



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ

Петя Борисова Станкова

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

Автореферат

На дисертационен труд

За придобиване на научна и образователна степен „Доктор”

Научна специалност „Микробиология”

Научни ръководители:

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

София

2020

Авторът е редовен докторант към Катедра "Медицинска микробиология", Медицински факултет, Медицински университет - София.

Дисертационният труд е с обем 168 стандартни страници. Работата е онагледена с 31 фигури и 22 таблици. Библиографията включва 300 литературни източници, от които 1 на кирилица и 299 на латиница.

Експерименталната работа е извършена в Катедрата по медицинска микробиология, МФ, МУ-София, Центъра по молекулна медицина, МУ-София.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от Катедрен съвет на Катедра "Медицинска микробиология", състоял се на 08.09.2020г.

Научно жури:

Проф. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм, Катедра по микробиология и вирусология, МУ-Варна

Проф. д-р Грозданка Томова Лазарова, дмн, Катедра по микробиология и паразитология, МФ, Тракийски университет-Стара Загора

Доц. д-р Иван Николаев Иванов, дб – НЦЗПБ – София

Проф. д-р Райна Цветанова Гергова, дм, Катедра по медицинска микробиология, МФ, МУ-София

Проф. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, дм, Катедра по медицинска микробиология, МФ, МУ-София

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 30.11.2020г. отчаса в Първа аудитория на Медицински факултет.

Благодарност

Бих искала да изкажа сърдечни благодарности на научните си ръководители:

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

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

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

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

Мамо, благодаря ти за всичко!

Съдържание:

1. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	9
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	10
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	12
5. ИЗВОДИ.....	60
6. ПРИНОСИ.....	62
7. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	64
8.УЧАСТИЯ В СИМПОЗИУМИ И КОНГРЕСИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	64

Използвани съкращения:

ACC β -лактамази- Ambler class C-1	EUCAST- European Committee on
AMI -amikacin	Antimicrobial Susceptibility Testing
Amp C - Extended-spectrum cephalosporin-resistant class C	ExPEC- екстраинтестинални патогенни <i>Escherichia coli</i>
APBA -аминофенил борна киселина	ESBL - Extended spectrum beta-lactamase
ATCC - American Type Culture Collection	ESKAPE- <i>Enterococcus faecium</i> ,
AUG – amoxicilin/clavulanic acid	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ,
BD - Becton, Dickinson and Company	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas</i>
CAZ – ceftazidime	<i>aeruginosa</i> u <i>Enterobacter spp.</i>
CC – клонален комплекс	ETEC – Ентеротоксигенни <i>Escherichia coli</i>
CDT- комбинираня диск тест	FEP - cefepime
CFU - Colony-forming unit	FOS - fosfomicin
CHL - chloramphenicol	FOX - cefoxitin
CIP – ciprofloxacin	GEN - gentamicin
CLSI- Clinical & Laboratory Standards Institute	GES - Guiana extended spectrum
CLX - cloxacillin	IBC - Integron borne cephalosporinase
CMY-class C active on cephamycins	IEF - Isoelectric focusing
COL- colistin	IMI - Imipenem–hydrolyzing β -lactamase
CTX – cefotaxime	IMP – Imipenem
CTX-M - Cefotaxime–hydrolyzing β -lactamase	IRT - Inhibitor-resistant β -lactamases
DDM - Disk diffusion method	KPC – <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
ddNTP - Dideoxynucleotide triphosphates	LB - Luria Berthrani broth
DDST - Double-disk synergy test	LEV - Levofloxacin
dNTP – Deoxynucleotide triphosphate	LT – Thermolabile
DPA - дипиколинова киселина	MALDI-TOF- Matrix-assisted laser
EAEC – Дифузно-адхерентни <i>Escherichia coli</i>	desorption/ionization
ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control	MBLs - Metallo- β -lactamases
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid	MDR- Multidrug resistance
EPEC – Ентеропатогенни <i>Escherichia coli</i>	MER - Meropenem
ERIC-PCR-Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction	MIC- Minimum Inhibitory Concentration
Information	MLST -Multi Locus Sequence Typing
NDM - New Delhi metallo- β -lactamase	NCBI - National Center for Biotechnology
	ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина
	МБАЛ-многопрофилна болница за активно

NIT – Nitrofurantoin	лечение
NMC-A - not metalloenzyme carbapenemase	МДЛ-Медико-диагностична лаборатория
OXA - Oxacillin–hydrolyzing β -lactamase	МНТ -Модифициран Hodge-test
PBA - фенил борна киселина	МЦ- Медицински център
PCR - Polymerase Chain Reaction	НЦЗПБ-Национален център по заразни и паразитни болести
PER – <i>Pseudomonas</i> extended resistant	УМБАЛ- Университетска многопрофилна болница за активно лечение
pI – Isoelectric point	УМБАЛСМ- Университетска многопрофилна болница за активно лечение и спешна медицина
PIP/TAZ – Piperacillin/tazobactam	5NO- nitroxoline
R+ - трансконюгант	
rRNA- Ribosomal ribonucleic acid	
SHV- sulf-hydryl variable active site	
SME - <i>S. marcescens</i> enzyme	
SPM - SuperPolymyxin Medium	
SXT- co-trimoxazole	
SHEC – Ентерохеморагични <i>Escherichia coli</i>	
TEM- Temoniera enzyme	
TIGE- tigecycline	
TOB - tobramycin	
VIM- Verona integron metalo- β -lactamase	

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Едни от най-често изолираните микроорганизми в микробиологичните лаборатории са представителите на разред *Enterobacterales*. Те са предимно условно пагогенни и причиняват, както нозокомиални, свързани с медицинското обслужване инфекции като уроинфекции, раневи, съдечно съдови, инфекции на меките тъкани, сепсис, катетър-свързани инфекции, пневмония, така и инфекции в обществото. Като облигатно патогенни ентеробактериите се асоциират с диарийни заболявания, чернодробни абсцеси, дизентерия, хранителни токсикоинфекции, коремен тиф и др. В резултат на увеличения селективен антибиотичен натиск в болниците и обществото, както и проблемите с контрола на вътреболничните инфекции, в последните години една от най-големите опасности за общественото здраве и човечеството въобще, е нарастващата антибиотичната резистентност на клинично-значимите микроорганизми. Съществува реалната опасност за връщане към предантибиотичната ера като едни от най-засегнатите представители са ентеробактериите. Бета-лактамите, с тяхната добра поносимост, бактерициден ефект и широк спектър са най-често използваните антибиотици. Това обуславя лесното и бързо възникване на резистентност. Най-честият механизъм на устойчивост при тях е продукцията на ензими, които ги разграждат (бета-лактамази). Най-проблемни са тези, които повлияват цефалоспорините трета генерация (широко-спектърни бета-лактамази (ESBL)) и карбапенемите (карбапенемази). Продуцентите на карбапенемази и широкоспектърни бета-лактамази от сем. *Enterobacteriaceae* се доказват с нарастваща честота в целия свят (Ghafourian et al., 2015). ESBL продуцентите са най-често резистентни на всички бета-лактами, с изключение на карбапенемите и комбинациите с инхибитор, а произвеждащите карбапенемаза, обикновено на всички бета-лактами. Голям терапевтичен проблем е локализацията на гените, кодиращи ги на мобилни генетични елементи като транспозони, интегрони, конюгативни плазмиди, заедно с гени за устойчивост към други групи като аминогликозиди, хинолони и антифолатни агенти (Brolund A et al., 2016). Това води до появата на изключително резистентни и панрезистентни изолати, които бързо се разпространяват. Допълнителен проблем представлява затрудненото откриване на продуцентите на тези ензими. В Европа процентите на продуцентите на ESBL се различават значително за *E. coli* и *K. pneumoniae* в зависимост от регионите, с много ниски проценти, наблюдавани в страните от Северна Европа и много по-високи проценти, наблюдавани в Източна и Южна Европа държави (Jones RN et al., 2014). По най-нови данни от 2018г на European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), (ECDC, 2018) разпространението на резистентни на трета генерация цефалоспорини за *E. coli*, България е на първо място с 38.7%, следвана от Кипър - 37.1% и Италия - 28.7% (ECDC, 2018). Резистентността към цефалоспорини трета генерация при инвазивни *K. pneumoniae* отново ни поставя на първо

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

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

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

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Бактериални изолати

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

Проучването обхващаше периода 12.2017 - 12.2018г.

3.2. Идентификация на чревните изолати

Биохимичната идентификация на включените в проучването щамове беше осъществена чрез конвенционални тестове и потвърдена с идентификационни панели на системите Phoenix 100 (Becton Dickinson) и MALDI-TOF (Biomerieux). Молекулярно – генетичният метод *hsp60* секвениране, бе използван за определяне видовата принадлежност на проучваните клинични изолати в *E. cloacae* complex, *Citrobacter spp.* и *Klebsiella spp.* (Hoffmann H&Roggenkamp A, 2003).

3.4. Методи за определяне на чувствителността към антимикробни средства

3.4.2. Дифузионно-дисков метод на Bauer-Kirby

3.4.3. Определяне на MIC чрез градиентен MIC метод

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

3.4.5. Определяне на MIC на Colistin чрез (Liofilchem, Italy)-SensiTest Colistin

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

3.5.1. Фенотипни методи за доказване на продуценти на широкоспектърни бета-лактамази – двойно-дисков синергичен тест

3.6. Фенотипни методи за доказване на продуценти на карбапенемази

3.6.1. Модифициран Hodge-test (МНТ)

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

3.7. Методи за доказване на хиперпродукция на AmpC ензими

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

3.8.1. Полимераза-верижна реакция (PCR)

3.9. ДНК секвениране

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

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

3. 10. Епидемиологично типизиране

3.10.1. ERIC-PCR

3.10.2. Мултилокусно секвениране Multi Locus Sequence Typing (MLST) – за *E. coli* беше използвана схемата на Achtmann, за *E. cloacae* и *K. pneumoniae* схемата на Pasteur

3.10.3. Доказване на O25b-ST131 клона при изолатите *E. coli* (Clermont O et al., 2009)

3.10.4. Филотипиране на изолатите *E. coli* (Clermont O et al., 2003)

3.11. Статистически анализ

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Бактериални изолати

За периода 12.2017-12.2018г беше изследвано чревното носителство на суспектни за продукция на ESBL/карбапенемаза изолати при 1297 лица от София, Пловдив, Плевен, Варна и Бургас. Разпределението на пациентите и съответния брой изолати по здравни лечебни заведения и вида на изследваните - хоспитализирани пациенти или здрави индивиди - е представено на **Табл. 1**.

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

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

Таблица 1. Разпределение на пациентите и съответния брой изолати по лечебни заведения и вида на изследваните (хоспитализирани пациенти или здрави индивиди, деца или възрастни)

Лечебно заведение/МДЛ	Общ брой изследвани	Брой (възрастни и/деца)	Брой хоспитализиран и/зdravi	Брой изолати
МБАЛ "Света Марина" Варна	158	158/0	158/0	61
УМБАЛ д-р Г. Странски-Плевен	71	3/68	71/0	25
МЦ "Екзакта Медика" - Плевен	126	65/61	0/126	22
УМБАЛ "Св.Георги" - Пловдив	102	4/98	102/0	58
МДЛ "Лина" - Бургас	244	244/0	0/244	36
УМБАЛ "Александровска" София	120	120/0	120/0	28
П-ра МБАЛ - София	82	82/0	82/0	21
УМБАЛ СМ "Н.И. Пирогов"	47	47/0	47/0	12

МДЛ"Медирс"-София	170	0/170	0/170	49
МЦ"Торакс"-София	52	0/52	0/52	6
МДЛ"Лора"-София	125	0/125	0/125	28
Общо	1297	723/574	580/717	346

4.2. Видова идентификация

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

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

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

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

4.3. Молекулярно-генетична идентификация с *hsp60* секвениране

Беше направено и сравнение на идентификацията чрез MALDI-TOF с молекулярно-генетична идентификация чрез *hps60* секвениране. Бяха тествани всичките изолати от *Enterobacter cloacae complex* n=24, *Citrobacter freundii complex* n=16, както и *K. oxytoca* изолатите. При всички *C. freundii complex* изолати беше потвърдена принадлежността към *C. freundii complex* групата. При три изолата беше установена специфичния вид от тази група – *Citrobacter braakii*, но за улеснение в настоящото проучване ще запазим името *C. freundii complex*. Молекулярно-генетичната идентификация установи наличието на 4 вида *Enterobacter* – *E. hormaechei* n=19, *E. soli* n=1, *E. kobei* n=1, *E. asburiae* n=3. От тях само *E. soli* не влиза в групата на *E. cloacae complex*. При 19-те *E. hormaechei* изолати бяха установени три подвида както следва:

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

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

E. hormaechei spp. *xiangfangensis* – 2 изолата

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

Финалното разпределение на изолатите по видове беше следното: *Klebsiella spp.* (84) (*K. pneumoniae* n=74, *K. oxytoca* n= 7, *K. michiganensis* n=3), *E. coli* (213), *Enterobacter spp.* (24), *Citrobacter spp.* (16), *M. morgani* (5), *H.alvei* (4). **Таблица 2** показва разпределението на видовете, според мястото, от където са изолирани, респ. по лечебни заведения.

Таблица 2. Разпределение на изолатите по видове и лечебни заведения

Център	<i>Eco</i> (213)	<i>Kleb</i> <i>spp.</i> (84)	<i>Ent</i> <i>spp.</i> (24)	<i>Cit</i> <i>spp.</i> (16)	<i>Mm</i> (5)	<i>Hal</i> (4).
МБАЛ "Света Марина" Варна	34	15	6	4	2	0
УМБАЛ д-р Г.Странски-Плевен	16	8	3	0	0	0
МЦ "Екзакта Медика"-Плевен	14	2	4	1	0	0
УМБАЛ,,Св.Георги"-Пловдив	25	26	2	5	0	0

МДЛ„Лина”- Бургас	31	2	1	2	0	0
УМБАЛ”Александровска” София	16	7	3	1	1	0
П-ра МБАЛ-София	11	8	2	0	0	0
УМБАЛСМ”Н.И. Пирогов”	2	10	0	0	0	0
МДЛ”Медирс”-София	39	5	1	2	2	0
МЦ”Торакс”- София	5	0	0	0	0	1
МДЛ”Лора”- София	20	2	2	1	0	3

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

Обсъждане

Процентът на установените цефалоспорин трета генерация резистентни изолати, 27% (346 от 1297), беше сравнително висок. Той е сходен с този, установен при подобно проучване в Португалия (Aires-de-Sousa M et al., 2019) и е много по-висок от нивата (около 10%) в подобни проучвания в други европейски страни (Strömdahl H et al., 2011; Schoevaerdt D et al., 2012; Otter JA et al., 2019; Díaz-Agero Pérez C et al., 2019; Hamprecht A et al., 2016; Platteel TN et al., 2015). Резултатите показват наличието на висок риск от разпространение на проблемни изолати в болниците и в обществото и потвърждават факта, че чревния тракт е значим резервоар на ESBL/карбапенемаза продуценти. Увеличаването на цефалоспорин трета генерация резистентните изолати в чревния тракт може да се обясни и с нарастването на общата антибиотична консумация в България и по специално на тази на цефалоспорините, тя е на трето място в Европа (ECDC. Antimicrobial consumption in Europe. 2018). Увеличената употреба на цефалоспорини, предимно трета генерация се наблюдава не само в болниците, но и в обществото, особено след въвеждането на таблетната форма на cefixime (напр. Pancef като търговско наименование) и cefprozime. Необходимо е внимателно да се прецизира терапията с цефалоспорини трета генерация и хинолони, за да се намали рискът от увеличаване на нивото на тези продуценти.

