ПРОУЧВАНЕ НА ШИРОКОСПЕКТЪРНИТЕ БЕТА-ЛАКТАМАЗИ ПРИ ЩАМОВЕ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* И *ESCHERICHIA COLI* В ДВЕ УНИВЕРСИТЕТСКИ БОЛНИЦИ – ВАРНА

Р. Марковска[1], Т. Стоева[2], К. Божкова[2] и И. Митов[1]

[1]Катедра по медицинска микробиология, МУ – София

[2]Катедра „Микробиология", МУ – Варна

A STUDY ON EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE PRODUCING ISOLATES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND *ESCHERICHIA COLI* IN TWO HOSPITALS IN VARNA CITY

R. Markovska[1],T. Stoeva[2], K. Bozhkova[2] and I. Mitov[1]

[1]Department of Medical Microbiology, MU – Sofia

[2]Department of Microbiology, MU – Varna

Резюме:

Бяха изследвани 43 клинично значими изолата от сем. *Enterobacteriaceae*: 27 *K. pneumoniae* и 16 *E. coli,* с редуцирана чувствителност или резистентни на цефалоспорини от III генерация, изолирани през 2006 г. и 2009 г. от 2 медицински центъра, Варна. Бяха определени антибиотичната чувствителност, възможността за конюгативен пренос, наличието и видът на широкоспектърни бета-лактамази (ESBL) чрез полимеразоверижна реакция и секвениране, както и генетичната свързаност на изолатите. При всички щамове беше доказана продукцията на ESBL, като основните типове бета-лактамази са от CTX-M групата (97%). Само един щам от 2006 г. произвеждаше SHV-12. При *K. pneumoniae* щамовете бяха установени основно CTX-M-3 ензими – в 89%, докато при *E. coli* преобладаваха CTX-M-15 – 88%. CTX-M-15 продуциращите *E. coli* принадлежаха към два клона, от които един основен – клон А (9 от 15 щама). Конюгационните експерименти бяха успешни само при половината от тестваните щамове *E. coli*. При щамовете *K. pneumoniae* установихме 7 клона, от които един доминантен (в 48%), както и висока честота на конюгационен пренос при продуцентите на CTX-M-3 (100%) и еднакъв фенотип на трансконюгантите. ESBL продуцентите показват висока резистентност към аминогликозиди Tobramycin и Gentamicin, а по отношение на Amikacin щамовете *K. pneumoniae* са значително по-устойчиви ($p < 0.001$) в сравнение с щамовете *E. coli*. *K. pneumoniae* също така са сигнификантно по-резистентни към Co-trimoxazole и са значително по-чувствителни към Ciprofloxacin. На базата на тези резултати може да се предположим, че клоналното разпространение играе основна роля за високия процент на CTX-M-15 *E. coli* продуценти, а хоризонталният плазмиден трансфер – за разпространението на CTX-M-3 ензимите при *K. pneumoniae* изолати.

Ключови думи: широкоспектърни бета-лактамази (ESBL), изоелектрично фокусиране (IEF), CTX-M-15

Адрес за кореспонденция: *Д-р Румяна Марковска, Катедра по микробиология, Медицински факултет, ул. „Здраве" № 2, 1431 София, e-mail: markovska73@abv.bg*

Summary:

The aim of this study was to confirm the presence of ESBLs in isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*, characterize the ESBLs types and susceptibility of their producers to antibiotics and determine the genetic relationship between the studied isolates. A total of 43 clinically significant isolates from *Enterobacteriaceae* were studied: 27 *K. pneumoniae* isolates and 16 *E. coli* isolates with reduced susceptibility or resistant to III generation cephalosporins, isolated in 2006 and 2009

