

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „МИКРОБИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ“



д-р Атанаска Петрова Петрова

**Проучване върху резистентността към
карбапенемни антибиотици на клинични
изолати *Acinetobacter baumannii* и
*Pseudomonas aeruginosa***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен
„Доктор“

по докторска програма „Микробиология“
професионално направление 4.3. „Биологически науки“

Научен ръководител:
проф. д-р Мариана Мурджева, дмн, мзм

Пловдив, 2018 г.

Дисертационният труд е написан в 160 страници. Съдържа 18 броя таблици, 25 фигури и 3 приложения. Цитирани са 225 литературни източника, от които 216 на латиница и 9 на кирилица. Всички идентификационни, фенотипни и молекулно-генетични тестове са изработени изцяло или в по-голямата си част от докторанта в Катедрата по Микробиология и имунология към Фармацевтичен факултет на Медицински университет - Пловдив, в Технологичния Център по Спешна медицина, секция Молекулярно-биологична оценка на хроничен стрес към Катедра Медицинска биология на МУ – Пловдив, както и в Националния център по заразни и паразитни болести, НРЛ Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност, София. Статистическите анализи са изготвени в Катедрата по Социална медицина и Обществено здраве, Факултет по Обществено здраве към МУ – Пловдив с активното участие на докторанта.

Проучването е финансирано чрез двугодишен вътреуниверситетски проект № 09/2013 г. по договор № Р-7088 към МУ – Пловдив, както и от Технологичен център за спешна медицина към МУ – Пловдив.

Потвърдителен анализ на част от пробите бе извършен в лабораторията на OpGen, USA.

Научно жури:

Председател:

проф. д-р Мариана Атанасова Мурджева, дм, мзм

Членове:

доц. д-р Теменуга Жекова Стоева, дм

доц. Иван Николаев Иванов, дб

доц. д-р Таня Василева Стратева, дм

проф. д-р Енчо Запрянов Савов, дмн

Резервни членове:

доц. д-р Росица Стефанова Вачева-Добревска, дм

доц. д-р Тихомир Мишев Дерменджиев, дм

Публичната защита на дисертационния труд пред Научно жури ще се състои на **09.07.2018 г. от 14.00 ч.** във **Втора аудитория** на Аудиторен комплекс, Медицински университет – Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на Медицински университет – Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А и на интернет страницата на Медицински университет – Пловдив.

Забележка: Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. Увод	5
2. Цел и задачи на проучването	7
3. Материали.....	8
4. Методи	10
5. Собствени резултати	13
5.1. Идентификация на клинични изолати <i>Acinetobacter baumannii</i> и <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
5.2. Епидемиологични данни	13
5.3. Антибиотична резистентност на <i>Acinetobacter</i> и <i>Pseudomonas</i> към карбапенеми - фенотипни данни	14
5.4. Фенотипен скрининг за продукция на карбапенемази при <i>Acinetobacter</i> и <i>Pseudomonas</i>	16
5.5. Молекулярно-биологичен анализ на гени, кодиращи резистентност към карбапенеми при <i>Acinetobacter</i> и <i>Pseudomonas</i>	17
5.6. Резултати от молекулярно-генетичните методи за симултантна детекция на експресията на гени, кодиращи ключови белтъци на ефлукс помпите: MexAB-OprM, MexXY-OprM и трансмембранный белтъчен рецептор за имипенем OprD при <i>P. aeruginosa</i>	18
5.7. Статистическа обработка на данните от генната експресия чрез IBM софтуерен продукт SPSS 19.0.....	20
5.8. Резултати от молекулярно-генетичните методи за детекция на експресията на гена, кодиращ индуцибельната цефалоспоринова AmpC.....	24
5.9. Резултати от RAPD-PCR анализа за определяне на щамовата и клонова принадлежност на изолатите <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
5.10. Динамика на структурата и резистентността към карбапенеми за периода 2010-2017 год. в УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив.....	26
6. Обсъждане	30
7. Изводи	47
8. Приложение на научния резултат.....	49
9. Приноси	52
10. Публикации и участия на научни форуми.....	54
Благодарности	56

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА

ДДТ – дисково-дифузионен тест

ЕДТА- етилендиамин тетраоцетна киселина

Е-тест- епсилометър тест

ИСМО – инфекции, свързани с медицинското обслужване

МИК- минимална инхибираща концентрация

МХТ – Модифициран Ходж тест

AFLP-Amplified fragment length polymorphism

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

ddNTP/ддНТФ- дидезоксинуклеотидтрифосфат

DNA/ДНК- дезоксирибонуклеинова киселина

EPIs - инхибитори на ефлукс помпите

Im- imipenem/ имипенем

MBL/МБЛ- метало-бета-лактамази

MDR - multi-drug-resistant/ мулти-резистентни

Mer- meropenem/ меропенем

PCR- полимеразо-верижна реакция

PDR - pan-drug-resistant/ пан-резистентен

RAPD-PCR- случайна амплификация на полиморфна ДНК посредством полимеразо-верижна реакция

RNA/РНК – рибонуклеинова киселина

RND – resisto-nodular deviation/ резисто-нодуларна система

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

XDR - extensively-drug-resistant/ с екстензивна резистентност

*„Since we cannot know all that there is to be known about anything,
we ought to know a little about everything“*

Blaise Pascal

*„Само противоречието стимулира развитието на науката.
Това трябва да се подчертава, а не да се замазва“*

Сергей Капица

1. УВОД

Pseudomonas aeruginosa и *Acinetobacter baumannii* са Грам-отрицателни неферментативни пръчковидни бактерии, широко разпространени в природата и заобикалящия ни свят. Те са отговорни за едни от най-сериозните опортюнистични инфекции: нозокомиални, респираторни, уринарни и хирургични. Като рискови фактори се считат тежко протичащи заболявания, придружаващи болести, имunosупресия и инвазивни процедури, особено механична вентилация.

Антимикробната резистентност значително ограничава терапевтичните възможности за пациентите, инфектирани с този вид микроорганизми, особено, ако изолатите са резистентни към групата на карбапенемните антибиотици.

Карабапенемите са клас бета-лактамни антибиотици с широк антибактериален спектър. Тяхната структура до голяма степен определя устойчивостта им към повечето бета-лактамази. Именно за това карбапенемите се определят като „тежката артилерия“ срещу много бактериални инфекции, а нарастващата резистентност към тях буди сериозни притеснения.

Няколко са механизмите, свързани с резистентността към карбапенемите, в това число понижената мембранна непроницаемост чрез алтернация или загуба на порините и/или повишен ефлукс, промени в РВР (пеницилин-свързващите белтъци), продукцията на карбапенемази. Въпреки, че продукцията на карбапенемази и резистентността към карбапенеми все още не е напълно изяснена, тези ензими се считат за важни фактори, подпомагащи изграждането ѝ. Карбапенемазите се подразделят на три основни класа: клас „А“ – серин съдържащи ензими, клас „Б“ – метало-бета-лактамази (MBL) и клас „Д“ – оксацилинази (ОХА). MBL заслужават особено внимание. Това са цинк съдържащи бета-лактамази с хидролитична активност спрямо почти всички бета-лактами с изключение на монобактамите. Тяхната хидролиза не

може да бъде инхибирана от наличните комерсиални бета-лактамни инхибитори, включително клавуланова киселина, сулбактам и тазобактам, но се инхибират от метални хелатори като EDTA (етилен диамин тетра-ацетатна киселина) и SMA (натриев маркапто-ацетатна киселина). Неферментативните Грам-отрицателни бактерии са главен гостоприемник за MBL. Някои от тях притежават естествена резистентност към карбапенемите, частично обусловена от експресията на ендогенни MBL. При *P. aeruginosa* и *A. baumannii* водеща роля имат придобитите чрез интегрони MBL, като VIM и IMP, както и продукцията на оксацилинази - най-вече при *A. baumannii*. Именно тези продуценти се асоциират с взривове на инфекции, свързани с медицинското обслужване (ИСМО). MBL продуцентите при неферментативните бактерии са сериозен клиничен проблем не само поради ниската антибиотична ефективност към тях, но и като източници на MBL гени, способни да се разпространяват както междувидово, така и към представители на други родове и семейства.

През последните 8 години челните две позиции на преобладаващи изолати от Клиниката по анестезиология и реанимация (КАИЛ) при УМБАЛ „Свети Георги“ се заемат от *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, като резистентността към карбапенемни антибиотици е над 76% при ацинетобактер и над 43% при псевдомонас. До този момент не са правени детайлни анализи за структурата на резистентност към групата на карбапенемите на територията на нашата болница. Тези неблагоприятни тенденции бяха повод за инициране на настоящото проучване, чиято цел е да се скринират фенотипно резистентните на имипенем и меропенем изолати *A. baumannii* и *P. aeruginosa* от рискови за ИСМО клиници на УМБАЛ „Свети Георги“ (КАИЛ, Кардиохирургия, Клиника по изгаряния и др.) за продукцията на карбапенемази, с последващо генно типичане на семейната им принадлежност, както и да се оцени експресията на гени, кодиращи белтъците на ключови ефлукс помпи и трансмембранни рецептори при псевдомонас. Прилагането на RAPD-PCR технология има за цел да докаже дали се касае за представители на един или няколко щамове, циркулиращи в дадено клинично звено, както и наличието или отсъствието на клонална връзка.

На базата на обработените данни ще бъдат изведени тенденциите за основните механизми на резистентност сред клинично значимите Грам-отрицателни неферментативни изолати (*P. aeruginosa* и *A. baumannii*) от рисковите за ИСМО клиници в УМБАЛ „Св. Георги“-Пловдив. Това е предпоставка за изготвяне на алгоритми за бърз скрининг и препоръки за оптимизиране на терапията на инфекции, предизвикани от MDR, XDR и PDR ацинетобактери и псевдомонаси, както и за актуализиране на антибиотичната политика в лечебното заведение.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО:

2.1. Цел:

Да се проучат механизмите на резистентност към двата най-често използвани карбапенемни антибиотици в болнични условия - имипенем и меропенем при клинични изолати *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2. Задачи:

1. Да се извърши фенотипен скрининг за карбапенемазна продукция и при двата вида: *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, както и да се скринират всички налични изолати за металоензимна продукция.

2. Да се проведе молекулно-генетичен скрининг за детекция на най-честите карбапенемаза-кодиращи гени при *Acinetobacter baumannii* - оксацилинази от група 2df - OXA-23, OXA-24 и OXA-58, както и да се оцени наличието на хиперекспресия на intrinsic OXA-51 гена, дължаща се на инсерционна последователност Isab1, разположена пред него.

3. Да се проучат чрез молекулно-генетичен скрининг най-разпространените за Европа метало-бета-лактамази група Б сред изолати *Pseudomonas aeruginosa*: VIM и IMP.

4. Да се направи симултантна оценка на експресията на белтъци на ключови ефлукс помпи: MexAB-OprM и MexXY-OprM заедно с трансмембранный белтъчен рецептор за имипенем OprD, както и независима оценка на експресията на индуцибилната цефалоспориноза AmpC при изолатите *Pseudomonas aeruginosa*.

5. Да се анализира щамовата принадлежност и проучи наличието на клонална свързаност на колекционирани изолати посредством RAPD-PCR технология.

6. Да се извърши секвениране на детектираните гени за прецизно категоризиране и типизиране на принадлежността им.

7. Да се предложат адекватни мерки за подобряване антибиотичната политика в лечебното заведение.

3. МАТЕРИАЛИ

3.1. Микроорганизми

- 43 клинични изолата *Acinetobacter baumannii*
- 43 клинични изолата *Pseudomonas aeruginosa*,

колекционирани от пациенти, пролежавали в различни клиники на УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив за периода 2010-2014 г.

3.2. Праймери, използвани за детекция на карбапенемаза-кодиращи гени в настоящото проучване

Праймери	Нуклеотидна последователност (5'-3')	T°C на анийлинг	Размер на продукта (bp)
Bla VIM-F	TTTGGTCGCATATCGCAACG	66	500
Bla VIM-R	CCATTCAGCCAGATCGGCAT		
Bla IMP-F	GTTTATGTTTCATACWTCG	45	432
Bla IMP-R	GGTTTAAYAAAACAACCAC		
OXA-51-like R	TGGATTGCACTTCATCTTGG	52 (това проучване)	1000
ISAbal-R	GCTCACCGATAAACTCTCT		
OXA-23-like F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	51	501
OXA-23-like R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
OXA-24-like F	GGTTAGTTGGCCCCCTTA AA	53	246
OXA-24-like R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
OXA-51-like F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	47	353
OXA-51-like R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
OXA-58 A	CGATCAGAATGTTCAAGCGC	53	599
OXA-58 B	ACGATTCTCCCCTCTGCGC		

Праймери, предвидени за RAPD PCR при *A. baumannii* и *P. aeruginosa*

- ERIC-1R (5'-AAGCCTCCTGGGGATTCA-3')
- ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3')

3.3. Праймери и сонди, използвани за оценка на генната експресия на MexA, MexX, OprD, AmpC и groD протеини при изолати *P. aeruginosa*

Таргетен ген	Праймери и сонди	Литературен източник
groD	Прав: 5 -GGGCTGTCTCGAATACGTTGA-3 Обратен: 5 -ACCTGCCGGAGGATATTTCC-3 Сонда: 3'TAMRA 5'FAM TGCGGATGATGTCTTCCACCTGTTCC	(Quale et al. 2006)
OprD	Прав: 5 -CTACGGCTACGGCGAGGAT-3 Обратен: 5 -GACCGGACTGGACCACGTACT-3 Сонда: 3'TAMRA 5'FAM CACCACGAAACCAACCTCGAAGCC	(Quale et al. 2006)
MexA	Прав: 5 -AACCCGAACAACGAGCTG-3 Обратен: 5 -ATGGCCTTCTGCTTGACG-3 Сонда: 3'TAMRA 5'FAM CATGTTCGTTACGCGCAGTTG	(Quale et al. 2006)
MexX	Прав: 5 -GGCTTGGTGGGAAGACGTG-3 Обратен: 5 -GGCTGATGATCCAGTCGC-3 Сонда: 3'TAMRA 5'FAM CCGACACCCTGCAGGGCC	(Quale et al. 2006)
AmpC	Прав: 5-CGCCGTACAACCGGTGAT-3 Обратен: 5-CGGCCGTCCTCTTTTCGA-3 Сонда: 3'TAMRA 5'FAM TGCGGATGATGTCTTCCACCTGTTCC	(Quale et al. 2006)

4. МЕТОДИ

4.1. Идентификация на бактериалните изолати и изпитване *in vitro* на антибиотична чувствителност

1) Идентификация с мануален тест Api 20 NE (bioMerieux, France) с автоматично отчитане от система BIOMIC V3 (Giles scientific, USA)

2) Реидентификация и изпитване на антибиотичната чувствителност към имипенем и меропенем на колекционирания изолат посредством автоматизирана система Vitek 2 (bioMerieux).

3) Контролно изпитване на антибиотичната чувствителност към пиперацилин, цефтазидим, цефепим, азтреонам, пиперацилин/тазобактам, цефоперазом/сулбактам, амикацин, тобрамицин, меропенем, имипенем, ципрофлоксацин, триметоприм/ сулфаметоксазол и колистин чрез дисководифузионен метод (ДДМ) на Bauer-Kirby с автоматично отчитане от система BIOMIC V3.

4) Е-тест (Епсилометър тест) за определяне на МИК към имипенем, меропенем и колистин

5) Микродилуционен тест за определяне на МИК към колистин (обхват в μg : 16 - 0,25 mg/l)

4.2. Фенотипни методи за скрининг на карбапенемази

1) Модифициран Ходж тест за скрининг на карбапенемазна продукция

2) Модифициран Carba NP тест v3 (MCNP v3) за скрининг на карбапенемазна продукция

3) Двойно-дисков комбиниран метод за оценка на MBL продукцията на изолати от *Pseudomonas spp.* и *Acinetobacter spp.*

4) Комбиниран Е-тест (Епсилометър тест) имипенем и имипенем/ЕДТА за скрининг на металоензими от изолати на *Pseudomonas spp.* и *Acinetobacter spp.*

4.3. Молекулно-генетични методи за детекция на гени на резистентност и определяна на щамова принадлежност на изолатите

1. PCR (Polymerase Chain Reaction) анализ за доказване на гени, кодиращи семейства VIM и IMP метало-бета-лактамази и гени, кодиращи оксацилинази от група 2df, субгрупи от 1 до 4.

Двадесет изолата (11 броя *A. baumannii* и 9 броя *P. aeruginosa*), колекционирани през 2011 г., бяха изпратени за потвърдителен анализ чрез мултиплексен PCR за детекция на гени, кодиращи бета-лактамази (Acuitas Gene Test) в лабораторията на OpGen, USA.

2. RAPD (random amplification of polymorphic DNA) PCR анализ за определяне на щамовата принадлежност на изолати от *Pseudomonas spp.* и *Acinetobacter spp.*:

PCR протокол за RAPD анализ на *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*:

PCR реакция за обем 25µl: 2,5µl 10xPCR Extra buffer with 1,5 mM MgCl₂; 2,5 µl 2mM dNTP; 0,3 µl Taq polymerase 5U/µl; 4µl DNA; 10,7 µl дестилирана вода; 2,5 µl ERIC1R праймер и 2,5 µl ERIC2 праймер.