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

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

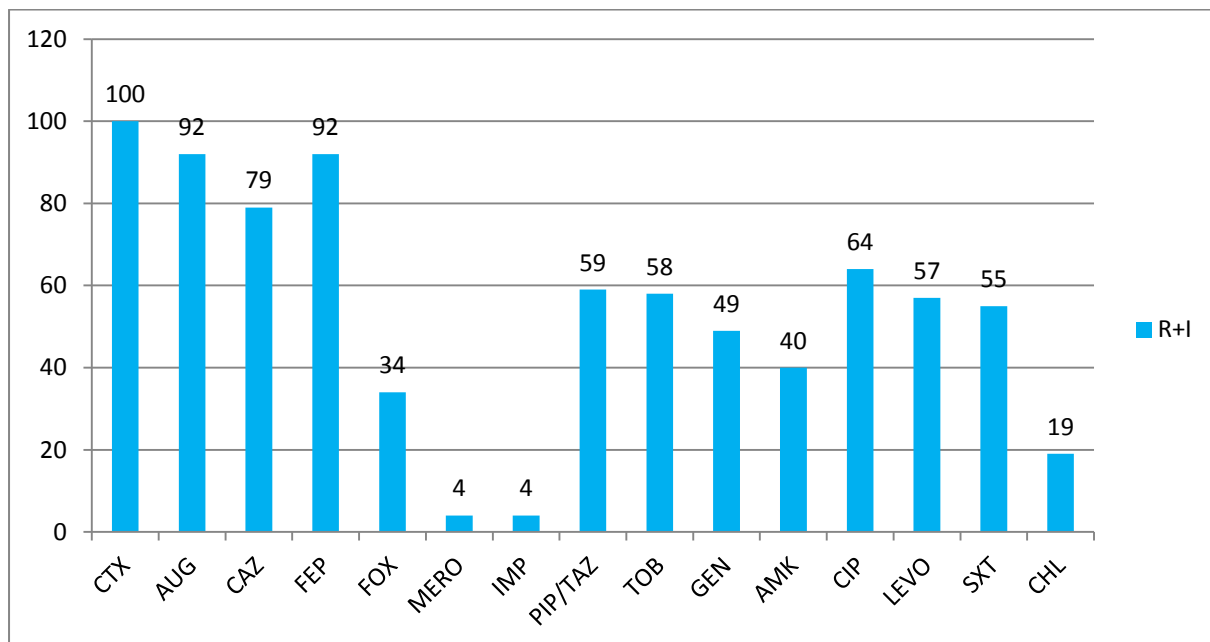
Заклучение

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

4.4. Чувствителност

Чувствителността на 346 изолата ентеробактерии, резистентни на цефалоспорини трета генерация, за периода 2017/2018 г., е показана на **Фиг. 1**.

Устойчивостта към всички тествани цефалоспорини трета генерация беше между 79 - 100%. Резистентността към amoxicillin/clavulanic acid беше 92%, а към ciprofloxacin и levofloxacin 64% и 57%, съответно. Нива на устойчивост към аминогликозиди бяха 40% - 58%, към trimetoprim/sulfomethoxazole - 55% и към piperacillin/tazobactam – 59%. Четиринадесет изолата бяха резистентни на карбапенеми (4%), 13 *K. pneumoniae* и 1 *E. coli*. При определянето на чувствителността бяха открити още 25 изолата с интермедиерни нива на чувствителността само към imipenem (5 *K. pneumoniae*, 7 *E. coli* и 7 *Enterobacter spp.*, 5 *S. freundii* complex и 1 изолат *M. morgani*, с вродена AmpC продукция), като зоните бяха по-малки от таргетните cut-off стойности за imipenem, но с модифицирания Hodge тест и дисковете KPC&MBL&OXA-48 disk kit (Liophilchem, Italy) те не бяха доказани като възможни карбапенемаза продуценти (виж точка 4.6).



Фигура 1. Антимикробна устойчивост в % (R+I) при всички 346 изолата, резистенти на цефалоспориини трета генерация, установена чрез дисково – дифузионен метод

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

От **Фиг.1.** се вижда, че при изследваните щамове, устойчивостта към всички тествани цефалоспориини трета генерация е висока, което отговаря на критериите за селекция на изолатите. Резистентността към cefepime и amoxicillin/clavulanic acid също беше много висока. Установява се сравнително висока устойчивост към аминогликозиди и към piperacillin/tazobactam. Резултатът е интересен, защото този антибиотик се препоръчва от някои проучвания в случаите на инфекции, причинени от ESBL продуценти (Sharara S et al., 2019). Получените данни показват, че той може да се използва само, ако имаме потвърждение на чувствителността на съответния изолат. Щамовете са загубили във висока степен и чувствителността си към trimetoprim/sulphamethoxazole - 55%.

Устойчивостта към ciprofloxacin - 64% и levofloxacin - 57% е важен показател, поради значимостта на флуорохинолоните за терапия на инфекции, причинени от широк спектър микроорганизми, както и наличието на кръстосана резистентност между всички флуорохинолони. Поради анатомичните особености на жените, чревните изолати лесно могат да причинят уроинфекции. Хинолоните са на едно от първите места за лечение на неусложнени уроинфекции в обществото. Сравнително високите нива на резистентност към тази група при чревните носители би представлявало терапевтичен проблем. Това налага прецизиране на терапията и задължително установяване на чувствителността на изолатите преди започване на терапията. Високата устойчивост към не-бета-лактамните антибиотици (флуорохинолони, аминогликозиди и co-trimoxazole) се обяснява с факта, че гените за ESBL

обикновено са разположени на плазмиди, носещи и други гени за устойчивост, напр. за аминокликозид-модифициращи ензими и *qnr* гени (Jacoby GA et al., 2014). Всеки един представител на тези групи може да упражни селективен натиск. Употребата и на флуорохинолони в България е висока, тя е на четвърто място в Европа (ECDC. Antimicrobial consumption in Europe. 2018).

От голямо значение е и установената резистентност към карбапенеми – 4% (14/346). Това е групата, която се използва като последно средство на избор при животозастрашаващи инфекции, причинени от ESBL продуценти и наличието на такъв тип устойчивост е голям проблем за терапията, тези щамове са обичайно резистентни на повечето групи антимикробни средства, с изключение на colistin, tigecycline и евентуално fosfomycin (iv приложение). Резистентността към карбапенеми в света се увеличава през последните десетилетия, като основната причина за това са нарастващото разпространение на карбапенемаза продуциращите ентеробактерии. Чревният тракт е един от важните фактори за това разпространение. Много висок процент карбапенемаза продуценти (51.3%) се установява при хоспитализирани пациенти в Гърция за периода 2010г.-2012г – с преобладаване на KPC продуцентите - в 57% (Pournaras S et al., 2013). При двумесечно проучване върху пациенти в португалска болница, се установява, че разпространението на продуцентите на карбапенемаза-резистентни изолати е 3% (Aires-de-Sousa M et al., 2019). Извън Европа честотата на чревна колонизация с карбапенемаза продуценти е много по-висока, както за болниците, така и за обществото. При проучване на чревното носителство в Мароко са установени 14% карбапенем-резистентни ентеробактерии (Girlich D et al., 2013). В Китай се установява 8.5% карбапенем-резистентни ентеробактерии, в болниците (Liu Q et al., 2019). По-висок процент се установява в Израел за 2011г – 12% карбапенем резистентни ентеробактерии (Ben-David D et al., 2011). В болница в САЩ са установени 18.9% носители на карбапенем резистентни ентеробактерии (Prasad N et al., 2016). Трябва да се има предвид, че често фекалното носителство продължава много дълго време, включително няколко години. Нивата на колонизация с ESBL и карбапенемаза продуценти дава представа за разпространението на тези ензими. При всяко постъпване в болница на такива хора може за започне разпространението на вътреболнична инфекция (Woerther PL et al., 2013).

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

В **Таблица 3** се сравняват нивата на устойчивост от двата периода. Статистически

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

Таблица 3. Сравнение нивата на устойчивост от двата периода

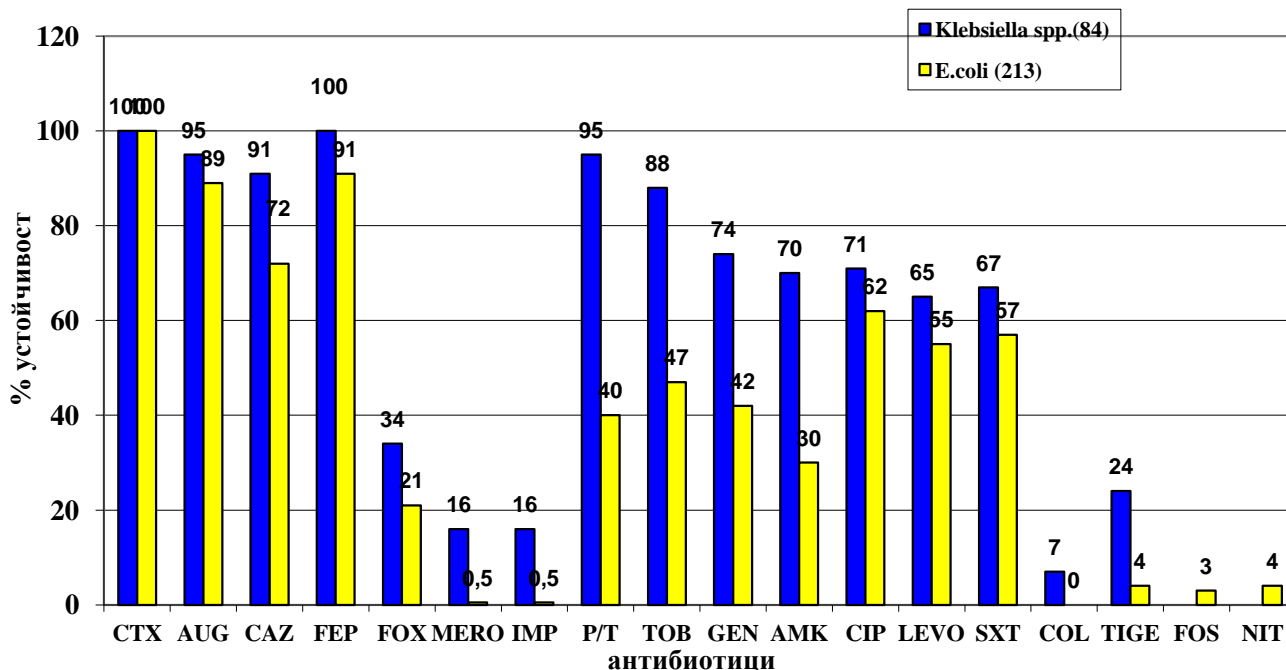
Антибиотик	2014 - % I+R	2017/2018- % I+R	p
cefotaxime	100	100	1.0
amox/clavulanic acid	56	92	<0.0001
ceftazidime	80	79	0.9595
cefepime	69	92	<0.0001
cefoxitin	11	34	<0.0001
meropenem	3	7	0.1703
imipenem	3	7	0.1703
piper/tazob	39	59	0.0002
tobramycin	57	58	0.8052
gentamicin	53	49	0.5623
amikacin	21	40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

4.4.1. Антимикробна устойчивост, разпределена по видове бактериални изолати

Анализът на антимикробната устойчивост на изолатите *Klebsiella spp* (n=84) и *E. coli* (n=213), показва значително по-високите нива на резистентност при почти всички изследвани групи антимикробни средства при *Klebsiella spp.*, особено по отношение на карбапенемите, аминогликозидите и piperacillin/tazobactam (Фиг 2).

Изолатите *E. coli* бяха с много висока чувствителност към tigecycline (96%), карбапенеми (99.5%), colistin (100%), както и към fosfomycin (97%) и nitrofurantoin (96%). Изолатите *E. coli* и *Klebsiella spp.* бяха посявани на селективната скрийн среда SPM (Фиг. 3) и установихме, че само 12 от изолатите *Klebsiella spp* растат на средата, като 6 от тях само с 1 колония. Всички изолати растящи на тази среда бяха тествани със SensiTest Colistin

(Liofilchem, Italy). Всички изолати, показали наличие на 1 колония, бяха чувствителни на colistin с MIC ≤ 1 mg/L. Само 6 изолата *K pneumoniae* (7%), всички карбапенем резистентни, показаха MIC от 6 mg/L до >32 mg/L (Фиг. 4)



Фигура 2. Антимикробна устойчивост в % (R+I) при изолатите *E. coli* (213) и *K. pneumoniae* (84), резистентни на цефалоспоринови трета генерация

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



Фиг.3 Селективната скрийн среда SPM



Фиг. 4 Определяне на MIC на Colistin чрез SensiTest

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

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

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

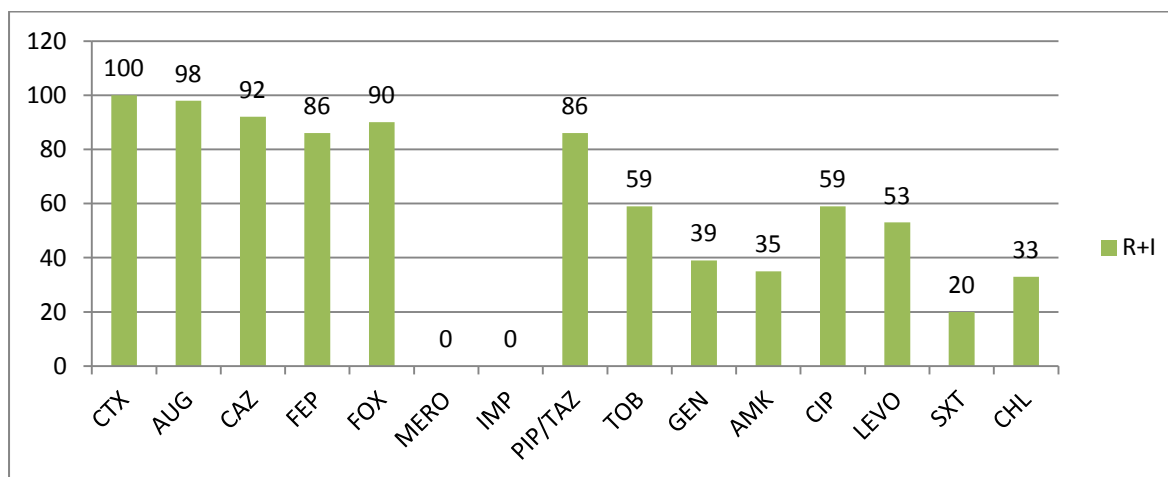
При предишно проучване от 2014г. бяха установени нивата на устойчивост на клинично значими изолати *K. pneumoniae* (n=108) и *E coli* (n=124), колекционирани от седем медицински центъра (София, Варна, Плевен, Пловдив и Стара Загора) (Markovska R et al., 2018). Сравнението на чувствителността на чревните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

Устойчивостта при изолатите *Klebsiella spp.* е статистически по-висока от тази при *E. coli*, като най-значима е разликата по отношение на карбапенемите, piperacillin/tazobactam и аминогликозидите - **Таблица 4.**

Таблица 4 .Сравнение на нивата на устойчивост на *E. coli* и *Klebsiella spp.*

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

Фиг. 5 показва антимикуробната чувствителност на изолатите *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella morganii* и *Hafnia alvei*.