from two medical centers in Varna city. Antibiotic susceptibility, the possibility for conjugation transfer, the presence and the ESBLs types were studied by PCR and sequencing. The genetic relationship between the isolates was studied by RAPD PCR. Production of ESBL was detected in all studied strains with the CTX-M group being the predominant one (97%). Only one strain, isolated in 2006, was a SHV-12 producer. CTX-M-3 enzymes were found mainly in the group of *K. pneumoniae* isolates (in 89%), while in the group of *E. coli* isolates, the CTX-M-15 were detected more commonly (in 88%). The CTX-M-15 positive isolates of *E. coli* belonged to two clones, one of which, clone A, was the predominant (n = 9). The conjugation experiments were successful only in half of the tested isolates of *E. coli*. Seven different clones, one of which the predominant (in 48%), were found in the group of *K. pneumoniae* isolates. High rate of conjugation transfer in the collection of CTX-M-3 producers (100%) and identical phenotype of the transconjugates were detected. The ESBLs producers demonstrated high resistant rates to tobramycin and gentamicin. *K. pneumoniae* isolates were significantly more resistant to amikacin in comparison to *E. coli* isolates ($p < 0.001$), as well as more resistant to trimethoprime/sulphomethoxazole and significantly more susceptible to ciprofloxacin. On the base of these results, it can be concluded that the clonal dissemination plays the major role for the high percentage of the CTX-M-15 *E. coli* producers, while the horizontal plasmid transfer plays a role for the dissemination of the CTX- M-3 enzymes in *K. pneumoniae*.

Key words: extended spectrum beta-lactamase (ESBL), isoelectric focusing (IEF), CTX-M-15

Address for correspondence: *Rumyana Markovska, M. D., Department of Medical Microbiology, Medical University, 2, Zdrave Str., Bg – 1431 Sofia, e-mail: markovska73@abv.bg*

ВЪВЕДЕНИЕ

Продукцията на широкоспектърни бета-лактамази (ESBL) при представителите на сем. *Enterobacteriaceae* е един от основните терапевтични проблеми [5, 6, 11, 15]. Както ESBL, така и плазмидните AmpC бета-лактамази придават устойчивост към пеницилини, цефалоспорини от I и II генерация, цефалоспорини от III генерация, както и се селекционират при лечение с тези антибиотици [4, 5, 6, 16]. Те имат много бързо еволюционно развитие; първите клинични изолати с придобити ESBLs, са идентифицирани в Германия през 1983 г. [5]. Броят на идентифицираните ESBL варианти постоянно се увеличава – данните за тях се докладват от почти всички страни [7]. ESBLs са класифицирани в девет различни структурни/еволюционни семейства, основани на сравнението на установените последователности на аминокиселините (семейства TEM, SHV, CTX-M, VEB, GES, TLA, BES и OXA) [4, 5, 6]. Главните семейства са сформирани от TEM и SHV ензимите, първите идентифицирани ESBL варианти, които са и едни от най-разпространените типове ESBL [5, 6]. CTX-M ензимите съставят нова група плазмид-кодирани ензими и се появяват в края на 1980 г. [4, 15], като те имат по-висока активност към Cefotaxime, отколкото към Ceftazidime [4, 18]. Генетично са близки до хромозомно кодираната клас А цефалоспориназа на щамовете *Kluyvera georgiana* (KLUG), *Kluyvera cryorescens* (KLUC) и *Kluyvera ascorbata* (KLUA) [4, 15], които се откриват в околната среда. Понастоящем CTX-M групата наброява над 99 ензима (www.lahey.org/studies/webt.asp). Филогенетичните проучвания разделят CTX-M ензимите на 5 големи групи (с > 94% хомология в групата) – CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 [4, 15]. Някои от представителите, появили се през последните години, са с повишена активност към Ceftazidime CTX-M-15, -16, -27, -32 [4]. Те се различават от съответните CTX-M-3, -9, -14, -1 само с една аминокиселинна замяна: Asp240Gly [4].

