

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” –
ВАРНА**

ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА

КАТЕДРА ПО МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ



Д-Р ГЕРГАНА НЕДЕЛЧЕВА КУЮМДЖИЕВА

**Епидемиологично типизиране и механизми на антибиотична
резистентност в клинично значими *Klebsiella pneumoniae*, изолирани в
УМБАЛ „Света Марина”, Варна**

Дисертационен труд

За присъждане на образователна и научна степен «Доктор»

Научна специалност:

« Микробиология »

Научни ръководители:

ПРОФ. Д-Р ТЕМЕНУГА СТОЕВА, Д.М.

ДОЦ. Д-Р РУМЯНА МАРКОВСКА-ДАВИДКОВА, Д.М.

ВАРНА

2019

Съдържание

1. Увод	7
2. Литературен обзор	9
2.1. Исторически преглед на таксономията на род <i>Klebsiella</i>	9
2.2. Морфология, културелни свойства и биохимични характеристики на <i>K. pneumoniae</i>	11
2.3. Видова идентификация	11
2.4. Резистентност на <i>K. pneumoniae</i> към антимикробни лекарствени препарати	12
2.4.1. Резистентност към β -лактамни антибиотици	12
2.4.2. Резистентност към бета-лактами поради нарушени пермеабилитетни функции на външната мембрана.	25
2.4.3. Резистентност към флуорхинолони	25
2.4.3.1. Хромозомен тип резистентност към флуорхинолони	26
2.4.3.2. Плазмид-медирана хинолонова резистентност (PMQR)	29
2.4.4. Резистентност към colistin	31
2.4.4.1. Механизми на резистентност към colistin	32
2.4.4.2. Разпространение на colistin резистентни <i>K. pneumoniae</i> (CoRKP)	35
2.5. Епидемиология на инфекциите, причинени от <i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
2.5.1. Разпространение на <i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
2.5.2. Инфекции, причинени от <i>K. pneumoniae</i>	38
2.5.2.1. Уроинфекции / урогенитални инфекции	39
2.5.2.2. Инфекции на дихателна система	39
2.5.2.3. Интра абдоминални инфекции	40
2.5.2.4. Инфекции на хирургичното място (Surgical Site Infections, SSI)	41
2.5.2.5. Инфекции на сърдечно - съдова система	41
2.5.2.6. Инфекции на ЦНС	42
2.5.2.7. Остеомиелит	43
2.5.3. Лечение на инфекции причинени от ESBL-продуциращи и карбапенем-резистентни <i>K. pneumoniae</i> .	43
2.6. Методи за епидемиологично типизиране на <i>K. pneumoniae</i>	51
3. Цел и задачи	55
4. Материали и методи	56
4.1. Бактериални изолати	56
4.2. Хранителни среди	56

4.3. Антибиотични субстанции и дискове	56
4.4. Реактиви	57
4.5. Методи за идентификация на <i>Klebisella pneumoniae</i>	57
4.6. Методи за изпитване на чувствителността на <i>Klebsiella pneumoniae</i> към антимикробни лекарствени средства.	58
4.6.1. Дисково - дифузионен метод	58
4.6.2. Методи за определяне на Минимална Подтискаща Концентрация (МПК).	59
4.6.2.1. Определяне на МПК чрез използване на МІС стрип (Epsilometer test)	59
4.6.2.2. Определяне на МПК на colistin и tygecycline чрез микродилуционния метод на серийните разреждания в бульон.	59
4.7. Фенотипни методи за доказване на щамове, продуценти на бета-лактамази:	60
4.7.1. Двойно - дисков синергичен тест (DDST)	60
4.7.2. Модифициран Hodge test (МНТ)	60
4.7.3. Потвърждаване на продукцията на ESBL и определяне на спектъра на продуцирани бета-лактамази чрез изоелектрично фокусиране (IEF).	61
4.7.4. Bioassay – биологичен тест за β -лактамазна хидролитична активност.	63
4.8. Конюгационно предаване на плазмиди, детерминиращи продукцията на ESBL и гени за хинолонова резистентност.	63
4.9. Молекулярно-генетична идентификация на видовете бета-лактамази (ESBLs, AmpC, карбапенемази) и механизмите на хинолонова резистентност.	63
4.9.1. Полимеразо-верижна реакция (PCR)	63
4.9.2. Доказването на алелният вариант на ацетилтрансферазата - aac(6')- Ib-cr	67
4.9.3. ДНК секвениране	68
4.10. PCR за типирание на репликони	69
4.11. Епидемиологичен анализ	70
4.11.1. ERIC-PCR	70
4.11.2 MLST (Multi Locus Sequence Typing)	71
5. Резултати и обсъждане	73
5.1. Епидемиологична информация	73
5.2. Определяне чувствителността на изолатите <i>K. pneumoniae</i> към антимикробни лекарствени средства.	75
5.2.1.Изпитване на чувствителността към антимикробни лекарствени средства по дисково - дифузионния метод (ДДМ) на Bauer – Kirby.	75

5.2.2. Изпитване на чувствителността към антимикробни лекарствени средства чрез определяне на МПК на антибиотика.	79
5.2.2.1. Изпитване на чувствителността към colistin и tigecycline чрез определяне на МПК чрез микродилуционен метод.	79
5.2.2.2. Изпитване на чувствителността към хинолони чрез определяне на МПК чрез E-тест.	81
5.3. Проучване на механизмите на резистентност към β -лактами.	94
5.3.1. Фенотипни методи за доказване продукцията на β -лактамази	94
5.3.1.1. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукцията на широко-спектърни β -лактамази.	94
5.3.1.2. Модифициран Hodge test (МНТ)	96
5.3.2. Молекулярно - генетична идентификация на ESBL	99
5.3.2.1. PCR метод за доказване на гени, кодиращи β -лактамази	99
5.3.3. Определяне вида на бета-лактамазата чрез изоелектрично фокусиране IEF и биологичен тест за β -лактамазна хидролитична активност.	102
5.3.4. Секвениране на <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{DHA} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{NDM}	108
5.4. Конюгационно предаване на плазмиди, носещи гени за ESBLs и хинолонова резистентност.	116
5.5. Определяне типа на плазида.	117
5.6. Епидемиологично типизиране.	120
5.7. Доказване на гени, кодиращи хинолонова резистентност	134
5.7.1. Доказване на гени, кодиращи плазмидна хинолонова резистентност	134
5.7.2. PCR метод за детекция на мутации в <i>gyrA</i> и <i>parC</i> гените, асоциирани с хромозомно медирана хинолонова резистентност.	136
5.8. Доказване на гени, кодиращи плазмидна колистинова резистентност	144
6. Изводи	146
7. Справка за приносите на дисертационния труд	148
8. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд	150
9. Литература	151

Използвани съкращения

ДДМ	Дисково дифузионен метод
МПК	Минимална подтискаща концентрация
СЗО	Световна Здравна Организация
AmpC	β -lactamases Ambler class C
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Институт за клинични лабораторни стандарти
DDST	Double disk synergy test
ERIC PCR	Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> spp.
ESBLs	Extended spectrum beta-lactamases
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing
<i>gyr B</i>	ген за DNA gyrase subunit B
IEF	Isoelectric focusing
IS	Insertion sequence
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MDR	multidrug resistance
MLST	Multilocus sequence typing
NDM	New Delhi metallo beta lactamase
<i>par C</i>	ген за DNA topoisomerase IV subunit A
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
PMQR	Plasmid mediated quinolone resistance
QRDR	Quinolone-Resistance Determining Regions
RAPD-PCR	Randomy amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction
SME	<i>Serratia marcescens</i> ensime
VIM	Verona integron metallo beta lactamase
AMC	amoxicillin/clavulanic acid
AK	amikacin
CAZ	ceftazidime
CRO	ceftriaxone
CTX	cefotaxime

CIP	ciprofloxacin
COL	colistin
CZA	ceftazidime-avibactam
FEP	cefepime
GM	gentamicin
LVX	levofloxacin
NX	nalidix acid
SXT	trimethoprim/sulfamethoxazole
TOB	tobramycin
TGC	tigecycline
TZP	piperacillin/tazobactam

1. Увод

Приложението на антибиотиците в борбата с инфекциите е едно от най-великите достижения на медицинската наука. Още през 60-те години на миналия век обаче започва да се появява резистентност на микроорганизмите спрямо използваните антимикуробни лекарствени препарати, за да се стигне до настоящия момент, в който този феномен се е превърнал в един от най-важните проблеми, стоящи пред медицинската общност и човечеството въобще.

В доклади на Световния Икономически форум за глобалните рискове, антибиотичната резистентност е отбелязана като една от най-големите заплахи за човешкото здраве. Смята се, че в Европа 25 000 души умират всяка година в резултат на мултирезистентни бактериални инфекции, което струва на икономиката на Европейския съюз около 1,5 милиарда € годишно (Walker D, 2011; World Economic Forum, 2013; World Economic Forum, 2014). В САЩ повече от 2 милиона души ежегодно се заразяват с резистентни бактерии, което се асоциира с 23 000 смъртни случая като пряк резултат (Blair et al, 2015; World Health Organization, 2014; Hampton T, 2013).

Klebsiella pneumoniae е един от най-важните причинители на инфекции, особено на тези, свързани с медицинското обслужване. В последните две десетилетия изолати *K. pneumoniae*, резистентни на трета генерация цефалоспорини се съобщават практически от всички краища на света. Обикновено такива изолати се асоциират с продукцията на широкоспектърни бета-лактамази (ESBLs) и демонстрират често кръстосана резистентност към други антибиотични групи – аминогликозиди, флуорхинолони, trimethoprim/sulphamothoxazole и др. Сравнително наскоро появили се и определени като опасност за общественото здраве са карбапенем – резистентните *K. pneumoniae*, продуциращи карбапенемази от различни класове (KPC, NDM, OXA-48, VIM), които често демонстрират резистентност към практически всички налични бета-лактамни антибиотици. *K. pneumoniae*, продуценти на KPC карабапенемази често са нозокомиални изолати, докати тези, продуциращи NDM и OXA-48 бета-лактамази са както свързани с вътреболнични, така и с придобити в обществото инфекции (Nordmann P, 2014). В последните две-три десетилетия се наблюдава тревожна тенденция на нарастване на резистентността на този бактериален вид към различни групи антимикуробни лекарствени средства, като най-често този феномен се асоциира с придобиването на различни плазмиди. Не случайно видът *K. pneumoniae* е отнесен към групата патогени ознзвени като ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*). Тези бактериални видове са парадигма за множествена

резистентност и крос-трансмисия (Pendleton JN, 2013; Rice LB, 2008; Rice LB, 2010). С особена острота стои проблемът с лечението на инфекции, причинени от мултирезистентни *K. pneumoniae* и нарастването в глобален план на резистентността към стратегически антибиотици и „антибиотици на последен избор“ особено в интензивните болнични структури.