Фиг. 5 Антимикуробна устойчивост в % при *Enterobacter spp.* (24), *Citrobacter spp.* (16), *Morganella morganii* (5), *Hafnia alvei* (4), (установена чрез дисково – дифузионен метод

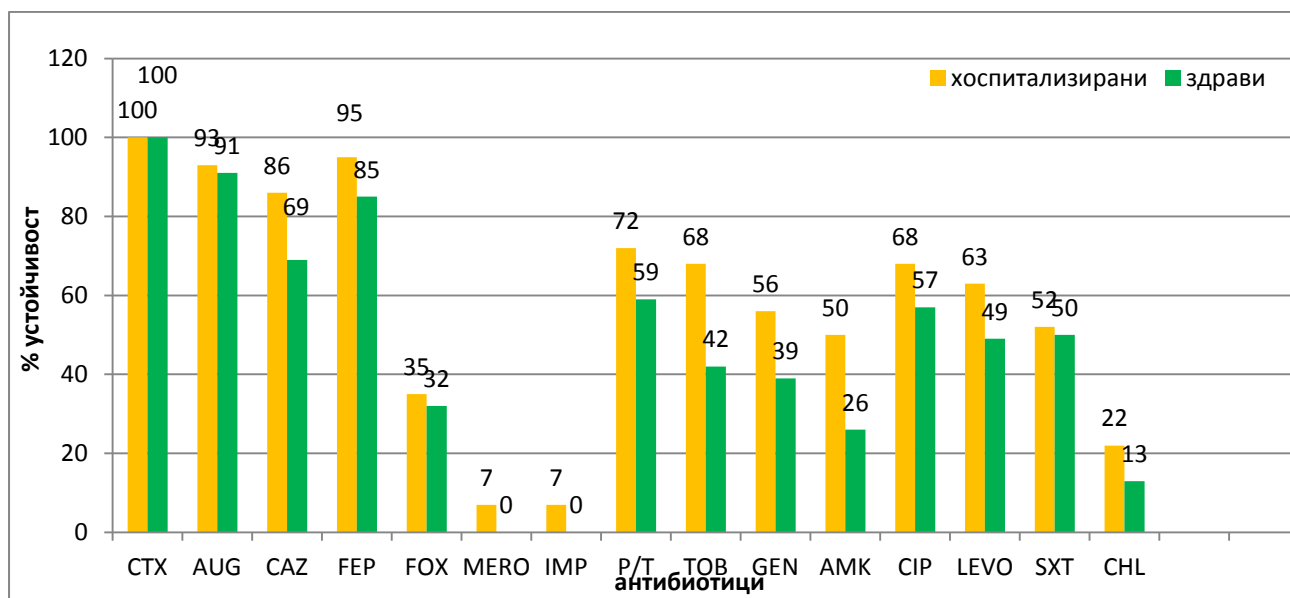
Легенда: cefotaxime (CTX), amoxicilin/clavulanic acid (AUG), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), cefoxitin (FOX), meropenem (MERO), imipenem (IMP), piperacillin/tazobactam (PIP/TAZ), tobramycin (TOB), gentamicin (GEN), amikacin (AMI), ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LEVO), co-trimoxazole (SXT), chloramphenicol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

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

4.4.2. Устойчивост на бактериалните изолати при хоспитализирани пациенти и здрави индивиди

Устойчивостта на изолатите от хоспитализирани пациенти спрямо изолатите от изследваните здрави индивиди е представена на **Фиг.6**. Резистентност към карбапенеми беше установена само при хоспитализираните пациенти – 7% (14/206).

Анализът на антибиотичната чувствителност според произходът на материалите демонстрира по-висока устойчивост при изолатите от хоспитализирани пациенти спрямо изолатите от изследваните здрави индивиди (**Фиг.6**). Сериозен проблем представлява намалената чувствителност към карбапенеми, установена при хоспитализираните пациенти – 7%. По-високите нива на резистентност при хоспитализираните пациенти, вероятно се обуславя от разпространението на клонални изолати в болниците на фона на селективния антибиотичен натиск. Спазването на мерките за контрол на инфекциите е съществено за предотвратяване на разпространението на тези проблемни микроорганизми. Проблем представлява и факта, че колонизацията на чревния тракт се задържа много дълго време, дори и над 1 година (Woerther PL et al., 2013), тоест след изписване от болницата пациентите стават източници на резистентни ентеробактерии, напр. в семейството (Hilty M et al., 2012).



Фиг. 6 Антимикробна устойчивост в % общо при хоспитализирани/здрави (206/140), установена чрез дисково – дифузионен метод

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

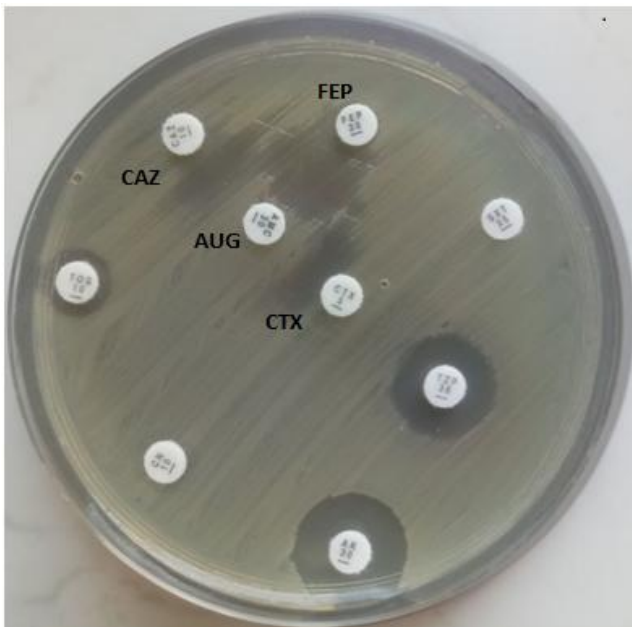
В литературата се предлагат много схеми за ерадикация на колонизацията с ESBL/карбапенемаза продуценти – използването на нерезорбиращи антибиотици като аминогликозиди и colistin показат добри краткосрочни резултати, но повечето хора остават носители в края на първата година (Siegel JD et al., 2007).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

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

4.5 Сравнение на фенотипни методи за определяне на продукцията на широкоспектърните β – лактамази

4.5.1 Двойно – дисков синергичен метод (DDST)

При DDST метод с дискове CAZ, CTX и FEP, разположени на 20 мм от диска AUG, беше установен синергичен ефект – **Фиг. 7** с поне един от дисковете при 261 от проучените изолати (75.7%). От последващите проучвания бяха установени 269 ESBL продуцента (виж. т. 4.8), като при 261 от тях беше установен синергичен ефект с дисковете, указани от EUCAST. Резултатите показват отлична чувствителност на метода - 97%. Осемте изолата без синергизъм бяха – 1 *M. morgani*, 1 *C. freundii*, 2 *E. cloacae* complex, 2 *K. oxytoca* и 2 *K. michiganensis*. При всички карбапенемаза продуценти (виж. т. 4.8) липсваше синергизъм. От 24 *E. coli* и 1 *K pneumoniae* продуценти на плазмидни Amp^C ензими, 20 бяха само с установен антагонизъм и 4 без синергизъм/антагонизъм.



Фиг. 7 Синергичен ефект с CTX, FEP и CAZ

4.6 Фенотипни методи за определяне на продукцията на карбапенемази

4.6.1. . Модифициран Hodge-test (МНТ)

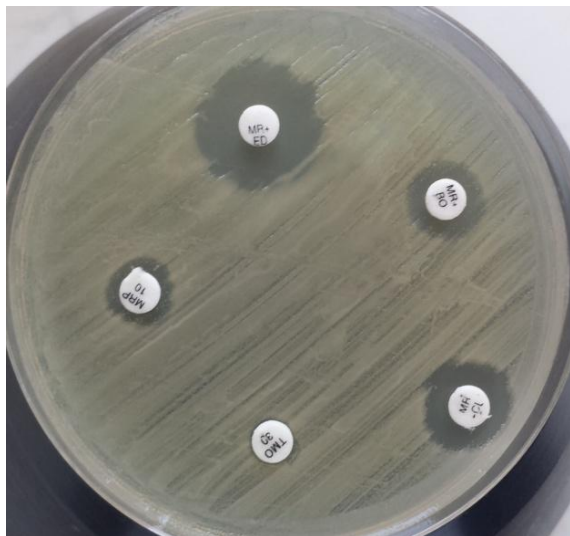
При 2 *K.pneumoniae* и 1 *E.coli* резистентни към имипенем и меропенем, Hodge теста беше положителен – **Фиг. 8**, докато при останалите 11 *K.pneumoniae*, резистентни към имипенем и меропенем, Hodge теста беше съмнителен/слабо положителен. При 25-те изолата с намалена зона на задръжка с диска имипенем, Hodge теста беше отрицателен.



Фиг. 8 Положителен Hodge тест

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

При 11 от карбапенем-резистентните изолати *K.pneumoniae*, суспектни за продукция на карбапенемаза, се установи наличие на метало бета-лактамаза, имаше увеличение на зоната на диска меропенем с EDTA с ≥ 5 мм, в сравнение с диска меропенем. (Фиг. 9). При 3 от изолатите (2 *K. pneumoniae* и 1 *E. coli*) имаше увеличение на зоната с ≥ 4 мм при диска с борониева киселина спрямо диска меропенем, касаеше се за карбапенемази от клас А. OXA-48 продуценти не се доказаха. При 25-те изолата с намалена зона на задръжка само около диска иміренем комбинираните дискове не показаха наличие на карбапенемаза.



Фиг. 9 Положителен тест за MBL

Заклучение

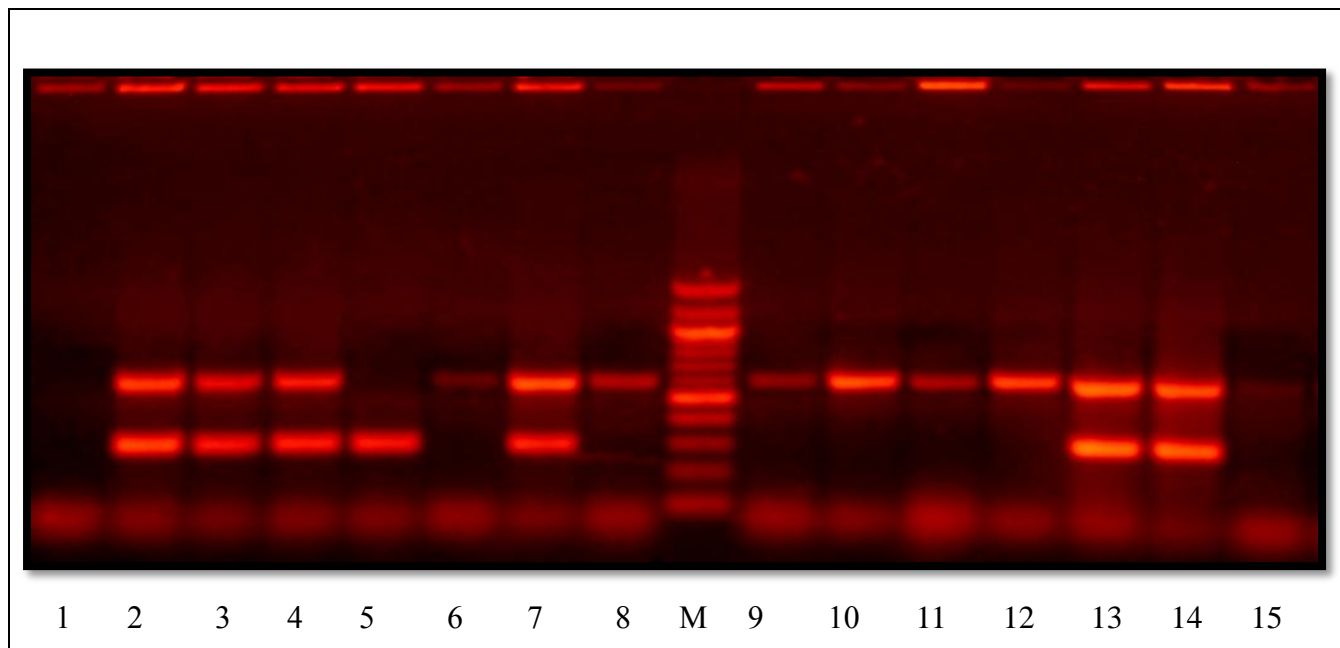
Дифузионно-дисковия синергичен метод с по-ниска концентрация на дисковете, съобразно изискванията на EUCAST и разстояние между тях 20мм работи много добре за откриване на ESBL продуценти, с чувствителност 97%.