ESBLs се срещат главно при щамове *Klebsiella spp.* и *Escherichia coli,* но те се разпространяват и сред останалите представители на сем. *Enterobacteriaceae* [5, 6], предимно в болниците [7, 18], и особено в интензивните отделения, които се превръщат в резервоар за разпространението на устойчиви щамове в останалите отделения, други болници и в обществото. Този процес вероятно е обусловен от клоналното разпространение на ESBL продуциращи щамове и/или хоризонтален трансфер на плазмиди, съдържащи гени на широкоспектърни бета-лактамази.

Проведени в България проучвания показват, че ESBL продуцентите, широко разпространени в целия свят, стават проблемни за терапия и диагностика вече и у нас [13]. Досега са доказани различни ESBL в пет университетски центъра, но няма детайлно проучване на вида и разпространението на широкоспектърните беталактамази във Варна, което се налага при доказаното увеличение на процента им в този медицински център [1].

Цел на настоящата работа бе:

1. Да се потвърди наличието на ESBL при изолати *Klebsiella spp.* и *Escherichia coli* с намалена чувствителност или резистентни към цефалоспорини от III генерация.

2. Да се охарактеризират типовете на установените ензими и чувствителността на техните продуценти.

3. Да се проучи възможната причина за увеличения брой ESBL за периода 2004-2008 г. чрез определяне на възможността за конюгативен пренос на гените, които ги кодират, и да се установи клоналното разпространение на техните продуценти.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Бактериални изолати

Четиридесет и три изолата от сем. *Enterobacteriaceae*: 27 *K. pneumoniae* и 16 *E. coli* с редуцирана чувствителност или резистентни на цефалоспорини от III генерация, бяха изолирани през 2006 г. и 2009 г. от клинични материали: урина – 12, хемокултура – 12, централен венозен катетър – 1, трахеален аспират – 2, ранев секрет – 5, дрен – 3, храчка – 1, материали от горни дихателни пътища – 7. Изолатите бяха предимно от неонатологично (n = 11), педиатрични (n = 7) и интензивни (n = 13) отделения. Те бяха от 2 медицински центъра, Варна – УМБАЛ "Св. Марина" и АГ болница. Двадесет и един щама *K. pneumoniae* бяха изолирани от деца на възраст от един ден до три месеца, останалите 6 – от възрастни над 65 години. При щамовете *E. coli* разпределението беше: до 17 г. – 3 изолата; между 18-64 г. – 6; и над 65 г. – 7.

Тестове за определяне на антибиотичната чувствителност

Беше използван дифузионен дисков метод (ДДМ) по CLSI, 2010 [8] с Mueller-Hinton agar II (BD, BBL) и антимикробни дискове Ceftazidime (CAZ), Cefotaxime (CTX), Cefoxitin (FOX), Imipenem (IMP), Amoxicillin/Clavulanic acid (AMC) – BD, BBL; Tetracycline (TET), Chloramphenicol (CHL), Gentamicin (GEN), Amikacin (AMK), Tobramycin (TOB), Co-trimoxazole (SXT), Ciprofloxacin (CIP) – НЦЗПБ, София.

Доказване на продукцията на ESBL

1. Двойнодисков синергичен метод (ДДМ) по V. Jarlier et al. [9] с два диска Ceftazidime, Cefotaxime и диск Amoxicillin/Clavulanic acid.

2. CLSI потвърдителен метод при *Klebsiella spp.* и *E. coli* с дискове CAZ и CAZ/clavulanic acid, и CTX и CTX/clavulanic acid [8].

Конюгационно предаване на R плазмиди

Използвахме метода на конюгативно предаване на твърда хранителна среда (Mueller-Hinton agar), с реципиенти *E. coli* K_{12}: W_{3110} Rif lac – и W_{3110} Nal lac+. Селекцията извършвахме на MacConkey agar (BD) с Ceftazidime 2 mg/L и Rifampin 50 mg/L или Nalidixic acid 50 mg/L. Получените трансконюганти доказвахме с тестове за чувствителност: ДДМ.