PCR протокол за амплификация: 1. начална денатурация на 95°C (5 мин.), 2. 45 цикъла на амплификация, включващи: денатурация на 95°C (35 сек.); анилинг на 42°C (35 сек), елонгация на 72°C (35 сек.), 3. крайна елонгация на 72°C (10 мин.)

4.4. Молекулно-генетични методи за детекция на експресията на гени, кодиращи ключови белтъци на ефлукс помпите: MexAB-OprM, MexXY-OprM, трансмембрания белтъчен рецептор за имипенем OprD и вродената AmpC при *P. aeruginosa*.

Експериментално се разработиха и оптимизираха два независими собствени протокола за изготвяне на PCR mix и симултантна амплификация на MexA, MexX и OprD гена чрез използване на два различни кита за едностъпков количествен RT-PCR:

- AccuPower® Dual-HotStart™ RT-qPCR Master Mix (**Bioneer**) - за проби с висока чистота ($A_{260}/A_{280} \geq 2,0$)
- Verso 1-Step qRT-PCR kit Plus ROX Vial (**Thermo Scientific**) – с допълнителен RT enhancer за проби с чистота под 2,0

Като таргетни протеини за оценката на експресията на двете ефлукс помпи - триплетите MexAB-OprM и MexXY-OprM се избраха: MexA и респективно MexX.

Протоколът с Verso 1-Step qRT-PCR kit Plus ROX Vial (**Thermo Scientific**) беше успешно приложен и за оценка на експресията на индуцибилната цефалоспориноза AmpC. Индукцията на последната се извърши при култивиране с цефокситин и имипенем преди РНК екстракцията.

Като “house-keeping” ген използвахме *groD* – кодиращ главния сигма фактор 70 при *Pseudomonas*, част от РНК полимеразния комплекс, който се експресира константно. Получените резултати от относителната експресия на транспортната РНК на тестваните изолати се представиха в сравнение с експресията на съответните белтъци при референтния щам *P. aeruginosa* ATCC 28753 (Quale et al. 2006).

Всички проби бяха тествани двукратно, включително и *groD* като позитивна вътрешна контрола и “house-keeping” ген, при всеки експеримент.

а) Протокол за симултантна амплификация на MexA, MexX и OprD белтъци с използване на AccuPower® Dual-HotStart™ RT-qPCR Master Mix, Bioneer

PCR mix за реакция с обем 25 µl: 14 µl Master mix, 3,0 µl Buffer, 0,25 µl флуоресцентна сонда, прав праймер - 0,5 µl 100 pmol/ µl, обратен праймер - 0,5 µl 100 pmol/ µl, дестилирана вода (H₂O) – 3,75 µl, РНК проба - 3 µl

PCR протокол за амплификация: 1. Обратна транскрипция на 60°C за 15 мин. 2. Начална денатурация на 95°C за 10 мин. 3. 40 цикъла на амплификация, включващи: денатурация на 95°C за 45 сек., анийлинг на праймерите и елонгация за 45 сек. 56°C. 4. крайна елонгация на 72°C за 10 мин.

б) Протокол за симултантна амплификация на MexA, MexX и OprD белтъци, както и за независима оценка на експресията на AmpC, с използване на Verso 1-Step qRT-PCR kit Plus ROX Vial Thermo Scientific

PCR mix за реакция с обем 25 µl: 12,5 µl 2x1-Step qRT-PCR mix, 0,25 µl Verso enzyme, 1,25 µl RT enhancer, 0,25 µl флуоресцентна сонда, прав праймер - 0,4 µl 100 pmol/ µl, обратен праймер - 0,4 µl 100 pmol/ µl, дестилирана вода (H₂O) – 6,95 µl, РНК проба - 3 µl

PCR протокол за амплификация: 1. Обратна транскрипция на 55°C за 15 мин. 2. Начална денатурация на 95°C за 15 мин. 3. 40 цикъла на амплификация, включващи: денатурация на 95°C за 30 сек., анийлинг на праймерите и елонгация за 45 сек. 56°C. 4. крайна елонгация на 72°C за 10 мин.

4.5. Секвениране на гени, кодиращи карбапенемази

Крайната цел на проектите за секвениране е получаване на нуклеотидната последователност на таргетен ген или цял геном.

5. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

5.1. Идентификация на клинични изолати *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*

Всички налични изолати *Acinetobacter* бяха идентифицирани от система Vitek 2 и мануален тест Api 20 NE като *Acinetobacter baumannii* с коефициент на достоверност респективно над 99% и над 95%. Този резултат се потвърди и от генетичния скрининг за *intrinsic* OXA-51 гена, детекцията на който може да се използва за видова идентификация. 100% от изолатите бяха носители на OXA-51. До сега разработените биохимични скрининги не позволяват разграничаване на видовете *Acinetobacter baumannii* и неговите близки родственици *Acinetobacter genomic species 3* и *Acinetobacter genomic species 13 TU* (Стоева Т 2009).

Всички налични изолати *Pseudomonas* бяха идентифицирани от система Vitek 2 и мануален тест Api 20 NE. *Pseudomonas aeruginosa* се доказва с коефициент на достоверност над 99% при Vitek 2 и над 95% при Api 20 NE.

При проведената реидентификация един от запазените изолати, рутинно диагностициран като *Pseudomonas aeruginosa*, се доказва от система Vitek 2 и мануален тест Api 20 NE като *Pseudomonas putida*. Изолатът е получен от раневи секрет от пациентка с десностранен белодробен абсцес, пролежала във Втора хирургична клиника през 2012 г., която многократно е лекувана с антибиотици в амбулаторната практика за чести рецидивиращи бронхити и пневмонии. Той бе включен в по-нататъшния скрининг за метало-ензимна продукция, като отделен независим изолат, фигуриращ под номер 44.

5.2. Епидемиологични данни

Колекциониранияте изолати са получени от общо 14 клиники и отделения при УМБАЛ „Св. Георги“ (табл. 1). Най-голям е броят (25) на изолатите и при двата бактерии от Клиниката по анестезиология и интензивна терапия (КАИЛ), следвана от Отделението по Изгаряния (12 броя) и Клиниката по Кардиохирургия (10 броя).

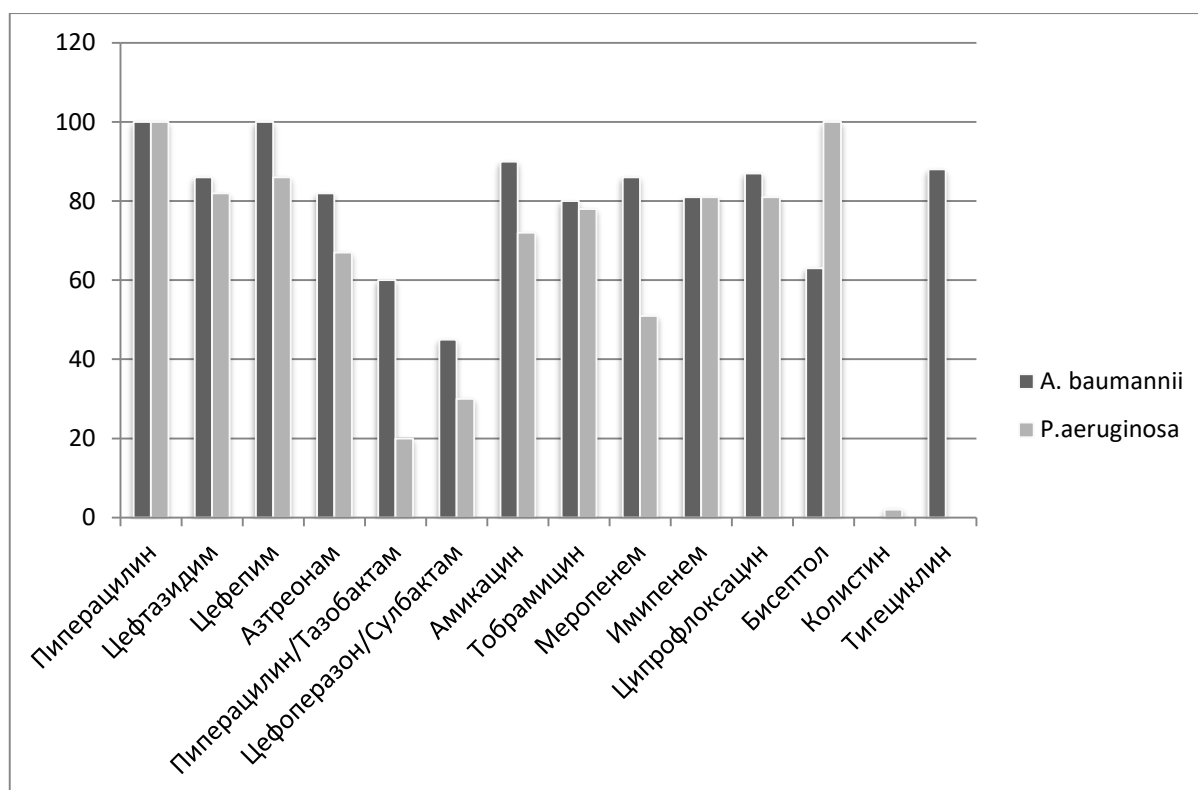
Таблица 1. Брой и разпределение на изолатите *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, колекционирани в периода 2010-2014 г. от различни клинични звена на УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив

Клиника/отделение	Брой изолати <i>A. baumannii</i>	Брой изолати <i>P. aeruginosa</i>
КАИЛ	15 (35%)	10 (23%)
Кардиохирургия	6	4
Изгаряне	6	6
Неврохирургия	3	1
ССХ	3	-
1-ва хирургия	3	-
КОТ	2	-
Инвазивна кардиология	1	-
Урология	1	5
АГ-интензивно отделение	1	3
Детска клиника	1	7
2-ра хирургия	1	3
УНГ	-	2
Инфекциозна клиника	-	1
Общ брой	43	43

5.3. Антибиотична резистентност на *Acinetobacter* и *Pseudomonas* към карбапенеми - фенотипни данни

Антибиотичната чувствителност беше изпитана *in vitro* както с класически ДДТ по Bauer-Kurby, така и чрез МИК градиент от система Vitek 2 и Е-тест за двата карбапенема и колистин. Интерпретацията бе извършена според критериите на CLSI за 2015 г. Използваните методи показаха висока степен на съпоставимост на резултатите.

Всички налични изолати изяха резистентност към повече от 3 групи антимикробни средства, което ги класифицира като полирезистентни (фиг.1).



Фигура 1. In vitro антимикробна резистентност на тестваните изолати по ДДТ и МИК от система Vitek 2

Легенда: По ординатната ос е отбелязан процентът на резистентност (%), по абсцисната - наборът от изпитаните антимикробни средства.

Чувствителността на *P. aeruginosa* към Бисептол е тествана с диагностична цел. Не е изпитвана чувствителността към Тигециклин при *P. aeruginosa*.

Най-висока степен на резистентност се очертава при групите на бета-лактамните антибиотици (пиперацилин - 100%, цефепим - над 86%, цефтазидим - над 82%), аминогликозидите (тобрамицин - над 78%) и хинолоните (ципрофлоксацин - над 81%) и при двата микроба. Прави впечатление 100%-вата чувствителност на нашите изолати ацинетобактер към Колистин, докато при псевдомонас 10 от изолатите се оказаха резистентни към този представител на полимиксиновата група при тестване с ДДТ по Bauer-Kurby, чрез МИК градиент от система Vitek 2 и Е-тест. Тази резистентност се потвърди само при един от изолатите псевдомонас при изпитване чувствителността към колистин чрез микродилуционен тест от НРЛ Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност, НЦЗПБ, София според критериите на EUCAST 2016.

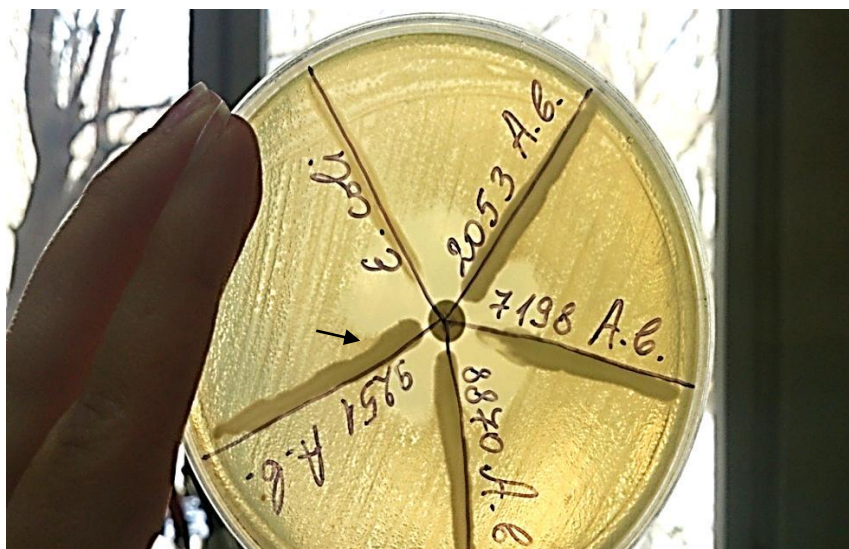
Резистентността към тигециклин, определена по МИК градиент (≥ 4 $\mu\text{g/l}$) от система Vitek 2 за ацинетобактер е 88% (38 броя от общо 43).

И двата вида изолати - *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, демонстрираха еднакъв процент на резистентност към имипенем (81%). Относно меропенем, при ацинетобактерите се наблюдава по-висок процент резистентност (86%), докато само половината от псевдомонасите се изявиха като резистентни към този представител.

5.4. Фенотипен скрининг за продукцията на карбапенемази при *Acinetobacter* и *Pseudomonas*

Всички ацинетобактери показаха положителен Ходж тест, съответно продукцията на карбапенемази, докато подобен феномен не се наблюдаваше при псевдомонасите, с изключение на изолатата *Pseudomonas putida* (фигура 2). Всички псевдомонаси се потвърдиха като непродуциращи карбапенем-хидролизиращи ензими и при провеждането на MCNP v3 тест с изключение на *Pseudomonas putida*, който позитивира на 30-та минута.

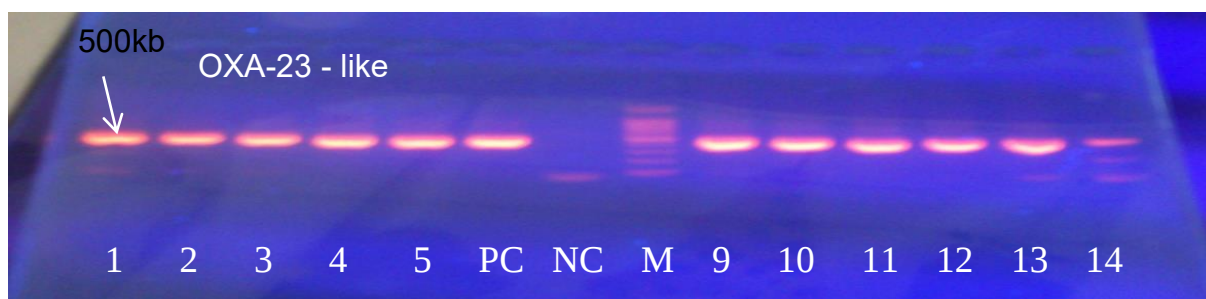
Всички налични изолати *A. baumannii* и *P. aeruginosa* не демонстрираха фенотипно продукцията на карбапенемази клас Б - металоензими при провеждането на двойно дисков комбиниран тест с дискове имипенем и имипенем + ЕДТА, както и комбиниран епсилومتър тест с имипенем + имипенем/ЕДТА. Изолатът *Pseudomonas putida* демонстрира положителен епсилومتър тест с имипенем + имипенем/ЕДТА: минималната инхибираща концентрация на имипенем в присъствието на ЕДТА намалява с 2 или повече разреждания.



Фигура 2. Модифициран Ходж тест на изолати *A. baumannii*. Със стрелка е отбелязан прорасналият към диска инокулум *E. coli* ATCC R 25922, вследствие на карабапенемаза-продуциращия щам *Acinetobacter baumannii* № 9251

5.5. Молекулярно-биологичен анализ на гени, кодиращи резистентност към карбапенеми при *Acinetobacter* и *Pseudomonas*

От проведените молекулярно-генетични тестове 42 от ацинетобактерите (97,7%) се оказаха носители на OXA-23-like гена (фигура 3). Всички бяха отрицателни за носителство на OXA-58 и OXA-24 гени, но притежаваха OXA-51 ген (потвърждение за тяхната видова принадлежност). Не се установи присъствието на ISAbal инсерционна последователност, разположена пред OXA-51 гена, която да промотира хиперекспресията му.



Фигура 3. Резултат от гел-електрофореза на 11 позитивни на OXA-23-like гена *A. baumannii*: позиция 6-позитивна контрола (PC), позиция 7-негативна контрола (NC), позиция 8 – ДНК молекулен маркер

Всички тествани изолати *P. aeruginosa* бяха отрицателни за носителство на метало-ензим кодиращи гени – blaVIM и blaIMP, което корелира на 100% с фенотипните резултати от MXT, MCNP-теста, двойно дисковия комбиниран тест с дискове имипенем и имипенем + ЕДТА, както и комбинирания епсилометър тест с имипенем + имипенем/ЕДТА.

