomonas, Acinetobacter, Klebsiella* и *Enterobacter* [*Yu et al., 2015*].

1.1. Химична структура

Colistin (Polymyxin E) е мултикомпонентен антибиотик, съставен от няколко близко родствени липопептида с обща структура - цикличен хептапептид с трипептидна странична верига, ацилирана в N-терминалния си участък от мастна киселина [*Li et al., 2005*]. Характерно за липопептидите от групата на Polymyxin E е наличието на D-Leu на позиция 6 и на Leu на позиция 7 [*Velkov et al., 2010*]. Отделните компоненти, обозначавани с цифри (Polymyxin E_1, E_2, E_3, E_4, E_7 и E_8-Ile), съдържат различни разклонени и неразклонени мастни ацилови групи с дължина 7 - 9 въглеродни атома [*Velkov et al., 2013*]. Polymyxin B и E имат почти идентична първична структура, като основната разлика е на позиция 6, където D-Leu при Polymyxin E е заменена от D-Phe при Polymyxin B (Фигура 1) [*Velkov et al., 2013*]. Формите за парентерално приложение

на Polymyxin B и E обикновено съдържат няколко различни компонента, като преобладаващи са съответно Polymyxin B_1 и B_2, и Polymyxin E_1 и E_2 (обикновено > 80%) [*Velkov et al., 2013*]. Полимиксините са амфипатични съединения [*Velkov et al., 2010*]. Посредставом 3D ядрено магнитен резонанс е установено, че молекулата им е нагъната и в нея се оформят две части - полярна и хидрофобна, което е есенциално за антибактериалната им активност [*Velkov et al., 2010*].



Фигура 1: Химична структура на polymyxin E (colistin) и polymyxin B. При polymyxin E (colistin) на позиции 6 и 7 – Leucin; при polymyxin B, D-Leu на 6 позиция се замества от d-phenylalanin; Thr = threonin; Dab=α,γ – diaminobutiric acid.(Адаптирано от: *Velkov et al.*, 2013)

1.2. Биосинтеза на полимиксините

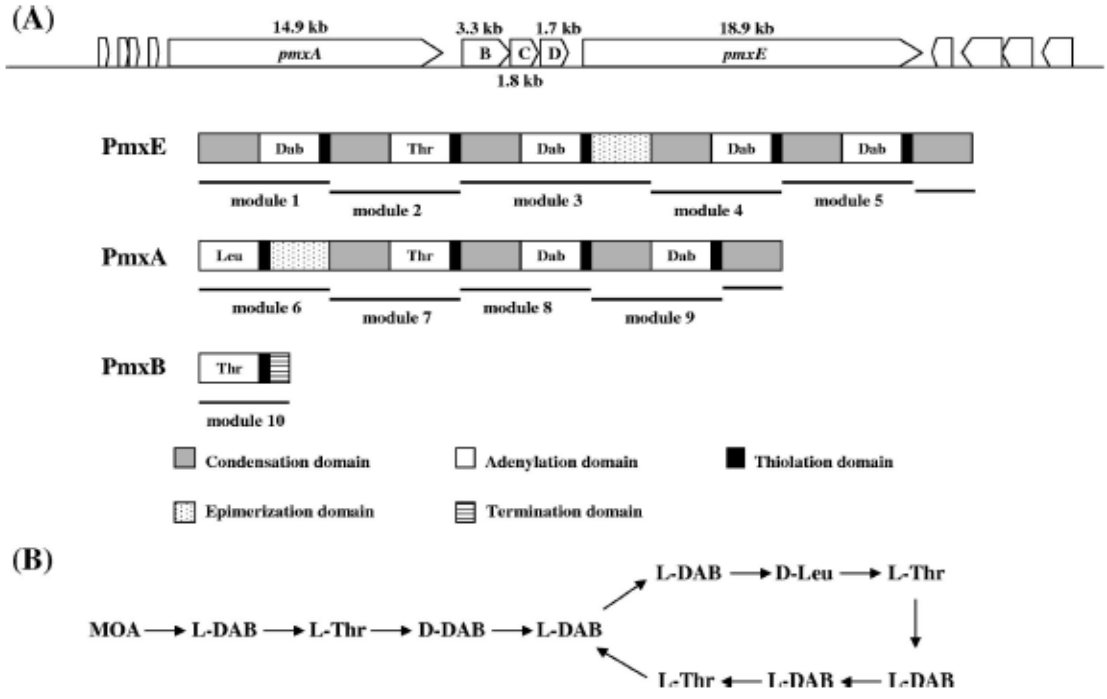
Полимиксините са нерибозомално синтезирани, антимикробни пептиди, произвеждани от почвените бактерии *Paenibacillus polymyxa* [*Clausell et al., 2007*]. За разлика от повечето пептиди, които се синтезират от рибозомите чрез транслация на иРНК, нерибозомалните се произвеждат от големи нерибозомални, пептид синтетазни ензимни комплекси (NRPS), с модулна структура [*Choi et al., 2009, Martinez-Nunez, 2016*]. Всеки модул на NRPS представлява обособен участък от мултиензима, отговорен за включване на една или повече аминокиселини в крайния продукт [*Choi et al., 2009*]. Модулите са съставени от различни домени, всеки един от които извършва специфична биохимична реакция [*Choi et al., 2009*].

Съществуват 3 основни домена - аденилиращ (A), тиолиращ (T) и кондензиращ (C) домен. А-доменът разпознава специфично аминокиселините и ги активира, Т - доменът е отговорен за транспортиране на субстрата и разполагане на междинните продукти в близост до каталитичните центрове, а С-доменът катализира образуването на пептидна

връзка. NRPS могат да включват и допълнителни модули като епимеризационен (E-домен) и тиоестеразен (TE-домен) [*Choi et al., 2009*].

Модулите и домените могат да се кодират последователно от генен клъстер. Биосинтетичният генен клъстер на полимиксините се нарича *pmx* и включва пет отворени рамки на четене - *pmxA, pmxB, pmxC, pmx D* и *pmxE*. Те кодират три полимиксин синтетази *PmxA, PmxB* и *PmxE* и два мембранни транспортни протеина *PmxC* и *Pmx D* [*Choi et al., 2009*]. *PmxA* е съставен от четири модула, чиито аминокиселинни субстрати са Leu за polymyxin E или Phe за polymyxin B, Thr, Dab и Dab, и C-домен. *PmxB*, отговорен за завършване на синтезата на полимиксини включва само 1 модул, чийто субстрат е аминокиселината Thr. *PmxE* има пет модула, аминокиселинни субстрати на които са Thr, Dab, Dab, Dab и C-домен [*Choi et al., 2009*].

В съответствие със структурата на полимиксините, подреждането на модулите при биосинтезата на полимиксини би трябвало да бъде PmxE-PmxA-PmxB (Фигура 2) [*Choi et al., 2009*].



Фигура 2. Биосинтеза на полимиксините. (A) генетична структура на *pmx* гените и организация на домените на Pmx ензимите; (B) първична структура на полимиксин A, MOA=6-methyloctanoic acid

(Адаптирана от **Choi SK**, Park SY, Kim R et al., "Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of Paenibacillus polymyxa and heterologous expression of the gene in bacillus subtilis", J Bacteriol, 2009; 191 (10), p.3353)

1.3. Антимикробен спектър

Colistin проявява бактерицидна активност срещу повечето Грам - отрицателни аеробни бактерии, включително *Acinetobacter spp, P. aeruginosa, Klebsiella spp, Enterobacter spp, Escherichia coli, Salmonella spp, Citrobacter spp, Yersinia pseudotuberculosis, Haemophilus influenzae* [*Falagas et al., 2005*]. Притежава също и значима *in vitro* активност спрямо *Stenotrophomonas maltophilia (83% - 88%)* [*Falagas et al., 2005*].

Счита се, че може да бъде потенциално активен срещу няколко вида микобактерии - *Mycobacterium xenopi, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium phlei и Mycobacterium smegmatis* [*Falagas et al., 2005*].

Вродено резистентни към colistin са *Burkholderia mallei, Burkholderia cepacia* complex, *Proteus spp, Providencia spp, Morganella spp, Serratia spp, Edwardsiella spp, Brucella spp,* аеробни Грам - положителни и Грам - отрицателни коки, Грам - положителни аеробни бактерии, всички анаероби, фунги и паразити [*Falagas et al., 2005; Olaitan et al., 2014*].

1.4. Механизъм на действие

Полимиксините проявяват много бързо бактерицидно действие спрямо чувствителните микроорганизми, по все още ненапълно изяснен механизъм [*Nation et al., 2009*].

Счита се, че те взаимодействат последователно с външната и вътрешната мембрани на Грам - отрицателните бактерии (Фигура 3) [*Clausel et al., 2007*]. Полимиксините са силно амфипатични молекули, с катионен заряд при физиологично pH (пет положителни заряда, които се дължат на Dab). Катионният характер на тези молекули улеснява преференциалното им взаимодействие с бактериалните мембрани, богати на анионни фосфолипиди, като фосфатидил глицерол и кардиолипин [*Clausel et al., 2007*]. За разлика от бактериите, външния слой на мембраните на клетките на бозайниците е съставен основно от фосфатидилхолин и холестерол, в резултат на което те са електронеутрални при физиологично pH [*Clausel et al., 2007*]. Първична мишена за действието на полимиксините е външната мембрана [*Velkov et al., 2010*]. Тази мембрана, за разлика от цитоплазмената, има сложна асиметрична структура. Съставена е от вътрешен фосфолипиден слой и външен слой, който съдържа предимно липополизахарид (LPS), протеини и фосфолипиди. Липополизахаридът е изграден от три части - вариабилна О-антигенна верига, сърцевинен олигозахариден регион и липид А. Липид А е вмъкнат във външния слой и функционира като хидрофобна котва [*Raetz et al., 2002*]. Представлява β-1'-6-свързан D-глюкозамин дизахарид, който е

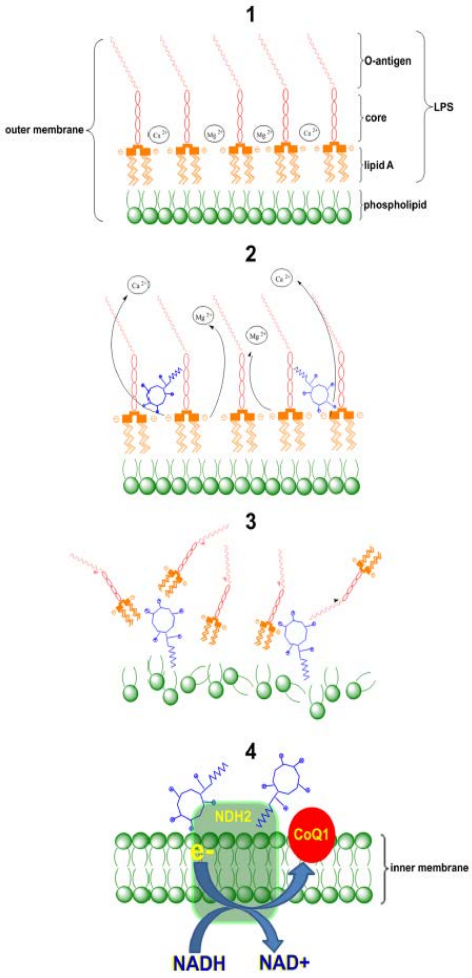
фосфорилиран при позиции 1' и 4' [*Nicaido, 2003*]. Сатурираните въглеводородни вериги на липид А са плътно пакетирани във външната мембрана посредставом *van der Waals*'ови сили, а съседните липополизахаридни молекули са свързани чрез двувалентни Ca^{2+} и Mg^{2+} катиони [*Raetz et al., 2002*]. Бариерната функция на външната мембрана се усилва допълнително от силно репулсивния анионен заряд на фосфоестерните остатъци на липид А и карбоксилните функционални групи в сърцевинните и О-антигенни захари [*Raetz et al., 2002*].

Първоначално, полимиксините, посредством катионните Dab странични вериги взаимодействат електростатично с анионните липополизахаридни молекули, при което изместват свързващите ги двувалентните Ca^{2+} и Mg^{2+} [*Velkov et al., 2010, 2013*]. Електростатичните взаимодействия намаляват стабилността на външната мембрана, което дава възможност на N-терминалната мастна ацилова опашка да се вмъкне във външния липиден слой и да предизвика нарушаване на интегритета му [*Hancock et al., 1999*]. Мастната киселина на полимиксините е много важна за антибактериалното им действие. Установено, че полимиксин нонапепептид няма антибактериална активност [*Ofec, 1994*].

След като преминат през външната мембрана, полимиксините достигат до периплазменото пространство и предизвикват молекулярни контакти (образуване на везикули), съпроводени с обмен на анионни фосфолипиди между периплазмените слоеве на двете мембрани [*Cajal et al., 1996, Clausell, 2007*]. Това от своя страна предизвиква загуба на структурна идентичност на мембраните, осмотична нестабилност и вероятно - лизиране на клетките [*Cajal et al., 1996, Clausell, 2007*].

Последващите събития остават ненапълно изяснени. Според *Deris et al., 2014,* втора мишена за действието на полимиксините при Грам - отрицателните бактерии вероятно е тип II NADH - quinone (reduced nicotinamide adenine dinucleotide - quinone, редуциран никотинамид аденин - квинон) оксиредуктазния ензим, който представлява интегрална част от електронно-транспортния път при бактериите. NADH-quinone оксиредуктазите са флавоензими, които участват в дихателните вериги на различни микроорганизми [*Matsushita et al., 1987*]. NDH-2 се обозначава често и като "алтернативна" NADH-quinone оксиредуктаза, която не изпомпва протони през вътрешната мембрана [*Matsushita et al., 1987*]. Подобен NDH-2 ензим е важна мишена за създаване на антимикробни агенти, най-вече срещу причинителите на малария и туберкулоза [*Deris et al., 2014*], но проучванията върху този ензим при Грам - отрицателните бактерии са много ограничени. Установено е, че Polymyxin B, B_1, B_2 и colistin инхибират некомпетитивно

активността на NDH-2 по концентрационно зависим начин [*Deris et al., 2014*]. Polymyxin B е по-добър инхибитор от colistin при Грам - отрицателните бактерии, подобно на наблюдаваното при *M.smegmatis* [*Deris et al., 2014*]. Основна роля за инхибиране на NDH-2 имат N-терминалната мастна ацилова верига и положителните заряди на полимиксиновите молекули [*Deris et al., 2014*].



Стъпка 1: полимиксините достигат до външната мембрана на Грам - отрицателните бактерии.

Стъпка 2: Положително заредените полимиксинови молекули изместват двувалентните катиони, които свързват съседно разположените липополизахаридни молекули.

Стъпка 3: Електростаичните взаимодействия намаляват стабилността на външната мембрана, след което хидрофобните участъци на полимиксините се вмъкват между липидите на външната мембрана и нарушават интегритета ù.

Стъпка 4: Полимиксините проникват във вътрешната мембрана и инхибират респираторния ензим NDH-2.

Фигура 3. Схематично представяне на възможния механизъм на действие на полимиксините на ниво външна и вътрешни мембрани при Грам - отрицателните бактерии. (Адаптирана от: **Deris ZZ et al.,** 2014)

Полимиксините вероятно могат да предизвикват клетъчна смърт и чрез натрупване на хидроксилни радикали (OH^-) при *A.baumanni* [*Sampson et al., 2012*]. Нарушенията в електронно-транспортната верига стимулират производството на супероксид, който може да участва в реакцията на Fenton и да индуцира производството на хидроксилни радикали [*Sampson et al., 2012*]. Тази реакция настъпва, когато супероксидите O_2^- се превръщат в пероксиди чрез супероксид дисмутазите в клетката. Впоследствие, H_2O_2 окислява Fe^{2+} до Fe^{3+}, при което се образуват OH^-. Когато концентрацията на OH^-

достигне до неконтролируемо ниво настъпва оксидативно увреждане на ДНК, липиди и протеини, и накрая - клетъчна смърт [*Sampson et al., 2012*].

В допълнение, освен директна антибактериална активност, колистинът и полимиксините притежават също и мощна анти-ендотоксинова активност [*Falagas et al., 2005*]. Ендотоксинът на Грам - отрицателните бактерии е липид А на липополизахарида. Колистин притежава способността да се свързва и да неутрализира ендотоксина. Значението на този механизъм за антимикробното действие *in vivo*, а именно, предотвратяване на възможността на ендотоксина да предизвика шок посредством освобождаване на цитокини е неясен, тъй като плазменият ендотоксин взаимодейства веднага с LPS-свързващ протеин, след което комплексът бързо се свързва с намиращите се на повърхността на клетките CD14 [*Gough M et al. 1996*].

2. Механизми на резистентност

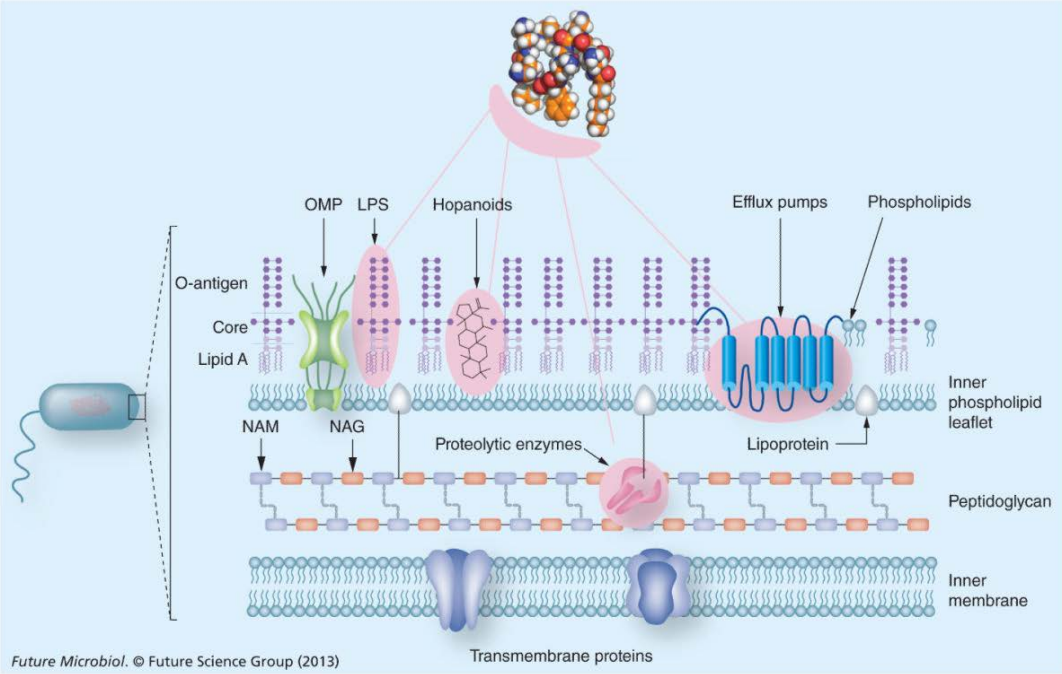
Бактериите използват различни стратегии за защита от вредни стимули на околната среда, включително и от действието на катионни антимикробни пептиди, като полимиксините (Фигура 4). Тези стратегии включват:

- ✓ Модификации на липополизахаридите - ковалентни модификации на липид А с фосфоетаноламин (PEtN) и аминоарабиноза (L-Ara4N), деацилиране, хидроксилиране [*Velkov et al., 2013*], които намаляват общия негативен заряд на повърхността на клетките и понижават афинитета към полимиксините [*Moffatt et al., 2010*]
- ✓ Загуба на липополизахарид, а следователно - загуба на мишената при *A. baumannii* [*Moffat et al., 2010*]
- ✓ Свръхпродукция на капсулен полизахарид
- ✓ Отделяне на свободни анионни капсулни полизахариди [*Llobet et al., 2008*]
- ✓ Използване на ефлуксни помпи [*Campos et al., 2004*]
- ✓ Промяна на външно мембранни протеини [*Macfarlane et al., 1999, Llobet et al., 2009*]

2.1. Хромозомно кодирани механизми на резистентност към полимиксини

Голяма част от тези модификации се дължат основно на хромозомни мутации. Поради голямото сходство в химичната структура на полимиксините е налице кръстосана резистентност между colistin и polymyxin B [*Velkov et al., 2010*]. Липополизахаридът (LPS) във външната мембрана на Грам - отрицателните бактерии е изграден от три части - О-антиген, сърцевинен олигозахарид и липид А. Той не е статична структура и

може да бъде модифициран по различни начини, под влияние на фактори на средата, което е важно за резистентността на бактериите към антибактериални агенти и за избягване на имунната защита на организма [*Chen & Groismann, 2013*]. Модификации във всеки един от тези региони може да предизвика резистентност към полимиксини.



Фигура 4. Механизми на резистентност към полимиксини (Адаптирана от *Velkov et al., 2013*)

2.1.1. Модификации на липид А

При *S.Typhimurium*, като и при други Грам - отрицателни бактерии (*P. aeruginosa, K. pneumoniae*), 1- и 4' фосфатните групи на липид А могат да бъдат ковалентно модифицирани с фосфоетаноламин (PEtN) или 4-амино-деокси-L-арабиноза (L-Ara-4N). Добавянето на PEtN към липид А се катализира от генния продукт на *pmrCAB* (*pmrC*), докато добавяне на L-Ara-4N в липид А се медиира от продукти на оперона *arnBCADTEF-pmrE* и от *гена ugd* [*Chen & Groismann, 2013, Olaitan et al., 2014*].

Добавянето на L-Ara-4N и PEtN става само в новосинтезиращи се липид А молекули [*Chen & Groismann, 2013*]. Каталитичните домени на ензимите, които медиират този трансфер са разположени в периплазмената част на вътрешната мембрана [*Chen & Groismann, 2013*]. PmrC - медиира включването на PEtN предимно на 1 позиция в липид А, докато L-Ara-4N се добавя основно на 4'-позиция [*Chen & Groismann, 2013*].

Ковалентните модификации на липид А с L-Ara-4N и PEtN неутрализират нетния негативен заряд на липид А и намаляват свързването на катионните антимикробни

пептиди с бактериалната повърхност. PEtN намалява нетния заряд на липид А от (-1,5) до (-1), докато L-Ara-4N го намалява до 0 [*Nicaido, 2003*], поради което модификациите на LPS с L-Ara4N водят до по-високо ниво на резистентност към полимиксини, отколкото тези, свързани с PEtN [*Tamayo et al., 2005*].

При повечето Грам - отрицателни бактерии с вродена резистентност към полимиксини (*Proteus, Providencia, Morganella, Serratia, Edwardsiella tarda, Burkholderia cepacia complex*) са налице модификации на липополизахарида с L-Ara4N [*Olaitan et al., 2014*].

Макар и рядко, при някои видове бактерии са възможни и други видове модификации на липид А. Например, при *Vibrio cholerae El Tor*, резистентността към colistin / полимиксини се дължи на модификация на 3'-свързаната вторична ацилова верига на липид А с глицин (и/или диглицин) [*Hankins et al., 2012*], а при клинични изолати *A. baumannii*, резистентни на полимиксини, е установена уникална структурна модификация на липид А - едновременно с PEtN и гликозилиране с галактозамин (GalN) [*Pelletier et al., 2013*].

Едно-фосфат на липид А може да бъде фосфорилиран от LpxT, при което се образува 1-дифосфат (1-PP) [*Olaitan et al., 2014*]. Тази промяна увеличава негативния заряд на липид А и намалява ефикасността на модификацията с PEtN. Активността на LpxT се инхибира чрез активиране на *pmrA* чрез PmrR, което допълнително увеличава резистентността към полимиксини [*Olaitan et al., 2014*].

Двукомпонентни системи

Промените в липополизахарида се медиират предимно от двукомпонентни системи, които регулират експресията на гените, отговорни за химичната му модификация [*Chen & Groismann, 2013*]. Двукомпонентните системи са широко разпространени сред бактериите [*Wang, 2012*]. Те играят важна роля при адаптацията им към обкръжаващата ги среда [*Wang, 2012*]. Поради липсата им при хора и бозайници, те се считат за потенциална мишена за създаване на нови антибиотици [*Wang, 2012*]. Повечето двукомпонентни системи се състоят от два протеина - сензорна хистидин киназа и регулатор на отговора [*Wang, 2012*]. Сензорната хистидин киназа регистрира специфични сигнали в средата, които предизвикват активиране на киназната активност и автофосфорилиране на хистидиновия остатък [*Wang, 2012*]. Впоследствие, фосфорилната група се прехвърля на спрегнатия регулатор на отговора и го активира [*Wang, 2012*]. Повечето регулатори на отговора регулират транскрипцията на

определени гени, които се "включват" и "изключват", в зависимост от получените сигнали от сензорната хистидин киназа [*Wang, 2012*].

Основен регулатор на гените, които модифицират химично липополизахарида при много видове бактерии като *Salmonella enterica, E. coli, K. pneumoniae, Yersinia pestis, Citrobacter rodentium, P. aeruginosa* е двукомпонентната система PmrA/PmrB [*Chen* & *Groismann, 2013*]. Тази система е проучена най-добре при *Salmonella enterica.*

PmrA/PmrB се активира, когато периплазмено разположеният сензор PmrB регистрира в околната среда наличие на високи концентрации на Fe^{3+}, Al^{3+}, или леко кисело pH (pH 5.8). В отговор на тези индуциращи сигнали, PmrB се автофосфорилира и прехвърля фосфорилната група на спрегнатия регулатор PmrA. Фосфорилираната форма на PmrA (PmrA-P) е активната форма на протеина, който се свързва с ДНК и стимулира експресията на PmrA-активираните гени и инхибира експресията на PmrA-репресираните. При липса на индуциращи сигнали PmrB протеина функционира основно като PmrA-P фосфатаза [*Chen* & *Groismann, 2013*].

PmrA/PmrB може да се активира и индиректно, посредством друга двукомпонентна система PhoP/PhoQ [*Chen* & *Groismann, 2013*]. При оптимални условия на растеж, PhoP/PhoQ е репресирана и може да се активира при ниски концентрации на Mg^{2+} в средата или наличие на сублетални концентрации на антимикробни пептиди [*Velkov et al., 2013*]. При този процес PhoQ, сензорна киназа на вътрешната мембрана, фосфорилира PhoP [*Velkov et al., 2013*], който от своя страна, активира гена *pmrD*, при което се синтезира PmrD [*Chen* & *Groismann, 2013*]. PmrD е протеин, съставен от 85 аминокиселини, който регулира посттранслационно активността на PmrA [*Chen* & *Groismann, 2013*]. Той стабилизира фосфорилираната форма на PmrA, като я защитава от дефосфорилиране от PmrB [*Chen* & *Groismann, 2013*]. Тази протекция позволява експресията на PmrA-зависимите гени при ниски концентрации на Mg^{2+}, дори при липса на Fe^{3+}, който стимулира фосфатазната активност на PmrB [*Chen* & *Groismann, 2013*]. PmrD е представител на клас протеини, наречени конектори, които подпомагат активирането на двукомпонентните системи, при липса на техните активиращи сигнали, като по този начин създават регулаторна връзка между две независими системи [*Chen* & *Groismann, 2013*].

Гените, които се активират от PmrA/PmrB, могат да предизвикват химични модификации и в трите региона на LPS-молекула (Таблица 1)

Счита се, че някои катионни антимикробни пептиди - polymyxin B, colistin, C18G, LL-37, протегрин, могат да активират директно PhoP/PhoQ и по този начин да стимулират

транскрипцията на PmrA-зависимите гени. За разлика от ниската концентрация на Mg^{2+}, която активира целия PhoP регулон, катионните антимикробни пептиди активират само част от гените в PhoP и PmrA, както степента на тази активация, по неизвестни все още причини, е различна при различните пептиди [*Chen* & *Groismann, 2013*].

Таблица 1: Влияние на системата PmrA/PmrB върху експресията на гени, които модифицират липополизахарида [Адаптирана от *Chen* & *Groismann, 2013*].

Ген	Ефект
cptA/yijP	Добавяне на фосфоетаноламин (PEtN) в сърцевинния регион
pbgPE/arn/pmrHFIJKLM оперон (известен също като arnBCADTEF-pmrE)	Модификация на липид А с L-Ara-4N
pmrC/yjdB (*pmrCAB*)	Модификация на липид А с фосфоетаноламин (PEtN)
pmrG	Дефосфорилиране на Hep (II) фосфат в сърцевинния регион
pmrR	Негативен регулатор на LpxT - протеин, отговорен за образуването на дифосфорилиран липид А на позиция I
ugd	Синтез на UDP-глюкоза дехидрогеназа, която превръща UDP-глюкоза в UDP-d-глюуронова киселина и модификация на липид А с L-Ara-4N
$wizz_{fepE}$	Синтез на много дълги О-антигенни вериги
$wizz_{ST}$	Синтез на дълги О-антигенни вериги

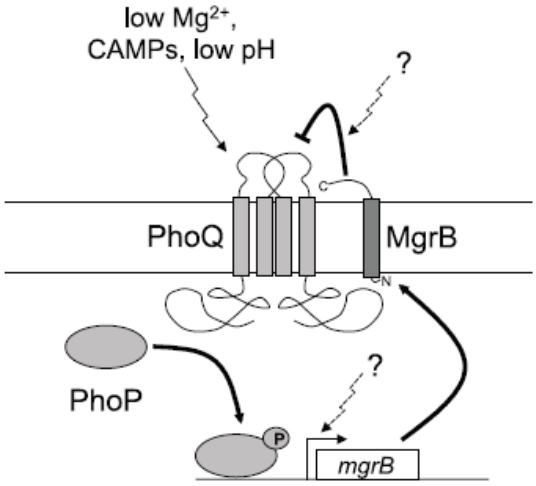
Мутации в гените, кодиращи PhoP/PhoQ и PmrA/PmrB могат да причинят тяхната конститутивна свръхекспресия, което да доведе до активиране на *pmrCAB* и *arnBCADTEF-pmrE,* с последваща модификация на липополизахарида с PEtN и L-Ara4N [*Barrow* & *Kwon, 2009*]. Описани са общо 27 независими "missense" мутации на гените *pmrA* и *pmrB*, които предизвикват повишена експресия на *arnB* [*Olaitan et al., 2014*]. Генът *pmrB* мутира по-често, в сравнение с гена *pmrA* [*Olaitan et al., 2014*].

При *P. aeruginosa*, резистентността към полимисини е свързана с мутации в поне още 3 двукомпонентни системи - ColR/ColS, Cpr/CprS [*Gutu et al., 2013*] и ParR/ParS [*Fernandez et al., 2010, 2012*]. ColR/ColS и Cpr/CprS предизвикват високо ниво на резистентност към colistin, по все още недостатъчно проучен механизъм [*Gutu et al., 2013*]. ParR/ParS участва в адаптивната резистентност към полимиксини, като мутации в тази система предизвикват конститутивна експресия на *arnBCADTEF* [*Fernandez et al., 2010, 2012*].

Регулатори на двукомпонентните системи pmrAB и phoPQ

Друг важен механизъм на резистентност към colistin/полимиксини при *K. pneumoniae, E. coli, Salmonella enterica, Yersinia pestis,* а вероятно и при други Грам - отрицателни

бактерии, е мутация / инактивация на гена *mgrB* [*Canntelli et al., 2013*]. Този ген има дължина 141 нуклеотида и кодира малък, съставен от 47 аминокиселини, трансмембранен протеин (MgrB), който осъществява негативна обратна връзка в регулаторната система PhoP/PhoQ (Фигура 5) [*Lippa* & *Guilian, 2009*]. Стимулацията на PhoQ под действие на катионни пептдиди или ниска концентрация на Mg^{2+} води до повишено ниво на фосфорилиран PhoP, който от своя страна предизвиква повишена транскрипция на *mgrB.* Mgr B е разположен във вътрешната мембрана по такъв начин, че N-терминалния му край е в цитоплазмата, а C-терминалния - в периплазмата [*Lippa* & *Guilian, 2009*]. Предполага се, че MgrB репресира PhoQ, чрез инхибиране на киназната и/или стимулиране на фосфатазната му активност, което води до потискане на фосфорилирането на PhoP и до репресия на гените, регулирани от PhoP [*Lippa* & *Guilian, 2009*]. Делецията на *mgrB* или инактивирането му посредством различни инсерционни последосвателности (*IS5-like, IS903B, IS1F-like, ISKpn14*), предизвиква повишена експресия на гените, регулирани от PhoP [*Lippa* & *Guilian, 2009, Canntelli et al., 2013*]. Установено е, че активирания PhoP може също директно да активира *arnBCADTEF* при *K. pneumoniae*, по механизъм независим от PmrD и PmrA [*Mitrophanov et al., 2008*].



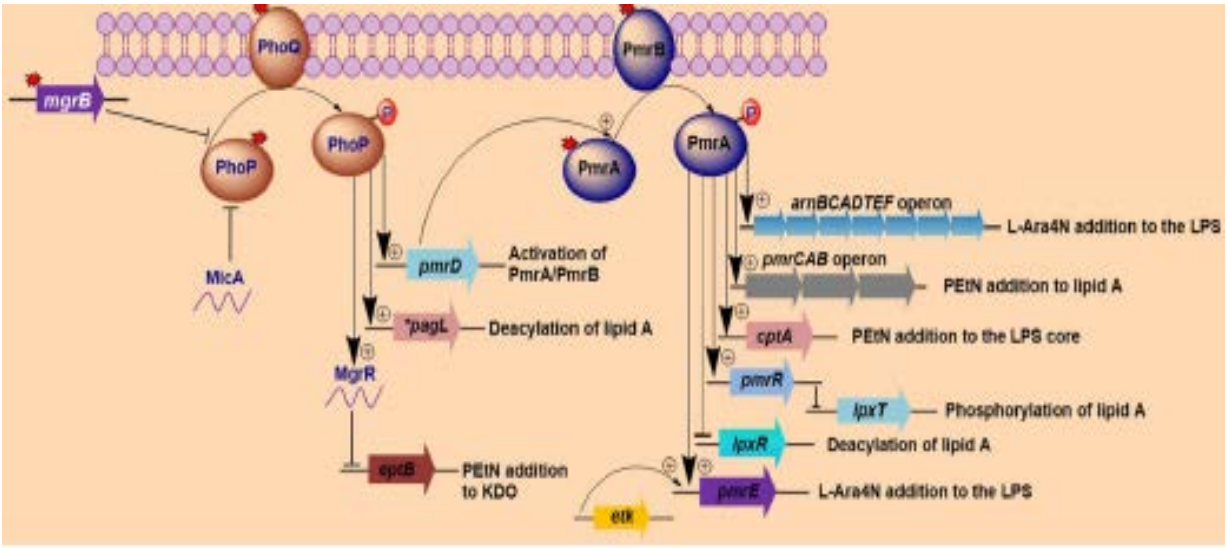
Стимулирането на PhoQ от ниски екстрацелуларни концентрации на Mg^{2+} или от катионни антимикробни пептиди води повишено ниво на фосфорилиран PhoP, което от своя страна предизвиква увеличена транскрипция на mgrB. MgrB е вмъкнат във вътрешната мембрана по такъв начин, че N-терминалния му край е в цитоплазмата, а C-терминалния - в периплазмата. По все още неизяснен механизъм репресира PhoQ, което предизвиква намалено фосфорилиране на PhoP.

Фигура 5: Механизъм на осъществяване на обратна връзка от MgrB. (Адаптирана от Lippa & Goulian, 2009)

Друг ген, свързан с резистентността към полимиксини при *K. pneumoniae* е *crrAB. crrAB* оперона кодира два протеина - регулаторният протеин CrrA и сензорната киназа CrrB, чиято физиологична роля все още не е известна [*Wright et al., 2015*]. Мутации в *crrB* гена индуцират експресията на CrrC, като по този начин предизвикват повишена експресия на *pmrHFIJKLM (arnBCADTEF)* оперона и *pmrC*, в резултат на което се

развива високо ниво на резистентност към colistin [*Cheng et al., 2016*]. Хомолози на CrrC са открити при много Грам (-) бактерии (*E. coli, K.oxytoca, E.cloacae, S. flexneri*) и имат поне 45% аминокиселинна идентичност [*Cheng et al., 2016*]. Функцията на CrrC все още не е изяснена [*Cheng et al., 2016*]. Предполага се, че *CrrC* може да осъществява връзка (директна или индиректна) между системите CrrAB и PmrAB [*Cheng et al., 2016*].

Двукомпонентната система PhoP/PhoQ се регулира също и от Hfq-зависима малка, некодираща РНК, наречена MicA, която репресира експресията на PhoP [*Coornaet et al., 2010*]. MicA директно взаимодейства с *phoPQ* иРНК и инхибира транслацията чрез конкурентно свързване с рибозомите [*Coornaert et al., 2010*]. Възможно е мутации в *micA* също да имат отношение към резистентността към полимиксини [*Olaitan et al., 2014*]. Схематично, механизмите за активиране на липополизахарид модифициращите гени са представени на Фигура 6.



Фигура 6. Активиране на липополизахарид модифициращите гени, медииращи резистентност към полимиксини при Грам - отрицателните бактерии. MgrB и MicA (при *E. coli*) осъществяват негативна обратна връзка на регулаторната система PhoP/PopQ. Мутациите в *mgrB* или *phoP/phpQ* предизвикват конститутивна индукция на двукомпонентната система PhoP/PopQ. Активирането на PhoP/PopQ предизвиква активиране на *pagL* (който деацилира липид А при *Salmonella*) и *pmrD* (който от своя страна активира *pmrA*) и репресира *eptB* чрез активиране на MgrR, при което се получават модификации на липополизахарида. В допълнение, регулаторната система PhoP/PopQ може директно да активира оперона *arnBCADTEF* при някои бактерии като *K. pneumoniae*. Репресията на *eptB* предотвратява модификацията на Kdo с PEtN. Двукомпонентната система PmrA/PmrB се активира посредством *pmrD* (който се активира от PhoP) или чрез мутации в гените *pmrA/pmrB*. След като се индуцира, фосфорилираната pmrA активира гените *arnBCADTEF* и *pmrE*, който съвместно модифицират LPS с L-Ara-4N. Липид А и сърцевинния олигозахарид се модифицират чрез PEtN посредством съответно оперона *pmrCAB* и *cptA*. Други гени, които се активират от *pmrA* са *pmrR*, който репресира *lpxT* (който фосфорилира липид А) при активиране и *lpxR* (който деацилира липид А). Накрая, *etK* може допълнително да фосфорилира *pmrE*. Адаптирана от [*Olaitan et al., 2014*].

Транскрипционен регулатор Ram A

RamA е друг важен транскрипционен регулатор при *K. pneumoniae*, който участва в регулацията на 68 гена, свързани с много клетъчни функции, голяма част от които имат отношение към антимикробната резистентност и вирулентността [*De Majumdar et al., 2015*]. Открит е също и при *Enterobacter spp, Salmonella spp, Citrobacter spp* [*De Majumdar et al., 2015*]. RamA директно свързва и активира гените *lpxC, lpxL-2, lpxO,* които са свързани с биосинтезата на липид А, в резултат на което се получават модификации на LPS. Свръхекспресията му намалява чувствителността на щамовете към полимиксини и човешкият катионен антимикробен пептид LL-37 [*De Majumdar et al., 2015*].

2.1.2. Модификация на сърцевинния олигозахарид (Kdo)

Регулираните от PmrA модификации на сърцевинния олигозахарид на липополизахарида се осъществяват от ензимите CptA и PmrG. CptA добавя pEtN към Hep (I) фосфатната група в сърцевинния регион - значението на тази модификация е неясно. Периплазменият протеин PmrG е фосфатаза, която действа на Hep (II) фосфат. Тази модификация няма отношение към резистентността към полимиксини [*Chen & Groismann, 2013*]. Генът *eptB* кодира фосфоетаноламин трансфераза, която модифицира Kdo на липополизахарида с фосфоетаноламин [*Reynolds et al., 2005*]. Модификацията на сърцевинния олигозахарид с PEtN намалява нетния негативен заряд на липополизахарида и води до резистентност към полимиксини [*Moon & Gottesman, 2009*]. Експресията на *eptB* се инхибира от MgrR - Hfq-зависима малка, некодираща РНК (sRNA), част от регулона PhoP/PhoQ. sRNA = некодиращи малки РНК играят важна роля в посттранскрипционалната регулация на генната експресия. Установени са 80 малки РНК при *E. coli*, 1/3 от тях се свързват с РНК-шаперона Hfq. Hfq стабилизира тези малки РНК *in vivo* и стимулира свързването с мишените им *in vitro*. Клетки с делеция на *mgrR* са приблизително 10 пъти по-резистентни към полимиксини [*Moon & Gottesman, 2009*].

2.1.3. Модификация на дължината на О-антигена

Дължината на О-антигена се контролира от активираните от PmrA гени $wizz_{fepE}$ и $wizz_{ST}$, които кодират продукти, отговорни за получаването на много дълги и дълги О-антигенни вериги. Експресията на $wizz_{fepE}$ и $wizz_{ST}$ води до повишена резистентност към комплемент и полимиксини при *S.Typhimurium* [*Chen & Groismann, 2013*].

Гените, които модифицират липополизахарида могат да бъдат активирани и от други регулаторни системи, независими от PmrA/PmrB [*Chen* & *Groismann, 2013*].

При *A. baumannii,* резистентността към полимиксини може да се дължи и на пълна загуба на липополизахарид [*Moffatt et al., 2010*]. Предизвиква се от мутации в гените *lpxA, lpxC* и *lpxD*, които водят до инактивиране на синтезата на липид А, а оттам и до липса на липополизахарид [*Moffatt et al., 2010*]. За да компенсират намаления външно мембранен интегритет, свързан със загубата на липополизахарида, полимиксин-резистентните щамове *A. baumannii* повишават експресията на гени от биосинтетичните системи, отговорни за фосфолипид, липопротеин и поли-β-1,6-N-ацетилглюкозамин, като по този начин увеличават здравината на клетъчната обвивка [*Henry et al., 2012*].

При някои видове, съществуват уникални механизми за резистентност към полимиксини, различни от модификацията на липополизахарида.

2.1.4. Свръхпродукция на капсулен полизахарид и отделяне на свободни капсулни полизахариди.

Капсулният полизахарид при *K. pneumoniae* действа като протективна бариера срещу полимиксини [*Campos et al., 2004*] и намалява свързването им с външната мембрана. Това свойство на капсулния полизахарид не е свързано със серотипа или с химическия състав, но зависи от количеството на произведения капсулен полизахарид [*Campos et al., 2004*]. Установено е, че *K. pneumoniae* могат да отделят под влияние на полимиксини, извънклетъчни комплекси, които съдържат основно анионни капсулни полизахариди [*Llobet et al.,* 2008]. Те могат да улавят полимиксините и да ги неутрализират, като по този начин не им позволяват да достигнат до клетъчната повърхност, което фенотипно се проявява с резистентност [*Llobet et al.,* 2008]. Капсулните полизахариди при *K. pneumoniae* се свързват към клетъчната повърхност чрез йонни връзки между полизахарида и сърцевинния регион на липополизахарида. Взаимодействието се стабилизира от двувалентни катиони. Полимиксините нарушават връзките между капсулата и клетъчната стена и предизвикват отделяне на свободен капсулен полизахарид [*Llobet et al.,* 2008].

2.1.5. Промени в експресията на външно мембранни протеини (OMP) и ефлуксни помпи

Външно-мембранните протеини (Outer Membrane Proteins, OMP) са важни за интегритета на мембраните, транспорта на молекули и патогенезата. При *K. pneumoniae,* недостигът на външно мембранния протеин OmpA, се свързва с повишена

чувствителност към полимиксини [*Llobet et al., 2009*]. OmpA е добре характеризиран OMP, който медиира адхезията и/ или инвазията на еукариотните клетки, серумната резистентност, както и защитата на бактериите от белодробните колектини. OmpA е мишена и на вродената имунна защита - еластазата на неутрофилите разгражда OmpA, което предизвиква смърт на клетките, а свързването на серумния амилоид А с OmpA има опсонизиращ ефект [*Llobet et al., 2009*].

Резистентността към полимиксини при *P. aeruginosa* се свързва с промени в експресията на външно-мембранния протеин OprH, който се счита, че изпълнява мембранно-стабилизираща роля при недостиг на Mg^{2+} [*Macfarlane et al., 1999*].

AcrAB-TolC ефлуксната помпа е свързана с резистентността към полимиксини и ефлукс от *K. pneumoniae* и *E. coli* [*Padilla et al., 2010, Warner et al., 2010*].

NorM - multidrug efflux pump при *Burkholderia vietnamien* също допринася за резистентността към полимиксини [*Fehlner-Gardiner et al., 2002*].

В биофилми на *P. aeruginosa, Pamp et al., 2008,* установяват наличие на две физиологични субпопулации - едната чувствителна на colistin, а другата - резистентна. Развитието на толеранс към colistin/полимиксини в зрял биофилм на *P. aeruginosa* е зависимо от клетъчната метаболитна активност, но не зависи от подвижността на клетките [*Pamp et al., 2008*]. Метаболитно активните клетки могат да се адаптират към терапия с colistin/полимиксини чрез включване на специфични механизми за адаптация, медиирани от pmr оперона, както и неспецифични механизми на адаптация, медиирани от mexAB-oprM [*Pamp et al., 2008*]. Метаболитната активност е най-висока в най-горния слой на биофилма. Клетките с най-висока метаболитна активност индуцират *pmrHFIJKLM (arnBCADTEF)* оперона при терапия с colistin и оцеляват. Резистентността към полимиксини в метаболитно активната субпопулация е свързана и със свръхекспресия на mexAB-oprM ефлуксната помпена система [*Pamp et al., 2008*].

2.1.6. Хопаноиди

Хопаноидите са амфипатични, стерол-подобни съединения в мембраните на много видове бактерии, които се счита, че увеличават ригидността на липидния матрикс и подобряват бариерни свойства на мембраните [*Sahm et al., 1993*]. Счита се, че хопаноиди в цитоплазмената мембрана допринасят за вродената резистентност на бактериите към антибиотици [*Malott et al., 2012*]. Дефицитът на хопаноиди при *Burkholderia multivorans* е съпроводено с увеличаване на чувствителността на бактериите към полимиксини [*Malott et al., 2012*].

2.1.7. Хетерорезистентност

Хетерорезистентността към антибиотици е феномен, който се характеризира с наличие на субпопулации с различно ниво на резистентост към даден антибиотик в щамове, определени като чувствителни при използване на стандартните методи за определяне на чувствителността [*El-Halfawy* & *Valano, 2015*]. Хетерорезистентността е установена още през 1947г. при изследване на *H.influenzae* и се наблюдава както при Грам - отрицателните, така и при Грам - положителните бактерии [*El-Halfawy* & *Valano, 2015*].

Хетерорезистентността към полимиксини е широко разпространена при *A. baumannii* ≈ 90% от клинични изолати [*Olaitan et al., 2014*]. Установена е също и при *Enterobacter cloacae* [*Napier et al., 2014, Band et al., 2016*] и *Klebsiella pneumoniae* [*Silva et al., 2016*]. Хетерорезистентността към colistin при *K. pneumoniae*, а вероятно и при други микроорганизми може би е свързана с образуването на биофилм [*Silva et al., 2016*]. При хетерорезистентни към colistin щамове *E. cloacae* се установява кръстосана резистентност с лизозим [*Napier et al., 2014*].

По време на антибиотична терапия хетерорезистентните субпопулации могат да се селекционират, което да доведе до терапевтичен неуспех и повишена смъртност [*El-Halfawy* & *Valano, 2015*].

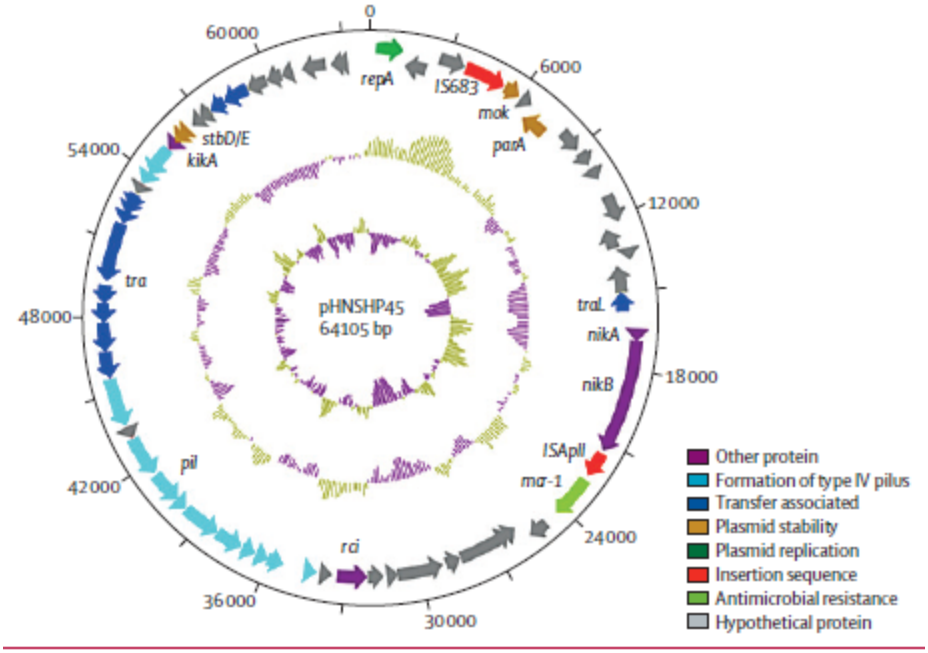
2.1.8. Адаптивна резистентност

Друг феномен, наблюдаван при бактериите е наличието на адаптивна резистентност [*Barin et al., 2013*]. За разлика от хетерорезистентността, адаптивната резистентност се характерзира с бърза индукция на резистентност в присъствие на определен антибиотик и възвръщане към чувствителен фенотип при неговото отстраняване [*Barin et al., 2013*]. Наблюдавана е с много висока честота (55% от изследваните щамове) при *A. baumannii* [*Barin et al., 2013*], *P. aeruginosa* [*Gilleland and Farley, 1982, Fernandez et al., 2010*], *E. coli* [*Prim et al., 2015*], *K. pneumoniae* [*Wright et al., 2015, Olaitan et al., 2014*]. Клиничната значимост на адаптивната резистентност към полимиксини не е достатъчно изяснена, но вероятно е една от причините за неблагоприятен терапевтичен ефект [*Barin et al., 2013*].

2.2. Плазмидно-медиирана резистентност към полимиксини

Дълги години се счита, че резистентността към полимиксини (colistin) при Грам - отрицателните бактерии е хромозомно кодирана, като възникването и

разпространението ù е, или *de novo*, или след клонална експанзия на резистентни щамове [*Schwarz et al., 2016*]. В края на 2015г., се появява първото в света съобщение за плазмидно медиирана резистентност към полимиксини [*Liu et al.* 2015/2016]. При изследване на щамове *E. coli*, изолирани от проби от сурово месо, животни и хора през периода 2011г. - 2014г. е наблюдавана висока честота на резистентност към полимиксини [*Liu et al., 2016*]. Впоследствие е установено, че резистентността се дължи единствено на плазмидно кодиран ген *mcr-1*. Плазмидът (pHNSHP45, Фигура 7), носител на този ген е конюгативен и е мобилизиран в реципиент *E. coli* с честота 10^{-1} до 10^{-3} / клетки на реципиент.



Фигура 7: Структура на плазмид pHNSHP45 [Адаптирана от *Liu et al., 2016*]

Предава се и междувидово чрез трансформация, но не и конюгация, при *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, при което се получава 8 - 16 пъти увеличение на минималните потискащи концентрации (МПК). Може да се предава в епидемични щамове *Enterobacteriaceae*, като *E. coli* ST131 и *K. pneumoniae* ST11, както и в *P. aeruginosa*, което предполага възможности за много бързо разпространение в ключови човешки патогени [*Liu et al., 2016*]. Първоначалните изследвания относно стабилността на плазмида показват, че pHNSHP45 е стабилен, както в трансконюгантите, така и в изходните щамове, дори без селективен натиск от полимиксини [*Liu et al., 2016*].

pHNSHP45 е напълно секвениран - има размер 64015 bp и средно съдържание на GC 43%. Съдържа 60 предполагаеми отворени рамки на четене и притежава типичен IncI2 backbone (гръбнак) (57 624 bp), кодиращ репликация, хоризонтален трансфер,

поддържане и стабилност на функциите. Генът *mcr-1* е с размер 1626 - bp, има съдържание на GC 49% и се разполага "downstream" от инсерционна последователност I*SApl1* [*Liu et al., 2016*]. Нуклеотидната последователност на pHNSHP45 е депозирана в GenBank с accession number KP347127 [*Liu et al., 2016*].