Предварително характеризиране на типа на ESBL

1. **Изоелектрично фокусиране (IEF).** За получаване на ензимните екстракти донорните щамове и получените трансконюганти бяха култивирани в 80 ml Tryptic Soy Broth (Difco) на водна баня с разклащане при температура 37° C, до гъстота 10^9 CFU/ml. Клетките бяха отделени чрез центрофугиране и след това лизирани чрез ултразвуков дезинтегратор пулсово: 75 пулса/min 3 min на ледена водна баня. За получаване на ензимните екстракти центрофугирахме в хладилна центрофуга при 4° C. IEF провеждахме в полиакриламиден гел 30%, съдържащ Ampholyte pH 3-10, Isolyte, ISN, Germany по модифициран [2] метод на Mathew [14]. Визуализирането на ивиците на β-лактамазите беше с разтвор на Nitrocefin (Oxoid) 500 mg/L. Ензимни екстракти на β-лактамази с известни pI бяха използвани като контроли.

2. **Bioassay** беше проведено според методиката на Bauernfeind et al. [2]. IEF гелът беше покрит с Tryptic Soy Agar (TSA) (50%), съдържащ съответния антибиотик: CAZ или CTX в концентрация 2 μg/ml, и беше инкубиран на 35° C за 2 часа. Допълнително бе покрит със слой TSA 50%, съдържащ чувствителен *E. coli* $1.2x10^9$ CFU/ml. След инкубиране 18-20 часа на 35°C наличието на растеж на щама определяше ивиците, разградили антибиотика.

Полимеразоверижна реакция беше проведена при всички щамове или при техните трансконюганти, с праймери за съответната група

ESBL, според данните от изоелектричното фокусиране [13].

Нуклеотидно секвениране

Амплифицираните продукти при репрезентативни за вид и тип ензим бяха секвенирани с автоматичен секвенатор ABI 3700, MWG. Резултатите бяха обработени с BLAST и DNAMAN програми.

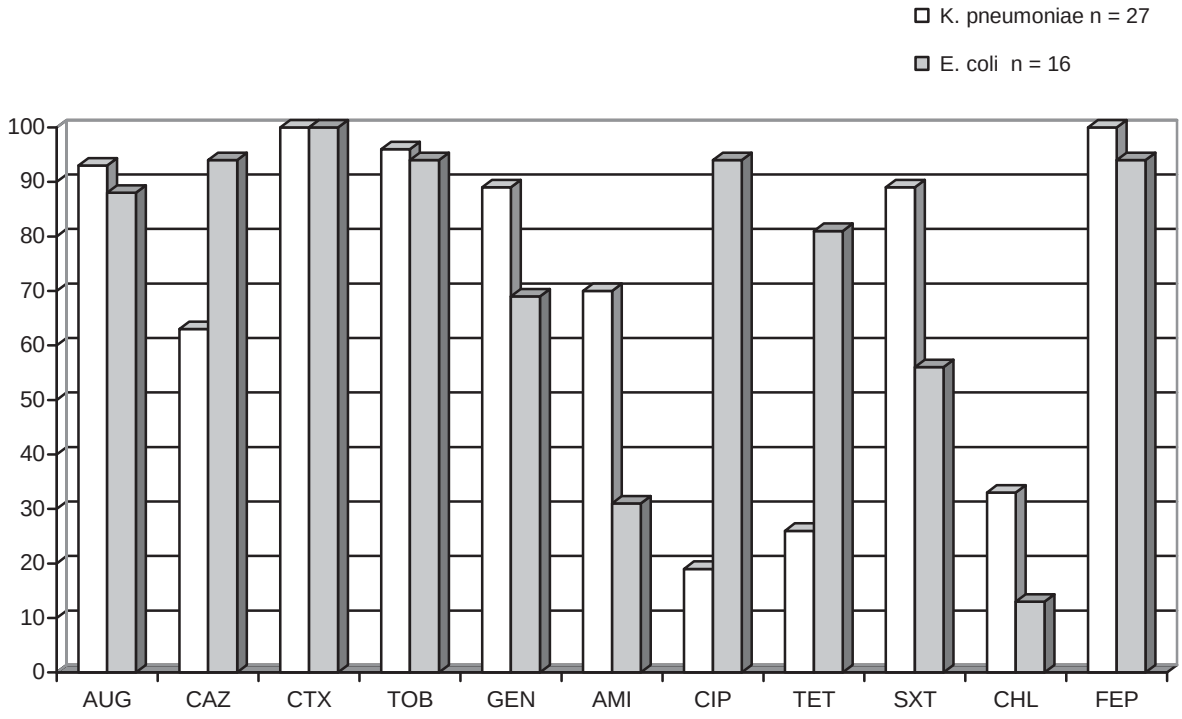
Епидемиологично типиране – бяха използвани ERIC-1 и ERIC-2 праймери. Щамове с под 2 ивици разлика бяха приети като клонално свързани [19].