Значението на *K. pneumoniae* за съвременната вътреболнична патология е несъмнено. През 2017г. СЗО създава списък от MDR патогени с глобален приоритет с цел откриване и разработване на нови антимикробни лекарствени средства срещу тези бактерии. В групата с най-висок приоритет, определен като “критичен”, СЗО поставя резистентните към цефалоспорици III генерация и карбапенеми *K. pneumoniae*. По настоящем възникването и разпространението на такива множествоно резистентни микроорганизми се приема като заплаха за общественото здраве.

K. pneumoniae е един от най-значимите бактериални видове като причинители на инфекции, свързани с медицинското обслужване и е сред петте най-често изолирани бактериални видове в болничните микробиологични лаборатории. В унисон със световните тенденции, в последните няколко години *K. pneumoniae* заема трето място по честота на изолиране от всички клинични материали на пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“, а в етиологичната структура на бактериемииите е сред водещите патогени, заемайки първо място през 2014г. и трето през 2018г. Резистентността към трета генерация цефалоспорици показва трайна тенденция за повишаване, достигаща до 81.6% през 2018г., а тази към карбапенеми – 5.3%. Ето защо осъществяването на адекватна антибиотична терапия в условията на непрекъснато повишаваща се резистентност и контролът върху вътреболничното разпространение на множествоно резистентни *K. pneumoniae* поставят сериозни предизвикателства пред лекуващите лекари и клиничните микробиолози. Това определя мониторинга върху тенденциите в развитието на антибиотичната резистентност и разшифроването на генетичните й механизми в множествоно-резистентни *K. pneumoniae* да е сред основните задачи на диагностичните микробиологични лаборатории.

2. Литературен обзор

2.1. Исторически преглед на таксономията на род *Klebsiella*

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

Род *Klebsiella* има интересна таксономична история. Първоначално той е разделен на три вида: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* и *K. rhinoscleromatis*, съответстващи на трите заболявания – пневмония, риносклерома и озена. По-късно, с разработването на нови методи като числената таксономия, класифицирането на видовете в този род търпи развитие. Възникват три класификационни схеми: на Cowan, на Bascomb и на Ørskov (таблица 1.)

Таблица 1. Класификационни схеми на видовете в род *Klebsiella* (BARR JG, 1977).

Cowan	Bascomb	Ørskov
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. aerogenes /oxytoca/</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. edwardsii</i>	<i>edwardsii</i>	<i>subsp. Pneumoniae</i>
<i>subsp. edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>subsp. Rhinoscleromatis</i>
<i>subsp. Atlantae</i>	sensu stricto	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. pneumoniae</i>	sensu lato	<i>K. terrigena</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. planticola</i> (syn <i>K.</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>trevisanii</i>)
	<i>K. “unnamed group”</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	

В началото на 80-те години на миналия век изолираните от околна среда клемсиели, които до тогава са били класифицирани като "*Klebsiella* подобни организми" (Групи J, K, L и

М) са вече класифицирани като таксони. Тези четири групи са означени като четири нови видове: *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola* и *K. trevisanii*. През 1986 г. последните два вида са обединени в един вид (*K. planticola*) на базата на тяхната обширна ДНК хомоложност. Първоначално се счита, че *K. terrigena* и *K. planticola* нямат клинично значение и че тяхното разпространение се ограничава до води, почви и растения, но през 90-те години на миналия век има описани изолати *K. planticola*, получени от човешки проби (Podschun, 1992; Podschun, 1998). Така родът *Klebsiella* включва 4 вида: 1. *Klebsiella pneumoniae*, ssp. *pneumoniae*, ssp. *ozaenae* и ssp. *rhinoscleromatis*; 2. *Klebsiella oxytoca*; 3. *Klebsiella terrigena*, 4. *Klebsiella planticola* / *Raultella*.

По-късно в семейство *Enterobacteriaceae* е обособен Tribus *Klebsiellae*, включващ пет рода: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia* и *Pantoea*. Род *Klebsiella* е хетерогенен и съставен от видове, които образуват три клъстера, в които са включени и членове на други родове, включително *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia* и *Tatumella*. Клъстер I съдържа *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* и *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*. Клъстер II съдържа *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella trevisanii* и *Klebsiella terrigena*. Тук името *Raoultella* е предложено като родово наименование за видовете от клъстер II. Клъстер III съдържа *Klebsiella oxytoca* (Drancourt, 2001). Малко по-късно Boye и Hansen чрез секвениране на 16S rDNA на род *Klebsiella* определят таксономичните отношения в рода заедно с други *Enterobacteriaceae* и род *Klebsiella* е разделен на 5 клъстера (Boye, 2003). Клъстер I - *K. oxytoca*, Клъстер II - *K. terrigena*, Клъстер III - *K. planticola* и *K. ornithinolytica*, Клъстер IV- *Enterobacter aerogenes* (*K. mobilis*), Клъстер V- *K. pneumoniae* (Boye, 2003). *E. aerogenes* и *Klebsiella mobilis* се приемат за хомотипни синоними и *E. aerogenes* дори е бил включен като член на род *Klebsiella* в Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd тъй като е по-близо до *K. pneumoniae* отколкото до *E. cloacae* (Brady, 2013).

Съвременната класификация на рода може да се представи по следния начин (Saha, 2013; Li X, 2004; Brisse, 2014):

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacterales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Klebsiella*

- *K. pneumoniae* (type-species)
 - *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*
 - *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*
 - *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*
- *K. granulomatis*
- *K. oxytoca*
- *K. michiganensis*
- *K. quasipneumoniae*
 - *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*
 - *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*
- *K. grimontii*
 - *K. variicola* (*Klebsiella singaporensis*)

2.2. Морфология, културелни свойства и биохимични характеристики на *K. pneumoniae*

K. pneumoniae са Грам отрицателни пръчици, които не образуват спори, образуват капсули, неподвижни, разположени поединично, на двойки или в къси верижки. Невзискателни микроорганизми, които добре се развиват на обикновени хранителни среди, а в рутинната микробиологична диагностиката се изолират на диференциращи среди за ентеробактерии и кръвен агар. Образуват кръгли, блестящи, куполообразни, мукозни колонии. В течни среди дават слузести утайки. Притежават богата ензимна активност. Притежават О и К антигени.

2.3. Видова идентификация

Идентификация чрез фенотипни методи

В диагностичната практика идентификацията на *K. pneumoniae* се осъществява чрез мануални методи, полуавтоматизирани (API 20 E, Crystal, Remel) и автоматизирани системи (Merlin, Phoenix (BD), Vitek-2 (BioMerieux). На таблица 2 са показани най-важните биохимични отнасяния на представителите на род *Klebsiella* и в частност *K. pneumoniae*.

Таблица 2. Биохимична характеристика на Род *Klebsiella*

Биохимична характеристика	<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
	subsp. <i>pneumoniae</i>	subsp. <i>ozaenae</i>	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>				
Indole	-	-	-	+	-	+/-	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	+
Lysine	+	+/-	-	+	+	+	+

decarboxylase							
Pectate degradation	-	-	-	+	-	-	-
Gas from lactose at 44.5°C	+	-	-	-	-	-	-
Growth at 10°C	-	-	-	+	+	+	+
Acid from: D-Melezitose	-	-	-	+/-	+	-	-
L-Sorbose	+/-			+	+	+	
Utilization of: <i>m</i> - Hydroxybenzoate	-	-	-	+	+	-	-
Utilization of: Hydroxy-L- proline	+/-			+/-	+/-	+	
Malonate	+	-	+	+	+	+	+
Methyl red test	-	+	+	-	+	+/-	+
Voges-Proskauer reaction	+	-	-	+	+	+	+

2.4. Резистентност на *K. pneumoniae* към антимикробни лекарствени препарати

В последните две десетилетия в световен мащаб се установява нарастване и разпространение на резистентността към антибактериални средства сред много бактериални видове с важно медицинско значение. В това отношение *K. pneumoniae* е един от водещите патогени.

2.4.1. Резистентност към β-лактамни антибиотици

Бета - лактамните антибиотици обединяват голяма група антимикробни препарати, използвани за лечението на инфекции с различна етиология. Съществуват множество изследванията в областта на механизмите на антибиотична резистентност в *K. pneumoniae*, като този процес продължава особено интензивно и в наши дни.

Известни са три основни механизми на устойчивост към β-лактамни антибиотици:

1. механизъм на антибиотична инактивация чрез продукция на хидролизиращи ензими (β -лактамази) – пеницилинази, цефалоспоринози, карбапенемази.
2. нарушени пермеабилитетни функции на външната мембрана;
3. промяна на пеницилин - свързващите протеини (PBPs).

Хидролизата на β - лактамния пръстен от β - лактамази е един от водещите механизми на резистентност при *K. pneumoniae*. Известни са две класификационни схеми на β – лактамазите: молекулярната класификация на Ambler (1980г.) и функционалната класификация на Bush-Jacoby (2009г.). В практиката по-удобна се оказва класификацията въз основа на първичната структура на ензимите (по Ambler), където β -лактамазите са разпределени в четири класа А, В, С и D. Класовете А, В и D включват ензими, които съдържат серин в активния си център, докато клас В са метало- β -лактамази, съдържащи цинков йон в активния си център (таблица 3) (Shaikh, 2015 ; Padmini, 2017).

Клас А β -лактамази (TEM, SHV, CTX-M, VEB, GES/IBC, KPC, NMC-A, IMI-1, IMI-2)

Ензимите от клас А хидролизират пеницилини, цефалоспорини (включително III и IV генерация), а някои представители - и карбапенеми. Тези ензими се инхибират от clavulanic acid. Клас А- представляват хетерогенен молекулярен клъстер, съдържащ бета –лактамази споделящи от 20% до 90% идентичност. Най-ранните широко-спектърните β -лактамази (ESBLs) от клас А, съобщавани от 1985 до 1987г., се различават от широко разпространените плазмид-медираните TEM-1/2 и SHV-1 пеницилинази. Днес тези ESBLs са широко разпространени по целия свят и са над 100 варианта. Повечето от тези ензими са цефтазидимази и само няколко са цефотаксимази (Bonnet, 2004). Семейство SHV (sulfhydryl variant) бета-лактамази вероятно произлиза от *Klebsiella* spp., а първият представител е SHV-1, чийто ген е хромозомно локализиран в *K. pneumoniae*. Прекурсор на този ген е LEN-1, който се намира в бактериалната хромозома. По-късно този ген се включва в плазмид и се разпространява в други чревни бактерии (Shaikh, 2015). SHV-1 придава устойчивост към широкоспектърни пеницилини, ампицилин, пиперацилин, но не и към окси-имино цефалоспорини (Livermore, 1995). Повече от 20% от плазмид-медираната резистентност към ампицилин при *K. pneumoniae* се дължи основно на SHV-1 β -лактамазата (Tzouveleakis, 1999) (Shaikh, 2015).