4.7 Охарактеризиране на групите ESBL, CARBA, AmpC ЧРЕЗ PCR

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

Всички изолати бяха тествани чрез Multiplex PCR за *bla*_{CTX-M} и *bla*_{SHV}. Размерите на амплифицираните продукти бяха 585bp за *bla*_{CTX-M} и 297 bp за *bla*_{SHV}. От тестваните 346 изолата, 278 (80%) бяха положителни за *bla*_{CTX-M}, а 76 (22%) бяха положителни за *bla*_{SHV} (Фиг. 10). Те включваха всички изолати *K. pneumoniae* и два изолата *E. coli*. *K. oxytoca* и *K. michiganensis* изолатите бяха отрицателни за SHV ензими. Положителните за CTX-M ензими изолати бяха тествани с праймери за отделните групи CTX-M, като 212 изолата бяха положителни със CTX-M-P1/P2 праймерите и дадоха положителна реакция (~1100bp сегмент),

което доказва наличието на СТХ-М 1-ва група, докато 52 изолата бяха положителни с СТХ-М-9 груповите праймери (~ 1000bp сегмент).



Фиг. 10 Агарозна електрофореза на PCR продукти, след полимеразо-верижна реакция с *bla_{SHV}* *bla_{CTX-M}* специфичен праймер

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

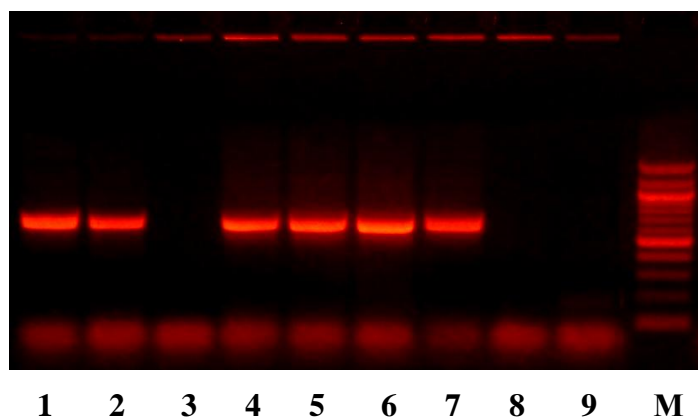
Бяха направени и PCR-и за охарактеризиране на *bla_{TEM}* и *bla_{OXA}* на всички изолати, като размерите на амплифицираните продукти бяха 1075bp за *bla_{TEM}* и 1000bp за *bla_{OXA}*. Сто двадесет и един изолата (35%) бяха положителни за TEM, а 67 (19%) за OXA III група типове специфични праймери.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

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

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

Всички изолати с намалена чувствителност към дисковете imipenem и meropenem (n=39) бяха тествани чрез Multiplex PCR за *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* и *bla_{OXA-48}*, както и чрез Multiplex PCR за *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*. Размерите на амплифицираните продукти бяха 798bp за *bla_{KPC}*, 621 bp за *bla_{NDM}*, 438bp за *bla_{OXA-48}*, 270bp за *bla_{IMP}* и 390bp за *bla_{VIM}*. От тестваните 39 изолата, 3 бяха положителни за *bla_{KPC}*, а 11 бяха положителни за *bla_{NDM}* (Фиг. 11). Тестваните изолати бяха отрицателни за *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* и *bla_{OXA-48}*. Двадесетте и пет изолата с интермедиерна зона на диска imipenem и отрицателни за модифицирания Hodge тест и комбинираните дискове (виж т

4.6) бяха негативни и при PCR теста.

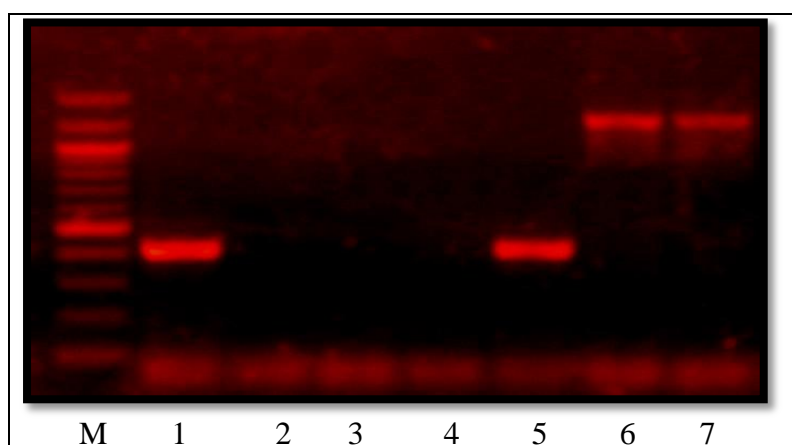


Фиг. 11 Агарозна електрофореза на PCR продукти, след полимеразо-верижна реакция с *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} и *bla*_{OXA-48} специфичен праймер

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

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

Всички изолати, при които не беше установен синергизъм или с установен антагонизъм, както и всички *E. coli* и *K. pneumoniae*, устойчиви на FOX и тези с вродена AmpC продукция (всички *Enterobacter spp*, *M. morgani*, *C. freundii* complex, *H. alvei*) бяха тествани за AmpC продукция (n=118) чрез Multiplex PCR за *bla*_{ДНА} и *bla*_{СМУ} и Multiplex PCR за *bla*_{МОХ}, *bla*_{ФОХ} и *bla*_{АСС}. Размерите на амплифицираните продукти бяха 405bp за *bla*_{ДНА}, 1226bp за *bla*_{СМУ}, 520bp за *bla*_{МОХ}, 190bp за *bla*_{ФОХ} и 346bp за *bla*_{АСС}. От тестваните 118 изолата, 26 бяха положителни за *bla*_{ДНА} (вкл. 5-те изолата *M. morgani*), 16 за *bla*_{СМУ}, 4 за *bla*_{АСС} (четири изолата *H. alvei*) (Фиг. 12).



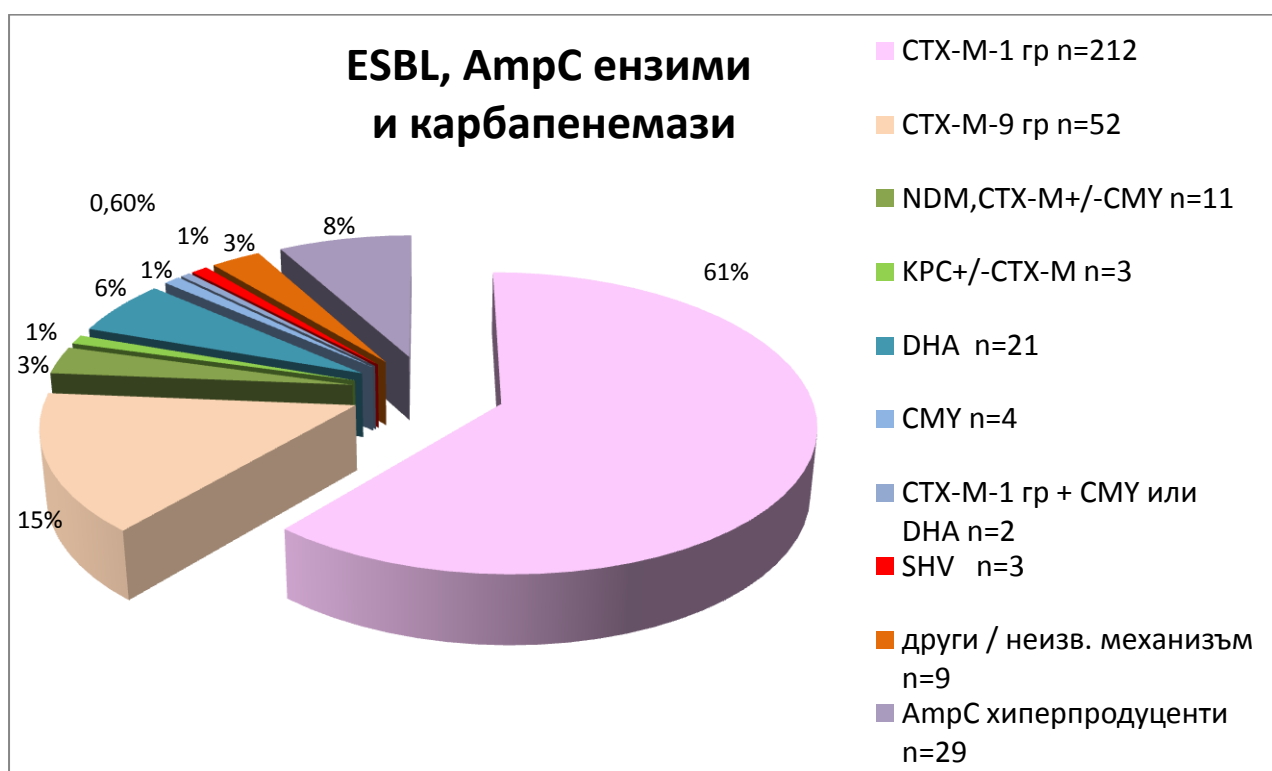
Фиг. 12 Агарозна електрофореза на PCR продукти, след полимеразо-верижна реакция с *bla*_{ДНА} и *bla*_{СМУ} специфичен праймер

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

Двадесет и два от 24-те изолата *E. cloacae* complex бяха положителни за *bla*_{ESB}, което показва наличието на MIR/ACT семейството гени (сегмент ~302 bp). При 20 от тях PCR реакцията със ACT специфични праймери даде положителен резултат (сегмент ~1100bp). Тестваните изолати бяха отрицателни за *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}.

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

Фигура 13 представя графично разпределението на основните групи ESBL, AmpC и карбапенемаза ензими при проучените 346 изолата.



Фиг. 13 Разпределение на ESBL, AmpC ензимите и карбапенемазите при установените 346 цефалоспорин резистентни изолати

4.8. Нуклеотидно секвениране

Ампликоните, получени при PCR реакциите с групово специфичните праймери бяха амплифицирани с праймери, обхващащи целия ген. На **Таблица 5** са показани резултатите от секвенционните реакции, определени при различните видове ентеробактерии. На **Таблица 6** е показано разпределението на идентифицираните бета-лактамази по бактериален вид и според произхода – хоспитализирани пациенти или здрави хора. На **Таблица 7** е показано разпределението на идентифицираните бета-лактамази по бактериален вид и според произхода – деца или възрастни. При изолатите *M. morganii* секвенирането показва наличието *bla*_{DHA-1} при 1 изолат, докато при другите бяха доказани AmpC ензими, характерни за вида *M. morganii*.

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

CTX-M-1 групата се раздели на четири подгрупи – изолати показващи наличие на *bla*_{CTX-M-15} – 136, като два от тях носеха гени за плазмидни AmpC ензими - единия *bla*_{DHA-1}, а другия *bla*_{CMY-4}. Изолатите, носещи *bla*_{CTX-M-3} бяха 70, изолатите, носещи *bla*_{CTX-M-1} – 3. Пет изолата, показаха наличието на две рI при изоелектричното фокусиране отговарящи на CTX-M-3 и CTX-M-15. Изолатите от CTX-M-9 групата също се разделиха на три подгрупи, като групите и броя изолати са, както следва - *bla*_{CTX-M-27} – 28 изолата, *bla*_{CTX-M-14} – 22 и *bla*_{CTX-M-9} – 2 изолата. Положителните за ДНА носеха *bla*_{DHA-1}, докато за CMY – *bla*_{CMY-2}. Карбапенемаза продуцентите носеха *bla*_{NDM-1} (n=11), *bla*_{KPC-2} (n=3), като при 13 от тях бяха в комбинация със CTX-M-15/CTX-M-3 ензими и/или CMY-4 (**Табл 5**). Всички изолати дали положителен резултат с OXA-III гр праймери показаха наличие на *bla*_{OXA-1}, докато положителните за TEM – *bla*_{TEM-1}. При положителните за SHV (извън *K. pneumoniae*) три изолата притежаваха *bla*_{SHV-12}, при репрезентативни изолати *K. pneumoniae* бяха секвенирани SHV ампликоните, при 20 CTX-M-3 продуцента беше установено наличие на *bla*_{SHV-1}, при CTX-M-15 продуцентите *bla*_{SHV-1} се амплифицираше при 8 и *bla*_{SHV-11} при 12. Всички продуценти на NDM-1 ензими носеха *bla*_{SHV-11}, а на KPC-2 и CTX-M-14 на *bla*_{SHV-1}.

Таблица 5. ESBLs, CARBA и AmpC ензими според бактериалните видове при изолираните 346 цефалоспорин 3-та генерация резистентни изолати

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

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

**, виж точка 4.9.

Таблица 6. ESBLs, CARBA и AmpC ензими според бактериалните видове и според произхода (хоспитализирани/зdravi хора) при изолираните 346 цефалоспорин 3та генерация резистентни изолати

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

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

**, виж точка 4.9., х – хоспитализирани, зд - здрави хора

Таблица 7. ESBLs, CARBA и AmpC ензими според бактериалните видове и според произхода (деца/възрастни) при изолираните 346 цефалоспорин 3та генерация резистентни изолати

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

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

** ,виж точка 4.9.; д–деца, в–възрастни

4.9 Охарактеризиране на групите бета-лактамази чрез изоелектрично фокусиране (IEF)

Изоелектрично фокусиране и биологичен тест бяха извършени при 52 репрезентативни щама. (*K. pneumoniae* –15 и *E. coli* –29, *E. cloacae* complex – 4, *C. freundii* complex– 3, *H. alvei* - 1), подбрани според нуклеотидното секвениране и микробния вид (Табл. 8)

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

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

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

Таблица 8. Бета лактамази, според изоелектричната им точка

Продуценти на :	Брой изследвани	Изоелектрични точки / ESBL/AmpC/карбапенемази
CTX-M-15	12	pI 8.8
CTX-M-15+CMY-4	1	pI 8.8 , 9.2
CTX-M-15+DHA-1	1	pI 7.7, 8.8
CTX-M-15like + CTX-M-3like	5	pI 8.4 , 8.8
CTX-M-1	2	pI 8.4
CTX-M-3	7	pI 8.4
CTX-M-9	2	pI 8.1
CTX-M-14	5	pI 8.1
CTX-M-27	6	pI 8.2
SHV-12	2	pI 8.2
NDM-1+CTX-M-15+CMY-4	5	pI 8.8 , 9.2
NDM-1+CTX-M-3+CMY-4	1	pI 8.4 , 9.2
NDM-1+CTX-M-3	1	pI 8.4
KPC-2	1	pI <u>6.7</u>
KPC-2 +CTX-M-15	1	pI <u>6.7</u> , 8.8
KPC-2+CTX-M-3	1	pI <u>6.7</u> , 8.4
DHA-1	3	pI 7.7
CMY-2	2	pI 9.0
AmpC хиперпродуценти	8	8.6, 8.8, 8.4
Неизвестен механизъм	9	7.8/8.0
SHV-1	2	7.6