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При всички 43 изолата беше установено наличие на ESBL и по двата фенотипни метода.

Антибиотична чувствителност при щамовете, продуценти на ESBL

Резистентността на ESBL продуцентите (R+I) е представена на фиг. 1.



Фиг. 1. Резистентност (I+R) на ESBL продуцентите

R – резистентен, I – интермедиерен

От клинична гледна точка е важна високата резистентност към TOB и GEN. По отношение на Amikacin щамовете *K. pneumoniae* са значително по-устойчиви ($p < 0.001$) в сравнение с щамовете *E. coli*. Те също така са сигнификантно по-резистентни към SXT, и са значително по-чувствителни към Tetracycline и Ciprofloxacin. При щамовете *E. coli* установихме обратната зависимост: те са сигнификантно по-резистентни към Tetracycline, Ciprofloxacin и по-чувствителни към Co-trimoxazole (фиг. 1). Проучените щамове бяха 100% чувствителни към Imipenem и Cefoxitine, както и с висока чувствителност към CHL. Резистентността към FOX е показател за наличието на плазмидна AmpC [3,17] или на пермеабилитетни промени. В настоящата колекция от изолати такива не бяха доказани.

Определяне на типа ESBL

Резултатите са представени в табл. 1. IEF анализът показа, че повечето щамове съдържат 2 или 3 различни бета-лактамази. Всички изолати демонстрират бета-лактамази с изоелектрична точка (pI) 5.4 – отговаряща най-вероятно на тясноспектърните TEM-1 [5]. Двадесет и седем щама *Klebsiella pneumoniae* бяха носители на бета-лактамаза с pI 7.6, нехидролизираща Cefotaxime. На тези pI отговарят хромозомните бета-лактамази с тесен спектър SHV-1 [5].

Таблица 1. Тип ESBL, година на изолиране и ERIC тип

	ESBL тип	*Брой*	*IEF**	*Година на изолиране* $_{брой}$	*ESBL тип секвениране*	*RAPD тип* $_{брой}$	*Фенотип на трансконюгантите* $_{брой}$
E. coli	CTX-M n =15	14	5.4 7.4 8.8	2006_{10}, 2009_{6}	CTX-M-15; OXA-1	A_9; D_5	TOB,GEN,TET,SXT_3 TOB,TET_4 TOB,GEN,TET_1
		1	5.4 8.4	2006	CTX-M-3	уникален	TOB,GEN,AMI,SXT
	SHV	1	5.4 8.2	2006	SHV-12	уникален	Без предаване
K. pneumoniae	CTX-M n = 27	3	5.4 7.4/7.6 8.8	2009	CTX-M-15	g_3	Без предаване
		24	5.4 7.6 8.4	2009	CTX-M-3	d_{13};h_3;n_3;o_2; уникални$_3$	TOB,GEN,AMI,SXT_{22}