Впоследствие, в същия щам (SHP45), е установено наличие и на втори плазмид, носител на *mcr-1* [*Zhi et al., 2016*]. Плазмидът е наречен pHNSHP45-2. Съставен е от 251 493bp и принадлежи към IncHI2 [*Zhi et al., 2016*]. В него се установяват гени за резистентност и към други основни класове антибиотици, включително хинолони (oqxAB), цефалоспорини ($bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$) и fosfomycin (fosA3) [*Zhi et al., 2016*].

Ензимът, кодиран от *mcr-1* (MCR-1) принадлежи към семейството на фосфоетаноламин трансферазите [*Liu et al., 2016*] и представлява интегрален мембранен протеин с пет периплазмени трансмембранни спирали [*Sun et al., 2016*]. Експресията му при *E. coli* предизвиква модифициране на липид А, посредством добавяне на фосфоетаноламин [*Liu et al., 2016*], при което се наблюдава понижаване на общия негативен заряд на повърхността на бактериалните клетки и намаляване на афинитета към полимиксини (colistin) [*Liu et al., 2016*]. MCR-1 медиира също кръстосана резистентност и към катионния антимикробен пептид лизозим [*Sherman et al., 2016*].

След публикуване на нуклеотидната последователност на *mcr-1* от *Liu et al.,* в рамките на няколко месеца се появяват множество съобщения за откриване на *mcr-1* положителни ентеробатериални щамове в целия свят [*Mulvey et al., 2016, Falgenhauer et al., 2016, Sherman et al., 2016, Haenni et al., 2016, Arcilla et al., 2016, Olaitan et al., 2016, Hu et al., 2016, Webb et al., 2016, Shen et al., 2016, Stoesser et al., 2016, Zhi et al., 2016, Petrillo et al., 2016, Poirel et al., 2016, Zeng et al., 2016, Zurfuh et al., 2016, 2016, Malthora-Kumar et al., 2016*]. Изолирани са от проби от животни, околна среда, храни и хора в повече от 30 държави от 5 континента - Азия, Европа, Африка, Северна и Южна Америка [*Schwarz et al., 2016*]. Появява се предположението, че *mcr-1* вероятно съществува отдавна и е разпространен в много щамове *E. coli* [*Petrillo et al., 2016*]. Тази хипотеза се потвърждава от проучвания на *Shen et al., 2016*, които скринират 1611 щама *E. coli,* изолирани от пилета в 8 провинции в Китай през периода 1970г - 2014г, за наличие на *mcr-1*. Генът е установен е при 104 от тях, като всички ампликони имат 100% хомоложност с публикуваната от *Liu et al*. Най-старите *mcr-1* положителни щамове (3) са изолирани през 1980-те, а от броят им от 2009г прогресивно нараства и от 5,2 % (2009г) достига до 30% (2014г). Това съответства и на увеличената употреба на colistin в Китай през този период [*Shen et al., 2016*]. При ретроспективно проучване във

Франция [*Haenni et al., 2016*] върху 517 ESBL - продуциращи *E. coli,* изолирани от телета през периода 2005г - 2014г са установени 106 *mcr-1* (21%) - положителни щама, най-старият от които е изолиран през 2005г. Фактът, че *mcr-1* положителни бактерии се изолират по-често при животни и в храни от животински произход, води до заключението, че този нов ген за резистентност вероятно се е разпространил от ветеринарния в хуманния сектор [*Schwarz et al., 2016*].

Генът *mcr-1* се локализира основно на конюгативни плазмиди от различни репликонни типове, включително IncI2, IncHI1, IncP, IncX4 и IncHI2, които се пренасят с много висока честота [*Zhi et al., 2016, Schwarz et al., 2016*]. Много от тези плазмиди носят и други гени за резистентност, включително гени за ESBL и карбапенемази [*Schwarz et al., 2016, Poirel et al., 2016*].

Първоначално, *mcr-1* е открит при *E. coli,* но няколко съобщения потвърждават наличието му и при други представители на сем. *Enterobacteriaceae,* включително *E. cloacae* и *E.aerogenes* [*Zeng et al., 2016*], *K. pneumoniae* [*Stoesser et al., 2016, Li et al., 2016; Du et al., 2016*], *S.sonnei* [*Pham Thanh et al., 2016*] и *Salmonella enterica subsp enterica* [*Webb, 2016, Doumith et al., 2016, Anjum et al., 2016, Veldmann et al., 2016*].

В следващите месеци са описани и депозирани в GenBank database нови варианти на *mcr-1*: при *E. coli* - в Китай - ***mcr-1.3*** (AN KU934208), ***mcr-1.4*** (AN KY041856), ***mcr-1.7*** (AN KY488488), в Аржентина ***mcr-1.5*** (AN: KY283125, KY4711308, KY471310, KY471311), в Брунеи - ***mcr-1.8*** (AN KY683842)*; K. pneumoniae* в Италия - ***mcr-1.2*** (AN KX236309) *и* ***mcr-1.6*** при *S.Thiphimurium* в Китай (AN KY352406) [*Tijet et al.2017*].

През 2016г, в Белгия, при изследване на щамове *E. coli*, изолирани от свине и говеда, *Xavier et al.,* идентифицират нов плазмидно кодиран ген за резистентност към полимиксини - ***mcr-2***. Той е с размер 1617 bp, кодира фосфоетаноламин трансфераза (MCR-2) и има само 76,7% хомоложност с *mcr-1*. Счита се, че може да е произлязъл от *Moraxella catarrhalis* (вродено резистентни на полимиксини), вероятно междуродов трансфер [*Xavier et al.,* 2016]. Локализиран е в конюгативен плазмид IncX4. Пренася с висока честота, което го прави много ефективно средство за дисеминиране на *mcr-2*. Установено, че *mcr-2* е по-широко разпространен в Белгия от *mcr-1* [*Xavier et al.,* 2016]. До момента, *mcr-2* не е установен в Китай (скринирани са почти 10 000 изолата). Това налага хипотезата, че *mcr-2* се разпространява по начин, различен от този на *mcr-1* [*Sun et al., 2016*]. За разлика от *ISApl1*-медиираната транспозиция на *mcr-1*, трансферът на *mcr-2* се осъществява посредством уникален транспозон, който съдържа *IS1595* [*Sun et al., 2016*]. На кратко, *mcr-2* е обграден от I*S1595*-подобни последователности (714bp),

кодиращи ген за транспозаза (654 bp), фланкирани от две обърнати последователности (всяка една по 18 bp). Транспозаза кодиращият ген е сходен с фрагмент (bp 1531602 до 1532255) от *Moraxella bovoculi,* щам 58069, с 75% идентичност и 100% queri coverige, което дава основание да се счита, че това е възможният произход на *mcr*-2 [*Sun et al., 2016*].

Генът за *mcr-2,* заедно с двата идентични *IS* елемента може да образува "circulized intermediate" чрез хомоложна рекомбинация на *IS* елементите - това може да допринесе за бързото разпространение между различни видове [*Sun et al., 2016*].

През 2017г, *Yin et al.* характеризират трети мобилен ген за резистентност към colistin - *mcr-3*. Генът е открит заедно с още 18 гена за резистентност в 261-kb IncHI2-тип плазмид pWJ1 в щамове *E. coli*, изолирани от свине. Генът има сходство с нуклеотидната последователност на *mcr-1* и *mcr-2* съответно 45% и 47%. Аминокиселинната последователност на фосфоетаноламин трансферазата MCR-3 е много сходна с фосфоетаноламин трансферазите, открити при други представители на сем. *Enterobacteriaceae* и *Aeromonas spp*., изолирани от клинични материали и проби от околната среда в 12 държави от 4 континента. Поради широкото разпространение на аеромонадите в околната среда и потенциалния пренос на *mcr-3* между *Enterobacteriaceae* и *Aeromonas spp,* съществува вероятност *mcr-3* да е значително по-широко разпространен, отколкото се предполага [*Yin et al., 2017*].

Nicolet et al., 2016 съобщават и за откриването на друг, все още неизяснен плазмидно кодиран механизъм на резистентност към colistin при *K. pneumoniae,* различен от *mcr-1*.

През 2017г., *Carattoli et al*. характеризират четвърти плазмидно кодиран ген за резистентност към полимиксини - *mcr-4*, открит при щам *Salmonella enterica,* монофазен вариант на серовар *Typhimurium*, изолиран в Италия през 2013г. и при щамове *E. coli,* изолирани в Испания и Белгия през 2015г. и 2016г [*Carattoli et al*., 2017].

През 2017г бе охарактеризиран транспозон-асоцииран, фосфоетаноламин трансферазен ген, *mcr-5,* при *S.enterica, susp.enterica serovar Partyphi B* [*Borowiak et al., 2017*]. Този ген е част от 7337 bp транспозон, принадлежащ към семейство Tn3 и се локализира обикновено в родствени ColE тип плазмиди. При един изолат е установена и хромозомна локализация на този транспозон [*Borowiak et al., 2017*].

През 2017г, *AbuOun et al*., 2017 описват варианти на *mcr*-1 и *mcr*-2, установени при *Moraxella spp*., единия от които впоследстие е преименуван на *mcr*-6 [*Yang et al*., 2018].

През 2018г., *Yang et al*. охарактеризират плазмидно кодиран ген, *mcr*-7.1., установен при щамове *K. pneumoniae,* изолирани от пилета през периода 2010 - 2015г в Китай. Генът е открит в конюгативен плазмид pSC20141012, кодира фосфоетаноламин трансфераза и има 78% сходство с *mcr-3.* Счита се, че подобно на *mcr-3, mcr*-7.1 е произлязъл от *Aeromonas spp* [*Yang et al*., 2018]

През 2018г., *Wang et al*. охарактеризират нов плазмидно кодиран ген, *mcr-8,* установен заедно с bla_{NDM} в щамове *K. pneumoniae,* изолирани от хора и животни в периода 2015 -2017г. [*Wang et al., 2018*]. Генът е локализиран в плазмид pKP91, спадащ към IncFII. При анализа на генетичното обкръжение е установено, че генът е обграден от две пълни IS*903B*, произлизащи от *E. coli*. Впоследствие е установено, че други IS (IS*Ecl1*) също могат да имат отношение към дисеминирането на *mcr-8* сред *Enterobacteriaceae*. Наличието едновременно на *mcr-8* и bla_{NDM} в щамове *K. pneumoniae,* изолирани от хора и животни е повод за сериозни притеснения [*Wang et al., 2018*].

3. Генетични методи за определяне на резистентността към полимиксини

Механизмите на резистентност към полимиксини могат да бъдат установени чрез секвениране на гените, отговорни за специфичните модификации на липополизахарида [*Poirel et al., 2017*]. Най-добре са проучени промените в гените, кодиращи двукомпонентните системи pmrAB, phoPQ, както и регулатора mgrB. Изучаването на хромозомната резистентност към полимиксини е трудно, поради наличието на много, все още неидентифицирани хромозомни механизми на резистентност, трудности при преценката, дали определени модификации предизвикват резистентност към colistin, както и наличие на различни нива на експресия на гените, което се свързва и с различни нива на резистентност към полимиксини [*Poirel et al., 2017*].

Изключение от посоченото по-горе представляват плазмидно кодираните гени, чиито продукти предизвикват резистентност към полимиксини. Понастоящем се счита, че идентифицирането на тези гени е белег на резистентност или намалена чувствителност към полимиксини [*Poirel et al., 2017*]. Скрининг едновременно за *mcr-1* и *mcr-2* може да се направи със стандартен PCR - протокол, като се използват праймерите MCR-1/2-Fw (5' -TAT CGC TAT GTG CTA AAG CC-3') и MCR-1/2-Rv (5'-TCT TGG TAT TTG GCG GTA TC-3'), при което се получава ампликон от 715-bp [*Poirel et al., 2017*]. MCR-1 може да се открие и SYBR-Green based real-time PCR тест, предложен от *Bontron et al., 2016*. Методът е валидиран както за човешки, така и за животински изолати и може да се прилага при големи скрининг проучвания.

В резистентността към полимиксини вероятно вземат участие и мутации в порините и свръхекспресия на ефлуксни помпи. Много вероятно фенотипната резистентност към полимиксини на клиничните изолираните Грам - отрицателни бактерии често да се дължи на комбинация от резистентни механизми (например дефекти във външно мембранните протеини, съчетани с структурни модификации на липополизахарида) [*Poirel et al., 2017*].

Следователно, фенотипните тестове са много по-важни за последващото терапевтично поведение, тъй като чрез тях се определя на практика дали щамът е чувствителен или резистентен към полимиксини. За разлика от тях, генотипните методи, използвани при полимиксините регистрират само потенциална резистентност и налагат секвениране на множество гени [*Poirel et al., 2017*].

4. Епидемиология на резистентността към полимиксини

Въпреки, че полимиксините все още имат значителна *in vitro* активност срещу повечето Грам - отрицателни бактерии, в последните години сме свидетели на непрекъсното увеличаване на резистентността на клиничните изолати към този антибиотичен клас [*Poirel et al., 2017*].

По данни от проучване на програмата SENTRY, направено върху 40625 щама Грам - отрицателни бактерии, изолирани в периода 2006 - 2009г. от 157 центъра в 31 държави от Европа, Северна Америка, Латинска Америка и Азиатско-Тихоокеанския регион, резистентността към полимиксини като цяло е ниска <0.1% до 1.5% [*Gales et al., 2011*]. При *K. pneumoniae,* обаче, е регистрирана тенденция за увеличаване на резистентността в Латинска Америка и Азиатско-Тихоокеанския регион [от 1.2% през 2006 до 1.8% през 2009г], вероятно като резултат от увеличената им и/или неадекватна употреба за лечение на инфекции, причинени от мулти-резистентни Грам - отрицателни бактерии [*Gales et al., 2011*]. Резистентността към colistin при *K. pneumoniae* е повод за сериозни притеснения, тъй като голяма част от щамовете, причинители на вътреболнични инфекции са резистентни на почти всички антибиотични класове [*Poirel et al., 2017*]. В резултат на широкото разпространение на карбапенем-резистентни щамове *K. pneumoniae* и свързаната с това увеличена употреба на colistin през последните години са публикувани множество съобщения за епидемични взривове от карбапенем-резистентни и colistin-резистентни щамове в Европа [*Mezzatesta et al., 2011, Monaco et al., 2014, Pena et al., 2014, Giani et al., 2015*] и Северна Америка [*Marchaim et al., 2010*].

Повечето от тях са свързани с KPC-продуциращи щамове, принадлежащи към международния епидемичен клон ST258 [*Poirel et al., 2017*].

По данни от годишния доклад на *EARS-Net* за 2016г., чувствителността към colistin на докладваните щамове *K. pneumoniae, A. baumanni* и *P. aeruginosa* е определена при съответно, 27.6%, 51.3% и 51.3% от тях. Резистентни на colistin са 8.5% от изследваните изолати *K. pneumoniae, 4%* от *A. baumanni* и по-малко от 1% от *P. aeruginosa.* По-голяма част от резистентните щамове са изолирани в Гърция и Италия. Поради относително малкия брой изследвани щамове, относително високия % щамове от региони с високо ниво на резистентност и значителните технически трудности при определяне на чувствителността към colistin се препоръчва тези данни да бъдат интерпретирани внимателно, тъй като може да не са представителни за Европа като цяло [*Surveillance report of antimicrobial resistance (AMR) in Europe, 2016*].

Рисков фактор за развитието на резистентност е употребата на colistin [*Poirel et al., 2017*], особено, ако е под формата на монотерапия и при субоптимално дозиране [*Durante-Mangoni et al., 2015*]. Системната употребата на colistin за селективна чревна деконтаминация на ESBL-продуциращи *K. pneumoniae* води до значително повишение на резистентността към colistin - до > 70% [*Halaby et al., 2013, Strenger et al., 2011*], поради което тази практика вече не се препоръчва.

5. Определяне на чувствителността към colistin *in vitro*

Полимиксините са открити преди повече от 60 години, но все още не е установен оптималния метод за определяне на чувствителността към тях [*Poirel et al., 2017*].

5.1. Проблеми, свързани с определяне на чувствителността към colistin

В лабораторната практика, чувствителността към антимикробни средства се изследва с помощта на различни техники, които се основават на дифузия (дисково дифузионен метод, Е-тест) или на определяне на МПК чрез разреждане в бульон, агар или посредством различни автоматизирани системи като Vitek 2c, Phoenix, Merlin, Sensititre и др. Определянето на чувствителността към полимиксини, обаче, чрез традиционно прилаганите методи, е съпроводено със сериозни технически трудности, свързани с йонния състав на използваните среди, антибиотичните субстанции, вида плаките, наличие / липса на полисорбат-80 и др. [*Humphries, 2015*].

Влияние на средата

Резистентността към полимиксини се регулира от двукомпонентни системи PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB, които се активират при промени в концентрациите на Ca^{2+}, Mg^{2+} и Fe^{3+},

както и при промени в pH [*Olaitan et al., 2014*]. Поради това е много важно, използваните среди да бъдат точно стандартизирани по отношение на йонния си състав и на pH. Установени са много големи вариации в концентрацията на катионите в Мюлер-Хинтън агар/бульон в зависимост от производителя, както и в различни партиди на един и същ производител, което води до получаване на противоречиви резултати и намалява акуратността на използваните методи [*Girardello et al., 2012*]. Установено е също и катион-зависимо инхибиране на антимикробната активност на полимиксините [*Matzneller et al., 2015*]. Препоръчваните от CLSI концентрации на Ca^{2+} 20 - 25 mg/l и на Mg^{2+} 10 - 12,5 mg/l, са около 2 пъти по-ниски от концетрацията им в интерстициалната течност *in vivo,* съответно 50 mg /l (Ca^{2+}) и 20 mg /l (Mg^{2+}) [*Matzneller et al., 2015*]. *Matzneller et al.,* 2015, изследват 100 клинични изолата *A. baumannii*, *P. aeruginosa, K. pneumoniae* и *E. coli* и определят МПК спрямо тях в три различни среди - Мюлер-Хинтън бульон без допълнително добавени Ca^{2+} и Mg^{2+}, катионно коригиран, съгласно препоръките на CLSI и Мюлер-Хинтън бульон, суплементиран с концентрации на Ca^{2+} и Mg^{2+}, които симулират тези в интерстициалната течност. МПК срещу изследваните щамове *A. baumannii* и *P. aeruginosa* се увеличава значително при по-високи катионни концентрации. Чувствителността на *K. pneumoniae* не показва сериозни разлики, а при *E. coli* се наблюдава намаляване на МПК при увеличаване на катионните концентрации. Това се потвърждава и при проведените time-kill експерименти. Всичко това показва, че антимикробната активност на colistin може да бъде погрешно определена *in vitro* чрез използване на конвенционалните среди [*Matzneller et al., 2015*]. Въпросът, дали трябва да се използват катион-коригирани или катион-некоригирани среди все още не е решен [*Poirel et al., 2017*]. Понастоящем, обединената работна група на CLSI и EUCAST препоръчва използването на катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон [*Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group*].

Влияние на антибиотичните субстанции

За определяне на чувствителността *in vitro* трябва да се използват само сулфатни соли на полимиксини (colistin sulfate и polymyxin sulfate). Колистин метансулфонат (Colistin Methanesulfonate) не трябва да се използва, тъй като е неактивен прекурсор на colistin, който се разгражда бавно в разтвор [*Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working*

Group] и дава погрешно високи МПК *in vitro* [*Landman et al., 2008*]. Polymyxin B и colistin sulfate представляват смес от химично родствени съединения, които се различават само по една аминокиселина и по мастната киселина, свързана с декапептида; тези съединения имат различна антибактериална активност [*Landman et al., 2008*]. Съществуват вариации в относителния състав на тези смеси, както между различните производители, така и между различните серии на един и същ производител, което е потенциален източник на вариации при определяне на МПК [*Humphries, 2015*].

Влияние на състава и обработката на плаките за разреждане в бульон

Типът на плаката, използвана за BMD оказва значително влияние върху резултатите при определяне на МПК [*Humphries, 2015*]. Поради амфипатичната си природа, полимиксините лесно адхерират към полистиреновата повърхност на плаките за BMD. Количеството colistin, което се адсорбира е различно и зависи от вида на покритието на плаката и заряда му, като съществуват различия между отделните ямки [*Humphries, 2015*]. Адсорбцията е най-висока при по-ниски концентрации на антибиотика [*Humphries, 2015*]. Обединената работна група CLSI-EUCAST, препоръчва да се използват плаки, направени от обикновен полистирен, които не трябва да се третират по никакъв начин преди употреба [*Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group*].

Влияние на полисорбат-80 (P-80)

Полисорбат-80 (P-80 или Tween 80) е сърфактант, който се използва за приготвяне на микротитърните плаки за BMD [*Poirel et al., 2017*]. Препоръчва се от CLSI като добавка при изследване на dalbavancin, oritavancin, televancin [*Humphries, 2015*]. 0.002% P-80, добавен към бактериалния инокулум или МХБ, намалява адсорбцията на colistin към полистирена в плаките [*Hindler, 2013*]. В присъствие на P-80, МПК colistin / polymyxin B са средно 4 до 8 пъти по-ниски, отколкото при изследване без P-80 [*Hindler, 2013*].

Друг възможен проблем представлява факта, че P-80 може да има синергично действие с полимиксините, в резултат на което да се получават фалшиво по-ниски МПК [*Humphries, 2015*]. Феноменът е забелязан за първи път през 1960г при *P. aeruginosa* [*Humphries, 2015*]. P-80 има много слаба антимикробна активност, но може да увеличи пермеабилитета на клетъчната стена на *P. aeruginosa* и лизира сферопласти [*Humphries, 2015*]. Полимиксините дестабилизират външната мембрана, което дава възможност на

P-80 да достигне до вътрешната мембрана и да лизира клетката [*Humphries, 2015*]. Проблемът с P-80 засяга основно щамовете с МПК ≤ 1 µg/ml, но не и тези, които са резистентни на полимиксини, тъй като те имат интактна външна мембрана [*Humphries, 2015*]. Необходими са допълнителни проучвания за точните взаимодействия между полимиксините, P-80 и клетъчната стена на Грам - отрицателните бактерии [*Humphries, 2015*].

Понастоящем, обединената работна група на CLSI и EUCAST препоръчва определянето на МПК да става без добавяне на P-80 или други сърфактанти [*Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group*].

5.2. Лабораторни методи за определяне на чувствителността към colistin

5.2.1. Разреждане в бульон

Методите с разреждане в бульон се използват за определяне на МПК. Те са референтни методи при определяне на чувствителността към полимиксини [*Poirel et al., 2017*]. При тези методи се изследва способността на микроорганизмите да предизвикат видим растеж в поредица от бульонни среди, които съдържат нарастващи концентрации антибиотик. МПК се определя като най-ниската концентрация от антимикробния агент (mg/l), която при определени *in vitro* условия (температура 35±1°C и инкубиране 16-24 часа) предотвратява развитието на видим бактериален растеж. Използват се 2 разновидности на метода - макроразреждане, което се извършва в стандартни тест епруветки с минимален обем на средата 2 ml и микроразреждане, при което се използват микро-титърни плаки с капацитет ≤ 500 µl и обем на средата в ямките - 0.05 - 0.1 ml.

Съгласно препоръките на EUCAST и CLSI, микроразреждането в бульон се извършва с катонно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон (CA-MHB), при двукратни серийни разреждания на полимиксините в диапазон 0.125 - 512 µg/ml и краен бактериален инокулум 5 x 10^5 CFU/ml за всяка ямка. Плаките трябва да бъдат направени от обикновен полистирен и да не бъдат третирани по никакъв начин преди употреба. На нито един етап от изследването не трябва да се добавят полисорбат-80 или други сърфактанти. За изследване трябва да се използват само сулфатни соли на полимиксини (colistin sulfate) [*Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group*].

Микроразреждането в бульон, обаче е много трудоемко и при мануално приготвяне на антибиотичните разреждания могат да се допуснат сериозни грешки, поради което методът е трудно приложим в повечето диагностични микробиологични лаборатории [*Poirel et al., 2017*]. Много фирми предлагат готови тестове за определяне на МПК на colistin чрез микроразреждане в бульон. Използването им може да е съпроводено с получаването на много големи грешки и трябва задължително да се извършва съвместно с изследване на colistin - чувствителни [*E. coli ATCC 25922, P. aeruginosa ATCC 27853*] и colistin - резистентни [*E. coli NCTC 13846*] контролни щамове [*EUCAST, Warnings, 2017*]. Това се потвърждава от *Matuschek et al., 2018,* които правят сравнителна оценка на резултатите от изследване на 75 щама, получени от три търговски кита (Sensititre, MICRONAUT-S, MICRONAUT MIC-Strip, MERLIN Diagnostica), с референтни МПК, определени чрез замразени панели за BMD (Thermo Scientific). Установяват се следните резултати (Таблица 2):

Таблица 2: Резултати, получени при сравнителната оценка на търговски тестове за BMD и референтния метод за определяне на чувствителността към colistin (*Matuschek et al., 2018)*

Търговски кит за BMD	Съществено съвпадение (МПК ± 1 разреждане от референтната МПК)	Големи грешки (фалшива резистентност)	Много големи грешки (фалшива чувствителност)
Sensititre	96%	4	0
MICRONAUT-S	96%	6	2
MICRONAU MIC-Strip	99%	5	2

Друг проблем, наблюдаван често при при изследване на colistin чрез микро-разреждане в бульон е наличието на т. нар. "skip wells" (пропуснати ямки) - ямки, в които няма растеж, като в същото време е налице растеж при по-високи концентрации на colistin. Такива резултати се интерпретират трудно и вероятно се дължат на наличие на хетерорезистентни популации в изследвания щам [*Landman et al., 2013, Poirel et al., 2017*].

Макроразреждането в бульон се извършва чрез идентични с микрометода катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон, бактериален инокулум, антибиотични разреждания, условия на инкубиране и отчитане, като единствените разлики са в обема на използваната среда (≥ 2 ml) и използване на стъклени тест епруветки [*Poirel et al.,*

2017]. Показва много голямо съответствие с резултатите, получени при микроразреждане в бульон (83%) при липса на много големи грешки [*Hindler, 2013*].

5.2.2. Метод с разреждане в агар

Разреждането в агар е друг референтен метод, при който различни концентрации от антибиотика се добавят към разтопен и охладен катионно-коригиран Мюлер-Хинтън агар, така че да се получат серийни разреждания в диапазон 0.125 - 512 µg/ml (EUCAST). Върху агаровите среди се закапва краен бактериален инокулум от 10^4 CFU. МПК е най-ниската концентрация, която инхибира бактериалния растеж.

Разреждането в агар дава възможност за едновременно изследване на голям брой щамове, но се използва рядко, тъй като е много трудоемко [*Humphries, 2015*]. При разреждане в агар липсват проблемите с адсорбцията, налични при BMD, но не са правени проучвания, които да определят точните крайни концентрации на colistin в агаровите среди [*Humphries, 2015*]. В много проучвания се установява добро съвпадение на резултатите, получени чрез метода на разреждане в агар и BMD [*Gales et al., 2001, Lo-Ten-Fo et al., 2007, Tan et al., 2007, Behera et al., 2009, Hindler, 2013*], но не се посочва дали BMD е правено със или без P-80 (*Humphries, 2015*).

5.2.3. Дисково-дифузионен метод (ДДМ) на Bauer-Kirby

Това е един от основните и най-често използвани методи за определяне на чувствителността към антибиотици в диагностичните микробиологични лаборатории. Той е лесен, достъпен и надежден метод за повечето антибиотици. За съжаление, не може да се използва при определяне на чувствителността към полимиксини, тъй като дава висок процент на много големи грешки (фалшива чувствителност) в сравнение с BMD и разреждане в агар (до 32%) [*Humphries, 2015, Poirel et al., 2017*]. Тези резултати от ДДМ се дължат на лошата и бавна дифузия на полимиксините в агар (EUCAST), което води до много малки зони на инхибиране, които не могат надеждно да разграничат чувствителни от резистентни изолати [*Humphries, 2015, Poirel et al., 2017*]. Производители на дискове colistin препоръчват всеки чувствителен щам по ДДМ да се потвърди чрез МПК [*Becton Dickinson, 2010*].

5.2.4. Градиентен МПК метод (Е-тест)

Е-тестът представлява тънка, инертна, непорозна пластмасова лента носител (стрип) с размери 5 мм / 60 мм. Върху едната страна на стрипа е натоварен антибиотик с

непрекъснат концентрационнен градиент, вариращ от 0.016 – 256 μg/ml. Този обхват съответства на 15 двукратни серийни разреждания при конвенционалните МПК методи. Върху другата страна на лентата се намира скала за отчитане на МПК в μg/ml. Съгласно инструкциите на производителя, стрипът се поставя върху агарова среда, инокулирана с приблизително 10^8 CFU/ml (0.5 MF) бактериална суспензия от изследвания щам. Веднага след поставянето му започва ефективно освобождаване на антибиотика от носителя в агара. Директно под стрипа се създава непрекъснат и експоненциален градиент на антибиотичната концентрация. След изтичане на определения период на инкубация (16-24 часа при 35±1°C), около стрипа се оформя симетрична зона на инхибиране с формата на елипса. МПК се определя по скалата в μg/ml там, където края на елипсата пресича стрипа. При наличие на колонии в зоната на инхибиране, щамът трябва да се отчита като хетерорезистентен и крайната МПК да се определя по най-високата МПК, при която се установяват колонии [*Behera et al., 2009*]. Методът е лесен за изпълнение, но относително скъп и не открива надеждно резистентност към colistin (много големи грешки (фалшива чувствителност) от 9 -32%) [*Humphries, 2015, Matuschek et al., 2018*]. Съгласно FDA-регулациите, Е-тест може да се използва за изследователски цели, но не трябва да се използва за определяне на чувствителността към colistin на клинични изолати [*Humphries, 2015*].

5.2.5. Дифузионен метод с пре-дифузия

Това е нов метод, при който се използват Neosensitabs, произведени от Rosco Diagnostica, Дания. Предназначен е за определяне на чувствителността към colistin на представители на сем. *Enterobacteriaceae, Acinetobacter spp* и *P. aeruginosa*.

Принципът на метода на пре-дифузия е разработен от датския микробиолог Frõlund-Thompsen и чрез него се цели да се даде възможност на антибиотичните субстанции да дифундират по-дълго в агара преди инокулиране на изследваните щамове. Таблетка, съдържаща 10 mg colistin се поставя върху повърхността на неинокулиран Мюлер-Хинтън агар и се инкубира два часа в термостат (първи период на инкубация), след което се отстранява и средата се оставя за още 18 часа на стайна температура (втори период на инкубация). От изследвания щам се приготвя суспензия с мътнина 0.5 MF (10^8 CFU/ml), след което средата се инокулира по начин, аналогичен на този при ДДМ. Инкубира се 16-24 часа в термостат при температура 35°C. Измерва се диаметъра на зоната на инхибиране и получения резултат се интерпретира съобразно инструкциите на производителя. В резултат на използването на тази техника се получават значително

по-големи разлики в диаметъра на зоната на инхибиране между съседни стойности на МПК - приблизително 5 mm при метода на пре-дифузия, за разлика от стандартния дисково-дифузионен метод, при който разликата е само 1 - 1.5 mm [*Rosco Diagnostika A/S)*]. Съобщава се за 96,8% съпоставимост на резултатите от теста с пре-дифузия в сравнение с BMD, но методът е оценен само от производителя и не е утвърден нито от CLSI нито от EUCAST [*Balaji, 2011*].

5.2.6. Автоматизирани системи

В България, широко се използват две автоматизирани системи - Vitek 2 и Phoenix, а също и полу-автоматизираните - MERLIN и MicroLaTest [*Erba Lachema*].

Vitek 2 (bioMerieux, France) е силно автоматизирана система, която използва много компактни реагентни тест-карти с 64 ямки, които съдържат разреждания на изследваните антибиотици в тест-среда. Периодично, по време на инкубационния период, се извършва турбидиметричен мониторинг на бактериалния растеж [*Jogensen, 2009*]. С тази система, резултатите от антибиотичната чувствителност за повечето бързо растящи бактерии се получават в рамките на 4 - 10 часа [*Jogensen, 2009*]. Концентрациите на colistin в тест-панелите варират от 0.5 до 16 µg/ml. При сравняване на резултатите за чувствителността към colistin, получени от Vitek 2 и BMD се установява, че системата има ниска чувствителност при откриване на colistin-резистентни Грам - отрицателни бактерии и не е надеждна при регистриране на хетерорезистентни популации [*Tan et al., 2007, Poirel et al., 2017, Chew et al., 2017*].

Phoenix (BD Diagnostics) - Системата включва голям инкубатор - детектор/четец, който може да обработва едновременно 99 панела [*Jogensen, 2009*]. Тест-панелите съдържат 84 ямки с двукратни серийни разреждания на изследваните антибиотици. Концентрациите на colistin са в диапазона 0.5 - 4 µg/ml. Системата мониторира панелите на всеки 20 минути, чрез използване едновременно на турбидиметрични и колориметрични индикатори на растеж [*Jogensen, 2009*]. Резултатите от определяне на МПК се получават в рамките на 6 - 16 часа [*Jogensen, 2009*]. *Poirel et al.,* анализират акуратността на системата чрез изследване на 100 щама *Enterobacteriaceae* и установяват висок процент (15%) на много големи грешки (фалшиво чувствителни резултати), ниска чувствителност при регистриране на хетерорезистентност при *K. pneumoniae* и *E. cloacae*, но добра - при откриване на плазмидно медиирана резистентност към colistin [*Poirel et al., 2017*].

5.3. Гранични стойности за определяне на чувствителността към colistin

Граничните стойности за определяне на чувствителността към colistin съгласно критериите на *EUCAST* са представени в Таблица 3.

Таблица 3: Гранични стойности за определяне на чувствителност към colistin съгласно критериите на *EUCAST* 2017/2018

	МПК (µg/ml)		
Микроорганизми	Чувствителен (S)	Интермедиерен (I)	Резистентен (R)
Enterobacteriaceae spp.	≤ 2	-	> 2
Acinetobacter spp.	≤ 2	-	> 2
Pseudomonas spp.	≤ 2	-	> 2

5.4. Контрол на качеството на тестовете

Съгласно препоръките на съвместната работна група *CLSI-EUCAST,* контролът на качеството на тестовете трябва да се извършва с colistin-чувствителни (*E. coli ATCC 25922, P. aeruginosa ATCC 27853*) и colistin-резистентни контролни щамове (*E. coli NCTC 13846, mcr*-1 положителен). За *E. coli NCTC 13846* прицелната стойност за colistin МПК е 4 µg/ml, като само в единични случаи е допустимо да бъде 2 или 8 µg/ml. За *E. coli ATCC 25922* прицелна стойност за МПК colistin е 0.5 - 1, а допустимия диапазон 0.25 - 2; а за *P. aeruginosa ATCC 27853* прицелна стойност 1 - 2, допустим диапазон 0.5 - 4 [*EUCAST QC Tables v. 5.0, valid from 2015-01-09*].

5.5. Други методи за откриване на резистентност към colistin/полимиксини

5.5.1. Rapid Polymyxin NP тест (RPNP)

Тестът е предложен от *Nordmann et al., 2016* и е предназначен за бързо откриване на colistin-резистентни представители на сем. *Enterobacteriaceae* [*Nordamann et al., 2016b*]. Основава се на регистриране на метаболизирането на глюкоза при инкубиране на изследваните щамове в среда с определена концентрация полимиксини (polymyxin B или colistin sulfate). При метаболизиране на глюкозата се образува киселина, която понижава pH и предизвиква цветна промяна на индикатора фенол рот. За извършване на теста се използват две ямки - едната съдържа полимиксин в концентрация 3.75 µg/ml, а другата е без полимиксин. Във всяка ямка се закапва бактериална суспензия в количество 10^8 CFU/ямка. Тест-плаката се поставя в инкубатор при 35°C. Първоначалната зрителна инспекция се прави на 10 min (за да се изключат неспецифични цветни промени), след което на всеки час в продължение на два часа.

Тестът се счита за положителен (щамът е резистентен на полимиксини), ако изолатът расте в присъствие на colistin/polymyxin B (промяна в цвета на средата от оранжев в жълт), а за отрицателен (т.е. чувствителен на полимиксини) ако липсва промяна на цвета (няма бактериален растеж). Тестът е бърз и лесен за изпълнение [*Nordamann et al., 2016b*]. В сравнение с микро-разреждане в бульон има специфичност 99.3% и чувствителност 95.4%. Чрез Rapid Polymyxin NP тест могат да бъдат откривани хетерорезистентни щамове, както и такива с плазмидно медиирана резистентност [*Nordamann et al., 2016b*]. За извършване на теста могат да се използват бактериални култури, получени при култивиране на Мюлер-Хинтън агар, Луриа-Бертани агар, Колумбия агар с 5% овнешка кръв, шоколадов агар, Ури-селект 4 агар, Левин агар. Чрез Rapid Polymyxin NP могат да бъдат открити и colistin-резистентни *Enterobacteriaceae* директно в хемокултури, в този случай тестът позитивира в рамките на 4 часа [*Jayol et al., 2016, Poirel et al., 2018*].

5.5.2. Superpolymyxin medium (SPM)

Средата е предложена от *Nordmann et al., 2016a* и дава възможност за скрининг на пациенти за чревна колонизация с полимиксин-резистентни Грам - отрицателни бактерии. SuperPolymyxin screen agar предотвратява пълзенето на *Proteus*, както и растежа на Грам - положителни бактерии и фунги (съдържа Daptomycin и Amphotericin B). Като база се използва агар на Левин, който е селективна среда за Грам - отрицателните бактерии и диференцира лактоза-ферментиращи от лактоза-неферментиращи бактерии. SuperPolymyxin съдържа colistin в концентрация 3.5 μg/ml, която позволява ясно диференциране на полимиксин-резистентните от полимиксин-чувствителните щамове. Чувствителността и специфичността на средата е 100% [*Nordmann et al., 2016a*].

5.5.3. Micromax test

Tamayo et al., 2013 предлагат бърз метод за откриване на colistin-резистентни *A. baumanni* чрез използване на Micromax тест. Тестът се основава на откриване на свободни нуклеотиди (белег за фрагментация на ДНК) и на увреждане на клетъчната стена в присъствие на colistin [*Tamayo et al., 2013*]. Накратко, бактериите се инкубират 90 min в Мюлер-Хинтън бульон, за да се постигне експоненциална фаза на развитието им, след което се инкубират 60 min в 2 епруветки - едната без colistin, а другата - с 0.5 μg/ml colistin. След това се поставят в агароза и се инкубират с лизис разтвор, който отстранява само отслабените клетъчни стени. Освободената, фрагментирана ДНК може

да се оцвети с флуорохром SYBR gold и да се наблюдава с флуоресцентен микроскоп. Щамовете се считат за резитентнни към colistin, ако след инкубиране с 0.5 μg/ml colistin, ≤ 11% от бактериите имат увреждане на клетъчната стена. Методът е бърз, резултат се получава след около 3 ½ часа, има 100% чувствителност и 96% специфичност при откриване на резистентност към colistin при *A.baumanni* [*Tamayo et al., 2013*]. Основни недостатъци са трудоемкостта му, високата цена на консумативите и необходимостта от специално оборудване, което би ограничило рутинната му употреба [*Poirel et al., 2017*].

5.5.4. Капилярна електрофореза

Методът е предложен от *Sautrey et al., 2015* и е валидиран за *K. pneumoniae, E. coli* и *P. aeruginosa*. Разделянето на бактериите чрез капилярна електрофореза се основава на способността на бактериалните клетки да реагират като негативно заредени колоидални частици, което се дължи на особената структура на външната им мембрана. Точният механизъм, по който става разделянето на бактериите все още не е изяснен и зависи от вида на приложения метод. Счита се, че поведението на бактериалните клетки в капиляр е свързано с техни повърхностни свойства, като zeta потенциал. Резистентността към colistin се дължи основно на мутации в гените, кодиращи производството на липополизахарид. Резистентните клетки имат променени мембранен състав и заряд на липополизахарида. Чрез капилярна електрофореза хетерогенни colistin-резистентни щамове могат в рамките на няколко минути да бъдат разделени на субпопулации. Методът е обещаващ, но все още е в процес на разработка [*Sautrey et al., 2015, Poirel et al., 2017*].

6. Мутант превантивна концентрация (Mutant prevention concentration, MPC) и хипотеза за мутант селекциониращия прозорец (МСП)

Класическите *in vitro* тестове за изследване на чувствителността към антимикробни средства се базират на определяне на МПК чрез използване на стандартизиран бактериален инокулум от 10^5 CFU/ml [*Blondeau, 2009*]. При някои инфекции, обаче, много пациенти могат да бъдат инфектирани със значително по-голям брой микроорганизми (≥ 10^9 CFU/ml), отколкото инокулума, който се използва при класическите тестове за чувствителност [*Blondeau, 2009*]. Например, *Firsch et al.* (1942) изчисляват, че при хора с пневмококова пневмония, общата бактериална популация по време на остра инфекция варира от 10^{10} до 10^{12} микроорганизма [*Blondeau, 2009*].

Feldman et al., установяват микробни числа в цереброспинална течност на пациенти с менингит, вариращи от $4.5x10^3$ до $3x10^8$ и стигат до извода, че персистирането на положителни култури при микробиологично изследване може да бъде свързано с първоначално по-високата им концентрация [*Blondeau, 2009*]. Съществуват и други подобни съобщения, на базата на които може да се направи извода, че по време на инфекция микробното число е по-високо, което от своя страна поставя въпроса за необходимостта от изследване на чувствителността с по-големи микробни инокулуми [*Blondeau, 2009*].

Нова стратегия за изследване на появата на антимикробната резистентност предлага хипотезата за мутант превантивната концентрация (mutant prevention concentration, MPC) и мутант-селекциониращия прозорец (МСП)[*Dong et al., 1999, Zhao and Drlica, 2001, Blondeau, 2009, Choi et al., 2014*]. Теорията за мутант превантивната концентрация (MPC) е представена от *Dong et al., 1999г*, като нов метод за определяне на антимикробната чувствителност, при който се взема под внимание възможността за наличие на мутантни субпопулации в бактериални популации с висока численост [*Dong et al., 1999г*]. При изследване на активността на флуорохинолоните към *S.aureus* и *M.bovis BCG, Dong et al.,* установяват, че при нарастване на броя на бактериалните клетки, третирани с антибиотик *in vitro*, се наблюдават два обособени региона в концентрациите, необходими за инхибиране на бактериалния растеж [*Dong et al., 1999г*]. Първият регион е приблизително около МПК на антибиотика - от агарови среди, съдържащи антибиотик с тази и по-високи концентрации могат да се изолират жизнеспособни микроорганизми, които имат мутации за намалена чувствителност / резистеност към изследвания антибиотик [*Dong et al., 1999г*]. Вторият регион се определя от антибиотичната концентрация, която блокира развитието на тези мутантни клетки и е наречена мутант превантивна концентрация (MPC) [*Dong et al., 1999г*]. МПК на антибиотика е по-ниска от MPC, поради което за предотвратяване на растежа на мутантни субпопулации в големи бактериални инокулуми се счита, че са необходими по-високи антибиотични концентрации [*Dong et al., 1999г*]. Това е потвърдено и при последващи определяния на MPC за флуорохинолони спрямо *S.pneumoniae* [*Blondeau, 2009*].

Според *Blondeau,* (2009) определянето на мутант превантивната концентрация е уникален подход за *in vitro* определяне на чувствителността, при който се използва бактериален инокулум, който отразява по-добре микробното натоварване при някои инфекции [*Blondeau, 2009*]. Такъв тип изследвания предоставят по-голяма информация

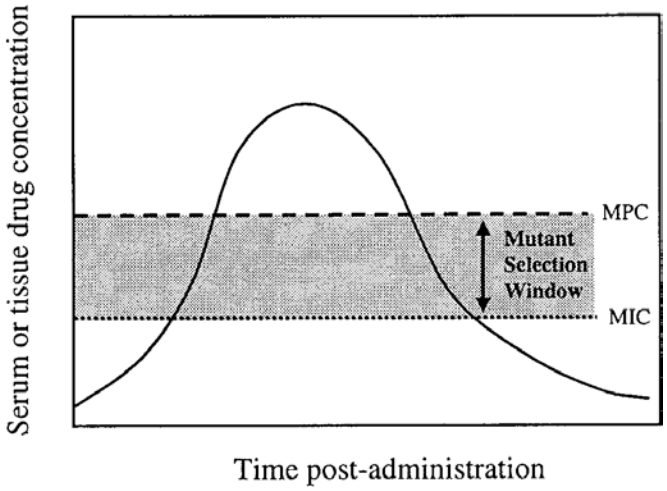
за истинската динамика в големи бактериални популации, подложени на действието на определени антибиотици [*Blondeau, 2009*]. Цел на определянето на мутант превантивната концентрация е да определи антибиотичната концентрация, необходима за блокиране на растежа на най-слабо чувствителните клетки в популацията и не зависи от механизма на резистентност [*Blondeau, 2009*]. Измерванията на мутант превантивните концентрации са приложими само за микроорганизми, при които чрез класическите методи за определяне на чувствителността е установено, че са чувствителни към изследвания антибиотик [*Blondeau, 2009*].

Определянето на мутант превантивната концентрация е значително по-трудоемко от определянето на МПК [*Blondeau, 2009*]. На кратко, изследваните бактериални щамове се субкултивират на няколко агарови среди и се инкубират 18 - 24 часа при температура 35 - 37°C и аеробни условия. На следващия ден, цялата получена бактериална популация се събира със стерилен памучен тампон и се прехвърля в течна среда с обем 100 - 500 ml. Инокулираният бульон се инкубира 18 - 24 часа при температура 35 - 37°C. На следващия ден, получената бульонна култура може да съдържа необходимото количество бактерии или трябва първо да бъде центрофугирана и седимента да се ресуспендира в по-малък обем свежа бульонна среда. След като се установи, че бактериалният инокулум е точен, $\geq 10^9$ CFU се инокулират върху агарови среди, съдържащи различни концентрации от изследвания антибиотик и се инкубират при температура 35 - 37°C и аеробни условия. Отчитат се на 24 и 48 час. Мутант превантивната концентрация е най-ниската концентрация на антибиотика, която предотвратява появата на бактериален растеж [*Blondeau, 2009*].

Хипотеза за мутант селекциониращия прозорец (МСП)

За много форми на резистентност е необходимо да настъпят две събития - от една страна трябва да се появят резистентни мутанти, а от друга - тези мутанти трябва да бъдат селективно намножени в бактериалната популация [*Zhao and Drlica, 2001*]. Генетичните промени са естествен процес - те могат да са резултат от мутационни промени в ДНК или хоризонтален пренос от една бактериална клетка в друга [*Zhao and Drlica, 2001*]. Поради тази причина, резистентни клетки могат да съществуват в дадена бактериална популация преди приложението на определен антибиотик [*Zhao and Drlica, 2001*]. Някои мутации могат да бъдат предизвикани от антибиотици. Честотата на спонтанните мутации е ниска - от 1 /10^6 до 1/10^8 клетки, поради което те могат да бъдат лесно контролирани от защитните сили на организма, освен ако не бъдат

селективно амплифицирани [*Zhao and Drlica, 2001*]. Терапевтичните концентрации, които се използват понастоящем потискат растежа на преобладаващата част от чувствителните микроорганизми, но много често точно тези концентрации са причина за селективно обогатяване на резистентната мутантна част от бактериалната популация [*Zhao and Drlica, 2001*]. При пациенти с нормално функционираща имунна система и чувствителните, и резистентните бактериални клетки се унищожават [*Blondeau, 2009*]. При пациентите с отслабена имунна защита под действието на различни фактори като напреднала възраст, радиотерапия, инфекция с ХИВ, лечение с имуносупресивни медикаменти, имунната система не може да се справи с елиминирането на микробни патогени, поради което при антибиотична терапия съществува вероятност от свръхрастеж на резистентни мутанти [*Zhao and Drlica, 2001*]. Според *Zhao and Drlica, 2001,* съществува "прозорец" в антибиотичните концентрации, т.нар. мутант селекциониращ прозорец (МСП), в който резистентните мутанти селективно се намножават. Граници на МСП са стойностите на МПК и МРС, а концентрационния диапазон между тези две стойности определя МСП (Фигура 8) [*Zhao and Drlica, 2001*].



Фигура 8: Схематично представяне на мутант-селекциониращия прозорец [адаптирана от *Zhao and Drlica, 2001*].

Счита се, че "опасната зона" за селективна амплификация на резистентни субпопулации е МСП [*Zhao and Drlica, 2001, Blondeau, 2009*]. Ако антибиотичните концентрации надвишават мутант превантината концентрация се стига до инхибиране на растежа, както на чувствителните, така и на резистентните микроорганизми. Ако антибиотичните концентрации спаднат под МПК, не се инхибират нито чувствителните, нито резистентните микроорганизми. Ако антибиотичните

концентрации попадат в МСП, чувствителните клетки се инхибират, тъй като прилаганите концентрации надвишават МПК, но резистентните мутанти оцеляват, тъй като концентрацията е по-ниска от MPC [*Zhao and Drlica, 2001, Blondeau, 2009*].

Според Zhao и Drlica (2007), от тази хипотеза произлизат два принципа. Първо, традиционните стратегии за дозиране, които целят да блокират резистентността чрез убиване на чувствителните клетки, поставят антибиотичните концентрации по време на терапия в мутант-селекциониращия прозорец, което дава възможност за увеличаване на броя на резистентните субпопулации [*Drlica and Zhao, 2007*]. Второ, ако антибиотичните концентрации по време на терапия се поддържат над мутант превантивната концентрация, това би трябвало да доведе до много сериозно намаляване на риска от появата на резистентност [*Drlica and Zhao, 2007*]. Тези идеи са в центъра на антимутантните дозови стратегии срещу бактериални популации, които все още не са напълно резистентни към даден антибиотик [*Drlica and Zhao, 2007*]. Ако МСП се затвори няма да се селекционират мутанти, следователно - затварянето или елиминирането на този прозорец е ключът към предотвратяване на селекцията на резистентни мутанти [*Drlica and Zhao, 2007, Blondeau, 2009*].

Според *Zhao* и *Drlica* (2007), съществуват 2 стратегии за стесняване на МСП [*Drlica and Zhao, 2007*]. Първата цели минимализиране на времето, през което серумните антибиотични концентрации са в МСП [*Drlica and Zhao, 2007*]. По принцип това може да стане чрез използване на антибиотици, чиито концентрации преминават бързо през МСП след приложение на първата доза, след което концентрациите им остават над MPC през останалия период от терапията [*Drlica and Zhao, 2007*]. В края на лечението, концентрациите на антибиотика трябва също да преминат бързо през МСП (това има по-малко значение, тъй като в края на терапията броя на патогените е значително намален) [*Drlica and Zhao, 2007*]. Намаляването на продължителността на терапия чрез използването на високи дози и подходящи антибиотични формули/начини на приложение може да намали периода, в който концентрацията на антибиотика е в МСП [*Drlica and Zhao, 2007*]. Обратно - терапевтични режими, при които се използват антибиотици с дълга, постепенна абсорбция в организма, постепенно разпадане и препоръчваните дозировки водят до поддържане на лекарствените концентрации в МСП е по-вероятно да селектират резистентни мутанти [*Drlica and Zhao, 2007*]. За някои микроорганизми, мутант превантивните концентрации (MPC) на даден антибиотик е над постижимите серумни / тъканни концентрации или над токсичната концентрация [*Drlica and Zhao, 2007*]. В тези случаи се използва друг подход, чрез

който се цели стесняване на МСП чрез намаляване на разликата между MPC и МПК посредством комбинация от антибиотици [*Drlica and Zhao, 2007*]. Двойната антибиотична комбинация дава възможност за стесняване / затваряне на МСП чрез използване на умерени антибиотични концентрации, дори ако двата антибиотика поотделно имат много високи MPC [*Drlica and Zhao, 2007*]. За да оцелеят в присъствие на два антибиотика, които имат различни механизми на действие, микроорганизмите трябва да придобият резистентност едновременно и към двата антибиотика [*Zhanel et al., 2009*].