Таблица 3. Класификация на β -лактамазните ензими (Padmini, 2017)

Ambler	Bush-Jacoby	Активен Център	Ензим	Инхибиране от clavulanic acid	Бактериален вид	Субстрат
A	2b 2br, 2be 2c, 2e, 2f	серин	тясноспектърни (TEM-1, SHV-1) Инхибитор-резистентни ESBLs (TEM, SHV, CTX-M) Карбапенемази (KPC, GES, SME)	Да изключение: 2br	<i>Enterobacteriaceae</i> ГОНФ	ampicillin, cephalotin пеницилини; цефалоспорини от трета генерация всички бета-лактами
B	3	цинк	карбапенемази (VIM, IMP, NDM)	Не	<i>Enterobacteriaceae</i> ГОНФ	всички бета-лактами
C	1	серин	AmpC (CMY, DHA, MOX, FOX, ACC)	Не	<i>Enterobacter species</i> <i>Citrobacter species</i>	цефамицини, цефалоспорини от трета генерация
D	2d	серин	Не-ESBL β -лактамази (OXA) ESBL (OXA) карбапенемази(OXA)	Да	<i>Enterobacteriaceae</i> ГОНФ	оxacillin, ampicillin, cephalothin пеницилини; цефалоспорини от трета генерация всички бета-лактами

ESBLs медираат резистентността към всички пеницилини, цефалоспорини от трето поколение (например ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxon) и aztreonam, но не и към цефамицини (cefoxitin, cefotetan) и карбапенеми (Bonnet, 2004). За първи път ESBL-ензими са доказани в изолати *Klebsiella pneumoniae* и *Serratia marcescens* в Германия през 1983 г. и от тогава се наблюдава бързото им разпространение в Европа, САЩ, Азия, като в момента такива бактерии са повсеместно разпространени (Kumar, 2006). Това се свързва с факта, че гените, кодиращи този тип ензими са локализирани в плазмиди, което улеснява тяхната дисеминация (Kumar, 2006). Първият вариант на TEM бета-лактамазата с повишена активност срещу широкоспектърни цефалоспорини е TEM-3, докладвана през 1988г.

CTX-M са друго семейство β -лактамази, които хидролизират преференциално цефотаксим. Установени са основно в изолати *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* и други видове от семейство *Enterobacteriaceae*, вкл. *Klebsiella pneumoniae*. Тези ензими се инхибират по-добре от тазобактам, отколкото от сулбактам и клавуланова киселина. CTX-M бета-лактамазите също се появяват в края на 80-те години, няколко години след въвеждане в употреба на цефотаксим. Прогениторите на *bla*_{CTX-M} са хромозомните *bla* гени в *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera georgiana* и други видове от семейство *Enterobacteriaceae*. Различни мобилни елементи (*ISEcp1*, *Orf513*) участват в трансфера на тези гени. (Bonnet, 2004). В клиничните щамове, гените CTX-M са локализирани върху плазмиди с размер от 7 kb до 160 kb (Bonnet, 2004). CTX-M ESBLs придават по-високи нива на резистентност към cefotaxime отколкото към ceftazidime. В някои случаи МПК на ceftazidime са в диапазона на чувствителност (Bonnet, 2004). Подобно на наблюдаваните CTX-M ESBLs при хората, най-честите ESBL ензими, циркулиращи сред животните също принадлежат към CTX-M група (Naseer, 2011). В азиатските страни изолати, продуциращи CTX-M-14 преобладават при хора, домашни любимци и домашни птици, което може да означава кръстосано контаминиране, но и общ трети източник (Ewers, 2012). Докато CTX-M-1 преобладава сред животни в Европа, но не и при хора, то CTX-M-15 е широко разпространен сред хората, но слабо сред животните (Madec, 2012) (Madec, 2017). Предполага се също така обмен на ESBL продуциращи изолати *Klebsiella pneumoniae* между хора и домашни любимци, като например широко разпространеният CTX-M-15 *K. pneumoniae* ST15 тип, широко разпространен при хора, е доказан също при домашни любимци и коне (Haenni, 2012) (Ewers, 2014). Установено е също, че клинични изолати *K. pneumoniae* от хора, отнасящи се към *K. pneumoniae* ST101 типа, който е доминиращ в Италия, се среща и в кучета (Donati, 2014).

В допълнение, в изолати *K. pneumoniae* е доказана и GES-1 бета-лактамазата. Първоначално GES-1 са описани в изолати *K. pneumoniae* от новородени от Френска Гвиана, които са били транспортирани до Франция (Poirel, 2000; Shaikh, 2015).

В някои изолати *K. pneumoniae* се доказва едновременно присъствие на повече от един *bla* ген. При проведено проучване върху изолати *K. pneumoniae* чрез мултиплекс PCR в интензивни клиници в Иранска болница в периода 2009-2010г. се установява в 39% продукция на TEM ESBLs, в 39% - ко-продукция на CTX-M на TEM ензими, а в 13% - едновременна продукция на TEM, SHV, CTX-M ESBL (Ghasemi, 2013). При проучване сред египетски пациенти със суспектни вътреболнични инфекции се доказва, че в 63.3% от клиничните изолати *K. pneumoniae* носят едния от двата гена - *bla_{SHV}* или *bla_{CTX-M}*: 10% от изолатите са положителни за *bla_{SHV}* ген, а 53.3% - за *bla_{CTX-M}* (Ahmed, 2013). В Иран в периода 2012-2013г. се установява, че 87% от MDR изолатите *Klebsiella spp.* са ESBL-продуциращи, като съдържат *bla_{CTX-M}*. Те представляват 56.25% от общия брой MDR изолати (Bialvaei, 2016). В Саудитска Арабия в 90% от изследваните карбапенем-нечувствителни болнични изолати *Klebsiella pneumoniae* е установено носителство на *bla_{CTX-M}* (Al-Agamy, 2017). В Монголия при проучване върху клинични изолати *K. pneumoniae*, CTX-M, TEM-1 и SHV-1 ESBLs са идентифицирани съответно в 42.9%, 85.7% и 100% (Као, 2016).

Към клас А β -лактамази се отнасят и ензими с карбапенем-хидролизираща активност. Такива са KPC, GES, SME.

Първата не-метало-карбапенемаза от клас А е идентифицирана преди повече от 20 години в изолат *Enterobacter cloacae*. По-късно са доказани ензимите SME (*Serratia marcescens* enzymes), които са хромозомно кодирани и обикновено се асоциират със *Serratia marcescens*. Откриват се спорадично в САЩ и Канада. IMI ензимите (имипенем-хидролизиращи β -лактамази) са открити в изолати *Enterobacter* и се кодират от гени с предимно хромозомна локализация. Изключение прави IMI -2 варианта, който е с плазмидна локализация и е доказан в изолати *E. asburiae* и *E. cloacae* (Nordmann, 2014).

Първият вариант на семейството GES (Guiana extended-spectrum β -lactamase) е докладван през 2000г. в изолати *K. pneumoniae*. GES-5 вариантът е идентифициран в *P. aeruginosa* и представители на семейство *Enterobacteriaceae* (включително *K. pneumoniae*), широко разпространен и докладвани в страни от Южна Америка (Бразилия) (Ribeiro, 2014). В изолати *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* *bla_{GES}* се асоциират с интегрони с плазмидна локализация (Queenan, 2007; Diene, 2014).

Понастоящем KPC ензимите (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) са клинично най-значимите карбапенемази от клас А. Тези ензими обуславят високи нива на резистентност не само към карбапенемите, но също така към повечето β -лактами, включително широкоспектърните цефалоспорини. Най-широко разпространени са KPC-2 продуцентите. Първите такива изолати са идентифицирани в САЩ през 1996г. в изолати *K. pneumoniae*

(Yigit, 2001). Оттогава са идентифицирани и други варианти на ензима, но КРС-2 остава най-честият. В рамките само на няколко години продуцентите на КРС-2 се разпространяват в световен мащаб и са доказани в много Грам отрицателни бактериални видове, но предимно в *K. pneumoniae*. В Латинска Америка производителите на КРС-2 имат характеристика на ендемични за някои региони, като например Колумбия и Аржентина (Munoz-Price, 2013). КРС-2 продуценти се съобщават и в Пуерто Рико и Мексико (Rodríguez-Zulueta, 2013; Nordmann, 2014). В Европа изолати *K. pneumoniae*, продуциращи КРС-2 са идентифицирани почти навсякъде и много често се свързват с внасяне на izolата от ендемични зони (Munoz-Price, 2013). Такива райони в Европа са Гърция, Италия и в по-малка степен Полша. В Израел също се съобщава за ендемичност на КРС-продуцентите, с регистрирани голям брой нозокомиални инфекции (Munoz-Price, 2013; Nordmann, 2014). В Югоизточна Азия мащабът на КРС - дисеминацията не е добре проучен, но в Китай има установени ендемични райони (Munoz-Price, 2013). За Индия има сравнително малко съобщения за КРС-продуценти, тъй като тук най-често идентифицираните карбапенемази са NDM и OXA-48 бета-лактамази (Kumarasamy, 2012).

В световен мащаб е идентифициран един широко разпространен клон *K. pneumoniae* - ST258, носител на *bla*_{КРС-2} или *bla*_{КРС-3} гени (Cuzon, 2010; Nordmann, 2014). Различните карбапенемазни гени, доказани в изолати *K. pneumoniae* често са локализиращи върху мобилни структури (плазмиди, транспозони), което улеснява изключително успешно разпространение сред различни представители на семейство *Enterobacteriaceae*. Така например транспозон Tn4401 е основната генетична структура, свързана с разпространението на *bla*_{КРС} гените (Cuzon, 2011; Pitout, 2015). В глобален аспект, епидемиологията на КРС-2 ензимите зависи от следните фактори: географски райони с гъсто население, лоша хигиена и висок селективен натиск от прекомерна или злоупотреба с антибиотици; разположение на карбапенемазните гени върху транспозони и плазмиди, улесняващи трансфера; обмен в човешката популация и мобилност на населението (Nordmann, 2014).