Почти всички изолати (n = 42) експресират бета-лактамази с pI, принадлежаща на CTX-M групата. Тези изолати се разделят на две групи – първата експресираща бета-лактамаза с pI 8.4 (25 изолата). Последващите PCR и секвениране на репрезентативни изолати доказа, че се касае за CTX-M-3. Втората експресираща бета-лактамаза бе с pI 8.8 (17 изолата). Последващите PCR и секвениране на репрезентативни изолати доказа, че се отнася за CTX-M-15. Всички изолати, продуциращи CTX-M-15 ESBL, продуцират и бета-лактамази с pI 7.4. Секвенирането при репрезентативни щамове доказа наличието на OXA-1 тяснospектърна бета-лактамаза. Само при един изолат *E. coli* бе установена SHV-12 ESBL.

Конюгационно предаване на гени, кодиращи ESBL

При провеждане на конюгацията бяха предадени маркерите за резистентност към Cefotaxime или Ceftazidime при 29 от 43 донори. Таблица 1 представя фенотипната характеристика на получените трансконюганти.От нея се вижда, че при изолатите *E. coli* гените, кодиращи бета-лактамазите, се предаваха заедно с гените за резистентност към Tobramycin, Gentamicin, Tetracycline и с по-ниска честота – Co-trimoxazole. Също така при изолатите *E. coli* установихме и много по-ниска честота на предаване на гените за ESBL (само 9 от 16-те конюгационни експеримента бяха успешни). При изолатите *K. pneumoniae* с много висока честота (22 от 27) се предаваха детерминантите за резистентност към Tobramycin, Gentamicin, Amikacin, Co-trimoxazole което може да обясни наблюдаваните разлики в чувствителността при различните видове.

Епидемиологично типиране

Направеното типиране доказа наличието на 6 клона при щамовете *K. pneumoniae*, от които пет произвеждат CTX-M-3 и само един – CTX-M-15 (табл. 1). От тях само един – d тип, беше преобладаващ – с 13 щама (48%). Останалите бяха с 2 или 3 представителя. Преобладаващият d тип бе установен при щамове, изолирани от неонатологично и интензивно педиатрично отделение.

ERIC PCR типирането показа наличието на 2 основни клона при изолатите E. coli – A (9 щама) и D (5 щама) – всички продуценти на CTX-M-15. Двата щама с уникален ERIC тип продуцираха CTX-M-15 и CTX-M-3, респективно.

ОБСЪЖДАНЕ

Получените резултати показват много добра идентификация на наличието на ESBL от изпращащата лаборатория – при всички 43 изолата бе доказана продукцията на тези ензими с фенотипни и/или молекулярно-генетични методи. Препоръчително за всички лаборатории е да използват поне 2 различни фенотипни метода, напр. двойнодисков синергичен метод с разстояние 2/2.5 cm между дисковете и поне двата антибиотични диска Ceftazidime и Cefotaxime, както и CLS потвърдителният метод за *Klebsiella* и *E. coli*.

По правило продуцентите на ESBL са резистентни на всички пеницилини, цефалоспорини (с изключение на Cefoxitine) и монобактами, независимо от данните, получени при определяне на антибиотичната чувствителност. Така че въпреки демонстрираната в някои случаи in vitro активност към някои цефалоспорини от 3 и 4 генерация, напр CAZ или FEP, не се препоръчва

клиничната им употреба при изолати, продуценти на ESBL. При проучените изолати се установи, че Cefotaxime е много по-добър индикатор за наличие на ESBL (100% устойчиви). Високата устойчивост към не бета-лактамните антибиотици (фиг. 1) се обяснява с факта, че гените за ESBL обикновено са разположени на плазмиди или транспозони/интегрони, носещи и други гени за устойчивост [7].