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



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Фигура 14 Изоелектрично фокусиране

Легенда: Позиции №1 контролен шам СТХ-М-15, КРС-2,ТЕМ-1 (рI 8.8, 6.7, 5.4), Позиция 2- *K. pneumoniae*, продуцент на СТХ-М-15, СТХ-М-3 и SHV-1 с рI 8.8, 8.4 и 7.6. Позиция 3- *E. coli*, продуцент на СТХ-М-14 с рI 8.1. Позиция 4- *E. coli*, продуцент на СТХ-М-27 с рI 8.2. Позиция 5- *K. pneumoniae*, продуцент на СТХ-М-3 с рI 8.4. Позиция 6- *E. coli*, продуцент на СТХ-М-3 с рI 8.4. Позиция 7- *E. coli*, продуцент на СТХ-М-15 с рI 8.8. Позиция 8- *E. coli*, с рI 7.6. Позиция 9- *E. coli*, продуцент на ДНА-1 с рI 7.7. Позиция 10- *E. coli*, продуцент на СТХ-М-15 с рI 8.8. Позиция 11- *K. pneumoniae*, продуценти на СТХ-М-15 и СТХ-М-3 с рI 8.8 и 8.4.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Фигура 15. Биологичен тест

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

Обсъждане

Процентът на ESBL продуцентите при всички изследвани беше сравнително висок - **20.7%** (269/1297), като преобладаваха *E. coli* - **70.2%** (189/269), *Klebsiella spp.* **24.5%** (66/269), *Enterobacter spp.* 3.3% (9/26), *C. freundii* complex 3.3% (9/269), *M. morgani* 0.3% (1/269) (Табл 5.). Честотата на плазмидните AmpC ензими беше – **1.9%** (25/1297), като преобладаваха *E. coli* n= 23 (92%) и по един изолат бяха *K. pneumoniae* и *C. freundii* complex. Два изолата бяха едновременно продуценти на CTX-M и AmpC ензим. Карбапенемаза продуцентите бяха - **1%** (14/1297), предимно *K. pneumoniae* n=13 и 1 *E. coli*. Делът на ESBL продуценти в България при здравите индивиди беше **14%** (102/707), докато при пациентите в болници беше **28%** (167/590). Разликата е статистически значима с $p < 0.0001$. Карбапенемаза продуцентите също бяха изолирани само от хоспитализирани - 2% (14/580) срещу 0% (0/707). Разликата е статистически значима с $p < 0.0001$. При AmpC продуцентите не се наблюдаваха статистически значими различия - здрави хора 2.5% (18/707) срещу хоспитализирани 1.1% (7/590), като $p = 0.08$. При децата нивото на ESBL продуцентите беше статистически значимо по-високо отколкото при възрастните – **24%** (139/574) срещу **18%** (130/723) , $p=0.005$, като разлика при AmpC продуцентите не се наблюдаваше 2% (13/574) и 1.6% (12/723), $p = 0.43$. Този факт е много тревожен и може да се свърже с евентуално по-висока антибиотична употреба при децата. Чревната колонизация с ESBL продуценти в световен мащаб е по-висока в Азия и Африка (варира от 46% до 15%) и по-ниска в Централна (3%), Северна (4%), и Южна Европа (6%) и Америка (2%) (Karanika S et al., 2016). Установеното ниво на ESBL чревно носителство при хоспитализираните пациенти в България 28% е по-високо от това в други Европейски страни, като напр.: от Белгия (11.6%), Германия (9.5%), Южна Швеция (6.8%), Англия (Лондон) (9%), Испания (7.7%), Холандия (8,2%), (Strömdahl H et al., 2011; Hamprecht A et al., 2016; Schoevaerdt D et al., 2012; Otter JA et al., 2019; Díaz-Agero Pérez C et al., 2018; Platteel TN et al., 2014). Сходен на установения в България процент се докладва от автори в Португалия - **24%** сред пациенти, хоспитализирани за > 48 часа (Aires-de-Sousa M et al., 2019). Високото ниво на ESBL продуценти в чревния тракт е много важно като прогностичен маркер за развитие на инфекции в болниците и в обществото в България. Високото ниво на ESBL продуценти в болниците е в съответствие с високите нива на цефалоспорин трета генерация резистентни инвазивни изолати. Според данните на ECDC за 2018г. България е на първо място с най-висок процент ESBL произвеждащи инвазивни *E. coli* и *K pneumoniae* – 38.7% и 77.7% съответно.

По отношение на чревната колонизация на здрави хора, процентът на изолираните ESBL в другите страни в Европа е много нисък. В Унгария при здрави индивиди фекалното носителство на ESBL-продуценти е било 3% (Ebrahimi F et al., 2016). Изследване в Португалия на здрави хора е доказало фекална колонизация в 2 % (Rodrigues C et al., 2016). Носителството при здрави индивиди в изследвания, проведени в Швейцария е 5.8% (Geser N et al., 2011). В проучване сред здрави индивиди в Париж за 5-годишен период (0.6% през 2006 г. срещу 6% през 2011 г.), се наблюдава 10-кратно увеличение на процента на здрави носители на ESBL-продуциращи *E. coli* (Nicolas-Chanoine MH et al., 2013). Процентът, установен в настоящето проучване - 14% при здравите хора е много по-висок от данните за Европа и е сходен с този, получен в подобно изследване за разпространение на ESBL продуценти в Англия, който показва нива на разпространение в 11.3% (Wickramasinghe NH1 et al., 2012). Интересен факт е, че в Англия нивото на колонизация е много по-високо в обществото в сравнение с болниците – 11.3% срещу 9%. Процентът на чревно носителство на ESBL продуценти в Азиатските страни е значително по-висок, напр. в Тайланд е установен значителен брой (58.2%) на ентеробактерии, произвеждащи CTX-M бета-лактамаза (Sasaki T et al., 2010). В Китай, в провинция Фудзиен, през 2009, се установява до 50% носителство на ESBL (Li B et al., 2011). По-високия процент на чревно носителство на ESBL продуценти в болниците и обществото може да се обясни с високата употреба предимно на цефалоспоринови трета генерация. България е на трето място по употреба на цефалоспоринови (ECDC, Antimicrobial consumption, 2018г). Важно значение имат и хинолоните. Те се използват като първа линия терапия при уроинфекции. Тяхната употреба може да селектира резистентни мутанти не само по отношение на хинолоните, но и по отношение на цефалоспориновите трета генерация, поради локализацията на детерминантите на резистентност на мобилни елементи. Преобладаването на *E. coli* при чревните ESBL продуценти е добре известен факт, докладван от много автори (Strömdahl H et al., 2011; Hamprecht A et al., 2016; Schoevaerds D et al., 2012; Díaz-Agero Pérez C et al., 2018; Otter JA et al., 2019). Установеният висок процент на носителство на ESBL продуценти показва повишената възможност за развитие на инфекция в обществото, необходимо е да се вземат спешни мерки за правилна антибиотична употреба и лечение на инфекциите, особено уроинфекциите след лабораторно потвърждение на чувствителността.

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

Анализът на изолатите показва, че разпределението на доказаните ESBL/AmpC/карбапенемаза продуценти при пациенти в болниците бяха **81%** (167/205), **3%** (7/205), **7%** (14/205) от изследваните 346 изолата, докато при здравите индивиди беше **72%** (102/141), **13%** (18/141), **0%** (0/141) съответно (**Таблица 6**). Хиперпродуцентите на вродени AmpC ензими преобладаваха при здравите хора с 12% (17/141), докато при пациентите бяха 6% (12/205). Много доклади показват ролята на болниците като резервоар на гени на резистентност, на ESBL/карбапенемаза продуценти (Otter JA et al., 2019; Díaz-Agero Pérez C et al., 2018; Platteel TN et al., 2014; Aires-de-Sousa M et al., 2019). Най-вероятно в условията на засилен антибиотичен натиск в чревния тракт се селектират резистентни мутанти, също така при широкото разпространение на клонални вътреболнични щамове, чревният тракт може да се посели с резистентни бактерии и да стане източник за тяхното разпространение в самите болници и в обществото след изписването на болния. Важен е също така факта, че фекалната колонизация се задържа месеци, до години (Jørgensen S et al., 2017). В чревния тракт ESBL продуцентите на 4-тия месец са 61%, 56% на 7-мия, 48% - 10-тия месец, 39% - 13-тия месец, 19% след 2 години, и 15% след три и повече (Jørgensen S et al., 2017). Много автори докладват връзката между инфекция с ESBL продуценти и увеличена колонизация на чревния тракт с тях – напр. при уроинфекции се увеличава процентът на ESBL продуцентите във чревния тракт (Karaniка S et al., 2016; Doi Y et al., 2017). Интерес представлява преобладаването на AmpC продуцентите при здрави хора, предимно DHA-1. Този резултат е в съответствие с установеното преобладаване на AmpC хиперпродуцентите в чревния тракт на здравите хора, в сравнение с пациентите.

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

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

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

продуцирани самотоятелно, включваха предимно **ДНА-1 - 6%** (21/346) и **СМУ-2 - 1%** (4/346).

От таблицата се вижда, че 183 ESBL продуцента, 23 AmpC, един изолат произвеждащ комбинация от AmpC и ESBL и само 1 карбапенемаза продуцент (KPC-2) бяха доказани при *E. coli*, като пет изолата бяха с неизвестен механизъм на бета-лактамна резистентност. При *E. coli* преобладаваха СТХ-М-15 **43%** (91/213), СТХ-М-3 **17%** (37/213), СТХ-М-27 – **13%** (28/213) и СТХ-М-14 – **9%** (20/213). Двадесет и четири изолата (11%) бяха продуценти на ДНА-1 или СМУ-2. От тях един изолат произвеждаше едновременно ДНА-1 и СТХ-М-15 ензим и КРС-2 продуцента също произвеждаше СТХ-М-15.

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

Преобладаващия тип ESBL при фекалните изолати беше **СТХ-М-15 (39%)**, като той се асоциираше със всички видове микроорганизми без *H. alvei* (**Табл. 5**). В световен мащаб това е най-често доказан тип СТХ-М ESBL (Hu Y et al., 2020). Той принадлежи към СТХ-М-1 групата (D'Andrea MM et al., 2013). В други проучвания върху чревното носителство тази група преобладава – напр. в Белгия 75% от ензимите са от СТХ-М-1 групата (Schoevaerdt D et al., 2012), 57.9% в Англия (Otter JA et al., 2019), 52.15% в Испания (Díaz-Agero Pérez C et al., 2018), 67.3% от ензимите са от СТХ-М-1 групата в Холандия (Platteel TN et al., 2014). СТХ-М-15 ензимите се доказват за пръв път в България през 2002г (Markovska R et al, 2004), след само 2-3 години те стават преобладаващи при клиничните изолати (Markovska R et al, 2008, Markovska et al, 2014). Много важен е фактът, че установяваме продуцентите на тези ензими не само в болниците 24% (84/134), но и при здравите хора – в 15% (50/346), и при деца и при възрастни (**Таблица 6 и Таблица 7**). Този тип ензими се доказват във всички проучени лечебни заведения.

В настоящото проучване делът на СТХ-М-3 продуцентите беше 22%. Този ензим се асоциираше предимно с *K. pneumoniae*, като всички три изолата *K. michiganensis* го произвеждаха. СТХ-М-3 продуценти се изолираха предимно от пациенти, но това се свързва с факта, че *K. pneumoniae* изолатите бяха предимно от хоспитализирани (**Таблица 6 и Таблица 7**). Интерес представлява факта, че при клинични изолати *K. pneumoniae*, установени в 6 българските болници, преобладават СТХ-М-15 продуцентите (87%) и само

9% носят СТХ-М-3, докато при *K. pneumoniae* от чревно носителство преобладава СТХ-М-3 – 38% , а СТХ-М-15 бяха 32%.

Делът на представителите на СТХ-М-9 групата в нашето изследване беше 15 % (52/346), **Фиг. 13**, като основно бяха представени от СТХ-М-27 (8%) и СТХ-М-14 (6%). СТХ-М-27 се доказва за първи път в България. Появата му при изолати от чревния тракт говори за възможността да бъде установен и при клиничните изолати. Тези ензими се установяват често при чревните носители (Flament-Siomon SC et al., 2020). По-висок процент на СТХ-М-27 – 29% беше установен в Португалия (Aires-de-Sousa M et al., 2019). И в други проучвания процентното съотношение е по-високо в сравнение с нашите данни - 20.7% СТХ-М-9 в Англия (Otter JA et al., 2019), 16.8% в Германия (Hamprecht A et al., 2016). а в Холандия установения процент е по-нисък - 11 % от група СТХ-М-9 (Platteel TN et al., 2014), както и в проучване в Египет, като 4 (6.2%) от изолатите са били продуценти на СТХ-М-14 и един на СТХ-М-27 (Abdallah NM et al., 2017) и в Тайланд са били 11.0% от СТХ-М-9 групата (Sasaki T et al., 2010).

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

били продуценти на *bla*_{NDM} и 2 изолата на *bla*_{VIM} в проучване в Египет (Abdallah HM et al., 2017). В Китай се установяват 8.5% карбапенем-резистентни ентеробактерии, в болниците, предимно КРС произвеждащи ST11 *K. pneumoniae* (Liu Q et al., 2019). По-висок процент се установява в Израел за 2011г – 12% карбапенем резистентни ентеробактерии (Ben-David D et al., 2011). Освен в болниците, увеличени нива на фекална колонизация се доказват в лечебните заведения за дългосрочна грижа (Woerther PL et al., 2013; Nicolas-Chanoine MH et al., 2013). В такава болница в САЩ са установени 18.9% носители на карбапенем-резистентни ентеробактерии (Prasad N et al., 2016).

Заклучение

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

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

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

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

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

4.10. Епидемиологично типизиране

4.10.1. *K. pneumoniae*

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

При изолатите *Klebsiella spp* бяха идентифицирани 33 ERIC типа с от 1 до 13 представителя. Всички изолати *K. michiganensis* имаха еднакъв ERIC тип. Всички седем *K. oxytoca* имаха уникален ERIC тип. Дванадесет изолата *K. pneumoniae* имаха уникален тип, а останалите 13 ERIC типа имаха от 2 до 13 представителя – общо 62 изолата. От всеки ERIC тип бяха избрани репрезентативни за лечебно заведение и вид бета-лактамаза изолати, за които бяха определени MLST типове. Таблица 9 показва броят на представителите на отделните клъстери и броят проучени с MLST, както и лечебните заведения, в които са установени.