Клас В метало β-лактамази

Метало β-лактамазите (MBLs) са също ензими с карбапенем-хидролизираща активност. Тези бета лактамази имат най-широкият хидролитичен спектър, който включва всички β - лактамни антибиотици, в това число и карбапенемите, но без aztreonam. Инхибирането на този вид ензими от EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) е характерна тяхна особеност. Клас В метало-β-лактамазите са представени от IMP (active on imipenem), VIM (Verona integron-encoded metalobeta-lactamase), GIM (German Imipenemase), SIM (Seoul

imipenemase) и NDM (New Delhi metallo- β -lactamase) ензими, чиито гени се намират главно в плазмиди, доказани в представители на *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. Вродени метало β -лактамази се срещат при сапрофитни и опортюнистични бактерии. От началото на 90-те години са описани придобити ензими от този клас в изолати *Pseudomonas* или в семейство *Enterobacteriaceae*. Най-често MBLs - те от клас B са от VIM и IMP групите, както и от наскоро появилата се NDM група. Спорадично се среща GIM-1 карбапенемазата (German Imipenemase), доказана в много ентеробактериални видове, включително *Escherichia coli*, *C. freundii* и *K. oxytoca* (Walsh, 2005; Nordmann, 2014; Wendel, 2013).

Сред VIM ензимите, които сега са представени от над 30 варианта, VIM-1 е съобщен за първи път в клиничен изолат *P. aeruginosa* от Верона през 1997 г. Този ген е интегриран в генна касета, разположена в клас I интегрон заедно с *aacA4* ген отговорни за аминокликозидната резистентност (Lauretти, 1999). Същият ген е съобщен малко по-късно в изолати *E. coli* и *K. pneumoniae* от Гърция (Miriagou, 2003; Giakkoуpi, 2003). По настоящем такива изолати се съобщават от страни по целия свят (Cornaglia, 2011; Diene, 2014). Продуцентите на VIM ензими сред *Enterobacteriaceae* са най-разпространени в Южна Европа, докато IMP продуцентите са характерни най-вече за Азия (Walsh, 2005). VIM продуцентите (главно VIM-2) имат ендемично разпространение в Гърция, Италия, Испания, Югоизточна Азия (Корея, Тайван), фокуси има в Африка и някои европейски страни като Германия, Холандия и Франция. Гърция е известна като ендемичен район за VIM-1 продуциращи *K. pneumoniae* и други представители на *Enterobacteriaceae* (Nordmann, 2014). Честотата на продуцентите на IMP карбапенемази е много по-ниска от тази на KPC, VIM, NDM или OXA-48 ензимите.

Една от най-значимите в клинично отношение карбапенемаза е NDM-1, описана през 2009г. в изолати *K. pneumoniae* и *Escherichia coli* от шведски пациент с индийски произход след престой в болница в Ню Делхи (Yong, 2009; Nordmann, 2014). NDM-1 е доста различна в сравнение с други MBLs, като аминокиселинното сходство с VIM-1 и VIM-2 е едва 32.4%. NDM-1 ефективно хидролизира широка гама от бета-лактами, включително пеницилини, цефалоспорини и карбапенеми, но няма ефект върху монобактами, като азтреонам (Yong, 2009). От първоначалното описание на NDM-1, вече са публикувани осем варианта от този ензим (NDM-1 до NDM-8), повечето от които произхождат от Азия (Dortet, 2014). NDM-4, NDM-5 и NDM-7 вариантите са с по-висока активност към карбапенеми в сравнение с NDM-1 (Rahman, 2014; Nordmann, 2014). Изолатите, носители на *bla*_{NDM} често са носители и на други детерминанти на резистентност: плазмид-медиирани Amp^C цефалоспоринази, ESBLs, други видове карбапенемази (OXA-48, VIM и KPC) и ензими, предаващи резистентност към широк спектър аминокликозиди (16S РНК метилази),

хинолони (Qnr), рифампицин (ензими, модифициращи рифампицин), хлорамфеникол и към сулфаметоксазол (Johnson, 2013.) Поради тази причина много от щамовете производители на NDM-1 остават чувствителни само на colistin, fosfomycin и tygecycline (Cornaglia, 2011; Nordmann, 2014). Основният резервоар на NDM-продуциращи *Enterobacteriaceae* е индийският субконтинент (Пакистан, Индия и ШриЛанка) (Nordmann, 2011b), като честотата на носителството е между 5% и 15% за тази част на света (Day, 2013). Значително разпространение на NDM продуценти е установено в Обединеното кралство, което има близки отношения с Индия и Пакистан (Kumarasamy, 2010), но производители на NDM сред *Enterobacteriaceae* са докладвани в почти целия свят - Азия, Африка, Австралия, Северна и Южна Америка и Европа (Berrazeg, 2014; Nordmann, 2014). Други установени вторични резервоари са балканските държави, арабския полуостров и страни от Северна Африка. (Halaby, 2012; Zowaw, 2013; Dortet, 2014; Markovska, 2015; Todorova, 2016; Kostyanev, 2016; Savov, 2018). В краткосрочно проучване от Саудитска Арабия, *bla*_{NDM-1} носители се установяват в 33% от карбапенем-нечувствителните *Klebsiella pneumoniae* (Al-Agamy, 2017). Също страните с по-висок процент на индийци и пакистанци като Канада, САЩ, Великобритания, Ирландия, Южна Африка, Саудитска Арабия, страни от Персийския залив и Австралия, представляват вторични резервоари на производители на NDM (Nordmann, 2014). От всички NDM-продуциращи ентеробактериални видове, *K. pneumoniae* е основен причинител на нозокомиални инфекции, а *Escherichia coli* – на придобити в обществото инфекции. По тази причина огнища от NDM-продуциращи *K. pneumoniae* ще бъдат все по-често докладвани в световен мащаб (Nordmann, 2014). Карбапенемаза продуциращи *Enterobacteriaceae* включително и *K. pneumoniae* са изолирани в различни части на света от различни селскостопански животни, месо и домашни любимци, като са доказани следните гени: *bla*_{NDM} в Египет в пилешко месо, *bla*_{NDM-5} в Китай при крави (Abdallah, 2015; He, 2017). Като цяло, продуцентите на NDM и OXA-48 са както сред болнични, така и сред извънболнични изолати (Nordmann, 2014). В допълнение, MBL гените (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} и *bla*_{NDM}) се намират в различни типове плазмиди (напр. IncA/C, IncN) с широк кръг от гостоприемници с различни генетични характеристики. *Bla*_{IMP} и *bla*_{VIM} обикновено са локализиращи в клас 1 интегрони, а *bla*_{NDM} гените се асоциират и с инсерционни последователности (ISAba1) (Nordmann, 2011b; Pitout, 2015).

В научната литература има описани и други придобити MBLs като например SPM-1, SIM-1, DIM-1, TMB-1 и AIM-1, открити в *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp., но не и в представители на *Enterobacteriaceae* (Nordmann, 2014).

Клас C β-лактамази

Тези ензими принадлежат към група 1 според класификацията на Bush. Клас С ензимите не се инхибират от clavulanic acid или EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), а спектърът им на хидролитична активност включва аминок- и уреидопеницилините, тясноспектърните цефалоспорини и цефамицините. Докато фенотипните методи за детекция на ESBL са известни и установени от CLSI и EUCAST и се използват повсеместно в ежедневната лабораторна практика и са лесни за изпълнение и интерпретация: двойно-дисковият синергичен тест (ДДСТ) и комбинираният дисков тест (КДТ), то относно хромозомно-кодираните Amp C β-лактамази няма препоръчителни указания за детекция. В EUCAST 2013 има описани методи за установяване на плазмидно-кодираните AmpC β-лактамази. Тези методи обаче са доста трудоемки, без обаче да са високо чувствителни и специфични. При доста изолати, едновременното присъствие на AmpC и ESBL би затруднило детекцията на последните с фенотипни методи, поради маскиране на феномена на синергизъм от AmpC бета-лактамазата.

Много бактериални видове експресират хромозомно детерминирани AmpC β-лактамази: *Mycobacterium smegmatis*, *Ochrobactrum anthropi*, някои видове *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и др. При *Klebsiella pneumoniae* липсват хромозомно-кодираните *bla*_{AmpC}. Плазмид-кодираните AmpC ензими са познати още от 1989г. Доказани са в нозокомиални и извънболнични изолати, най-вече ентеробактерии. Известните са следните семейства плазмидни AmpC: CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX, DNA. Различни видове от сем. *Enterobacteriaceae* (*H. alvei*, *S. marcescens*, *C. freundii* и др.) са вероятни прогенитори на плазмид-детерминирани ензими (Jacoby, 2009; Padmini, 2017). В последното десетилетие на миналия век са направени съобщения за 50 различни *bla*_{AmpC}, сред които 20 плазмид-медираните (Barlow, 2002). Подобно на хромозомно-кодираните AmpC β-лактамази, плазмид-медираните ензими придават устойчивост към широк спектър β-лактами, включващи пеницилини, окси-имино-цефалоспорини, цефамицини и понякога aztreonam. Чувствителността към сефериме, сефтриаме и карбапенеми е слабо повлияна или незасегната (Jacoby, 2009).

Проучване в детска болница в Пакистан върху разпространението на AmpC β-лактамаза-продуциращи бактерии при неонатален сепсис, доказва, че сред Грам-отрицателните изолати AmpC продуцентите съставляват 22%. Разпределението по видове показва, че *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca* заемат четвърто и пето място с 5.7% и 2.8% съответно, след *Enterobacter cloacae* (56.7%), *E. sakazakii* (14.2%) и *E. coli* (9.9%) (Salamat, 2016). Luk и кол провеждат ретроспективно проучване на пациенти с бактериемия причинена от *Klebsiella pneumoniae* в три регионални болници в Хонг Конг и установяват присъствие на плазмидна AmpC β-лактамаза от DNA-тип самостоятелно и в комбинация с

ESBL в 41% от изолатите (Luk, 2016). В Корея съобщават за случаи на инфекции, причинени от ESBL продуциращи *K. pneumoniae* серотип K1 - ST тип 23. Изолатите демонстрират резистентност към cefotaxime, ceftazidime и piperacillin/tazobactam. В два от изолатите е идентифициран и *bla*_{DHA-1} гена (Cheong, 2016).