Фенотипните и/или молекулярно-генетичните методи на изследване доказаха, че в двата медицински центъра във Варна основните типове бета-лактамази са от CTX-M групата (97%). Само един щам от 2006 г. произвеждаше SHV-12. При *K. pneumoniae* щамовете бяха установени основно CTX-M-3 ензими – в 89%, докато при *E. coli* преобладаваха CTX-M-15 – 88%. Тези данни отговарят на световните данни за повсеместното разпространение на CTX-M ензимите [7, 10, 12, 15]. Продуценти на CTX-M ензими са изолирани в много страни по целия свят. В Европа са доказани като доминантни продуцентите на CTX-M-3, -9, -15 ензими. Пандемичното разпространение на *E. coli* щамове, произвеждащи CTX-M-15 ензими, се дължи предимно на разпространението на няколко клона, от които O25b ST131 е основен [10]. Резултатите от настоящото проучване показват, че CTX-M-15 продуциращите *E. coli* принадлежаха само на два клона, от които един основен – клон А (9 от 15 щама). При тези изолати конюгационните експерименти бяха успешни само в 50%. В резултат можем да предположим, че клоналното разпространение играе основна роля за високия процент на произвеждащи CTX-M-15 изолати. Наличието на по-голям брой резистотипове сред трансконюгантите се дължи най-вероятно на различни типове плазмиди, носещи различни детерминанти на резистентност. Известно е, че гените, кодиращи CTX-M-15 ензимите, имат голяма възможност за мобилизация и прескачане от хромозомата на плазмидите и обратно, дължаща се главно на IS*Ecp*1 елемента. Тези инсерционни последователности се състоят от незавършени повторности и област, кодираща евентуална транспозаза. Литературни данни сочат, че IS*Ecp*1 елементите могат да се пренесат чрез едностъпален процес на транспозиция и играят важна роля за пренасянето на CTX-M гените, както и за експресията на ензима [4].

При щамовете *K. pneumoniae* също преобладава един клон (в 48%), но високата честота на конюгационен пренос при *K. pneumoniae* продуценти на CTX-M-3 и наличието само на един фенотип на трансконюгантите ни кара да предположим, че разпространението на един плазмид, носещ детерминанти за резистентност към TOB, GEN, AMI, SXT, е основна причина за превалирането на CTX-M-3 в щамовете *K. pneumoniae*. Такива проучвания има и в Полша, където се доказва, че основен тип ESBL е CTX-M-3 и неговото разпространение се дължи на конюгативен плазмид с висока молекулна маса и еднакъв *Pst*I профил [12]. Такъв плазмид има доказан вече и в България [13]. Тревожен е фактът, че тези щамове са изолирани предимно от неонатологични и педиатрични отделения, основно при новородени (78%) и възрастни над 65 г.

Друга много вероятна причина за увеличение на ESBL продуцентите е високият селективен натиск в резултат от увеличената употреба на цефалоспорини трета генерация, както и на аминогликозиди. Това се потвърждава от проучване, направено за периода 2004-2008 г. за тези медицински центрове, което доказва увеличената консумация на Ceftriaxone и Ceftazidime от 1.22 за 2004 г. до 3.1 за 2008 г. DDD/100, както и на Gentamicin и Amikacin от 0.34 за 2004 г. до 3.44 за 2007 г. и 2.85 за 2008 г. DDD/100 [1]. Определянето на антибиотичната чувствителност на ESBL продуцентите показа, че те са с висока резистентност към аминогликозидите Tobramycin и Gentamicin, а по отношение на Amikacin щамовете *K. pneumoniae* са значително по-устойчиви ($p < 0.001$) в сравнение с щамовете *E. coli*. Тези данни ни карат да предположим, че и увеличената употреба на аминогликозиди може да доведе до селектиране на ESBL продуценти. Щамовете *K. pneumoniae* също така са сигнификантно по-резистентни към Co-trimoxazole и са значително по-чувствителни към Ciprofloxacin (фиг. 1). При *E. coli* зависимостта е обратна. Проучените щамове бяха 100% чувствителни на Imipenem. Тези данни, както и световният опит [5, 18] показват, че карбапенемите следва да бъдат първо средство на избор за лечение на тежки животозастрашаващи инфекции, причинени от продуценти на ESBL бета-лактамази.