Cai et al., 2010 установяват, че MPC_{90} на colistin за MDR *A. baumannii* е > 128μg/ml. *Choi et al., 2014* определят MPC на colistin спрямо *A. baumannii, K. pneumoniae, P. aeruginosa*. При всички изолати с изключение 3 щама - MPC ≥ 64 μg/ml, като при 62.5% от *A. baumannii* и 75.8% от *K. pneumoniae* са > 128μg/ml. Високите MPC на colistin дават основание да се предположи, че съществува много голяма вероятност от селекциониране на резистентни мутанти при монотерапия с colistin [*Cai et al., 2010, Choi et al., 2014*].

7. Клинична употреба и особености при приложение на полимиксини

7.1. Фармакокинетика и фармакодинамика

Colistin се използва под формата на colistin sulfate и Colistimethate (Colistin methanesulfonate) sodium (CMS) [*Falagas et al., 2005*]. Разтворите на соли на colistin са относително стабилни при pH 2 - 6, но стават нестабилни при pH > 6 [*Falagas et al., 2005*]. CMS е неактивен прекурсор на colistin, по-слабо токсичен от colistin sulfate [*Bergen et al., 2006*]. Получава се от colistin чрез химична реакция с формалдехид и натриев бисулфит [*Falagas et al., 2005, Bergen et al., 2012*].

CMS и colistin имат много различна фармакокинетика [*Li et al., 2006*]. CMS е нестабилен *in vitro* и *in vivo* [*Bergen et al., 2006*]. Свързва слабо с плазмените протеини [*Falagas et al., 2005*]. В човешка плазма се хидролизира, при което могат да се получат до 32 различни, частично сулфометилирани метаболита, включително и активен colistin [*Li et al., 2005, Bergen et al., 2006, Michalopoulos and Falagas, 2011*]. Colistin се свързва с плазмените протеини в около 50% [*Michalopoulos and Falagas, 2011*]. При инфектирани пациенти, обаче, се установяват различия, вероятно поради индуцирани от инфекцията промени в плазмените концентрации на α_1-киселия гликопротеин [*Nation and Li, 2009*]. Концентрацията на този остро-фазов протеин, който е важен за свързването с много basic/алкални медикаменти, е по-висока при критично болни пациенти [*Nation and Li,*

2009]. Серумният полуживот на CMS при здрави доброволци е приблизително 1.5 h след i.v. и 2.75 - 3 h след i.m. приложение [*Kwa et al., 2008*]. Пикови серумни концентрации се получават 10 минути след i.v. приложение [*Michalopoulos and Falagas, 2011*]. Елиминационният полуживот на CMS е 2.1 h, а обемът му на разпределение е 0.34 l/kg [*Kwa et al., 2008*]. Елиминационният полуживот на colistin е 4.2 h [*Kwa et al., 2008*].

Около 60% от приложения CMS се елиминира в непроменен вид чрез бъбреците основно чрез гломерулна филтрация, и в по-малка степен чрез тубулна секреция [*Li et al., 2003*]. При пациенти с нормална бъбречна функция, реналният клирънс на CMS е по-голям, отколкото скоростта на превръщането му в colistin, поради което само около 20% - 25% от приложената доза CMS се превръща *in vivo* в активна форма, а концентрациите на получения colistin са ниски [*Nation et al., 2014a*]. За разлика от CMS, colistin се елиминира предимно по неренален път, като голяма част се реабсорбира в бъбречните тубули [*Nation et al., 2014a*]. Независимо от факта, че colistin се екскретира слабо чрез бъбреците, концентрацията му в урината може да е относително висока, в резултат на превръщането на CMS в colistin в уринарния тракт [*Nation et al., 2014*a]. При бъбречна недостатъчност, бъбречната екскреция на CMS намалява, поради което по-голяма част от него се превръща в colistin и се удължава плазмения полуживот [*Michalopoulos and Falagas, 2011*]. Не е установена жлъчна екскреция при хора [*Falagas et al., 2005*].

Чрез перитонеална диализа от организма се отстраняват приблизително 1 mg colistin/h, като средно 16% от общата доза се отстраняват по време на една 2 часова процедура [*Kwa et al., 2008*]. Поради лошия клирънс се препоръчва при пациенти на перитонеална диализа colistin да се прилага в доза 2 mg/kg/d.

Стари проучвания показват, че colistin се свързва здраво с мембранните липиди на клетките на много тъкани, включително черен дроб, бял дроб, бъбреци, сърце и мускули [*Falagas et al., 2005*]. Освобождаването на тъканно-свързания антибиотик е много бавно и непълно, дори 5 дни след последната приложена доза [*Falagas et al., 2005*]. Colistin прониква слабо в плевралната кухина, белодробния паренхим, костите и цереброспиналната течност [*Michalopoulos and Falagas, 2011*]. При пациенти без значително възпаление на менингите само 5% от приложения *i.v.* colistin прониква в ликвора [*Markantonis et al., 2009*]. Причините за това не изяснени, но се предполага, че влияние може да оказва високото молекулно тегло на colistin. Елиминационният полуживот на colistin в серума и ликвора е сходен [*Markantonis et al., 2009*].

Инхалаторното приложение на полимиксини подобрява проникването в белодробния паренхим [*Kwa et al., 2008*] и увеличава антимикробната ефикасност на CMS [*Boisson et al., 2014*]. *Ratjen et al., 2006,* провеждат мултицентрично проучване при 30 пациенти с муковисцидоза, с цел определяне на концентрациите на colistin в храчка, серум и урина след инхалаторно приложение на еднократна доза от 2 MIU CMS. Установените серумни концентрации на colistin са значително по-ниски от получаваните при системно приложение, като достигат своя максимум 1.5 h след инхалиране, след което спадат [*Ratjen et al., 2006*]. Средно 4.3±1.3% от инхалираната доза се установява в урината [*Ratjen et al., 2006*]. Максималните концентрации в храчките са поне 10 пъти по-високи от граничните стойности на МПК за *P. aeruginosa* [*Ratjen et al., 2006*]. Достигат своя максимум 1 час след инхалаторното приложение на colistin, след което спадат, но и 12 часа по-късно, средните концентрации са > 4 mg/l [*Ratjen et al., 2006*]. *Boisson et al., 2014*, сравняват интрапулмоналната и системна фармакокинетика на CMS и colistin след аерозолно и интравенозно приложение на CMS при критично болни пациенти. Концентрациите на colistin в течността, покриваща епителa (ELF) показват много големи вариации (9.53 - 1137 mg/l), но са значително по-високи от плазмените (0.15 – 0.73 mg/l) след аерозолно, но не и след i.v. приложение на CMS [*Boisson et al., 2014*]. При инхалаторно приложение на CMS, 9% от дозата достига до ELF и само 1.4% пресистемно се превръща в colistin [*Boisson et al., 2014*].

За разлика от colistin, polymyxin B се прилага като активна форма. Подобно на colistin се елиминира по неренален път и се реабсорбира в голяма степен в тубулите [*Nation et al., 2014*]. Вероятно реабсорбцията на colistin в бъбречните тубули е свързана с нефротоксичността на полимиксините.

Colistin предизвиква бързо, концентрационно-зависимо убиване на бактериите с незначителни пост-антибиотични ефекти при клинично приложими концентрации [*Li et al., 2006, Velkov et al., 2013*]. Хетерорезистентност към colistin, т.е. наличие на резистентни субпопулации в щамове, които се определят като чувствителни въз основа на МПК, е установена при клинични изолати на *A. baumannii* [*Li et al., 2006*], *K. pneumoniae* [*Meletis et al., 2011, Halaby et al., 2016*], *E. cloacae* [*Napier et al., 2014*] и *P. aeruginosa* [*Bergen et al., 2011*]. Способността на резистентните субпопулации бързо да се намножават под въздействие на colistin е демонстрирано при *in vitro* PK/PD модел, който имитира дозовия режим при хора [*Tan et al., 2007*].

Фармакокинетично-фармакодинамичният индекс (PK-PD), който в най-голяма степен корелира с антибактериалната активност срещу *P. aeruginosa* и *A. baumannii* е

съотношението между площта под кривата, концентрация - време, за несвързания антибиотик от 0 - 24h и МПК (*fAUC$_{0-24}$/MIC*) [*Bergen et al., 2010, Garonzik et al., 2011, Bergen et al., 2012*]. За постигане на максимален антибактериален ефект, при минимален риск от нефротоксичност срещу изолати с МПК ≤ 1 μg/ml се препоръчва да се поддържа средна steady-state плазмена концентрация от 2 μg/ml [*Landersdorfer, Nation, 2015*]. При неадекватно съотношение *fAUC$_{0-24}$/MIC* съществува голяма вероятност за терапевтичен неуспех.

За разлика от colistin, Polymyxin B се прилага директно като активна антибактериална форма [*Nation et al., 2014*]. Подобно на colistin се подлага на значителна тубулна реабсорбция и се елиминира чрез нереанални механизми [*Nation et al., 2014*].

7.2. Клинична употреба и индикации

Colistin sulfate се прилага локално за лечение на бактериални кожни инфекции и перорално (под формата на таблетки или сироп) за селективна чревна деконтаминация [*Falagas et al., 2006*]. Colistimethate sodium (CMS) се прилага парентерално и инхалационно [*Falagas et al., 2006*]. Polymyxin B се използва клинично под формата на Polymyxin B sulfate и се прилага парентерално, локално (като очни и ушни препарати), интратекално, чрез инхалация или като разтвор за иригация [*Falagas et al., 2005*].

Colistimethate sodium (CMS) се прилага интравенозно (i.v.) за лечение на инфекции, причинени от Грам - отрицателни бактерии, резистентни на другите налични антибиотици, доказано чрез подходящо *in vitro* определяне на чувствителността [*Falagas et al., 2005*].

Аерозолно приложение на colistin (CMS) се използва за профилактика на белодробните екзацербации и влошаване на белодробната функция при пациенти с муковисцидоза, колонизирани с *P. aeruginosa* [*Falagas et al., 2005, Ballmann et al., 2011, Florescu et al., 2012*]. Инхалаторното приложение на colistin, въпреки, че не е официално одобрено от FDA, се използва и при лечението на пациенти с нозокомиална пневмония, свързана с апаратна вентилация (VAP) [*Falagas et al., 2005*].

7.3. Дозировка и начини на приложение

Оптималната клинична употреба на colistin е силно затруднена от различните начини на дозиране и представяне на дозировките [*Nation et al, 2014a*]. Проблемът до голяма степен се дължи на объркващата терминология, използвана в публикации от различни части на света [*Nation et al, 2014a*]. Използват се две основни конвенции, базирани на *in vitro* тестове за микробиологична стандартизация, чрез които се описва съдържанието на флаконите за парентерално приложение и съответните дози CMS [*Nation et al,*

2014a]. В Европа, Великобритания, Индия, съдържанието на флаконите и дозировката се представя в международни единици (IU), като допълнително се добавя и информация за съответстващите им mg CMS [*Nation et al, 2014a*]. В Северна и Южна Америка, Юго-Източна Азия и Австралия съдържанието на флаконите и дозировката се представя в милиграми (mg) colistin base activity (CBA) [*Nation et al, 2014a*] 1 000 000 IU (1 MIU) ≈ 30 mg CBA ≈ 80 mg CMS, т.е. 1 mg CBA ≈ 2.7 mg CMS [*Nation et al, 2014a*]. Изразяването на дозировката на colistin в mg, без да се уточнява дали става въпрос за CMS или CBA създава предпоставки за грешки, а това от своя страна застрашава безопасността на пациентите [*Nation et al, 2014a*].

CMS се произвежда във флакони под формата на стерилен, лиофилизиран, бял прах, който се разтваря непосредствено преди употреба с вода за инжекции или с 0.9% NaCl. Прилага се най-често интермитентно, чрез бавна (30 - 60 минути), i.v. инфузия през интервал от 8 - 12 часа (кратка характеристика) и значително по-рядко - i.m., интратекално / интравентрикуларно и инхалаторно [*Falagas et al., 2005*].

Определянето на подходящата доза CMS е изключително трудно, тъй като клирънсът на colistin зависи от бъбречната функция и варира много при пациенти, с един и същ креатининов клирънс [*Nation et al., 2017*]. Освен това, плазмените концентрации, необходими за постигане на желания антибактериален ефект се припокриват с тези, които увеличават риска от нефротоксичност [*Nation et al., 2017*]. Препоръчваните в миналото дозови режими за CMS (1 - 2 милиона IU на всеки 8 часа при пациенти с тегло > 60 kg) водят до постигане на суб-оптимални steady-state плазмени концентрации при повечето критично болни пациенти, особено при такива със запазена бъбречна функция [*Plachouras et al.,* 2009, *Garonzic et al.,* 2011, *Bergen et al., 2012*].

Nation et al., 2017 провеждат най-голямото до момента международно, мултицентрично, популационно проучване на фармакокинетиката на CMS и colistin при 214 възрастни, критично болни пациенти с креатининов клирънс 0 - 236 ml/min. На базата на направения популационен, фармакокинетичен анализ предлагат схема за дозиране при различни категории критично болни пациенти, която цели постигане на средна steady-state плазмена концентрация на colistin от 2 mg/l (Таблица 4) [*Nation et al., 2017*].

В България се използва Colistin Alvogen. Производителят препоръчва натоварваща доза от 9 MIU, последвана от поддържаща доза от 9 MIU/дневно, приложени като 2 - 3 отделни дози. Корекция на дозата се налага при бъбречна недостатъчност, но не и при

пациенти с чернодробни увреждания. При пациенти в старческа възраст, с нормална бъбречна функция не се налага корекция на дозата [кратка характеристика].

Таблица 4: Предложения за натоварваща и дневна доза CMS за постигане на плазмена концентрация от 2 mg/l при различни категории критично болни пациенти [адаптирана **от *Nation et al., 2017***]

<table>
<tr><td>Доза</td><td>Категория критично болни пациенти</td><td colspan="3">Предложена дозировка</td></tr>
<tr><td>Натоварваща доза</td><td>За всички пациенти</td><td colspan="3">Натоварваща доза CBA (mg) = Colistin $C_{ss, avg}$ (mg/l) x 2,0 x идеално телесно тегло (kg)
За да се постигне плазмена $C_{ss, avg}$ концентрация от 2 mg/l при пациент с идеално телесно тегло от 75 kg, натоварващата доза трябва да бъде 300 CBA (9MIU)
Първата регулярна дневна доза трябва да се приложи 12 часа по-късно.</td></tr>
<tr><td rowspan="13">Дневна доза</td><td rowspan="13">За пациенти, които не са на бъбречно заместителна терапия

Дневната доза се прилага в 2 равни дози през интервал от 12 часа</td><td colspan="3">Дневна доза CBA (mg) = Colistin $C_{ss, avg}$ (mg/l) x $10^{(0,0048 \times CrCl + 1.825)}$</td></tr>
<tr><td rowspan="2">CrCl (ml/min)</td><td colspan="2">Доза CMS за постигане на плазмена $C_{ss, avg}$ концентрация от 2 mg/l</td></tr>
<tr><td>mg CBA / дневно</td><td>MIU / дневно</td></tr>
<tr><td>0</td><td>130</td><td>3,95</td></tr>
<tr><td>5 до < 10</td><td>145</td><td>4,40</td></tr>
<tr><td>10 до < 20</td><td>160</td><td>4,85</td></tr>
<tr><td>20 до < 30</td><td>175</td><td>5,30</td></tr>
<tr><td>30 до < 40</td><td>195</td><td>5,90</td></tr>
<tr><td>40 до < 50</td><td>220</td><td>6,65</td></tr>
<tr><td>50 до < 60</td><td>245</td><td>7,40</td></tr>
<tr><td>60 до < 70</td><td>275</td><td>8,35</td></tr>
<tr><td>70 до < 80</td><td>300</td><td>9,00</td></tr>
<tr><td>80 до < 90</td><td>340</td><td>10,3</td></tr>
<tr><td>≥ 90</td><td>360</td><td>10,9</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Дневна доза</td><td>За пациенти на бъбречно - заместителна терапия</td><td colspan="3">Базовата дневна доза за постигане на плазмена $C_{ss, avg}$ концентрация от 2 mg/l при пациент с CrCl (ml/min) нула е 130 mg CBA / дневно (3,95 MIU / дневно)
Когато се прави бъбречно заместителна терапия е необходима добавка към изходната доза - 10% от изходната доза за всеки час бъбречно заместителна терапия</td></tr>
<tr><td>Интермитентна хемодиализа</td><td colspan="3">Не-диализани дни - 130 mg CBA / дневно (3,95 MIU / дневно)

Добавка за дните с диализа:
30% към базовата дневна доза след 3 часова процедура
40% към базовата дневна доза след 4 часова процедура

Диализата трябва да се направи към края на дозовия интервал.

Добавката към базовата дневна доза трябва да се приложи след приключване на диализата, заедно със следващата доза CMS</td></tr>
<tr><td>SLED (Sustained low-efficiency dialysis) - продължителна, ниско-ефективна диализа</td><td colspan="3">При провеждане на SLED - добавят се 10% към базовата дневна доза за постигане на плазмена $C_{ss, avg}$ концентрация от 2 mg/l
Например, за пациент на 10-часова нощна SLED процедура всеки ден, на който се прилага CMS на 12 часа, необходимата доза се изчислява по следния начин:
Базова доза от 130 mg CBA / дневно при CrCl (ml/min) нула + допълнителна доза от 10% от базовата за всеки час x 10. В този случай дневната доза ще бъде 260mg CBA (7,9 MIU /дневно). Препоръчва се SLEDда започне 1 - 2 часа след обедната / вечерната доза. В такъв случай може би е поудобно и по-безопасно да се прилагат 2 x 130 mg през 12 часа.</td></tr>
<tr><td>CRRT - непрекъсната бъбречно-заместителна терапия</td><td colspan="3">При провеждане на CRRT - добавят се 10% към базовата дневна доза за постигане на плазмена $C_{ss, avg}$ концентрация от 2 mg/l
Препоръчваната доза в този случай е 440 mg CBA / дневно (~ 13 MIU / дневно)</td></tr>
</table>

Jacobs et al. (2016), изследват фармакокинетика на CMS и colistin при критично болни пациенти с остра бъбречна недостатъчност, която налага интермитентна хемодиализа, при което установяват, че за да се поддържа плазмена концентрация на colistin > 3 mg/l за $fAUC_{0-24}/MIC > 10$ (при МПК < 1.5 mg/l) за системни инфекции и $fAUC_{0-24}/MIC > 50$ (при МПК = 0.5 mg/l) за белодробни инфекции, дозовият режим за CMS трябва да бъде 2 x 1.5 MIU в дните без хемодиализа. Хемодиализата трябва да се провежда в края на дозовия интервал, като след приключването ù трябва да се приложи още 1 доза от 1.5 MIU (т.е в дните с хемодиализа общата дневна доза е 4.5 MIU) [*Jacobs et al., 2016*].

Дозиране при деца:

При деца ≤ 40 кг, дозата е 75 000 - 150 000 IU/kg/дневно, разделени в 3 дози [кратка характеристика]. При тегло > 40кг се използват препоръките за дозиране при възрастни [кратка характеристика].

Colistin може да се прилага и интрамускулно, но това се използва рядко в клиничната практика, тъй като тази форма на приложение е изключително болезнена [*Falagas et al., 2005*].

7.4. Особености на приложение на colistin при лечение на пневмония, свързана с апаратна вентилация (VAP)

VAP е една от най-честите вътреболнични инфекции в интензивни отделения, като засяга 10% - 30% от пациентите на апаратна венилация с продължителност повече от 48 часа [*Torres et al., 2010*]. Смъртността може да варира от 10% до > 70%, в зависимост от общото състояние на пациентите и патогенността на инфектиращите микроорганизми [*Tumbarello et al., 2013*]. В последните години значително нарастна % на VAP, причинени от MDR Грам - отрицателни бактерии, особено *A. baumannii, P. aeruginosa, K. pneumoniae* [*Tumbarello et al., 2013*]. Поликатионната структура на colistin ограничава проникването му в белодробната тъкан, поради което ефикасността му при *i.v.* приложение е спорна [*Lu et al., 2012, Florescu et al., 2012, Tumbarello et al., 2013*]. Друг сериозен проблем, свързан с *i.v.* монотерапия е рискът от селекциониране на резистентност към colistin, поради недостатъчна концентрация в белодробните тъкани [*Lu et al., 2012*].

Небулизацията е метод, предложен за постигане на бактерицидни концентрации на антибиотици, особено аминогликозиди и colistin, на алвеоларно ниво при пациенти с VAP, причинени от MDR Грам - отрицателни бактерии. Инхалираните антимикробни аерозоли водят до получаване на високи антибиотични концентрации в белите дробове,

без повишен риск от системна токсичност и появата на MDR чревна флора [*Florescu et al., 2012*]. Методиката, обаче не е стандартизирана и неправилното приложение на colistin и други медикаменти може да доведе до директно увреждане на белодробната тъкан с потенциално сериозни и животозастрашаващи странични ефекти [*Kollef, 2016*].

Аерозолното приложение на colistin може да бъде полезно допълнение към i.v. терапия при лечение на VAP, причинена от чувствителни само на colistin Грам - отрицателни бактерии [*Tumbarello et al., 2013*]. Комбинираното, аерозолно и интравенозно, приложение на colistin се свързва с по-висок % на клинично излекуване, по-кратък период на апаратна вентилация след началото на VAP, по-често постигане на бактериална ерадикация [*Tumbarello et al., 2013, Gu et al.,2014, Liu et al., 2015, Abdellatif et al., 2016*] и по-ниска нефротоксичност [*Abdellatif et al., 2016*].

VAP, причинена от *A. baumannii* и *P. aeruginosa* е лекувана ефективно и безопасно и само посредством високи дози (5 MIU на всеки 8 часа) аерозолно прилаган colistin [*Lu et al., 2012*]. По-висок процент на терапевтичен успех се наблюдава при VAP, причинена от *A. baumannii* (91%), докато при тези с *P. aeruginosa* той е 59% [*Lu et al., 2012*]. Плазмените концентрации на colistin се увеличават значително между 2 - 3 ден от инхалаторното приложение на colistin [*Lu et al., 2012*]. Счита се, че натрупването с времето се дължи на бавен системен пасаж през алвеоларно-капилярната мембрана [*Lu et al., 2012*]. Когато colistin се прилага само аерозолно за лечение на VAP, процентът на остро бъбречно увреждане (Acute Kidney Injuri, AKI) е значително по-нисък, отколкото при интравенозно приложение [*Lu et al., 2012, Kim et al., 2017*].

Поради липсата на специална форма за инхалаторно приложение, за аерозолно лечение с colistin се използва предназначения за *i.v.* терапия CMS. Прилагането на *i.v.* форми на colistin за инхалация, обаче, е свързано с рискове [*Ballmann et al., 2011*]. През 2008, McCoy, описва смъртен случай след аерозолно приложен CMS при пациент с муковисцидоза - CMS е разтворен, след което е оставен да престои няколко часа, в резултат на което се е хидролизирал почти напълно. След инхалаторното му приложение, при пациента се развива остър респираторен дистрес синдром (ARDS), завършил, летално [*Kollef, 2016*].

Ефективността и безопасността на аерозолното приложение на медикаменти, включително и colistin, зависи много от използваната техника [*Kollef, 2016*]. Повечето небулайзери са проектирани по такъв начин, че доставят аерозолно прилаганите медикаменти в проксималните отдели на въздухоносните пътища, но не и в белодробния паренхим [*Kollef, 2016*]. Небулайзерите, предназначени за употреба от

спонтанно дишащи пациенти не трябва да се използват при пациенти на апаратна вентилация [*Kollef et al., 2013*]. Нивото на проникване в дихателната система зависи от размера на размера на генерираните от небулайзера частици MMAD (mass median aerodynamic diameter) [*Kollef, 2016*]. Оптималният размер на MMAD за достигане до белодробните алвеоли е 1 - 3 μm [*Kollef, 2016*], а рутинно използваните джет небулайзери генерират частици с размер около 5 μm MMAD, като различията между апаратите, произведени от различни фирми са значителни [*Kollef, 2016*]. Проникването на аерозолните частици в дисталните отдели на дихателната система може да се възпрепятства и от влажността във вентилаторния кръг, която може да причини хидроскопичен растеж и rain-out ефект в ендотрахеалната тръба [*Kollef, 2016*]. За да се преодолее антагонизма на храчките (активно свързване с муцина), концентрациите на прилаганите аерозолно антибиотици трябва да бъдат поне 25 пъти по-високи от МПК [*Kollef, 2016*]. Дозировката на аерозолно прилаганият CMS не е уточнена. Препоръчваната дозировка от производителите в UK е 40 mg (500 000 IU) на всеки 8 часа при пациенти с тегло ≤ 40 kg и 80 mg (1 000 000 IU) на всеки 8 часа при пациенти с тегло > 40 kg [*Falagas et al., 2005*]. При лечение на рекурентни белодробни инфекции дозата може да се увеличи до 160 mg (2 000 000 IU) на всеки 8 часа [*Falagas et al., 2005*].

Установено е, обаче, че независимо от високите дози (1 MIU на всеки 8 часа) CMS, използвани при колонизирани пациенти с бронхиектазии, при много от тях след 8 часа, концентрациите в течността, покриваща белодробния епител не са по-високи от 4 mg/l, поради което, при лечение на пневмония трябва да се използват високи дози 5 MIU / 8 часа [*Dhanani et al., 2016*]. Необходимо е провеждането на фармакокинетични проучвания, които да определят дозировките при пациенти с колонизация, трахеобронхит или пневмония [*Dhanani et al., 2016*]. По-високите дози, обаче, изискват по-дълги периоди на небулизация (~ 1 час), които не се толерират добре от пациенти с ARDS [*Dhanani et al., 2016*]. *Dhanani et al., 2016,* предлагат мерки за оптимизиране на параметрите за апаратна вентилация, необходими за аеролизиране на антибиотици, които включват:

- ✓ разполагане на небулайзера в инспираторния край, на 10 см, проксимално от Y-парчето
- ✓ разреждане в 10 мл физиологичен разтвор
- ✓ отстраняване на HME (Heat and moisture exchanger) филтър
- ✓ режим на вентилация - volume controlled

- ✓ модел на въздушния поток - constant inspiratory flow
- ✓ настройки на апарата - RR 12 / min, I:E ratio 50%, VT 8 ml/kg
- ✓ End-inspiratory pause, 20% duty cycle
- ✓ приложение над 60 минути
- ✓ издишаните аерозолни частици се събират във филтър

HME=haet and moist exchanger; RR=дихателна честота, VT=tidal volume

7.5. Особености при приложение на colistin за лечение на менингит / вентрикулит, причинени от MDR Грам - отрицателни бактерии

Colistin (CMS) се прилага и интратекално / интравентрикуларно за лечение на инфекции на ЦНС, причинени от MDR *A.baumanni* [*Katragkou et al., 2005, Khawcharoenporn et al., 2010*]. Клинично и микробиологично излекуване се наблюдава в > 80% от случаите, като стерилизация на ликвора се постига след средно 3 [*Khawcharoenporn et al., 2010*] до 4,5 дни [*Katragkou et al., 2005*] от началото на терапията. Най-често се използва доза от 40 000 - 500 000 IU colistin (3.2 - 40 mg CMS) / дневно (1 mg colistin = 30 000 IU, 1 mg CMS = 12 500 IU colistin), приложени 1 или 2 пъти дневно [*Khawcharoenporn et al.,2010*]. Colistin + 0.9% стерилен физиологичен разтвор се прилага чрез вентрикуларен катетър или спинална игла, след като е източено съответното количество цереброспинална течност [*Khawcharoenporn et al.,2010*]. За пациенти с външен вентрикуларен дренаж - дренажът се прекъсва за 2 часа [*Khawcharoenporn et al.,2010*]. Продължителността на IT/IVT с colistin е 2 - 3 седмици, но може да варира в зависимост от клинични отговор, като стерилизиция на ликвора се очаква в рамките на 72 часа от началото ù [*Khawcharoenporn et al.,2010*]. Като цяло, интратекалното / интравентрикулрно приложение на colistin се понася добре [*Katragkou et al., 2005*], като в редки случаи може да се развие химичен вентрикулит или доза-зависими гърчове [*Khawcharoenporn et al.,2010*].

7.6. Токсичност и странични действия

Най-често наблюдаваните странични ефекти при приложение на colistin са нефротоксичност и невротоксичност [*Falagas et al., 2006*].

Основният страничен ефект, който ограничава приложението на полимиксините е нефротоксичността. Тя е доза-зависима, като рискът от развитие ù се увеличава при плазмени концентрации на colistin > 2.5 - 3 μg/ml [*Sorli et al., 2013*], при по-възрастни пациенти, наличие на предхождащо бъбречно увреждане, хипоалбуминемия и

едновременно приложение на нестероидни противовъзпалителни средства, аминогликозиди или ванкомицин [*Yahav et al., 2012*]. Клинично се проявява с увеличение на серумния креатинин и намаление на креатининовия клирънс [*Falagas et al., 2006*]. Могат да се наблюдават също хематурия, протеинурия, цилиндриурия или олигурия, а в някои случаи и остра тубулна некроза [*Falagas et al., 2006*]. Проявява се обикновено през първата седмица от лечение с colistin и в повечето случаи е обратима [*Yahav et al., 2012*]. Честотата на нефротоксичност в по-старите публикации варира от 20.2% до 36% [*Falagas et al., 2006*], а в по-новите - от 6% до 55% [*Yahav et al., 2012*]. Тези големи разлики се дължат до голяма степен на използването на различни критерии за дефиниране на понятието бъбречна недостатъчност [*Yahav et al., 2012*]. В последните години все повече проучвания използват RIFLE (Risk-Injury-Failure-Loss-End stage renal disease) класификацията за регистриране на нефротоксичността при приложение на colistin, което би дало възможност за по-добра база за сравнение на резултатите [*Hartzell et al., 2009*].

Невротоксичността също е доза-зависима [*Falagas et al., 2006*]. Наблюдава се значително по-рядко [*Falagas et al., 2006*]. Клинично може да се прояви със замаяност, мускулна слабост (генерализирана или не), лицева или периферна парестезия, частична глухота, зрителни нарушения, световъртеж, объркване, халюцинации, гърчове, атаксия и нервномускулна блокада (обикновено под формата на миастения-подобен клиничен синдром, както и дихателна недостатъчност или апнея в резултат на парализа на дихателната мускулатура) [*Falagas et al., 2006*]. В по-старата литература най-често наблюдаваните неврологични странични ефекти са парестезиите, които се проявяват при приблизително 27% от пациентите, с i.v. приложение на CMS [*Falagas et al., 2006*]. Обикновено са доброкачествени и механизмът им на възникване вероятно не е свързан с нарушения в нервната трансмисия [*Falagas et al., 2006*]. Рискови фактори за развитието на невротоксичност са хипоксия и едновременното приложение на полимиксини с миорелаксанти, наркотици, седативи, анестетици или кортикостероиди [*Falagas et al., 2006*]. При пациенти с нарушена бъбречна функция или миастения гравис е налице по-голям риск от развитие на нервно-мускулна блокада и респираторна парализа [*Falagas et al., 2006*].

При инхалаторно приложение на CMS може да се наблюдава възпаление на гърлото, кашлица, бронхоконстрикция и стягане в гърдите [*Falagas et al., 2006*]. Бронхоконстрикцията може да се развие и при пациенти без анамнеза за астма или атопия, като обикновено изисква прекратяване на лечението и приложение на

бронходилататори и допълнително кислород [*Falagas et al., 2006*]. Най-тежкият страничен ефект след инхалаторно приложение на CMS е 1 описан случай на остър ARDS, летално [*Koleff, 2016*].

При интратекално / интравентрикуларно приложение на CMS може да се развие химичен ветрикулит или доза-зависими гърчове [*Khawcharoenporn et al., 2010*].

В по-старите публикации, честотата на съобщаваните алергични реакции, свързани с приложението на CMS е приблизително 2% [*Falagas et al., 2006*]. При 22% от пациентите с i.v. приложение на CMS се съобщава за лек сърбеж, който не налага прекратяванре на терапията [*Falagas et al., 2006*]. При няколко пациента се съобщава и за появата на обрив. В по-новата литература - няколко съобщения за случаи на контактен дерматит (екзема или еритематозна ерупция) след локално приложение на colistin sulfate и очно приложение на CMS [*Falagas et al., 2006*].

За предотвратяване на страничните действия се препоръчва често изследване на урина и на сермните урея и креатинин, внимателен ежедневен мониторинг на диурезата и неврологичния статус, ранно и правилно коригиране на дозата при наличие на нарушена бъбречна функция, избягване на едновременното приложение на други медикаменти с нефротоксично или невротоксично действие [*Falagas et al., 2006*]. Бронхосконстрикцията обикновено се повлиява при лечение с бронходилататори, поради което могат да се прилагата профилактично преди инхалаторния colistin [*Falagas et al., 2006*].

7.7. Предозиране

Предозиране на полимиксини, особено на CMS е съобщено няколко пъти в по-старата литература. В повечето случаи предозирането води до развитието на остра бъбречна недостатъчност и различни прояви на невротоксичност, включително нервно-мускулна блокада и апнея [*Falagas et al., 2006*]. Много рядко се стига до фатален изход [*Falagas et al., 2006*]. Няма антидот при предозиране на полимиксини [*Falagas et al., 2006*]. Поведението включва прекъсване на терапията и провеждане на подходяща поддържаща терапия [*Falagas et al., 2006*]. При наличие на остра бъбречна недостатъчност, хемодиализата и перитонеалната диализа могат само да контролират/регулират бъбречните усложнения, но имат много слабо влияние върху елиминирането на полимиксините [*Falagas et al., 2006*]. При развитие на апнея е необходима апаратна вентилация [*Falagas et al., 2006*].

7.8. Лекарствени взаимодействия

Едновременното приложение на полимиксини с курареформени мускулни релаксанти и други невротоксични медикаменти като етер, тубокурарин, сукцинилхолин, галамин, декаметониум и натриев цитрат трябва да се избягва, тъй като може да предизвика нервно-мускулна блокада [*Falagas et al., 2006*]. Трябва да се избягва също и едновременното приложение на colistin с cephalothin sodium, поради увеличен риск от невротоксичност [*Falagas et al., 2006*]. Трябва да се избягва комбинацията с нефротоксични медикаменти като аминогликозиди [*Falagas et al., 2006*]. Ако все пак се налага да се прилагат едновременно - много внимателен мониторинг на бъбречната функция [*Falagas et al., 2006*]. Експериментални проучвания показват, че приложението на полимиксини в комбинация с глутаминова киселина до периферен нерв може да причини трансганглионна дегенеративна атрофия [*Falagas et al., 2006*].

7.9. Комбинирана терапия с colistin

Поради наличието на хетерорезистентност и честото използване на субоптимални концентрации за лечение на инфекции, причинени от MDR Грам - отрицателни бактерии, рискът от развитие на резистентност при монотерапия с colistin е много голям. Установено е, че смъртността при монотерапия с colistin на тежки инфекции, причинени от карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae* (CRE) надвишава 50% [*Tangden & Giske, 2015*]. Дори и при новите дозови режими (9 MIU) се счита, че монотерапията не е достатъчно ефективна [*Tangden & Giske, 2015*].

Съществуват много малко проспективни клинични проучвания, които правят оценка на ефективността от комбинираното приложение на полимиксини с други антибиотици. Основната част от проучванията се базират на *in vitro* тестове за синергизъм. Синергични или бактерицидни ефекти се наблюдават при двойни и тройни комбинации, които включват colistin и аминогликозид, aztreonam, rifampicin, tigecycline, карбапенем или fosfomycin [*Tangden & Giske, 2015*]. Ефективността на тези комбинации се дължи предимно на способността на colistin да увеличава пермеабилитета на външната мембрана на Грам - отрицателните бактерии за другите антибиотици [*Tangden & Giske, 2015*]. Резултатите между различните проучвания са много противоречиви, вероятно поради различия в методологията, наличие на специфични фактори от страна на изолираните щамове, както и клиничната значимост на синергизма, наблюдаван *in vitro* [*Tangden & Giske, 2015*]. От всички антибиотици, изследвани за синергизъм с полимиксините, трябва да се отбележи ефикасността на

комбинацията с rifampicin. Комбинацията colistin / rifampicin показва в много висок процент ефективност при MDR *A. baumannii* при повечето проучвания [*Li et al., 2007*]. Същата комбинация, обаче, показва силно вариращ синергизъм при *P. aeruginosa* (14 - 100%) [*Balaji et al.2011*]. Комбинацията Polymixin B / rifampicin показва много висок % синергизъм и при *K. pneumoniae,* включително и по отношение на резистентни на карбапенеми и colistin щамове [*Elemam et al., 2010*]. Обещаващи резултати за ефективност *in vitro* показва и комбинацията colistin /meropenem при карбапенем-резистентни *A. baumannii* [*Balaji et al.2011*]. Комбинацията може да се прилага и при карбапенемаза продуциращи *Enterobacteriaceae,* ако МПК на meropenem е ≤ 4, а според някои автори, дори и при МПК ≤ 8 [*Tangden & Giske, 2015*]. В тези случаи се препоръчва използване на висока доза и продължителна инфузия (например Meropenem 2g / 8h, приложени като 3 часови инфузии - в тези случаи увеличаването на времето над МПК увеличава вероятността за терапевтичен успех [*Tangden & Giske, 2015*]. При карбапенемаза продуциращи *Enterobacteriaceae* се препоръчва и комбинация на colistin с аминогликозид, активен *in vitro* срещу изолирания щам [*Tangden & Giske, 2015*]. Гликопептидите, които нямат ефект спрямо Грам - отрицателни бактерии показват много висок % на синеризъм с полимиксини. Установен е висок процент синергизъм на комбинацията vancomycin / colistin при MDR *A. baumannii* [*Gordon et al., 2010*]. Поради нефротоксичността и на двата антибиотика приложението им *in vivo* вероятно няма да бъде подходящо [*Balaji et al.2011*]. Синергизъм *in vitro* се наблюдава и при комбиниране с по-слабо токсичния гликопептид, teicoplanin [*Wareham et al., 2011*]. Липсват клинични проучвания за ефекта от тази комбинация *in vivo*. Други ефективни *in vitro* комбинации са colistin / minocyclin (при MDR *A. baumannii),* Polymixin B / doxycycline (tigecycline) (MDR *K. pneumoniae),* colistin / ceftazidime (MDR *P. aeruginosa*) [*Balaji et al.2011*], colistin / aztreonam при MDR *P. aeruginosa* [*Yamagishi et al., 2017*]. Установен е синергизъм и на макролидите с colistin. Дори при суб-МПК и при клинично приложими концентрации на всеки един от тези антибиотици се наблюдава изразен синергизъм срещу MDR *A. baumannii, P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* [*Lin et al., 2015*]. Colistin увеличава пермеабилитета на клетъчната мембрана и улеснява навлизането на макролидите в клетката, като по този начин те осъществяват антбактериалния си ефект [*Lin et al., 2015*]. Erythromycin и Clarithromycin проявяват синергизъм с colistin, но най-мощна е комбинацията с Azithromycin [*Lin et al., 2015*]. Azithromycin има и силно изразен синергичен ефект с катионния антимикробен пептид LL-37, произвеждан от фагоцитиращите и епителните клетки по време на инфекция

[*Lin et al., 2015*]. Трябва да се отбележи и противовъзпалителния ефект на този антибиотик в белодробните тъкани [*Lin et al., 2015*]. Azithromycin има и други ефекти срещу Грам - отрицателните бактерии - установено е, че нарушава бактериалния биофилм, намалява производството на фактори на вирулентност, интерферира с подвижността и адхезията към човешки епителни клетки [*Lin et al., 2015*].

Комбинацията colistin / meropenem /tigecycline също се препоръчва на базата на високия % на оцеляване при пациенти с бактериемия, лекувани с тази комбинация [*Tangden & Giske, 2015*].

Съществуват ретроспективни проучвания за ефектите от комбинираната терапия *in vivo* при възрастни, но много малко за лечение на инфекции при новородени. Единственият предложен вариант до момента е за комбинирано приложение на colistin + meropenem ± rifampicin [*Balaji et al.2011*].

8. Методи за *in vitro* изследване на комбинираното действие на антибиотиците

Цел на тестовете за синергизъм е да се оцени *in vitro* взаимодействието на антибиотичните комбинации и да се определи какъв би бил ефекта от комбинираното приложение на два/повече антибиотика. Този ефект може да бъде позитивен или негативен. Действието на антибиотиците е синергично, ако комбинираната активност е по-голяма от сумата от техните активности поотделно. Антимикробната комбинация действа адитивно, когато кумулативния антибиотичен ефект е равен на сумата от ефектите на двата антибиотика поотделно. Когато ефекта от антибиотичната комбинация не се различава съществено от активността на по-ефективния антибиотик самостоятелно, комбинацията се определя като индиферентна, а в случаите, при които кумулативния антибиотичен ефект е значително по-малък от адитивния, комбинацията действа антагонистично.

Съществуват 4 основни групи методи, които се използват за оценка на синергизма *in vitro* - метод на шахматната дъска, MCBT-multiple-combination bactericidal antimicrobial testing, E-test и Time-kill curve тестове.

8.1. Метод на шахматната дъска

При този метод, се използват двукратни серийни разреждания от изследваните антибиотици. МПК на антибиотик А, антибиотик В и на комбинацията А+В се определят чрез разреждане в бульон (микро- и макро-метод) или агар. Ефектът от комбинирането на двата антибиотика се анализира чрез използване на общата

фракционна инхиниторна концентрация (ΣFIC). ΣFIC се изчислява по формулата (Elion et al.): $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B$, където:

$FIC_A = MIC_{A+B}/MIC_{(A)}$, а $FIC_B = MIC\ B_{A+B}/MIC_{(B)}$.

Интерпретация:

$\Sigma FIC \leq 0,5 \rightarrow$ синергизъм, $\Sigma FIC > 0,5 - 1 \rightarrow$ адитивен ефект,

$\Sigma FIC\ 1 - 4 \rightarrow$ индиферентност, $\Sigma FIC > 4 \rightarrow$ антагонизъм

Методът се използва от много лаборатории, но има своите ограничения. Той е трудоемък и е свързан е с използването на много реагенти и консумативи при изследване на голям брой антибиотични комбинации [*Doern, 2014*]. Отчитането на резултатите е едномоментно, поради което методът предоставя статична, а не динамична картина на действието на съответната антибиотична комбинация [*Doern, 2014*].

8.2. Метод на шахматната дъска с гранични антибиотични концентрации (break-point checkerboard)

Методът е предложен от *Tateda et al., 2006*. За разлика от класическия метод на шахматната дъска, вместо двукратни серийни разреждания от изследваните антибиотици се използват само по 2 антибиотични концентрации - граничните стойности за чувствителен и интермедиерен за съответния антибиотик. Методът позволява едновременно изследване на голям брой антибиотични комбинации в една 96-гнездна микротитърна плака.

8.3. MCBT (Multiple Combination Bactericidal Test, тест за бактерицидно действие на множествени комбинации)

Предназначен за изследване на комбинации от 2, 3 или 4 антибиотика едновременно. Концентрациите, които се използват при експериментите се определят на базата на серумните концентрации на изследваните антибиотици. За разлика от метода на шахматната дъска, при този метод се използват само фиксирани антибиотични концентрации. Експериментите се извършват в 96-ямкови микротитърни плаки, които съдържат желаните антбиотични комбинации в съответните концентрации. Ямките на плаките се инокулират със суспензия от изследвания микроорганизъм при крайна концентрация $5x10^5$ CFU/ml и се инкубират при 35°C за 48 часа. На 24 и 48 час, ямките се преглеждат за наличие на мътнина и суспензиите от ямките без видим растеж се субкултивират на твърда хранителна среда, инкубират се до следващия ден и се

оценява способността на съответната комбинация да предизвиква убиване на 99.9% от бактериалните клетки [*Doern, 2014*].

8.4. Модифициран метод на шахматната дъска на El Azizi

Този метод, предложен от Mohamed El Azizi през 2016г дава възможност за едновременно изследване в 96-ямкова микротитърна плака на 3 двойни и 1 тройна антибиотични комбинации. Методът дава възможност за определяне и на МВС. За всяка комбинация, чрез сравнение на МПК на всеки един от антибиотиците самостоятелно и в комбинация, се генерира Interaction Code (IC). Тестът е верифициран с ТКА [*El Azizi, 2016*].

8.5. ТКА (Time-kill assays)

Тези тестове произлизат от тестовете за определяне на минималната бактерицидна концентрация - минималната концентрация на антибиотик, която е необходима за убиване на 99.9% от инокулума след 24-часов период на експозиция. Това е и фундаменталният принцип, използван при МСВТ, но приложимостта му е ограничена, тъй като отчитането става след фиксиран период от време, трудно се контролират променливите и е труден за изпълнение [*Doern, 2014*].

ТКА използват принципа на МСВТ, но вместо бактерицидната активност да се оценява едномоментно, активността се оценява хронологично за 48 часа. За разлика от метода на шахматната дъска, който оценява способността за убиване на бактериите за фиксиран период от време и определя оптималните концентрации за това, ТКА определя скоростта на убиване. CLSI (1999) публикува стандартизиран протокол за ТКА. Накратко, за извършване на ТКА се използват по-големи обеми (≥ 10ml), където бактериалният инокулум се поставя в бульон, който съдържа желаната антибиотична концентрация от изпитваните антибиотици. Изследваният щам се инкубира в три среди - две от тях съдържат всеки един от изследваните антибиотици самостоятелно, а третата съдържа едновременно и двата антибиотика. Средите се инкубират общо 48 часа, като периодично от тях се вземат проби, които се посяват за определяне на микробното число (CFU/ml). Вземането на проба става обикновено на 0, 4, 8, 10, 12 и 24 час. Счита се, че е налице синергизъм, когато има > $2\log_{10}$ намаляване на броя на CFU/ml при комбинирано приложение в сравнение с по-активния от двата антибиотика при самостоятелно приложение. Комбинацията се счита за бактерицидна, ако е налице ≥ 3 $\log_{10}$ намаление на CFU/ml спрямо изходния инокулум.

Резултатите се представят графично [*Doern, 2014*].

8.6. Методи, основани на използването на E-тест

Описани са 3 различни метода за доказване на синергизъм чрез използване на E-test. И при трите метода първоначално се определя МПК и на двата антибиотика самостоятелно.

При Fixed Ratio Method [*Sopirala et al., 2010*], върху агарова среда, инокулирана с изследвания щам се поставя E-test стрип на единия от антибиотиците и зоната на МПК за този антибиотик се маркира със стерилна игла. Посявката се инкубира 1 час на стайна температура, след което стрипът се отстранява и на негово място се поставя стрип на другия антибиотик по такъв начин, че МПК на антибиотик В да съвпадне с маркировката на повърхността върху агара, т.е МПК и на двата антибиотика да се намират в една и съща точка. Посявката се инкубира 18 - 20 часа при 35°C, след което се отчита МПК при комбинирано приложение на антибиотиците. Определя се FICI по формулата:

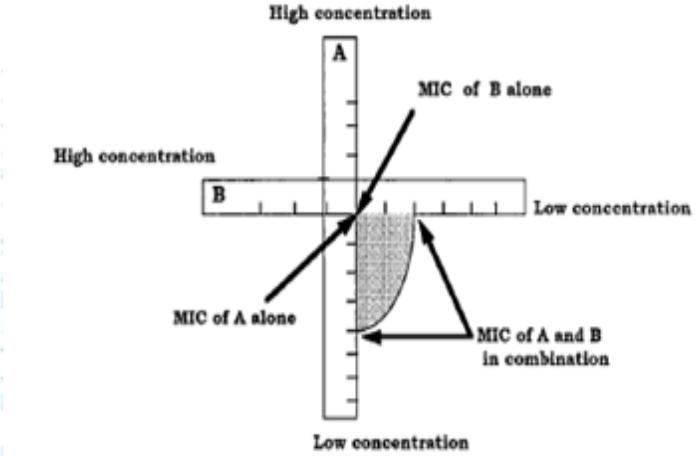
$FICI=FIC_A+FIC_B$, където $FIC_A=MIC_{(A+B)}/MIC_A$ и $FIC_B=MIC_{(A+B)}/MIC_B$.

Интерпретацията се прави както следва:

$FICI \leq 0.5 \rightarrow$ синергизъм, $0,5 < FICI \leq 1 \rightarrow$ адитивен ефект, $1 < FICI \leq 4 \rightarrow$ индиферентност, $FICI > 4 \rightarrow$ антагонизъм.

При втория метод [*White et al., 1996*], стриповете на изследваните антибиотици се поставят един спрямо друг под ъгъл 90°C, по такъв начин, че двата стрипа да се пресичат на мястото на МПК за съответния антибиотик. След инкубиране се отчитат МПК в комбинация и изчисленията се правят по описания по-горе начин. При третия метод, по-активния от двата антибиотика се включва в средата при определени, двукратно нарастващи концентрации, а E-test стрип, съдържащ другия антибиотик се поставя върху инокулирания щам. Инкубира се 18 - 20 часа в термостат. Определят се МПК, изчислява се FICI и резултатите се интерпретират по начин аналогичен на останалите методи [*Balaji et al., 2011*].

Трябва да се отбележи, че към момента, с изключение на ТКА, няма стандартизирани препоръки за провеждане и интерпретиране на резултатите от *in vitro* тестове за комбинирано приложение на антибиотици от международните организации за изследване на чувствителността.



Фигура 9. Схема за поставяне на стриповете Е-тест по метода на White. Адаптирано от White et al 1996

При сравняване на резултатите, получени чрез използване на различни методи се установяват много сериозни разлики и често липсва съпоставимост на резултатите [*Doern, 2014*]. От всички прилагани *in vitro* методи, time-kill тестовете се считат от повечето автори за референтен метод [*Doern, 2014*]. Чрез тези методи се открива синергизъм с много по-висока честота, в сравнение с другите методи [*Balaji et al., 2011*].

Методът на шахматната дъска дава относително надеждни резултати, но е необходимо да бъдат потвърдени чрез time-kill експерименти [*Elemam et al., 2010*]. Методите, основани на използването на Е-тестове са лесни за изпълнение и дават бързи резултати. От трите описани метода, най-добро съвпадение с time-kill тестовете дава третия метод с инкорпориране на единия антибиотик в средата [*Balaji et al., 2011*].

При тези условия е много важно *in vitro* проучванията за оценка на синергизма да стандартизират и съобщават клинично значими концентрации и съотношения на лекарствени комбинации [*Lim et al., 2011*]. Постигането *in vitro* на редукция в МПК с дадена антибиотична комбинация може да няма никакво практическо приложение, ако същите концентрации не могат да бъдат постигнати *in vivo* [*Lim et al., 2011*].

Една от главните опасности за човешкото здраве през 21 век се явява увеличаващата се резистентност към антимикробните препарати. Инфекциите, причинявани от резистентни бактерии допринасят за удължаване на болничния престой, по-високи разходи за хоспитализация, терапевтични неудачи, преждевременна смърт. Появилата се и бързо разпространяваща се резистентност към едни от резервните ни антибиотици, каквито са карбапенемите, налага използването на „забравени“ антибиотици или въвеждането на схеми за комбинирани терапии. От началото на 2017г. се наблюдава значително увеличение на честота на изолираните в УМБАЛ "Александровска" XDR

Грам (-) бактерии. Много сериозен проблем представляват карбапенем-резистентните щамове *K. pneumoniae, A. baumannii* и *P. aeruginosa*, голяма част от които са чувствителни само на colistin.