Унгария е първата европейска страна, в която се съобщава за ендемично разпространение на *bla*_{DHA-1}, улеснено от международния високорисков клон *K. pneumoniae* ST11. За периода от декември 2009 до декември 2013 г. са потвърдени 312 последователни клинични изолати *K. pneumoniae*, продуциращи DHA-1 бета-лактамаза и демонстриращи резистентност към трето поколение цефалоспорици, аминогликозиди и флуорохинолони. В 77% от изолатите е доказана нечувствителност към поне един карбапенем. В това проучване 90% от изолатите ко-експресират *bla*_{DHA-1} и *bla*_{CTX-M-15} (Kis, 2016).

В научната литература има множество съобщения за разпространението на гени, кодиращи β -лактамази в изолати от хора и животни. Някои проучвания сравняват молекулните характеристики на ESBL / AmpC гени, плазмиди или клонове между животински и човешки източници (Day, 2016; Kluytmans, 2013). Използването на антибиотиците при животните и хората е основен селективен фактор, отговорен за нарастващия процент на разпространение на ESBL / AmpCs, както и международната търговия със селскостопански животни и техни продукти (Madec, 2017). Сред AmpC ензимите, CMY-2 е преобладаващият в животинския сектор, предимно в домашни птици (Dierikx, 2013; Nilsson, 2014), а DHA-продуциращият клон ST11 *K. pneumoniae* е най-често срещан във ветеринарни изолати (Wohlwend, 2015).

Клас D β -лактамази

Бета-лактамазите от клас D се означават като оксацилинази, което съответства на техния хидролитичен спектър: хидролизират по-добре oxacillin, methicillin и cloxacillin, отколкото benzylpenicillin и тяхната активност се инхибира от NaCl, но не и от clavulanic acid. Към клас D β -лактамазите се отнасят и оксацилинази с карбапенемазна активност. Тези ензими се характеризират с относително слаба активност, като по-голямата част от тях водят само до намалена чувствителност към тази група антибиотици.

Понастоящем са известни множество варианти на OXA-типа бета-лактамази (около 200 ензима), някои, от които с тесен спектър на действие, а други широкоспектрни. Еволюцията на ESBL типа OXA β -лактамази е от ензими с по-тесен спектър, като са налице редица сходства с развитието на ензимите от типовете SHV и TEM ESBLs (Shaikh, 2015). Клас D β -лактамази хидролизират карбапенеми се означават като CHDL (Carbapenem-hydrolysing Class D β -lactamases). Клас D β -лактамази, сега включват повече от 400 ензима,

сред които само някои варианти действително притежават карбапенемазна активност. С изключение на редките ОХА ензими (като например ОХА-163), CHDL не хидролизират или много слабо хидролизират широкоспектърни цефалоспорини. Всички CHDL имат слаба карбапенемазна активност, която не придава високо ниво на устойчивост към карбапенемите, ако не е свързана с други фактори, като нарушения в проникваемостта на външната мембрана на бактериалната клетка (Poirel, 2010; Nordmann, 2014). *bla_{CHDL}* се доказват като в хромозомата, така и локализиращи върху плазмиди (Diene, 2014).

Въпреки че повечето CHDL варианти са идентифицирани в *Acinetobacter*, ОХА-48 и неговите производни са идентифицирани в изолати от семейство *Enterobacteriaceae* (Poirel, 2012b). Първият идентифициран производител на ОХА-48 е изолат *K. pneumoniae*, установен в Турция през 2003г. (Poirel, 2004). Продуценти на ОХА-48 карбапенемаза в Турция често са докладвани само като причинители на нозокомиални инфекции (Aktaş, 2008). Понастоящем изолати, продуциращи ОХА-48 са широко разпространени в много европейските държави, в страни от Северна Африка (Мароко, Алжир, Либия), в повечето страни от Средиземноморския регион, в Близкия Изток (Ливан, Оман, Саудитска Арабия, Кувейт), Индия и Южна Африка (Poirel, 2012b; Hays, 2012; Kocsis, 2013; Dortet, 2012a; Shibl, 2013; Brink, 2013; Singh, 2016; Potron, 2011a). *K. pneumoniae*, продуценти на ОХА-48 доказани в Израелска болница се асоциират с медицински туризъм, тъй като са изолирани от пациенти, трансферирани от Грузия и Йордания (Adler, 2011b). ОХА-48 все още се смята за рядко срещаща се карбапенемаза в Северна и Южна Америка, но вече има съобщения за появата на ОХА-48 продуциращи *K. pneumoniae* и в САЩ (Lascols, 2013; Nordmann, 2014).

Вътреболнични взривове, асоциирани с ОХА-48-продуциращи *K. pneumoniae*, *E. coli* и *E. cloacae* са докладвани в много страни, сред които Франция, Германия, Швейцария, Испания, Холандия и Великобритания. Един от основните фактори за поддържане на успешното разпространение на *bla_{ОХА-48}* гена сред различни ентеробактериални видове е високата ефективност на трансфера на този ген от IncL/M тип плазмид, върху който е локализиран (Poirel, 2012a). Това е конюгативен плазмид, който се счита за епидемичен и конюгира с много висока честота към всеки ентеробактериален вид (Potron, 2014; Nordmann, 2014).

Произведен на ОХА-48 в резултат на точкова мутация, е ОХА-181 карбапенемазата, която има същите хидролитични свойства и е идентифицирана в ентеробактериални изолати от Индия и в пациенти с връзка с индийския субконтинент (Potron, 2011b). *bla_{ОХА-181}* генът е доказан в различни страни, като Франция, Великобритания, Норвегия, Румъния, Оман, Канада, Австралия, Нова Зеландия, Сингапур и Шри Ланка, като системно се установява връзка с Индия. (Poirel, 2012b; Brink, 2013; Samuelsen, 2013; Nordmann, 2014).

Друга карбапенемаза е ОХА-204, идентифицирана в изолати *K. pneumoniae*, получени от пациенти, идващи от Алжир или Тунис. Тази бета-лактамаза има две аминокиселинни замествания разлика в сравнение с ОХА-48 и субстратният профил е много подобен на този на ОХА-48 (Potron, 2013a; Potron, 2013b; Nordmann, 2014).

ОХА-232 е идентифициран в изолати *K. pneumoniae* във Франция от пациенти, които са били прехвърлени от Мавриций или Индия (Potron, 2013b). Той има пет аминокиселинни замествания разлика в сравнение с ОХА-48 и е само точков мутант на ОХА-181. Този ензим притежава по-слаба хидролитична активност спрямо карбапенеми в сравнение с ОХА-48. Доказан в ко-продукция с NDM-1 в карбапенем-резистентен изолат *K. pneumoniae*, получен от пациент в САЩ, който преди това е пребивавал в Индия (Doi, 2014; Nordmann, 2014). През 2016г. в Италия е идентифициран NDM-1 и ОХА-232 продуциращ изолат *K. pneumoniae* от кръв и урина на хоспитализиран пациент, който не е имал пътувания в чужбина (Avolio, 2017).

Друг ензим, подобен на ОХА-48, е ОХА-163, идентифициран в ентеробактериални изолати от Аржентина (Poirel, 2011a; Poirel, 2012b). Карбапенемазната му активност е пониска от тази на ОХА-48, но неговия субстратен профил включва широкоспектърните цефалоспорини и активността му частично се инхибира от клавулановата киселина. По този начин изолатът, носител на *bla*_{ОХА-163} има фенотип на резистентност много подобен на този на ESBL продуцентите. ОХА-163 първоначално е идентифициран в изолати *E. cloacae* и *K. pneumoniae* в Аржентина, а след това и в Египет (Poirel, 2011a; Abdelaziz, 2012). Други проучвания показват, че в Аржентина често се идентифицират изолати, представители на семейство *Enterobacteriaceae*, продуценти на ОХА-163 и ОХА-247 (Gomez, 2013; Nordmann, 2014).

Методи за идентификация на продуцентите на карбапенемази

Бързата идентификация на карбапенемаза продуциращи изолати е от изключително значение за адекватна антибактериална терапия. Съществуват различни фенотипни тестове, но нито един не е достатъчно сигурен, тъй като се получават както фалшиво положителни, така и фалшиво отрицателни резултати. В диагностичната практика често се използват индикаторни антибиотици - **meropenem**, **ertapenem**, а за бактерии продуциращи карбапенемази от ОХА-48 тип – **temocillin** (Hrabak, 2014). Приложение намират и скриниращи среди като CHROMagar-KPC, chromID CARBA (Adler, 2011a; Vrioni, 2012). Тези среди обаче се оказват неподходящи за детекция на ОХА-48 продуценти, за които Модифицираният тест Hodge е лесен за изпълнение и евтин метод, но с висока честота на фалшиво отрицателни резултати, особено в карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae*, продуциращи ESBLs (например CTX-M тип) или AmpC бета-лактамази в комбинация с

поринов дефицит (Carvalhoes, 2010; Seah, 2011; Hrabak, 2014). Модифицираният тест Hodge е добър за откриване на серин активни карбапенемази и често дава фалшиво отрицателни или съвсем слабо положителен резултат при металобета-лактамазите

Други методи за детекция на карбапенемази се базират на инхибиране активността на ензима от хелаторните агенти (EDTA, дипиколинова киселина (DPA), тиолови съединения, комбинация от хелатори (EDTA + 2-меркаптопропионова киселина). Най-често се използва синергизма между MBL инхибитори (EDTA) и окси-имино-цефалоспорин или карбапенем (Yong, 2002; Kim, 2007; Hrabak, 2014). Сред най-широко използваните са двойно-дисковия синергистичен тест (DDST) и комбинирания дисков тест (CDT). При DDST се използва диск с бета-лактам антибиотик, поставен до диск с MBL инхибитор (най-често EDTA) (Miriagou, 2010; Hrabak, 2014; Girlich, 2013). За първоначално охарактеризиране на MBLs се използват E-тест ленти натоварени с imipenem и imipenem плюс EDTA или meropenem и meropenem плюс EDTA (Miriagou, 2010; Girlich, 2013). Детекцията на KPC се базира на феномена на инхибиране на ензима от борониева киселина (Pasteran, 2008).

В случаите на ко-продукция на KPCs и MBLs (напр. VIM) могат да се получат фалшиво отрицателни резултати и да се компрометират тестовете с хелатори и борониева к-на (Giakkoupi, 2009; Hrabak, 2014; Giakkoupi, 2008; Papagiannitsis, 2012; Steinmann, 2011; Wang, 2012; Perilli, 2013).