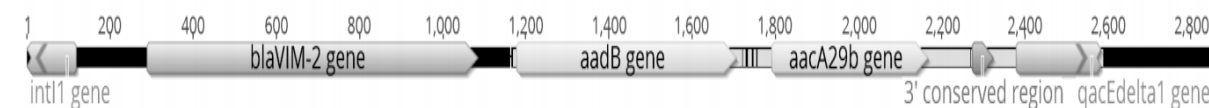
Анализът на 11 наши изолата *A. baumannii* от лабораторията на OpGen, USA потвърди наличието на OXA-23 и OXA-51 кодиращи гени при всички изолати като при два от тях в комбинация с PER-1, а при други три с TEM-7, кодиращи гени.

При всички 9 изолата *P. aeruginosa* не се доказаха гени, кодиращи металоензими, но при 3 от изолатите се детектираха OXA-50 представители на група 2df, които не са съобщавани до момента в България. При един от тях (с интермедиерна чувствителност към имипенем и меропенем) OXA-50 е в комбинация с OXA-2; при един изолат, резистентен на имипенем и с интермедиерна чувствителност към меропенем, в комбинация с OXA-10 и при третия, резистентен и на двата карбапенема, самостоятелно без детекция на други бета-лактамаза кодиращи гени.

Други два изолата се доказаха като носители на OXA-10 в комбинация с VEB-1.

Единственият наличен карбапенемаза-продуциращ *P. putida* бе доказан като първият VIM-2-продуцент в България в НРЛ по Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност, НЦЗПБ, София.

Секвенирането на региона разкри наличието на интегрон, кодиращ VIM-2 гена в асоциация с гена, кодиращ ацетил трансфераза - aacA29b. Наличието на ацетил-трансферазата обяснява резистентността към аминокликозидите амикацин и гентамицин на тествания изолат (фигура 4).



Фигура 4. Интегрон, кодиращ VIM-2 гена в асоциация с гена, кодиращ ацетил трансферазата - aacA29b при *P. putida*. Този резултат обяснява резистентността на изолата към карбапенеми в съчетание с резистентност към аминокликозидите амикацин и гентамицин.

5.6. Резултати от молекулно-генетичните методи за симултантна детекция на експресията на гени, кодиращи ключови белтъци на ефлукс помпите: MexAB-OprM, MexXY-OprM и трансмембрания белтъчен рецептор за имипенем OprD при *P. aeruginosa*

Проведе се анализ върху експресията на гени, кодиращи белтъци на ефлукс помпите и OprD белтъка на 32 изолата *P. aeruginosa*. И двата протокола на работа показаха добра възпроизводимост, съпоставимост и лесна интерпретация на резултатите от софтуерния продукт - Exicycler™ Analysis software. “Up-down” регулацията на съответните гени се интерпретира на базата на експресията на предварително подбран “house-keeping” ген – в случая кодиращият главния сигма фактор от рибозомния полимеразен комплекс при псевдомонас *groD*. Крайните резултати от експресията на трите гена се съпоставиха с експресията на съответните гени при референтен щам *P. aeruginosa* ATCC 27853, чувствителен на карбапенеми.

Експресията на гените се анализира чрез $\Delta\Delta Ct$ метод, където *groD* служи за референтен ген, а референтният щам *P. aeruginosa* ATCC 27853 за калибратор. Стандартното отклонение на ΔCt ($\Delta Ct\ SD, s$) беше изчислено по формулата $SQRT(SD^2[gene] + SD^2[reference\ gene])$. Fold change (FC) беше определен като $2^{-\Delta\Delta Ct}$, минималният fold change (FC min) като $2^{-\Delta\Delta Ct+s}$, а максималният като $2^{-\Delta\Delta Ct-s}$. Позитивните грешки (error bars-EB) на фигура 5 и фигура 10 представят FC max-FC, а негативните съответно FC-FC min.

За интерпретация на резултатите приехме следните критерии, предложени от *J Quale et al.* за **MexA** и **MexX**, и от две независими проучвания на *JL Dumas et al.* и *Ocampo-Sosa et al.* за трансмембрания **OprD** (Quale et al. 2006; Dumas et al. 2006; Ocampo-Sosa et al. 2012):

хиперекспресия:

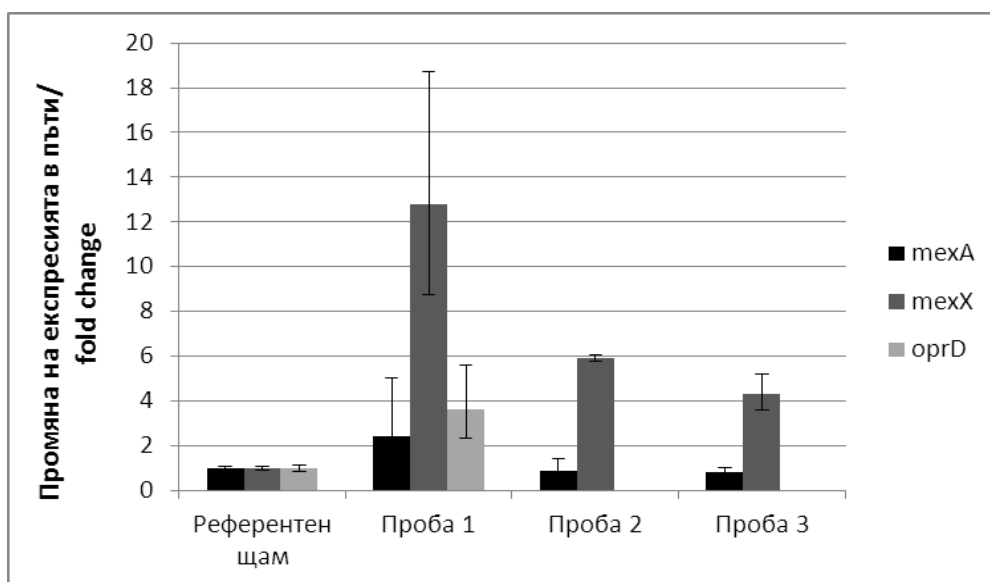
MexA ≥ 2 пъти в сравнение с референтния щам (J Quale et al., 2006);

MexX ≥ 10 пъти в сравнение с референтния щам (J Quale et al., 2006);

OprD ≥ 2 пъти в сравнение с референтния щам (Ocampo-Sosa et al., 2012);

понижена експресия или загуба на продукция:

OprD ≤ 0.3 пъти в сравнение с референтния щам (JL Dumas et al., 2005);



Фигура 5. Количествен анализ на експресията на MexA (в черен цвят), MexX (в тъмно сив цвят) и OprD (в светло сив цвят) при 3 изолата *P. aeruginosa* в сравнение с референтния щам *P. aeruginosa* ATCC 27853. При изолат №1 се наблюдава хиперекспресия на MexA и OprD гена в съчетание с повишена експресия на MexX гена. При изолат №2 MexA гена е нормално експресиран, MexX е с повишена експресия спрямо референтния щам и липсва експресия на OprD. При изолат №3 MexA е нормално експресиран, MexX е с повишена експресия и отново липсва експресия на OprD гена.

Данните на 12 тествани изолата са интерпретирани, обобщени и демонстрирани на фигура 6.

Проба №	Лабораторен №	Imipenem	Meropenem	Mex A	Mex X	OprD
1	3122	R	R	n	↑	n
2	159	R	S	n	↑	n
3	1574	I	R	n	↑↑	n
4	1509	R	I	↑↑	↑↑	↑↑
5	1488	R	R	n	↑	↓
6	8127	R	I	n	↑	↓
7	5223	R	S	n	↑	n
8	583	R	I	n	↑↑	↑↑
9	379	R	I	↑↑	↑	↓
10	202	I	I	↑↑	↑↑	↓
11	3979	R	S	n	↑	↓
12	393	R	I	↑↑	↑	↓

Фигура 6. Асоциация между хиперекспресията на MexXY-OprM, MexAB-OprM и OprD като механизми, определящи карбапенемна резистентност при псевдомонас. При всички 12 изолата *P. aeruginosa* се наблюдава повишена експресия или хиперекспресия на MexXY-OprM ефлукс помпата, в някои от случаите в съчетание с хипекспресирана MexAB-OprM с или без загуба на трансмембрания протеин OprD.

Легенда:

S - чувствителен; I - интермедиерен; R - резистентен

↑-повишена експресия спрямо референтния щам ATCC 27853

↓-понижена експресия или загуба на продукция (≤ 0.3 JL Dumas et al., 2005)

↑↑-хиперекспресия

(MexA ≥ 2 ; MexX ≥ 10 – J Quale et al., 2006; OprD ≥ 2 Ocampo-Sosa et al., 2012)

n-нормална експресия

5.7. Статистическа обработка на данните от генната експресия чрез IBM софтуерен продукт SPSS 19.0

Статистически се обработиха резултатите на всички 32 тествани изолата псевдомонас. Съпостави се честотното разпределение в проценти на експресията на трите гена, кодиращи съответно белтъците на ефлукс помпите: MexA и MexX, както и трансмембрания протеин OprD. На следващ етап се извърши непараметричният анализ чрез Chi-square test и Fisher's exact test за доказване на асоциация между експресията на различните механизми на резистентност и чувствителността към карбапенеми.

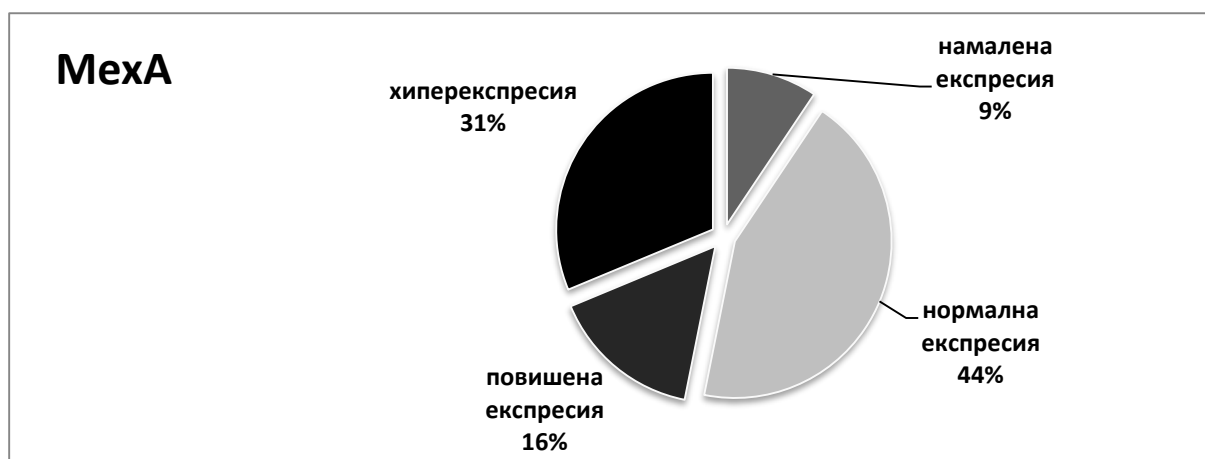
Експресията на всеки ген се категоризира в четири признака (системата SPSS не позволява въвеждането на кирилица), както следва:

- „0“ – **lack of expression**/ липса на експресия
- „1“ – **decreased expression to Ref**/ намалена експресия
в сравнение с референтния щам
- „2“ – **normal expression**/нормални нива на експресия
- „3“ – **increased expression to Ref**/ повишена експресия
в сравнение с референтния щам
- „4“ – **hyperexpression**/ хиперекспресия

Получените графични резултати допълнително се обработиха на кирилица в програма Word и Excel, Microsoft, USA.

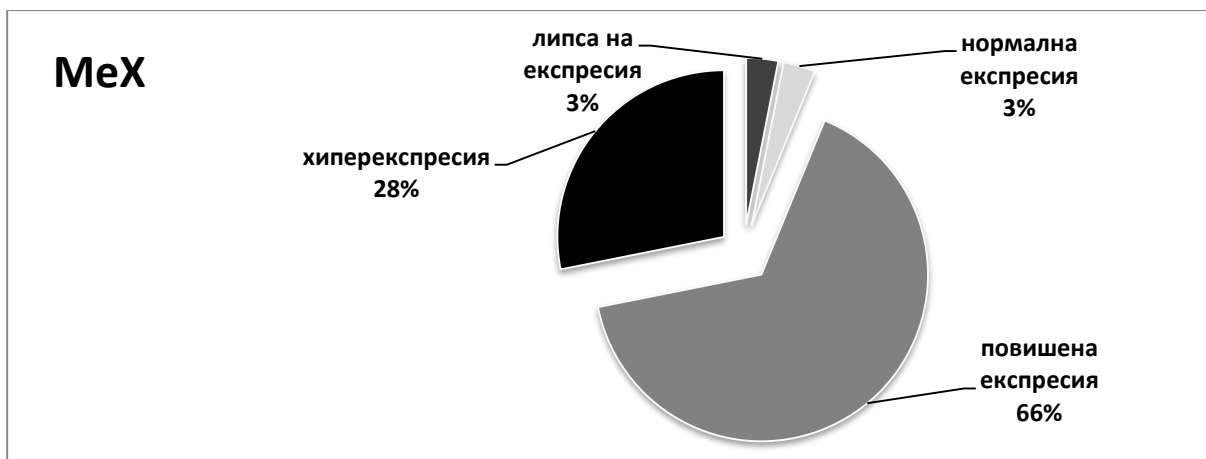
Въпреки, че броят на изолатите надхвърляше необходимия за малообемни извадки (над 30), поради разпределението им в различни категории (с липсваща, намалена, нормална, висока и хипер-експресия гени) и признаци (чувствителни, с интермедиерна чувствителност и резистентни към имипенем и меропенем) не успяхме да достигнем статистическа значимост при нашите резултати, като не се отчете достоверна разлика при сравнение на отделните параметри по групи ($p > 0.05$).

A. Честотно разпределение/ Frequencies



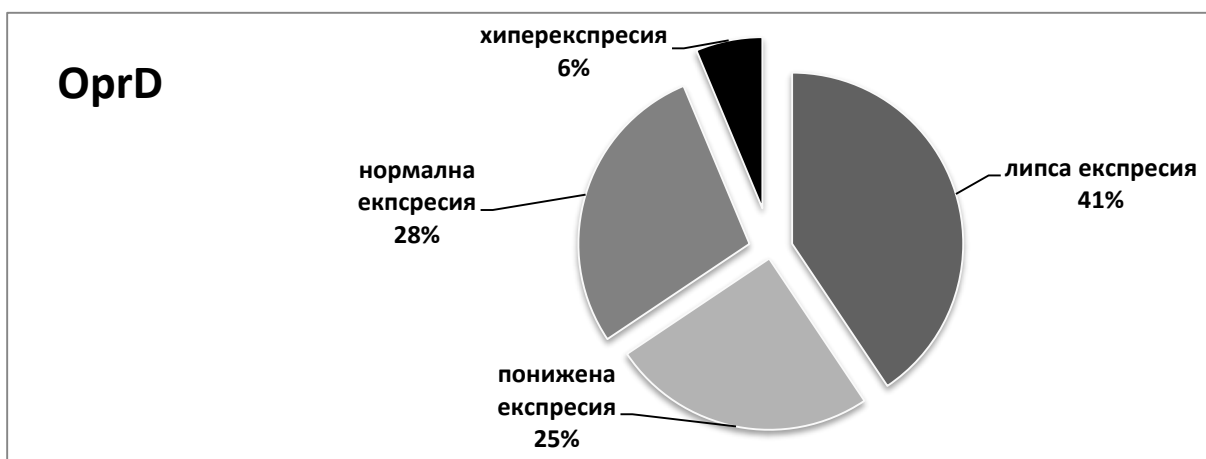
Фигура 7. Графично процентно разпределение на четирите категории експресия при MexA гена. С най-голям относителен дял са изолатите с нормална експресия (42.8%), следвани от изолатите с хиперекспресия (31.3%) и повишена експресия (15.6%) спрямо референтния щам. Най-малък е дялът на изолатите с намалена експресия (9%).

Общ сбор проценти на изолатите с повишена и хиперекспресия:
 $15,6 + 31,3 = 46,9 \%$



Фигура 8. Графично процентно разпределение на четирите категории експресия при MexX гена. С най-голям относителен дял са изолатите с повишена експресия (65.6%), следвани от изолатите с хиперекспресия (28.1%). Най-малък е дялът на изолатите с нормална и липсваща експресия (3%).

Общ сбор проценти на изолатите с повишена и хиперекспресия: $65,6 + 28,1 = 93,8 \%$



Фигура 9. Графично процентно разпределение на четирите категории експресия при OprD гена. С най-голям относителен дял са изолатите с липса на експресия (40.6%), следвани от изолатите с нормална експресия (28.1%) и тези с понижена експресия (25%). Най-малък е дялът на изолатите с хиперекспресия (6.3%).