Таблица 9. Разпределение на ERIC и MLST типове при проучените 74 *K. pneumoniae* изолати по лечебни заведения

ERIC тип брой	Брой, проучени с MLST анализ	Проучени лечебни заведения	MLST тип
b n=11 b'' n=2	7	PD (11), PIR (1), PNa (1)	353
p n=12	6	PIR (8), Alx (3), BS (1)	11
s n=7	4	VAR (6), PD (1)	37
a n=5	3	PD (5)	1198
h n=5	3	VAR (4), LR (1)	280
w n=5	3	PIG (2), PD (1), VAR (1), MD (1)	34
m n=4	2	PIG (3), VAR (1)	15
t n=3	2	PD (2), PIG (1)	1569
c n=2	1	PD (2)	17
n n=2	1	PIR (1), Alx (1)	258
r n=2	1	PIG (2)	253
e n=2	1	PNb (1), Alx (1)	449
uni n=12 (8+4 нетипабилни)	1 1 1 1 1	PD (1) PD (1) Alx (1) PD (1) MD (1) VAR (1)	429 16 627 20 14 215

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

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

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

Таблица 10 представя разпределението на изолатите според изследвания контингент (хоспитализирани/здрави) и установените бета-лактамази във всеки MLST тип.

Таблица 10. Разпределение на ERIC, MLST типовете при проучените *K. pneumoniae* изолати, както и разпределение на изолатите според изследвания контингент (хоспитализирани/здрави) и установените бета-лактамази във всеки MLST тип.

ERIC тип брой	MLST тип	Хоспитализирани (n=73)	Здрави (n=11)	Бета-лактамаза(брой)
b n=11 b'' n=2	353	13	1	CTX-M-3 (11) CTX-M-3 I/CTX-M-15 I (3)
p n=12	11	11	1	NDM-1/CTX-M-15(3)/CMY-4 (11) DHA-1 (1)
s n=7	37	7	-	CTX-M-3 (6) CTX-M-15 (1)
a n=5	1198	5	-	CTX-M-15 (5)
h n=5	280	4	1	CTX-M-15 (4) CTX-M-3 (1)
w n=5	34	4	1	CTX-M-15 (4) CTX-M-14 (1)
m n=4	15	4	-	CTX-M-15 (4)
t n=3	1569	3	-	CTX-M-3 (2), CTX-M-15 (1)
c n=2	17	2	-	CTX-M-15/CTX-M-3 like (1), CTX-M-15 (1)
n n=2	258	2	-	KPC-2 (1) KPC-2+CTX-M-3 (1)
r n=2	253	2	-	CTX-M-15 (2)

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

ERIC тип b (Табл 10, Фиг.16), съответстващ на секвенционен тип **ST353**, беше доминиращ, доказан в 18% (n=13/74) от всички изолати *K. pneumoniae*. Този тип беше установен в УМБАЛ”Св.Георги”- Пловдив, УМБАЛСМ”Н.И.Пирогов” и УМБАЛ д-р Г. Странски - Плевен. Преобладаващият тип ESBP беше CTX-M-3 (85%) - **Фиг 18**. Този ST тип е доказан в проучване в Китай (Zhang et al., 2017), като всички изолати са били носители на KPC-2 карбапенемаза. Това е от важно значение и показва възможността на този клон да придобива други бета-лактамази, вкл. карбапенемази. Този клон е докладван и като носител на CTX-M-15 ензими (Ghebremedhin B et al, 2014).

ERIC тип p (Фиг. 16), идентифициран като **MLST 11**, е втория по честота тип, доказан в 14% (n=11). На този тип принадлежаха почти всички карбапенемаза продуценти - NDM-1 в комбинация с CTX-M-15 и CMY-4 (**Фиг.18**), като всички те са от хоспитализирани пациенти от УМБАЛСМ”Н.И.Пирогов” и УМБАЛ”Александровска”- София, само един от ST11 клона продуцираше DNA-1 и беше установен във фекална проба от здрав индивид в МДЛ”Лина”- Бургас.

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

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

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

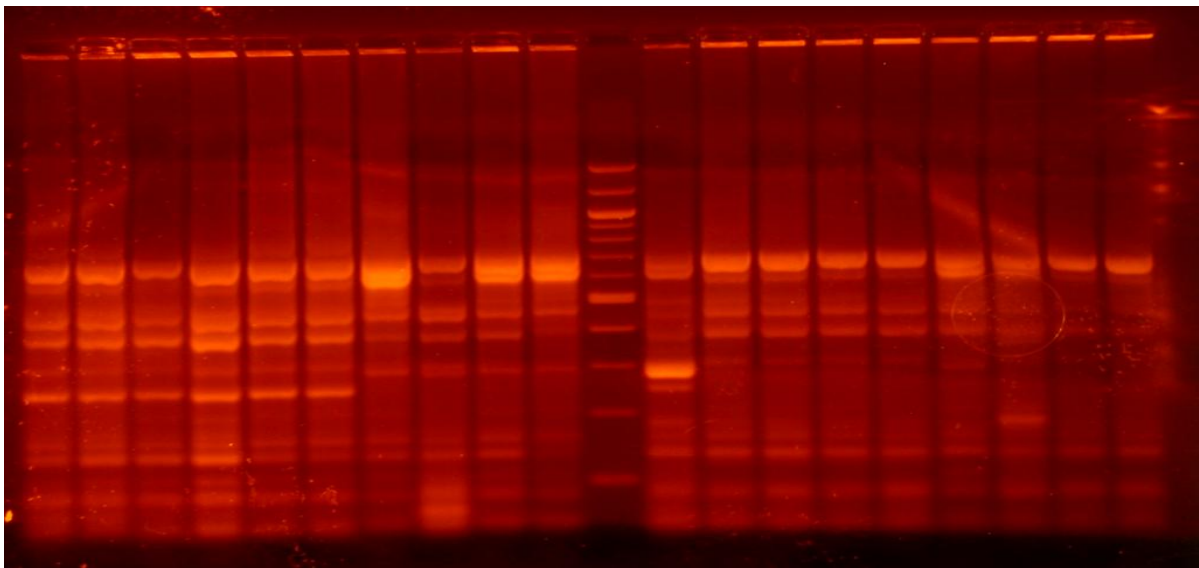
ERIC тип s (MLST 37) е третият по честота, доказан в 7 изолата, всичките установени при пациенти в болници. Този тип беше доказан в МБАЛ”Света Марина” Варна и УМБАЛ”Св.Георги”-Пловдив Преобладаващия ESBL за този MLST тип беше CTX-M-3 (85%)- **Фиг.18**. Отново в проучването от Китай (Zhang R et al., 2017), този MLST тип е доказан като преносител и на карбапенемази, както KPC-2, така и NDM-1, което е предпоставка за бъдещото им разпространение и в други страни. Този тип се доказва и в България при 3 изолата, един от които продуцент на KPC-2 (Markovska R et al., 2019).

ERIC типове a, h, w и m (съответно MLST 1198, 280, 34, 15) са представени от малък брой (по 4 и повече) изолати *K. pneumoniae*, като **ST15** е представен само от изолати от пациенти в болници от II-ра МБАЛ-София и МБАЛ”Света Марина” Варна, като всички те бяха продуценти на CTX-M-15 ензима (**Фиг.18**). Представителите на **ST15** клона са съобщавани като продуценти на CTX-M-15 или карбапенемазни в световен мащаб (Breuges et al., 2013; Esteban-Cantos et al., 2017; Melegh et al., 2014; Morris D et al., 2016). Изолати от този клон са докладвани и в България, установени от клинични изолати в болници във Варна, Плевен, Пловдив и София (Markovska et al., 2017).

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

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

Единични ST типове **14** и **2449** са установени само при изолати от здрави хора в МДЛ"Медирс"- София (Табл. 10). В литературата ST14 многократно се съобщава като един от най-често срещаните видове NDM-позитивни *K. pneumoniae* щамове (Giske CG et al., 2012; Jain A et al., 2014; Yoon EJ et al., 2018; Wu W et al., 2019).

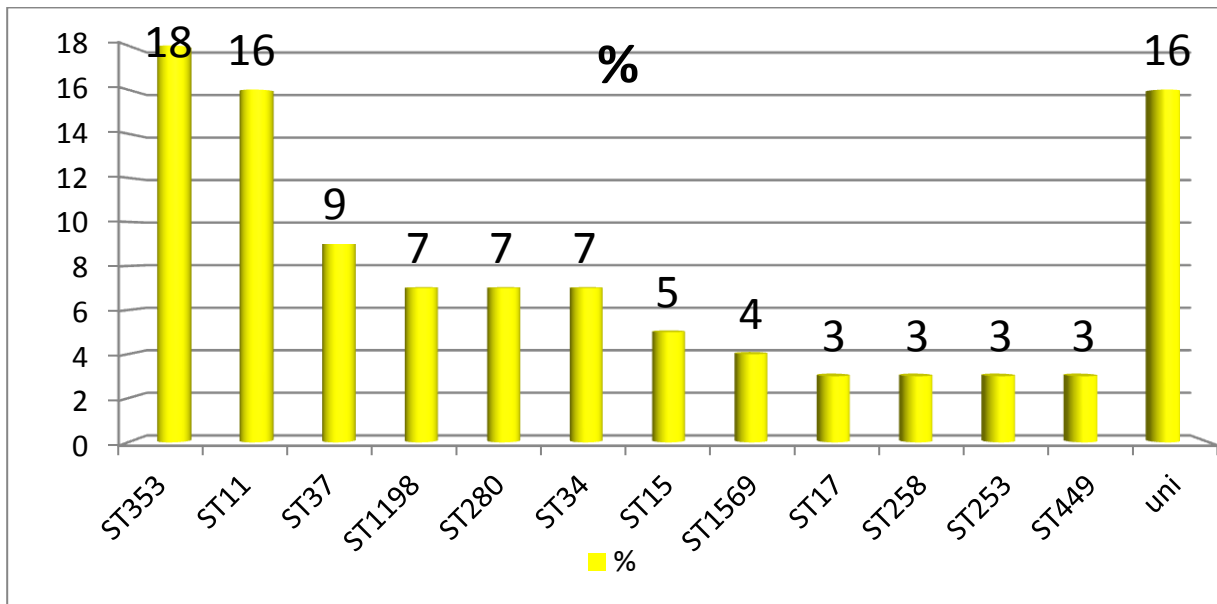


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 16 17 18 19

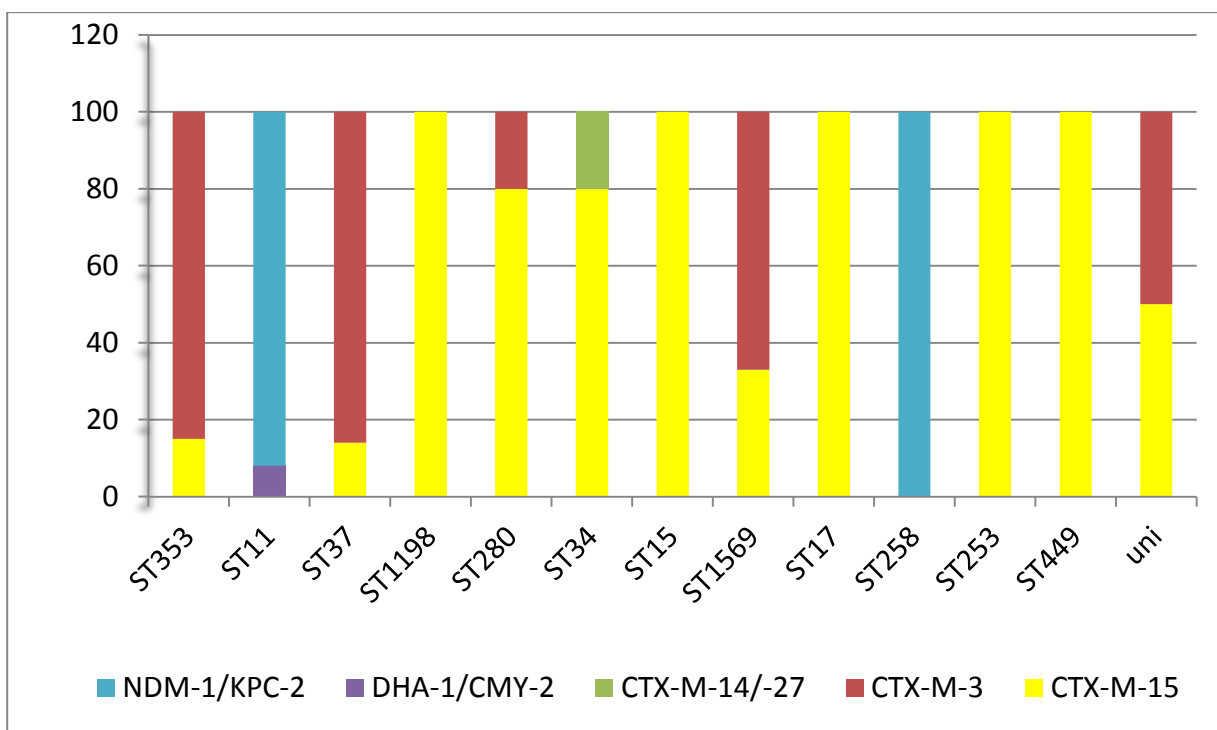
Фигура 16. ERIC профили на изолатите *K. pneumoniae*

Легенда: Клон **p** - позиции 1, 2, 3, 4, 5, 6 ; клон **a** – позиции 7, 9, 10, 16; клон **b** – позиции 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19; позиции 8-d, позиции 11-c, M - маркер

Анализът на ERIC и MLST типове при изолатите *K. pneumoniae* показва, че спектъра на MLST типове е голям, като осем MLST типа имаха ≥ 3 представителя и обхващаха 54 от изолатите - (73%) - **Фиг 17. Фигура 18** показва видовете ензими при съответните MLST типове.



Фигура 17. MLST типове при *K. pneumoniae* (74)



Фигура 18. Видове ензими според MLST типове при *K. pneumoniae*

4.10.2. *E. coli*

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

Таблица 11 показва броят на представителите на отделните клъстери и броят проучени с MLST, както и лечебно заведение, в което са установени. MLST типове на репрезентативни изолати от всеки ERIC тип с по-голям брой представители бяха определени чрез мултилокусно секвениране.