За фенотипното разграничаване на MBLs от клас А карбапенемази се използват четири антибиотични диска, натоварени съответно с meropenem, meropenem плюс фенолборониева киселина (PBA), meropenem плюс EDTA и meropenem плюс PBA и EDTA (Tsakris, 2010; Hrabak, 2014; Stoeva, 2016). Съществуващите фенотипни тестовете за детекция не са подходящи за идентифицирането на изолати, произвеждащи клас D OXA-карбапенемази. Високото ниво на резистентност към temocillin (MICs > 64 mg / L) и piperacillin/tazobactam при представители на сем. *Enterobacteriaceae*, намалена чувствителност или резистентност към поне един карбапенем може да бъде показател за производството на OXA-48 (Glupczynski, 2012). Категоричното потвърждаване на карбапенем-резистентни изолати изисква молекулярно генетични тестове за идентификация на съответните гени за резистентност (Hrabak, 2014).

В практиката се използват и директни колориметрични методи за откриване на карбапенемазна активност, базирани на индикатор (фенол-рот) за откриване на карбапенемази в изолати от семейство *Enterobacteriaceae* и *P. aeruginosa*. Пример за такъв тест е Carba NP теста (Dortet, 2012b). Той е надежден метод за откриване на клас А, В и D карбапенемази (Hrabak, 2014). През 2011 г. са публикувани и първите резултати от приложението на методи за откриване на карбапенемазна активност, почиващи на

използването на MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) (Hrabak, 2014).

За прецизната идентификация на карбапенемазните гени се разчита на молекулярно-генетичните техники - PCR (вкл. Real Time PCR) с последващо секвениране на гена (Nordmann, 2011a). Редица автори разработват мултиплексен PCR метод за едновременно откриване на гени, кодиращи бета-лактамази от различни семейства (VIM, IMP, SPM, GIM, SIM, KPC, NDM-1, OXA-48, DIM-1, BIC-1, AIM-1 и др.) (Ellington, 2007; Poirel, 2011b; Dallenne, 2010; Voets, 2011; Endimiani, 2010; Hrabak, 2014; Bisiklis, 2007; Chen L, 2011; Chen L, 2012; Monteiro, 2012; Ulyashova, 2010; Naas, 2011; Bogaerts, 2011).

2.4.2. Резистентност към бета-лактами поради нарушени пермеабилитетни функции на външната мембрана.

Резистентността към карбапенеми и цефалоспорини се обуславя не само от продукцията на съответните бета-лактамази, а и от промени в пермеабилитетните функции на външната мембрана. Порините представляват структури с протеинов състав, намиращи се във външната мембрана при Грам-отрицателните бактерии и образуващи трансмембранни пори. Всяко намаляване в броя, или пълната липса на експресията им, може да доведе до развитие на резистентност към някои антибактериални средства (Martínez-Martínez, 2008). В *K. pneumoniae* са описани два главни порина OmpK35 и OmpK36, които са хомолози съответно на Omp F и Omp C. Някои автори съобщават, че ESBL- продуциращите щамове *K. pneumoniae* по-често експресират само OmpK36, докато щамове, при които липсват ESBL ензими, притежават и двата вида порини (Hernandez-Alles, 1999). Описани са случаи на резистентност към imipenem (MIC 8 mg/L) и meropenem (MIC 16 mg/L) в клиничен изолат *K. pneumoniae* продуциращ SHV-2, с липсващ OmpK35 и редуциран OmpK36 (Crowley, 2002). Понижената експресия на OmpK35 и OmpK36 (OmpC-like), едновременно с наличието на AmpC или ESBL, води до увеличаване на МПК за ertapenem в клиничен щам *K. pneumoniae* (Martínez-Martínez, 2008). Загубата на OmpK35 и OmpK36 в ESBL - продуциращи *K. pneumoniae* се асоциира с резистентност към ceftazidime, увеличава резистентността към широко-спектърни цефалоспорини и намалява чувствителността към карбапенеми и флуорохинолони (Martínez-Martínez, 2008).

2.4.3. Резистентност към флуорохинолони

Ефективността и широкият спектър на действие на флуорохинолоните, са направили този антибактериален клас един от най-широко използваните, както в хуманната така и във

ветеринарната практика. Тази широка употреба обаче допринася за бързата поява на резистентност към тези антибиотици в световен мащаб.

По данни на EARS NET за 2015г. процентът на хинолон-резистентните инвазивни изолати *K. pneumoniae* в Европейския Съюз показва тенденция да се увеличава за периода 2012 - 2015 от 25.3% през 2012г. до 29.7% през 2015г. В допълнение, отбелязва се характерен градиент от север на юг, с по-ниски проценти на резистентност в *K. pneumoniae* съобщени от северните страни и по-високи за източните и южните части на Европа. Процентът на хинолонова резистентност през 2015г. варира от 2.9% за Исландия до 70% за Словакия. Мястото на България в този период е в диапазона между 37.5% и 50.3% резистентност към хинолони, което е доста по-високо от средното ниво за Европа.

<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf>

Известни са следните механизми на резистентност към флуорхинолони: (Hooper, 1999; Hooper, 2001; Aldred, 2014; Correia, 2017)

I. Хромозомен тип резистентност към флуорхинолони

1. Промяна в таргетните ензими, свързана с мутации в QRDR (Quinolone-Resistance Determining Regions) на гените кодиращи гиразата и топоизомераза IV

2. Намалено вътреклетъчно натрупване на антимикробното лекарство - редукция в лекарствения инфлукс

- Алтерация на външно мембранни протеини
- Редукция на основни порини

3. Увеличено излизане от клетката на антимикробното лекарство средство (увеличена експресия на ефлуксни помпи)

II. Плазмидно-медирана хинолонова резистентност (PMQR)

1. синтез на протеин, който се свързва и защитава таргетните ензими

2. синтез на ензим, който ацетитира хинолона

3. увеличена експресия на ефлуксни помпи (QepAB, OqxAB)

2.4.3.1. Хромозомен тип резистентност към флуорхинолони

Хромозомните мутации се свързват с мутации предимно в *gyrA* гена, но също и в *gyrB* гена, кодиращи ензима ДНК гираза. Подобни мутации се установяват и в гените, кодиращи топоизомераза IV - *parC* и *parE*. Така например за *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* първото стъпало за селектиране на резистентност към флуорхинолоните се свързва

с мутации в *gyrA* и *gyrB* гените. За много Грам-положителни бактерии ДНК-гиразата е вторичен таргет на хинолоните. Те придобиват резистентност чрез мутации в *parC* или *parE* гените. При *S. aureus* топоизомераза IV е по-чувствителна в сравнение с ДНК гиразата и е първото стъпало на хинолонова резистентност е в *parC* и *parE* гените (Hooper, 1999; Aldred, 2014). В изолати *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* и *Mycoplasma hominis* заедно с промени в *parC* или *parE* гените се доказват и промени *gyrA* гена, като тези мутации се свързват с високо ниво на резистентност (Hooper, 1999). При *E. coli* мутациите в *parC* или *parE* имат вторична роля. *ParC* мутации се откриват в клинични изолати *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* с високо ниво на резистентност към хинолони (Hooper, 1999). Установено е, че селектирането на по-високи нива на хинолонова резистентност обикновено се получава в щамове с мутации, засягащи и двата ензима (Aldred, 2014). В литературата са описани основните мутации в гените на ДНК гираза (*gyrA*) и топоизомераза IV (*parC*) в клинично значими *Klebsiella pneumoniae* (Correia, 2017).

за *gyrA*: Asp87Ala/Asn/Gln/Glu/Gly/His/Tyr

Ser80Ile

Ser83Ile/Leu/Phe/Tyr

Ser88Ile/Phe/Tyr

за *parC*: Ser80Arg/Ile/Met

Glu84Gly/Val

Yingmei и кол. проучват връзката между различните модели на *gyrA* мутации с различни нива на резистентност към ciprofloxacin и levofloxacin в изолати *K. pneumoniae* и *E. coli*. Авторите установяват корелация между хинолоновата резистентност и конкретния тип мутация. *GyrA* мутации се откриват както в чувствителни така и в резистентни изолати. За изолати с QRDR-мутации степените на резистентност към ciprofloxacin и levofloxacin са различни. Сред общо 14 модела на мутации в *GyrA* при 327 изолата *K. pneumoniae* и *E. coli*, две единични мутации (Ser83Tyr и Ser83Ile) и три двойни мутации (Ser83Leu + Asp87Asn, Ser83Leu + Asp87Tyr и Ser83Phe + Asp87Asn) са свързани както с ципрофлоксацинова, така и с левофлоксацинова резистентност. Две единични мутации (Ser83Phe и Ser83Leu) в *GyrA* са свързани с резистентност към ciprofloxacin, но не и с levofloxacin. Резултатите показват, че за проучваните изолати *K. pneumoniae* и *E. coli* резистентността към ciprofloxacin е по-висока от тази към levofloxacin, като Ser83Leu + Asp87Asn замените могат да предизвикат разликата в резистентността към двата хинолона (Fu Y, 2013).

Лекарственото навлизане в Грам отрицателните бактерии се улеснява от протеинови канали - порини (Fernández, 2012). Редуцирането или загубата на експресия на порини като OmpF, OmpC, OmpD и OmpA може да доведе до повишена антибиотична резистентност към хинолони и други агенти. В допълнение, свръхекспресията на OmpX, свързан с експресията на порини, води до понижена продукция на OmpC, OmpD, OmpF, LamB и Tsx порини, в резултат на което се повишава резистентност към различни антибиотици, включително хинолони. Така например OmpK35 и OmpK36 и вариациите в тяхната експресия при *Klebsiella pneumoniae* са свързани директно с резистентност към цефалоспорини, карбапенеми, хинолони и chloramphenicol (Fernández, 2012; Correia, 2017).