Colistin не е използван в продължение на десетилетия в България, поради което не са провеждани системни проучвания за чувствителността на изолираните щамове към него. Много, и понякога противоречиви са данните за активността му, дозировките, тестовете за чувствителност и възможните комбинации с други антимикробни средства, публикувани в световната литература. Прави впечатление, че при пациенти с изолирани чувствителни на colistin микроорганизми, монотерапията с ниски дози от препарата, води до терапевтични неуспехи и чести решути на заболяването. Не са редки и случаите на бързо развитие на резистентост към colistin след подобно неудачно терапевтично поведение. Всичко това показва, че начина на употреба на този резервен антибиотик, понастоящем, е нерационален и води до бързо селектиране на резистентност към него.

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

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

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

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

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

ЗАДАЧИ

1. Да се създаде колекция от щамове на клинично значими Грам-отрицателни бактерии с множествена антибиотична резистентност.
2. Да се определи чувствителността на колекционираните щамове към основни антибиотични класове чрез дисково-дифузионен метод и определяне на МПК.
3. Да се проучи чувствителността към colistin чрез референтия метод за BMD съгласно стандарт ISO 20776-1. Да се оцени ефективността на:
   - търговски кит за определяне на чувствителността към colistin чрез BMD (MICROLATEST MIC Colistin, Erba Lachema), на метода на разреждане в агар и на метода на пре-дифузия в агар и да се сравнят с тези на референтния метод.
   - Да се проучи ефективността на Rapid Polymyxin NP като бърз скрининг тест за откриване на резистентност към colistin
   - Да се проучи ефективността на Superpolymyxin Medium (*Nordaman et al., 2016b*) като скрийн агар за резистентност към colistin.
4. Да се определи мутант-превантивната концентрация на colistin при представителна част от изследваните щамове и да се изследва влиянието на други антибиотици върху нея.
5. Да се проучи ефекта на различни антибиотични комбинации с colistin при карбапенем-резистентни щамове *K. pneumoniae* чрез модифициран метод на шахматната дъска на El Azizi, TKA (Time kill assay) и да се оценят възможностите на скринингов метод с пре-дифузия (разработен в лабораторията) за изследване на този ефект.

6. Да се определи спектъра на произвежданите карбапенемази при представителите на сем. *Enterobacteriaceae* и да се проучи клоналната свързаност на изолатите при видовете с установена резистентност към colistin.
7. Да се проучат известните до момента плазмидни и част от най-често срещаните хромозомни механизми на резистентност към colistin.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Бактериални щамове

1.1. Клинични изолати

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

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

2. Идентификация на клиничните изолати

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

3. Методи за определяне на чувствителността към антимикробни средства

3.1. Дисково-дифузионен метод на Bauer-Kirby

Методът беше използван за първоначално определяне на чувствителността на всички включени в проучването щамове. Бяха използвани Мюлер-Хинтън агар (HiMedia Laboratories, India) и следните антибиотични дискове (Becton-Dickinson) - ampicillin 10 µg, amoxicillin/clavulanic acid 20/10 µg, piperacillin/tazobactam 30/6µg, cefuroxime 30 µg, cefoxitine 30 µg, cefotaxime 5 µg, ceftazidime 10 µg, cefepime 30 µg, imipenem 10 µg, meropenem 10 µg, ciprofloxacin 5µg, gentamicin 10 µg, amikacin 10 µg, tobramycin 10 µg, chloramphenicol 30 µg, trimethoprim/sulfamethoxazole 23.75/1.25 µg, tigecycline 15 µg, cefoperazone/sulbactam 105 µg. Тестовете бяха извършени и интерпретирани в съответствие с препоръките на EUCAST (www.eucast.org). Отчитането на резултатите от тестовете за чусвствителност на cefoperazone/sulbactam бе направено съобразно препоръките на Pfizer (S ≥ 21 mm, I =16 - 20 mm, R≤ 15 mm) (Кратка характеристика на

продукта Sulperazon). Като контролни щамове бяха използвани *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.2. Определяне на МПК чрез градиентен МПК метод

Методът беше използван за определяне на МПК на Tigecycline, посредством МПК Test Strip Tigecycline (*Liofilchem*). Извършването на тестовете и отчитането на резултатите бе направено в съответствие с препоръките на производителя.

3.3. Доказване на продукция на широкоспекърна β-лактамаза (ESBL)

Фенотипно, производството на широкоспектърна β-лактамаза бе доказано посредством двойно-дисковия тест за синергизъм, съобразно инструкциите на EUCAST (EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms of clinical and/or epidemiological importance)

3.4. Доказване на продукция на карбапенемаза

За фенотипно доказване на производството на карбапенемаза бе използван търговския кит на Rosco diagnostica A/S, Denmark - MBL, KPC and OXA-48 Confirm kit. Тестовете бяха извършени и интерпретирани съобразно инструкциите на производителя.

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

Определянето на МПК чрез метода на микроразреждане в бульон бе направено в съответствие с препоръките на ISO 20776-1, посредством лабораторно приготвени панели за BMD [*ISO 20776-1*]. Методът беше използван за определяне на референтната МПК на colistin. Диапазонът на изследваните концентрации бе 0.125 - 128 mg/l. Подготовката на панелите и извършването на тестовете бе направено по следния протокол, изготвен на базата на ISO 20776-1 [*ISO 20776-1*]:

Подготовка на плаките:

Плаки: Стерилни, 96-ямкови полистиренови, микротитърни плаки с обло дъно (Dinatech S.A.)

Среда: Катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон (Biolab ZRt.), приготвен, в съответствие с препоръките на производителя.

Антимикробни агенти:

Colistin sulfate (Sigma-Aldrich) с чистота 26699 IU/mg. Потентността на colistin (mg/g) се преизчислява по следния начин 26699 IU/mg x 0.03333 = 889. 88 mg/g [CLSI].

Приготвяне на изходен разтвор (Stock solution)

От сухата субстанция се приготвят изходни разтвори (Stock solution) в стерилна дестилирана вода с концентрация 10240 mg/l. Количеството на сухата субстанция се изчислява по формулата:

$$\text{тегло на сухата субстанция (mg)} = \frac{\text{обем на разтвора (ml) x концентрация (mg/l)}}{\text{потентност на субстанцията (mg/g)}}$$

Алтернативно, количеството на необходимия разредител (dH_2O) може да се изчисли по формулата:

$$\text{количество на разредителя (ml)} = \frac{\text{тегло на сухата субстанция (mg) x потентност (mg/g)}}{\text{концентрация (mg/l)}}$$

Необходимото количество антибиотична субстанция се измерва с аналитична везна и се разтваря с десилираната вода. Приготвеният Stock solution се разпределя в аликвоти (х 1 ml) в стерилни стъклени шишенца и се съхранява във фризер при температура ≤ -20°C. След размразяване неизползваните количества от Stock solution се изхвърлят.

Приготвяне на работни разтвори

Работните разтвори се приготвят от Stock solution (10240 mg/l) в стерилен катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон в концентрация 2х желаните крайни концентрации в плаките, като се използва следната схема (Таблица 5):

Таблица 5: Приготвяне на разреждания на работни разтвори за разреждане в бульон. [адаптирано от Eucast discussion document 3]

Антимикробна концентрация изходен разтвор (mg/l)	Обем на изходния разтвор (ml)	Обем Мюлер-Хинтон бульон (ml)	Получена концентрация на работния разтвор (mg/l)	Крайна концентрация на colistin в ямките (mg/l)
10240	0,5	9,5	512	-
512	1	1	256	128
512	1	3	128	64
512	1	7	64	32
64	1	1	32	16
64	1	3	16	8
64	1	7	8	4
8	1	1	4	2
8	1	3	2	1
8	1	7	1	0,5
8	1	1	0.5	0.25
1	1	3	0.25	0.125

Работните разтвори (в количество x 50µl) се закапват в ямките от съответните колонки на плаката посредством 8 канална пипета, като в колона 1 (Growth control, GC) се закапват x 50µl катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон. Ако не се използват веднага, плаките се покриват с фолио, поставят се в торбичка за съхранение и се замразяват веднага във фризер при температура (-20°C).

Приготвяне на бактериалния инокулум

Крайната концентрация на инокулума в ямките трябва да бъде ~ 5 x 10^5 CFU/ml.

За приготвянето му се използват чисти култури от изследвания щам, не по-стари от 30h. В стерилен физиологичен разтвор, от 4 - 5 добре диференцирани колонии се приготвя суспензия с мътнина 0.5 MF (~ 1 x 10^8 CFU/ml). Инокулумът трябва да бъде използван в рамките на 30 минути от приготвянето му. Суспензията се разрежда 1:100 (0.1ml изходна суспензия + 9.9 ml Мюлер-Хинтън бульон= 1x10^6). След като 50 µl от разредения инокулум се добавят към 50 µl от съответното антибиотично разреждане, се получава разреждане 1:2→ крайна концентрация на инокулума във всяка ямка ~ 5 x 10^5 CFU/ml.

Инокулиране на плаките

В ямките на всеки ред от плаката се закапват по 50 µl от разредените 1:100 суспенизии от изследваните щамове и от контролите. На всяка плака се включват като положителна контрола *E. coli* NCTC 13846 (*mcr*-1 положителен) и като отрицателна контрола *E. coli* ATCC 25922 или *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Схемата за приготвяне и инокулиране на плаките за референтния BMD е представена на Фигура 10.

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	GC	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	*E. coli* NCTC 13846
B	GC	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	*E. coli* ATCC 25922
C	GC	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	Щам № 1
D	GC	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	Щам № 2
E	GC	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	Щам № 3
F	GC	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	Щам № 4
G	GC	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	Щам № 5
H	GC	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	Щам № 6
	Крайна концентрация на colistin в ямките след добавяне на бактериалния инокулум												

*GC (growth control) - контрол на растежа

Фигура 10: Схема за приготвяне и инокулиране на плаките за референтия BMD

Проверка на инокулума:

Периодично от ямката за контрол на растежа, веднага след закапване на плаката се вземат 10 µl. Разреждат се в 10 ml стерилен бульон или физиологичен разтвор. 100 µl от това разреждане се посяват на повърхността за подходяща агарова среда и се инкубира до следващя ден. Ако изходния инокулум е бил ~ 5 x 10^5 CFU/ml се очаква появата на ~ 50 колонии.

Чистотата на инокулума се контролира чрез посявка на суспензията върху неселективен агар и последващо инкубиране до следващия ден.

Инкубиране на плаките:

Върху инокулираната плака се поставя капак, след което плаките се инкубират в термостат при температура 35-37°C за 16 - 20 часа.

Отчитане на резултатите:

Резултатите се отчитат и се приемат за валидни, само ако:

- ✓ е налице достатъчен растеж (мътнина) в ямката за контрол на растежа
- ✓ е потвърдена чистотата на културата
- ✓ МПК на контролните щамове са в допустимия диапазон (Таблица 6):

Таблица 6: Допустим диапазон на МПК на colistin за контролни щамове

Контролен щам	МПК Colistin (mg/l)	
	Прицелна стойност	Допустим интервал
E. coli ATCC 25922	0.5 - 1	0.25 - 2
P. aeruginosa ATCC 27853	1 - 2	0.5 - 4
E. coli NCTC 13846	4	2 - 8

МПК е най-ниската концентрация на антибиотика, която напълно инхибира бактериалния растеж. Ако има пропусната ямка (най-често явлението се приема като белег за хетерорезистентност) - МПК е следващата, най-ниска концентрация, при която няма видим бактериален растеж. При наличие на повече от една "пропуснати ямки" тестът не може да се отчете и трябва да се повтори [*ISO 20776-1*].

3.6. Определяне на МПК чрез метода на разреждане в агар

Определянето на МПК чрез разреждане в агар бе извършено в съответствие с препоръките на EUCAST [EUCAST *E.Def 3.1, 2000*]. Методът беше използван за

определяне на МПК на следните антибиотици - ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, aztreonam, colistin, ceftriaxon. Подготовката на агаровите среди и извършването на тестовете бе направено по следния протокол, изготвен на базата [EUCAST *E.Def 3.1, 2000*]:

Хранителна среда

За определяне на МПК чрез разреждане в агар бе използван катионно регулиран Мюлер-Хинтън агар (Himedia Laboratories), приготвен в съответствие с препоръките на производителя.

Антимикробни агенти:

Gentamicin sulfate (Sigma Aldrich) - потентност (активност) 590 mg/g

Tobramycin sulfate (Sigma Aldrich) - потентност (активност) 671 mg/g

Amikacin (Sigma Aldrich) - потентност (активност) 981 mg/g

Ceftazidime pentahydrate (Sigma Aldrich) - потентност (активност) 914 mg/g

Cefepime hydrochloride (USP) - потентност (активност) 1000 mg/g

Ciprofloxacin (USP) - потентност (активност) 1000 mg/g

Imipenem monohydrate (Sigma Aldrich) - потентност (активност) 930 mg/g

Meropenem trihydrate (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd) - потентност (активност) 880 mg/g

Aztreonam (Sigma Aldrich) - потентност (активност) 956 mg/g

Colistin sulfate (Sigma Aldrich) - потентност (активност) 26699 IU/mg (= 889, 88 mg/g)

Приготвяне на изходните разтвори (Stock solution)

От сухите субстанции се приготвят изходни разтвори (Stock solution) с концентрация 10240 mg/l или 2560 mg/l (Ciprofloxacin).

Необходимите количества суха субстанция и разредител се изчислява по формулите:

$$\text{тегло на сухата субстанция (mg)} = \frac{\text{обем на разтвора (ml) х концентрация (mg/l)}}{\text{потентност на субстанцията (mg/g)}}$$

$$\text{количество на разредителя (ml)} = \frac{\text{тегло на сухата субстанция (mg) х потентност (mg/g)}}{\text{концентрация (mg/l)}}$$

Необходимото количество антибиотична субстанция се измерва с аналитична везна. Антибиотичните субстанции се разтварят и разреждат в съответствие с посоченото в Таблица 7.

Таблица 7: Разтворители и разредители за приготвяне на изходен разтвор (Stock solution) за антибиотици (адаптирано от EUCAST Discussion Document E.Dis 5.1, 2003)

антибиотик	**разтворител**	**разредител**
Aztreonam	Наситен разтвор на натриев бикарбонат	вода
Cefepime	Фосфатен буфер 0,1M, pH 6	Фосфатен буфер 0,1M, pH 6
Ceftazidime	Наситен разтвор на натриев бикарбонат	вода
Colistin	вода	вода
Imipenem	Фосфатен буфер 0,01M, pH 7,2	Фосфатен буфер 0,01M, pH 7,2
Meropenem	Фосфатен буфер 0,01M, pH 7,2	Фосфатен буфер 0,01M, pH 7,2
Gentamicin	вода	вода
Tobramycin	вода	вода
Amikacin	вода	вода

След приготвяне Stock solutions се разпределят в аликвоти (1 ml) в стерилни стъклени шишенца и се съхраняват във фризер при температура ≤ -20°C.

Приготвяне на работни разтвори:

За определяне на МПК в агар се използват петри с диаметър 9 mm, за които е необходимо да се приготви обем от 20 ml (1ml от съответното антибиотично разреждане + 19 ml Мюлер-Хинтън агар). Работните разтвори на изследваните антибиотици се приготвят в стерилна десилирана вода в концентрация 20х желаната крайна концентрация в агара. Разрежданията се правят по следната схема (Таблица 8):

Приготвяне на агаровите среди

За определяне на МПК се използват следните антибиотични концентрации:

0,125 - 128 mg/l (за gentamicin, tobramycin, amikacin, colistin)

0.0004 - 32 mg/l (ciprofloxacin)

0.03 - 256 mg/l (ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem)

Мюлер-Хинтон агарът се приготвя, съобразно инструкциите на производителя. Стерилизира се с автоклав. Охлажда се на водна баня до 50°C. Крайното pH на средата трябва да бъде 7.2 - 7.4.

Работните разреждания на антибиотичните субстанции се приготвят по описаната по-горе схема, като се включва и контрола без антибиотик. В контейнери с обем 25 - 30 ml се поставя по 1 ml от съответното разреждане. Към всеки контейнер се добавят се по 19 ml агар, разбърква се добре и се излива в предварително надписана стерилна петриева паничка f90, поставена върху равна повърхност. Средите се оставят на стайна температура, за да се втвърди агара, след което се подсушават в термостат за отстраняване на излишната влага от повърхността на агара. Така приготвените среди се използват в деня на приготвяне.

Таблица 8. Приготвяне на работни разтвори за разреждане в агар [адаптирано от EUCAST Definitive document E.Def 3.1]

Антимикробна концентрация изходен разтвор (mg/l)	Обем на изходния разтвор (ml)	Обем дестлирана вода (ml)	Получена концентрация на работния разтвор (mg/l)	Крайна концентрация в средата след добавяне на 19ml агар
10240	1	1	5120	256
10240	1	3	2560	128
2560	1	1	1280	64
2560	1	3	640	32
2560	1	7	320	16
320	1	1	160	8
320	1	3	80	4
320	1	7	40	2
40	1	1	20	1
40	1	3	10	0.5
40	1	7	5	0.25
5	1	1	2.5	0.125
5	1	3	1.25	0.06
5	1	7	0.625	0.03
0,625	1	1	0.3125	0.015
0,625	1	3	0.1562	0.008
0,625	1	7	0.0781	0.004

Приготвяне на инокулума

За извършване на теста е необходим инокулум от 10^4 CFU/ml на петно върху агара.

Първоначално, като се използват 4 - 5 колонии от чиста култура от изследвания щам, с цел да се избегне селекциониране на атипичен вариант, се приготвя суспензия с мътнина 0.5MF (~ 1 x 10^8 CFU/ml) в 0.85% стерилен физиологичен разтвор. Така приготвената суспензия се разрежда 1:10 с 0.85% стерилен физиологичен разтвор, за да се получи съспензия с мътнина ~ 1 x 10^7 CFU/ml (например 0.5 ml от 0,5MF + 4,5 ml стерилен физиологичен разтвор). Средите трябва да се инокулират в рамките на 30 минути след стандартизиране на инокулума.

Инокулиране на агаровите среди

Петрата се разделя на сектори и се надписват полетата, в които ще се изследват изпитваните щамове. За всеки щам върху средата се закапва по 1 µl от разредената 1:10 суспензия. За инокулиране на средите е най-добре да се използва репликатор. Алтернативно, инокулирането може да стане чрез микропипета (1µl) или калибрирано йозе (1µl) - 1µl от 10^7 CFU/ml = 10^4 CFU/ml.

Преди да се инокулира, повърхността на агара трябва да бъде подсушена (след престой на стайна температура или в термостат). За контрол на растежа трябва да се включат и 2 петри Мюлер-Хинтън агар без антибиотик. Инокулирането на средите започва с инокулиране на агар без антибиотик, след това продължава от средата с най-ниска концентрация към тази с най-високата. Накрая се инокулира втора петра за контрол на растежа без антибиотик, за да се изключи замърсяване на инокулума или значим пренос на антибиотик от една среда в друга. Върху среда без антибиотик се прави посявка на част от инокулума, за проверка на чистотата на културата.

Инкубиране:

Инокулираните среди се оставят за няколко минути на стайна температура, докато се абсорбира инокулума. След това се обръщат и се инкубират в термостат при 35°C за 16 - 20 часа. При подреждане в термостата не трябва да се поставят повече от 5 петрита едно върху друго, за да се избегне неравномерно загряване на средите.

Отчитане и интерпретиране на резултатите

Преди отчитане и записване на резултатите за изследваните клинични щамове се отчитат контролите на растежа и чистотата на инокулума. На контролните петри без антибиотик трябва да е налице адекватен растеж, както на изследваните, така и на контролните щамове.

Определят се МПК на контролните щамове - за да е валиден теста за изследваните щамове, стойностите на МПК на контролните щамове трябва да са в допустимите граници. Отчитането на резултатите се извършва на тъмен фон с невъоръжено око. МПК е най-ниската концентрация на антибиотика, която напълно инхибира видимия растеж. 1 колония или лека "мъгла"/пелена, останала от първичния инокулум се игнорират. При наличие на малък брой колонии при концентрации няколко пъти по-високи от тази, която инхибира по-голямата част от инокулума → препосявка и повторно изследване. Този феномен може да се дължи на замърсяване на инокулума, резистентни субпопулации, β-лактамаза-продуциращи микроорганизми, растеж на чувствителен щам след инактивиране на антибиотика в средата.

Контрол на качеството

За контрол на качеството се използват контролни щамове - *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* NTCC 13846, които се включват във всяка партида изследвани щамове. За да се приеме теста за валиден, резултатите на контролните щамове за съответните антибиотици трябва да бъдат в допустимия от стандарта (EUCAST) интервал.

Интерпретация:

Интерпретацията на получения резултат (S/I/R) се прави в съответствие с препоръките на EUCAST за сответните видове [www.eucast.org].

3.7. Определяне на МПК на colistin чрез MICROLATEST MIC COLISTIN (Erba Group - Erba Lachema, Czech Republic) (MLTCol)

MICROLATEST MIC COLISTIN е търговски кит за определяне на МПК на colistin чрез BMD. Представлява стрип съставен от 8 полистиренови ямки с плоско дъно, които съдържат лиофилизиран colistin с концентрации от 0.25 до 16 mg/l (в стрипа е включена и ямка без антибиотик за контртол на растежа). Всички тестове бяха извършени в съответствие с препоръките на производителя. От чиста култура от изследвания щам се приготвя съспензия с мътнина 0.5 MF в стерилен физиологичен разтвор. 60 µl от тази суспензия се инокулира в 13 ml стерилен катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон (Biolab ZRt.). От така приготвения инокулум, след добро хомогенизиране, във всички ямки от стрипа се закапват по 100 µl. Инокулираният стрип се поставя в полиетиленова торбичка и се инкубира в термостат при 35±1°C за 16-20 часа в аеробна атмосфера. На

следващия ден се отчита МПК. Тестът се счита за валиден, ако е налице растеж в ямката за контрол на растежа. МПК е най-ниската концентрация на антибиотика, при която няма растеж. Ако има пропусната ямка (най-често явлението се приема като белег за хетерорезистентност) - МПК е следващата, най-ниска концентрация, при която няма видим бактериален растеж. При наличие на повече от една "пропуснати ямки" тестът не може да се отчете и трябва да се повтори [*ISO 20776-1*].

3.8. Определяне на чувствителността към colistin по метода на пре-дифузия

Тестът може да се използва за определяне на чувствителността към colistin на представители на сем. *Enterobacteriaceae, Acinetobacter spp* и *P. aeruginosa*. Всички тестове бяха извършени в съответствие с препоръките на производителя, а именно:
Таблетка Colistin Pre-diffusion Neo-Sensitab (10 µg) се поставя върху повърхността на не-инокулиран Мюлер-Хинтън агар. След престой в продължение на 2 часа в термостат при температура 35 - 37°C, таблетката се отстранява и петрата се оставя да престои на стайна температура за 18 - 22 часа. От чиста култура на изследвания щам се приготвя суспензия с мътнина 0.5 MF. Агарът се инокулира с тампон по начин, аналогичен на използвания при ДДМ, след което петрата се поставя в термостат при температура 35°C и се инкубира до следващия ден. Измерва се диаметъра на зоната на инхибиране и получените резултати се интерпретират съобразно посоченото в Таблица 9:

Таблица 9: Критерии за интерпретация на резултатите, получени от теста с пре-дифузия на Rosco Diagnostica A/S

Микроорганизмъм	S	I	R
Enterobacteriaceae	≥ 16 mm	15 - 12 mm	< 12 mm
P. aeruginosa	≥ 16 mm	15 - 12 mm	< 12 mm
Acinetobacter spp	≥ 20 mm	19 - 14 mm	< 14 mm

Посочените стойности съответстват на МПК за S ≤ 2 µg/ml и R > 4 µg/ml.

3.9. Rapid Polymyxin NP тест (RPNP)

Предложен е от *Nordmann et al.* през 2016г като бърз, скриниг тест за откриване на резистентност към полимиксини при представители на сем. *Enterobacteriaceae*. Тестът се основава на доказване на метаболизирането на глюкоза при наличие на бактериален растеж в присъствие на определена концентрация colistin / Polymyxin B. Образуването на кисели метаболити се визуализира чрез промяна в цвета на pH индикатор (фенол рот) от оранжево в жълто.

Описаният протокол е изготвен на базата на оригиналния протокол [*Nordmann et al., 2016b*]

Приготвяне на реагенти и разтвори:

Приготвяне на Stock solution colistin:

Colistin sulfate (Sigma-Aldrich) се разтваря в катионно буфериран Мюлер-Хинтън бульон (BioLab, ZRt), така че да се получи крайна концентрация от 0.2 mg/ml (200 µg/ml). Количеството colistin sulfate, необходимо за приготвяне на разтвора се изчислява по формулата:

$$\text{colistin sulfate (mg)} = \frac{\text{желан краен обем (1 ml) x крайна концентрация (200 µg /ml)}}{\text{потентност на сухата субстанция (889.88 mg/g)}}$$

Приготвеният Stock solution colistin се съхранява в стерилно стъклено шише при -20°C за максимум 1 година.

Приготвяне на Rapid Polymyxin NP solution:

За 250 ml разтвор:

6.25 g суха субстанция от катионно-буфериран Мюлер-Хинтон бульон се смесват с 0.0125 g phenol red, след което се разтварят с 225ml dH_2O. pH на получения разтвор се коригира до 6.7 чрез добавяне на 1 mol/L HCl. Полученият разтвор се автоклавира при 121°C за 15 min. Охлажда се до стайна температура, след което се добавят 25 ml 10% стерилна D (+) glucose.

Крайните концентрации на съставките в Rapid Polymyxin NP solution са както следва: 2,5% CA-MHB, 0,005% phenol red и 1% D (+) glucose.

Така приготвения разтвор може да бъде съхраняван при 4°C за 1 седмица или при -20°C за 1 година. Преди употреба разтворът трябва да се затопли до 37°C, за да се предотврати забавяне на началото на растежа и съответно - забавяне на промените в цвета. Непосредствено преди извършване на експеримента, към Rapid Polymyxin NP solution се добавя Stock Solution Colistin, така че да се получи крайна концентрация на colistin в работния разтвор 5 µg/ml. Например, за получаване на работен разтвор B с colistin за изследване на един щам (включително и необходимите контроли) е необходимо смесването на 25µl Stock Solution Colistin и 975 µl Rapid Polymyxin NP solution (разтвор A), при което се получава краен обем 1 ml и концентрация от 5 µg/ml colistin.

Работни разтвори: Разтвор A = Rapid Polymyxin NP (без colistin);

Разтвор B = Rapid Polymyxin NP + 5 µg/ml colistin

Приготвяне на бактериалния иноклум:

За приготвяне на инокулума се използва 18 - 24 часова чиста култура от изследвания щам, получена при култивиране върху Мюлер-Хинтон агар, Luria-Bertani агар, Columbia agar + 5% овнешка кръв, шоколадов агар, уриселект 4 агар или Levin агар. Фалшиво положителни резултати могат да се получат при използване на агар на MacConkey, Drigalski, Bromocresol purple agar.

За извършване на теста се използват като (+) контрола *E. coli* NTCC 13846, а като (-) контрола *E. coli* ATCC 25922. Чисти култури от изследвания щам, положителната и отрцателната контрола се ресуспендират в епруветки с 10 ml стерилен разтвор на NaCl (0.85%), така че да се получат суспензии с мътнина 3.0 – 3.5 MF ($\approx 10^9$ CFU/ml). Така приготвените суспензии трябва да се използват в рамките на 15 минути от приготвянето им и не повече от 60 минути след приготвяне.

Инокулиране на плаката:

Тестът се извършва 96-гнездна полистиренова микротест плака (с обло дъно на ямките и капак). За всеки изолат, бактериалната суспензия се инокулира в две ямки - със и без colistin по схемата, представена на Фигура 11.

	A1	**A2**	**A3**	**A4**
Стъпка 1	150 µl разтвор A	150 µl разтвор A	150 µl разтвор A	150 µl разтвор A
Стъпка 3	50 µl 0.85% NaCl	-	-	-
Стъпка 4	-	50 µl суспензия (-) контрола	-	-
Стъпка 5	-	-	50 µl суспензия (+) контрола	-
Стъпка 6	-	-	-	50 µl суспензия изследван щам
	B1	**B2**	**B3**	**B4**
Стъпка 2	150 µl разтвор B	150 µl разтвор B	150 µl разтвор B	150 µl разтвор B
Стъпка 3	50 µl 0.85% NaCl	-	-	-
Стъпка 4	-	50 µl суспензия (-) контрола	-	-
Стъпка 5	-	-	50 µl суспензия (+) контрола	-
Стъпка 6	-	-	-	50 µl суспензия изследван щам

Фигура 11. Схема за инокулиране на плаката при извършване на RPNP тест

Крайната концентрация на бактериите в ямките е ≈ 10^8 CFU/ml, а крайната концентрация на colistin sulfate - 3.75 µg.

Инкубиране

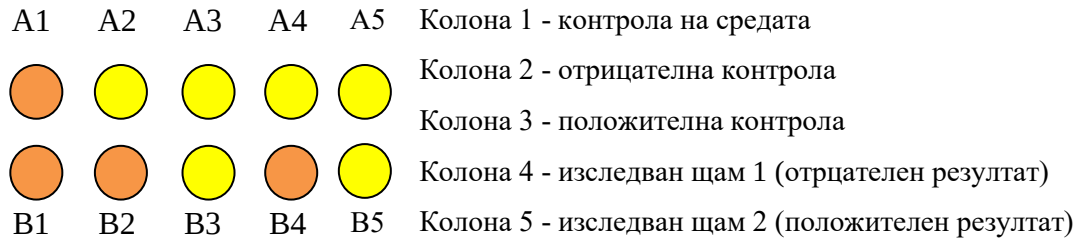
Инокулираната плака се инкубира до 4 часа при 35±1°C, при аеробни условия, без да се запечатва с фолио и без разклащане. Не се запечатва, тъй като за въглехидратния метаболизъм е необходим кислород. Плаката се проверява първоначално на 10 минута за наличие на спонтанна промяна в цвета, след което на всеки час.

Отчитане

Тестът е положителен при промяна на цвета на суспензията и в двете ямки на изследвания щам - от оранжево в жълто. Тестът е отрицателен, ако има промяна на цвета на суспензията само в ямката без colistin (Фигура 12).

Критерии за валидност на теста:

- ✓ суспензиите в ямки A1 и B1 трябва да останат оранжеви (липсва замърсяване на средата)
- ✓ суспензиите в ямки A2, A3 и A4 и т.н. трябва да бъдат с жълт цвят (налице е метаболизиране на глюкозата от изследваните щамове)
- ✓ ямките с (-) контрола трябва да дават отрицателен резултат, а тези с положителна контрола - положителен



Фигура 12. Отчитане на RPNP тест

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

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

Рецептата за приготвяне на SuperPolymyxin Medium е представена в Таблица 10.

Приготвяне на Stock Solution colistin за SPM - Разтворът се приготвя от суха субстанция colistin sulfate (Sigma-Aldrich) в концентрация 20 mg/ml.

colistin sulfate (mg) = краен обем (1 ml) x крайна концентрация (20 mg /ml= 20000 µg/ml)
потентност на сухата субстанция (889.88 µg/mg)

Таблица 10. Приготвяне на SuperPolymyxin Medium [адаптирано от *Nordmann et al., 2016a*]

	Stock solution (mg/ml)	количество	Крайна концентрация в агара
EMB агар (Levin)	-	15 g	3.75%
dH_2O	-	400 ml	
Colistin sulfate	20 (в стълени епруветки)	70 µl	3.5 mg/l

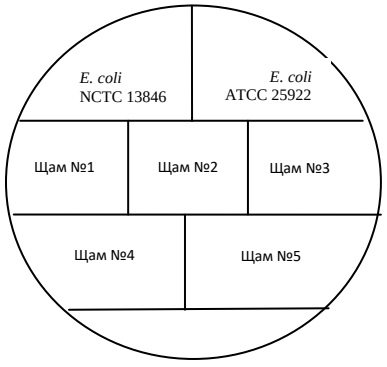
Приготвяне на агара - 15 g EMB агар (Levin) се разтварят в 400 ml dH_2O. Загрява се до разтваряне на сухата субстанция. Средата се стерилизира при 121°C за 15 min, след което се охлажда за 1 час до 56°C. Добавят се 70 µl Stock solution colistin (20 mg/ml). Хомогенизира се добре и се разлива в стерилни пластмасови петри (f90) в количество 20 ml. Съхранява се в хладилник при температура 4°C за максимум 1 седмица.

Инокулиране на скрийн-агар colistin

Всяка петра screen agar colistin може да се използва еднократно. При извършване на теста задължително се използват положителна (*E. coli* NCTC 13846) и отрицателна контрола (*E. coli* ATCC 25922).

Приготвяне на инокулума - аналогично на методиката, използвана при дисково-дифузионния метод се приготвя суспензия с мътнина 0,5 MF.

Инокулиране - посредством тампон, след отстраняване на излишното количество течност, за всеки щам и за контролите се инокулира сектор от агара с размери ~ 15 (20)mm / 15 (20) mm (Фигура 13.)



Фигура 13. Схема за инокулиране на Screen agar colistin

Инкубиране - инкубират се в термостат при температура 35±1°C до следващия ден (16-20h).

Отчитане: Тестът за всички изследвани щамове се счита за валиден, само ако контролните щамове дават очаквания резултат - липса на растеж за *E. coli* ATCC 25922 и наличие на конфлуентен растеж за *E. coli* NCTC 13846. Тестът се приема за положителен при наличие на растеж в инокулирания за съответния щам сектор - под формата на конфлуентен растеж или изолирани колонии. Тестът е негативен при липса на растеж.

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

4.1. Определяне на мутант-превантивна концентрация на colistin

За разлика от тестовете за определяне на МПК, при които се използва инокулум от 10^5 CFU/ml, при определяне на MPC се изисква работа с по-голям инокулум > 10^9 - 10^{10} CFU/ml, за да е сигурно, че в чувствителната бактериална популация са налице едностъпални резистентни мутанти [*Canton et al., 2011*].

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

Приготвяне на агаровите среди:

Извършва се по начин, аналогичен на този, описан при определяне на МПК в агар. Приготвят се петри с катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон (HiMedia Laboratories) с нарастващи концентрации на colistin sulfate от 0.125 - 128 mg/l.

Бактериален инокулум:

Чиста култура от изследвания щам се посява на цяла петра агар на McConkey (или КА). Инкубира се 18 - 24 часа при аеробни условия и температура 35±1°C. На следващия ден, цялата получена бактериална популация се събира със стерилен памучен тампон и се прехвърля в колба със 100 ml стерилен Мюлер-Хинтън бульон. Инкубира се 18 - 24 часа, с периодично разклащане, при аеробни условия и температура 35±1°C.

Инокулиране на средите:

Средите с нарастващи антибиотични концентрации 0.125 - 128 mg/l се разграфяват на сектори (на една агарова среда могат да изследват максимум 6 щама). За всеки изследван щам - колбата с бактериалната суспензия се разклаща добре и посредством

пипета се закапват по 25 µl (≥ 10^9 CFU) върху всички среди, в съответния сектор. Посредством стерилно пластмасово йозе (10 µ) инокулумът се разпределя равномерно в целия сектор. Изчаква се няколко минути до пълното абсорбиране на инокулума, след което средите се инкубират се при аеробни условия и температура 35±1°C за 48 часа.

За всеки изследван щам се проверява и гъстотата на бактериалния инокулум, чрез определяне на микробно число. Тестът е валиден, ако микробното число е ≥ 10^{10} CFU/ml.

Отчитане на резултатите:

Резултатите се отчитат на 24 и 48 час. MPC е най-ниската концентрация, която предотвратява видимия бактерилен растеж.

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

Методът беше използван за изследване на влиянието на rifampicin и meropenem върху MPC на colistin при *K. pneumoniae.*

Приготвяне на агаровите среди:

За извършване на теста бяха използвани петри с катионно-коригиран Мюлер-Хинтън агар с нарастващи концентрации на colistin sulfate от 0.125 - 128 mg/l и фиксирани концентрации на rifampicin (1.7 mg/l) и meropenem (6.8 mg/l). Тези концентрации са подбрани така, че да съответстват на средните, несвързани с плазмените протеини концентрации на тези антибиотици в плазмата при стабилно състояние (steady-state) [*Lagerbäck et al., 2016*].

Работните разтвори на colistin, meropenem и rifampicin се приготвят в концентрация 40х желаната крайна концентрация в агара. Мюлер-Хинтън агар се приготвя съобразно препоръките на производителя. Приготвянето на агаровите среди се извършва по схема, представена в Таблица 11.

Бактериален инокулум:

Чиста култура от изследвания щам се посява на цяла петра агар на McConkey (или КА). Инкубира се 18 - 24 часа при аеробни условия и температура 35±1°C. На следващия ден, цялата получена бактериална популация се събира със стерилен памучен тампон и се прехвърля в колба със 100 ml стерилен Мюлер-Хинтон бульон. Инкубира се 18 - 24 часа, с периодично разклащане, при аеробни условия и температура 35±1°C.

Таблица 11: Приготвяне на работни разтвори за среди за определяне на влиянието на различни антибиотици върху MPC на colistin*

Антимикробна концентрация изходен разтвор (mg/l)	Обем на изходния разтвор (ml)	Обем дестлирана вода (ml)	Получена концентрация на работния разтвор на colistin (mg/l)	Обем на работния разтвор на colistin (ml), добавян към агара	Обем на работния разтвор на rifamin 68 mg/l (ml) добавян към агара	Крайна концентрация (mg/l) в средата след добавяне на 19ml агар
10240	1	1	5120	0.5	0.5	128 + 1.7
10240	1	3	2560	0.5	0.5	64 + 1.7
2560	1	1	1280	0.5	0.5	32 + 1.7
2560	1	3	640	0.5	0.5	16 + 1.7
2560	1	7	320	0.5	0.5	8 + 1.7
320	1	1	160	0.5	0.5	4 + 1.7
320	1	3	80	0.5	0.5	2 + 1.7
320	1	7	40	0.5	0.5	1 + 1.7
40	1	1	20	0.5	0.5	0,5 + 1.7
40	1	3	10	0.5	0.5	0,25 + 1.7
40	1	7	5	0.5	0.5	0,125 + 1.7

* Схемата е примерна за комбинацията colistin - rifampicin (1.7 mg/l). За комбинацията colistin - meropenem се използва същата схема, но с работен разтвор на meropenem от 272 mg/l, така че крайната концентрация на meropenem в агара да бъде 6.8 mg/l

Инокулиране на средите:

Средите с нарастващи антибиотични концентрации 0.125 - 128 mg/l се разграфяват на сектори (на една агарова среда могат да изследват максимум 6 щама). За всеки изследван щам - колбата с бактериалната суспензия се разклаща добре и посредством пипета се закапват по 25 µl ($\geq 10^9$ CFU) върху всички среди, в съответния сектор. Посредством стерилно пластмасово йозе (10 µ) инокулумът се разпределя равномерно в целия сектор. Изчаква се няколко минути до пълното абсорбиране на инокулума, след което средите се инкубират се при аеробни условия и температура 35±1°C за 48 часа.

За всеки изследван щам се проверява и гъстотата на бактериалния инокулум, чрез определяне на микробно число. Тестът е валиден, ако микробното число е $\geq 10^{10}$ CFU/ml.

Отчитане на резултатите:

Резултатите се отчитат на 24 и 48 час. MPC е най-ниската концентрация, която предотвратява видимия бактерилен растеж.

5. Тестове за изследване на комбинираното действие на антибиотици colistin

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

Методът е разработен в лабораторията и дава възможност за едновременно изследване за синергизъм с colistin на голям брой антибиотици. За извършване на теста бяха използвани петри с Мюлер-Хинтън агар (HiMedia Laboratories) и следните антибиотични дискове (BD): colistin (10 µg), rifampicin (5 µg), meropenem (10 µg), gentamicin (10 µg), tobramycin (10 µg), amikacin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), azithromycin (15 µg), doxycycline (5 µg), tigecycline (15 µg), clindamycin (2 µg), chloramphenicol (30 µg), vancomycin (5 µg), piperacillin/tazobactam (30/6 µg), aztreonam (30 µg), cefoperazone/sulbactam (105 µg), fosfomycin (200 µg).

Тестовете бяха извършени по следния начин:

Дискове colistin от 10µg (BD) се поставят върху повърхността на неинокулиран Мюлер-Хинтън агар (максимум 9 диска на петра, един от които - в центъра) и се инкубират при 35±1°C за 2 часа (първи период на пре-дифузия), след което се изваждат от термостата и се оставят на стайна температура за още 2 часа (втори период на пре-дифузия). След като изтекат двата периода на пре-дифузия, дисковете се отстраняват. От чиста, 18-24 часова култура на изследвания щам се приготвя суспензия с мътнина от 0.5 MF. За всеки изследван щам, с тампон, по начин, аналогичен на този, използван при дисково-дифузионния метод се инокулират 2 петри с Мюлер-Хинтън агар - едната с пре-дифузия на colistin (петра №1), а другата (петра №2) - без предварителна обработка. Върху инокулираните петри, паралелно, се поставят дискове, съдържащи антибиотиците, с които ще се търси синергизъм, като на петра №1 те се поставят точно върху местата на отстранените дискове colistin. Мястото на един диск colistin на петра №1 се оставя празно, с цел да се определи инхибирането, получено от пре-дифузията на colistin самостоятелно. Петритата се инкубират в термостат, при аеробни условия и температура 35±1°C за 18 - 24 часа. На следващия ден, диаметрите на зоните на инхибиране на комбинациите с colistin (петра №1), на всички антибиотици самостоятелно (петра №2) и на colistin, след пре-дифузия (петра №1) се измерват. За всяка една комбинация се определя разликата (Δ, mm) между диаметъра на зоната на инхибиране на комбинацията и диаметъра на зоната на инхибиране на по-активния от двата антибиотика. Интерпретацията на получените резултати се прави както следва:

- ✓ ако Δ е (-2), (-1), 0, 1 или 2 mm → индиферентност на комбинацията
- ✓ ако Δ е (-3) или (-4) mm→ възможен антагонизъм

- ✓ ако Δ е ≤ (-5) mm → антагонизъм
- ✓ ако Δ е 3 или 4 mm → възможен синергизъм
- ✓ ако Δ ≥ 5 mm → синергизъм

5.2. Микродилуционен метод на El-Azizi

Тестовете бяха извършени в стерилни 96-ямкови плаки (Dinatech S.A.), в съответствие с оригиналния протокол на метода, предложен от *El-Azizi, 2016,* но без определяне на минималните бактерицидни концентрации за антибиотиците и изследваните комбинации. Методът е сходен с метода на шахматната дъска, но при него се използват ограничен брой антибиотични концентрации и на 1 плака могат да се определят едновременно чувствителността към три антибиотика и ефектите на три двойни и една тройна комбинация от тези антибиотици спрямо изследвания щам.

Тестовете бяха извършени по следния начин [методологията е описана в съответствие с оригиналния протол - *El-Azizi, 2016*]:

Подготовка на плаката: Първите три реда от всяка плака (A, B, C) се използват за всеки един от антибиотиците самостоятелно, следващите три реда (D, E, F) - за изследване на трите двойни комбинации, а ред G - за тройната комбинация от тези антибиотици. Във всички ямки на плаката се закапват по 50µl катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон. От изследваните антибиотици се приготвят разреждания в концентрация 4x най-високата концентрация за всеки един от антибиотиците самостоятелно и в съответните двойни и тройни комбинации. В ямки от A11 до G11 се закапват по 50µl от съответните 4x- разреждания и посредством 8-канална пипета се правят двукратни серийни разреждания в посока от колона 11 (A11-G11) към колона 1 (A1-G1). От последните ямки (A1-G1) се изхвърлят по 50µl (Фигура 14).

Инокулиране на плаката: От чиста, 18-24 часова култура от изследвания щам се приготвя суспензия във физиологичен разтвор с мътнина 0,5MF. Разрежда се 1:100 с CA-MHB (например 100 µl (0,5MF) + 9.9 ml). Във всички ямки на плаката, с изключение на ред H се закапват по 50 µl от така приготвената суспензия, така, че крайният обем в ямките да бъде 100 µl, а инокулумът ~ 1-5 x 10^5 CFU/ml. Последният ред на плаката (H) се използва за отицателна контрола и съдържа само Мюлер-Хинтън бульон, а ямките от колона 12, които не съдържат антибиотик - като положителна контрола на растежа (Фигура 14).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											A	(+)K
B											B	(+)K
C											C	(+)K
D											A+B	(+)K
E											A+C	(+)K
F											B+C	(+)K
G											A+B+C	(+)K
H	(-) K	(-) K	(-) K	(-) K	(-) K	(-) K	(-) K	(-) K	(-) K	(-) K	(-) K	

A - антибиотик №1, B - антибиотик №2, C - антибиотик №3; A+B - комбинация от антибиотици №1 и №2; A+C - комбинация от антибиотици №1 и №3, B+C - комбинация от антибиотици №2 и №3; A+B+C - комбинация от трите изследвани антибиотика

(-)К - отицателна контрола (съдържа само Мюлер-Хинтън агар), (+) К - контрола на растежа - съдържа Мюлер-Хинтън агар и бактериален инокулум

Фигура 14. Схема за извършване на микродилуционния метод на El-Azizi (адаптирана от *El-Azizi, 2016)*

Инкубиране на плаката: Върху плаката се поставя капак и се инкубира в термостат при температура 35±1°C за 24 часа.

Отчитане:

Определят се МПК на антибиотиците самостоятелно и в комбинация, след което оценката се прави спрямо най-активният антибиотик (с най-ниска МПК) самостоятелно, и в двойните и тройна комбинации. При отчитане на двойните комбинации, за всяка комбинация се генерира IC (interaction code = код на взаимодействието), който представлява цифрова стойност, съответстваща на броя на двукратните серийни разреждания, с които се променя МПК на по-активния от двата антибиотика в съответната комбинация, в сравнение с МПК самостоятелно. Тази стойност може да бъде положителна или отрицателна. Например, ако МПК на по-активния антибиотик е намаляла с 1 двукратно серийно разреждане, IC за тази комбинация е 1, ако е намаляла с две двукратни серийни разреждания, IC = 2 и т.н. Ако МПК на по-активния антибиотик в комбинацията се е увеличила с 1 двукратно серийно

разреждане, IC= (-1), ако се е увеличила с две - IC= (-2) и т.н. Определя се типа на взаимодействие на антибиотиците в съответната комбинация (IT=interaction type) по следния начин. Комбинацията е индиферентна, ако IC е (-1), 0 или 1, което показва, че МПК на по-активния антибиотик в комбинацията е останала непроменена или се увеличила/намалила с едно двукратно серийно разреждане. Комбинацията се приема за синергична, ако IC ≥ 2, т.е. МПК на по-активния от двата антибиотика в комбинация е намаляла с ≥ 2 двукратни серийни разреждания. Комбинацията е антагонистична, ако IC ≤ (-2), което показва, че МПК на по-активния антибиотик се е увеличила с ≥ 2 двукратни серийни разреждания при комбиниране с други антибиотици. При отчитане на тройната комбинация се прилага същото правило, но сравнението се прави с МПК на най-активния антибиотик в двойните комбинации. Тройната комбинация се приема за синергична, ако нейният IC ≥ 2, индиферентна, ако IC е (-1), 0 или 1 и антагонистична, ако IC ≤ (-2) в сравнение с IC на която и да е от двойните комбинации, която съдържа по-активния антибиотик.

Методът на El-Azizi беше използван за определяне на ефекта на следните двойни комбинации с colistin: colistin - meropenem; colistin - rifampicin, colistin - gentamicin и на тройните комбинации: colistin - rifampicin - meropenem, colistin - rifampicin - gentamicin, colistin - meropenem - gentamicin. Антибиотиците бяха изследвани в следните концентрации: colistin 0.007 - 8 mg/l (за colistin-чувствителни щамове) и 0,125 - 128 mg/l (за colistin-резистентни щамове), meropenem 0.06 - 64 mg/l, gentamicin 0.03 - 32 mg/l и rifampicin 0.125 - 128 mg/l.

5.3. Time-kill assays (TKA)

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

За извършването им беше използван катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон (CA-MHB, Biolab ZRt). Беше изследвано влиянието на комбинацията colistin - rifampicin при концентрации на colistin от 1.2 mg/l и на rifampicin от 1.7 mg/l, което съответства на средните, несвързани с плазмените протеини концентрации на тези антибиотици в плазмата при стабилно състояние (steady-state) [*Lagerbäck et al., 2016*]. За всеки изследван щам бяха използвани по 4 реакционни епруветки със следния състав:

- ✓ бактериален инолулум + Мюлер-Хинтън бульон → за контрол на растежа
- ✓ бактериален инокулум + Мюлер-Хинтън бульон + colistin 1.2 mg/l → за отчитане на ефекта на colistin самостоятелно

- ✓ бактериален инокулум + Мюлер-Хинтън бульон + rifampicin 1.7 mg/l → за отчитане на ефекта на rifampicin самостоятелно
- ✓ бактериален инокулум + Мюлер-Хинтън бульон + colistin 1.2 mg/l + rifampicin 1.7 mg/l → за отчитане на комбинираният ефект от действието на двата антибиотика

Крайният обем на разтворите във всяка епруветка в началото на изследването е 10 ml.

Антибиотични разтвори:

Работните антибиотични разтвори се приготвят в концентрации 100х желаната крайна концентрация (120 mg/l за colistin и 170 mg/l за rifampicin) от stock solutions (стокови разтвори) на двата антибиотика с концентрации 1024 mg/l, съхранявани във фризер при (-20°C).

Бактериален инокулум:

За извършване на теста се използва бактериален инокулум в логаритмична фаза на развитие, получен по следния начин:

Бактериалните клетки от 1 колония от изследвания щам се посяват в 2 ml катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон и се култивират до следващия ден при температура 35±1°C. 20 µl от тази култура се посяват в 2 ml предварително затоплен катионно-коригиран Мюлер-Хинтън бульон и се инкубират още 2 часа при температура 35±2°C.

Инокулиране на епруветките:

Инокулирането на епруветките става по следната схема (Таблица 12).

Таблица 12: Схема за инокулиране на средите за извършване на ТКА за комбинацията colistin - rifampicin

епруветка	Работен разтвор на colistin (ml)	Работен разтвор на rifampicin (ml)	CA-MHB (ml)	Бактериален инокулум (ml)
Контрол на растежа	-	-	9.5	0.5
Colistin	0.1	-	9.4	0.5
Rifampicin	-	0.1	9.4	0.5
Colistin + rifampicin	0.1	0.1	9.3	0.5

Първоначално, към съответните количества предварително темперирaн при 35±2°C катионно-коригиран, Мюлер-Хинтън бульон се добавят работните разтвори на антибиотиците, а след това бактериалния инокулум (получен по описания вече начин). Вортексира се в продължение на 15 sec, след което от всяка епруветка се вземат по 0.1

ml за определяне на микробното число в момента на инокулиране на средите (0h). Началният бактериален инокулум беше ~ 1- 5 x 10^7 CFU/ml.

Инкубиране:

Средите се инкубират в термостат при 35±1°C за 24h, като периодично епруветките се разклащат. На 2h и 24h от средите във всяка епруветка, след предварително вортексиране в продължение на 15 sec, се вземат по 0.1 ml за определяне на микробното число. Получените стойности се представят като $\log_{10}$ CFU/ml.

Отчитане и интерпретация:

Получените при определяне на микробните числа стойности за количествата на бактериите на 0, 2 и 24h се сравняват и се определя разликата им (Δ_{24h-0h}) между 24h и 0h. Сравняват се получените разлики (Δ_{24h-0h}) за комбинацията colistin-rifampicin и за всеки един от антибиотиците самостоятелно. Интерпретацията на получените резултати се прави както следва:

Комбинацията се счита за синергична, ако е налице ≥ 2 $\log_{10}$ намаляване на cfu/ml между комбинацията и по-активния антибиотик [*Tangdän, 2014a*]. Ефектът на антибиотика/комбинацията е бактериостатичен, ако е налице намаление с < 3 $\log_{10}$ в cfu/ml след 24h, в сравнение с изходния инокулум, а ефектът е бактерициден, ако това намаление е ≥ 3 $\log_{10}$ [*Lagerbäck et al., 2016*].