Общ сбор проценти на изолатите с липсваща и понижена експресия: $40,6 + 25,0 = 65,6 \%$

Б. Резултати от непараметричния анализ чрез Chi-square test и Fisher's exact test за доказване на асоциация между експресията на различните механизми на резистентност и чувствителността към карбапенеми:

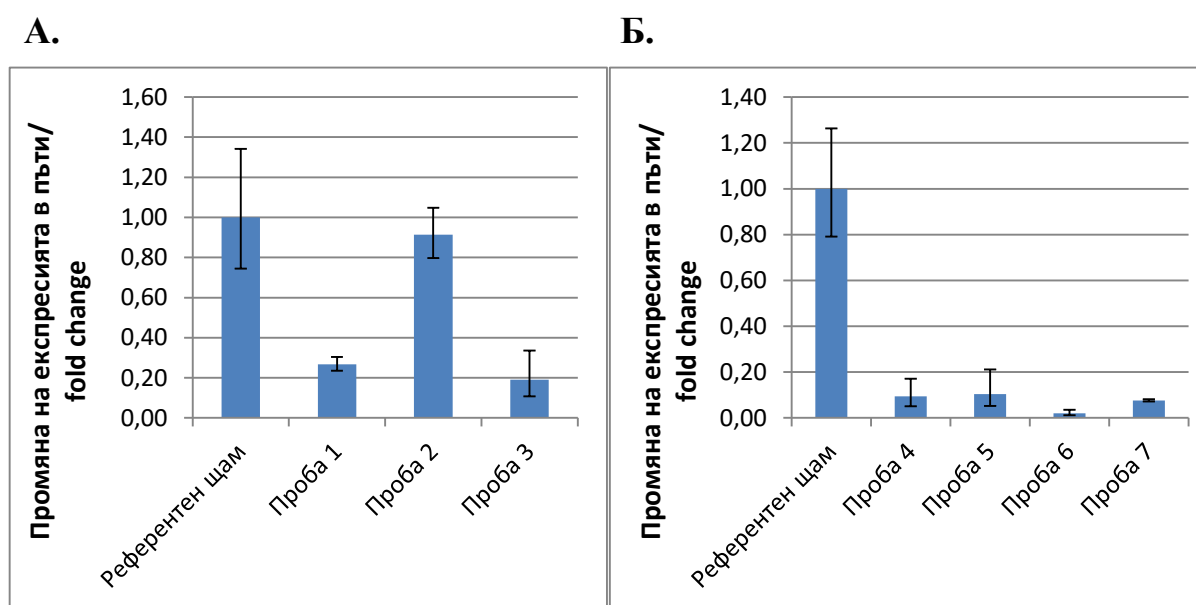
Обобщение: повишената експресия и хиперекспресия на MexAB-OprM се асоциира най-вече с резистентност към имипенем и по-слабо към меропенем. Повишената експресия и хиперекспресия на MexXY-OprM се асоциира в над 90% с резистентност и към двата карбапенема. Намалената експресия и липса на експресия на OprD е предпоставка за резистентност към имипенем и по-слабо се асоциира с тази при меропенем.

От направените статистически анализи като водеща причина за резистентност към карбапенемни антибиотици при нашите изолати псевдомонас се оформя повишената експресия или хиперекспресия на MexXY-OprM ефлукс помпата (93,8%), в някои от случаите в комбинация с намалена или липсваща експресия на трансмембрания OprD (66%). Повишената или хиперекспресията на MexAB-OprM помпа на този етап заема последна позиция с 46,9%. При всички 5 изолата с тотална липса на OprD експресия се наблюдава повишена експресия на MexXY-OprM, в един от случаите в комбинация с хиперекспресия на MexAB-OprM помпата. Само при един изолат намалената продукция на OprD се оформя като единствена причина за резистентност поради нормална експресия на ефлукс помпите. Хиперекспресията на MexAB-OprM се наблюдава при 10 изолата, при всички в комбинация с повишена или хиперекспресия на MexXY-OprM. При един изолат, резистентен и към двата карбапенема, се регистрира липса на експресия на MexXY-OprM, както и нормални нива на експресия на MexAB-OprM и OprD, което предполага възможни други механизми на резистентност или мутантен OprD продукт. При други 4, резистентни на имипенем, повишената или свръхекспресия на MexXY-OprM се оформи като единствен фактор, определящ тази резистентност, предвид нормалните нива на експресия на MexAB-OprM и OprD. При един изолат, резистентен на имипенем и с интермедиерна чувствителност към меропенем, се наблюдаваха свръхекспресирани нива на MexXY-OprM и OprD и нормални такива при MexAB-OprM. При този случай е възможно компенсаторно завишена продукция поради мутантен OprD и/или афинитет на MexXY-OprM към имипенем.

5.8. Резултати от молекулно-генетичните методи за детекция на експресията на гена, кодиращ индуцибелната цефалоспориназа AmpC

След предварителна индукция с цефокситин и имипенем на Мюлер-Хинтон агар, и последваща РНК екстракция, се проведе анализ на AmpC експресията при 15 от 32-те изолата *Pseudomonas* с оценка на експресията на ефлукс помпите и OprD. При 12 изолата (80%) се наблюдаваха по-ниски нива на експресия в сравнение с референтния щам. Един от изолатите демонстрира по-високи нива на експресия от референтния, но без данни за хиперекспресия, а два бяха с неинтерпретабилни данни. Резултатите от анализа на 7 проби са представени на фигура 10.

Забележка: За хиперекспресия се приемат стойности, при които AmpC ≥ 10 пъти в сравнение с референтния щам (J Quale et al., 2006);

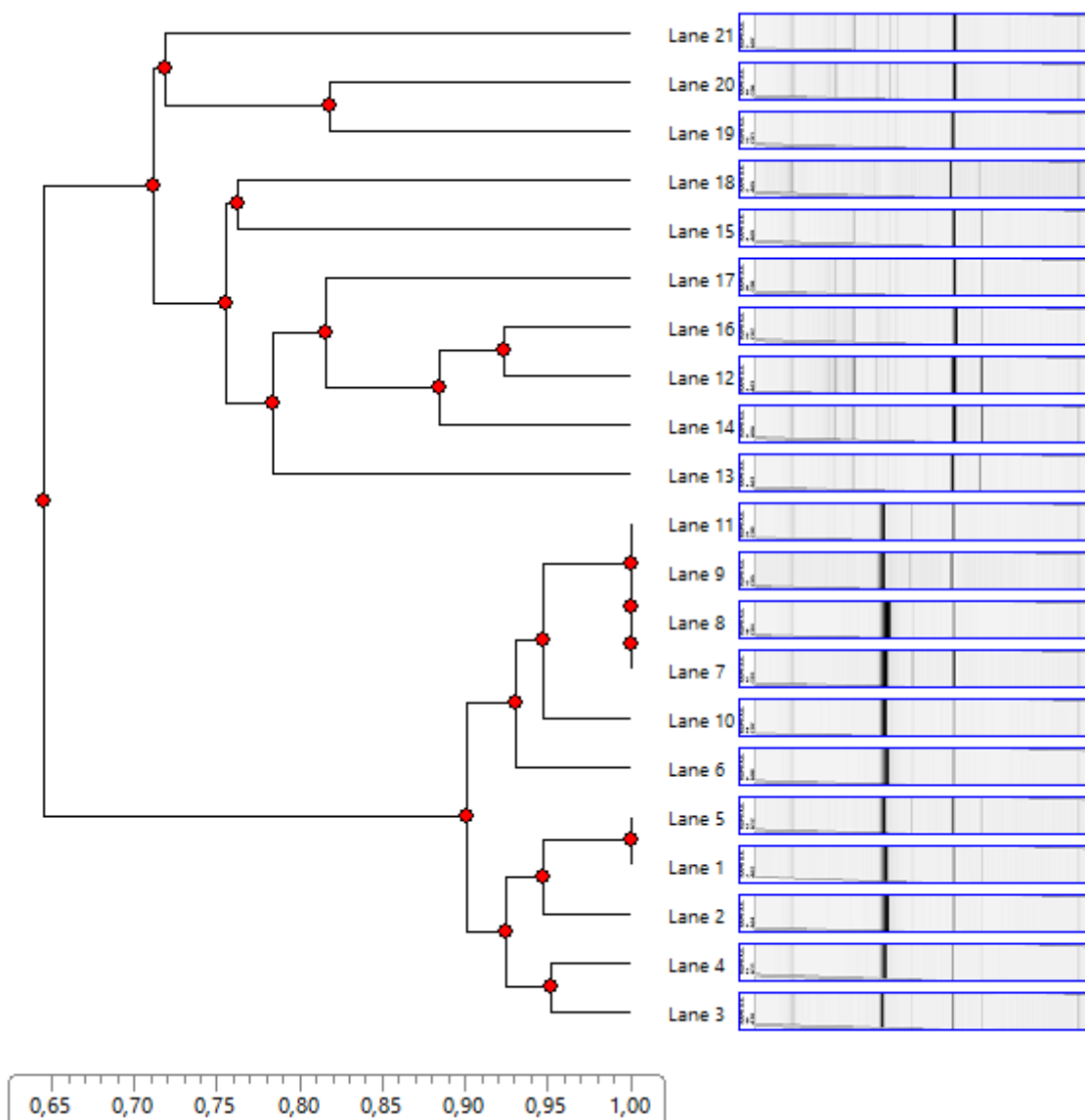


Фигура 10. Анализ на експресията на AmpC гена при 7 изолата *P. aeruginosa* в сравнение с референтния щам *P. aeruginosa* - ATCC 27853); При двата показани експеримента А (с 3 проби) и Б (с 4 проби) всички тествани изолати демонстрираха по-ниски нива на експресия на AmpC гена в сравнение с референтния щам.

5.9. Резултати от RAPD-PCR анализа за определяне на щамовата и клонова принадлежност на изолатите *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*

При RAPD анализа на 21 ОХА-23 позитивни изолата *A. baumannii* от КАИЛ, Клиниката по Кардиохирургия и Клиниката по Изгаряния (в съотношение 11:5:5) се установиха 6 различни електрофоретични профила, което предполага наличието на 6 основни циркулиращи щамове в тези звена.

При филогенетичния анализ единадесет от тях (всички от КАИЛ; ивици от 1 до 11) демонстрираха сходство над 90%, което предполага принадлежност към общ клон. Останалите 10 профила показаха приблизително 70% сходство, което предполага наличието на втори клон (фигура 11). RAPD анализът на 20 случайно подбрани изолата *P. aeruginosa* от същите клиници (в съотношение 10:5:5) разкри общо 3 електрофоретични профила, като десетте от КАИЛ принадлежаха към 2 от тях, което предполага наличието на два основни циркулиращи щам в звеното.

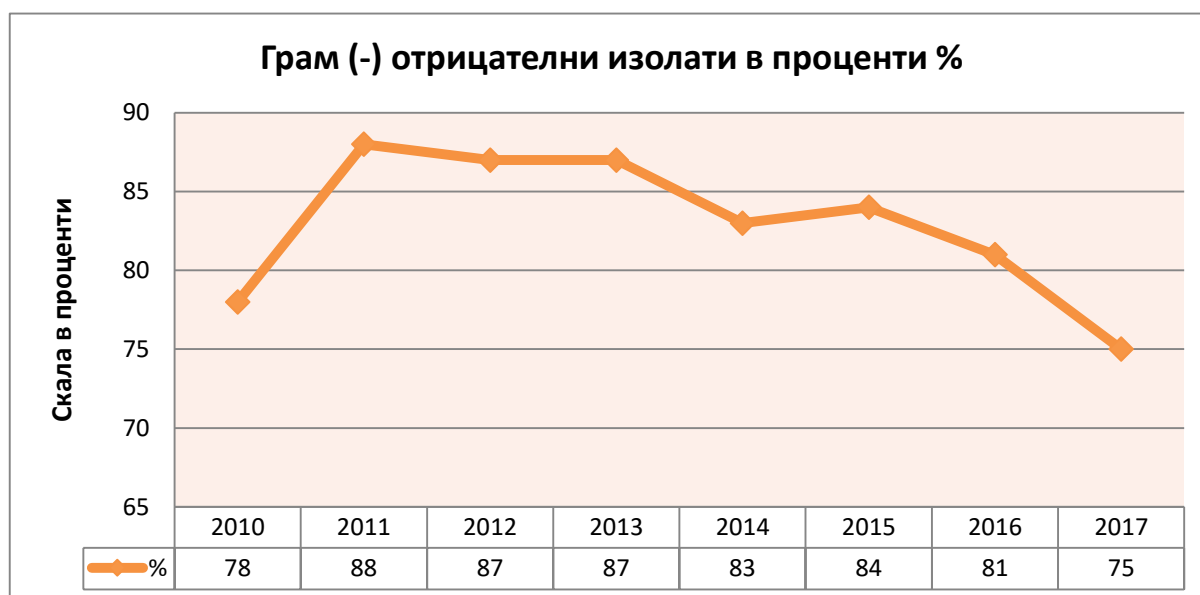


Фигура 11. Дендрограма на 21 изолата ОХА-23 позитивни *A. baumannii*. Анализът на графиката разкрива разпространението на 2 основни клона, циркулиращи в Университетската болница „Свети Георги“-Пловдив; линии 1-11 демонстрират сходство над 90% и определят наличието на първи клон; линии 12-21 с приблизително 70% сходство, определящи наличието на втори клон.

5.10. Динамика на структурата и резистентността към карбапенеми за периода 2010-2017 год. в УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив

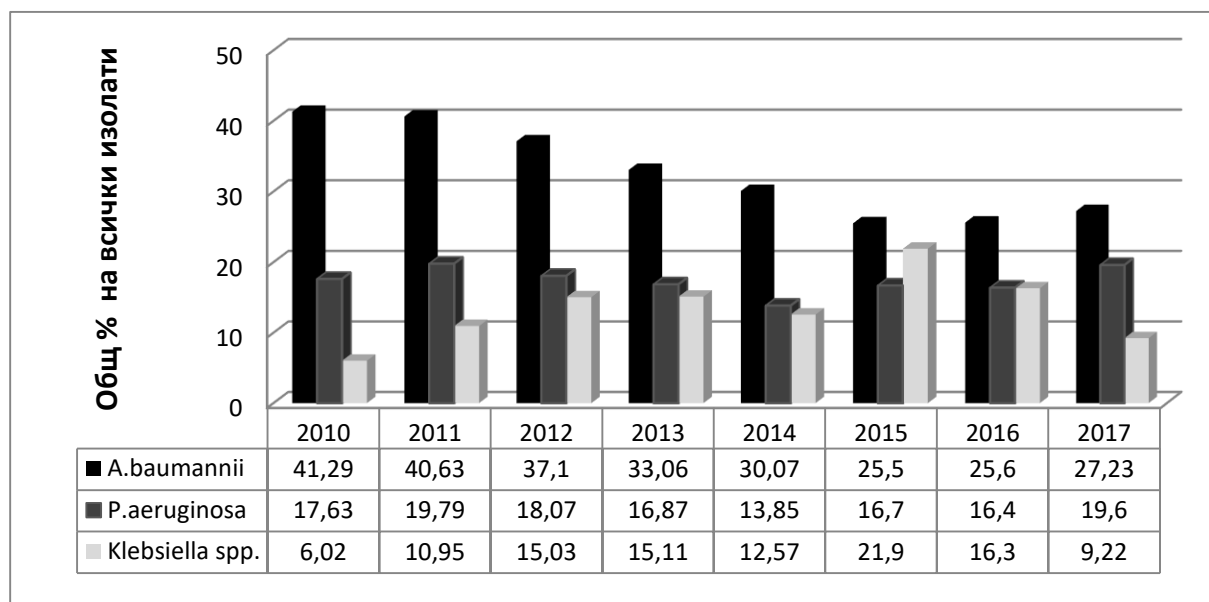
Резистентността към карбапенемните антибиотици е обект на многобройни проучвания през последните 20 години на нашия век. На фона на световна глобализация на проблемите с антибиотичната резистентност, този, касаещ карбапенемите се откроява с особен акцент. Причините са многобройни. Карбапенемите са едни от най-често използваните анти-микробни средства в интензивните отделения като последен шанс за преодоляване на терапевтичните рестрикции, с добри фармакокинетични и динамични показатели и с широк спектър на действие, повлияващ и клинично значимите Грам-негативни неферментативни представители - *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. Инфекциите, причинени от последните, се оказват особено рискови за интензивните отделения и клиниките с тежки хирургични интервенции като Кардиохирургия и Изгаряния, където пациентите се подлагат на чести инвазивни процедури (интубация, катетаризация), страдат от белтъчен недоимък, престояват дълго в отделенията в статично положение, което води до хиповентиляция и нарушения в микроциркулацията. Всичко това наред с други усложняващи фактори (лоши хигиенни и протиепидемични мерки) са предпоставка за колонизацията с полирезистентни вътреболнични щамове.

Подобна тенденция наблюдаваме и в нашата Клиника по анестезиология и интензивно лечение. През последните 8 години Грам-негативните изолати трайно превалират като надхвърлят 75% (фигура 12).



Фигура 12. Общ процент на Грам негативните изолати за периода 2010-2016 г. от Клиника по анестезиология и интензивно лечение към УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив

Челните 2 позиции се заемат от неферментативните представители: *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* (фигура 13).