Често резистентността се свързва с активно извеждане на антимикробните агенти извън клетката чрез действието на ефлуксни помпи (Köhler & Pechere, 1998). Ефлуксът като механизъм на антибиотична резистентност е съобщен за първи път през 1980г. за tetracycline (Ball, 1980; McMury, 1980). Оттогава са проучени и секвенирани детерминанти на ефлукс-медирана резистентност към множество антимикробни агенти, включително флуорхинолоните, в различни бактериални видове (Paulsen, 1996). Бактериалните антимикробни ефлуксни транспортери са групирани в четири семейства, главно въз основа на аминокиселинната последователност: MFS, ABC, RND, и SMR (Stephanie, 1998; Hendrik W, 1998; Nikaido, 1998; Saier, 1994). По-късно е идентифицирано и пето семейство MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion). Антибиотичните ефлуксни помпи попадат в RND, MFS или MATE. Транспортери от RND семейството са уникални за Грам-отрицателни бактерии и обикновено работят заедно с периплазмен мембрано свързващ протеин (MFP) (Saier, 1994). Най-специфичната черта на RND-MFP-OEP MDR ефлуксни системи на Грам-отрицателни бактерии е тяхната изключително широка субстратна специфичност, обхващаща различни антимикробни агенти, включително клинично значими антибиотици, оцветители, детергенти, дезинфектанти, антимикробни пептиди, органични разтворители, инхибитори на мастно киселинния синтез и хомосеринови лактони, участващи в бактериална сигнализация от клетка на клетка (Poole, 2000). Преобладаващата ефлуксна система за флуорхинолони при *E.coli* е AcrAB-TolC (Sun J, 2014; Poole, 2000). За *K. pneumoniae* е характерна AcrAB ефлуксна помпа от RND и KmrA, KdeA ефлуксни помпи от MFS семейството (Mazzariol, 2002; Correia, 2017; Fàbrega, 2009). Експресия на AcrAB се регулира главно от AcrR, продукт на репресорен ген намиращ се в непосредствена близост до ефлукс гените (Sun J, 2014) и MarA, положителен регулатор, кодиран от гена *MarA* на marRAB оперона (множествена антибиотична резистентност (MAR) фенотип). *MarA* хомолози са идентифицирани в няколко бактериални вида: *Klebsiella* spp., *Salmonella Typhimurium* *Shigella* spp., *C. freundii*, *Hafnia alvei* и *Enterobacter* spp. (Elkins, 2003; Lomovskaya, 2006;

Cohen, 1993; Correia, 2017). Например в скринингово проучване на 52 изолата *K. pneumoniae* от пациенти с изгаряния в болница в Техеран, в 40 изолата с резистентност към ciprofloxacin, tetracycline, ceftazidime и gentamicin е установена свръхекспресия на ефлуксната AcrAB помпа (Pakzad, 2013).

ОqxAB ефлуксната помпа принадлежи към RND семейството. Гените, кодиращи тази помпа са хромозомно локализирани в *K. pneumoniae* и широко разпространени в клиничните изолати (Norman, 2008). Известно е, че ОqxAB гените могат да бъдат разположени в някои представители на семейство *Enterobacteriaceae* и върху конюгативни плазмиди (pOLA52) (Guillard, 2015).

2.4.3.2. Плазмид-медирана хинолонова резистентност (PMQR)

Първоначалната идея, че флуорхинолоновата резистентност се дължи само на хромозомни мутации в гените на таргетните ензими ДНК-гирази и мутации в гените, асоциирани с експресията на ефлуксните ендогенни помпи, се опровергава в началото на 90-те години на 20 век, когато е описан първият клиничен щам *K. pneumoniae* с плазмид-медирана резистентност към тази антибиотична група (Jacoby, 2005). През 1994 г. за първи път е доказан гена *qnr* в клинични изолати *E.coli* от Шанхай, регион, който се характеризира с високо ниво на резистентност към ciprofloxacin (Jacoby, 2005). И други автори докладват за плазмид-кодиран механизъм на хинолонова резистентност, който се свързва с протекция на ДНК гиразата от протеин от семейството на т.нар. PRP (pentapeptide repeat proteins), означен като *qnr* (Tran, 2002). Смята се, че *qnr* гените са придобити от хромозомни гени на някои водни бактерии, асоциират се с мобилни и транспонируеми елементи върху плазмиди и често са включени в *sul I* тип интегрони (Jacoby, 2008). Qnr протеинът се свързва към таргетните ензими ДНК-гираза и топоизомераза IV и ги защитава от инхибиращото действие на ciprofloxacin (Jacoby, 2005; Guan, 2013; Correia, 2017). Сега са известни различни *qnr* детерминанти с техните варианти: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrVC* (Robicsek, 2006; Jacoby, 2008; (Correia, 2017). Още в началото на новото хилядолетие някои автори съобщават за изолати *E. coli* и *K. pneumoniae* с хинолонова резистентност свързана с *qnr* гена (Wang M, 2004). Плазмиди, носещи *qnr*-гени са открити в изолати от САЩ, Европа и Източна Азия. Въпреки че *qnr* предизвиква само ниско ниво на резистентност към хинолони, неговото присъствие улеснява селекцията на мутанти с по-високо ниво резистентност, като по този начин допринася за нарастване на резистентността към хинолони (Jacoby, 2005). Тревожен е фактът, че *qnr* гени се откриват както и в ciprofloxacin - чувствителни, така и в ciprofloxacin-резистентни изолати тяхното присъствие се асоциира с по-високо ниво на резистентност, поради възникване на хромозомни мутации. В допълнение, присъствието на *qnr* гени в

клинично значими видове Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии може да доведе до развитие на резистентност в хода на лечението с хинолонов препарат (Dalhoff, 2012).

Вторият плазмид-медиран механизъм е свързан с модифициране на хинолоните от ензим - ацетилтрансфераза, бифункционален вариант на аминогликозидната ацетилтрансфераза AAC(6')-Ib-cr, който съдържа две специфични аминокиселинни замествания, Trp102Arg и Asp179Tyr. Този вариант е в състояние да ацетилира незаместения азот на C7 пиперазиновия пръстен, който се намира в хинолони като ciprofloxacin. По този начин се постига устойчивост към препарата чрез намаляване на неговата активност (Robicsek, 2006; Jacoby, 2008; Rodríguez-Martínez, 2016; Correia, 2017).

Третият плазмид-медиран механизъм на хинолонова резистентност се осъществява чрез активен ефлукс на хинолоните от ефлуксните помпи QepAB и OqxAB, (Jacoby, 2008 Aldred, 2014). QepA принадлежи към семейството MFS и води до понижена чувствителност към ciprofloxacin, norfloxacin и enrofloxacin. OqxAB принадлежи към RND групата и има широка субстратна специфичност, особено при неговата свръхекспресия, освен хинолоните ciprofloxacin, norfloxacin, nalidix acid, olaquinox и flumequin, изолатите са резистентни и на tetracycline, chloramphenicol и trimethoprim, както и някои биоцидни препарати като бензалкониев хлорид или триклозан (Correia, 2017).

Въпреки че трите механизма на PMQR причиняват само ниско ниво на устойчивост към хинолони, те могат да допълват други механизми на хромозомна резистентност, като по този начин се достига ниво на клинично значима резистентност и се улеснява селектирането на резистентност от по-високо ниво (Rodríguez-Martínez, 2016). Освен това в присъствието на терапевтични нива на хинолони, PMQR осигурява благоприятен фон за селекция на допълнителни механизми на резистентност и следователно за появата на високи нива на хинолонова резистентност (Correia, 2017). PMQR гени са открити в транспозони и / или интегрони, които често се намират съвместно с други детерминанти на резистентност (често гени за ESBLs, AmpC β -лактамаза и карбапенемази) в MDR плазмиди (Correia, 2017).

В научната литература има редица съобщения за хинолон резистентни изолати от семейство *Enterobacteriaceae*, в които се доказват комбинации от два плазмидни механизма на резистентност към хинолони. Например през 2008г. Yan Jiang и кол. характеризират разпространението на плазмид-медирана хинолонова резистентност и установяват детерминантите *qnrA*, *B* и *S* тип, както и *aac(6')-Ib-cr* в ESBL продуциращи *E. coli* и *K. pneumoniae* (Jang, 2008). В проучване от Япония в периода 2008 - 2011г. също в изолати *K. pneumoniae* и *E. coli* са идентифицирани гените *qnrB*, *qnrS*, и *aac(6')-Ib-cr* (Okade, 2014). В

Иран при проведен скрининг на резистентни на флуорохинолони клинични изолати са установени *qnrS*, *qnrB*, и *aac(6')-Ib-cr* (Majlesi, 2016). В проучване от Индия, Nivedita и кол. в периода 2013-2014г. изследват 209 изолата от семейство *Enterobacteriaceae* и установяват, че в 51% от случаите хинолоновата резистентност се дължи на PMQR гени, сред които най-разпространени са *qnrD* и *aac(6')-Ib-cr* (Dasgupta, 2017).

2.4.4. Резистентност към colistin

Семейството на полимиксините е изградено от 5 химични класа. За целите на медицината като терапевтични средства се използват само 2 вещества: polymixin B (изолиран от *Bacillus polymixa*, 1947г.) и polymixin E или colistin (изолиран от *Bacillus polymixa*, var. *colistinus*, 1950г.) (Li J, 2005a.; Landman D, 2008). Colistin се използва в хуманната медицина от 1950г. за лечение на Грам отрицателни бактериални инфекции, но постепенно е изоставен заради нефротоксичност и изместен от нови антибиотици с подобно действие без токсичност – втора и трета генерация цефалоспорици. Въпреки това colistin запазва своите индикации за лечение на пациенти с кистична фиброза и за деконтаминация на храносмилателния тракт на хоспитализирани пациенти в интензивни отделения (Mezghani, 2012).

В последните години на миналия век появата на множествено-резистентни Грам отрицателни бактерии, заедно с липсата на нови антибиотични молекули, води до подновяване интереса към тези стари антибиотици и преразглеждане на colistin като терапевтична алтернатива при пациенти в критично състояние (Landman, 2008; Li J, 2005a). Понастоящем този препарат се използва предимно за лечение на нозокомиални MDR Грам-отрицателни бактериални инфекции и специално срещу карбапенем - резистентни *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* като средство на последен избор, както и за лечение на инфекции с MDR бактерии при пациенти с кистична фиброза (Ozsurekci, 2016; Mezghani, 2012). Страничните ефекти са свързани с нефро- и невротоксичност с честота между 7 - 27%, както и риск от невро-мускулни блокади. Доста проучвания са показали по-ниска честота на тези токсични ефекти, които са дозо-зависими, кумулативни и обратими (Landman, 2008). Polymixin B sulfate се употребява в лекарствени форми за локално приложение – ушни, очни, кожни препарати, вагинални песари и парентерално. Polymixin E (Colistin) се предлага като две соли: сулфат – за локални и орални препарати и метансулфонат наречен colistimethat – за парентерално приложение. Полимиксините се предлагат и като аерозолни препарати за инхалиране при лечение на инфекции предизвикани от *P. aeruginosa* в пациенти с муковисцидоза. Polymixin B sulfate е по-активен и свързаните с него токсични ефекти са

близки до тези на colistin (Landman, 2008; Li J, 2005a). Освен в хуманната медицина, colistin има широка употреба в животновъдството и ветеринарната медицина за лечение на гастроинтестинални инфекции, причинени от представители на семейство *Enterobacteriaceae* (Rhouma, 2016). Ето защо, поради увеличеното използване на colistin в последните години, в световен мащаб се докладва появата на colistin-резистентни *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., и представители на семейство *Enterobacteriaceae*. Механизмът на действие на полимиксините е уникален. Те са вещества подобни на детергентите, с висок афинитет към бактериалните мембрани. Пенетрацията на антибиотика в клетката става чрез образуване на пори, които нарушават интегритета на цитоплазмената мембрана, нарушава се пропускливостта на клетъчната мембрана, което води до разрушаване на осмотичната бариера, изтичане на есенциални цитоплазмени компоненти и освобождаване на литични ензими (Bergen, 2012).