Таблица 11. Разпределение на ERIC, MLST типове, при проучените *E. coli* изолати по лечебни заведения

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

U n=2	1	681	-	VAR (2)
O n=2	1	7670	-	BS (2)
D n=2	1	9298	-	PNa (1), BS (1)
UNI n=54	14 (7+7нетип.)	2178 2617 295 648 8578 93 95	- 59 23 648 12 168 95	<u>Tor</u> <u>PNa</u> <u>MD</u> <u>BS</u> <u>PNa</u> <u>PNa</u> PNb

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

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

Таблица 12 показва разпределението на ERIC и MLST типове според изследвания контингент (хоспитализирани/зdravi) и бета-лактамази

Таблица 12. Разпределение на ERIC, MLST типове, клонален комплекс, филотип, според изследвания контингент (хоспитализирани/зdravi) и вида на бета-лактамазите при проучените *E. coli*

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

K n=5	69	69	D	2	3	DHA-1 (3), CTX-M-3 (1), unknown (1)
H n=5	1196	-	B1	4	1	CTX-M-15 (2), CTX-M-3 (2), DHA-1 (1)
Y n=5	4238	10	A	1	4	3 CTX-M-3 (3), CTX-M-15 (1), DHA-1(1)
M n=4	394	394	D	-	4	CTX-M-15 (4)
W n=4	405	405	D	3	1	CTX-M-15 (4)
F1 n=4	56	155	B1	2	2	CTX-M-14 (1), CTX-M-1 (1), CTX-M-3 (1), DHA-1 (1)
J n=3	10	10	A	1	2	CTX-M-15 (2), CTX-M-3 (1)
E n=3	2797	-	B1	-	3	CTX-M-15 (2), CTX-M-1 (1)
I n=3	73	73	B2	-	3	CTX-M-15 (2), unknown (1)
Z n=3	88	23	A	3	-	CTX-M-3 (2), CTX-M-15 (1)
R n=2	1011	-	D	2	-	CTX-M-14 (1), CTX-M-9 (1)
P n=2	1057	14	B2	-	2	CTX-M-15 (2)
L n=2	127	-	B2	2	-	CTX-M-15 (2)
T n=2	144	-	B2	2	-	CTX-M-15 (2)
N n=2	1485	648	B1	2	-	CTX-M-3 (2)
B n=2	1993	-	B2	1	1	CTX-M-15 (1), CTX-M-3 (1)
V n=2	34	10	A	1	1	CTX-M-15 (1), CTX-M-3 (1)
U n=2	681	-	B2	2	-	CTX-M-3 (1), CTX-M-15 (1)
O n=2	7670	-	B1	-	2	DHA-1 (2)
D n=2	9298	-	B2	-	2	CTX-M-15 (1), CMY-2 (1)
UNI n=54	2178	-	B1	-	1	CTX-M-14
	2617	59	B1	-	1	CTX-M-14
	295	23	B1	-	1	CTX-M-3
	648	648	B1	-	1	DHA-1
	8578	12	B2	-	1	SHV-12
	93	168	A	-	1	SHV-12
	95	95	B2	1	-	CTX-M-14

Съкращения: CC – клонален комплекс

При изолатите *E. coli* преобладаващ **ERIC тип беше А (Фиг. 19) - 29%** (61/213), представен от **ST 131** и свързан с вирулентния филотип B2. Този клон преобладаваше при клиничните изолати с **42%** (43/103), като те бяха доказани във всички проучени болници, а при здравите хора беше **16%** (18/110), изолирани от всички проучени центрове. Най-разпространения тип бета-лактамаза при клона ST131 беше CTX-M-15 (**46%**), следван от CTX-M-27 (**36%**), CTX-M-3 (**10%**), CTX-M-14 (5%)- **Фиг. 21**. Един от изолатите от този клон беше карбапенемаза продуцент (KPC-2) и също продуцираше CTX-M-15.

Клонална група ST131 на *E. coli* е разпространена в целия свят и изолатите причиняват придобити в общността и вътреболнични инфекции (Can F et al., 2015; Nicolas-Chanoine MH et al., 2017). Този клон е отговорен за бързото увеличаване на резистентността към бета-лактами при *E. coli*, главно поради производството на CTX-M-15 ензими (Nicolas-Chanoine MH et al., 2017). Клиничното му значение се подчертава от много проучвания, които демонстрират високия му потенциал за вирулентност (Can F et al., 2015). В проучване в 2 болници в Испания и Франция се докладват сходни на установените в настоящето проучване резултати - високото разпространение на ST131, продуциращ предимно CTX-M-15, следвани от CTX-M-14 и CTX-M-27 (Flament-Simon SC et al., 2020). Този интернационален клон притежава разнообразни гени за кодиране на фактори на вирулентност (VF) (Blanco et al., 2013). Анализът на секвенцията на целия геном (WGS) разкри, че изолатите от ST131 клона принадлежат на три различни подкласа (А, В и С), характеризиращи се с различни алели на *fimH* гена (Petty et al., 2014; Ben Zakour et al., 2016). Подклад C2 (известен още като подклон H30Rx), свързан с производството на CTX-M-15, е най-разпространеният ST131 (Banerjee et al., 2013; Price et al., 2013; Dahbi et al., 2014 ; Peirano et al., 2014; Sauget et al., 2016). Към него принадлежи O25bST131 изолатите, които се характеризират с производство на CTX-M-15, OXA-1 и вирулентната B2 филогрупа (Rogers BA et al., 2011). O25bST131 клона *E. coli* е високо вирулентен, пандемичен клон, свързан с придобити в общността и вътреболнични инфекции (Rogers BA et al., 2011). От ST131 изолатите от настоящето проучване, 42 принадлежаха на високо вирулентния и пандемичен клон O25B2ST131. Към този клон принадлежеше и единствения *E. coli*, продуцент на KPC-2 ензим. O25B2ST131 продуценти са били доказани и в предишно проучване в България (Markovska R et al., 2012).

В последните години все по-често се доказват представители на ST131, които произвеждат CTX-M-27. Те принадлежат на клъстера C1-M27, и се доказват първо в Япония (Matsumura et al., 2016, 2017), а след това в други страни (Тайланд, Австралия, Канада, САЩ, Франция, Италия, Германия, Холандия и Испания) (Blanc et al., 2014; Birgy et al., 2016; Bevan et al., 2017; Merino et al., 2018; Peirano and Pitout, 2019). Повишеното разпространение на CTX-M-27 е доказано и в проучването в двете болници в Испания и Франция (Flament-Simon SC et al., 2020). В проучването FUT1, Birgy et al. (2020) също показва нарастващата тенденция на CTX-M-27 ензим.

Първото съобщение за KPC-2, произвеждаща *E. coli* е докладвано от Navon-Venezia et al. през 2006 г. (Navon-Venezia S et al., 2006). Подобни щамове *E. coli* ST131, произвеждащи KPC-2, са били открити във Франция, Турция, Китай, Италия. (Sun Y et al., 2016; Naas T et al.,

2011; Can F et al., 2015; Cai JC et al., 2014; Piazza A et al., 2016). В България за първи път такъв изолат е доказан през 2017г. (Markovska R et al., 2017). Появата на *bla_{KPC}* в *E. coli*, е потенциална заплаха за обществото и болниците.

Втория по честота **ERIC тип беше S - 10%** (21/213), представен от **ST 38**, като беше разпределен по равно в двете изследвани групи – хоспитализирани пациенти и здрави. Този клонален комплекс обикновено се свързва с филотип D, което отговаря на настоящите резултати (Clermont O et al, 2015). Този ST тип е често срещан при ESBL продуциращи *E. coli* (Peirano and Pitout, 2019). Този MLST тип беше изолиран от болниците в Пловдив, Варна, УМБАЛ”Александровска” - София и П-ра МБАЛ-София, както и от здрави носители в МДЛ”Лина”- Бургас, МДЛ”Лора”- София и МДЛ”Медирс”- София. Най-разпространения ESBL тип при този клонален комплекс беше CTX-M-14 (**38%**), следван от CTX-M-27 (**19%**), CTX-M-15 (**14%**). Преобладаващ тип ST 38 е доказан в проучване на изолати *E. coli* от хора и животни в Германия (Pietsch M et al., 2018).

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

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

ERIC тип K беше представен от MLST типа **ST69** и филотип D. Той беше представен от 5 изолата, 2 от болницата във Варна, 2 от здрави носители в Плевен и 1 от здрав индивид в

Бургас. При ST69 преобладаващ ензим беше плазмидния AmpC - DHA-1. Този клон е открит и в проучване в болници в Испания и Франция (Flament-Simon SC et al., 2020), като също е асоцииран с филотип D.

ERIC тип M беше представен от **ST394**, принадлежащ към филогрупа D, като всички представители на този клон бяха изолирани от здрави носители от Бургас и носеха CTX-M-15 ензимите. В проучване в Пакистан, ST394 е преобладаващ, като е съдържал много ентероагрегативни гени характерни за диарогенните *E. coli* и алела за fimH30, свързан преди това с успеха на ST131 (Zahra R et al., 2018).

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

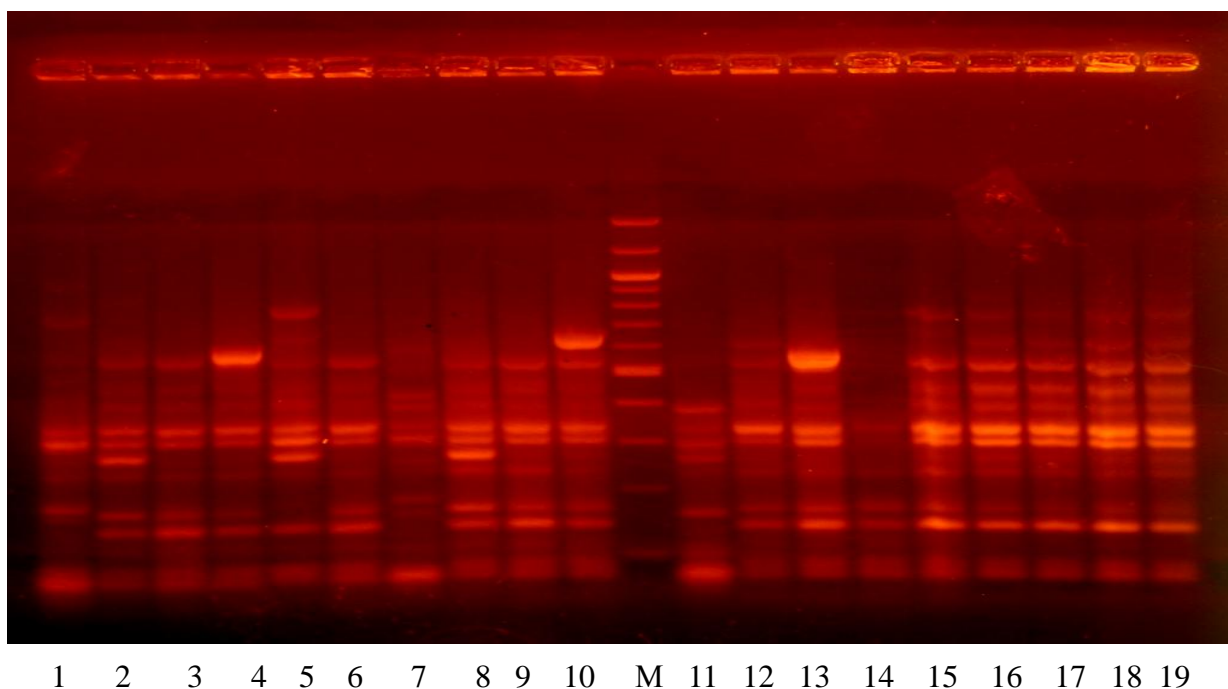
На **ERIC типа W** отговаряха 4 изолата от **ST405** MLST тип, който също е доказан като често срещан тип в други проучвания (Brisse et al., 2012; Naseer et al., 2012; Peirano et al., 2012; Izdebski et al., 2013; Peirano and Pitout, 2019). И четирите изолата бяха продуценти на CTX-M-15, като 3 от тях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

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

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

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

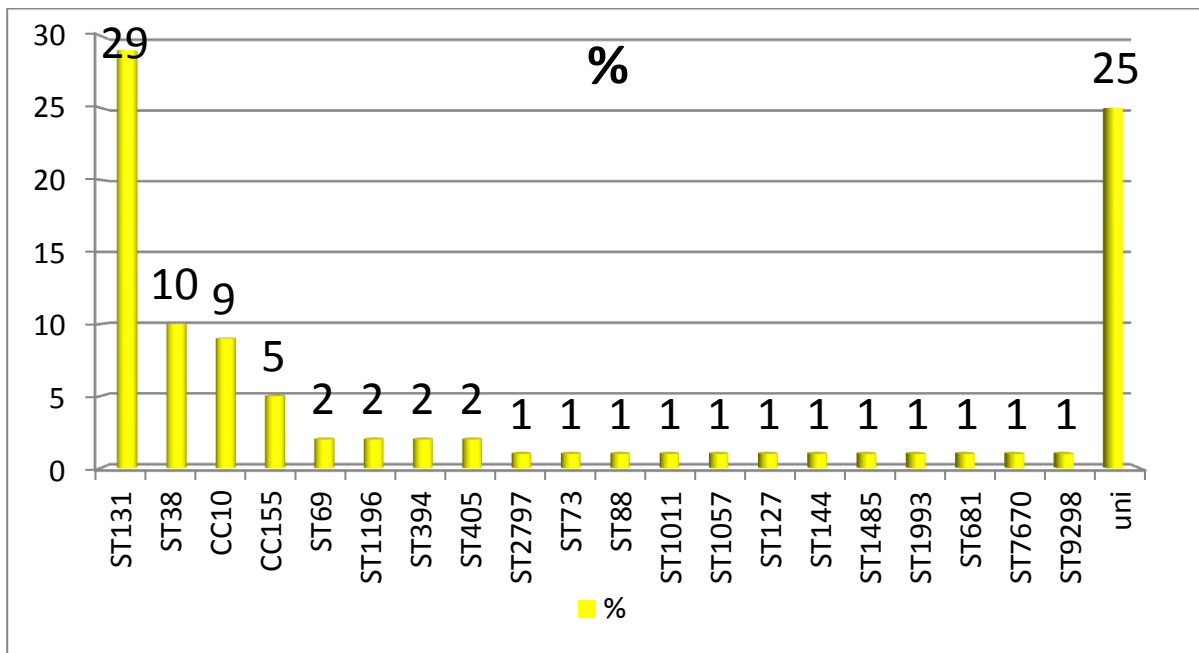
ERIC типа Z (n=3) е представен от MLST типа **ST88**, филогрупа A, разпространен в болницата в Пловдив и продуцент на СТХ-М ензими от 1-ва група. Той е бил разпространен в болница в Испания (Flament-Simon SC et al., 2020), също така е бил доказан и в проучване в Нидерландия за 2014-2016г (van de Bunt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