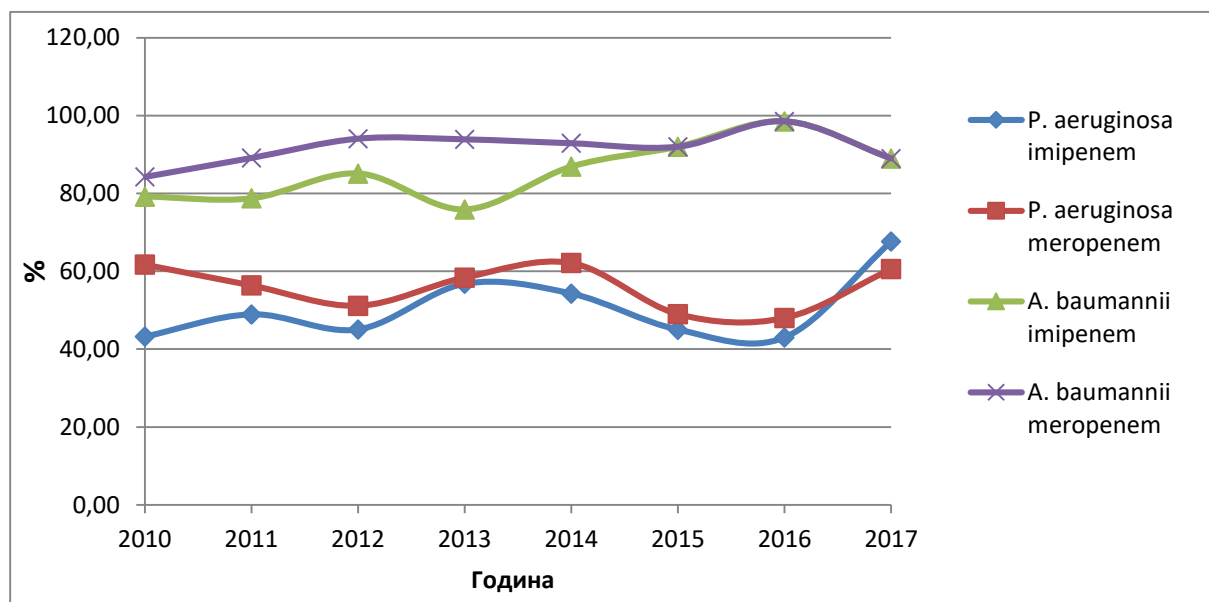
Фигура 13. Най-чести изолати за периода 2010-2017 г. от Клиника по анестезиология и интензивно лечение към УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив

Въпреки че не доказахме статистическа значима динамика в нарастване на резистентността към двата карбапенемни антибиотика – имипенем и меропенем (Times series, SPSS 19.0) при двата бактерия *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* от КАИЛ (фигура 14), процентите се открояват с драстично високи стойности, характерни за интензивните отделения: респективно над 76% за ацинетобактер и над 43% за псевдомонас. Не се доказва и бъдеща тенденция за нарастване на резистентността за двата карбапенема и при двата бактерия (forecasting, SPSS 19.0).

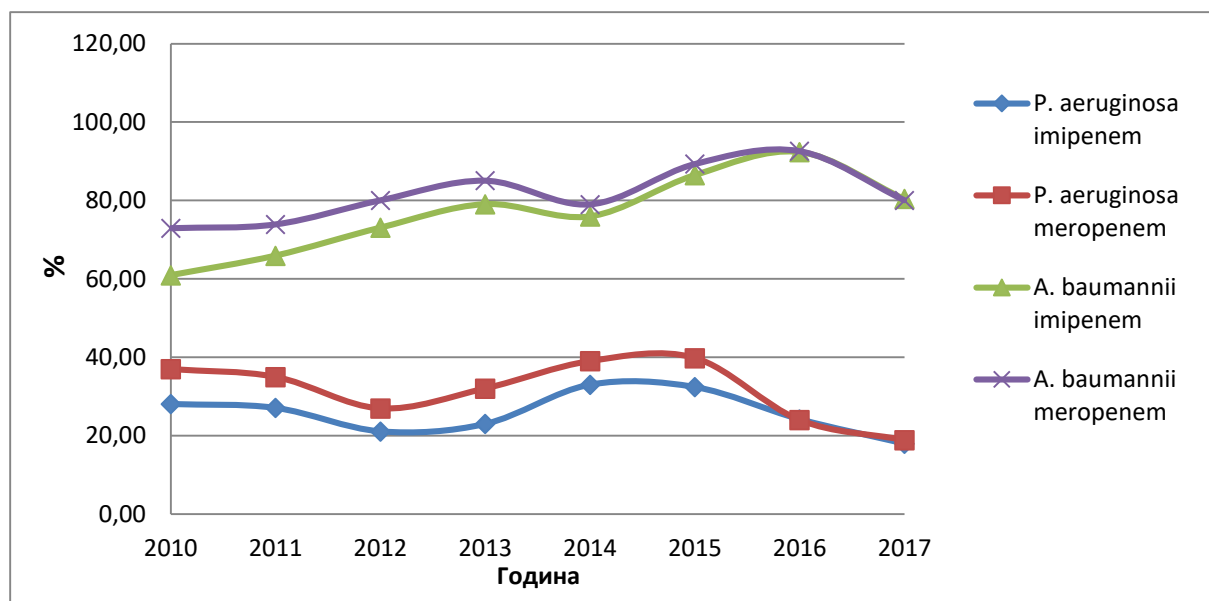
Подобни статистически резултати получихме и при анализа на антибиотичната резистентност към двата карбапенемни антибиотика – имипенем и меропенем при двата бактерия *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, касаещи цялостно УМБАЛ „Свети Георги“: статистическа незначима динамика в нарастването на резистентността, без тенденция това нарастване да се запази в бъдеще (Times series, forecasting, SPSS 19.0 (фигура 15).

Запазва се цялостната тенденция за страната резистентността към карбапенеми при ацинетобактер да е значително по-висока от тази при псевдомонасите (фигура 16); (вж. и раздел Литературен обзор, глава: Проучвания върху карбапенемна резистентност на *Acinetobacter* и *Pseudomonas*, изолирани в България). Данните са предоставени от НЦЗПБ,

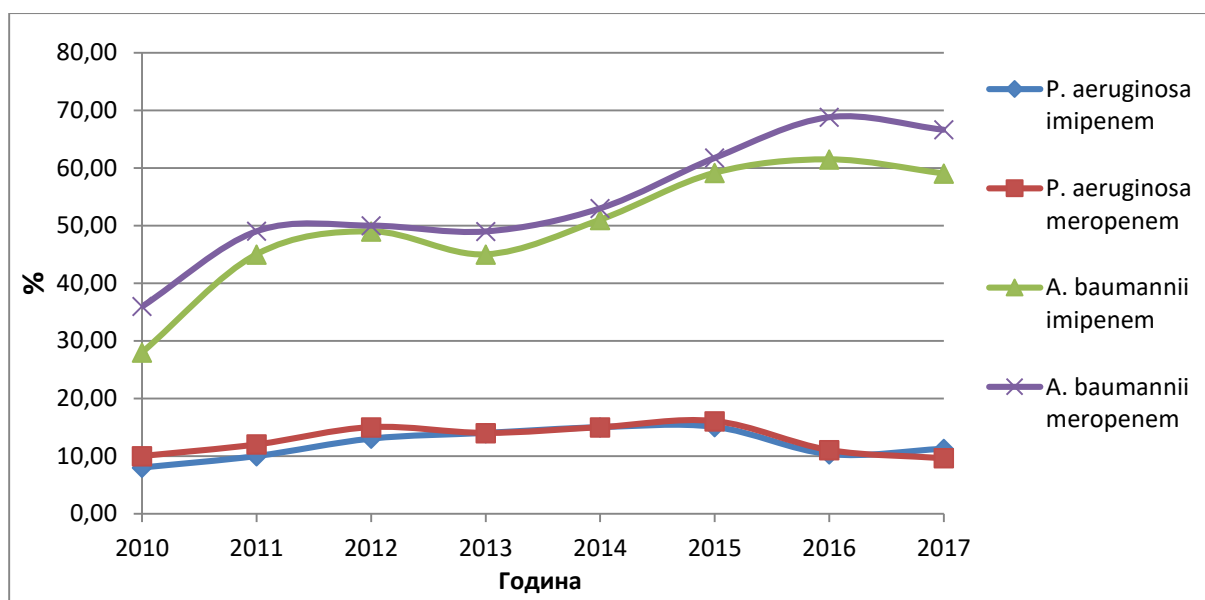
София и системата за надзор на антимикробната резистентност за страната BulSTAR.



Фигура 14. Динамика на резистентните към меропенем и имипенем изолати *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* за периода 2010-2017 г. от Клиника по анестезиология и интензивно лечение към УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив, (Times series, SPSS 19.0);



Фигура 15. Динамика на резистентността към меропенем и имипенем на всички изолати *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* за периода 2010-2017 г. от УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив, (Times series, SPSS 19.0);



Фигура 16. Динамика на резистентността към меропенем и имипенем на всички изолати *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* за периода 2010-2017 г. за страната по данни на BulStar, (Times series, SPSS 19.0);

Резултатите от forecasting анализа подробно са представени в табличен вид в **Приложение 3** към дисертационния труд.

Забележка: Приложението съдържа статистически обработените данни за периода на колекциониране на изолатите: 2010-2014 г.

Като цяло динамичните криви на двата антибиотика: меропенем и имипенем при двата микроорганизма следват приблизително еднаква траектория на ниво УМБАЛ „Свети Георги“ и за страната, като моделите показват значително сходство при ацинетобактер (фигура 15 и 16). За последните 2 години (2016 и 2017 г.) на ниво болница и за страната се наблюдава леко понижение на нивата на резистентност и при двата бактериални вида.

По отношение на КАИЛ се наблюдава лека дисоциация при псевдомонас за периода 2010-2011 г.: резистентността към меропенем намалява, докато тази при имипенем компенсаторно се увеличава. При ацинетобактер през 2013 г. се отбелязва лек спад в резистентността към имипенем, докато тази към меропенем запазва нивата от предходната година (фигура 14). За 2016 г. се регистрира понижаване на резистентността при псевдомонас и при двата карабапенема, докато при ацинетобактер се отчита повишение. През 2017 г. се наблюдава обратна тенденция-повишаване на нивата при псевдомонас и лек спад при ацинетобактер.

Като обобщение прави впечатление значително по-високите нива на резистентност към карбапенеми и при двата микроба при УМБАЛ „Свети Георги“ в сравнение със средните нива за страната

6. ОБСЪЖДАНЕ

Основната цел на настоящия труд е да се проучат в детайли механизмите на резистентност към двата най-често употребявани в болничната практика карбапенема: имипенем и меропенем при клинично значими изолати *A. baumannii* и *P. aeruginosa* от УМБАЛ „Св. Георги“-Пловдив. На базата на получените резултати да се изготвят препоръчителни подходи и насоки за справяне с инфекции, причинени от тези микроорганизми, които се оказват все по-сериозен терапевтичен проблем, особено касаещ интензивните отделения. До този момент не са правени конкретни проучвания, касаещи нашата болница, за цялостно изясняване структурата на карбапенемна резистентност при ацинетобактер и псевдомонас.

6.1. Обсъждане на резултатите от идентификацията на изолатите и изпитването на антимикробната чувствителност

Автоматизирани и полуавтоматизирани методи за идентификация в лицето на система Vitek 2 и мануален тест Api 20 NE с автоматизирано отчитане от система Biomic V3 показаха добра корелация и пълна съпоставимост на резултатите и при двата микроба. Подобни данни по отношение на съпоставката на двата метода получават и други автори (Bosshard et al. 2006; Renaud et al. 2005). По отношение на рутинната диагностика се наблюдаваха някои несъответствия: единични изолати *Burkholderia* и *Pseudomonas putida* бяха предварително запазени като *Pseudomonas aeruginosa*. Това са обичайни грешки при рутинната диагностика предвид неферментативния профил на тези организми, положителния тест за оксидаза и сходната пигментна продукция (*Pseudomonas putida* образува лимонено жълт към бледо-зеленикав пигмент, наподобяващ този при *Pseudomonas aeruginosa*) (Chakrabarty and Gunsalus 1970). Чувствителността към триметоприм/ сулфаметоксазол често се използва като диференциращ подход при *Pseudomonas* и *Burkholderia* (Lewenza, Visser, and Sokol 2002). Дискове с по-ниско от стандартното натоварване са предпоставка за диагностични грешки. Липсата на характерен седефен блясък на колонииите, не добре изразена пигменто-продукция, както и липса на характерния мирис на липа при някои от щамовете *Pseudomonas aeruginosa* допълнително затрудняват рутинната

диагностика. Това налага разработване и внедряване на нови съвременни методи за надеждна идентификация, особено тези, базирани на молекулно-генетични принципи (E.M., M.S., and G.J. 1994). От друга страна, един изолат *Stenotrophomonas* бе съхранен като *Acinetobacter baumannii* - и двата микроба в случая са оксидаза негативни, неферментиращи глюкоза. При екстензивно-резистентни и пан-резистентни ацинетобактери рутинното разграничаване е трудно.

По отношение изпитването на антибиотичната чувствителност атоматизираният метод чрез МИК градиент от система Vitek 2 и стандартният дисково дифузионен тест демонстрират добра съпоставимост на резултатите (Ling et al. 2001).

6.2. Обсъждане на резултатите от фенотипните тестове за доказване на карбапенемази

Модифицираният Ходж тест доказва карбапенемазна продукция при 100% от тестваните изолати ацинетобактер. При 42 от тях (97,7%) впоследствие се установи наличието на ОХА-23 кодиращи гени. При останалия 1 изолат предполагаме наличието на други карабапенемази, различни от тези, обект на скрининга. Въпреки, че Модифицираният Ходж тест не се приема от EUCAST за надежден метод за детекция на карбапенемази при ферментиращите глюкоза Грам-отрицателни микроорганизми, при неферментативните бактерии стандартът приема, че той има добра чувствителност и специфичност. Нашите резултатите корелират с тези на други автори по отношение добрата съпоставимост на фенотипния скрининг с Модифицирания Ходж тест с други фенотипни и генетични методи (ГЮЗЕЛ 2016; Thomson 2010; Amjad et al. 2011; Lee et al. 2003).

Тестовите за метало-ензими не установиха наличието на такива - резултат, който се потвърди и от молекулно-генетичния скрининг.

При псевдомонасите тестовите за скрининг за общи карбапенемази и метало-ензими бяха отрицателни при всички изолати *Pseudomonas aeruginosa*, но позитивни при единственият включен в проучването изолат

Pseudomonas putida. Тези резултати напълно съответстват на данните от генетичния анализ и потвърждават надеждността и достоверността на фенотипните методи. Метало-ензимите не са водещ механизъм на резистентност при псевдомонасите и ацинетобактер (Quale et al. 2006; Cabot, Ocampo-Sosa, Tubau, Macia, Rodríguez, et al. 2011; Vatcheva-Dobrevska et al. 2013; Higgins et al. 2010), въпреки все по-нарастващото им разпространение и откриването на нови класове.

Настоящото наше проучване потвърждава, че фенотипните методи за детекция на карбапенемази при клинично значими неферментативни изолати в лицето на Модифицирания Ходж тест, MCNP v3-тестът, двойно-дисковият синергичен метод с дискове имипенем и дискове ЕДТА, както и епсилометър тестът с имипенем и ЕДТА (в частност за скрининг на металоензими) са надеждни алтернативи, съпоставими със съвременните молекулно-генетични методи. Бързината и ниската цена позволява използването им да бъде въведено рутинно и в ниско-бюджетни лаборатории.

6.3. Обсъждане на резултатите от молекулно-генетичните тестове

На базата на получените резултати като водещ фактор за карбапенемна резистентност при изолатите *A. baumannii* се очерта продукцията на оксацилинази от подсемейство ОХА-23. Последващото секвениране доказва, че се касае за класическата оксацилиназа 23 (ARI-1). Оксацилиназите от група 2df не са необичаен феномен за нашата страна. През 2008 год. Т. Стоева доказва широкото разпространение на ОХА-23 и ОХА-58 продуциращи изолати в българските болници, както и intrinsic ОХА-51 гена, който успешно може да се използва за видова идентификация на *A. baumannii* (Т. Stoeva et al. 2008; Temenuga Stoeva et al. 2009). Нашите резултати до голяма степен потвърдиха тази тенденция, с изключение на ОХА-58 продуцентите. През 2014 г. бяха докладвани първите 4 български изолата *A. baumannii*, продуценти на ОХА-24 (Todorova et al. 2014), които все още не са широко разпространени в световен мащаб (Higgins et al. 2010). При нашите изолати не се доказаха и ОХА-24 кодиращи гени, както и изолати, хиперекспресиращи ОХА-51 поради наличие на *IsAba1* инсерционна последователност. Последният резултат потвърждава факта, че оксацилиназа ОХА-51 не участва като фактор, определящ карбапенемна резистентност и при нашите изолати ацинетобактер, за разлика от данните на други автори (Higgins et al. 2010; Turton et al. 2006). Все още няма данни за български изолати с доказана хиперекспресия на ОХА-51 поради наличие на *IsAba1*.

Филогенетичният анализ разкри персистирането на 2 клона ОХА-23, продуциращи *A. baumannii* за периода 2010-2014 г., със сходство над 70% и 90%, което е обичаен феномен за страната, както на европейско, така и на световно ниво – обикновено циркулират един или два клона. Циркулиране на 2 клона ацинетобактер с над 70% и 90% сходство са докладвани в Плевенската болница за периода 1999-2006 г. За периода септември 2006-декември 2006 г. 2 клона персistirат и във ВМА, София (Стоева Т 2009). По-късно през 2012 г. отново се доказват клонално свързани мулти-резистентни *A. baumannii* изолати (включително към карбапенеми),

принадлежащи към един клон в същата болница, като 2 от изолатите от КАИЛ са с идентичен профил, изолирани от небулайзер, вероятно източник на вътреболнични инфекции (Savov E and Mihajlova G 2012). През същата 2012 доц. Т. Стратева и колектив докладват за ендемичен клон от ОХА-23 продуциращи *A. baumannii* в Университетската болница в София (Strateva et al. 2012). За периода 2004-2007 г. 2 клона със сходство 70% и 90% са докладвани и в УМБАЛ „Св. Марина“, Варна (Стоева Т 2009). През 2015 г. екип на проф. Вачева и проф. Савов докладват за превалентен клон от мултирезистентни *A. baumannii* (90% сходство на AFLP-моделите в клъстер А), циркулиращ в клиничните звена на Военномедицинска академия (Vatcheva-Dobrevsky et al. 2005).