В заключение можем да кажем, че в двата медицински центъра във Варна основните типове бета-лактамази са от CTX-M групата. Само един щам от 2006 г. произвеждаше SHV-12. При *K. pneumoniae* щамовете бяха установени основно CTX-M-3 ензими – докато при *E. coli* преобладаваха CTX-M-15. Предимно клоналното разпространение играе основна роля за високия процент на продуценти на CTX-M-15 при щамовете *E. coli*, а хоризонталният плазмиден трансфер – за разпространението на CTX-M-3 ензимите при *K. pneumoniae* изолати.

Библиография

1. Стоева, Т., К. Божкова, В. Снегарова и М. Божкова. Динамика в резистентността на най-честите бактериални изолати в УМБАЛ "Света Марина" и употребата на някои антибиотици в периода 2004-2008. – Мед. преглед, 46, 2010, 67-42.
2. Bauernfeind, A. et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with Salmonella typhimurium. – Infection, 20, 1992,158-163.
3. Bauernfeind, A. et al. Plasmid-encoded AmpC β Lactamases: How Far Have we Gone 10 Years after the Discovery? – Yonsei M. J., 39,1998,520-25
4. Bonnet, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 48, 2004, 1-14.
5. Bradford, P. Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. – Clin. Microb. Rev., 14, 2001, 933-951.
6. Bush, K. New Beta-Lactamases in Gram Negative Bacteria Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Resistance. – CID, 32, 2001,1085-1089.
7. Coque, T. Increasing prevalence of ESBL–producing Enterobacteriaceae in Europe. – Eurosurveillance, 47, 2008, 1-11.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Sixteenth Informational Supplement. Approve standard M100-S20. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
9. Jarlier, V. et al. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. – Rev. Infect. Dis., 10, 1988, 867-878.
10. Johnson, J. et al. Escherichia coli sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant E. coli infections in the United States. – Clin. Infect. Dis., 51, 2010, 286-294.
11. Livermore, D. β Lactamases in Laboratory and Clinical Practice. – Clin. Microb. Rev., 8, 1995, 557-584.
12. Livermore, D. et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. – J. Antimicrob. Chemother.. 59, 2007, 165-174.
13. Markovska, R. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Bulgarian hospitals. – Microb. Drug Resist., 14, 2008,119-128.
14. Mathew, M. et al. The use of analytcal isoelectric focussing for detection and identification of beta-lactamases. – J. Gen. Microb., 88, 1975,169-178.
15. Naseer, U. et A. Sundstjord The CTX-M Conundrum: Dissemination of Plasmids and E. coli clones. – Microbial Drug Resistance, 17, 2011, 183-197.
16. Paterson, D. et R. Bonomo. ESBL's: a Clinical update. – Clin. Microbiol. Rev., 18, 2005, 657-686
17. Philippon, A., G. Aralet et G. Jacoby. Plasmid-Determind AmpC Typeβ Lactamases. – Antimicrob. Agents Chemother., 46, 2002, 1-11.
18. Pitout, J. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices. – Drugs, 70, 2010, 313-33.
19. Versalovic, J., T. Koeuth et J. Lupski. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. – Nucleic Acids Res., 19, 1991, 6823-6831.

Постъпила за печат на 3 януари 2012 г.

КАРДИОЛОГИЯ

Под ред. на проф. д-р Младен Григоров.
С., БКИ, 2010, 984 с.

В предлагания учебник авторите са се постарали да предоставят на читателя общоприетите разбирания за основните заболявания в кардиологията. По дидактически съображения са избегнати многобройните цитирания на противоречиви мнения и проучвания, при съобразяване с посочената в книгописа и останалата извън него литература.

Книгата е предназначена за кардиолози, интернисти, кардиохирурзи, анестезиолози и други медицински специалисти.