6. Молекулярно - генетични изследвания

6.1. Екстракция на ДНК

6.1.1. ДНК екстракция за изършване на real-time PCR

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

6.1.2. Термоекстракция на ДНК

За извършване на част от PCR тестовете бе използван термоекстракт на ДНК в Tris-EDTA (TE) buffer (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 8 - 8.3). Термоекстрактите бяха получени по следния начин:

Преди извършване на екстракцията щамовете се култивират на агар на МакКонки. 1 - 2 колонии от получената чиста култура се суспендират в 300 µl TE buffer. Суспензията се

центрофугира при 10 000 rpm за 5 min. Супернатантата се отпипетира и утайката се ресуспендира в нови 300 µl TE buffer. Пробата се поставя в термоблок, загрят при 100°C за 10 min. След охлаждане термокстрактите се съхраняват във фризер при температура (-20°C).

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

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

6.3. Multiplex PCR за доказване на основните групи карбапенемази

При част от карбапенем резистентните щамове, основните групи карбапенемази бяха доказани и чрез multiplex PCR. За извършване на реакциите бяха използвани термоекстракти от изследваните щамове (получени по методиката, описана в т.6.1.2.) и праймери, описани в Таблица 13. Всички използвани праймери са синтезирани от Metabion (Germany), Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) или Alpha DNA (USA).

За всеки щам бяха извършени по две мултиплекс реакции:

- ✓ за откриване на bla_{VIM} и bla_{IMP}
- ✓ за откриване на bla_{NDM}, bla_{KPC} и bla_{OXA}

Всяка една от двете PCR реакции беше изпълнена в обем от 25 µl. Реакционната смес включваше 1.2 µl ДНК-екстракт от съответния щам, 1x reaction buffer (съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) и 50 mM KCl), 2 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (GenetBio, Korea), 15 pmol от всеки праймер, 0.75 U Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea).

ДНК продуктите (x10 µl + 1-2 µl 6x DNA Loading Dye (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada) бяха подложени на електрофореза в 1,5% агарозен гел с добавен етидиев бромид в крайна концентрация 0,5 µg/ml. При всяка електрофореза беше включван ДНК маркер: PCRSizer 100bp DNA Ladder (100bp-1517bp) (*New England Biolabs*). Електрофорезата бе провеждана в 1x TAE буфер (40mM Tris, 20mM оцетна киселина,

1mM EDTA) за 60 минути при 400 mA, 120V. Амплификационните продукти бяха визуализирани на UV-лъчев трансилюминатор TFX-35M (Vilber Lourmat, France).

Таблица 13. PCR праймери за multiplex PCR за доказване на основните групи карбапенемази (*Poirel et al., 2011*)

Ген	Праймер	Нуклеотидна последователност (5' - 3')	Размер (bp) на продукт
bla_{IMP}	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232 bp
	IMP-R	GGTTTAAYAAAACAACCACC	
bla_{VIM}	VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390 bp
	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	
bla_{NDM}	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621 bp
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
bla_{KPC}	KPC-Fm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798 bp
	KPC-Rm	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	
bla_{OXA-48}	OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438 bp
	OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	

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) при условия, посочени в Таблици 14 и 15.

Таблица 14. Режим на амплификация на PCR реакция за откриване на bla_{VIM} и bla_{IMP}

Етап	Процес	t° C	продължителност
1x	начална денатурация	95° C	5 min
30x	денатурация	95° C	30 sec
	свързване на праймерите	54° C	30 sec
	удължаване	72° C	45 sec
1x	финално удължаване	72° C	5 min

Таблица 15. Режим на амплификация на PCR реакция за за откриване на bla_{NDM}, bla_{KPC} и bla_{OXA}

Етап	Процес	t° C	продължителност
1x	начална денатурация	95° C	5 min
30x	денатурация	95° C	30 sec
	свързване на праймерите	57° C	30 sec
	удължаване	72° C	45 sec
1x	финално удължаване	72° C	5 min

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

При част от включените в проучването щамове бяха извършени PCR реакции за откриване на гени на често срещани β-лактамази - bla_{SHV}, bla_{CTX-M} и bla_{CMY}. Всички използвани праймери са синтезирани от Metabion (Germany), Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) или Alpha DNA (USA) и са посочени в Таблица 16.

Всяка една от трите PCR реакции беше изпълнена в обем от 25 µl. Реакционната смес включваше 1.2 µl ДНК-екстракт от съответния щам, 1x reaction buffer (съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) и 50 mM KCl), 2 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (GenetBio, Korea), 15 pmol от всеки праймер, 0.75 U Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea).

Таблица 16. Праймери, използвани за PCR реакции за откриване на bla_{SHV}, bla_{CTX-M} и bla_{CMY}

Ген	Праймер	Нуклеотидна последователност	Размер (bp) на продукт	литературен източник
bla_{SHV}	SHV-A	ACTGAATGAGGCGCTTCC	297 bp	Markovska R, 2008
	SHV-B	TCCCGCAGATAAATCACC		
bla_{CTX-M}	CTX-M-V	CVATGTGCAGYACCAGTAA	585 bp	Markovska R, 2008
	CTX-M-R	ARGTSACCAGAAYMAGCGG		
bla_{CMY}	CMY F	AACACACTGATTGCGTCTGAC	1 226 bp	Schneider I , 2014
	CMY R	CTGGGCCTCATCGTCAGTTA		

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) при условия, посочени в Таблица 17.

Таблица 17. Режим на амплификация на PCR реакция за откриване на bla_{SHV}, bla_{CTX-M} и bla_{CMY}

Етап	Процес	t° C	продължителност
1x	начална денатурация	95° C	5 min
30x	денатурация	95° C	30 sec
	свързване на праймерите	61° C	30 sec
	удължаване	72° C	45 sec
1x	финално удължаване	72° C	5 min

ДНК продуктите (x10 µl + 1-2 µl 6x DNA Loading Dye (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada) бяха подложени на електрофореза в 1,5% агарозен гел с добавен етидиев бромид в крайна концентрация 0,5 µg/ml. При всяка електрофореза беше включван

ДНК маркер: PCRSizer 100bp DNA Ladder (100bp-1517bp) (*New England Biolabs*). Електрофорезата бе провеждана в 1x TAE буфер (40mM Tris, 20mM оцетна киселина, 1mM EDTA) за 60 минути при 400 mA, 120V. Амплификационните продукти бяха визуализирани на UV-лъчев трансилюминатор TFX-35M (Vilber Lourmat, France).

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

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

За извършване на реакциите бяха използвани термоекстракти от изследваните щамове (получени по методиката, описана в т.6.1.2.) и праймери, описани в Таблица 18. Всички използвани праймери са синтезирани от Metabion (Germany), Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) или Alpha DNA (USA).

PCR реакциите бяха изпълнени в обем от 25 µl. Реакционната смес включваше 1.2 µl ДНК-екстракт от съответния щам, 1x reaction buffer (съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) и 50 mM KCl), 2 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (GenetBio, Korea), по 15 pmol от всеки праймер за mcr-1, mcr-2 и mcr-3, по 10 pmol от всеки праймер за mcr-4 и mcr-5, по 5 pmol от всеки праймер 16S и 1 U Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea).

Таблица 18. Праймери за multiplex PCR за плазмидно кодирани гени за резистентност към colistin (*Lescat et al., 2018, article in press*)

Ген	Праймер	Нуклеотидна последователност	Размер (bp) на продукт
mcr-1	mcr1-mtpF	5′-ATGCCAGTTTCTTTCGCGTG-3′	502 bp
	mcr1-mtpR	5′-TCGGCAAATTGCGCTTTTGGC-3′	
mcr-2	mcr2-mtpF	5′-GATGGCGGTCTATCCTGTAT-3′	379 bp
	mcr2-mtpR	5′-AAGGCTGACACCCCATGTCAT-3′	
mcr-3	mcr3-mtpF	5′-ACCAGTAAATCTGGTGGCGT-3′	296 bp
	mcr3-mtpR	5′-AGGACAACCTCGTCATAGCA-3′	
mcr-4	mcr4-mtpF	5′-TTGCAGACGCCCATGGAATA-3′	207 bp
	mcr4-mtpR	5′-GCCGCATGAGCTAGTATCGT-3′	
mcr-5	mcr5-mtpF	5′-GGACGCGACTCCCTAACTTC-3′	608 bp
	mcr5-mtpR	5′-ACAACCAGTACGAGAGCACG-3′	
16S rDNA	16SF	5′-GTGCAATATTCCCCACTGCT-3′	93 bp
	16SR	5′-CGATCCCTAGCTGGTCTGAG-3′	

Амплификацията беше извършвана с апарат GenePro Thermal Cycler модел: TC-E-96G (BIOER, Hangzhou. Китай) и LifeECO модел: TC-96/H(b)C (BIOER, Hangzhou. China) при режим, посочен в Таблица 19.

Таблица 19. Режим на амплификация на multiplex PCR за плазмидно кодирани гени за резистентност към colistin (*Lescat et al., 2018, article in press*)

Етап	Процес	t° C	продължителност
1x	начална денатурация	94° C	4 min
30x	денатурация	94° C	5 sec
	хибридизация	59° C	20 sec
	удължаване		
1x	финално удължаване	72° C	5 min

ДНК продуктите (x10 µl + 1-2 µl 6x DNA Loading Dye (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada) бяха подложени на електрофореза в 1.5% агарозен гел с добавен етидиев бромид в крайна концентрация 0,5 µg/ml. При всяка електрофореза беше включван ДНК маркер: PCRSizer 100bp DNA Ladder (100bp-1517bp) (*New England Biolabs*). Електрофорезата бе провеждана в 1x TAE буфер (40mM Tris, 20mM оцетна киселина, 1mM EDTA) за 60 минути при 400 mA, 120V. Амплификационните продукти бяха визуализирани на UV-лъчев трансилюминатор TFX-35M (Vilber Lourmat, France).

6.6. PCR за амплифициране на хромозомно кодирани гени, свързани с развитие на резистентност към colistin и секвениране

Гените бяха амплифицирани по описания вече начин за изпълнение на полимеразо-верижна реакция. Използваните праймери за амплификация са представени в Таблица 20.

Таблица 20. Праймери за амплифициране на хромозомно кодирани гени, свързани с развитие на резистентност към colistin

Ген	Праймер	Нуклеотидна последователност (5'-3')	литературен източник
pmrA	pmrA ext F	CAT TTC CGC GCA CTG TCT GC	Jayol et al., 2014
	pmrA ext R	CAG CTT TCA GTT GCA AAC AG	
pmrB	pmrB ext F	ACC TAC GCG AAA AGA TTG GC	Jayol et al., 2014
	pmrB ext R	GAT GAG GAT AGC GCC CAT GC	
phoP	phoP ext F	GAG CTT CAG ACT ACT ATC GA	Jayol et al., 2014
	phoP ext R	GGG AAG ATA TGC CGC AAC AG	
phoQ	phoQ ext F	ATA CCC ACA GGA CGT CAT CA	Jayol et al., 2014
	phoQ ext R	CAG GTG TCT GAC AGG GAT TA	
mgrB	mgrB ext F	TTA AGA AGG CCG TGC TAT CC	Cannatelli et al., 2013
	mgrB ext R	AAG GCG TTC ATT CTA CCA CC	

Всяка една от PCR реакции беше изпълнена в обем от 25 µl. Реакционната смес включваше 1.2 µl ДНК-екстракт от съответния щам, 1x reaction buffer (съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) и 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (GenetBio, Korea), 15 pmol от всеки праймер, 0.75 U Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea).

Режимите за амплификация са представени в Таблица 21.

Таблица 21. Режим на амплификация на PCR реакция за хромозомно кодирани гени, свързани с резистентност към colistin

Ген	Етап	Процес	t° C	продължителност
	1x	начална денатурация	95° C	5 min
mgrB	30x	денатурация	95° C	30 sec
		свързване на праймерите	56° C	30 sec
		удължаване	72° C	1 min
	1x	финално удължаване	72° C	5 min
	1x	начална денатурация	95° C	5 min
pmrA	30x	денатурация	95° C	30 sec
		свързване на праймерите	54° C	30 sec
		удължаване	72° C	60 sec
	1x	финално удължаване	72° C	5 min
	1x	начална денатурация	95° C	5 min
pmrB	30x	денатурация	95° C	30 sec
		свързване на праймерите	59° C	30 sec
		удължаване	72° C	1 min 10 sec
	1x	финално удължаване	72° C	5 min
	1x	начална денатурация	95° C	5 min
phoP	30x	денатурация	95° C	30 sec
		свързване на праймерите	56° C	30 sec
		удължаване	72° C	40 sec
	1x	финално удължаване	72° C	5 min
	1x	начална денатурация	95° C	5 min
phoQ	30x	денатурация	95° C	30 sec
		свързване на праймерите	56° C	30 sec
		удължаване	72° C	1 min 45 sec
	1x	финално удължаване	72° C	5 min

Пречистване на PCR продукта с цел последващо секвениране по Sanger бе извършено чрез Rapid PCR Cleanup Enzyme Set (ExoSAP, Applied Biosystems,USA) и секвениране

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 програмата BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

6.7. ERIC-PCR за епидемиологично типизиране

За извършване на реакцията бяха използвани термоекстракти от изследваните щамове (получени по методиката, описана в т.6.1.2.) и ERIC-1R и ERIC2 праймери (*Amersham Pharmacia Biotech* или *Metabion*).

Pr1	ERIC-1R	5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'
Pr2	ERIC-2	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC-3'

ERIC-PCR беше изпълняван в обем от 25 µl. Реакционната смес включваше: 4 µl ДНК екстракт, 1 x reaction buffer, съдържащ 10 mMTris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 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 с апарат Bioer при следния режим (таблица 22):

Таблица 22. Режим на амплификация на ERIC-PCR

Брой цикли	Процес	t° C	продължителност
1x	денатурация	94° C	5 min
5x	денатурация	94° C	30 sec
	свързване на праймерите	26° C	30 sec
	удължаване	72° C	90 sec
30x	денатурация	94° C	30 sec
	свързване на праймерите	45° C	30 sec
	удължаване	72° C	90 sec

След амплификацията, 18 µl от всяка реакционна смес бяха подложени на електрофореза (установка за хоризонтална електрофореза Bio Rad) в 2 % агарозен гел с 0,5 µg/ml етидиев бромид при 120 V за 120 мин. Продуктите бяха визуализирани на UV трансилюминатор (Vilbert Lourmat). Размерът на продукта беше определян чрез сравняване с ДНК маркер: PCRSizer 100bp DNA Ladder (100bp-1517bp) (*New England Biolabs*). Анализ на данните: Ивиците от ERIC- PCR бяха анализирани визуално. За

определяне на филогенетичното родство между проучените клинични щамове и за построяване на дендрограмите (филогенетични дървета) бе използван UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average clustering algorithm) with Dice coefficient и за построяване на дендрограмата Phylodendron (http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html). Изолати с коефициент на сходство над 0,8 се приемаха за един клон.

6.8. Електрофореза

Всички PCR продукти (с изключение на получениете от Real-time PCR) бяха анализирани електрофоретично на 1.5% агарозен гел. За приготвянето му беше използвана агароза Standard EEO (*Applichem, Germany; Serva, Germany или SeaKem LE Agarose, LONZA,Rockland, ME*), 1x TAE буфер (40mM Tris, 20mM оцетна киселина, 1mM EDTA) и етидиев бромид. Агарозният гел бе приготвян по следния начин:

Агарозата се разтапя в 100 ml 1x TAE буфер за около 2 min в микровълнова фурна до достигане на хомогенна стопилка. След частично охлаждане се добавя етидиев бромид до крайна концентрация 0.5 µg/ml. Агарозата се излива във ваничка за хоризонтална електрофореза с предварително поставен гребен. След полимеризиране на агарозата в електрофоретичната вана се налива 1x TAE буфер. Гребенът се отстранява. При всяка електрофореза се накапва молекулен маркер PCR Sizer 100 bp DNA Ladder (*Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada* или *New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA*). Преди накапване на пробите, 10 µl от съответния PCR-продукт се смесват с 1-2 µl 6x DNA Loading Dye (*Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada*) или Gel Loading Dye (*New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA*). Електрофорезата се провежда за 50 до 90 минути при 400 mA и 120V. Амплификационните продукти се визуализират на UV-лъчев трансилюминатор TFX-35M (*Vilber Lourmat, France*).

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

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

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

разреждане в агар, е по-малък от общия брой изследвани щамове, поради различия в диапазона на изследваните концентрации.

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

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

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

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

V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Характеристика на включените в проучването клинични изолати

В хода на проучването беше създадена колекция от 210, неповтарящи се, клинично значими щамове *K. pneumoniae* (n=107), *E. coli* (n=41), *E. cloacae* complex (n=13), *A. baumannii* complex (n=28) и *P. aeruginosa* (n=21), изолирани в периода 2013г - 05/2018г в Централна лаборатория по микробиология на УМБАЛ "Александровска"ЕАД. 96.7 % (203/210) от тях бяха изолирани в периода от 01/01/2017г до 31/05/2018г. Критерий за селекция на щамовете бе установяването на множествена антибиотична резистентност, като бяха включвани всички изолати с нечувствителност към карбапенеми, тъй като инфекциите, причинени от тях са показани за лечение с colistin. Преобладаващата част от щамовете (96.7%, 203/210) бяха изолирани от проби на хоспитализирани пациенти - в 99% от случаите (201/203) от пациенти на УМБАЛ "Александровска" и в два случая - от пациенти на болница "св.И.Рилски". Категоризирането на щамовете като multidrug resistant (MDR), extensively drug resistant (XDR) и pandrug resistant (PDR) бе направено в съответствие с дефинициите на *Magiorakos et al.,* (2012), а именно:
MDR - нечувствителни (R, I) към поне един антибиотик в 3 или повече антимикробни категории; XDR - нечувствителни (R, I) към поне един антибиотик от всички, с изключение на две или по-малко категории; PDR - нечувствителни към всички антибиотици от всички антимикробни категории. Характеристиката на изследваните щамове е представена в Таблица 23.

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

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

Таблица 23. Характеристика на включените в проучването клинични изолати (210)

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

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

2.1. *K. pneumoniae*

Антибиотичната чувствителност на включените в проучването 107 щама *K. pneumoniae* е представена в Таблица 24.

Таблица 24. Антибиотична чувствителност на включените в проучването 107 щама *K. pneumoniae*

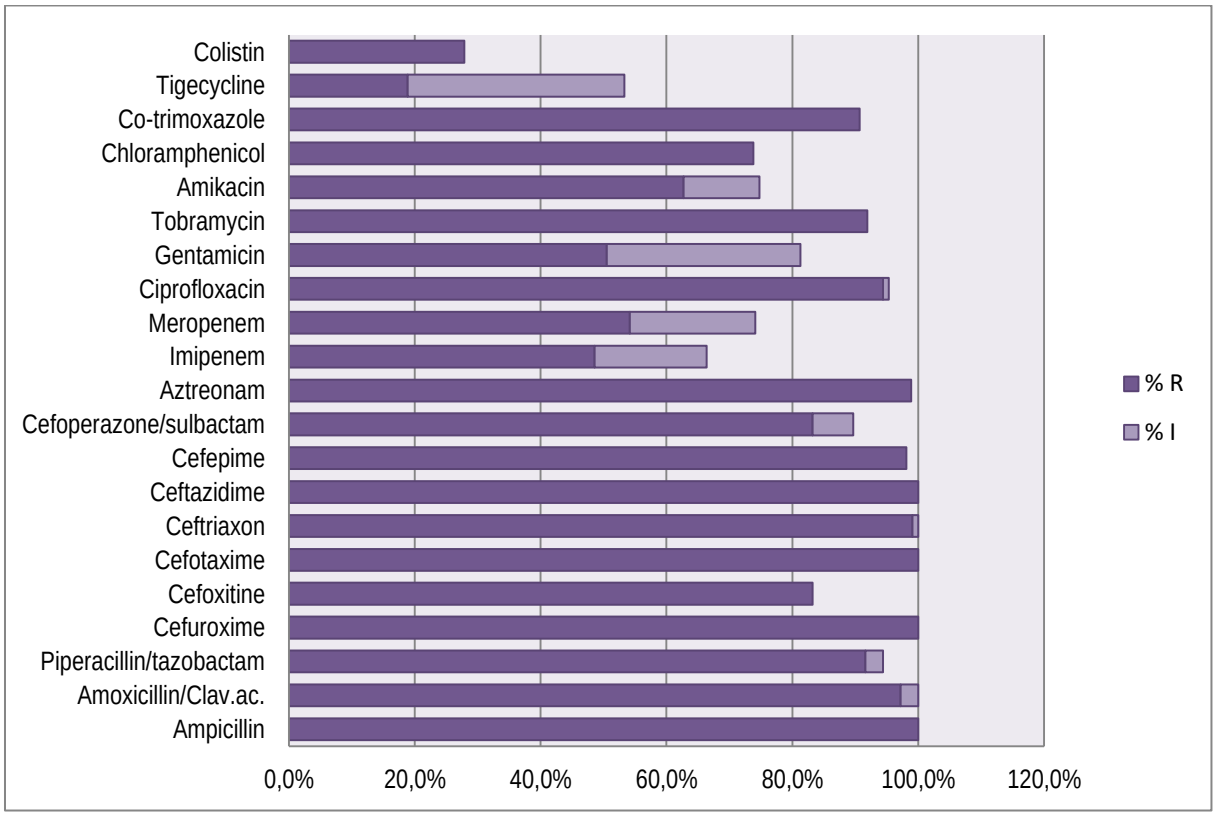
Антибиотик	**брой**	**Диапазон** µg/ml	**МПК$_{50}$** µg/ml	**МПК$_{90}$** µg/ml	S (n, %)	I (n, %)	R (n, %)
Ampicillin[1]	107	-	-	-	0	0	107 (100%)
Amoxicillin/Cl.ac.[1]	107	-	-	-	0	3 (2.8%)	104 (97.2%)
Piperacillin/tazobactam[1]	107	-	-	-	6 (5.6%)	3 (2.8%)	98 (91.6%)
Cefuroxime[1]	107	-	-	-	0	0	107 (100%)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

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

Установеновени бяха много високи нива на резистентност към почти всички антибиотични класове - β-лактамни антибиотици, хинолони, аминогликозиди (Фигура 15). Чувствителност към карбапенеми е налице при по-малко от 35% от изследваните щамове (33.6% към Imipenem и 26.2% към Meropenem). Чувствителност към Tigecycline беше установена при 46.7% от щамовете.

За периода 2013-2016 г бяха изолирани единични карбапенем-нечувствителни изолати (седем) *Enterobacteriacae*, предимно от пациенти с предхождаща хоспитализация в

други болници. Рязко увеличение, предимно на броя на карбапенем нечувствителните *K. pneumoniae*, изолирани в болницата, бе установено в началото на 2017г. За период от 17 месеца техният брой достигна 72. Общо за целият период 79 изолата – 73.8%.



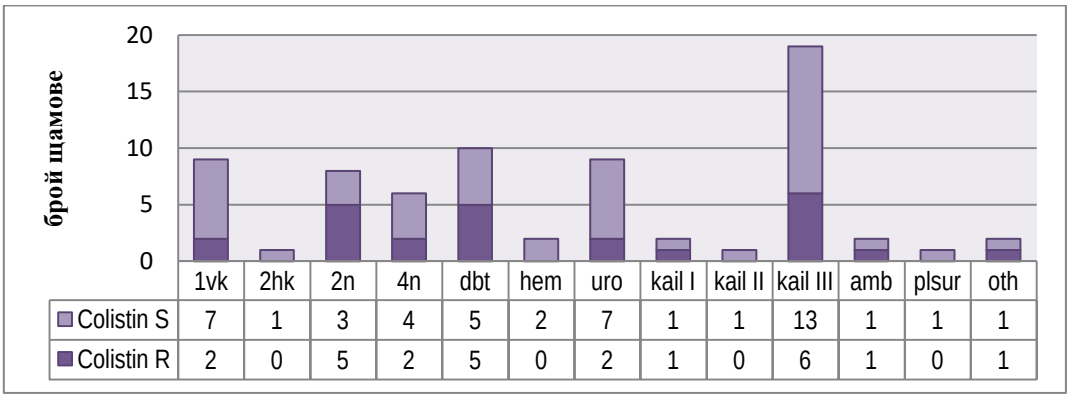
Фигура 15. Антибиотична резистентност (% I+R) на изследваните щамове *K. pneumoniae* (107)

Изолирани са от пациенти на различни клиники, като най-голям е техния брой в едно от отделенията на КАИЛ - КАИЛ III (19), ДБТ (10), Клиники по кардиология и Урология (по 9), Нефрологично-трансплантационна клиника (8), Клиника по нефрология (6). В четири случая, щамовете са изолирани от амбулаторни пациенти (2) или от пациенти на други болници (2) (Фигура 16). Резистентност към colistin при *K. pneumoniae* чрез референтния метод за BMD бе установена при 29 щама (27.9%, 29/104). Нивото на резистеност към colistin е по-високо при карбапенем нечувствителни щамове (32.9%, 25/76) в сравнение с карбапенем-чувствителните (14.3%, 4/28).

2.2. *E. coli*

Антибиотичната чувствителност на включените в проучването 41 щама *E. coli* е представена в Таблица 25.

Всички изследвани щамове *E. coli* са продуценти на широкоспектърни β-лактамази (ESBL).

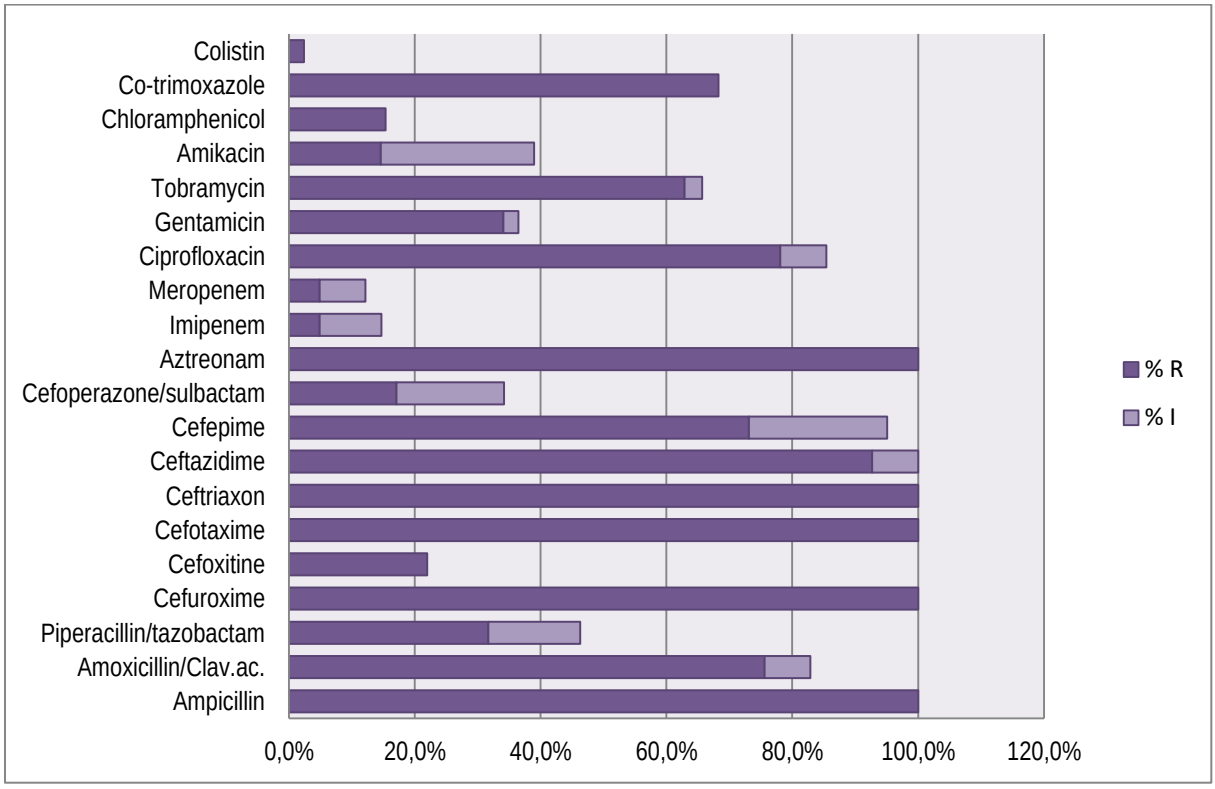


	1vk	2hk	2n	4n	dbt	hem	uro	kail I	kail II	kail III	amb	plsur	oth
Colistin S	7	1	3	4	5	2	7	1	1	13	1	1	1
Colistin R	2	0	5	2	5	0	2	1	0	6	1	0	1

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

Фигура 16:Разпределение по клиники на карбапенем нечувствителни щамове *K. pneumoniae* (72), изолирани в периода 01/2017 - 05/2018

В допълнение, резистентност/намалена чувствителност към карбапенеми беше установена при шест щама, изолирани през 2018г. Относително по-ниски са нивата на резистентност (% I+R) към Piperacillin/Tazobactam (46.3%), Cefoperazone/sulbactam (34.2%), Gentamicin (36.5%), Amikacin (39%), Chloramphenicol (15.4%). Само 14,6% изследваните щамове са чувствителни на Ciprofloxacin. Резистеност към colistin беше установена при един щам *E. coli*, изолиран през 2018г. Сумарно, антибиотичната резистентост (%I+R) на изследваните щамове *E. coli* е представена на Фигура 17.



Фигура 17. Анттибиотична резистентност (%I+R) на изследваните щамове *E. coli* (41)

Таблица 25. Антибиотична чувствителност на 41 щама *E. coli*, включени в проучването

Антибиотик	**брой**	**Диапазон** µg/ml	**МПК$_{50}$** µg/ml	**МПК$_{90}$** µg/ml	S (n, %)	I (n, %)	R (n, %)
Ampicillin[1]	41	-	-	-	0	0	41(100%)
Amoxicillin/Cl.ac.[1]	41	-	-	-	7 (17,1%)	3 (7,3%)	31 (75,6%)
Piperacillin/tazobactam[1]	41	-	-	-	22 (53,75)	6 (14,6%)	13 (31,7%)
Cefuroxime [1]	41	-	-	-	0	0	41 (100%)
Cefoxitine[1]	41	-	-	-	32 (78%)	0	9 (22%)
Cefotaxime[1]	41	-	-	-	0	0	41 (100%)
Ceftriaxone[2]	41	16 - >256	256	>256	0	0	41 (100%)
Ceftazidime[2]	41	2 - >256	64	256	0	3 (7,3%)	38 (92,7%)
Cefepime[2]	41	0,5 - >256	16	128	2 (4.9%)	9 (22%)	30 (73,1%)
Cefoperazone/sulbactam[4]	41	-	-	-	27 (65,9%)	7 (17,1%)	7 (17,1%)
Aztreonam[2]	36	8 -256	32	128	0	0	36 (100%)
Imipenem[2]	41	0.06 - 16	0,25	4	35 (85,4%)	4 (9,8%)	2 (4,9%)
Meropenem[2]	41	≤0.03 - 16	0,06	4	36 (87,8%)	3 (7,3%)	2 (4,9%)
Ciprofloxacin[2]	41	≤0.03 - >32	>32	>32	6 (14,6%)	3 (7,3%)	32 (78,1%)
Gentamicin[2]	41	1 - >128	2	>128	26 (63,5%)	1 (2,4%)	14 (34,1%)
Tobramycin[2]	35	1 - >128	16	>128	12 (34,3%)	1 (2,8%)	22 (62,9%)
Amikacin[2]	41	4 - 64	8	32	25 (61%)	10 (24,4%)	6 (14,6%)
Chloramphenicol[1]	39	-	-	-	33 (84,6%)	0	6 (15,4%)
Co-trimoxazole[1]	41	-	-	-	13 (31,7%)	0	28 (68,3%)
Colistin[3]	41	≤0.125 - 16	≤0,125	1	40 (97,6%)	0	1 (2,4%)

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

2.3. *E. cloacae* complex

Преобладаващата част от изследваните щамове *E. cloacae* complex - 9 (69.23%) са XDR. Установени бяха много високи нива на резистентност към почти всички изследвани антибиотици - 100% (I+R) към пеницилини, цефалоспорини, piperacillin/tazobactam, Ciprofloxacin. Малка част от изследваните щамове запазват чувствителността си към gentamicin (7.7%), amikacin (46.15%), chloramphenicol (23.1%), co-trimoxazole (15.4%), cefoperazone/sulbactam (21.3%). При един щам беше установена резистентност към карбапенеми чрез ДДМ, а впоследствие, чрез фенотипни методи беше доказано вероятно наличие на карбапенемаза. МПК imipenem / meropenem бяха в границите на чувствителните - 2 µg/ml. Не беше установена резистентност colistin. (Таблица 26, Фигура 18).

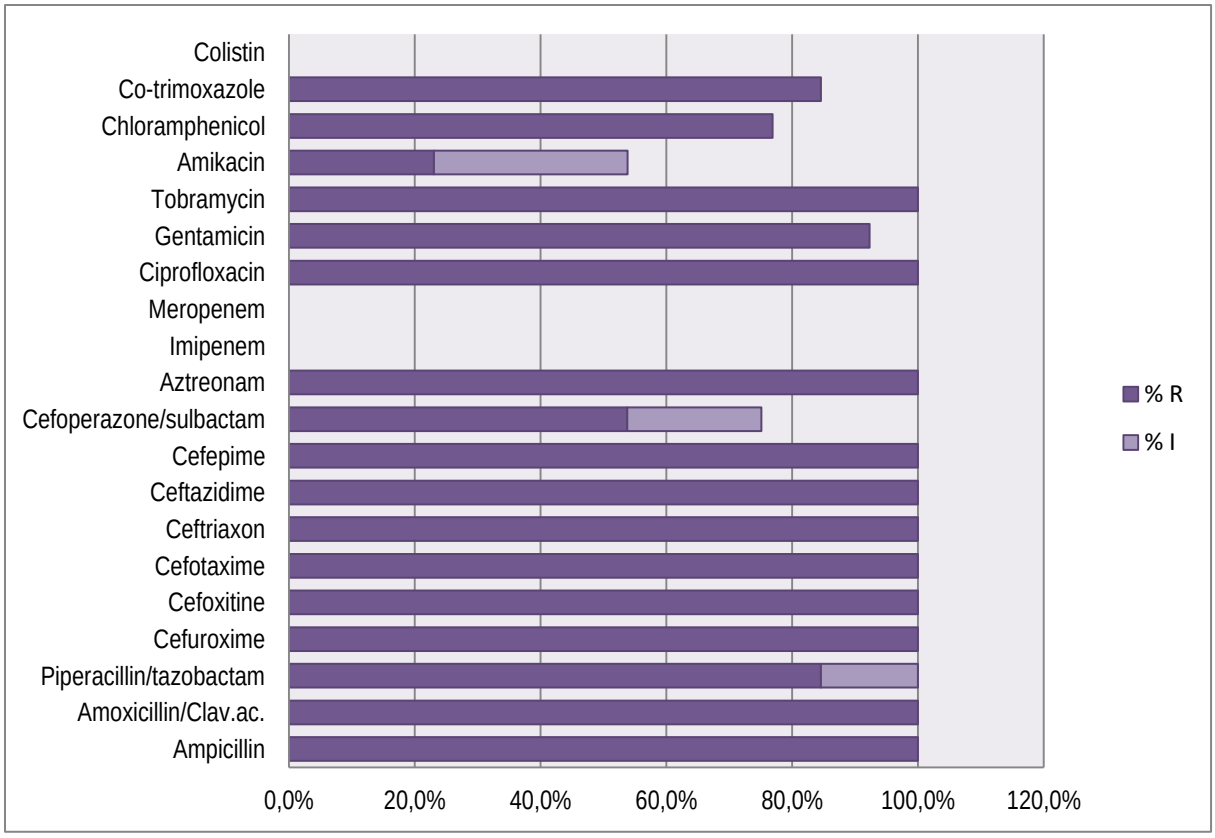
Таблица 26. Антибиотична чувствителност на включените в проучването 13 щама *E. cloacae* complex

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

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

2.4. *A. baumanni* complex

Всички изследвани щамове *A. baumanni* complex са XDR, резистентни на карбапенеми, хинолони. Малка част от тях притежават чувствителност към cefoperazone/sulbactam (7.2%) и някои аминогликозиди – 14.3% (tobramycin) и 3.6% - към amikacin. Не беше установена резистентност към colistin (Таблица 27).

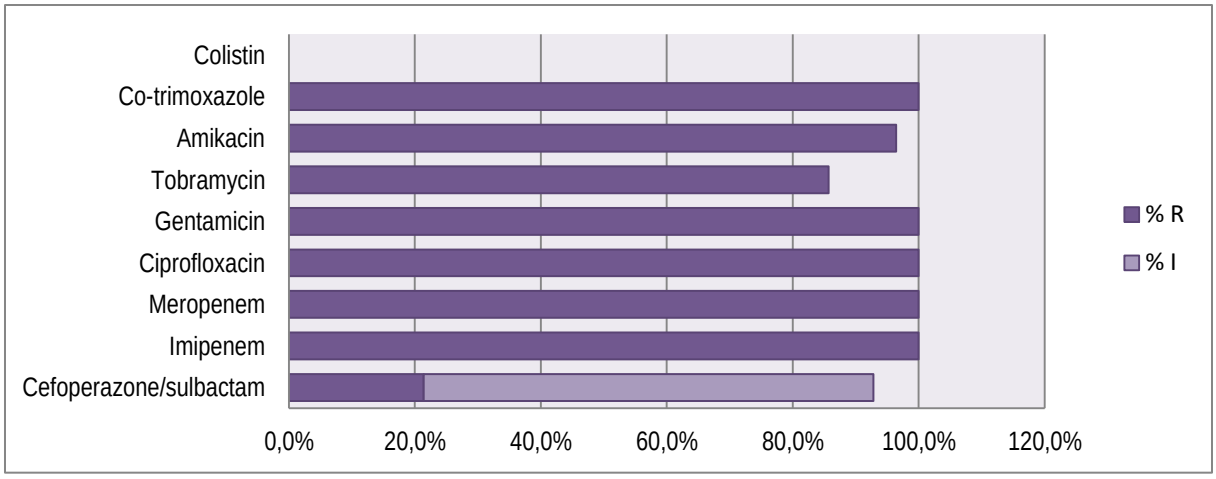


Фигура 18. Анттибиотична резистентност (%I+R) на изследваните щамове *E. cloacae* complex (13)

Таблица 27. Антибиотична чувствителност на включените в проучването 28 щама *A. baumanni* complex

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

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



Фигура 19. Антибиотична резистентност (%I+R) на изследваните щамове *A. baumannii complex* (28)

2.5. *P. aeruginosa*

В проучването бяха включени 21 щама *P. aeruginosa*. Резултатите, получени при изследване на чувствителността им са представени в Таблица 28.

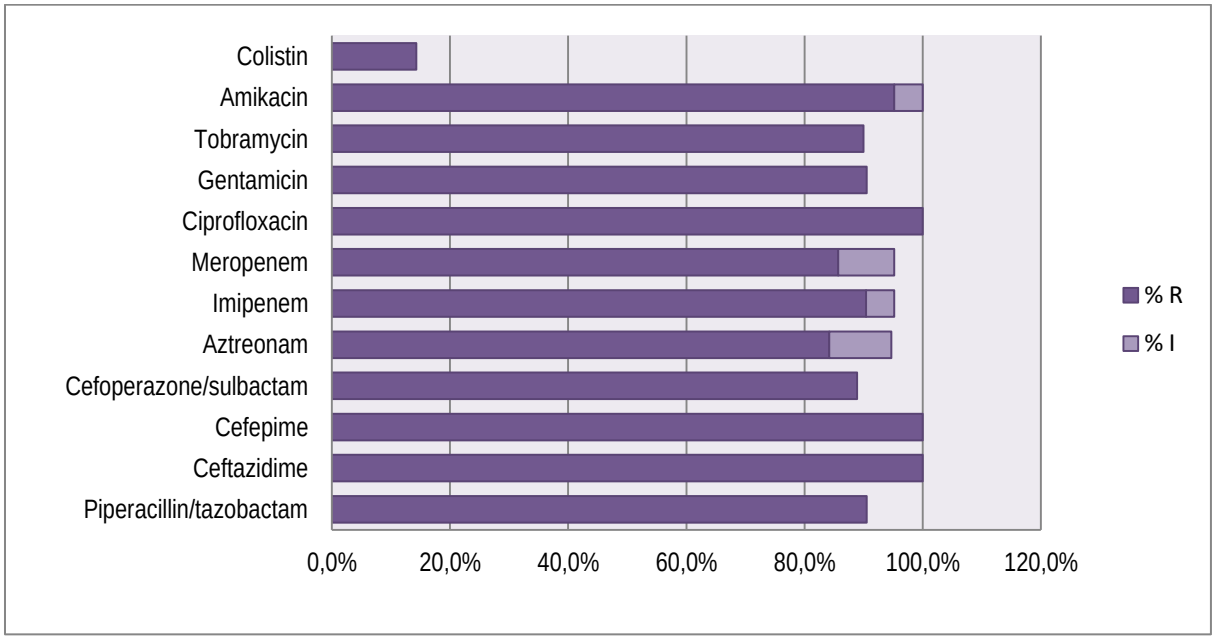
Таблица 28. Антибиотична чувствителност на 21 щама *P. aeruginosa*, включени в проучването

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

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

Установени бяха много високи нива на резистентност към почти всички изследвани антибиотици. Всички, включени в проучването щамове са резистентни/нечувствителни към ciprofloxacin, ceftazidime, cefepime, amikacin. Нечувствителност към карбапенеми (%I+R) бе установена при 95.2%, а към piperacillin/tazobactam при 90.5% от изолатите.

Чувствителността към gentamicin и tobramycin бе ниска - съответно 9.5% и 10%. При 3 щама (14.3%) бе установена резистентност към colistin. Сумарно, данните за антибиотичната резистентност на изследваните щамове *P. aeruginosa* е представена на Фигура 20.



Фигура 20. Антибиотична резистентност (%I+R) на включените в проучването щамове *P. aeruginosa* (21)

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

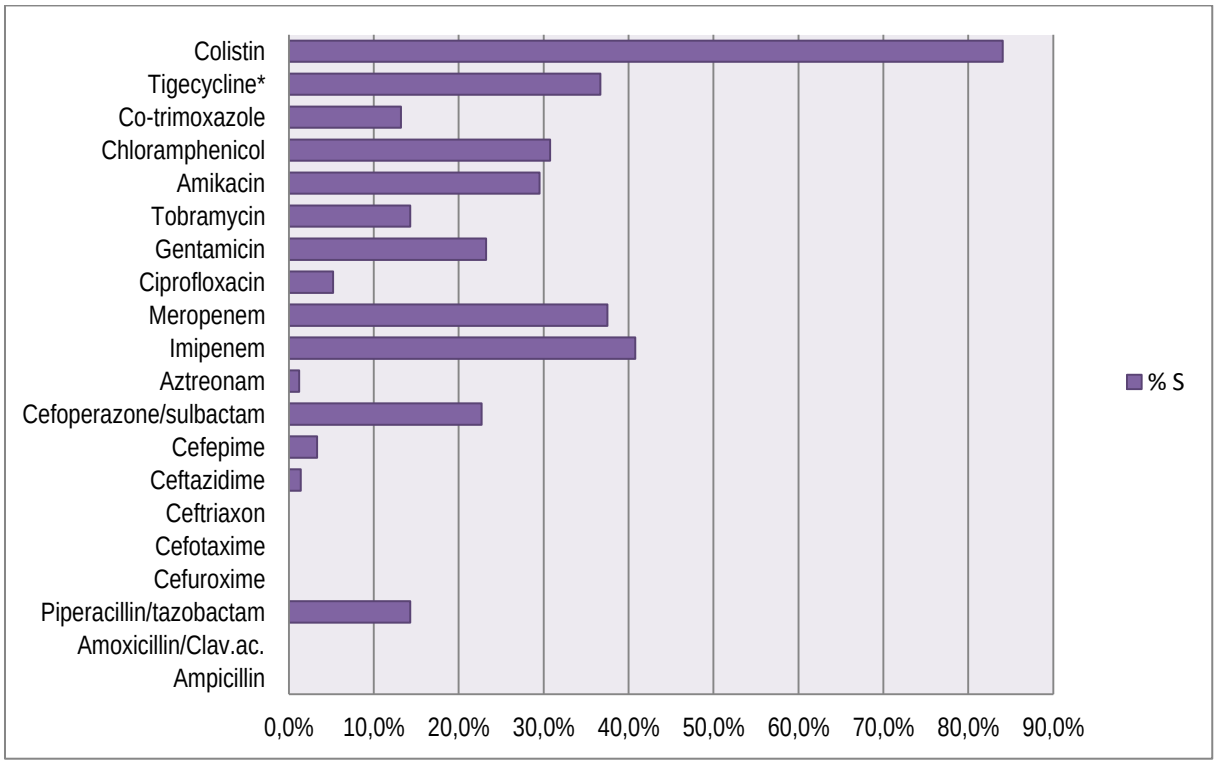
Резултатите от антимикробната чувствителност (%S) на всички, включени в проучването щамове са представени на Фигура 21.

2.7. Обсъждане

Включените в колекцията Грам-отрицателни бактерии показаха изключително високи нива на резистентност към повечето изследвани антибиотици. Една от малкото терапевтични възможности за лечение на инфекции, причинени от такива изолати, понастоящем, е colistin, поради което считаме, че е важно да се проучи чувствителността към този антибиотик именно при мултирезистентни щамове.

В България, резистентността към антибиотици при *K. pneumoniae* от години е висока. По данни на годишния доклад на EARS-Net за 2016г., докладваните от България инвазивни изолати *K. pneumoniae* са резистентни към трето-генерационни цефалоспорини, хинолони и аминогликозиди в съответно 72.5%, 55.6% и 64.4%, а при

45.9% от щамовете е налице комбинирана резистентност и към трите антибиотични класа [*Surveillance report of AMR in Europe 2016*].



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

Фигура 21. Обобщение на чувствителността (%S) на включените в проучването щамове (210) към антимикробни средства

От 2014г се наблюдава увеличение на резистентността на *K. pneumoniae* и към карбапенеми, като през 2016г. тя е била 4.4% [*Surveillance report of AMR in Europe 2016*]. Рязко и бързо увеличение на броя на изолираните карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* в болницата беше установено от началото на 2017г. Част от тези щамове бяха изолирани от амбулаторни пациенти и пациенти, хоспитализирани в друга болница, което показва, че проблемът вероятно е много по-широко разпространен, не само в болниците, но и в обществото.

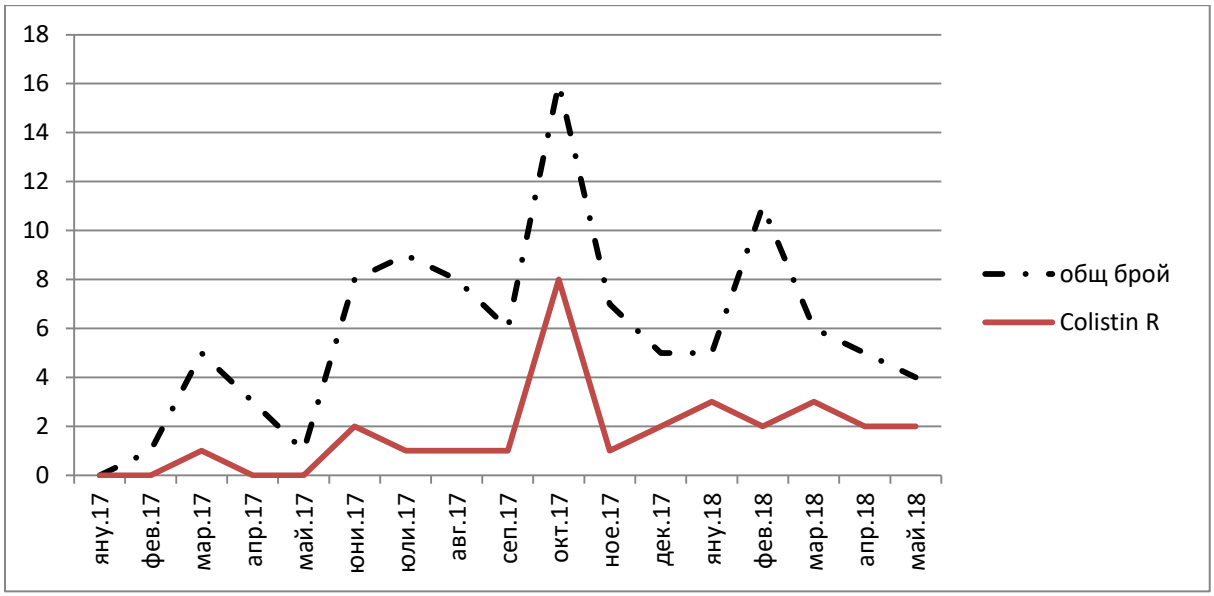
Антибиотичната резистентност в България при *E. coli* е висока, но в много по-малка степен от тази при *K. pneumoniae*. По данни на годишния доклад на EARS-Net за България за 2016г., 42.4% от докладваните инвазивни изолати *E. coli* са резистентни на хинолони, 41.6% - на трето-генерационни цефалоспорини, 34.8% на аминогликозиди, като при 22.1% от щамовете е налице комбинирана резистентност и към трите антибиотични класа. Резистентни на карбапенеми са 0.9% от изолатите [*Surveillance*

report of AMR in Europe, 2016]. Тревога буди факта, че от началото на 2018г. (само за 4 месеца) в болницата са изолирани 6 щама *E. coli* с намалена чувствителност/резистентност към карбапенеми, което показва, че много вероятно предстои увеличаване на резистентността и към тях. Резистентността на *A. baumannii* complex към антибиотици от години е повод за сериозни притеснения. През 2016г., 74.8% от докладваните от България инвазивни *Acinetobacter spp* са резистентни към карбапенеми, 81% към аминогликозиди, 67.9% - към хинолони, като комбинирана резистентност към трите антибиотични класа е установена при 72.4% [*Surveillance report of AMR in Europe, 2016*]. *P. aeruginosa* е патоген с вродена резистентност към много антибиотици, спрямо който има малко терапевтични възможности. По данни от доклада на EARS-Net за 2016г., 40% от докладваните от България инвазивни изолати *P. aeruginosa* са резистентни към piperacillin/tazobactam, 38.7% към хинолони, 38.9% към ceftazidime, 30.4% - към карбапенеми, 50.6% - към аминогликозиди, като при 35.7% от щамовете е налице комбинирана резистентност [*Surveillance report of AMR in Europe, 2016*]. Всичко това, както и резултатите от настоящото проучване, показват наличие на тревожно високо ниво на антибиотична резистентност при ключови Грам-отрицателни патогени в България. Най-сериозен е проблемът при *K. pneumoniae*.