До този момент са доказани три основни клона *A. baumannii*, циркулиращи в европейските болници, които на по-късен етап бяха приети и за интернационални (Zarrilli et al. 2013; Ahmed et al. 2016; Higgins et al. 2010). Нашите изолати принадлежат към два от тях.

RAPD анализът на 11 изолата *A. baumannii* от КАИЛ разкри 2 ивичести профила, което предполага наличието на два ендемични щамове, циркулиращи в отделението за периода 2010-2014. Това е сериозна предпоставка за възникването на взривове от ИСМО и налага спазването на по-строги противоепидемични мерки.

Фенотипните методи за детекция на карбапенемази позитивираха при единствения включен в скрининга *P. putida*, който впоследствие се доказва като VIM-2 продуцент. *Pseudomonas putida* е опортюнист, често погрешно диагностициран като *Pseudomonas aeruginosa* поради сходна продукция на пигмент. Описани са спорадични случаи на нозокомиални инфекции, причинени от мулти-резистентни щамове в редица европейски страни (Италия, Испания, Португалия), най-вече при критично болни и имунокомпрометирани пациенти (Treviño et al. 2010; Lombardi et al. 2002; Santos et al. 2010). Първият VIM-5-продуциращ *P. putida* на Балканския полуостров е изолиран в Турция през 2008г (Poirel et al. 2009). Оттогава не са докладвани други случаи в съседни наши държави. Това е първият доказан за страната ни VIM-продуциращ *P. putida*.

За първи път се доказват и български изолати *P. aeruginosa*, носители на ОХА-50 гена, в колаборация с Лаборатория OpGen, USA. ОХА-50 генът се счита от някои автори като естествена част от генома на *P. aeruginosa* (Girlich, Naas, and Nordmann 2004), докато други докладват не дотолкова широкото му разпространение (M. Liu et al. 2008). ОХА-50 бета-лактамазите се отличават съществено от останалите оксацилинази от група 2df, затова са обособени в отделно подсемейство, включващо освен PoxB, ОХА-50a, ОХА-50b, ОХА-50c и ОХА-50d. Най-голямо генетично сходство на ОХА-50

се наблюдава с ОХА-23 гена (44%), като кодираната от него оксацилиназа демонстрира слаба карбапенемазна активност към имипенем (Girlich, Naas, and Nordmann 2004). Въпреки, че се счита, че самостоятелната продукция на ОХА-50 (PoxB) не би довела до карбапенемна резистентност, комбинацията с други механизми като загуба на OprD (част от които са и нашите изолати) би подпомогнало развитието ѝ (Zincke et al. 2016). Данните в световната литература по-отношение на ролята на ОХА-50 относно антибиотичната резистентност при клинични изолати *P. aeruginosa* са все още оскъдни.

След установяване липса на металоензим-продуциращи *P. aeruginosa* и отхвърляне на хипотезата за обусловена от тях карбапенемна резистентност, усилията ни се насочиха в изследване на други ключови механизми на резистентност: хиперекспресията на ефлукс помпите и загубата на трансмембрания OprD протеин, определяни като най-чести причини за излявата ѝ, както и вероятна хиперекспресия на вродената AmpC.

Като водещ фактор на тази резистентност се открии повишената експресия или хиперекспресия на MexXY-OprM ефлукс помпата, в някои от случаите в комбинация с намалена или липсваща експресия на OprD протеина, както и в комбинация с повишена или хиперекспресирана MexAB-OprM помпа.

Не се доказва хиперекспресия на индуцибилната AmpC при никой от 15-те тествани изолата. Липсата на AmpC свръхекспресия не е необичаен феномен, още повече, че класическите варианти на ензима нямат пряка хидролитична активност към карбапенеми, а нарастването на МИК се отдава по-скоро на релативен спад в OprD продукцията (Dumas et al. 2006; Livermore 2001). Описаните широкоспектърни варианти ESAC имат слаба карбапенемазна активност и биха могли да доведат до резистентност, когато са хиперекспресирани. Според литературни данни асоциация карбапенемна резистентност/AmpC хиперекспресия най-често се открива в приблизително 18% от случаите (Vatcheva-Dobrevska et al. 2013; Cabot, Ocampo-Sosa, Tubau, Macia, Rodriguez, et al. 2011; Xavier et al. 2010).

Нашите резултати изцяло корелират с резултатите, получени от Р. Вачева и колектив през 2013 г., в колаборация с Медицински университет - Палма де Майорка, Испания. От проведените тестове при това проучване върху 29 изолата *Pseudomonas aeruginosa* от български болници се доказва повишена експресия на MexXY-OprM ефлукс чрез детекция на MexY протеина и загуба на OprD протеина, доказана чрез SDS-PAGE електрофореза, като основни причини за карбапенемна резистентност.

При само 17% от тестваните изолати е наблюдавана хиперекспресия на AmpC (Quale et al. 2006).

Различните подходи при двете проучвания и пълната съпоставимост на резултатите потвърждават хипотезата, че на този етап карбапенемната резистентност при българските изолати *P. aeruginosa* е обусловена по-скоро от намален инфлукс и повишен ефлукс, отколкото от действието на хидролизиращи ензими.

MexXY-OprM ефлукс помпата не се експресира при нормални условия при представителите на род *Pseudomonas*, но може да се индуцира от антибиотици, инхибитори на белтъчния синтез, особено аминогликозиди и тетрациклини, както и от някои инхибитори на нуклеиновите киселини като флуорохинолоните. Най-често мутации в негативния регулаторен ген MexZ се считат като директна причина за хиперекспресия на помпата. Въпреки, че много автори предполагат, че имипенем не е субстрат за тази помпа (Dumas et al. 2006; Quale et al. 2006; Wolter et al. 2004), последни проучвания поставят на преоценка тази теория. Ocampo-Sosa et al. доказват през 2012г. чувствителен към меропенем, но резистентен към имипенем щам с хиперекспресия само на MexXY-OprM ефлукс помпата и нормална експресия на OprD (Ocampo-Sosa et al. 2012). Това е резултат, който корелира и с нашите данни - при 4 от изолатите, резистентни на имипенем, наблюдавахме повишена експресия на MexXY-OprM в съчетание с нормални нива на експресия на OprD, AmpC и MexAB-OprM. Тези резултати подкрепят тезата, че имипенем е вероятен субстрат за MexXY-OprM. Подобен феномен не е описан при досега тестваните български изолати псевдомонас от Р. Вачева и съавтори през 2013 г.

Същият колектив на Ocampo-Sosa оспорва загубата на OprD като основен фактор за резистентност към имипенем поради факта, че инактивиращи този протеин мутации се срещат и при чувствителни към карбапенеми изолати.

Подобен феномен наблюдавахме и ние. При изследване на 3 контролни, чувствителни на имипенем и меропенем клинични изолати *Pseudomonas aeruginosa*, два демонстрираха пълна загуба на OprD в съчетание с леко завишена експресия на двете ефлукс помпи.

Като белег за дисрегулация в експресията на OprD се приемат както двукратно понижените, така и двукратно повишените стойности в сравнение с референтния щам, което дава основания да се допуска, че повишената продукция е компенсаторна, тъй като се произвежда мутантен белтък, негоден или неизпълняващ адекватно функцията си (Ocampo-Sosa et al. 2012). Подобен феномен с компенсаторна хиперекспресия на OprD наблюдавахме и ние. При два от нашите изолати, резистентни на имипенем и с интермедиерна чувствителност към меропенем, доказахме хиперекспресия на OprD гена в съчетание с други механизми: хиперекспресия на

двете ефлукс помпи при единия и хиперекспресия на MexXY-OprM при другия. Регулацията на протеина негативно се контролира от експресията на MexT гена.

Особена роля играе вторичната и третична структура на OprD. Счита се, че бримки L13, L15 и L16 могат да допринесат за стесняване на отвора на OprD канала, което възпрепятства навлизането на имипенем и обуславя резистентност към този антибиотик, въпреки нормалното или дори повишено количество. От друга страна, единични мутации, водещи до замяна на глутамин с глутамат на позиция 301 в бримка L13, се наблюдават в изолати със скъсена бримка L15. Делеции при синтеза на последната също водят до скъсяването ѝ и се свързват със значително понижаване на МИК към меропенем, вероятно поради разширяване отвора на OprD канала, което позволява навлизане на оптимални концентрации на този агент (Epp et al. 2001). Меропенем също може да се свързва и преминава през OprD канала, но с много по-ниската скорост (73 nm/s за меропенем срещу 736 nm/s за имипенем) (Köhler, Michea-Hamzehpour, et al. 1999). Този факт е причина някои автори да категоризират OprD основно като рецептор за имипенем, който няма отношение към резистентността към меропенем (Pérez et al. 1996; Rodríguez-Martínez, Poirel, and Nordmann 2009).

Нашите резултати подкрепят хипотезата, че OprD е рецептор и за меропенем и той може да играе съществена роля в резистентността към този карбапенем. При 9 от тестваните изолати, резистентни или с интермедиерна чувствителност на меропенем, наблюдавахме липса или намалена експресия на OprD в съчетание с нормална и/или леко завишена експресия на двете ефлукс помпи, но без данни за хиперекспресия. При един изолат с интермедиерна чувствителност към меропенем и намалена експресия на OprD и двете ефлукс помпи демонстрираха нормални нива на експресия. Шест от тези изолати попадаха в групата на тествана AmpC експресия, съответно без данни за хиперекспресия.

MexAB-OprM е може би най-проучената ефлукс помпа на резистендоуларната система. Нормално тя се експресира във всички изолати псевдомонас и освен флуорохинолони, тетрациклини, хлорамфеникол и бета-лактами, се счита, че и меропенем, благодарение на страничната му хидрофилна верига, може да бъде субстрат за изпомпващата ѝ функция (Tomás et al. 2010).

Експресията ѝ негативно се контролира от MexR репресор, но инактивиращи мутации в други три регулаторни гена- nalB, nalC и nalD също могат да доведат до свръх функция (Sobel et al. 2005; Saito, Yoneyama, and Nakae 1999). Приблизително 1/2 (47%) от нашите изолати демонстрираха хиперекспресия или повишена експресия на тази помпа, при всички в

комбинация с повишена или хиперекспресия на MexXY-OprM. Данните в литературата по отношение хиперекспресията на тази помпа варират. При съвместно проучване на японски и корейски учени на 44 карбапенем-резистентни клинични изолата *P. aeruginosa*, хиперекспресия на MexAB-OprM докладват едва при 3 (6.8%) от тях. Американски учени от Бруклинска болница докладват хиперекспресия на тази помпа при 10 от 33 проучвани изолата (33%), резистентни на карбапенеми (Quale et al. 2006). Вачева и колектив съобщават за 6 изолата карбапенем-резистентни *P. aeruginosa*, хиперекспресиращи MexAB-OprM или 21% от 29 тествани български изолати.

Доказването и интерпретацията на механизми за резистентност, базирани на анализ на генната експресия, може да се окаже трудна задача, особено когато няколко механизма за резистентност към дадена група антибиотици са активни едновременно. Други предупреждения за този метод са присъщи като цяло за генната експресия, именно поради факта, че присъствието на транскрипт не винаги означава, че е кодиран функционално годен протеин. Още повече, че посттранскрипционните регулаторни процеси също повлияват протеиновата експресия и оттам фенотипа (Dumas et al. 2006). Определени гени могат да притежават хипервариабилни участъци или мозаична структура, какъвто е и генът за OprD, което води до нови придобити мутации и делеции в имипенем резистентни щамове (Pirnay et al. 2002; El Amin et al. 2005). Експресията на OprD може да се регулира, както на транскрипционно ниво (Ochs et al. 1999), така и на посттранскрипционно (Köhler, Epp, et al. 1999).

В ранните етапи на проучване на карбапенемната резистентност при псевдомонас някои автори допускат и съществена роля на пеницилин-свързващите белтъци (Hashizume et al. 1984; Yang, Bhachech, and Bush 1995).

Всичко това идва да покаже, че карбапенемната резистентност при псевдомонасите все още остава предизвикателство за микробиологичната научна общност и трябва винаги да се разглежда комплексно в контекста на многофакторна етиология, още повече, че ролята на ефлукс помпите и трансмембранните протеини най-вече е проучвана сред референтни лабораторни изолати, като ролята им при клиничните щамове все още се приема като „непредсказуема и хаотична“ (Kolayli et al. 2004).

Филогенетичният анализ на 20 случайно подбрани изолата псевдомонас от КАИЛ, клиниката по Кардиохирургия и Клиниката по Изгаряния разкри наличието на 3 електрофоретични профила, като всички тествани изолати от КАИЛ, принадлежаха към два от тях. Това предполага наличието на два основни щама, циркулиращи в отделението за периода 2010-2014. Циркулирането на идентични щамове в спешните звена и клиниките по

изгаряне и кардиохирургия, както и на ниво болница, са докладвани и от редица автори (Joffe et al. 1992; Tredget et al. 1992; Seki et al. 2013; Pradhan, Bhat, and Ghadage 2014; Mayank et al. 2009; Bou et al. 2006), като България не прави изключение. През 2012 година доц. Стратева докладват за ендемичен клон от *P. aeruginosa* (5 клъстера с 70% сходство) с проблемна антибиотична резистентност, циркулиращ в Клиниката по интензивни грижи на Университетска болница „Света София“ за периода 1999-2001 г. (Стратева и кол. 2002). Трансмисията най-често се осъществява при извършването на инвазивни манипулации: бронхоскопия, трансезофагиална ехокардиография и др. Това е предпоставка за възникване на взривове от ИСМО и налага спешни и стриктни противоепидемични мерки.

На базата на цялостните резултати, изясняващи структурата на резистентност към карбапенеми на територията на нашата болница, бихме препоръчали следните обосновани подходи за лечение на карбапенем-резистентни ацинетобактери и псевдомонаси, съобразно съвременните тенденции и насоки:

6.4. Терапевтични подходи при карбапенем-резистентни *A. baumannii*

За лечение на индуцирани от *A. baumannii* инфекции бихме препоръчали следните алтернативи:

6.4.1. Колистин: под формата на интравенозни апликации и/или небулизации. Предвид 100%-та чувствителност на нашите изолати, колистинът е удачно средство на избор при липса на контраиндикации.

Обичайната доза за интравенозно приложение при деца и възрастни, които тежат до 60 кг. е 50 000 до 75 000 IU на всеки килограм от телесното тегло, ежедневно. Дозата се разделя на три приема, прилагани през около 8 часа.

Обичайната доза при хора, които тежат над 60 кг. е 1 до 2 милиона IU, прилагани три пъти дневно през около 8 часа. Максималната доза е 6 милиона IU дневно, но при критични пациенти е възможно приложение по 3 милиона IU на всеки 8 часа при съхранена бъбречна функция.

За инхалаторно приложение обичайните схеми са: 500 000 IU на всеки 12 часа при пациенти с тегло под 40 кг.; и 1000 000 IU на всеки 12 часа при пациенти с тегло над 40 кг (medscape.com).

При бъбречна дисфункция дозата се редуцира в зависимост от креатининовия клирънс: обикновено 2-3 мг/кг, като 1 мг. колистин сулфат отговаря на 12 500 IU. На тази база при липса на флакони за небулизации

могат да се изготвят инхалационни разтвори от формите за венозно приложение (ампули от 150 мг/2 мл).

Препоръчителната доза може да варира в зависимост от фирмата производител. Обичайната продължителност на лечението е 7-14 дни (Biswas et al. 2012).

6.4.2. Сулбактам. Поради широкото разпространение на ОХА-23 продуцентите сред нашите изолати, считаме за уместни комбинации, съдържащи сулбактам с или без ампицилин/цефоперазон. Оптималната доза на сулбактам при ацинетобактер е 3 гр. в бавна инфузия на всеки 8 часа (Jaruratanasirikul et al. 2013). Добра комбинация при *A. baumannii* е: колистин + ампицилин/сулбактам (цефоперазон/сулбактам);

6.4.3. Фосфомицин. Предвид сравнително безопасния му фармакокинетичен и динамичен профил, фосфомицинът е друга удачна възможност за терапия. Въпреки, че официално не участва в никой от общоприетите стандарти EUCAST и CLSI за лечение на ацинетобактерни инфекции, поради липса на самостоятелна активност, той успешно може да се прилага в синергични комбинации с колистин или сулбактам. Приложението му в експериментална доза от 4 гр., разделена в 2 приема на 12 часа, показва обнадеждаващи резултати (Sirijatuphat and Thamlikitkul 2014). Колистин + фосфомицин е комбинация, която се препоръчва с оглед на по-добрата микробна ерадикация в сравнение със самостоятелното приложение на колистин. При контраиндикации за използване на колистин, удачна е комбинацията фосфомицин + ампицилин/сулбактам (цефоперазон/сулбактам) (Santimaleeworagun et al. 2011).