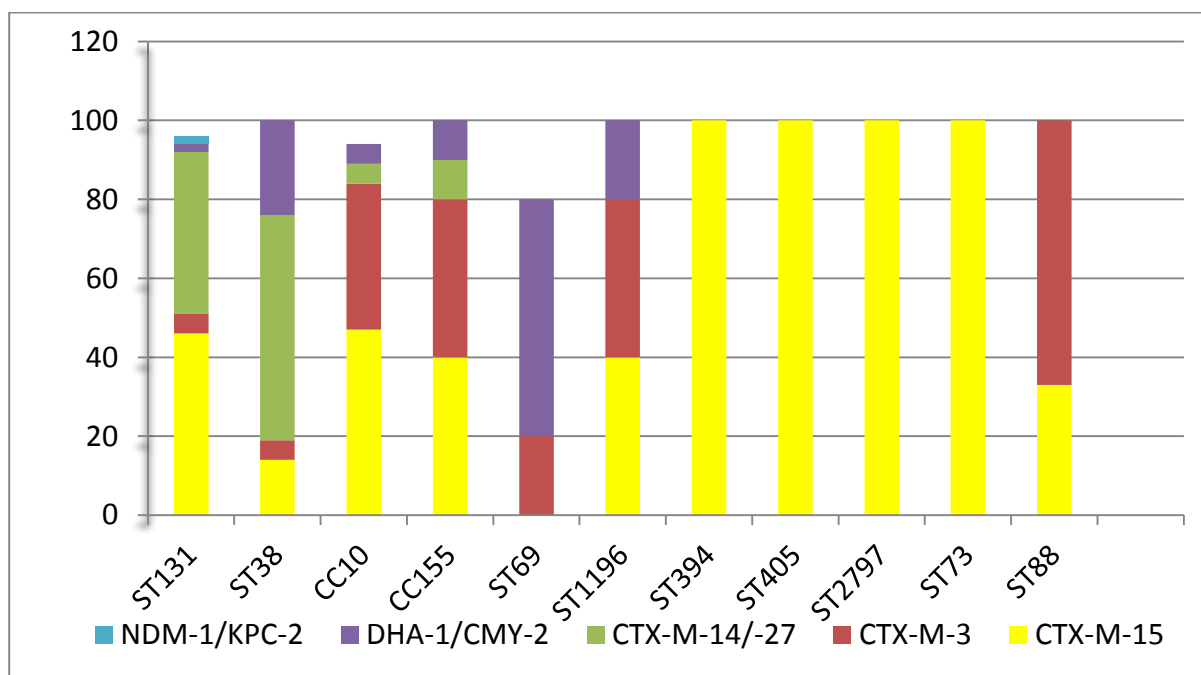
Фигура 19. ERIC профили на изолатите *E. coli*

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

На **Фиг. 20** са показани MLST типовете при *E. coli*, а на **Фиг. 21** – ензимите при съответните MLST типове.



Фигура 20. MLST типове при *E.coli* (213)



Фигура 21. Бета лактамази според най-разпространените MLST типове (≥ 3) при *E.coli* (213)

4.10.3 *Enterobacter spp.*

ERIC анализът показва наличието на 16 ERIC типа и съответно 10 MLST типа. Табл 13 показва разпределението на MLST и ERIC типове според центъра, от който са изолирани.

Таблица 13. Разпределение на ERIC, MLST типове, вида на бета-лактамазите, проученото лечебно заведение, при проучените *Enterobacter spp*

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

Легенда: *E hoffmanii*= *E. hormaechei* spp. *hoffmanii*

E steigerwaltii= *E. hormaechei* spp. *steigerwaltii*,

E xiangfangensis= *E. hormaechei* spp. *xiangfangensis*

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

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

Плевен, PNa=МЦ"Екзакта Медика"- Плевен, PD=УМБАЛ"Св.Георги"-Пловдив,

BS=МДЛ"Лина"- Бургас, Alx=УМБАЛ"Александровска"- София, ПГ=II-ра МБАЛ-София,

PIR=УМБАЛСМ"Н.И. Пирогов", MD=МДЛ"Медирс"- София, Тор=МЦ"Торакс"- София,

LR=МДЛ"Лора"- София

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

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

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

Интересен представител, който открихме беше *E. hormaechei* spp. *xiangfangensis* от MLST типа **ST200**. Той беше от пациент от “Александровска” болница и беше продуцент на CTX-M-3 ензима. В болници в Мианмар този ST тип е бил открит в 16 изолата *E. hormaechei* spp. *xiangfangensis*, и те са били устойчиви на аминогликозиди и кодиращи 16S rRNA метилази: ArmA, RtmC и RtmE, продуциращи метало-бета-лактамазите NDM-1 и NDM-4. Тези изолати са били клонално разпространени в цялата страна (Oshiro S et al., 2020). Нашият изолат също беше резистентен на всички аминогликозиди.

За останалите ST типове няма литературни данни.

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

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

Заклучение

При изследваните 346 изолата ентеробактерии беше установен широк клонален спектър. При изолатите *Klebsiella* spp бяха идентифицирани 30 ERIC типа с от 1 до 13 представителя. Всички изолати *K. michiganensis* имаха еднакъв ERIC тип. Всички седем *K. oxytoca* имаха също уникален ERIC тип. Анализът на MLST типовете при изолатите *K. pneumoniae* показа, че спектъра на MLST типовете е голям, като осем MLST типа (ST353, ST11, ST37, ST1198, ST280, ST34, ST15, ST1569) имаха ≥ 3 представителя и обхващаха 54 от изолатите (73%). NDM-1 продуцентите принадлежаха на ST11 клона, а KPC-2 на ST258.

DHA-1 продуцента принадлежеше на същия клон. И двата клона се доказват в България като продуценти на карбапенемази при клинични изолати (Markovska R et al, 2019). CTX-M-15 продуцентите принадлежаха на ST1198, ST280, ST34, ST15 и единични изолати от ST17, ST253, ST16, ST14, ST1563 клоновете. CTX-M-3 продуцентите принадлежаха основно на ST353, ST37 и единични изолати ST1569, ST20, ST2449. От тях ST15, ST16, ST37 са описвани в България при клинични изолати (Markovska R et al, 2017). ST11, ST15, ST258 са високоепидемични интернационални клонове, носещи ESBL/карбапенемази и представляващи голям терапевтичен проблем (Peirano G& Pitout J). Резултатите показват предимно клоналното разпространение при карбапенемаза продуцентите.

При изолатите *E. coli* бяха идентифицирани 83 ERIC типа, от които 54 изолата имаха уникален ERIC тип, докато останалите 29 ERIC типа, обхващащи 159 изолата (75%) имаха от 2 до 61 представителя и бяха 75% от изолатите. Преобладаващите MLST типове бяха ST131, ST38, CC10 (ST10, ST34, ST4238, ST4981), CC155 (ST56, ST155), ST69, ST1196, ST394, ST405, ST2797, ST73, ST88 (≥ 3 представителя) – обхващащи 141 изолата (66%). ST131, ERIC тип A, A1-A5 беше 29% от *E. coli* изолатите и се асоциираше предимно с хоспитализирани болни и продуценти на CTX-M-15, CTX-M-27 и в по-малка степен на CTX-M-3 и CTX-M-14 ензими. Те бяха изолирани от всички проучени центрове. От ST131 изолатите 42 принадлежаха на високо вирулентния и пандемичен клон O25B2ST131. Към този клон принадлежеше и единствения *E. coli*, продуцент на KPC-2 ензим.

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

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

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

5. ИЗВОДИ:

1. Беше проучено чревното носителство на ESBL, AmpC и карбапенемаза продуциращи представители на разред *Enterobacterales* при здрави индивиди (n=717) и хоспитализирани пациенти (n=580) от 7 лечебни заведения и 5 диагностични центрове в 5 града в България за периода 2017-2018г.
2. Беше установен висок процент резистентни на цефалоспорин трета генерация изолати - 346 (27% от всички изследвани). Преобладаваха *E. coli* (61.5%), следвани от *Klebsiella spp.* (24.2%), *Enterobacter spp.* (7%), *Citrobacter spp.* (5%), *M. morganii* (1%), *H.alvei* (1%).
3. Устойчивостта на проучваните изолати беше много висока към amoxicillin/clavulanic acid и ceferime - 92%, а също и към хинолони и piperacillin/tazobactam - около 60% и към аминогликозиди 40% - 58%. Четири процента от изолатите бяха резистентни на карбапенеми. Изолатите *K. pneumoniae* бяха с много по-високи нива на устойчивост по отношение на повечето групи антимикробни средства от изолатите *E. coli*. Един от тях беше панрезистентен. Изолатите от хоспитализирани болни показаха много по-висока устойчивост в сравнение с тези от здрави индивиди.
4. Процентът на ESBL продуцентите при всички изследвани беше сравнително висок - 20.7%, като преобладаваха *E. coli* - 70.2% , *Klebsiella spp* 24.5% и единични изолати *Enterobacter spp* 3.3%, *C. freundii complex* 3.3%, *M. morganii* 0.3%. Процентът на плазмидните продуценти на AmpC ензими беше – 1.9%, като преобладаваха *E. coli*. Карбапенемаза продуцентите бяха - 1%, предимно *K. pneumoniae* (n=13) и 1 *E. coli*.
5. Анализът на разпространението показва, че ESBL продуцентите в България преобладават при хоспитализирани болни 28% срещу 14% при здравите, $p<0.0001$ и при децата 24% срещу 18%, $p=0.005$. Карбапенемаза продуцентите бяха изолирани от хоспитализирани възрастни. При AmpC продуцентите не се наблюдаваха статистически значими различия здрави/хоспитализирани и деца/възрастни.
6. При ESBL продуцентите преобладаваха CTX-M-15 - 39%, следвани от CTX-M-3 - 20%, CTX-M-27 – 8% и CTX-M-14 – 6%. CTX-M-1, CTX-M-9 и SHV-12 бяха установени при единични изолати. Плазмидните AmpC ензими, продуцирани самотоятелно, включваха DHA-1, 6% и CMY-2, 1%. При карбапенемаза продуцентите преобладаваха 11 изолата NDM-1, като 9 от тях ко-продуцираха CTX-M-15 и CMY-4. Три изолата произвеждаха KPC-2.

7. Епидемиологичното типизиране показва, че спектъра на MLST типовете при *Klebsiella spp* е голям (26), като осем MLST типа (ST353, ST11, ST37, ST1198, ST280, ST34, ST15, ST1569) имаха ≥ 3 представители и обхващаха 73% от изолатите. Всички изолати *K. michiganensis* имаха еднакъв ERIC тип. Всички седем *K. oxytoca* имаха уникални ERIC типове. NDM-1 продуцентите принадлежаха на ST11 клона, а KPC-2 на ST258. DHA-1 продуцентът принадлежеше на ST11 клона. CTX-M-15 продуцентите принадлежаха предимно на ST1198, ST280, ST34 и ST15 клоновете. CTX-M-3 продуцентите принадлежаха основно на ST353 и ST37.
8. При изолатите *E. coli* бяха идентифицирани 83 ERIC типа, от които 54 изолата имаха уникални ERIC типове, докато останалите 29 ERIC типа, имаха от 2 до 61 представителя.
 - а. Преобладаващите MLST типове бяха ST131, ST38, CC10, CC155, ST69, ST1196, ST394, ST405, ST2797, ST73, ST88 – обхващащи 66% от изолатите .
 - б. ST131 беше доказан в 29% от изолатите и се асоциираше предимно с хоспитализирани болни и продуценти на CTX-M-15, CTX-M-27 и в по-малка степен на CTX-M-3 и CTX-M-14 ензими. Те бяха изолирани от всички проучени центрове. Към този клон принадлежеше и единствения *E. coli*, продуцент на KPC-2 ензим.
 - в. С продукция на CTX-M-15 ензими се свързваха още представителите на CC10, ST394, ST405, CC155 клоновете. CTX-M-3 се произвеждаше и от изолати принадлежащи на CC10, ST155, ST1196, CC1485, ST4981, ST88. DHA-1 ензимите се продуцираха от ST38, ST69, ST7670, докато CTX-M-27/CTX-M-14 от представителите на ST38 комплекса. Представителите на клонален комплекс 10, ST394, ST1198, ST73 се изолираха предимно от здрави индивиди, докато при ST1196, ST88 от хоспитализирани. DHA-1 продуцентите бяха от ST38 и ST69 клоновете.
9. ERIC анализът при *Enterobacter spp.* показва наличието на 16 ERIC и 10 MLST типа. Преобладаваше ST90 клона (7/24), който се асоциираше с продукция на CTX-M-15 ензими и беше доказан само сред хоспитализирани пациенти.
10. Широкият спектър на клонове асоцииран и с ESBL и AmpC продукцията показва, че не само клоналното разпространение, но и хоризонталния плазмиден или на различни мобилни елементи трансфер, играе съществено значение при разпространението на продуцентите на тези ензими.

6. Приноси

Приноси с оригинален характер

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

Приноси с потвърдителен характер

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

Приноси с приложен характер

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

7. Списък с публикации, свързани с дисертационния труд:

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

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

1. **Stankova P**, Markovska R, Stoeva T, Ivanova D, Dimitrova D, Bozhkova M, Nedelcheva G, Boyanova L, Mitov I Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among hospitalized patients in two hospitals in Varna and Sofia 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with international participation , Hisarya October 10th -13th , 2018
2. **П. Станкова**. Съвременни аспекти при чревното носителство на широкоспектърни бета-лактамаза и карбапенемаза продуциращи ентеробактерии Симпозиум”Акад. Чудомир Начев”, 2018 БАН
3. Markovska R, **Stankova P**, Stoeva T, Ivanova D, Dimitrova D, Pencheva D, Kaneva R, Mitov I. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Bulgarian hospitals 29th ECCMID, Amsterdam, Netherlands 13-16 April 2019
4. R. Markovska, T. Stoeva, **P. Stankova**, L. Boyanova, E. Keuleyan, M. Sredkova, M. Murjeva, G. Lazarova, D. Ivanova, D. Dimitrova, K. Mihova, R. Kaneva, I. Mitov. Mechanisms of beta-lactam resistance among third-generation cephalosporin resistant isolates from family *Enterobacteriaceae* different from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria 10th Balcan Congress of Microbiology, Sofia, November 16th -18th, 2017