Непрекъснато нарастващата антибиотична резистентност, особено към карбапенеми, доведе до подновяване на употребата на полимиксини в клиничната практика [*Falagas et al., 2005*]. Както се очакваше, резистентността към този резервен клас антибиотици също нарастна [*Poirel et al., 2017*]. По данни от годишния доклад на EARS-Net за 2016г., резистентни на colistin са 8.5% от изследваните щамове *K. pneumoniae, 4%* от *A. baumanni* и по-малко от 1% от *P. aeruginosa.* По-голяма част от тях са изолирани в Гърция и Италия [*Surveillance report of AMR in Europe, 2016*]. Въпреки, че поради относително малкия брой изследвани щамове (*K. pneumoniae* 27.6%, *A. baumanni* 51.3% и *P. aeruginosa* 51.3%), относително високия % изолати от региони с високо ниво на резистентност и значителните технически трудности при определяне на чувствителността към colistin, се препоръчва тези данни да бъдат интерпретирани внимателно, тъй като може да не са представителни за Европа като цяло, налице е ясна тенденция за увеличване на резистентността към colistin [*Surveillance report of AMR in Europe 2016*]. Това се потвърждава и от публикуваните множество съобщения за епидемични взривове от карбапенем-резистентни и colistin-резистентни щамове в Европа [*Mezzatesta et al., 2011, Monaco et al., 2014, Pena et al., 2014, Giani et al., 2015, Bathoorn et al., 2016*] и Северна Америка [*Marchaim et al., 2010*]. Рисков фактор за

развитието на резистентност е употребата на colistin [*Poirel et al., 2017*], особено, ако е под формата на монотерапия и при субоптимално дозиране [*Durante-Mangoni, 2015*], което за съжаление, е обичайна практика в България.

Посредством референтния метод за BMD, установихме 33 изолата (15.94%) с резистентност към colistin - основно *K. pneumoniae* (29/104), но също и *P. aeruginosa* (3/21) и *E. coli* (1/41). Първият colistin резистентен изолат от настоящето проучване беше изолиран през месец март 2017г. По-голямата част от colistin-резистентните *K. pneumoniae* (79.31%) бяха изолирани в периода 10/2017 - 05/2018г, което съвпада и с увеличената употреба на colistin (Фигура 22).



Фигура 22. *K. pneumoniae* - графично представяне на броя на colistin-R щамове, спрямо общия брой, изолирани в периода 01/2017 - 05/2018г

Високо ниво на резистентност към colistin (63%, 24/38) при KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae* е установено и при проучване на щамове, изолирани във Варна и Плевен в периода 2012 - 2015г [*Markovska et al., 2015*]. Резистентност към colistin при KPC-2 положителни *K. pneumoniae* е регистрирана и във Военно Медицинска Академия в София [*Savov et al., 2017*]. Тези данни, както и резултатите от нашето проучване, показват, че резистентността към colistin при карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* в България се повишава и ако не бъдат взети мерки, тази тендеция ще продължи с бързи темпове. В настоящото проучване не бяха установени резистентни на colistin щамове *A. baumannii* complex. Това е в съответствие с резултатите, получени при изследване на 226 карбапенем-нечувствителни щама *A. baumannii*, изолирани в 4 големи

университетски болници в страната през периода 2014-2016г. [*Стратева и* съавт., 2017]. Резистентност към colistin при *A. baumannii* в България, обаче, е докладвана от *Dobrewski* и съавт. (2006) при 3 (16.7%) от изследваните от този колектив изолати [*Dobrewski et al., 2006*]. В настоящото проучване не бяха установени и резистентни на colistin представители на *E. cloacae* complex, вероятно поради малкия брой изолати или принадлежността им към генен клъстер с по-висока чувствителност към colistin [*Guérin et al., 2016*].

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

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

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

3.1. Референтен BMD метод

Определянето на МПК на colistin чрез референтния метод за BMD беше направено при всички, включени в проучването изолати (210). Феноменът на "пропуснати ямки" (sw) беше наблюдаван често, (при около 20% от щамовете), особено при *K. pneumoniae*, което наложи многократно повторение на част от тестовете. При един щам (92K), при неколкократно изследване бяха наблюдавани едновременно по няколко "пропуснати ямки". Съгласно инструкциите за отчитане на тестовете за BMD [стандарт ISO 20776-1] такива резултати не могат да бъдат интерпретирани, поради което този щам беше изключен от последващите анализи. Два други щама *K. pneumoniae* (11K и 24K), също бяха изключени от анализите, тъй като при неколкократното им изследване бяха получени противоречиви резултати, с вариации на МПК и за двата щама от 1 до 8 mg/l (като във всички случаи, МПК, получени за контролните щамове на съответните плаки бяха в допустимия диапазон). Разпределението на МПК за останалите 207 щама е

представено в таблица 29. $МПК_{50}$ и $МПК_{90}$ на изследваните щамове са съответно 0.5 mg/l и 32 mg/l.

Таблица 29: Разпределение на МПК на Colistin при 207 Грам-отрицателни бактерии, получени чрез референтния метод за BMD

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

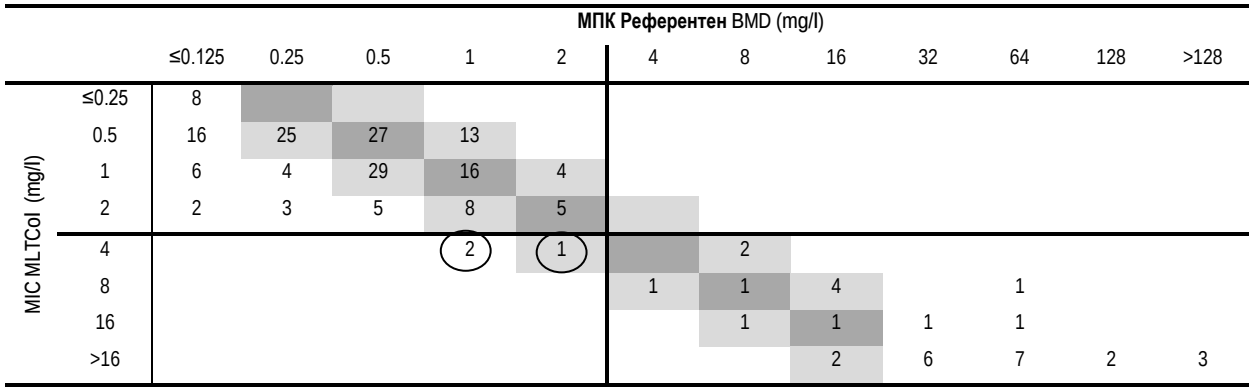
На базата на резултатите, получени от референтния метод за BMD, 15.94% (33/207) от изследваните щамове са резистентни на colistin. Най-високи нива на резистентност се наблюдават при *K. pneumoniae* (27.9%, 29/104), следвани от *P. aeruginosa* (14.3%, 3/21) и *E. coli* (2.4%, 1/41). 86.2% (25/29) от colistin-резистентните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

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

В анализите бяха включени резултатите, получени за 207 щама, изследвани чрез двата теста за BMD. ЕА между резултатите от референтния BMD метод и търговския кит на ErbaLachema беше изчислено на базата на 154 резултата с референтни МПК на colistin в диапазона 0.25 - 16 mg/l (поради различия в обхвата на изследваните концентрации при двата теста). ЕА беше установено в 90.91% от случаите (140/154). СА бе наблюдавано в 98.55% (204/207), MD (големи несъответствия) - 3 (1.7%, 3/174), като не бяха установени VMD (много големи несъответствия). Корелационният коефициент на Spearman за резултатите от двата теста $\rho=0,553$, $p<0.01$ (Фигура 23).

3.3. Метод на разреждане в агар

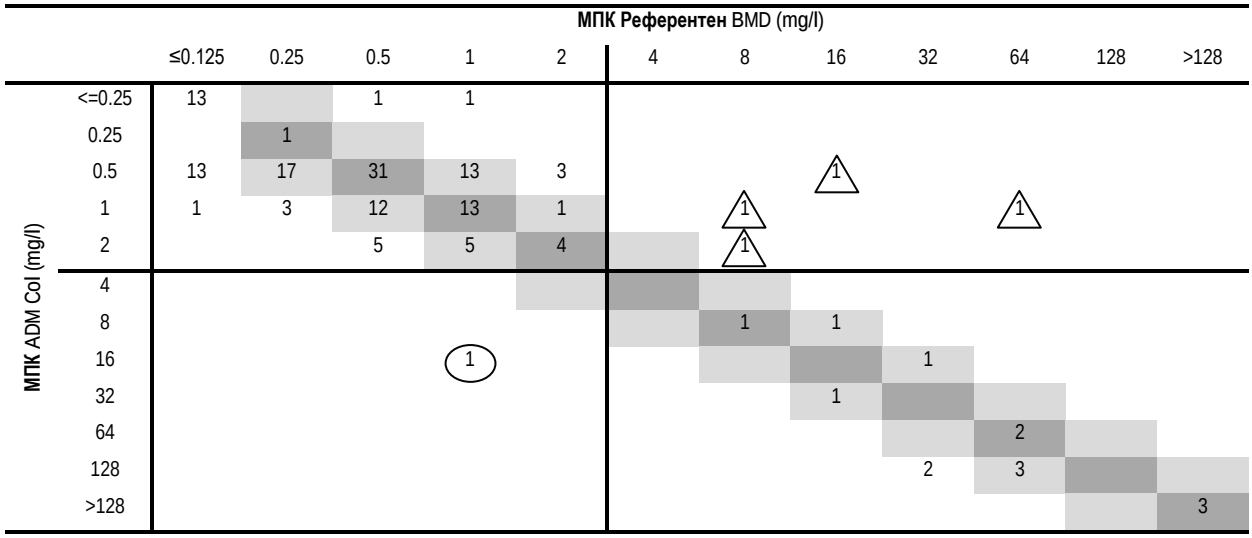
МПК на 156 щама бяха определени и чрез метода на разреждане в агар. ЕА между МПК, определени чрез референтния BMD метод и метода на разреждане в агар беше изчислен на базата на 129 резултата с референтни МПК на colistin в диапазона 0.25 - >128 mg/l (поради различия в обхвата на изследваните концентрации при двата теста).



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

Фигура 23: Корелация между МПК, определена чрез MLTCol и референтният BMD

ЕА беше установено в 84.50% от случаите (109/129). СА бе наблюдавано в 96.79% (151/156), MD (големи несъответствия) - 1 (0.72%, 1/138), а VMD (много големи несъответствия) - 4 (22.22%, 4/18). Корелационният коефициент на Spearman за резултатите от двата теста ρ=0,590, p<0.01 (Фигура 24)

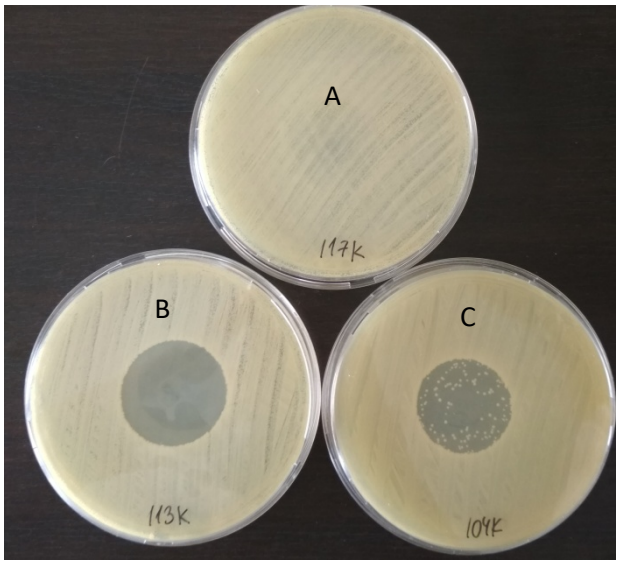


Броят на щамовете с МПК, съответстващи точно на референтните е маркиран в тъмно сиво, докато броя на щамовете с МПК с ЕА от +/- 1 двукратно серийно разреждане - в светло сиво. Големите несъответствия са обозначени с кръг, а много големите несъответствия с триъгълник. Дебелите линии маркират граничните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

Фигура 24: Корелация между МПК, определена чрез ADM Col и референтния BMD

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

С теста за пре-дифузия на Rosco Diagnostica A/S бяха изследвани общо 210 щама. В хода на изследванията бяха наблюдавани 3 типа резултати - липса на зона на инхибиране (A), голяма, добре очертана зона на инхибиране (B) и голяма зона на инхибиране с различен брой колонии в нея (C) (Фигура 25). В инструкцията за употреба, производителят не упоменава точно как би трябвало да се интерпретират резултатите от тип C. Колонии от вътрешността на зоните на инхибиране бяха субкултивирани и МПК на тези субпопулации бяха определени чрез референтния метод за BMD - във всички случаи те бяха в диапазона от 8 до 128 mg/l. За по-добро разграничаване, щамовете, при които беше наблюдаван резултат от тип C ще бъдат обозначавани в анализите и дискусията като хетерорезистезистентни. И при трите щама (11К, 24К и 92К), изключени от анализите, поради наличие на няколко пропуснати ямки или противоречиви резултати при многократни изследвания с референтния метод за BMD беше наблюдаван този феномен, поради което считаме, че те са хетерорезистентни. По отношение на останалите 207 щама, CA беше наблюдавано 95.17% от изследваните щамове (197/207). Резултат от хетерорезистентен тип C бе наблюдаван при 19 щама *K. pneumoniae*. 52.63% от тях (10/19) се определят като резистентни чрез референтния BMD метод, докато другите 9 - като чувствителни (голямо несъответствие). Един щам *P. aeruginosa* с МПК 8 mg/l бе определен от теста с пре-дифузия като чувствителен (зона на инхибиране 21mm), което беше категоризирано като VMD (много голямо несъответствие) $\rho = -0.427$, $p < 0.01$. Таблица 30.



Фигура 25: Представя различните типове растеж, наблюдавани при извършване на теста с пре-дифузия на Rosco Diagnostica:
A - липсва зона на инхибиране, обикновено при щамове с високо ниво на резистентност,
B - голяма, добре очертана зона на инхибиране (най-често с диаметър 25 - 32 mm) при colistin чувствителни щамове,
C - голяма зона на инхибиране с различен брой колонии в нея. Подобни щамове ще бъдат обозначавани като хетерорезистентни (hR)

Таблица 30. Сравнение на резултатите, получени от референтния метод за BMD и теста с пре-дифузия на Rosco-diagnostica A/S при 207 щама Грам (-) бактерии

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

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

3.5. Обсъждане

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

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

Резултатите, получени от MIKROLATEST MIC Colistin (*Erba Lachema*) показаха добра корелация с референтния BMD метод и съответстват на критериите на ISO 20776-2 за акуратност на тестовете за изследване на чувствителност (EA и CA ≥ 90%, като MD и VMD ≤ 3%)(ISO 20776-2). Тези резултати са сходни с получените в други проучвания по отношение на други търговски китове за определяне на чувствителността към colistin чрез BMD (Таблица 31), поради което считаме, че теста може да се използва надеждно в рутинната диагностична работа.

Таблица 31. Сравнение на резултатите, получени при оценка на търговски тестове за определяне на чувствителността към colistin чрез BMD

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

* VME и ME докладвани като брой, а не като %;
Производители: [1]ThermoFisher Diagnostics; [2]Merlin Diagnostica; [3]Liofilchem; [4]Beckman Coulter; [5]Biocentric; [6]Erba Lachema

Методът на разреждане в агар показа по-слаба корелация с референтния метод по отношение на определяне на чувствителността към colistin в сравнение с търговския кит на Erba Lachema. EA бе установено при 84.5% от изследваните щамове, CA в 96.79%, с 4 много големи несъответствия и 1 голямо несъответствие. Независимо, че други проучвания установяват по-добра корелация между методите на разреждане в агар и микроразреждане в бульон [*Lo-Ten-Foe et al., 2007; Behera et al., 2009*], установените от нас резултати, както и голямата трудоемкост на метода ни карат да считаме, че не е подходящ за определяне на чувствителността към colistin в ежедневната диагностична практика.

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

установено СА от 95.17% между теста с пре-дифузия на ROSCO Diagnostica A/S и референтния BMD. Несъответствия между двата метода бяха установени при един щам *P. aeruginosa* с МПК=8 mg/l, определен погрешно като чувствителен и при девет хетерорезистентни щама *K. pneumoniae*. По-високите МПК на колониите от зоните на инхибиране потвърждават хетерорезистентността на щамовете. Резултатите, получени от нас показват, че теста с пре-дифузия открива по-добре някои от хетерорезистентните на colistin щамове определени чрез BMD като чувствителни. Неудобство на тест-протокола е необходимостта от продължителна пре-дифузия (около 20 часа), което води до забавяне на крайния резултат [*Boyen et al., 2010*].

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



Фигура 26. Rapid Polymyxin NP

RPNP тестът (Фигура 26) беше оценен при изследване на 158 щама от сем. *Enterobacteriaceae* - *K. pneumoniae* (n=104), *E. coli* (n=41) *E. cloacae complex* (n=13). Тридесет (30) от тях бяха резистентни на colistin, на базата на резултатите, получени от референтния метод за BMD.

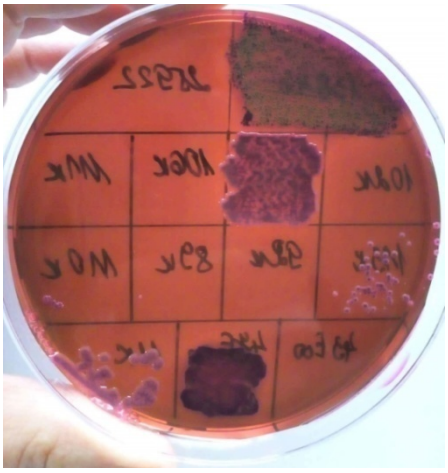
RPNP теста беше положителен при 28 от тях (27 щама *K. pneumoniae* и един *E. coli*). В повечето случаи - 85.71% (24/28) положителния резултат беше наблюдаван след 2 часа инкубиране. При четири щама *K. pneumoniae* (два от тях с МПК от 8 mg/l, а другите два - с 16 mg/l), положителен резултат бе наблюдаван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

RPNP тест е нов тест за бърза детекция на резистентност към colistin/polymyxin B, който може да се извършва директно от хемокултури [*Jayol et al., 2016*]. Това е изключително важно в ежедневната диагностична работа, при която от лабораториите се очаква да дават не само бързи, но и надеждни резултати. Според авторския колектив, разработил метода, в сравнение BMD, чувствителността и специфичността на Rapid

Polymyxin NP теста са съответно 99.3% и 95.4% [*Nordaman et al., 2016b*]. В настоящото проучване, не бяха установени фалшиво положителни резултати (специфичност 100%) и при щамове с високи МПК, тестът беше положителен в рамките на 2 часа. Такава висока специфичност е установена също и в други проучвания [*Simar et al., 2017, Poirel et al., 2018*]. Чувствителността, обаче, показва много значими вариации - от 99.3% - 100% [*Nordmann et al., 2016, Poirel et al., 2018*] до 25% [*Simar et al., 2017*]. Фалшиво негативен резултат в настоящето проучване беше наблюдаван при част от хетерорезистентните изолати, предимно с ниски МПК на colistin. Други автори също подчертават възможни проблеми при откриване на такъв тип щамове чрез RPNP [*Nordamann et al.,2016b; Jayol et al.,2016*]. Въпреки това, тестът може да бъде много полезен в рутинната диагностична работа - положителния резултат е доказателство за резистентност към полимиксини, но негативен резултат е препоръчително да бъде потвърден с BMD (самостоятелно или в комбинация с други методи).

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

При оценка на ефективността на Superpolymyxin Medium като SA Col (Фигура 27) бяха анализирани резултатите, получени при изследване на 207 щама - 174 от тях, colistin - чувствителни и 33 - colistin - резистентни, на базата на референтия метод за определяне на чувствителността към colistin.



Фигура 27:

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

Съвпадение в резултатите беше установено в 92.75% (192/207). Тестът беше положителен при всички colistin-резистентни щамове (или под формата на конфлуентен растеж или като изолирани колонии). При 15 от colistin-чувствителните по рефентния BMD метод щамове *K. pneumoniae* тестът бе положителен, под формата на растеж на различен брой колонии върху скрийн агара (Таблица 32). Колониите бяха

субкултивирани на агар на McConkey. МПК на colistin на тези субпопулации бяха определени чрез референтния метод за BMD, при което се установи, че варират от 4 до 128 mg/l, поради което считаме, че тези щамове са хетерирезистентни на colistin (Таблица 32). При трите щама *K. pneumoniae* (11К, 24К и 92К), изключени от анализите за оценка на методите за определяне на чувствителността към colistin, бе установен растеж под формата на единични колонии върху SPM, което потвърждава установената при тях (с теста на Rosco diagnostica) хетерорезистентност (Таблица 32).

Таблица 32. Щамове с противоречиви резултати, получени от различните методи за установяване на резистентност към colistin

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

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

3.8. Обсъждане

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

В настоящото проучване, посредством тази среда бяха открити 15 хетерорезистентни щама *K. pneumoniae*, определени като чувствителни чрез BMD и RPNP, а шест от тях - и от теста с пре-дифузия на Rosco Diagnostica A/S. Ако към броя на щамовете, резистентни на colistin, определени чрез референтния BMD метод се добавят и установените чрез SA Col хетерорезистентни щамове (15) и трите хетерорезистентните изолата, изключени от сравнителните анализи, резистентността при *K. pneumoniae* ще се повиши от 27.9% (29/104) на 43.9% (47/107).

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

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

този антибиотик, които да могат да бъдат използвани в ежедневната диагностична работа. Резултатите, получени от MIKROLATEST MIC Colistin (*Erba Lachema*) показаха добра корелация (CA 98.55%) с референтния BMD метод, поради което считаме, че теста може да се използва надеждно в рутинната диагностична работа. Методът на разреждане в агар показа по-слаба корелация с референтния метод и не е подходящ за определяне на чувствителността към colistin в ежедневната диагностична практика. Тестът с пре-дифузия на ROSCO Diagnostica A/S показа CA 95.17% с референтния метод, сходно с посоченото от производителя (96,8%), но установихме, че открива по-добре някои от хетерорезистентните на colistin щамове, определени чрез BMD като чувствителни. Неудобство на тест-протокола е необходимостта от продължителна пре-дифузия (около 20 часа), което води до забавяне на крайния резултат. В настоящото проучване, при сравнение с референтния метод, специфичността на RPNP беше 100%, чувствителността 94%, но тестът беше фалшиво негативен при част от хетерорезистентните изолати с ниски МПК. Въпреки това, считаме, че RPNP може да бъде много полезен в рутинната диагностична работа - положителния резултат (получен в рамките на 2h) е доказателство за резистентност към полимиксини, но отрицателния е препоръчително да бъде потвърден с BMD (самостоятелно или в комбинация с други методи). Посредством Superpolymyxin medium, използвана като Screen agar colistin, бяха открити допълнително 15 хетерорезистентни щама *K. pneumoniae,* определени като чувствителни чрез BMD и RPNP, а шест от тях - и от теста с пре-дифузия на Rosco Diagnostica A/S. Това са и първите докладвани в България хетерорезистентни щамове *K. pneumoniae*. Установихме, че някои colistin хетерорезистентни щамове могат да не бъдат открити чрез използване само на препоръчвания понастоящем BMD метод.

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

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

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

Мутант-превантивните концентрации (MPC) на colistin в настоящото проучване бяха определени при 40 щама - *K. pneumoniae* (18), *E. coli* (6), *E. cloacae* complex (6), *A. baumanni* complex (5) и *P. aeruginosa* (5) (Таблица 33). Установените MPC при всички изследвани видове значително надвишават МПК, като особено високи са те по отношение на *K. pneumoniae* - MPC_{50} е 128 mg/l, а MPC_{90} е > 128 mg/l. Подобни високи MPC на colistin спрямо *K. pneumoniae* са установени и в други проучвания [*Poudyal et al., 2008, Choi et al., 2014*]. MPC на colistin за *A. baumanni* complex и *P. aeruginosa* в настоящото проучване са по-ниски, в сравнение с установените от други автори [*Cai et al., 2010, Choi et al., 2014*], вероятно, поради малкия брой изследвани щамове.

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

Установените високи MPC и съотношения MPC/МПК при всички изследвани видове показват голяма ширина на МСП (мутант-селекциониращ прозорец), особено при *K.*

pneumoniae, което крие голям риск от селекциониране на полимиксин-резистентни, едно-стъпални мутанти при монотерапия с colistin [*Cai et al., 2010, Choi et al., 2014*], дори и при използване на препоръчваните понастоящем дозови режими [*Nation et al., 2017*].

Таблица 33. Мутант превантивна концентрация (MPC) на colistin спрямо 40 Грам - отрицателни бактерии

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

МПК - минимална инхибираща концентрация, MPC - мутант превантивна концентрация
Съотношение MPC/МПК - дава информация за размера на мутант-селекциониращия прозорец

Според *Drlica* и *Zhao* (2007), съществуват две стратегии за стесняване на МСП [*Drlica and Zhao, 2007*]. Първата цели минимализиране на времето, през което серумните антибиотични концентрации са в МСП чрез използване на по-високи дози и/или подходящи модификации в дозовите режими [*Drlica and Zhao, 2007*]. Установените в настоящото проучване MPC на colistin надвишават значително постижимите серумни / тъканни концентрации [*Nation et al., 2017*], а също и токсичните [*Falagas & Kasiakou, 2006, Sorli et al., 2013*], поради което тази стратегия е неприложима [*Drlica and Zhao, 2007*]. В подобни случаи, *Drlica* и *Zhao* (2007) препоръчват да се използва друг подход, чрез който се цели стесняване на МСП посредством комбинация от антибиотици [*Drlica and Zhao, 2007*]. Двойната антибиотична комбинация дава възможност за стесняване / затваряне на МСП чрез използване на умерени антибиотични концентрации, дори ако двата антибиотика поотделно имат много високи MPC [*Drlica and Zhao, 2007*]. При 18 щама *K. pneumoniae* беше проучено влиянието на rifampicin и meropenem върху мутант превантивната концентрация на colistin. Бяха използвани фиксирани концентрации на rifampicin и meropenem от съответно 1,7 mg/l и 6,8 mg/l. Концентрациите бяха подбрани така, че да съответстват на средните, свободни, несвързани с плазмените протеини концентрации на тези антибиотици в плазмата при стабилно състояние (steady-state) [*Lagerbäck et al., 2016*].

В присъствие на rifampicin, MPC на colistin се понижиха значително при 94.44% от изследваните щамове, като MPC_{50} (128 mg/l) и MPC_{90} (>128 mg/l) достигнаха,

съответно 4 и 16 mg/l (Таблица 34). При 1 щам (95К) не бе установена промяна в MPC на colistin. Добавянето на meropenem предизвиква минимално понижение на MPC на colistin при част от изследваните щамове (до 32 mg/l), като MPC_{50} и MPC_{90} запазиха стойностите от съответно 128 и >128 mg/l (Таблица 34). При 3 щама (16К, 18К и 29К), чувствителни на meropenem, не бе установен растеж, дори и при концентрациия на colistin от 0.125 mg/l. Инхибирането в тези случаи, обаче, най-вероятно се дължи на самостоятелното действие на meropenem, а не на понижение на MPC на colistin под влияние на комбинацията.

Таблица 34. Влияние на Rifampicin и Meropenem върху MPC на colistin при 18 щама K. *pneumoniae*

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

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

Съществуват малко проучвания, които изследват влиянието на различни антибиотици върху MPC на colistin. *Choi et al.* (2014b) проучват влиянието на ciprofloxacin (0.5 и 2 mg/l), imipenem (1 и 16 mg/l), tetracycline (1 mg/l) и rifampicin (4 mg/l) върху MPC (colistin) при *K. pneumoniae* (5 щама), *A. baumannii* (5 щама) и *P. aeruginosa* (5 щама). Комбинираното приложение на colistin и ciprofloxacin предизвиква понижение на MPC на colistin само при ciprofloxacin-чувствителни изолати, но не и при ciprofloxacin-резистентни, независимо от нивото им на резистентност към този антибиотик [*Choi et*

al., 2014b]. Според *Choi et al.* (2014), комбинацията от colistin и imipenem може да намали риска от появата на резистентност към imipenem и colistin само при imipenem-чувствителни щамове. Подобен ефект беше наблюдаван и в нашето проучване при изследване на ефекта на meropenem върху MPC на colistin. Драстично намаление на MPC на colistin беше установено само при три meropenem-чувствителни щама *K. pneumoniae,* докато в останалите случаи не бе регистрирана промяна или бе наблюдавано само минимално понижение на MPC (Таблица 34). В тези случаи, обаче, считаме, че причина за наблюдаваното понижение на MPC е самостоятелното действие на meropenem. Комбинираното приложение на colistin и tetracycline (1mg/l) не води до понижение на MPC на colistin, поради което *Choi et al.,* (2014b) считат, че тази комбинация не е в състояние на предотврати появата на едно-стъпални colistin-резистентни мутанти [*Choi et al., 2014b*]. Добавянето на rifampicin (4 mg/l) предизвиква понижение на MPC на colistin при всички (с изключение на един) изследвани от *Choi et al.* щамове *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [*Choi et al., 2014b*]. Понижението на MPC е най-изразено при *A.baumanni* (от 128 (>128) mg/l до 16-32 mg/l) и в по-малка степен при *K. pneumoniae* (от > 128 mg/l до 32-64 mg/l) и *P. aeruginosa* (от 64-128 mg/l до 32-64 mg/l) [*Choi et al., 2014b*]. В нашето проучване, понижение на MPC на colistin в присъствие на rifampicin бе наблюдавано при 17 от изследваните 18 щама (94.44%) *K. pneumoniae,* като то бе значително по-изразено, отколкото установеното от *Choi et al.* - MPC_{50} (128 mg/l) и MPC_{90} (>128 mg/l) се понижиха до съответно 4 и 16 mg/l. Този ефект бе наблюдаван и при по-ниска концентрация на rifampicin (1,7 mg/l).

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

В заключение, мутант превантивните концентрации на colistin за всички включени в проучването видове значително надвишават МПК, установени чрез BMD, като особено високи са по отношение на *K. pneumoniae* - MPC_{50} е 128 mg/l, а MPC_{90} >128 mg/l. Установените високи MPC и съотношения MPC/МПК при всички изследвани видове показват голяма ширина на МСП, особено при *K. pneumoniae*, което крие голям риск от селекциониране на полимиксин-резистентни, едно-стъпални мутанти при монотерапия с colistin, дори и при използване на препоръчваните понастоящем дозови режими. Комбинирано приложение на colistin и rifampicin би могло да допринесе за намаляване

на риска от селекциониране на едно-стъпални colistin-резистентни мутанти при лечение на инфекции, причинени от *K. pneumoniae*, докато комбинацията с meropenem не.

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

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

5.1. Скрининг тест за синергизъм с colistin

Посредством скрининг теста бяха изследвани ефектите на 16 двойни комбинации с colistin (Таблица 35).

В по-голямата част от случаите комбинациите бяха индиферентни (Фигура 28). Синергизъм и възможен синергизъм беше установен основно с azithromycin (18%), rifampicin (16%), meropenem (14%), doxycycline (12,8%) (Таблица 37). В преобладаващата част от случаите, синергизъм с colistin бе наблюдаван предимно при colistin - резистентни изолати (Таблица 38). Разпределението на получените резултати в групите на colistin чувствителните и colistin резистентните щамове бе статистически значимо при комбинациите colistin-rifampicin (Mann-Whithney U=148.5, $p<0.01$), colistin-azithromycin (Mann-Whithney U=154, $p<0.01$), colistin-doxycycline (Mann-Whithney U=144, $p<0.01$), colistin-aztreonam (Mann-Whithney U=56, $p<0.01$), colistin-tigecycline (Mann-Whithney U=56, $p<0.01$), colistin-gentamicin (Mann-Whithney U=231, $p<0.05$), colistin-chloramphenicol (Mann-Whithney U=58, $p<0.05$), colistin-ciprofloxacin (Mann-Whithney U=214.5, $p<0.05$).

5.2. Микродилуционен метод на El-Azizi

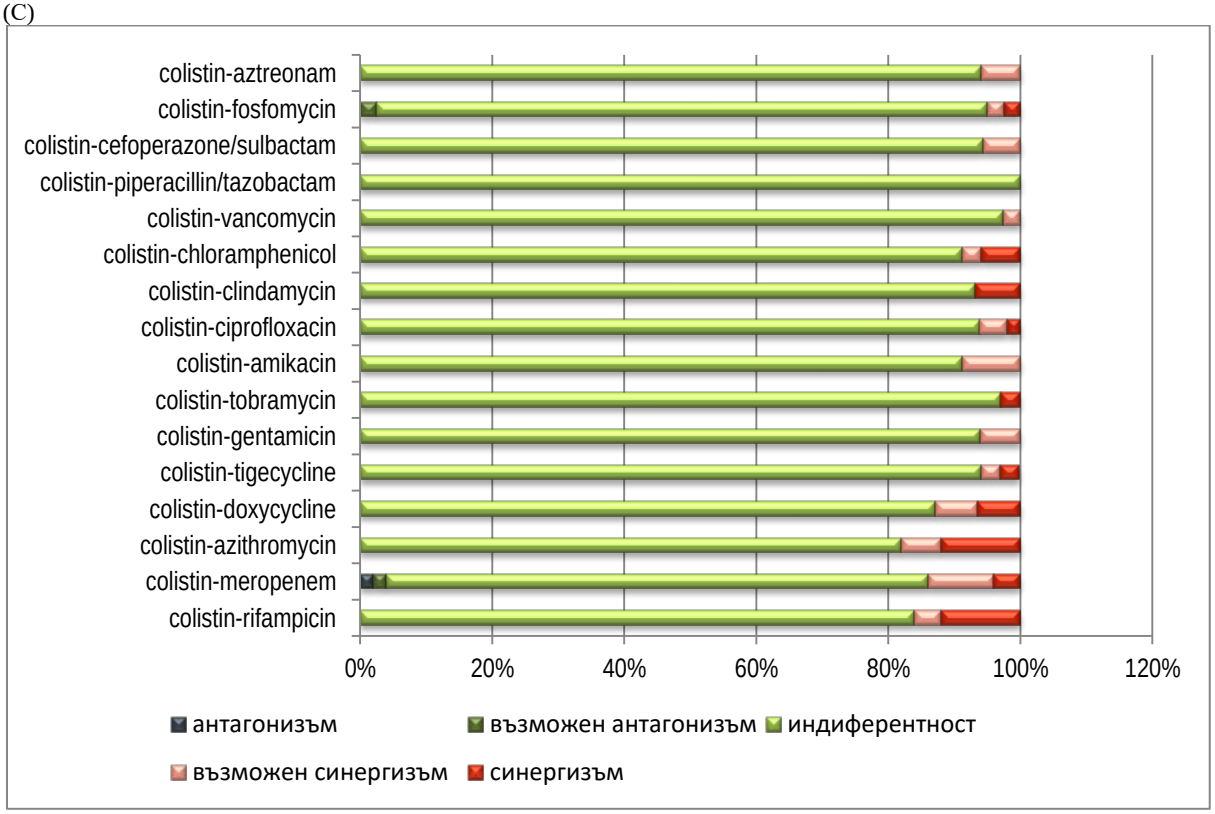
Методът беше използван за изследване на 3 двойни и 3 тройни комбинации с colistin: colistin-rifampicin, colistin-meropenem, colistin-gentamicin, colistin-meropenem-rifampicin, colistin-meropenem-gentamicin, colistin-rifampicin-gentamicin.

Както и при скрининг теста с предифузия, в повечето случаи комбинациите бяха индиферентни. Синергизъм в двойните комбинации беше установен при 36% от щамовете с rifampicin (18/50), в 20% с gentamicin (10/50) и в 8% с meropenem (4/50). Трите тройни комбинации, при сравнение на ефекта със съответните двойни, в почти всички случаи бяха индиферентни. Само при 2 щама (4%) бе установен синергизъм на комбинацията colistin-meropenem-rifampicin (Таблици 36 и 37).

Таблица 35. Резултати от скрининг тест за синергизъм с colistin при *K. pneumoniae*

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

Зоните на инхибиране на антибиотиците самостоятелно и от пре-дифузията на colistin самостоятелно се измерват и сравняват с диаметъра на зоната на инхибиране на съответната комбинация. Определя се разликата (Δ) между зоната на инхибиране на комбинацията и тази на по-активния от двата антибиотика самостоятелно. Резултатите те се интерпретират по следния начин: Δ от -2, -1, 0, 1 или 2→ индиферентност (И); Δ = (-3 или -4) → възможен антагонизъм (ВА); Δ of ≥ (-5) → антагонизъм (А); Δ = 3 или 4 → възможен синергизъм (ВС); Δ ≥ 5 → синергизъм (С)



Фигура 28: Ефект на различни антибиотични комбинации с colistin спрямо 50 карбапенем-резистентни щама *K. pneumoniae*, определен чрез скрининг-теста за синергизъм с colistin

Таблица 36. Резултати от 3 двойни и 3 тройни комбинации с colistin, получени при изследване на 50 щама *K. pneumoniae*, чрез метода на El-Azizi

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

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

Таблица 37. Сравняване на резултатите от скрининг теста за синергизъм с colistin и метода на El-Azizi

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

*При оценка на ефекта на тройните комбинации се прави сравнение с ефектите на съответните двойни комбинации.

Таблица 38. Разпределение на резултатите, получени от скрининг теста за синергизъм с colistin и метода на El-Azizi за част от антибиотичните комбинации, в зависимост от чувствителността на щамовете към colistin

комбинация (тест/метод)	Тип на щама	Антагонизъм	Възможен антагонизъм	Индиферентност	Възможен синергизъм	Синергизъм
		N, %	N, %	N, %	N, %	N, %
Colistin - Rifampcin (скрининг тест)	Colistin S (n_1=33)	0	0	33 (100%)	0	0
	Colistin R (n_2=17)	0	0	9 (52.9%)	2 (11.8%)	6 (35.3%)
	***Общо** (n=50)*	0	0	42 (84%)	2 (4%)	6 (12%)
Colistin - Rifampcin (метод на El-Azizi)	Colistin S (n_1=33)	0		30 (90.9%)		3 (9.1%)
	Colistin R (n_2=17)	0		2 (11.8%)		15 (88.2%)
	***Общо** (n=50)*	0		32 (64%)		18 (36%)
Colistin - Meropenem (скрининг тест)	Colistin S (n_1=33)	0	1 (3%)	30 (90.9%)	2 (6.1%)	0
	Colistin R (n_2=17)	1 (5.9%)	0	11 (64.7%)	3 (17.6%)	2 (11.8%)
	***Общо** (n=50)*	1 (2%)	1 (2%)	41 (82%)	5 (10%)	2 (4%)
Colistin - Meropenem (метод на El-Azizi)	Colistin S (n_1=33)	1 (3%)		31 (94%)		1 (3%)
	Colistin R (n_2=17)	0		14 (82.4%)		3 (17.6%)
	***Общо** (n=50)*	1 (2%)		45 (90%)		4 (8%)
Colistin - Gentamicin (скрининг тест)	Colistin S (n_1=33)	0	0	33 (100%)	0	0
	Colistin R (n_2=17)	0	0	14 (82.4%)	3 (17.6%)	0
	***Общо** (n=50)*	0	0	47 (94%)	3 (6%)	0
Colistin - Gentamicin (метод наEl-Azizi)	Colistin S (n_1=33)	1 (3%)		30 (90.9%)		2 (6.1%)
	Colistin R (n_2=17)	0		9 (52.9%)		8 (47.1%)
	***Общо** (n=50)*	1 (2%)		39 (78%)		10 (20%)
Colistin -Azithromycin (скрининг тест)	Colistin S (n_1=33)	0	0	32 (97%)	1 (3%)	0
	Colistin R (n_2=17)	0	0	9 (52.9%)	2 (11.8%)	6 (35.3%)
	Общо *(n=50)*	0	0	41 (82%)	3 (6%)	6 (12%)
Colistin - Doxycycline (скрининг тест)	Colistin S (n_1=32)	0	0	32 (100%)	0	0
	Colistin R (n_2=15)	0	0	9 (60%)	3 (20%)	3 (20%)
	***Общо**(n=47)*	0	0	41 (87.2%)	3 (6.4%)	3 (6.4%)
Colistin - Tigecycline (скрининг тест)	Colistin S (n_1=28)	0	0	28 (100%)	0	0
	Colistin R (n_2=6)	0	0	4 (66.7%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)
	***Общо** (n=34)*	0	0	32 (94.1%)	1 (2.9%)	1 (2.9%)
Colistin - Ciprofloxacin (скрининг тест)	Colistin S (n_1=33)	0	0	33 (100%)	0	0
	Colistin R (n_2=16)	0	0	13 (81.2%)	2 (12.5%)	1 (6.2%)
	***Общо** (n=49)*	0	0	46 (93.9%)	2 (4.1%)	1 (2%)
Colistin - Aztreonam (скрининг тест)	Colistin S (n_1=28)	0	0	28 (100%)	0	0
	Colistin R (n_2=6)	0	0	4 (66.7%)	2 (33.3%)	0
	***Общо**(n=34)*	0	0	32 (94.1%)	2 (5.9%)	0
Colistin- Chloramphenicol (скрининг тест)	Colistin S (n_1=28)	0	0	27 (96.4%)	1 (3.6%)	0
	Colistin R (n_2=6)	0	0	4 (66.7%)	0	2 (33.3%)
	***Общо** (n=34)*	0	0	31 (91.2%)	1 (2.9%)	2 (5.9%)

n - общ брой изследвани щамове; n_1 - брой colistin чувствителни щамове; n_2 - брой colistin резистентни щамове

Синергизъм бе установен предимно при colistin резистентни щамове (Таблица 38). Разпределението на получените резултати в групите colistin чувствителните и colistin резистентните щамове се различава статистически значимо за комбинациите colistin-rifampicin (Mann-Whithney U=58.5, $p<0.01$) и colistin-gentamicin (Mann-Whithney U=161, $p<0.01$).

5.3. Time-kill assays (TKA)

TKA бяха извършени за изследване на ефекта от комбинацията colistin-rifampicin при пет щама *K. pneumoniae*. Синергизъм беше установен при четири от тях. Във всички

случаи, след първоначалното инхибиране на растежа, както от colistin самостоятелно, така и под влияние и на комбинацията от двата антибиотика беше наблюдавано възобновяване на растежа. Количеството на бактериите след 24 часова инкубация в присъствие на изследваните антибиотици надвишаваше изходния инокулум и независимо от наблюдавания синергизъм при четири от тях, комбинацията не доведе до бактериостатичен или бактерициден ефект (Таблица 39).

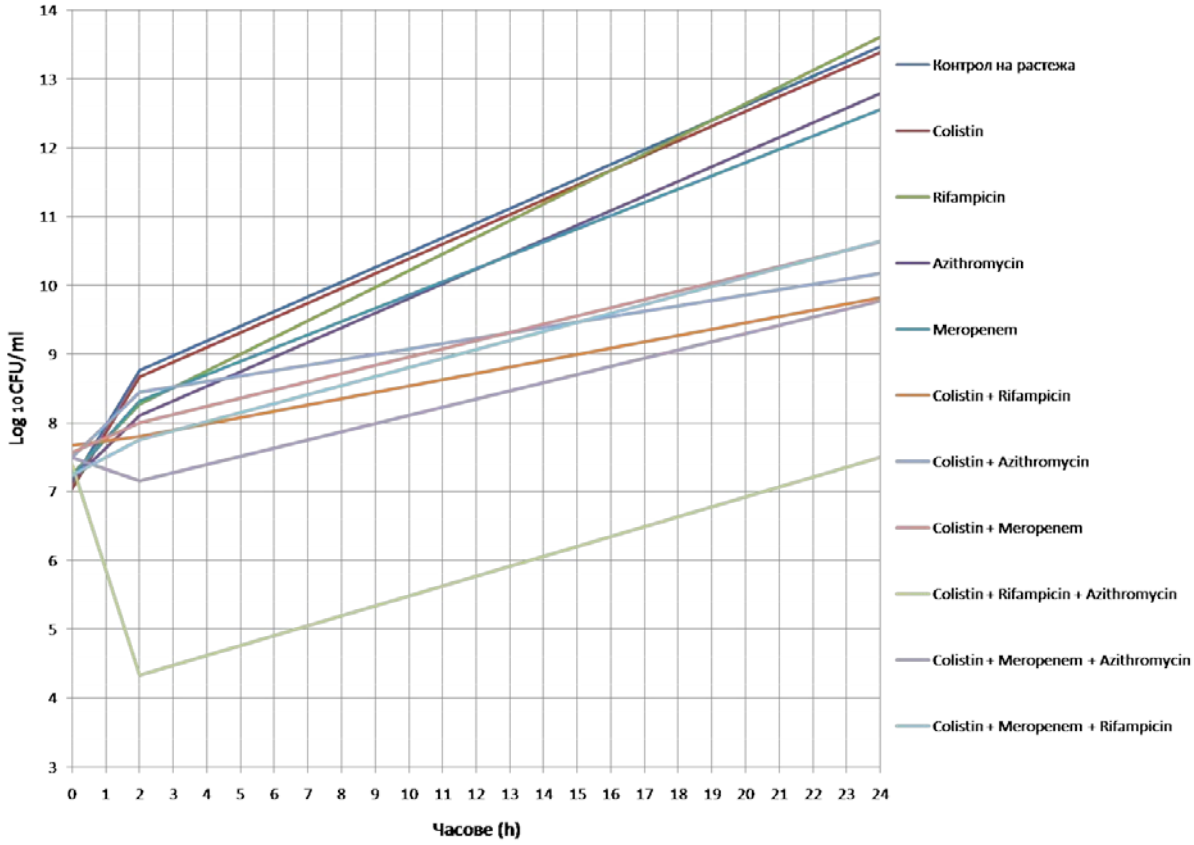
Таблица 39. Сравнение на резултатите, получени при изследване на ефекта на комбинацията colistin-rifampicin чрез 3 метода при 5 карбапенем-резистентни щама *K. pneumoniae*

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

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

При един от colistin-резистентните щамове *K. pneumoniae* (32K) чрез ТКА беше изследван ефекта на три двойни комбинации (colistin-rifampicin, colistin-azithromycin, colistin-meropenem) и три тройни (colistin-rifampicin-meropenem, colistin-rifampicin-azithromycin, colistin-meropenem-azithromycin). Щамът е с високо ниво на резистентност към всички изследвани антибиотици. МПК за тези антибиотици са както следва: colistin 64 mg/l, meropenem 128 mg/l, rifampicin > 64 mg/l, azithromycin 8 mg/l. При проведените ТКА нито един от антбиотиците самостоятелно не доведе по инхибиране на растежа и кривите на убиване за всеки един тях не се различават съществено от тази за контрол на растежа без антибиотик (Фигура 29). И при трите двойни комбинации беше установен синергизъм в сравнение с ефекта на антибиотиците при самостоятелно им приложение, като най-изявен беше при комбинацията colistin-rifampicin. И при трите двойни комбинации, обаче не беше наблюдаван бактериостатичен или бактерициден ефект, тъй като на 24 час бактериалният инокулум надвишаваше изходния (Фигура 29). От трите тройни комбинации най-силен инхибиращ ефект имаше комбинацията от colistin-rifampicin-azitromycin. На втория час от инкубиране в присъствие и на трите

антибиотика беше установено значимо инхибиране на бактериалния растеж. След 24 часа инкубиране в присъствие на colistin-rifampicin-azitromycin бактериалният инокулум беше приблизително равен на изходния, т.е. липсваше бактериостатичен или бактерициден ефект на комбинацията. Но въпреки това, взаимодействието беше синергично, за разлика от това при другите две тройни комбинации, при които беше налице индиферентност, в сравнение със съответните двойни комбинации (Фигура 29).



Фигура 29: Резултати от Time-kill експерименти с изследване на ефекта на 3 двойни и три тройни комбинации с colistin спрямо кармабенем-резистентен и colistin-резистентнен щам *K. pneumoniae* (32K)

5.4. Сравнение на резултатите, получени от използваните методи

Два от методите (скрининг-тест за синергизъм с colistin и метода на El-Azizi) бяха използвани за изследване на ефекта на комбинациите colistin-rifampicin, colistin-meropenem и colistin-gentamicin спрямо всички 50 щама *K. pneumoniae*. Съвпадение в резултатите, получени от двата метода беше установено в 80% за комбинациите colistin-rifampicin и colistin-meropenem (40/50) и в 84% за комбинацията colistin-gentamicin (42/50). При пет щама беше изследван ефекта на комбинацията colistin-

rifampicin и с трите използвани метода. Съвпадение в получените и от трите метода резултати беше установено при четири щама (80%) (Таблица 39).

5.5. Обсъждане

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

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

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

В настоящото проучване, чрез скрининг теста бе установен синергизъм / възможен синергизъм предимно с azithromycin (18%), rifampicin (16%), meropenem (14%) и doxycycline (12.8%). На базата на резултатите от скрининг теста, определянето на чувствителността на щамовете, а също и обзора на литературата избрахме три комбинации (colistin-rifampicin, colistin-meropenem и colistin-gentamicin), които да бъдат изследвани с метода на El-Azizi. Този нов метод е вариант на метода с шахматната дъска и се основава се микроразреждане в бульон, като дава възможност на една плака да се изследват, както чувствителността на микроорганизмите към три антибиотика, така и ефектите на три двойни и една тройна комбинация между тях [*El-Azizi, 2016*]. В сравнение с методите на класическата шахматната дъска и ТКА, методът на El-Azizi е по-бърз, по-икономичен и по-лесен. [*El-Azizi, 2016*]. В настоящото проучване, чрез метода на El-Azizi, синергизъм на комбинацията colistin-rifampicin бе установен при 36% от изследваните щамове (18/50). Комбинацията colistin-meropenem бе синергична при четири щама (8%), а комбинацията colistin-gentamicin - при 10 щама (20%). Тази комбинация, обаче, би трябвало да се използва много внимателно, поради нефротоксичността на двата антибиотика. Като цяло, съвпадение в получените резултати от двата метода бе наблюдавано в 80% за комбинациите colistin-rifampicin и colistin-meropenem (40/50) и в 84% за комбинацията colistin-gentamicin (42/50) (при изчисление на % на съвпадение на резултатите между тестовете, комбинациите с установен синергизъм/възможен синергизъм и антагонизъм/възможен антагонизъм от скрининг теста бяха сумирани и са съпоставени съответно на броя на комбинациите със синергизъм и антагонизъм от теста на El-Azizi). В настоящото проучване, ефектът на комбинацията colistin-rifampicin беше изследвана и чрез ТКА при пет от щамовете. Синергизъм бе наблюдаван при четири от тях. Съвпадение на резултатите от трите метода бе установено при 4 щама (80%).

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

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

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

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

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

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

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

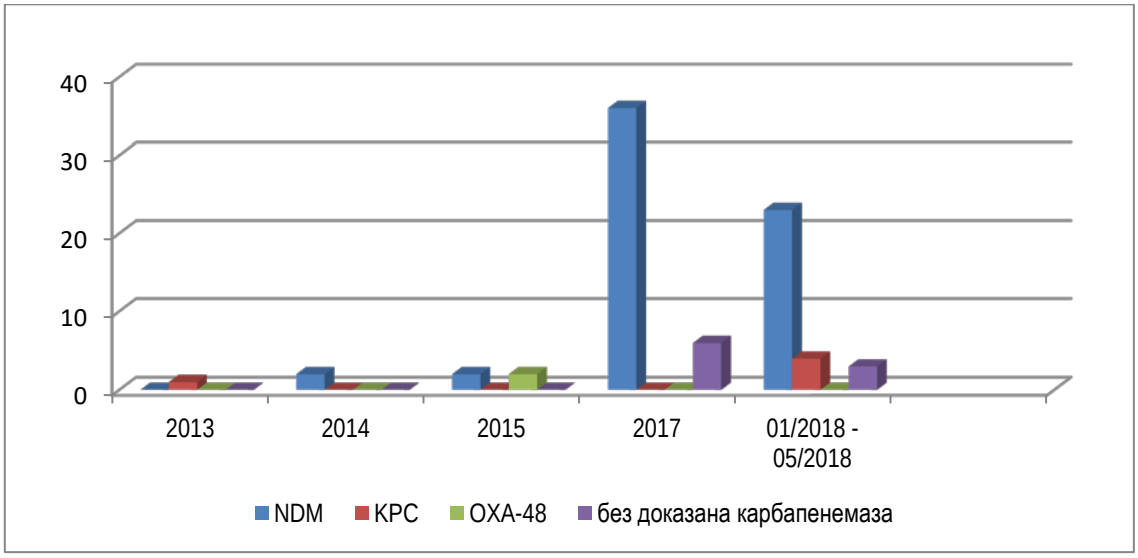
6. Определяне на спектъра на произвежданите карбапенемази при представителите на сем. *Enterobacteriaceae* и проучване на клоналната свързаност на изолатите при видовете с установена резистентност към colistin.