6.4.4. Тигециклин е алтернатива при доказана чувствителност. Оказва се, че при нашите изолати той би бил ефективен в едва 12% от случаите (88% резистентни). Този процент на резистентност напълно корелира с процентът на карбапенем резистентни ацинетобактери, резистентни и на тигециклин, доказани от доц. Стоева през 2009 г. (87%) (Стоева Т., 2009). В настоящето проучване сме използвали заложените в системата Vitek 2 критерии за определяне на антимикробна чувствителност при ентеробактерии, която отчита като МИК стойност $R \geq 4$ мг/л, съобразно критериите на SRGA (Swedish Reference Group of Antibiotics). Тази стойност е използвана и при проучването на доц. Стоева.

Тези резултати потвърждават тезата, че въпреки големите надежди, които се възлагаха на глицил-циклиновия дериват след въвеждането му в клиничната практика, ефективността му при карбапенем резистентни

изолати е ограничена. Официално той не фигурира в стандартите на CLSI за лечение на ацинетобактерни инфекции, но EUCAST допуска приложението му, въпреки оскъдните клинични данни по отношение на активността му към тези микроорганизми. Все още няма видово специфични брейкпойнти за МИК при ацинетобактер, но за интерпретация биха могли да се използват наличните видово неспецифични: $S \leq 0.25$ и $R > 0.5$ мг/л или стойностите, приети за Enterobacteriaceae: $S \leq 1$ и $R > 2$ мг/л (EUCAST, 2017), ([“Http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/,”](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) n.d.).

Като монотерапия тигециклинът е подходящ при мекотъканни инфекции, но при пациенти с тежки инфекции и бактериемии следва да се използва само в комбинация. Неприложим е при уроинфекции. При липса на контраиндикации, удачно е приложението му в по-високи дози от стандартната: 200 мг натоварваща, с последваща 100 мг на 12 часа.

6.4.5. Комбинацията рифампицин + колистин се предлага като подходяща алтернатива, водеща до добра микробна ерадикация и по-ниска смъртност в сравнение с монотерапията с колистин. Въпреки това, предвид широкото използване на рифампицина като противотуберкулозен препарат в нашата страна, не бихме го препоръчали за рутинна употреба.

6.5. Терапевтични подходи при карбапенем-резистентни *P. aeruginosa*

6.5.1. Колистин: под формата на небулизации и/или венозно приложение е удачен вариант при доказана чувствителност. Въпреки, че колистин резистентните псевдомонаси не са обичайно явление, все пак 2% от нашите изолати се изяха като такива. Предвид все по-мащабното му използване в клиничната практика и доказаните плазмид-медиирани трансфери на гени за резистентност (Y.-Y. Liu et al. 2016), се очаква в бъдеще този процент да нарасне. Практиката доказва, че най-удачен и достоверен метод за изпитване на чувствителността към колистин е микродилуционният тест. Поради голямата молекула колистин трудно дифундира в агарови среди и микрокапилярните мрежи на автоматизирани системи, поради което често се докладва фалшиво-положителна резистентност (Tan and Ng 2007).

6.5.2. Фосфомицин е също потенциална алтернатива, но поради малкото на брой клинични проучвания при използването му като монотерапия, препоръчваме употребата му в комбинация с колистин, отново в доза от 4 гр./24 часа (Sirijatuphat and Thamlikitkul 2014).

6.5.3. Цефтазидим/авибактам и цефтолозан/тазобактам. Предвид факта, че нашите псевдомонаси не се изяха като метало-ензим продуценти, при доказана чувствителност, добро средство на избор са и новите за Европейския пазар комбинации от цефалоспорин и бета-лактамазен инхибитор: цефтазидим/авибактам и цефтолозан/тазобактам, които показват добра ефективност при псевдомонаси с карбапенемна резистентност, дължаща се на повишен ефлукс и/или намален ефлукс, каквито са нашите (van Duin and Bonomo 2016). От 2017 г. те официално фигурират и в стандарта по EUCAST.

6.6. Превенция на възникването на карбапенем резистентни *P. aeruginosa*: подходи за емпирична терапия при псевдомонасни инфекции

Крайъгълен камък в борбата с карбапенемната резистентност е превенцията на възникването на мутантни щамове в хода на лечение с тези препарати - процес, който се оказва, че отнема няколко дни. При наличие на псевдомонасна инфекция, която ще подлежи на лечение с карбапенем, препоръчваме това да става по възможност с комбинация от флуорохинолон (най-вече левофлоксацин), а не аминогликозид, в следния терапевтичен режим за интравенозно приложение:

750 мг левофлоксацин еднократно на 24 ч. + 1 гр имипенем на 12 ч.
(Lister and Wolter 2005)

Тази комбинация е подходяща за емпирична терапия и дори като терапия на вече доказани карбапенем резистентни псевдомонаси, предвид факта, че предотвратява възникването на мутанти и ерадикира щамове, хиперекспресиращи MexAB-OprM и MexXY-OprM, както и тези със загуба на OprD, като каквито се изяха всички наши тествани изолати. При контраиндикации дозата на имипенем може да се редуцира до 250 мг. на 12 ч. При този дозов режим може да се очаква ерадикация на щамовете хиперекспресиращи MexAB-OprM и тези със загуба на OprD, но не и на тези със симултантна хиперекспресия на MexXY-OprM и загуба на OprD, към които, в по-голямата си част, принадлежат и нашите.

Всички описани по-горе терапевтични протоколи са с препоръчителен характер и се основават само на базата на микробната чувствителност и доказаните механизми на резистентност. Терапията на всеки конкретен случай следва да се определи от лекаря-клинист съобразно индивидуалните особености, клинични и параклинични данни за всеки пациент.

6.7. Бъдещи терапевтични подходи при карбапенем резистентни *A. baumannii* и *P. aeruginosa*

Предстои да бъде пуснат в продажба новият продукт на Merck & Co **релебактам** (МК-7655) - инхибитор на клас А и клас С бета-лактамази в комбинация с имипенем. Проучване от 2017 г. на комбинацията срещу Грам-негативните микроорганизми от групата на ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *Enterobacter spp.*) докладва, че имипенем/релебактам възвръща чувствителността към имипенем на 80.5% от имипенем резистентните псевдомонаси или при 202 от общо 251 тествани изолата, но няма активност при ацинетобактер (Lob et al. 2017).

Цефепим-зидебактам (WCK 52222) на Wockhardt е също нова комбинация, която предстои да бъде предлагана за терапия. Зидебактам е бета-лактамазен инхибитор, който има способността да се свързва с RBP2 при Грам-негативните бактерии и по този начин да упражнява двойно антимикробно действие. Проучване от 2017 г. съобщава за много добра активност срещу псевдомонас като 99.5% от изолатите се инхибират при МИК $\leq$ 8 μ г/мл (в съотношение 1:1). Комбинацията също показва 4 пъти по-висока активност към *Acinetobacter spp.* в сравнение със самостоятелното приложение на цефепим или цефтазидим (Sader et al. 2017).

Цефидерокол (S-649266) на Shionogi & Co е нов цефалоспорин/сидерофор с по-добра активност срещу карбапенем-резистентни *A. baumannii* и *P. aeruginosa* при МИК $_{90}$ =0.5 μ г/мл в сравнение с досега използваните антимикробни средства (Falagas et al. 2017). Други автори докладват активност, еквивалентна на колистин, при двата микроба и тигециклин при ацинетобактер (Dobias et al. 2017).

През последните години се работи и върху възможността за разширяване спектъра на **гликопептидните антибиотици**. Провеждани са експерименти, при които ванкомицин е включен във фузогенни липозоми, благодарение на което успява да премине през външната мембрана на Грам-отрицателните микроорганизми. Добра чувствителност е наблюдавана при *E. coli* и *A. baumannii* (Nicolosi et al. 2010).

Обнадеждаващи резултати са получени относно *in vitro* антимикробната активност и на **hBD-2** (човешкия бета-дефензин 2) особено при мулти-резистентни *A. baumannii*, но и при *P. aeruginosa* (Routsias et al. 2010).

Обсъжда се и разработването на **антисенс олигонуклеотиди** като антимикробни средства, които да действат още на генетично ниво, блокирайки транскрипцията на гени, кодиращи механизми на резистентност или съответните транспортните РНК-и, предотвратявайки транслацията на ключови протеини (Woodford et al. 2009).

6.8. Динамика на резистентността

Относно динамиката на резистентността за периода 2010-2017 г. на територията на нашата болница, прави впечатление по-високите нива на карбапенемна резистентност и при ацинетобактер, и при псевдомонас в сравнение със средните нива за страната за същия период - при ацинетобактер: 60-85% за двата карбапенема за УМБАЛ „Свети Георги“, но между 28-68% респективно за страната; при псевдомонас: над 21% за двата карбапенема за УМБАЛ „Свети Георги“, но под 16% респективно за страната. Динамичните криви на имипенем и меропенем имат съпоставим ход при двата микроба и при двата модела: за УМБАЛ „Свети Георги“ и за страната. Този модел се запазва и през последните три години 2015, 2016 и 2017 г. като резистентността при ацинетобактер за нашата болница достига критичните 92% за 2016 г. и при двата карбапенема, а при псевдомонас се регистрира лек спад (фиг. 15). Като цяло и на местно, и на национално ниво резистентността при ацинетобактер е драстично по-висока от тази при псевдомонас. Едно от възможните обяснения на този феномен се скрие в структурата на резистентност на българските изолати: при ацинетобактер, обусловена от карабапенемазни ензими, чиито кодиращи гени най-често са инкорпорирани в плазмиди и транспозони. Това позволява лесно да се трансферират междувидово, докато при псевдомонас водещ фактор са хиперекспресията на ефлукс помпи и намалена или липсваща продукция на трансмембранни рецептори, чиито белтъци се кодират и регулират на хромозомно ниво.

Нивата на резистентност в Клиниката по анестезиология и интензивно лечение към нашата болница (откъдето са и най-големият брой изследвани изолати и от двата вида) бележат още по-висок процент: над 79% при ацинетобактер и над 43% при псевдомонас като през 2015 г. и 2016 г. се наблюдава повишаване на резистентността при ацинетобактер и при двата карбапенема, достигайки 98%, а при псевдомонас бележи лек спад през този период, следван от завишаване през 2017 г. (фиг. 14). Това е характерно явление за интензивните отделения, където селективният антибиотичен натиск е най-голям и продължителен, пациентите са с отслабени защитни сили, подлежат на множество инвазивни интервенции, предразполагащи към колонизация с тези микроорганизми.

Общо за страната резистентността към карбапенеми за псевдомонас като цяло плавно нараства от 2010 г. като през последните 2 години (2016 и 2017) се забелязва лек спад. За ацинетобактер нарастването е с по-драстични темпове с лек спад през 2013 г. като този модел продължава и през 2017 г.

(BulStar), (www.bam-Bg.net/index.php/bg/bulstar), (И. Н. Иванов, М. Недялков и кол., 15-ти конгрес БАМ, 2018) (фиг. 16).

Много сходни са моделите на динамика за нашата болница като цяло и в частност този на КАИЛ. По отношение на КАИЛ се наблюдава лека дисоциация при псевдомонас за периода 2010-2011 г.: резистентността към меропенем намалява, докато тази при имипенем компенсаторно се увеличава. При ацинетобактер през 2013 г. се отбелязва лек спад в резистентността към имипенем, докато тази към меропенем запазва нивата от предходната година. Тези дисоциации могат да се обяснят в зависимост кой от двата антибиотика е изписван по-често в посочения период и съответно е упражнявал по-продължителен натиск.

При псевдомонасите от КАИЛ нивата на резистентност остават сравнително постоянни с лек спад през 2012 г. и 2016 г., докато при ацинетобактер бележат постепенно нарастване с лек спад през 2013-2014 г.

Намалението в резистентността към двата карбапенема за 2012 г. и 2016 г. при псевдомонас в КАИЛ е маркирано с пик в резистентността при ацинетобактер. През 2012 г. се наблюдава значително покачване на броя на всички изолати в клиниката в сравнение с предходните две години, респективно нарастване на общия брой псевдомонаси (таблица 2). Същото явление - увеличение на общия брой изолати се наблюдава и на ниво болница (таблица 3), като броят на псевдомонасите в този случай остава съпоставим с предходните години: т.е. нараснал е броят на изолирани псевдомонаси от КАИЛ за сметка на останалите отделения. Факт, който по-скоро се дължи на по-честите пробовземания, отколкото на повишения прием на пациенти в клиниката. Поради тази причина се отчита спад в относителния дял на карбапенем резистентните псевдомонаси и оттам вероятно фалшиво понижени нива на резистентност. При ацинетобактер също се наблюдава завишаване на общия брой изолати, но без драстични разлики от предходните години.

Тенденция е броят на изолатите ацинетобактер и псевдомонас, както и общият брой изолати на ниво болница и КАИЛ, да нараства с всяка изминала година. За периода 2010-2016 година общият брой изолати от КАИЛ се е увеличил 2.6 пъти, а този на ниво болница 1.7 пъти. Нарастването на броя изолати се дължи вероятно на по-честото пробовземане при приемане, в хода на лечението и при изписването на пациентите предвид съпоставимите леглодни, индекс на заетост и брой хоспитализации при сравняване на данните, предоставени от болничната администрация за последните 4 години (таблица 4).

Таблица 2. Общи данни за броя изолирани микроорганизми от КАИЛ при УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив за периода 2010-2017 г.

Година	Общ брой <i>P. aeruginosa</i>	Общ брой <i>A. baumannii</i>	Общ брой на всички изолати от отделението	КАИЛ
2010	81	178	431	
2011	94	193	475	
2012	131	269	725	
2013	125	245	741	
2014	140	267	855	
2015	155	237	928	
2016	183	286	1117	
2017	136	189	694	

*Общият брой включва всички изолирани микроорганизми, независимо от тяхната антимикробна чувствителност към всички антибиотици

Таблица 3. Общи данни за броя изолирани микроорганизми от УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив за периода 2010-2017 г.

Година	Общ брой <i>P. aeruginosa</i>	Общ брой <i>A. baumannii</i>	Общ брой на всички изолати	УМБАЛ „Свети Георги“
2010	506	384	5245	
2011	506	452	5711	
2012	512	546	6598	
2013	409	435	6151	
2014	582	524	7389	
2015	611	517	7084	
2016	790	567	9045	
2017	720	401	8074	

*Общият брой включва всички изолирани микроорганизми, независимо от тяхната антимикробна чувствителност към всички антибиотици

Като цяло правят впечатление значително по-високите нива на резистентност, касаещи двата карбапенема и при двата бактерия за нашата болница в сравнение с тези за страната през обхванатия пет годишен период. Това потвърждава необходимостта от преоценка и оптимизиране на антибиотичната политика в лечебното заведение, както и разработването и

внедряване на нови терапевтични подходи за справяне с подобен вид рестрикции и превенция на възникването на нови резистентни щамове. Доказването на идентични щамове, циркулиращи в отделенията на територията на болницата говори, че въпреки сериозната работа на определените за целта звена относно превенция и контрол на ИСМО: Комисия за борба с вътреболничните инфекции и Отделението за превенция и контрол на вътреболнични инфекции (ОПК-ВБИ), усилията са не дотам продуктивни и съществува реална заплаха от ендемични взривове на вътреболнични инфекции, причинени от мулти- и екстензивно-резистентни ацинетобактери и псевдомонаси.

Таблица 4. Общи параметрични данни за размера на УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив за периода 2014-2017 г.

Година	2014	2015	2016	2017
Брой легла	1373	1440	1485	1537
Брой интензивни легла	64	89	70	63
Брой леглодни	434 932	445 879	426 420	453 704
Индекс на заетост	86.8%	85.43%	78.46%	80.87%
Брой хоспитализации	78 656	76 379	80 151	79 867

Въпреки значително по-високите нива на резистентност към карбапенеми в нашата болница, статистическата обработка на данните за обхванатия пет годишен период на колекциониранияте изолати (2010-2014) не доказва оформяне на конкретна тенденция относно покачване, намаляване или запазване на статуквото на текущите нива на резистентност. Същият резултат получихме и в частност за КАИЛ – въпреки високите нива на резистентност към двата карбапенема и при двата микроба, не се наблюдава тенденция и не биха могли да се направят достоверни прогнози.

Според последният доклад на Европейския център за контрол и превенция на заболяванията (ECDC) от ноември 2016 г. за 2015 г. България се нарежда сред страните с особено висока карбапенемна резистентност при ацинетобактер ($\geq 50\%$) наред с Румъния, Гърция, Италия, Полша и Латвия. Страни с $\leq 1\%$ карбапенемна резистентност са Холандия и Великобритания, а тези в интервала 1-5%: Финландия, Швеция, Германия и Австрия. Резистентността към колистин до 2015 г. се оценява на 4% за Европа (<http://antibiotic.ecdc.europa.eu/>).

По отношение на псевдомонас за 2015 г. България заема средни позиции от 25.5% карбапенемна резистентност, следвана от Литва, Унгария, Полша, Хърватска, Гърция, Словакия и Румъния, където нивата достигат 66,3%. Страните с ниски нива под 5% са: Исландия, в която за 2015 г. няма регистрирани карбапенем-резистентни псевдомонаси, Великобритания с 2.4%, Белгия 3.9%, Холандия 4%, Дания 4.6% и Финландия 4.7% (antibiotic.ecdc.europa.eu).

В заключение, считаме, че основната цел на настоящето проучване се реализира: изясниха се механизмите на карбапенемна резистентност при клиничните изолати *A. baumannii* и *P. aeruginosa* като на базата на получените резултати се изготвиха препоръки за справяне с наложените терапевтични рестрикции и предотвратяване на възникването на нови резистентни щамове. Ефикасността на предложените подходи по отношение на трайно понижаване на карбапенемната резистентност и възвръщане на ефективността на карбапенемната група в борбата с ацинетобактерните и псевдомонасни инфекции, както и предотвратяване на ендемични и епидемични взривове от мулти- и екстензивно-резистентни щамове, би могла да се оцени след реалното им имплементиране в клиничната практика, съчетани с колаборация от нови иновативни подходи за превенция на ИСМО, преразглеждане на антибиотичната политика на лечебното заведение с оглед възможност за закупуване на новите алтернативни антибиотици, ротационен принцип на изписване на антимикробните средства и не на последно място ефективно обучение и контрол на медицинския персонал по отношение на асептиката и антисептиката с оглед ограничаване на трансмисията на нозокомиални щамове.

7. ИЗВОДИ

1. Карбапенемната резистентност при неферментативните бактерии не е изолирано явление. Обикновено резистентните на карбапенеми изолати *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* са резистентни на поне още 3 групи антимикробни средства, което ги категоризира най-малко като полирезистентни.

2. Фенотипните методи за детекция на карбапенемази – Модифицираният Ходж тест, MCNP v3 тестът, двойно дисковият комбиниран тест с дискове имипенем и имипенем + ЕДТА, както и комбинираният епсилометър тест с имипенем + имипенем/ЕДТА са бързи, надеждни и със съпоставими резултати с молекулно-генетичните тестове за скрининг при Грам-негативните неферментативни бактерии.

3. От проведения фенотипен и генетичен скрининг като водещ фактор за карбапенемна резистентност при нашите изолати *A. baumannii* се оформи продукцията на карабапенемази клас Д, група 2df оксацилинази, подсемейство ОХА-23. Не се доказаха разпространените за България карабапенемази, клас Д, група 2df оксацилинази, подсемейство ОХА-58 и ОХА-24 при тестваните изолати *A. baumannii*, както и хиперекспресията на вродената оксацилиназа ОХА-51.

4. При изолатите *P. aeruginosa* водещ фактор за карбапенемна резистентност е повишената експресия или хиперекспресия на MexXY-OprM ефлукс помпата, в повечето от случаите в комбинация със загуба или намалена продукция на ключовия трансмембранен протеин OprD и в по-малка степен с повишена експресия или хиперекспресия на MexAB-OprM.

5. Изолира се първият за страната VIM-продуциращ *Pseudomonas putida*, който би могъл да служи като резервоар и източник за трансфер на метало-ензими. VIM и IMP кодиращи гени не се установиха при изолатите *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*.

6. Продукцията на ОХА-50 бета-лактамаза при *Pseudomonas aeruginosa* вероятно подпомага развитието на карбапенемна резистентност в комбинация с други механизми като загуба на OprD протеина.

7. Имипенем е вероятен субстрат за MexXY-OprM ефлукс помпата, чиято повишена експресия или хиперекспресия може да доведе до резистентност при клинични изолати *P. aeruginosa*.

8. На територията на УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив за периода 2010-2014 г. персистират два клона ОХА-23 продуциращи *A. baumannii*.

9. Съществуват различни подходи за антибиотична терапия и превенция на инфекции, причинени от карбапенем-резистентни *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, които могат да бъдат прилагани в УМБАЛ „Свети Георги“-Пловдив.

8. ПРИЛОЖЕНИЕ НА НАУЧНИЯ РЕЗУЛТАТ

Таблица 5. Алгоритъм за лечение на инфекции, причинени от карбапенем-резистентни *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*

Терапевтичен подход	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
I Колистин (1 мг.= 12 500 IU)	Доза за инхалаторно приложение: 500 000-1000 000 IU на 12 часа Доза за i.v. приложение: 50 000-70 000 IU/кг (или 5 мг/кг) на 8 ч. при тегло < 60 кг. 1-2 млн. IU/кг на 8 ч. при тегло > 60 кг. <i>*Забележка: макс. дневна доза 6 млн. IU, при съхранена бъбречна функция и критични пациенти до 9 млн. IU, разделени в 3 приема</i>	Доза за инхалаторно приложение: 500 000-1000 000 IU на 12 часа Доза за i.v. приложение: 50 000-70000 IU/кг на 8 ч. при тегло <60 кг. 1-2 млн. IU/кг на 8 ч. при тегло > 60 кг. <i>*Забележка: макс. дневна доза 6 млн. IU, но при съхранена бъбречна функция и критични пациенти до 9 млн. IU, разделени в 3 приема</i>
II Сулбактам (винаги в комбинация): Сулбактам + колистин (270 мг/24 ч) Сулбактам + фосфомицин	Доза: 3 гр. на 8 ч. в бавна инфузия (за 4 часа) <i>*Забележка: при липса на монопродукт, биха могли да се използват:</i> ➤ ампицилин/ сулбактам: 2 гр./1 гр. i.v. на 8 ч.+колистин: инхалаторно приложение: 500 000-1000 000 IU на 12 часа или i.v. приложение: 50 000-70 000 IU/кг (или 5 мг/кг) на 8 ч. при тегло < 60кг.; 1-2 млн. IU/кг на 8 ч. при тегло > 60кг ➤ цефоперазон/ сулбактам: 1 гр./1 гр. i.v. на 8 ч.+колистин: инхалаторно приложение: 500 000-1000 000 IU на 12 часа или i.v. приложение: 50 000-70 000 IU/кг (или 5 мг/кг) на 8 ч. при тегло < 60 кг.; 1-2 млн. IU/кг на 8 ч. при тегло > 60 кг	Не се прилага

Терапевтичен подход	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
III Фосфомицин (винаги в комбинация): Фосфомицин + колистин Фосфомицин + сулбактам	Доза на фосфомицина за i.v. приложение в комбинация: 4 гр. на 12 часа ➤ фосфомицина i.v. приложение: 4 гр. на 12 часа.+колистин: инхалаторно приложение: 500 000-1000 000 IU на 12 часа или i.v. приложение: 50 000-70 000 IU/кг (или 5 мг/кг) на 8 ч. при тегло < 60 кг.; 1-2 млн. IU/кг на 8 ч. при тегло > 60 кг ➤ фосфомицина i.v. приложение: 4 гр. на 12 часа+ ампицилин/ сулбактам: 2 гр./1 гр. i.v. на 8 ч. или цефоперазон/ сулбактам: 1 гр./1 гр. i.v. на 8 ч. <i>*Забележка: като монотерапия оптималната доза е: 4 гр. на 8 ч., а максималната 8 гр. на 8 ч.</i>	Доза на фосфомицина за i.v. приложение в комбинация: 4 гр. на 12 часа ➤ фосфомицина i.v. приложение: 4 гр. на 12 часа.+колистин: инхалаторно приложение: 500 000-1000 000 IU на 12 часа или i.v. приложение: 50 000-70 000 IU/кг (или 5 мг/кг) на 8 ч. при тегло < 60 кг.; 1-2 млн. IU/кг на 8 ч. при тегло > 60 кг ➤ фосфомицина i.v. приложение: 4 гр. на 12 часа+ ампицилин/ сулбактам: 2 гр./1гр. i.v. на 8 ч. или цефоперазон/ сулбактам: 1 гр./1 гр. i.v. на 8 ч. <i>*Забележка: като монотерапия оптималната доза е: 4 гр. на 8 ч., а максималната 8 гр. на 8 ч.</i>
IV Тигециклин (винаги в комбинация): Тигециклин + колистин	Доза за i.v. приложение: 200 мг. натоварваща, последвани от 100 мг. на 12 ч. ➤ тигециклин i.v. приложение: 200 мг. натоварваща, последвани от 100 мг. на 12 ч.+колистин: инхалаторно приложение: 500 000-1000 000 IU на 12 часа или i.v. приложение: 50 000-70 000 IU/кг (или 5 мг/кг) на 8 ч. при тегло < 60 кг.; 1-2 млн. IU/кг на 8 ч. при тегло > 60 кг	Не се прилага

Терапевтичен подход	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
V Цефтазидим/авибактам	Не се прилага	Доза за i.v. приложение: 2 гр./0,5 гр. на 8 ч.
VI Цефтолозан/тазобактам	Не се прилага	Доза за i.v. приложение: 1 гр./1 гр. на 8 ч.
VII Рифампицин (винаги в комбинация): Рифампицин + колистин	Доза за i.v. приложение: Оптимална 600 мг. на 24 ч. Максимална 600 мг. на 12 ч. ➤ рифампицин i.v. приложение 600 мг. на 24 ч.+колистин: инхалаторно приложение: 500 000-1000 000 IU на 12 часа или i.v. приложение: 50 000-70 000 IU/kg (или 5 мг/kg) на 8 ч. при тегло < 60 кг.; 1-2 млн. IU/kg на 8 ч. при тегло > 60 кг	Не се прилага
VIII Левофлоксацин (винаги в комбинация): Левофлоксацин + имипенем (1 гр. на 12 ч.)	Не се прилага	Доза за i.v. приложение: 750 мг. на 24 ч. Левофлоксацин i.v. приложение: 750 мг. на 24 ч. + имипенем i.v. приложение 1 гр. на 12 ч. <i>*Забележка: тази комбинация е подходяща за емпирична терапия за превенция на карбапенемна резистентност</i>

9. ПРИНОСИ

9.1. Приноси с оригинален характер

1. За първи път в България се изготви анализ на генната експресия чрез RT-qPCR на двете ключови ефлукс помпи: MexAB-OprM и MexXY-OprM с таргетни протеини MexA и MexX при клинични изолати *P. aeruginosa*.

2. За първи път се изготви оценка на генната експресия на трансмембрания протеин OprD чрез RT-qPCR на български клинични изолати *P. aeruginosa*.

3. На базата на молекулно-генетичните анализи от експресията на MexAB-OprM, MexXY-OprM ефлукс помпите и трансмембрания протеин OprD за първи път от България се прави предположение, че имипенем също може да бъде субстрат за MexXY-OprM, експресирана в клинични изолати *P. aeruginosa*.

4. Съобщават се първите за страната изолати *Pseudomonas aeruginosa*, носители на OXA-50-кодиращи гени.

5. Регистриран е първият за страната VIM-продуциращ *Pseudomonas putida*.

9.2. Приноси с приложен характер

1. За първи път в България се разработват експериментално два независими протокола с различни фирмени кита за симултантна оценка на експресията на MexAB-OprM, MexXY-OprM ефлукс помпите в комбинация с трансмембрания протеин OprD чрез RTqPCR, което позволява бързина и гъвкавост на изследването.

2. За първи път в България се разработва експериментално протокол за оценка на експресията на индуцибилната ArpC чрез RTqPCR, който би могъл да се използва за скрининг и при други микроорганизми, освен *Pseudomonas*.

3. За първи път в България се разработва експериментално протокол за RAPD анализ, приложим при два микроорганизма: *A. baumannii* и *P. aeruginosa*.

4. За първи път на територията на Пловдивски регион се прави опит за оптимизиране на антибиотичната политика на лечебното заведение при терапията на инфекции, причинени от карбапенем-резистентни ацинетобактери и превдомонаси с изготвянето на препоръки, конкретно касаещи интензивните звена и съобразени със специфичната структура на карбапенемна резистентност в него.

9.3. Приноси, обогатяващи съществуващите до момента познания

1. За първи път на територията на Пловдивски регион се доказва като водещ фактор за карбапенемна резистентност при изолатите *A. baumannii* продукцията на карабапенемази, клас Д, група 2df оксацилинази, подсемейство ОХА-23, което потвърждава данните на други автори от страната и чужбина за широкото им разпространение.

2. Доказаната за първи път на територията на Пловдивски регион повишена експресия или хиперекспресия на MexXY-OprM ефлукс помпата, в по-голям процент от случаите в комбинация със загуба на трансмембранния протеин OprD с или без хиперекспресията на MexAB-OprM, като водещ фактор за карбапенемна резистентност при *P. aeruginosa*, е с потвърдителен характер относно българските изолати.

3. За първи път се доказва персистирането на два ендемични клона ОХА-23 продуциращи *A. baumannii* на територията на УМБАЛ „Св. Георги“–Пловдив за периода 2010-2014 г., което корелира с данните на други автори от страната и чужбина за обичайна циркулация на повече от един клон.

10. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ НА НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С РАЗРАБОТЕНИЯ ТРУД

10.1. Публикации

В България:

1. В. Гривнев, А. Петрова *Микробиологични аспекти на инфекциите в КАИЛ при УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив* Сборник Наука и Младост, 2013, стр. 46-50, **статия**
2. А. Петрова, М. Мурджева *Фенотипни и генетични характеристики на резистентността към карбапенеми при *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa**; с. „Медицински преглед“ 2016, том 2, брой 2, стр. 5-14, **обзор**
3. А. Petrova, I. Stanimirova, I. Ivanov, M. Petrov, Ts. Miteva-Katrandzhieva, V. Grivnev, V. Kardjeva, T. Kantardzhiev, M. Murdjeva *Carbapenemase production of clinical isolates *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from a Bulgarian University Hospital* (Ahead of print), Folia medica 2017 May; 59(4): 95-103, **статия**
4. А. Petrova, T. Borisova, Y. Feodorova, I. Stanimirova, Ts. Miteva-Katrandzhieva, M. Petrov, M. Murdjeva *Analysis of *OprD* receptor in carbapenem resistant clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* and interplay between the expression of main efflux pumps and intrinsic *AmpC** (под печат), Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, **статия** IF 2016=0.25

В чужбина:

1. А. Petrova, M. Murdjeva *Focus on the problem of carbapenem resistance in clinical significant non-fermenters: *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa**, Microbiology: current research, 2018; 2(1):3-4, **editorial**

10.2. Участия в научни форуми

В България:

1. **А. Петрова**, И. Станимирова, К. Драганова, М. Петров, М. Мурджева *Фенотипен скрининг чрез Модифициран Ходж тест за карбапенемазна продукция на *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* от УМБАЛ „Св. Георги“-Пловдив*. 11-ти конгрес по Клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите, гр. София 9-11 май 2013 г.; Сборник резюмета: стр.93, **постер**
2. **A. Petrova**, I. Stanimirova, M. Mircheva, M. Petrov, V. Kardjeva, M. Murdjeva *Polymerase-chain reaction analysis of carbapeneme resistance in gram negative non-fermenting isolates from the university hospital “St. George” in Plovdiv* Юбилейна научна конференция „Наука за здраве“ по случай 70 години МУ – Пловдив, Пловдив 18-22 Май 2015 г.; Сборник резюмета с. Folia Medica: стр. 64, **постер**
3. **А. Петрова**, И. Иванов, Л. Паунов, А. Учиков, Т. Кантарджиев, М. Мурджева *Първи случай на VIM-продуциращ *P. putida* в България, изолиран от УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив*; 15-ти Национален Конгрес по Клинична Микробиология и Инфекции на Българската Асоциация на Микробиолозите, 17-19 май 2017 г., Парк-хотел „Москва“, гр. София, **постер**

В чужбина:

1. **A. Petrova**, I. Stanimirova, M. Mircheva, M. Petrov, V. Kardjeva, M. Murdjeva *First PCR detection of carbapenemase encoding genes in non-fermentative clinical isolates from University Hospital “St. George”-Plovdiv* 5-th Congress of Macedonian microbiologists with international participation, 28-31 May, 2014, Ohrid, Republic of Macedonia; Abstract book, page 117, **poster**
2. V. Grivnev, **A. Petrova** *Microbiological aspects and genetic mechanisms of carbapenemase resistance in Hospital Acquired Infections at the Intensive care unit of University Hospital* 24-th Leiden International Medical Student Conference, 11th-15th March 2015, Leiden, The Netherlands; Abstract book, page 128, **oral presentation**
3. **A. Petrova**, T. Borisova, I. Stanimirova, M. Murdjeva *Gene expression analysis of efflux pumps’ and OprD protein in hospital *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Plovdiv, Bulgaria* 9-th Balkan Congress of Microbiology, 22-24 October, 2015, Thessaloniki, Greece; Abstract book, page 148, **oral presentation**

БЛАГОДАРНОСТИ:

На моя научен ръководител проф. д-р Мариана Мурджева за подкрепата и ценните напътствия във всеки етап от създаването на този научен труд.

На моите рецензенти доц. д-р Теменуга Стоева и доц. Иван Иванов за отзивчивостта и професионализма.

На цялото академично ръководство и Ректора на МУ-Пловдив проф. д-р Стефан Костянев за прекрасните условия и предоставени възможности за развитие на докторантите.

На колегите от Катедра Медицинска биология с ръководител проф. д-р Виктория Сарафян и по-специално на гл. ас. Яна Феодорова за приятната съвместна работа и безвъзмездно предоставената апаратура.

На колегите от НЦЗПБ - гр. София с ръководител проф. д-р Тодор Кантарджиев и по-специално на НРЛ Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност с ръководител доц. Иван Иванов за помощта в осъществяването на експериментите, касаещи секвениране.

На Катедрата по Социална медицина и Обществено здраве към МУ – Пловдив с ръководител проф. д-р Мария Стойкова и най-вече на доц. д-р Цонка Митева за помощта в извършването на статистическите анализи.

На всички колеги от Катедрата по Микробиология и имунология към МУ – Пловдив, както и от Лабораториите по микробиология, имунология и вирусология към УМБАЛ „Свети Георги“, Пловдив, които допринесоха за реализацията на този труд.

На моето семейство за вярата, подкрепата и вдъхновението.