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

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

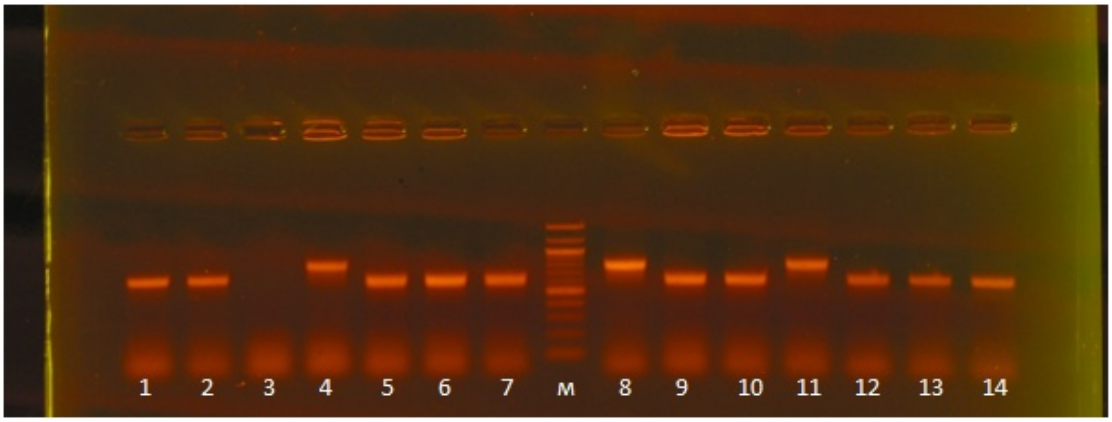
От включените в проучването 107 щама *K. pneumoniae,* 79 бяха нечувствителни към карбапенеми (73.8%). За периода 2013 - 2016г бяха установени само седем карбапенем-резистентни щама, докато останалите 91.1% (72/79) бяха изолирани от 01/2017 до 05/2018г. (Фигури 30). За доказване на производството на карбапенемази първоначално беше използван RT-PCR. Впоследствие всички резултати бяха потвърдени и чрез multi-plex PCR (Фигура 31).

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



Фигура 30. Графично представяне на разпределението на включените в проучването карбапенем не-чувствителни щамове *K. pneumoniae* според вида на установената група карбапенемаза и по години

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



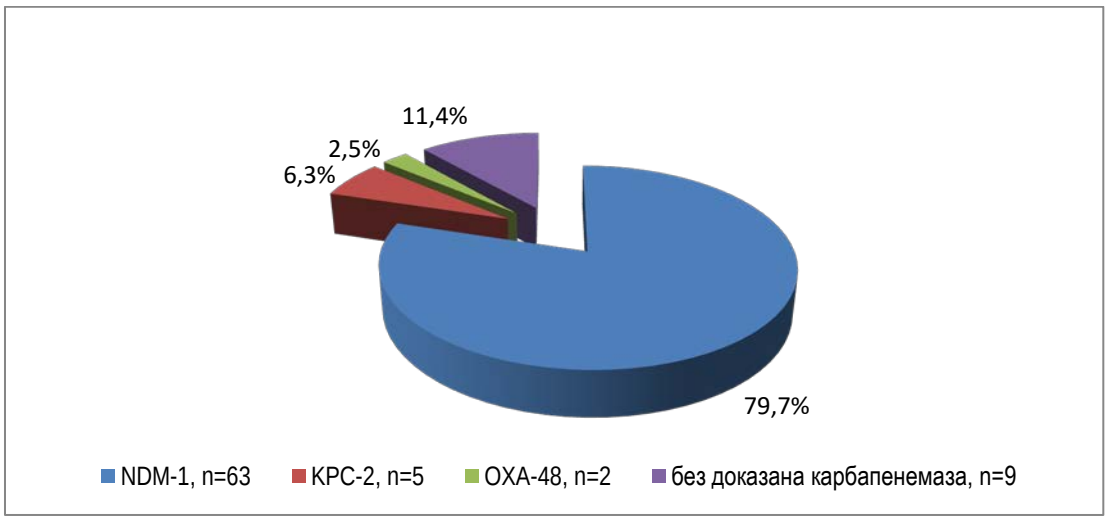
Фигура 31. Агарозна гел-електрофореза на PCR-продукти от multiplex PCR на щамове *K. pneumoniae* за доказване на основните класове карбапенемази. Позиции 1, 2, 5, 6, 7, 9, 1012, 13, 14 - фрагменти от ~ 600 bp (NDM); позиции 4, 8 и 11 - фрагменти от ~ 800 bp (KPC); позиция 3 - няма амплифициран ген; M- маркер (Ladder 100 bp)

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

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

При представителен брой от щамовете (n=18) с доказана продукция на карбапенемаза беше извършено секвениране, което показа, наличие на $bla_{\text{NDM-1}}$, $bla_{\text{KPC-2}}$, $bla_{\text{OXA-48}}$. Разпределението на изолатите, според установения механизъм на резистентност към карбапенеми е предствено на Фигура 32.

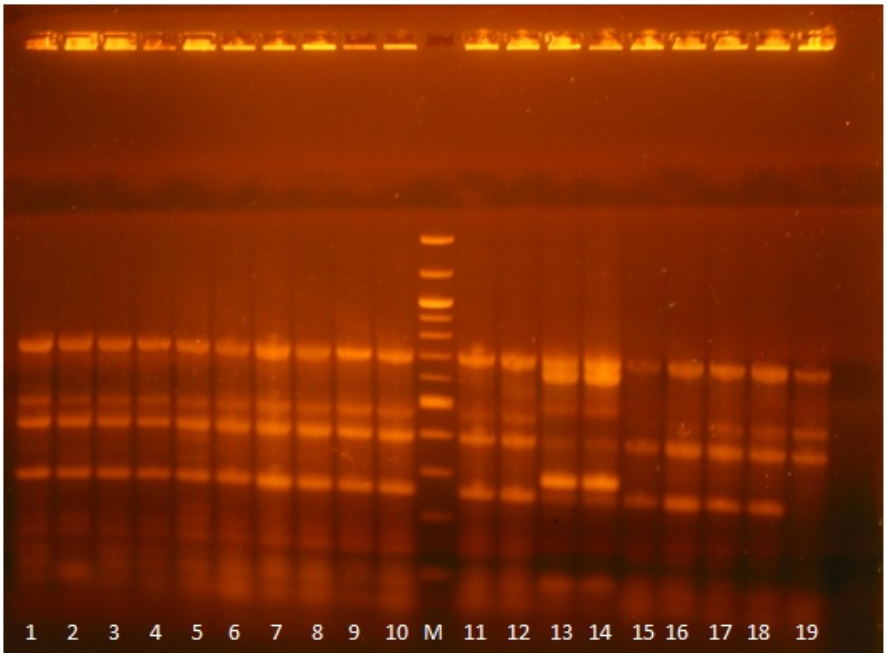
Седемнадесет от карбапенем резистентните изолати *K. pneumoniae* (12 NDM-1, два KPC-2 и три щама без доказана карбапенемаза) бяха охарактеризирани и за наличието на ESBL и AmpC ензими. Всички щамове бяха SHV-положителни. При девет от NDM-1 продуциращите изолати беше установено наличие на $bla_{\text{CTX-M-15}}$,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



Фигура 32. Разпределение на изолатите според установения механизъм на резистентност към карбапенеми при 79 щама *K.pneumoniae*

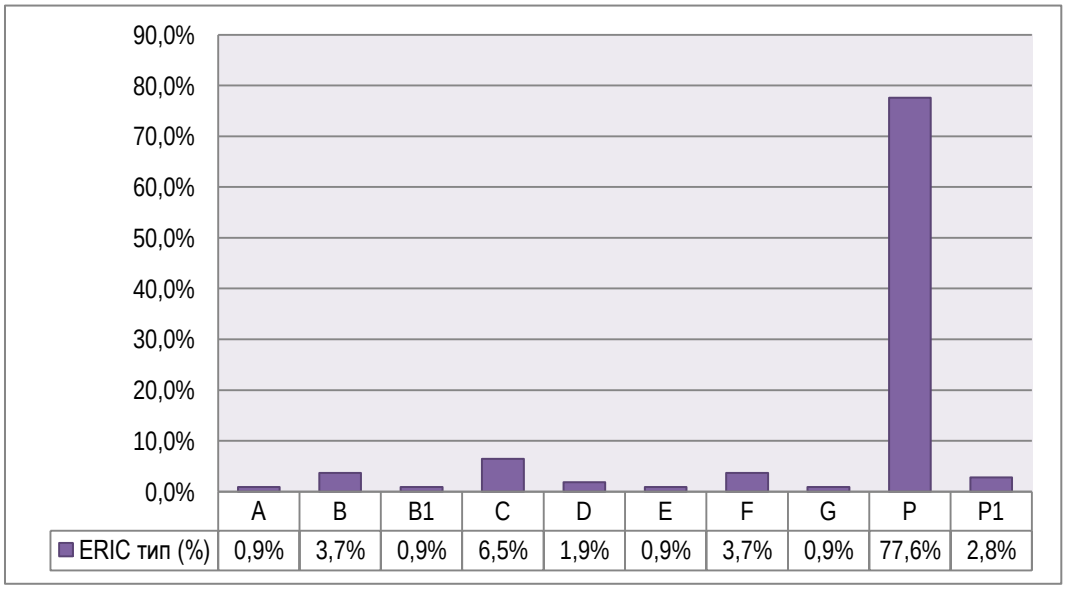
6.1.2. Епидемиологично типизиране на *K. pneumoniae*

Епидемиологичното типизиране беше направено чрез ERIC-PCR. Посредством ERIC-PCR бяха генерирани профили с 5 до 12 ивици (фигура 33), които съответстваха на 10 ERIC типа.



Фигура 33. Агарозна гел-електрофореза на PCR продукти от ERIC-PCR на щамове *K. pneumoniae* . Позиции 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17 и 18 - ERIC тип P, позиции 13 и 14 - ERIC тип B, позиция 19 - ERIC тип C; M- маркер (Ladder 100bp)

Клъстерният анализ с UPGMA показа, че коефициента на сходството на отделните ERIC типове се движи от 0.28 до 0.95, като десетте ERIC типа се групираха в 8 клона (Фигури 34 и 35).



Фигура 34: Разпределение на клоновете *K.pneumoniae*, определени чрез ERIC_PCR

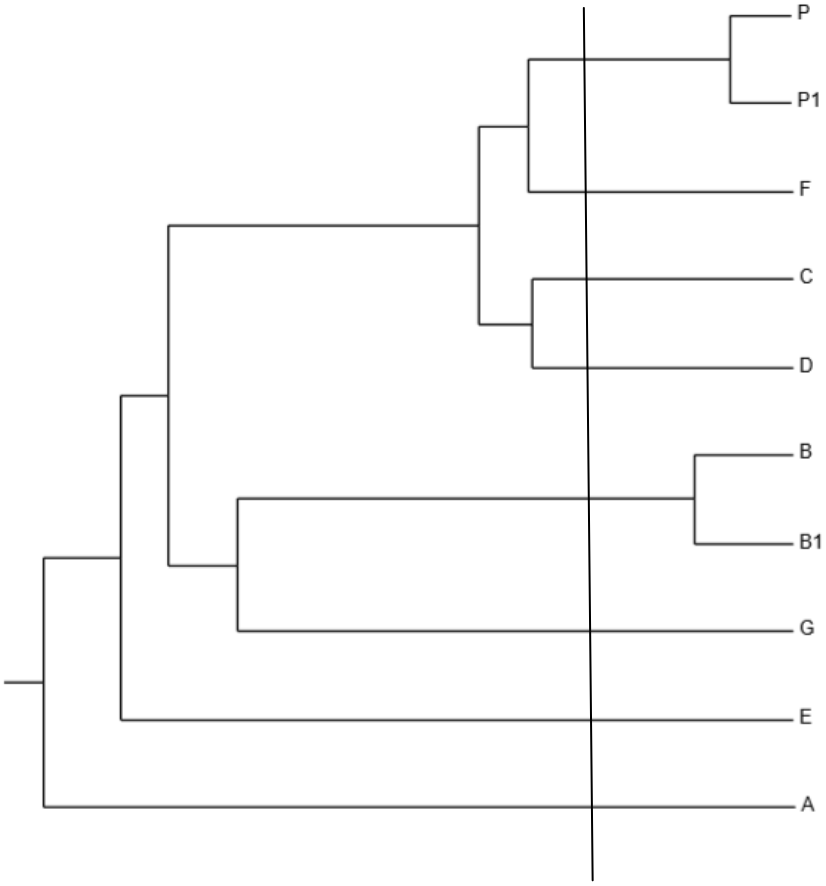
Таблица 40. Характеристика на ERIC типовете на ***K. pneumoniae (n=107)***

ERIC тип	Година/брой	Общ брой	Чувствителност към карбапенеми	Карбапенемази брой	Colistin		
					S, n (%)	hR*, n (%)	R, n (%)
A	2017[1]	1	S, n=1	-	1 (100%)	-	-
			R, n=0	-	-	-	-
B	2015[1], 2017[1], 2018[2]	4	S, n=2	-	1 (100%)	-	1 (100%)
			R, n=2	OXA-48[1]	-	2 (100%)	-
B1	2017[1]	1	S, n=1	-	-	1 (100%)	-
			R, n=0	-	-	-	-
C	2017[5], 2018[2]	7	S, n=5	-	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)
			R, n=2	NDM-1[1]	2 (100%)	-	-
D	2017[2]	2	S, n=2	-	2 (100%)	-	-
			R, n=0	-	-	-	-
E	2017[1]	1	S, n=1	-	1 (100%)	-	-
			R, n=0	-	-	-	-
F	2015[1], 2017[3]	4	S, n=3		1 (33.3%)	-	2 (66.7%)
			R, n=1	OXA-48[1]	1 (100%)	-	-
G	2017[1]	1	S, n=0	-	-	-	-
			R, n=1	-	1 (100%)	-	-
P	2013[1], 2014[2], 2015[2], 2017[53], 2018[25]	83	S, n=12	-	11 (91,7%)	1 (8,3%)	-
			R, n=71	NDM-1[61], KPC-2[4]	35 (49.3%)	12 (16.9%)	24 (33.8%)
P1	2017[1], 2018[2]	3	S, n=1	-	-	1 (100%)	-
			R, n=2	NDM-1[1], KPC-2[1]	1 (50%)	-	1 (50%)

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

77.6% от изследваните щамове попадат в доминиращия ERIC тип P, а 80.4% (86/107) в доминиращия клон P (Таблица 40). Коефициентът на сходство между отделните субклонове P и P1 беше 0.95. Доминиращият клон P включва 86 щама, изолирани в периода 2013 - 2018. В преобладаващата част от случаите (84.9%, 73/86), щамовете са нечувствителни към карбапенеми. 62 (84.9%, 62/73) от тях са NDM-1 продуценти, 5 (6,8%, 5/73) – KPC-2, а при останалите 6 щама (8.2%, 6/73) не е доказана продукция на карбапенемаза. Освен с високо ниво на резистентност към карбапенеми, щамовете от доминиращия клон се характеризират и с висока честота на резистентност/ хетерорезистентност към colistin. 82.9% (39 от 47 щама) от colistin резистентните / хетерорезистентни щамове попадат в клон P. Изолирани са от пациенти на почти всички структури на болницата, а също и от амбулаторни пациенти и хоспитализитрани в друга болница, което показва тяхното много широко разпространение.

Втори по честота е ERIC тип C, към който спадат 7 (6,5%) от изследваните щамове, изолирани през 2017г и 2018г. Преобладаващата част от щамовете от този тип са карбапенем-чувствителни (71.4%, 5/7). Продукция на NDM е установена при един от карбапенем-резистентните изолати. Трети по честота е ERIC тип F (4 щама), изолирани



Фигура 35. Дендрограма, представяща клоналната свързаност на ERIC типовете, установени за проучените щамове *K. pneumoniae*

Втори по честота е ERIC тип C, към който спадат 7 (6,5%) от изследваните щамове, изолирани през 2017г и 2018г. Преобладаващата част от щамовете от този тип са карбапенем-чувствителни (71.4%, 5/7). Продукция на NDM е установена при един от карбапенем-резистентните изолати. Трети по честота е ERIC тип F (4 щама), изолирани в периода 2015г - 2017г. Щамовете от този тип са предимно карбапенем-чувствителни (75%, 3/4), но 50% (2/4) са резистентни към colistin. Към този клон спада и един OXA-48 положителен щам, изолиран през 2015г. Останалите ERIC типове са представени от 1 до 3 щама. Като цяло, карбапенемаза-продуциращи *K. pneumoniae* се установяват в пет ERIC типа - B, C, F, P и P1 и съответно четири клона B, C, F, P.

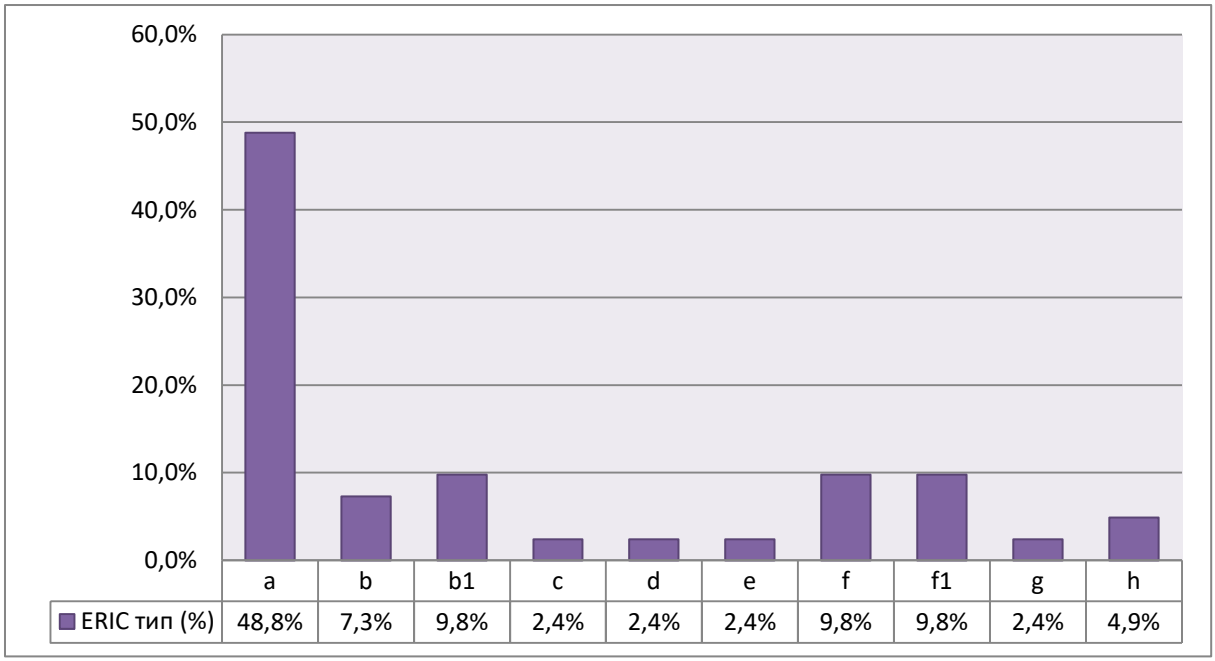
6.2. Определяне на спектъра на произвежданите карбапенемази при *E. coli* и проучване на клоналната свързаност на изолатите

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

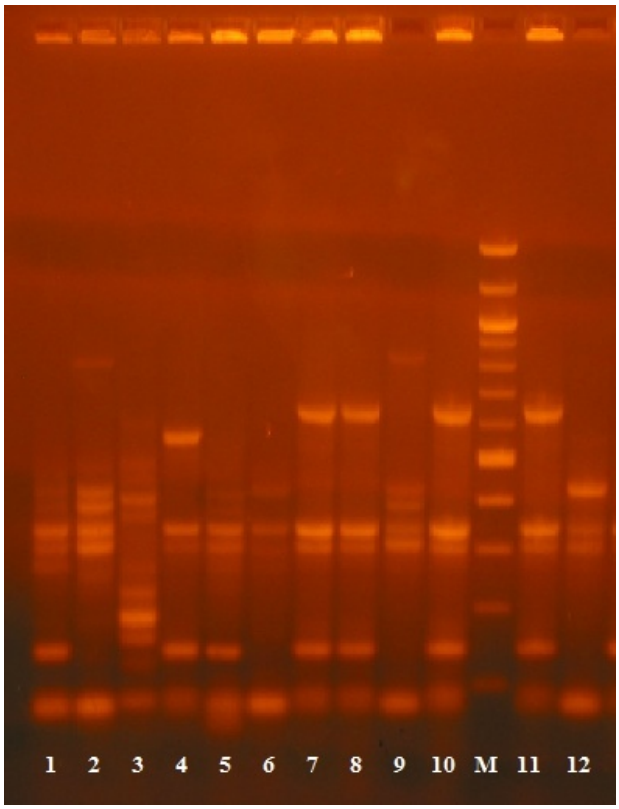
В края на 2017г и през първите 5 месеца на 2018г бяха изолирани шест щама *E. coli* с намалена чувствителност / резистентност към карбапенеми. Посредством RT-PCR, а впоследствие и чрез multiplex PCR, при два от щамове беше доказано наличието на bla_{NDM} (43Eco и 47Eco), при други два - гени за bla_{KPC} (42Eco и 45Eco). В два от случаите (44Eco и 46Eco) RT-PCR и multiplex PCR реакциите бяха негативни. Посредством секвениране беше установено, че 43Eco е носител едновременно на bla_{NDM-1}, $bla_{CTX-M-15}$ и bla_{CMY-4}, а 47Eco на bla_{NDM-1} и $bla_{CTX-M-3}$.

6.2.2. Епидемиологично типизиране при *E. coli*

Посредством ERIC-PCR бяха установени 10 различни ERIC типа, обособяващи 8 клона (с над 80% сходство) (фигури 36, 37 и 38). Преобладават изолатите от ERIC тип "a" - 48.8% (20/41). Към този ERIC тип спадат 19 щама, изолирани в периода 2017г и един през 2018г. Изолирани са от пациенти на 7 клиники на болницата, а също и от амбулаторни пациенти. 19 от щамовете произвеждат широкоспектърна β-лактамази (ESBL), а един от тях (47Eco) е карбапенем и colistin резистентен, NDM-1 продуцент. Интерес представлява факта, че този изолат е от пациент, при който един месец по-рано е изолиран карбапенем резистентен, NDM-1 положителен щам *K. pneumoniae* (92K). Това показва, че в този случай е възможно да е осъществен *in vivo* междувидов пренос на карбапенемазните гени от *K. pneumoniae* в *E. coli*. В следващите по честота ERIC типове "f", "f1" и "b1" се включват по четири щама. Към ERIC тип "f" (9.8%, 4/41) спадат щамове, изолирани от 4 различни клиники на болницата, като един от тях е



Фигура 36. Разпределение на клоновете *E. coli*, определени чрез ERIC-PCR



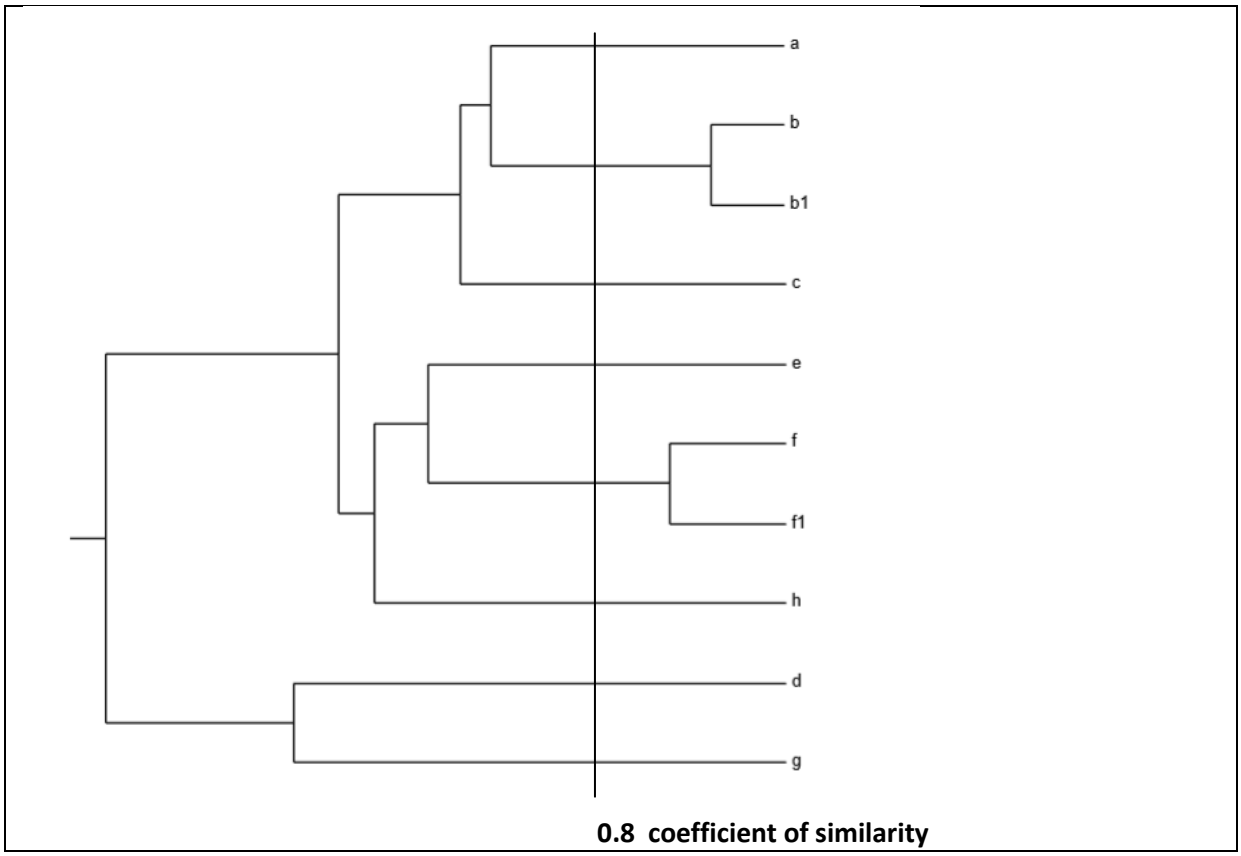
Фигура 37. Агарозна гел-електрофореза на PCR продукти на ERIC-PCR от щамове *E. coli*. Позиции: 1, 5 - ERIC тип "a", позиции 2, 9 - ERIC тип "f", позиции 6 и 12 - ERIC тип "f1", позиции 7, 8, 10 и 11 - ERIC тип "b1", позиция 3 - ERIC тип "h", позиция 4 - ERIC тип "b", M – маркер (Ladder 100 bp)

карбапенем резистентен с доказано наличие на $bla_{\text{NDM-1}}$. Към ERIC тип "f1" (9.8%, 4/41) спадат щамове, изолирани от пациенти на две от структурите на болницата. Един от изолатите е резистентен на карбапенеми, но при него не беше доказана продукция на карбапенемаза. ERIC тип "b1" (9.8%, 4/41), включва четири щама *E. coli*, изолирани само от една клиника на болницата (Хематология), като два от изолатите са карбапенем резистентни с доказана KPC-2 продукция. В останалите случаи ERIC типовете са представени само от 1 или 2 щама.

Характеристиката на установените ERIC типове при *E. coli* е представена в Таблица 41. Проведеното епидемиологично типизиране при *E. coli* показа доминиране на един широко разпространен клон. В началото на 2018г в този клон се появява и $bla_{\text{NDM-1}}$ положителен и colistin резистентен щам, при който вероятно е осъществен *in vivo* междувидов трансфер на карбапенемазни гени от *K. pneumoniae*.

Таблица 41. Характеристика на ERIC типовете на ***E. coli***

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



Фигура 38. Дендрограма, представяща клоналната свързаност на включените в проучването щамове *E. coli* (41)

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

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

6.4. ***Обсъждане***

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

Турция [*Poirel et al., 2004*]. Разпространени са широко в Средния Изток и Северна Африка [*Poirel et al., 2012*]. Периодично се появяват съобщения за епидемични взривове в различни части на Европа [*Livermore* 2012].

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

Първите три VIM-1 и CMY-99 продуциращи щамове *P.mirabilis* бяха изолирани в края на 2011 и началото на 2012г в УМБАЛ "Александровска" [*Schneider et al., 2014*]. Впоследствие бе установено широко разпространение на този мулти-резистентен клон на *P.mirabilis* в България, като за периода 2012 - 2015г бяха охарактеризирани общо 19 щама от пациенти на 7 болници в София, Варна и Плевен [*Markovska et al., 2016*].

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

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

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

Скоро след това бяха докладвани спорадични случаи на инфекции с NDM-положителни *K. pneumoniae* в три големи болници в София [*Kostyanev et al., 2016; Todorova et al., 2016*], два от които бяха установени в УМБАЛ "Александровска" през 2014г [*Kostyanev et al.,* 2016]. През 2015 - 2016г е регистриран поликлонален вътреболничен взрив, причинен от NDM-1-продуциращи *K. pneumoniae* във Военно Медицинска Академия, София [*Savov et al., 2018*]. Преобладават щамовете, принадлежащи към клонален тип

ST11, но друга част от тях спадат към ST15, ST16 и ST391. Счита се, че много вероятно този взрив е резултат от вътреболничен трансфер [*Savov et al., 2017*]. Освен това, клоналния тип ST11 е идентичен с установения при голям вътреболничен взрив в Гърция, което показва, че този клон е широко разпространен в Балканския регион [*Savov et al., 2017*].

В настоящото проучване, два от NDM-1 положителните щамове *K. pneumoniae* са изолирани през 2014 [*Kostyanev et al.,* 2016], два - през 2015, а всички останали - от началото на 2017. Появата на NDM-продуциращи *K. pneumoniae* в болницата е най-вероятно в резултат на междуболничен трансфер, тъй като първите регистрирани от началото на 2017г щамове бяха изолирани от проби на пациенти, взети в деня на хоспитализация. Допълнително, по анамнестични данни бе установена предхождаща им хоспитализация в други големи болници в София. Впоследствие, разпространението им най-вероятно се дължи комбинация от между- и вътреболничен трансфер.

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

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

В заключение, резистентността към карбапенеми на включените в проучването представители на сем. *Enterobacteriaceae* е най-висока при *K. pneumoniae* (73.8%). Дължи основно на широко разпространение на bla_{NDM-1} (79,7%). В единични случаи са установени $bla_{\text{OXA-48}}$ (изолирани през 2015г), а от началото на 2018г е се появяват KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae*. 14,63% (6/41) от включените в проучването щамове *E. coli* са резистентни към карбапенеми. Резистентността се дължи на производство на NDM-1 (2) и KPC-2 (2) ензими. При един щам *E. cloacae complex* е доказано на носителство на $bla_{\text{OXA-48}}$. Епидемиологичното типизиране показа преобладаването на един клон *K. pneumoniae* – в 80,4% (86 от 107 изолата). Карбапенем-резистентните изолати на този клон бяха 84,9% (73 от 86) - 62 щама $bla_{\text{NDM-1}}$ положителни и 5 щама $bla_{\text{KPC-2}}$ положителни. Другите шест бяха без доказана карбапенемаза. Тридесет и девет щама, 45.3% от този клон са резистентни и хетерорезистентни на colistin. Тридесет и два щама, 37.2% от този клон бяха NDM положителни, както и колистин резистентни или хетерорезистентни. Всички KPC-2 продуциращи изолати бяха колистин чувствителни. Единични colistin-резистентни изолати принадлежат на други три клона.

Проведеното епидемиологично типизиране при *E. coli* показа доминиране на един широко разпространен клон. В началото на 2018г в този клон се появява и $bla_{\text{NDM-1}}$

7. Проучване на генетичните механизми на резистентост към colistin

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

Плазмидни механизми на резистентост към colistin

При всички 33 щама (с установена резистентност към colistin) чрез референтния метод на микроразреждане в бульон, а също и при три от хетерорезистентните бяха извършени PCR тестове за откриване на плазмидно кодираните гени *mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4* и *mcr-5*. Не бяха установени плазмидно медиирани механизми на резистентност към colistin при изследваните щамове *K. pneumoniae, E. coli, P. aeruginosa* (Таблица 42).

Таблица 42. Обобщение на резултатите от генетичните тестове за резистентност към colistin

Щам	Col	*mgrB*	*pmrA*	*pmrB*	*phoQ*	*phoP*	*mcr-1*	*mcr-2*	*mcr-3*	*mcr-4*	*mcr-5*
2K	R	**IS*903 like element***	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
14K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
19K	hR	див тип									
20K	hR	див тип									
24K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
25K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
27K	S	див тип	див тип	мутация[1]	див тип	див тип					
28K	S	див тип									
30K	hR	див тип	див тип	мутация[1]	див тип	див тип					
32K	R	**(-)***	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
41K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
45K	hR	див тип									
47K	hR	див тип									
51K	hR	див тип									
53K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
57K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
59K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
61K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
67K	R	**Stop codon**	див тип	R256G[1]	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
68K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
69K	R	**Stop codon**					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
70K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
72K	R	див тип	див тип	R256G[1]	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
73K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
74K	hR	див тип									
75K	S	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
77K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
83K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
86K	hR	див тип									
87K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
88K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
90K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
91K	R	**IS*903B***					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
92K	hR	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
94K	R	**(-)***					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
96K	S	див тип									
97K	hR	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип					
100K	R	**IS*903B***	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
101K	hR	див тип									
104K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
108K	R	**IS*903B***	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
109K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
110K	hR	див тип									
112K	R	**IS*903B***					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
113K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
117K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
119K	S	див тип									
120K	R	див тип					(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
121K	R	див тип	див тип	див тип	див тип	див тип	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
47Eco	R						(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8P	R						(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10P	R						(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11P	R						(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

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

Хромозомни механизми на резистентност към colistin

При 52 щама *K. pneumoniae* (29 - резистентни на colistin по метода на микроразреждане в бульон, 18 хетерорезистентни и 5 чувствителни (избрани като контролни, за сравняване)) беше амплифициран гена *mgr*B. При два изолата не получихме амплификационен продукт, при 45 установихме сегмент с размер ~220 bp и при 5 - сегмент от ~ 1300bp. Посредством секвениране на гена *mgrB* бяха установени промени при 9 от colistin резистентните щамове *K. pneumoniae* (31 %). При два от тях (32К и 94К), праймерите не амплифицираха гена *mgrB*, което би могло да се дължи на делеция на целия *mgr*B локус или на инсерция в гена на много голям сегмент. При два щама (67К и 69К), генът беше инактивиран от стоп кодон, а при 5 щама бе доказано инактивиране посредством вмъкване на инсерционна последователност (IS*903like* или IS*903B*) в 144bp *mgr*B ген. При останалите colistin резистентни щамове, при хетерорезистентните и colistin-чувствителните контроли генът *mgrB* беше интактен (див тип) (Таблица 42).

При 23 щама *K. pneumoniae* (13 резистентни на colistin по метода на микроразреждане в бульон, 2 чувствителни и 8 хетерорезистентни), подбрани на случаен принцип, бяха секвенирани гените *pmrA, pmrB, phoP, phoQ*. Не бяха установени промени в *pmrA, phoP, phoQ*.

При четири от изследваните щамове (два colistin-резистентни (67К и 72К), един - хетерорезистентен (30К) и един чувствителен (27К)) беше установена мутациия в гена *pmrB*, която води до замяна на аминокиселината аргинин с глицин на 256 позиция в Pmr B (Таблица 42).

Обсъждане

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

Хромозомните механизми на резистентност към полимиксини могат да се установят посредством секвениране на гените, отговорни за специфичните мутации. Според *Poirel et al.* (2017), обаче, приложението на молекулярно-генетичните техники за доказване на хромозомните механизми на резистентност е затруднено, а интерпретацията на получените резултати - несигурна, тъй като вероятно съществуват и други, неизвестни към момента хромозомни механизми на резисистентност, а преценката, дали установените промени в протеини, които участват в биосинтезата на липополизахарида действително водят до резистентност към полимиксини е трудна. В допълнение, нивото на експресия на съответните гени може да варира и по този начин да оказва сериозно влияние върху нивата на резистентност към полимиксини [*Poirel et al., 2017*]. Като имахме предвид това, в настоящото проучване избрахме да секвенираме само гените *mgrB, pmrA, pmrB, phoP и phoQ,* тъй като мутациите в тях са най-добре проучени и най-често се свързват с резистентност към полимиксини.

Промени в гена *mgrB* бяха установени при 9 (31%) от colistin-резистентните *K. pneumoniae*. MgrB е малък трансмембранен протеин, който осъществява негативна обратна връзка в системата phoPQ. В литературата са описани множество промени - missense и nonsense мутации, делеции, инсерции, включително и пълна делеция на локуса *mgrB,* които водят до повишена експресия на *phoPQ* оперона, а това, от своя страна - до активиране на оперона *pmrHFIJKLM* и развитие на придобита резистентност към полимиксини [*Poirel et al., 2017*]. Инактивирането на *mgr*B много често се дължи на различни инсерционни последователности (IS). IS са едни от най-просто устроените мобилни генетични елементи, широко разпространени сред всички живи организми [*Vandecraen et al.,* 2017]. Представляват малки компактни елементи, които могат самостоятелно да се преместват, както в рамките на една ДНК молекула, така и между различни молекули [*Vandecraen et al.*, 2017]. До момента са известни повече от 4500 вида IS, класифицирани в 29 семейства [*Vandecraen et al.,* 2017]. IS предизвикват инактивиране/промяна в експресията на гени, свързани с вирулентността, резистентността към антимикробни средства, участват в модулиране на метаболитни функции, а появата им може да предизвиква също и промяна в експресията на съседни гени [*Vandecraen et al.*, 2017]. При *K. pneumoniae,* инактивиране на гена *mgr*B може да възникне под влияние на различни IS. В настоящото проучване при пет щама беше установено инактивиране посредством мобилни елементи IS*903* (2K, 91K, 100K, 108K,

112K). Тези IS принадлежат към семейството IS5 и са едни от честите причини за мутации в гена *mgr*B. Установени са от *Aires et al.* (2016), заедно с IS*5*, IS*102*, IS*Kpn26*, IS*10L*, като причина за резистентност към colistin, посредством инактивиране на гена *mgr*B при 10 щама *K. pneumoniae* [*Aires et al., 2016*]. *Uz Zaman et al.* (2018) проучват възможните механизми на резистентност към colistin при 23 щама *K. pneumoniae*, изолирани в периода 2011 - 2015г [*Uz Zaman et al., 2018*]. Установяват, че при 18 от изследваните 23 щама причина за резистентността към colistin е мутация в *mgr*B - в 17 от случаите посредством IS (IS*Kpn14*, IS*Kpn28*, IS*903*), а в един случай - от ранен stop codon. IS*903* е била причина и за възникване на резистентност към colistin по време на комбинирана терапия с colistin, meropenem и tigecycline [*Cannatelli et al.*, 2014]. Счита се, че "гореща точка" точка за инсерция на IS*903* е вероятно позиция (+70), тъй като в GenBank са депозирани секвенции от Гърция, Китай, Франция, при които е налице инсерция в тази позиция [*Uz Zaman et al., 2018*].

Инактивиране на гена *mgr*B може да възникне и под влияние на мутации, които водят до появата на stop codon. *Otter et al.* (2017), описват епидемичен взрив от 40 епидемиологично свързани NDM-1 положителни *K. pneumoniae* в две болници в Лондон през 2015г. [*Otter et al.,2017*]. Установяват високо ниво на резистентност към colistin (65.8%, 25/38). WGS показва три потенциални механизма на резистентност към colistin - два от тях се дължат на различни мутации в *mgr*B (ранен stop codon в *mgr*B - MgrB:C16 и MgrB:K3), а в един от случаите - на мутация в *phoQ* (L/Q субституция на аминокиселина в позиция 396 на PhoQ). Впоследсвие два от colistin резистентните варианти (тези, с мутации в гена *mgr*B) се разпространяват клонално в двете болници. Според *Otter et al.* установяването на клонално разпространение на щамове с мутационна (хромозомна) резистентност към colistin показва, че тези механизми на резистентност не трябва да се подценяват и може да представляват по-сериозна заплаха от плазмидно медиираните [*Otter et al.,2017*]. В настоящото проучване установихме инактивиране на гена *mgr*B посредством stop codon при два от colistin-резитсентните щамове *K. pneumoniae* (67K и 69K).

В два от случаите (32K и 94K) гена *mgr*B не беше амплифициран. Това може да се дължи на много големи делеции или инсерции в гена. *Cienfuegos et al.* (2017), при проучване на 32 colistin-резистентни щама *K. pneumoniae* в Колумбия установяват, че при 19 от тях липсва на амплификаця на гена *mgr*B. Посредством WGS при 3 от тях е установена инсерция на 8,1-kb фрагмент в гена *mgr*B, съответсващ на IS*Kpn*25. Инсерцирания регион показва 100% идентичност с няколко плазмида, поради което

Cienfuegos et al. считат, че резистентността към colistin в тези случаи се медиира от хромозомна интеграция на плазмидна ДНК [*Cienfuegos et al., 2017*]. Установена е и клонална експанзия на резистентния щам [*Cienfuegos et al., 2017*].

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

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

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

През 2015г се появява първото в света съобщение за откриване на плазмидно кодиран ген (*mcr-1*) за резистентност към полимиксини при *E. coli* [*Liu et al., 2016*], последвано множество съобщения за разпространението на този механизъм на резистентност и при други представители на сем. *Enterobacteriaceae* в повече от 30 държави в 5 континента [*Schwarz et al., 2016*]. Генът се локализира основно на конюгативни плазмиди от различни репликонни типове, включително IncI2, IncHI1, IncP, IncX4 и IncHI2, които се

пренасят с много висока честота [*Zhi et al., 2016, Schwarz et al., 2016*]. Много от тези плазмиди носят и други гени за резистентност, включително гени за ESBL и карбапенемази [*Schwarz et al., 2016, Poirel et al., 2016*]. През 2016 - 2018г са открити още седем плазмидно кодирани гени за резистентност към полимиксини - *mcr-2* [*Xavier et al.,* 2016], *mcr-3* [*Yin et al., 2017*], *mcr-4* [*Carattoli et al.,* 2017], *mcr-5* [*Borowiak et al., 2017*], *mcr-6* [*AbuOun et al*., 2017], *mcr-7.1* [*Yang et al*., 2018], *mcr-8* [*Wang et al.*, 2018]. Тези гени кодират производството на фосфоетаноламин трансферази, които модифицират LPS с фосфоетатаноламин, в резултат на което се развива резистентност към полимиксини. Счита се, че откриването на плазмидно кодирани гени за резистентност към полимиксини е сигурен белег на резистентност или намалена чувствителност към тези антибиотици. В настоящото проучване при изследване на 33 colistin резистентни щама и на три хетерорезистентни, не бяха установени известните към началото на 2018г пет плазмидно кодирани механизми (*mcr-1, -2, -3, -4, -5*) на резистентност към полимиксини при colistin-резистентните *K. pneumoniae, E. coli* и *P.aerugonosa*.

В заключение, резистентността към colistin на включените в проучването щамове се дължи на хромозомни мутации. В 31% от изследваните *K. pneumoniae* са установени промени в гена *mgrB*, предимно инактивиране от IS*903*, наличие на стоп кодон или вероятна голяма инсерция или делеция на целия локус *mgrB*. Не бяха установени промени в гените *pmr*A, *pho*P, *pho*Q. Установените мутации в гена *pmr*B при 4 от изследваните щамове не водят до развитие на резистентност към colistin. Резистентността при останалите colistin резистентни щамове най-вероятно се дължи на комбинация от механизми на резистентност или мутации в някои от другите хромозомни гени. В настоящото проучване не бяха установени щамове с плазмидно кодираните *mcr-1, -2, -3, -4, -5* гени за резистентност към полимиксини.

VI. ИЗВОДИ

1. Колекционирани са 210 щама, от 5 вида, с множествена антибиотична резистентност, изолирани от хоспитализирани (203) и амбулаторни (7) пациента.

2. Установено беше високо ниво на резистентност към карбапенеми - *K. pneumoniae* (73.6%), *A. baumanni* complex (100%), *P. aeruginosa* (95.2%), *E. coli* (14.6%). Резистентност към colistin чрез референтния метод бе установена при 29 щама *K. pneumoniae* (27,9%), 3 щама *P. aeruginosa* (14,3%) и един щам *E. coli* (2,4%). Нивото на резистеност към colistin бе по-високо при карбапенем-нечувствителните щамове *K. pneumoniae* (32,9%) в сравнение с карбапенем-чувствителните (14,28%).

3. При сравняването на четирите метода за определяне на чувствителността беше установено:

   3.1. MIKROLATEST MIC Colistin (*Erba Lachema*) показа добра корелация с референтния BMD метод (категорийно съответствие в 98.55%), докато методът на разреждане в агар имаше по-слаба корелация и не е подходящ за определяне на чувствителността към colistin в ежедневната диагностична практика.

   3.2. Rapid polymyxin NP, в настоящото проучване, показа специфичност 100% и чувствителност 94% спрямо референтния метод, но тестът беше фалшиво негативен при част от хетерорезистентните изолати с ниски МПК. Препоръчително е отрицателния резултат да бъде потвърден с BMD (самостоятелно или в комбинация с други методи).

   3.3. Тестът с пре-дифузия на ROSCO Diagnostica A/S имаше категорийно съвпадение с референтния метод в 95,17%, като той открива по-добре част от хетерорезистентните на colistin щамове, определени чрез BMD като чувствителни.

   3.4. Средата Superpolymyxin medium показа много добри резултати при използването ù като скрийн агар. С нея бяха открити допълнително 18 хетерорезистентни щама *K. pneumoniae*. В резултат на комбинираното използване на двата метода (BMD и Superpolymyxin medium като скрийн агар), резистентността към колистин се увеличи до 43,9% при изолатите *K. pneumonae*.

4. Мутант-превантивните концентрации на colistin за всички включени в проучването видове значително надвишаваха МПК, установени чрез BMD, като особено високи са по отношение на *K. pneumoniae* - MPC_{50} е 128 mg/l, а MPC_{90} >128 mg/l, което крие висок риск от селекциониране на полимиксин-резистентни мутанти при монотерапия с colistin. Комбинирано приложение на colistin и rifampicin води до намаляване на мутант-превантивната концентрация на colistin, за разлика от комбинацията с meropenem.

5. Скрининг-тестът за синергизъм с colistin показа съвпадение на резултатите с модифицирания метод на шахматната дъска (в 80% за комбинациите colistin-rifamicin и colisin-meropenem, и в 84% за colistin-gentamicin) и дава възможност за бързо изследване на ефекта на голям брой антибиотични комбинации. Установена беше по-висока честота на синергизъм на комбинациите с colistin при colistin-резистентни щамове в сравнение с colistin-чувствителни.

6. Беше установено, че комбинациите на colistin основно с rifampicin – в 36%, но също така и с azithromycin, meropenem, doxycycline или gentamicin могат да имат синергичен ефект и евентуално да бъдат използвани за лечение на инфекции, причинени от карбапенем- и colistin - резистентни изолати *K. pneumoniae* .

7. Резистентността към карбапенеми на включените в проучването представители на сем. *Enterobacteriaceae* бе най-висока при *K. pneumoniae* (73.8% (79/107)). Дължи основно на широко разпространение на NDM-1 (79,7% (63/79)). В единични случаи са установени OXA-48 и KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae*. Карбапенем-резистентните изолати *E. coli* са 14,6% (6/41). Резистентността се дължи на производство на NDM-1 и KPC-2 ензими. При един щам *E. cloacae* complex е доказано на носителство на $bla_{\text{OXA-48}}$.

8. Проведеното епидемиологично типизиране установи широкото разпространение на един клон *K. pneumoniae* – в 80% (86/ 107 изолата), като 85% (73/86) от изолатите са карбапенем резистентни. Два изолата от този клон принадлежаха на ST11 типа. Той произвеждаше предимно NDM-1 72% (62/86) и KPC-2 (5/86). Тридесет и девет щама, 45.3% от този клон са резистентни или хетерорезистентни на colistin. Единични colistin-резистентни изолати принадлежат на други три клона.

Проведеното епидемиологично типизиране при *E. coli* показа доминиране на един широко разпространен клон. В началото на 2018г в този клон се появява и $bla_{\text{NDM-1}}$.

9. Резистентността към colistin на проучените щамове се дължеше основно на хромозомни мутации. В 31% (9 от 29 изолата *K pneumoniae* с високо ниво на резистентност) бяха установени промени в гена *mgrB*, предимно инактивиране от IS*903*, наличие на stop codon или вероятна инсерция или делеция на целия локус. Не бяха установени промени в гените *pmr*A, *pmr*B (с изключение на 4 изолата), *pho*P, *pho*Q. Установената замяна R256G при четири изолата не се асоцииираше с резистентност към колистин. В настоящото проучване не бяха установени щамове с плазмидно кодираните *mcr* гени за резистентност към полимиксини.

VII. Справка за приносите на дисертационния труд

Приноси с оригинален характер

1. Бяха проучени 210 Грам-отрицателни бактерии с множествена антибиотична резистентност, като бяха установени високи нива на резистентност към карбапенеми и колистин, особено при изолатите *K pneumoniae*.

2. Проучен беше механизма на резистентност към colistin на колистин резистентни изолати *K. pneumoniae,* като за първи път в България се доказват изолати с промени в *mgrB* гена като основен механизъм на колистинова резистентност.

3. Установена беше, по-висока честота на синергизъм на комбинациите с colistin при colistin-резистентни щамове в сравнение с colistin-чувствителни.

4. Проведеното епидемиологично типизиране установи широкото разпространение на един клон *K. pneumoniae* – в 80%, като 85% от представителите са карбапенем резистентни. Два изолата от този клон принадлежаха на ST11 типа. Той произвеждаше предимно NDM-1 – в 72% и KPC-2 – в 5.8%. Тридесет и девет щама, 45.3% от този клон са резистентни или хетерорезистентни на colistin.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдени бяха установените от други автори високи MPC на colistin за *A. baumannii, P. aeruginosa, K. pneumoniae*.
2. Потвърдено беше намаляването на MPC в присъствие на rifampicin при *K. pneumoniae*.
3. Потвърден беше възможния синергизъм на комбинациите на colistin с rifampicin, azithromycin, doxycycline, meropenem.
4. Бяха оценени четири метода за определяне на чувствителност към colistin.
   4.1 MIKROLATEST MIC Colistin (*Erba Lachema*) имаше добра корелация с референтния BMD метод.
   4.2 Rapid polymyxin NP показа специфичност 100% и чувствителност 94% спрямо референтния метод, но тестът бе фалшиво негативен при част от хетерорезистентните изолати с ниски МПК.

4.3 Тестът с пре-дифузия на ROSCO Diagnostica A/S показа категорийно съвпадение с референтния метод в 95,17%, като открива по-добре част от хетерорезистентните на colistin щамове, определени чрез BMD като чувствителни.

4.4 Средата Superpolymyxin medium показа много добри резултати при използването ù като скрийн агар. С нея бяха открити допълнително 18 хетерорезистентни щама *K. pneumoniae*.

Приноси с научно-приложен характер

1. Апробирано беше използването на Superpolymyxin medium като Screen agar colistin в допълнение към BMD, с цел подобряване на откриването на хетерорезистентните на colistin щамове.

2. За първи път в България беше разработен е протокол за определяне на мутант превантивна концентрация.

3. Разработен беше протокол за Time kill assay.

4. Внедрен беше модифицирания метод на шахматната дъска на El-Azizi за определяне на ефекта от комбинираното действие на двойни и тройни антибиотични комбинации.

5. Апробиран беше скрининг тест за възможен синергизъм на отделни антимикробни средства с colistin.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. **Стратева Т**, Т Соева, Е Савов, Ю Мартева-Проевска, А Трифонова, А Стратев, Ц Велинов, И Митов, Карбапенем-нечувствителни нозокомиални изолати *A.baumanii* с множествена лекарствена резистентност (2014 - 2016): надзор на антимикробната устойчивост и препоръки за лечение, Медицински преглед 2017, 53 (6): 27-36
2. Кратка характеристика на продукта „Колистин алвоген". Приложение 1 към Рег. № 20170269. Изпълнителна агенция по лекарствата. Република България.
3. **Abdellatif S**, A Trifi, F Daly, K Mahjoub, R Nasri, S Ben Lakhal. Efficacy and toxicity of aerosolised colistin in ventilator-associated pneumonia: a prospective, randomised trial. Ann Intensive Care. 2016 Dec, 6 (1), p.26.
4. **AbuOun M**, EJ Stubberfield, NA Duggett, M Kirchner, L Dormer, J Nunez-Garcia, LP Randall, F Lemma, DW Crook, C Teale, RP Smith, MF Anjum; mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in Moraxella species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015, J Antimicrob Chemother, 2017 Oct, 72 (10), pp. 2745–2749.
5. **Aires CAM**, PS Pereira, MD Asensi, APD Carvalho-Assef. mgrB mutations mediating polymyxin B resistance in Klebsiella pneumoniae isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. Antimicrob Agents Chemother, 2016 Oct, 60 (11), pp. 6969 – 6972.
6. **Anjum MF**, NA Duggett, M AbuOun et al. Colistin resistance in Salmonella and Escherichia coli isolates from a pig farm in Great Britain. J Antimicrob Chemother. 2016 Aug, 71 (8), pp. 2306–13.
7. **Arcilla MS**, JM van Hattem, S Matamoros et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. 2016 Feb, 16 (2), pp. 147–49.
8. **Balaji V**, SS Jeremiah, PR Baliga. Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. Indian J Med Microbiol. 2011 Jul-Sep, 29 (3), pp.230-42.
9. **Ballmann M**, A Smyth, DE Geller. Therapeutic approaches to chronic cystic fibrosis respiratory infections with available, emerging aerosolized antibiotics. Respir Med. 2011, 105 S2, S2–S8
10. **Band VI**, EK Crispell, BA Napier et al. Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*. Nat Microbiol. 2016 May, 1(6):16053.
11. **Band VI,** SW Satola, EM Burd, MM Farley, JT Jacob, DS Weiss. Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibiting clinically undetected colistin heteroresistance leads to treatment failure in a murine model of infection. MBio. 2018 Mar, 9(2), pii: e02448-17.
12. **Bathoorn E**, C Tsioutis, JM da Silva Voorham, EV Scoulica, E Ioannidou, K Zhou, JW Rossen, A Gikas, AW Friedrich, H Grundmann. Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Crete, Greece: a close call. J Antimicrob Chemother, 2016 May, 71 (5), pp. 1207–1212.
13. **Barin J**, AF Martins, BL Heineck, AL Barth, AP Zavascki. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013 Jul, 12:15
14. **Barrow K, DH Kwon**. Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Dec, 53 (12), pp. 5150–5154.
15. **Becton D. BBL Sensi-Disc antimicrobial susceptibility discs package insert**. L Franklin , NJ: BD (Becton, Dickinson and Company); 2010.

16. **Behera B**, P Mathur P, A Das, A Kapil, B Gupta , S Bhoi, K Farooque,V Sharma, MC Misra. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. Int J Infect Dis 2010 Jul, 14 (7):e596–e601.
17. **Bergen PJ**, J Li, C Rayner, R Nation. Colistin Methanesulfonate Is an Inactive Prodrug of Colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents chemother 2006 Jun, 50 (6), pp. 1953–1958.
18. **Bergen PJ**, L Jian, LN Roger, DT John, C Kingsley, WR Milne. Comparison of once, twice- and thrice-daily dosing of colistin on antibacterial effect and emergence of resistance: studies with *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. J Antimicrob Chemother. 2008, 61, pp. 636–642.
19. **Bergen PJ**, JB Bulitta, A Forrest, BT Tsuji, J Li, RL Nation. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Investigation of Colistin against *Pseudomonas aeruginosa* Using an *In Vitro* Model. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Sep, 54(9), pp.3783-3789.
20. **Bergen PJ**, A Forrest, JB Bulitta et al. Clinically Relevant Plasma Concentrations of Colistin in Combination with Imipenem Enhance Pharmacodynamic Activity against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Multiple Inocula. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Nov, 55 (11), pp.5134-5142.
21. **Bergen PJ**, CB Landersdorfer, Z Jing, Z Miao, JL Hee. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Nov, 74(3),pp. 213–223.
22. **Blondeau JM**. New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. Vet Dermatol. 2009 Oct, 20 (5-6), pp 383 – 396.
23. **Boisson M**, M Jacobs, N Grégoire et al. Comparison of Intrapulmonary and Systemic Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate (CMS) and Colistin after Aerosol Delivery and Intravenous Administration of CMS in Critically Ill Patients. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Dec, 58 (12), pp.7331-7339.
24. **Bontron S**, P Laurent, N Patrice. Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (mcr-1) from cultured bacteria and stools, J Antimicrob Chemother, 2016 Aug, 71 (8),pp. 2318–2320.
25. **Borowiak M**, F Jennie, AH Jens, SH Rene, S Istvan, M Burkhard. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother, 2017 Dec, 72, (12), pp 3317–3324.
26. **Boyen F**, F Vangroenweghe, P Butaye, GE De, F Castryck, P Heylen *et al*. Disc prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. Vet Microbiol 2010 Aug, 144 (3-4), pp. 359-62.
27. **Bratu S**, P Tolaney,U Karumudi, J Quale, M Mooty, S Nichani, D Landman. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. J Antimicrob Chemother. 2005 Jul, 56 (1), pp.128–132.
28. **Bulman ZP**, L Chen, TJ Walsh et al. Polymyxin Combinations Combat *Escherichia coli* Harboring mcr-1 and blaNDM-5: Preparation for a Postantibiotic Era. Wright GD, ed. MBio. 2017 Jul, 8(4):e00540-17.
29. **Cai Y**, R Li, B Liang, N Bai,Y Liu, R Wang. *In Vitro* Antimicrobial Activity and Mutant Prevention Concentration of Colistin against *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Sep, 54(9), pp. 3998-3999.

30. **Cajal Y**, J Rogers, OG Berg, MK Jain. Intermembrane Molecular Contacts by Polymyxin B Mediate Exchange of Phospholipids. Biochemistry. 1996 Jan, 35 (1), pp. 299-308.
31. **Campos MA**, MA Vargas,V Regueiro, CM Llompart, S Albertí, JA Bengoechea. Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. Infect Immun. 2004 Dec, 72 (12), pp. 7107-7114.
32. **Canton R and MI Morosini**. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. FEMS Microbiol Rev 2011 Sep, 35 (5), pp. 977 – 991.
33. **Cannatelli A**, MM D'Andrea, T Giani et al. *In Vivo* Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* Regulator. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Nov, 57 (11), pp.5521-5526.
34. **Cannatelli A**, T Giani, MM D'Andrea et al. MgrB Inactivation Is a Common Mechanism of Colistin Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin. Antimicrob Agents Chemother, 2014 Oct, 58 (10), pp. 5696-5703.
35. **Capone A**, M Giannella, D Fortini, A Giordano, M Meledandri, M Ballardini, M Venditti, E Bordi, D Capozzi. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect 2013 Jan, 19 (1), pp. E23–E30.
36. **Carattoli A**, L Villa, C Feudi et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4 g*ene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill. 2017 Aug, 22 (31), pii:30589.
37. **Chen DH and EA Groisman**. The Biology of the PmrA/PmrB Two-Component System: The Major Regulator of Lipopolysaccharide Modifications. Ann Rev Microbiol 2013, 67 (1), pp. 83-112.
38. **Cheng YH**,TL Lin, YT Lin, JT Wang. Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2016 May, 60 (6), pp.3709-3716.
39. **Chew KL**, M-V La, RTP Lin, JWP Teo. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive *Enterobacteriaceae*: comparison of Sensititre, Micro Scan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. J Clin Microbiol 2017, 55, pp 609–2616.
40. **Choi SK**, SY Park, R Kim et al. Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of Paenibacillus polymyxa and heterologous expression of the gene in bacillus subtilis. J Bacteriol 2009 May, 191 (10), pp. 3350-3358.
41. Choi HK, YK Kim, HY Kim, Y Uh. Inhaled Colistin for Treatment of Pneumonia due to Colistin-Only-Susceptible *Acinetobacter baumannii*. Yonsei Med J. 2014 Jan, 55 (1), pp.118-125.
42. **Choi MJ and KS Ko**. Mutant prevention concentrations of colistin for *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2014 Jan, 69 (1), pp.275-7.
43. **Cienfuegos-Gallet AV**, L Chen, BN Kreiswirth, JN Jiménez. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* mediated by chromosomal integration of plasmid DNA. Antimicrob Agents Chemother, 2017 Jul, (61), pii :e00404-1.
44. **Clausell A**, M Garcia-Subirats, M Pujol, MA Busquets, F Rabanal, Y Cajal. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. J Physic Chem B 2007, 111 (3), pp. 551–563.
45. **CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016**. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. EUCAST

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MI_determination_of_colistin_March_2016.pdf. Accessed 4 July 2017.
46. **Coornaert A**, A Lu, P Mandin, M Springer, S Gottesman, M Guillier. MicA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress. Mol Microbiol. 2010 Apr, 76 (2), pp. 467–479.
47. **De Majumdar S**, J Yu, M Fookes, SP McAteer, E Llobet, S Finn et al. Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. PLoS Pathog. 2015 Jan, 11(1): e100462.
48. **Deris ZZ**, J Akter, S Sivanesan et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. J antibiot (Tokyo). 2014 Feb, 67(2), pp.147-151.
49. **Dhanani J**, JF Fraser, H-K Chan, J Rello, J Cohen, JA Roberts. Fundamentals of aerosol therapy in critical care. Critic Care. 2016 Oct, 20 (1), p. 269.
50. **Diep JK**, DM Jacobs, R Sharma et al. Polymyxin B in Combination with Rifampin and Meropenem against Polymyxin B-Resistant KPC-Producing Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Jan, 61(2): e02121-16.
51. **Dobrewski R**, E Savov, AT Bernards, M van den Barselaar, P Nordmann, PJ van den Broek, L Dijkshoorn. Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates in a Bulgarian hospital. Clin Microbiol Infect. 2006 Aug, 12 (11), pp. 1135–1137.
52. **Doern CD**. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing, J Clin Microbiol. 2014 Dec; 52 (12), pp.4124-4128.
53. **Dong Y**, X Zhao, J Domagala, K Drlica. Effect of Fluoroquinolone Concentration on Selection of Resistant Mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jul, 43(7), pp.1756-1758.
54. **Doumith M**, G Godbole, P Ashton et al. Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. J Antimicrob Chemother. 2016 Aug, 71 (8), pp. 2300–5.
55. **Drlica K, X Zhao**. Mutant Selection Window Hypothesis Updated. Clin Infect Dis. 2007 Mar, 44 (5), pp. 681–688.
56. **Du H**, L Chen, YW Tang et al. Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Lancet Infect Dis. 2016 Mar, 16 (3), pp. 287–8.
57. **Durante-Mangoni E**, M Del Franco, R Andini, M Bernardo, M Giannouli, R Zarrilli. Emergence of colistin resistance without loss of fitness and virulence after prolonged colistin administration in a patient with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015 Jul, 82 (3), pp. 222–226.
58. **El-Azizi M**. Novel Microdilution method to assess double and triple antibiotic combination therapy in vitro. International Journal of Microbiology. 2016 Mar; vol. 2016, Article ID 4612021, 10 pages
59. **Elemam A**, J Rahimian, M Doymaz. *In Vitro* Evaluation of Antibiotic Synergy for Polymyxin B-Resistant Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2010 Oct, 48 (10), pp.3558-3562.
60. **El-Halfawy OM, MA Valvano**. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. Clin Microbiol Rev 2015, 28 (1), pp.191–207.
61. **European Centre for Disease Prevention and Control**. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).Stockholm: ECDC; 2017

62. **The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017; http://www.eucast.org.
63. **CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group**. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. EUCAST
64. **The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1, 2018; http://www.eucast.org.
65. **EUCAST Definitive document E.Def.3.1** (2000) Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution
66. **Falagas ME,** SK Kasiakou, LD Saravolatz. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. Clin Infect Dis 2005 May, 40 (9), pp. 1333-1341.
67. **Falagas ME**, SK Kasiakou. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Crit Care. 2006 Feb, 10 (1), R27.
68. **Falgenhauer L**, SE Waezsada,Y Yao et al. Colistin resistance gene mcr-1 in extendedspectrum β-lactamase producing and carbapenemase producing Gram-negative bacteria in Germany, The Lancet Infect Dis. 2016 Mar, 16 (3), pp. 282-3.
69. **Fehlner-Gardiner CC,** MA Valvano. Cloning and characterization of the *Burkholderia vietnamiensis norM* gene encoding a multidrug efflux protein. FEMS Microbiol Lett. 2002 Oct, 215 (2), pp. 279–283.
70. **Fernández L**, WJ Gooderham, M Bains, JB McPhee, I Wiegand, Hancock REW. Adaptive Resistance to the "Last Hope" Antibiotics Polymyxin B and Colistin in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by the Novel Two-Component Regulatory System ParR-ParS. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Aug, 54(8), pp. 3372-3382.
71. **Fernandez L**, H Jenssen, M Bains, I Wiegand, WJ Gooderham, RE Hancock. The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. Antimicrob. Agents Chemother. 2012 Dec, 56 (12), pp. 6212–6222.
72. **Florescu DF**, F Qiu, MA McCartan, C Mindru, PD Fey, AC Kalil. What is the efficacy and safety of colistin for the treatment of ventilator-associated pneumonia? A systematic review and meta-regression. Clin Infect Dis. 2012 Mar, 54 (5), pp. 670-680.
73. **Gaibani P**, D Lombardo, RE Lewis, M Mercuri, S Bonora, MP Landini, S Ambretti. In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates, J Antimicrob Chemother. 2014 Jul, 69 (7), pp. 1856-1865.
74. **Gales AC**, AO Reis, RN Jones. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. J Clin Microbiol. 2001 Jan, 39 (1), pp. 183–190.
75. **Gales AC**, RN Jones, HS Sader. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 – 09). J Antimicrob Chemother. 2011 Sep, 66 (9), pp. 2070 –2074.
76. **Garonzik SM**, J Li, V Thamlikitkul et al. Population Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate and Formed Colistin in Critically Ill Patients from a Multicenter Study Provide Dosing Suggestions for Various Categories of Patients. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jul, 55(7), pp.3284-3294.

77. **Giani T**, F Arena, G Vaggelli et al. Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant. Carroll KC, ed. J Clin Microbiol. 2015 Oct, 53(10), pp. 3341-3344.
78. **Gilleland HE Jr**, LB Farley. Adaptive resistance to polymyxin in *Pseudomonas aeruginosa* due to an outer membrane impermeability mechanism.Can J Microbiol. 1982 Jul; 28(7), pp. 830-40
79. **Girardello R**, PJM Bispo, TM Yamanaka, AC Gales. Cation Concentration Variability of Four Distinct Mueller-Hinton Agar Brands Influences Polymyxin B Susceptibility Results. J Clin Microbiol. 2012 Jul, 50(7), pp. 2414-2418.
80. **Gordon NC**, K Png, DW Wareham. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Dec, 54 (12), pp. 5316-22.
81. **Gough M**, RE Hancock, NM Kelly. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. Infect Immun. 1996 Dec, 64(12), pp.4922-4927.
82. **Gu WJ**, F Wang, L Tang, J Bakker, JC Liu. Colistin for the treatment of ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: A systematic review and meta-analysis, Int J Antimicrob Agents. 2014 Dec, 44 (6), pp. 477 – 485.
83. **Guérin F**, C Isnard, C Sinel, P Morand, A Dhalluin, V Cattoir, JC Giard. Cluster-dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae complex*. J Antimicrob Chemother. 2016 Nov, 71 (11), pp. 3058–3061.
84. **Gutu AD**, N Sgambati, P Strasbourger, MK Brannon, MA Jacobs, E Haugen et al. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. Antimicrob Agents Chemother. 2013 May, 57 (5), pp. 2204–2215.
85. **Haeili M**, A Javani, J Moradi, Z Jafari, MM Feizabadi, E Babaei. MgrB Alterations Mediate Colistin Resistance in Klebsiella pneumoniae Isolates from Iran. Front Microbiol. 2017 Dec, 8, Article 2470.
86. **Haenni M**, V Métayer, E Gay, J-Y Madec. Increasing Trends in *mcr-1*Prevalence among Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Escherichia coli Isolates from French Calves despite Decreasing Exposure to Colistin. Antimicrol Agents Chemother. 2016 Oct, 60 (10), pp. 6433-6434.
87. **Halaby T**, N al Naiemi, J Kluytmans, J van der Palen, CMJE Vandenbroucke-Grauls. Emergence of Colistin Resistance in Enterobacteriaceae after the Introduction of Selective Digestive Tract Decontamination in an Intensive Care Unit. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Jul; 57(7), pp. 3224-3229.
88. **Halaby T**, E Kucukkose, AB Janssen et al. Genomic characterization of colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a nosocomial outbreak. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Nov, 60 (11), pp. 6837– 6843.
89. **Hancock REW and DS Chapple**. Peptide Antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jun, pp. 1317–1323
90. **Hankins JV**, JA Madsen, DK. Giles, JS. Brodbelt, MS Trent. Amino acid addition to *Vibrio cholerae* LPS establishes a link between surface remodeling in Gram-positive and Gram-negative bacteria Proc Natl Acad Sci U.S.A 2012 May 109 (22), pp. 8722-8727.
91. **Hartzell JD**, R Neff, J Ake, R Howard, S Olson, K Paolino, M Vishnepolsky, A Weintrob, G Wortmann. Nephrotoxicity Associated with Intravenous Colistin

(Colistimethate Sodium) Treatment at a Tertiary Care Medical Center, Clin Infect Dis. 2009 Jun, 48 (12), pp.1724–1728.
92. **Henry R**, N Vithanage, P Harrison et al. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids and poly-β-1,6-*N*-acetylglucosamine. Antimicrob. Agents Chemother. 2012 Jan, 56 (1), pp.59–69.
93. **Herrera ME**, LN Mobilia, R Graciela, R Posse. Comparative evaluation of the sensitivity of Acinetobacter to colistin, using the prediffusion and MIC methods. Detection of heteroresistant isolates. Rev Argent Microbiol. 2011, 43, pp. 115-119.
94. **Hindler JA**, RM Humphries. Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. J Clin Microbiol. 2013 Jun, 51(6) pp.1678-1684.
95. **Hu Y**, F Liu, IYC Lin, GF Gao, B Zhu. Dissemination of the mcr-1 colistin resistancegene. Lancet Infect Dis 2016; 16, pp. 146–47.
96. **Humphries RM**. Susceptibility Testing of the Polymyxins: Where Are We Now?. Pharmacotherapy. 2015 Jan, 35 (1), pp. 22–27.
97. **International Standards Organisation**. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1:Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. 2006.ISO 20776-1.
98. **International Standards Organisation**. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 2: Evaluation of antimicrobial susceptibility test devices. 2007. ISO 20776-2.
99. **Insert for Kit** for detection of colistin resistance in Enterobacteriaceae, P. aeruginosa and Acinetobacter (98018), ROSCO Diagnostica A/S, Revision DBV0038E/27-02-2016
100. **Instruction manual for MIKROLATEST MIC Colistin** (cat. №: MLT00057), Erba Lachema s.r.o., Karásek 2219/1d, 621 00 Brno, CZ
101. **Jacobs M**, N Grégoire, B Mégarbane et al. Population Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate and Colistin in Critically Ill Patients with Acute Renal Failure Requiring Intermittent Hemodialysis. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Jan, 60 (3), pp. 1788-1793.
102. **Jayol A,** P Nordmann, A Brink, L Poirel. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. J Antimicrob Agents Chemother**.** 2015 May, 59 (5), pp.2780 –2784.
103. **Jayol A**, V Dubois. L Poirel, P Nordmann. Rapid detection of polymyxin-resistant Enterobacteriaceae from blood cultures. J Clin Microbiol. 2016 Sep, 54 (9), pp.2273–2277.
104. **Jayol A**, P Nordmann, P Lehours, L Poirel, V Dubois. Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally-encoded colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect. 2018 Feb, 24 (2), pp.175-179.
105. **Jayol A**, N Patrice, A Catherine, P Laurent, D Véronique. Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram-negative bacilli, J Antimicrob Chemother. 2018 May, 73 (5), pp. 1272–1278.
106. **Johnson AP, N Woodford**. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-blactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. J Med Microbiol. 2013 Apr, 62 (Pt4), pp. 499–513.

107. **Jorgensen JH**, MJ FerraroL. B Reller, M Weinstein. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Clin Infect Dis. 2009 Dec, 49 (11), pp. 1749–1755.
108. **Katragkou A**, E Roilides. Successful Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Central Nervous System Infections with Colistin. J Clin Microbiol. 2005 Sep, 43(9), pp.4916-4917.
109. **Khawcharoenporn T**, A Apisamthanarak, LM Mundy. Intrathecal colistin for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infection: a case series and systematic review. Clin Microbiol Infect. 2010 Jul, 16 (7), pp. 888 – 894.
110. **Kidd TJ**, G Mills, J Sá-Pessoa et al. A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence. EMBO Mol Med, 2017 Apr, 9(4), pp.430-447.
111. **Kim YK**, JH Lee, H-K Lee et al. Efficacy of nebulized colistin-based therapy without concurrent intravenous colistin for ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Thorac Dis. 2017 Mar, 9 (3), pp.555-567.
112. **Kollef MH**, CW Hamilton, AB Montgomery. Aerosolized antibiotics: do they add to the treatment of pneumonia? Curr Opin Infect Dis. 2013 Dec, 26 (6), pp.538-544.
113. **Kollef MH**. Counterpoint: Should Inhaled Antibiotic Therapy Be Used Routinely for the Treatment of Bacterial Lower Respiratory Tract Infections in the ICU Setting? No. Chest 2017 Apr, 151 (4), pp.740 - 743.
114. **Kostyanev T**, T Strateva, BB Xavier, Y Marteva-Proevska, C Lammens, B Markova, H Goossens, S Malhotra-Kumar. Detection and characterization of two NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from Bulgaria. J Antimicrob Chemother. 2016 May, 71 (5), pp.1428–1430.
115. **Kwa AL**, VH Tam, ME Falagas. Polymyxins: A review of the current status including recent developments. Ann Acad Med Singapore 2008 Oct, 37 (10), pp. 870-83.
116. **Lagerbäck P**, WWT Khine, CG Giske, T Tängdén. Evaluation of antibacterial activities of colistin, rifampicin and meropenem combinations against NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in 24 h in vitro time–kill experiments, J Antimicrob Chemother. 2016 Aug, 71 (8),pp.2321–2325.
117. **Landersdorfer CB, RL Nation**. Colistin: how should it be dosed for the critically ill? Semin Respir Crit Care Med. 2015 Feb, 36 (1), pp.126 –135.
118. **Landman D**, C Georgescu, DA Martin, J Quale. Polymyxins Revisited. Clin Microbiol Rev. 2008 Jul, 21 (3), p. 449–465
119. **Landman D**, J Salamera, J Quale. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. J Clin Microbiol. 2013 Dec, 51 (12), pp.4106 – 4111.
120. **Lauretti L**, ML Riccio, A Mazzariol et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-betalactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999 Jul, 43 (7), pp.1584-1590.
121. **Lescat M**, L Poirel, P Nordmann. Rapid multiplex PCR for detection of mcr-1 to −5 genes. Dmb(2018), doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.010
122. **Li J**, J Turnidge, R Milne, RL Nation , K Coulthard. In Vitro Pharmacodynamic Properties of Colistin and Colistin Methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Mar, 45(3), pp.781-785.

123. **Li J**, RW Milne, RL Nation, JD Turnidge, K Coulthard. Stability of Colistin and Colistin Methanesulfonate in Aqueous Media and Plasma as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Apr, 47(4), pp.1364-1370.
124. **Li J**, CR Rayner, RL Nation et al. Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate and Colistin in a Critically Ill Patient Receiving Continuous Venovenous Hemodiafiltration. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Nov, 49 (11), pp. 4814-4815.
125. **Li J**, RL Nation, JD Tumidge et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections.Lancet Infect Dis. 2006 Sep, 6 (9), pp. 589 – 601.
126. **Li J**, CR Rayner, RL Nation, RJ Owen, D Spelman, KE Tan et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 2006 Sep, 50 (9), pp.2946-50.
127. **Li J**, RL Nation, RJ Owen, S Wong, D Spelman, C Franklin C. Antibiograms of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistinresistant strains. Clin. Infect. Dis. 2007 Sep, 45 (5), pp.594 –598.
128. **Li A**, Y Yang, M Miao et al. Complete sequences of mcr-1-harboring plasmids from extended spectrum β-lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE). Antimicrob Agents Chemother. 2016 Jun, 60 (7), pp. 4351-4.
129. **Lim TP**, TY Tan, W Lee, S Sasikala, TT Tan, LY Hsu *et al*. *In-vitro* activity of polymyxin B, rifampicin, tigecycline alone and in combination against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Singapore. PLoS One 2011 Apr, 6:e18485
130. **Lin L**, P Nonejuie, J Munguia, A Hollands, J Olson, Q Dam et al. Azithromycin Synergizes with Cationic Antimicrobial Peptides to Exert Bactericidal and Therapeutic Activity Against HighlyMultidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Pathogens, *EBioMedicine.* 2015 Jun; 2 (7): 690-698.
131. **Lippa AM, M Goulian**. Feedback Inhibition in the PhoQ/PhoP Signaling System by a Membrane Peptide. PLoS Genet. 2009 Dec, 5(12): e1000788.
132. **Liu YY**, Y Wang, TR Walsh, L-X Yi, R Zhang, J Spencer, Y Doi et al. 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 Feb, 16 (2), pp. 161-168.
133. **Liu D**, J Zhang, HX Liu, YG Zhu, JM Qu. Intravenous combined with aerosolised polymyxin versus intravenous polymyxin alone in the treatment of pneumonia caused by multidrug-resistant pathogens: a systematic review and meta-analysis. Int J Antimicrob Agents. 2015 Dec, 46 (6), pp. 603-9.
134. **Livermore DM**. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. Korean J Intern Med. 2012 Jun, 27(2), pp.128-142.
135. **Llobet E**, JM Tomas, JA Bengoechea. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. Microbiology. 2008 Dec, 154 (12), pp.3877–3886.
136. **Llobet E**, C March, P Giménez, JA Bengoechea. *Klebsiella pneumoniae* OmpA Confers Resistance to Antimicrobial Peptides. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jan, 53(1), pp.298-302.
137. **Lo-Ten-Foe JR**, AM de Smet, BM Diederen, JA Kluytmans, PH van Keulen. 2007. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical

isolates, including heteroresistant Enterobacter cloacae and Acinetobacter baumannii strains. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Oct, 51 (10), pp. 3726 –3730.

138. **Lu Q,** R Luo, L Bodin et al. Efficacy of High-dose Nebulized Colistin in Ventilator associated Pneumonia Caused by Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii, Anesthesiology. 2012 Dec, 117 (6), pp. 1335-1347.

139. **Macfarlane EL**, A Kwasnicka, MM Ochs, RE Hancock. PhoP–PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. Mol Microbiol. 1999 Oct, 34 (2), pp.305–316.

140. **Magiorakos, A-P** et al.Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012 Mar, 18 (3), pp. 268 – 281.

141. **Malhotra-Kumar S**, BB Xavier, AJ Das, C Lammens, HT Hoang, NT Pham, H Goossens. Colistin-resistant Escherichia coli harbouring mcr-1 isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. Lancet Infect Dis 2016 Mar, 16 (3), pp.286–287.

142. **Malott RJ**, BR Steen-Kinnaird , TD Lee, DP Speert . Identification of Hopanoid Biosynthesis Genes Involved in Polymyxin Resistance in Burkholderia multivorans. Antimicrol Agents Chemother. 2012 Jan, 56 (1), pp.464-471.

143. **Marchaim D**, T Chopra, JM Pogue et al. Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Feb, 55 (2), pp. 593-599.

144. **Markantonis SL**, N Markou, M Fousteri et al. Penetration of Colistin into Cerebrospinal Fluid. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Nov, 53 (11), pp.4907–4910.

145. **Markovska R**, I Schneider, T Stoeva, K Bojkova, L Boyanova, A Bauernfeind, I Mitov. First identification of KPC-2 and VIM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2013, 77, pp. 252–253.

146. **Markovska R**,T Stoeva, I Schneider, L Boyanova, V Popova, D Dacheva, R Kaneva, A Bauernfeind, V Mitev, I Mitov. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2 producing Klebsiella pneumoniae in Bulgaria. APMIS 2015 Oct; 123 (10), pp. 887–894.

147. **Martinez-Nunez MA and VE Lopez**. Nonribosomal peptides synthetases and their application in industry. Sustain Chem Process 2016 Aug, 4:13

148. **Matsushita K**, T Ohnishi, HR Kaback. NADH-Ubiquinone oxidoreductases of the Escherichia coli Aerobic Respiratory Chain. Biochemistry 1987, 26(24), pp. 7732-7737.

149. **Matuschek E**, J Ahman, C Webster, G Kahlmeter. Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Clin Microbiol Infect. 2018 Aug, 24 (8), pp.865 - 870.

150. **Matzneller P**, S Strommer, Z Osterreicher, D Mitteregger, M Zeitlinger. Target site antimicrobial activity of colistin might be misestimated if tested in conventional growth media. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015, 34, pp.1989 –1994.

151. **Meletis G**, E Tzampaz, E Sianou, I Tzavaras, D Sofianou. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2011; 66 (4):946–947. Advance access 25 Jan 2011
152. Meletis G, E Oustas, M Bagkeri . Carbapenemase reports from the Balkans: a systematic review. Infez Med 2014; 2, pp. 85–106.
153. **Mezzatesta ML**, F Gona, C Caio, V Petrolito, D Sciortino, A Sciacca, C Santangelo, S Stefani 2011. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, Klebsiella pneumoniae infections in two Sicilian hospitals. Clin Microbiol Infect. 2011 Sep, 17 (9), pp.1444 –1447.
154. **Michalopoulos AS, ME Falagas**. Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. Ann Intensive Care. 2011 Aug,1 (1), p. 30.
155. **Mitrophanov AY**, MW Jewett, TJ Hadley, EA Groisman. Evolution and Dynamics of Regulatory Architectures Controlling Polymyxin B Resistance in Enteric Bacteria. Guttman DS, ed. PLoS Genetics. 2008 Oct, 4(10):e1000233.
156. **Moffatt JH**, M Harper, P Harrison, JD Hale, E Vinogradov, T Seemann et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrob. Agents Chemother. 2010 Dec, 54 (12), pp. 4971–4977.
157. **Moffatt JH**, M Harper , B Adler, RL Nation, J Li, JD Boyce. Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 2011 Jun, 55 (6), pp. 3022–3024.
158. **Monaco M**, T Giani, M Raffone, F Arena,A Garcia-Fernandez, S Pollini, Network EuSCAPE-Italy, H Grundmann , A Pantosti, GM Rossolini. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. Euro Surveill 2014 Oct, 19(42):pii=20939
159. **Moon K, S Gottesman**. A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. Mol Microbiol. 2009 Dec, 74 (6), pp. 1314–1330.
160. **Mulvey MR**, LF Mataseje, J Robertson, JHE Nash, P Boerlin, B Toye, R Irwin, RG Melano. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. 2016 Mar, 16(3), pp.289-90.
161. **Napier BA**, V Band, EM Burd, DS Weiss. Colistin Heteroresistance in Enterobacter cloacae Is Associated with Cross-Resistance to the Host Antimicrobial Lysozyme. Antimicrob Agents Chemother.2014 Sep,58 (9), pp.5594 –5597.
162. **Nation RL**, J Li. Colistin in the 21st Century. Curr Opin Iinfect Dis. 2009 Dec, 22(6), pp.535-543.
163. **Nation RL**, J Li, O Cars, W Couet, MN Dudley, KS Kaye, JW Mouton, DL Paterson, VH Tam, U Theuretzbacher, BT Tsuji, JD Turnidge. Consistent Global Approach on Reporting of Colistin Doses to Promote Safe and Effective Use. Clin Infect Dis. 2014a Jan, 58 (1), pp.139–141.
164. **Nation RL**, T Velkov, J Li. Colistin and Polymyxin B: Peas in a pod, or Chalk and cheese, Clin Infect Dis.2014b Jul,59(1), pp.88-94.
165. **Nation RL**, SM Garonzik, V Thamlikitkul, EJ Giamarellos-Bourboulis, A Forrest, DL Paterson, J Li, FP Silveira. Dosing Guidance for Intravenous Colistin in Critically Ill Patients. Clin Infect Dis. 2017 Mar, 64 (5), pp.565–571.
166. **Nikaido H**. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 2003 Dec, 67 (4), pp. 593–656.

167. **Nordmann P**, G Cuzon, T Naas. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis 2009 Apr, 9 (4), pp.228-236.
168. **Nordmann P**, T Naas, L Poirel. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2011 Oct, 17 (10), pp. 1791-1798.
169. **Nordmann P**, A Jayol, L Poirel. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant Gram-negative isolates. J Clin Microbiol. 2016a May, 54 (5), pp.1395–1399.
170. **Nordmann P**, A Jayol, L Poirel. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2016b Jun, 22 (6), pp. 1038-43.
171. O'Neill J, editor. (ed). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. HM Government and the Wellcome Trust, London, United Kingdom 2016.
172. **Ofek I**, S Cohen, R Rahmani et al. Antibacterial synergism of polymyxin B nonapeptide and hydrophobic antibiotics in experimental gram-negative infections in mice. Antimicrob Agents Chemother. 1994 Feb, 38(2), pp.374-377.
173. **Olaitan AO**, S Morand, J-M Rolain. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. 2014 Nov, 5:643.
174. **Olaitan AO**, S Chabou, L Okdah , S Morand , J-M Rolain. Dissemination of the mcr-1colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016 Feb, 16 (20), pp. 147.
175. **Otter JA**, M Doumith, F Davies et al. Emergence and clonal spread of colistin resistance due to multiple mutational mechanisms in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in London, Nature, Scentific reports 2017 Oct, 7: 12711 | DOI:10.1038/s41598-017-12637 4
176. **Padilla E**, E Llobet, A Doménech-Sánchez, L Martínez-Martínez, JA Bengoechea,S Albertí. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence . Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jan, 54(1), pp.177-183.
177. **Pamp SJ**, M Gjermansen, HK Johansen, T Tolker-Nielsen. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. Mol Microbiol. 2008 Apr, 68 (1), pp. 223–240.
178. **Pelletier MR**, LG Casella , JW Jones, MD Adams, DV Zurawski, KR Hazlett et al. Unique structural modifications are present in the lipopolysaccharide from colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Oct, 57 (10), pp. 4831–4840.
179. **Pena I**, JJ Picazo, C Rodriguez-Avial, I Rodriguez-Avial. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST11 isolates. Int J Antimicrob Agents. 2014 May, 43 (5), pp.460–464.
180. **Petrillo M**, A Angers-Loustau, J Kreysa. Possible genetic events producing colistinresistance gene mcr-1. Lancet Infect Dis. 2016 Mar, 16 (3), pp.280.
181. **Plachouras D**, M Karvanen, LE Friberg LE et al. Population Pharmacokinetic Analysis of Colistin Methanesulfonate and Colistin after Intravenous Administration in Critically Ill Patients with Infections Caused by Gram-Negative Bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Aug, 53(8), pp.3430-3436.
182. **Poirel L**, C Héritier, V Tolün , P Nordmann . Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jan; 48 (1), pp. 15-22

183. **Poirel L**, TR Walsh, V Cuvillier, P Nordmann. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 May, 70 (1), pp. 119 – 123.
184. **Poirel L**, A Potron, P Nordmann. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace, J Antimicrob Chemother. 2012 Jul, 67 (7), 1597-1606.
185. **Poirel L**, E Savov, A Nazli, A Trifonova, I Todorova, I Gergova, P Nordmann. Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing Escherichia coli in Bulgaria. Antimicrob. Agents Chemother. 2014, 58 (4), pp.2472–2474.
186. **Poirel L**, A Jayol, S Bontron, MV Villegas, M Ozdamar, S Türkoglu, P Nordmann. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*, J Antimicrob Chemother. 2015 Jan, 70 (1), pp. 75–80.
187. **Poirel L**, N Kieffer, N Liassine, D Thanh, P Nordmann. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Lancet Infect Dis. 2016 Mar, 16(3), p.281
188. **Poirel L**, A Jayol, P Nordmann. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. Clin Microbiol Rev. 2017 Apr, 30(2), pp. 557–596.
189. **Poirel L**,Y Larpin, J Dobias, R Stephan, JW Decousser, JY Madec, and P Nordmann. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the mcr-1/mcr-2 genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2018 Jan, 90 (1), pp. 7-10.
190. **Poudyal A**, BH Howden, JM Bell et al. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, J Antimicrob Chemother. 2008 Dec, 62 (6), pp. 1311–1318.
191. **Prim N**, A Rivera, M Español, B Mirelis, P Coll. In Vivo Adaptive Resistance to Colistin in Escherichia coli Isolates. Clin Infect Dis. 2015 Aug, 61 (10), pp.1628-1629.
192. **Raetz CRH**, C Whitfield. Lipopolysaccharide Endotoxins. Ann Rev Biochem. 2002, 71, pp. 635-700.
193. **Ratjen F**, E Rietschel, D Kasel, R Schwiertz, K Starke, H Beier et al. Pharmakokinetics of inhaled colistin in patients with cysic fibrosis. J Antimicrob Chemother. 2006 Feb, 57 (2), pp.306-11.
194. **Reynolds CM**, SR Kalb, RJ Cotter, CR Raetz. A phosphoethanolamine transferase specific for the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residue of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Identification of the eptB gene and Ca2+ hypersensitivity of an eptB deletion mutant. J Biol Chem. 2005 Jun, 280 (22), pp.21202–21211.
195. **Sabtcheva S**, IN Ivanov, B Todorova , Y Simeonov, E Dobreva, K Ivanova et al. Detection and characterization of OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae originated in Bulgaria. J Chemother 2015 May 27. DOI 10.1179/1973947815Y.0000000047
196. **Sahm H**, M Rohmer, S Bringer-Meyer, GA Sprenger, R Welle. Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria. Adv Microb Physiol. 1993, 35, pp. 247–273.
197. **Sampson TR**, X Liu, MR Schroeder, CS Kraft, EM Burd, DS Weiss. Rapid Killing of *Acinetobacter baumannii* by Polymyxins Is Mediated by a Hydroxyl Radical Death Pathway. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Nov, ;56 (11), pp.5642-5649.
198. **Sautrey G**, RE Duval, A Chevalley, S Fontanay, I Clarot. Capillary electrophoresis for fast detection of heterogeneous population in colistin-resistant Gram-negative bacteria. Electrophoresis. 2015 Oct, 36 (20), pp.2630–2633.

199. **Savov E**, I Todorova , L Politi, A Trifonova, M Borisova, E Kioseva, A Tsakris. Colistin Resistance in KPC-2- and SHV-5-Producing Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates in Bulgaria.Chemotherapy. 2017, 62 (6), pp.339–342.
200. **Savov E**, L Politi, N Spanakis, A Trifonova, E Kioseva, A Tsakris. NDM-1 Hazard in the Balkan States: Evidence of the First Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. Microb Drug Resist. 2018 Apr, 24 (3), pp.253-259.
201. **Schneider I**, R Markovska, Y Marteva-Proevska, I Mitov, B Markova, A Bauernfeind. Detection of CMY-99, a novel acquired AmpC-type -lactamase, and VIM-1 in Proteus mirabilis isolates in Bulgaria. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jan, 58 (1), pp.620 –621.
202. **Schwarz S, AP Johnson**. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. J Antimicrob Chemother. 2016 Aug, 71 (8), pp. 2066–2070.
203. **Shen Z**, Y Wang,Y Shen, J Shen, C Wu. Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals. Lancet Infect Dis 2016 Mar; 16, p. 293
204. **Sherman EX**, DA Hufnagel, DS Weiss. MCR-1 confers cross-resistance to lysozyme. Lancet Infect Dis 2016 Nov, 16 (11), pp.1226 - 1227.
205. **Silva A**, AM Sousa, D Alves, A Lourenço, MO Pereira. Heteroresistance to colistin in Klebsiella pneumoniae is triggered by small colony variants sub-populations within biofilms. Pathog Dis. 2016 May, 74 (5), pii: ftw036.
206. **Silveira ACO**, GE Sambrano,TGS Paim,J Caierão,CMM Cordoca, and PA dAzevedo. Is prediffusion test an alternative to improve accuracy in screening hVISA strains and to detect susceptibility to glycopeptides/lipopeptides? Diagn Microbiol Infect Dis. 2014, 79, pp. 401–404.
207. **Simar S**, D Sibley, D Ashcraft , G Pankey. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP Test for Polymyxin B Resistance Detection Using Enterobacter cloacae and Enterobacter aerogenes Isolates. Ledeboer NA, ed. J Clin Microbiol. 2017 Oct, 55 (10), pp.3016-3020.
208. **Sirakov I**, Y Marteva-Proevska,T Strateva, B Zlatkov, B Markova, I Mitov. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying OXA-48 carbapenemase in Bulgaria. Int J Biological sciences and applications, 2016; 3 (3), pp.38-41.
209. **Sopirala MM**, JE Mangino, WA Gebreyes et al. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Nov, 54 (11), pp.4678-4683.
210. **Sorlí** L, S Luque, S Grau et al. Trough colistin plasma level is an independent risk factor for nephrotoxicity: a prospective observational cohort study. BMC Infect Dis. 2013 Aug, 13, p.380.
211. **Stoesser N**, AJ Mathers,CE Moore, NPJ Day, DW Crook. Colistin resistance gene mcr-1 and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Lancet Infect Dis 2016 Mar; 16 (3), pp.285-6.
212. **Strenger V**, T Gschliesser, A Grisold et al. Orally administered colistin leads to colistin-resistant intestinal flora and fails to prevent faecal colonisation with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in hospitalised newborns. Int J Antimicrob Agents. 2011 Jan, 37 (1), pp.67–69.
213. **Sun J**, Y Xu, R Gao et al. Deciphering MCR-2 colistin resistance. mBio. 2017 May, 8:e00625-17.
214. **Tamayo R**, B Choudhury, A Septer et al. Identification of cptA, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella*

*enterica*serovar typhimurium lipopolysaccharide core. J Bacteriol. 2005 May,187 (10), pp.3391–3399.
215. **Tamayo M**, R Santiso, F Otero et al. Rapid Determination of Colistin Resistance in Clinical Strains of Acinetobacter baumannii by Use of the Micromax Assay. J Clin Microbiol. 2013 Nov, 51(11), pp.3675-3682.
216. Tamma PD, SE Cosgrove, LL Maragakis. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. Clin Microbiol Rev. 2012 Jul, 25 (3), pp.450-470.
217. **Tan CH**, J Li, RL Nation. Activity of Colistin against Heteroresistant Acinetobacter baumannii and Emergence of Resistance in an In Vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model, Antimicrob Agents Chemother. 2007 Sep, 51 (9), pp. 3413–3415.
218. **Tan TY**, SY Ng. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. Clin Microbiol Infect. 2007 May,13 (5), pp.541-4.
219. **Tängdén T**, RA Hickman, P Forsberg, P Lagerbäck, CG Giske, O Cars. Evaluation of Double- and Triple-Antibiotic Combinations for VIM- and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* by *In Vitro* Time-Kill Experiments. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Mar,58 (3), pp.1757-1762.
220. **Tängdén T.** Combination antibiotic therapy for multidrug resistant Gram-negative bacteria. *Ups J Med Sci*. 2014 May; 119, pp.149-153
221. **Tängdén T, CG Giske**. Global dissemination of extensivelydrug-resista nt carbapenemase-producing Entero-bacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. J Intern Med 2015 May, 277 (5), pp.501–512.
222. **Tateda K**, Y Ishii, T Matsumoto, Ko Yamaguchi. 'Break-point Checkerboard Plate' for screening of appropriate antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Scand J Infect Dis. 2006, 38 (4), pp. 268-272.
223. **Tijet N**, D Faccone, M Rapoport, C Seah, F Pasterán, P Ceriana et al. Molecular characteristics of *mcr-1*-carrying plasmids and new *mcr-1* variant recovered from polyclonal clinical *Escherichia coli* from Argentina and Canada. PLoS ONE. 2017 Jul,12 (7), pp. e0180347.
224. **Pham Thanh D**, HT Tuyen, TNT Nguyen et al. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne mcr-1 gene in a 2008 Vietnamese Shigella sonnei. J Antimicrob Chemother 2016,71, pp.2314-2317
225. **Todorova B**, S Sabtcheva, IN Ivanov, M Lesseva, T Chalashkanov, M Ioneva, A Bachvarova, E Dobreva, T Kantardjiev. First clinical cases of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae from two hospitals in Bulgaria. J. Infect. Chemother. 2016 Dec, 22 (12), pp. 837–840
226. **Torres A**, M Ferrer, J Ramo´n Badia. Treatment Guidelines and Outcomes of Hospital-Acquired and Ventilator-Associated Pneumonia. Clin Infect Dis. 2010 Aug, 51(S1), pp.S48–S53.
227. **Tumbarello M**, G De Pascale, EM Trecarichi et al. Effect of Aerosolized Colistin as Adjunctive Treatment on the Outcomes of Microbiologically Documented Ventilator-Associated Pneumonia Caused by Colistin-Only Susceptible Gram-Negative Bacteria. Chest 2013 Dec, 144 (6), pp.1768–1775.
228. **Turlej-Rogacka A**, BB Xavier , L Janssens et al. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018 Feb,37(2), pp.345-353.
229. **Vandecraen J**, M Chandler, A Aertsen, R Van Houdt. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. Crit Rev Microbiol, 2017 Nov, 43 (6), pp. 709-730.

230. **Vatopoulos A.** High rates of metallo-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece: a review of the current evidence. Euro Surveill 2008 Jan, 13 (4), pii 8023.
231. **Veldmann K**, A van Essen-Zandbergen, M Rapallini et al. Location of colistin resistance gene mcr-1 in Enterobacteriaceae from livestock and meat. J Antimicrob Chemother. 2016 Aug, 71 (8), pp. 2340–2.
232. **Velkov T**, PE Thompson, RL Nation, J Li. Structure−activity relationships of polymyxin antibiotics. J Med Chem. 2010 Mar, 53 (5), pp.1898−1916.
233. **Velkov T**, KD Roberts, RL Nation, PE Thompson, J Li. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics, Future Microbiol. 2013 Jun, 8(6), pp.711-24.
234. **Versalovic J**, T Koeuth, JR Lupski. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991 Dec, 19 (24), pp.6823-6831.
235. **Urban C**, N Mariano , JJ Rahal. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae,* and *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 2010 Jun,54 (6), pp.2732–2734.
236. **Uz Zaman T**, M Albladi, MI Siddique, SM Aljohani, HH Balkhy. Insertion element mediated mgrB disruption and presence of ISKpn28 in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Saudi Arabia, Infect Drug Resist, 2018 Aug, (11), pp. 1183—1187
237. **Wang S.** Chapter 15: Bacterial two-component systems: Structures and Signaling Mechanisms. Protein Phosphorilation in Human Health.2012 Sep, pp.439-466
238. **Wang X**, Y Wang, Y Zhou et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. Emerg Microb Infect. 2018, (7), 122.
239. **Wareham DW**, NC Gordon, M Hornsey. *In vitro* activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2011 May, 66 (5), pp.1047-51.
240. **Warner DM**, SB Levy. Different effects of transcriptional regulators MarA, SoxS and Rob on susceptibility of *Escherichia coli* to cationic antimicrobial peptides (CAMPs): Rob-dependent CAMP induction of the *marRAB* operon. Microbiol. 2010 Feb, 156 (Pt2), pp.570-578.
241. **Webb HE**, SA Granier, M Marault et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. 2016 Feb, 16 (2), pp. 144–5.
242. **White RL**, DS Burgess, M Manduru, JA Bosso. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Aug, 40 (8), pp.1914-8.
243. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.Geneva: Wolrd Health Organization, 2014 Apr, ISBN: 978 92 4 156474 8, drugresistance/documents/surveillancereport/en/ (accessed http://www.who.int/Oct 20, 2015).
244. **Wright MS**, Y Suzuki, MB Jones et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of Klebsiella pneumoniae reveal multiple pathways of resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Jan, 59 (1), pp.536–43.
245. **Xavier BB**, C Lammens, R Ruhal, S Kumar-Singh , P Butaye, H Goossens, S Malhotra-Kumar. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene,

mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016 Jul, 21 (27):pii=30280.

246. **Yahav D**, L Farbman, L Leibovici, M Paul. Colistin: new lessons on an old antibiotic. Clin Microbiol Infect. 2012 Jan, 18 (1), pp. 18–29.

247. **Yamagishi Y**, M Hagihara, H Kato et al. In vitro and in vivo Pharmacodynamics of Colistin and Aztreonam Alone and in Combination against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Chemotherapy 2017, 62 (2), pp.105–110.

248. **Yang YQ**, YX Li, T Song et al. Colistin resistance gene mcr-1 and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Apr, 61 (5), pii: e01204-16.

249. **Yang YQ**, YX Li, CW Lei, AY Zhang, HN Wang; Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*, J Antimicrob Chemother, 2018 Jul, 73 (7), pp. 1791–1795.

250. **Yin W**, H Li , Y Shen et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in Escherichia coli. mBio. 2017 Jun, 8 (3), pii: e00543-17.

251. **Yong D**, MA Toleman, CG Giske et al. Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Dec, 53(12), pp.5046-5054.

252. **Yu Z**, W Qin, J Lin et al.. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. BioMed Research International. 2015;2015, Article ID 679109, 11pp.

253. **Zeng KJ**, Y Doi ,S Patil et al. Emergence of plasmid-mediated mcr-1 gene in colistin-resistant Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae. Antimicrob Agents Chemother. 2016 May, 60 (6), pp. 3862–3.

254. Zhanel GG, M Mayer, N Laing et al. Mutant Prevention Concentrations of Levofloxacin Alone and in Combination with Azithromycin, Ceftazidime, Colistin (Polymyxin E), Meropenem, Piperacillin-Tazobactam, and Tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Jun, 50 (6), pp.2228-2230.

255. **Zhao X and D Karl**, Restricting the Selection of Antibiotic-Resistant Mutants: A General Strategy Derived from Fluoroquinolone Studies. Clin Infect Dis. 2001 Sep, 33(Suppl 3), pp.S147–56.

256. **Zhao X and K Drlica**. Restricting the Selection of Antibiotic-Resistant Mutant Bacteria: Measurement and Potential Use of the Mutant Selection Window. J Infect Dis. 2002, Feb, 185 (4), pp.561–5.

257. **Zhi C**, L Luchao, Y Lin-Feng, D Yohei, JH Liu. Dissemination of the mcr-1colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016; 16, p 292.

258. **Zurfuh K**, L Poirel, P Nordmann et al. Occurrence of the plasmid-borne mcr-1 colistin resistance gene in extended-spectrum- β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in river water and imported vegetable samples in Switzer-land.Antimicrob Agents Chemother. 2016 Mar, 60 (4), pp.2594 –2595.

259. **Zhanel GG**, V Vashisht, E Tam, DJ Hoban, JA Karlowsky. Mutant prevention concentrations of doripenem and meropenem alone and in combination with colistin (polymyxin E), levofloxacin and tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2009, 20 (Suppl A), pp. 67A-71A.

Публикации, свързани с дисертацията:

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

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

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

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

Участия в научни прояви:

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