Полимиксините имат тесен антибактериален спектър, който включва множество Грам-отрицателни бактерии, вкл. *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertusis*, *Pasteurella multocida*. В ниски дози са бактериостатични, а във високи дози – бактерицидни. Някои чревни бактерии имат вродена резистентност: *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Edwardsiella tarda*. Други като *Aeromonas hydrophila* имат индуцибелна резистентност, докато *Burkholderia cepacia*, *B. pseudomallei* и 30-40% от изолатите *Stenotrophomonas maltophilia* са с естествена резистентност. С вродена резистентност са също *Neisseria* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Brucella* spp. Грам-положителните бактерии, включително микобактериите притежават вродена резистентност към полимиксини (Li J, 2005a.).

2.4.4.1. Механизми на резистентност към colistin

Увеличаването на употребата на colistin за лечение на инфекции с MDR Грам-отрицателни бактерии неизбежно води до появата на колистинова резистентност. При *Klebsiella pneumoniae* в няколко страни в света, включително и в Европа (особено Гърция), нивата на колистинова резистентност непрекъснато нарастват. Процентът на хетерорезистентност е значително висок (Ah YM, 2014; Falagas, 2008). Откриване на хетерорезистентни изолати може да се разглежда като предупреждение за съществуващ потенциал за бързо развитие на резистентност към този антибиотик и свързан с това терапевтичен неуспех (Falagas, 2008).

В основата на колистиновата резистентност стои промяна в отрицателния заряд на външната мембрана. Общият отрицателен заряд намалява чрез ковалентни модификации на липид А с 4-амино-4-деокси-L-арабиноза или фосфоетаноламин, което понижава афинитета

на Грам отрицателните бактерии към полимиксините. Така например бактериите с вродена резистентност (*Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Brucella*, *Neisseria*, *Chromobacterium* и *Burkholderia* spp.) имат по-нисък colistin свързващ афинитет поради LPS модификация (Ah YM, 2014). Естествената резистентост се дължи на налични структури на външната мембрана, които препятстват взаимодействието на полимиксините с фосфатните групи от липид А на ЛПЗ. Придобитата резистентност към colistin бива хромозомна и плазмидно медирана (Li J, 2005a).

Хромозомни механизми на резистентност

Въпреки че механизмът лежащ в основата на резистентността към colistin е ненапълно изяснен, като основна причина за възникването на colistin-резистентни *K. pneumoniae* се смята модификацията на ЛПЗ по различни пътища (Ah YM, 2014). Голяма част от тези модификации се дължат основно на хромозомни мутации. Липополизахаридът (LPS) във външната мембрана на Грам - отрицателните бактерии е изграден от три части - О-антиген, сърцевинен олигозахарид и липид А. Основно подлежи на ковалентна модификация липид А с присъединяване на 4-амино-4-деокси-L-арабиноза или фосфоетаноламин, което неутрализира нетния негативен заряд на липид А и намаляват свързването на катионните антимикуробни пептиди с бактериалната повърхност. Присъединяването на 4-амино-4-деокси-L-арабиноза води до по-силно неутрализиране на анионния заряд и от там до по-високи нива на резистентност към колистин. Вродената резистентност към полимиксини при *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Serratia*, *Edwardsiella tarda*, *Burkholderia cepacia complex* се свързва с присъединяването на 4-амино-4-деокси-L-арабиноза. Промените в липополизахарида се медираат предимно от двукомпонентни системи, които регулират експресията на гените, отговорни за химичната му модификация. Основен регулатор на гените, които модифицират химично липополизахарида при много видове бактерии като *Salmonella enterica*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Citrobacter rodentium*, *P. aeruginosa* е двукомпонентната система PmrA/PmrB. Гените, които се активират от PmrA/PmrB, могат да предизвикват химични модификации и в трите региона на LPS-молекула. Друга важна двукомпонентна система е PhoP/PhoQ която активира индиректно PmrA/PmrB (Chen & Groisman, 2013). Мутации в гените, кодиращи PhoP/PhoQ и PmrA/PmrB могат да причинят тяхната конститутивна свръхекспресия, което да доведе до последваща модификация на липополизахарида (Cannatelli, 2013; Lopez-Camacho, 2014). Друг важен механизъм на резистентност към colistin при *K. pneumoniae*, е мутация / инактивация на гена *mgrB* (Ah YM, 2014). *MgrB* представлява малък трансмембранен протеин (съставен от 47 аминокиселини), продуциран при активирането на PhoP/PhoQ система за сигнализиране и действащ като

отрицателен регулатор на тази система. Ролята на този протеин като източник на колистинова резистентност е проучена в серия от 47 щама *K. pneumoniae*, изолирани във Франция, Турция, Колумбия и Южна Африка (Poirel, 2014). Poirel и сътр. установяват следните генетични механизми на резистентност - възникването на мутации вътре в кодиращата последователност на *mgrB* гена, в промоторния регион, вероятно водещо до понижена експресия на *mgrB* гена: прекъсване на *mgrB* гена чрез различни инсерционни последователности (IS5-like, IS*Kpn13* и IS*Kpn14*); прекъсване на *mgrB* гена чрез преждевременен стоп кодон; модификация на *mgrB* генната експресия чрез вмъкване на IS10R елемент (Poirel, 2014).

В проучване от Унгария, Kocsis и колектив установяват в colistin резистентен изолат *K. pneumoniae* повишена генна експресия на *phoP* и *arn* и див тип PmrB. Във всички проучвани изолати е липсвал MCR-1 (Kocsis, 2016). Според авторите двукомпонентните регулаторни системи PmrA/PmrB и PhoP/PhoQ се асоциират с устойчивост към полимиксин В. Същите автори доказват, че инсерционното инактивиране на *mgrB* гена е свързано с колистинова резистентност, както и гените *ugd*, *eptB*, *pagL*, и *cdtA* (Kocsis, 2016).

Плазмидна резистентност към colistin

Няколко наскоро проведени изследвания идентифицират *mcr-1* ген, кодиращ плазмид-медирана резистентност към colistin в *Escherichia coli*. В този смисъл употребата на colistin като антибиотик на последен избор е сериозно застрашена от разпространението на този нов механизъм на резистентност (Quesada, 2016; Choo, 2016). Счита се, че употребата на colistin в животновъдството и по-специално в производството на свинско месо е сред причините за появата на колистинова резистентност. Търсенето на алтернативи на colistin в свиневъдството е от първостепенно значение, за да се запази ефективността на този антибиотик за лечение на MDR-Грам-отрицателни бактериални инфекции в хуманната медицина (Rhouma, 2016).

Mcr-1 е член на ензимна фамилия фосфоетаноламин-трансферази с експресия в *E. coli*. Този ензим води до добавянето на фосфоетаноламин към липид А, с което се модифицира ЛПЗ и по този начин се избягва действието на colistin. Идентификацията на *mcr-1* и асоциирането му с плазмид-медиран механизъм на устойчивост доказва хоризонтално предаване на резистентността към colistin (Quan, 2017).

В Китай, Liu и колектив доказват *mcr-1* в изолати *E. coli* в 15% от изследваните 523 проби сурово месо, в 21% от изследваните 804 животни и в 1% от изследваните 1322 проби от хоспитализирани пациенти с инфекция (Liu Y, 2016). В Дания Stoesser и кол. доказват общо 16 *mcr-1*-позитивни болнични изолати (13 *E. coli* и 3 *K. pneumoniae*) от

хоспитализирани пациенти в два региона през 2014 г., което предполага, междувидов трансфер на гени за *mcr-1* ензима (Stoesser, 2016). Доклади на Du и кол. потвърждават констатацията, че *mcr-1* гена се мобилизира на плазмиди, които са се разпространили в различни представители на семейство *Enterobacteriaceae* (Du H, 2016). Други автори установяват присъствие на две детерминанти на резистентност към colistin в изолати *E.coli* и *Salmonella enterica* от селскостопански животни (пилета и прасета) - *mcr* плюс *pmrA* или *pmrB* мутации (Quesada, 2016).

През 2016г. Европейският Център по контрол на инфекциите (ECDC) препоръчва провеждането на надзор върху степента на разпространение на Грам-отрицателните бактерии, носители на *mcr-1* ген, кодиращ резистентност към colistin. Препоръката е да се извършва тестване на изолати не само от хора, но и от животни, хранителни продукти и околна среда.

<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-plasmid-mediated-colistin-resistance-enterobacteriaceae-16>

Неправилната употреба на colistin и трансмисията на резистентни изолати от пациент на пациент са сред най-честите рискови фактори за възникване и разпространение на резистентност към този препарат (Ah YM, 2014). В последните години се появяват съобщения за трансмисия на резистентност към colistin от животни върху хора, вкл. от домашно свинско месо към хора (Liu, 2016; Olaitan, 2015).

Продължителната монотерапия с colistin и дозиране под оптималните дозировки също се асоциират с появата на резистентност (Poudyal, 2008; Li J, 2003a; Li J, 2005b; Deris, 2012). Според някои автори появата на резистентност към colistin най-ефективно се предотвратява при 8 часов интервал на дозиране (Bergen, 2008; Ah, YM 2014) и високи дози от 9 милиона единици. Редица проучвания доказват, че хоризонталното предаване е също толкова важно за придобиване на колистинова резистентност, колкото и селективният натиск. В допълнение, Arduino et al и кол. съобщава, че разпространението на колистинова резистентност е свързано с мобилни генетични структури каквито са Tn1331 транспозоните и клас 1 интегроните (Arduino, 2012).

2.4.4.2. Разпространение на colistin резистентни *K. pneumoniae* (CoRKP)

Колистинова резистентност в *K. pneumoniae* е докладвана в редица страни в Европа, Северна Америка, Южна Америка, Азия и Южна Африка. Най-висока устойчивост на colistin в клинични изолати *K. pneumoniae* се съобщава в Гърция (10.5-20%), следвана от Южна Корея (6.8%), Сингапур (6.3%) и Канада (2.9%) (AhYM, 2014).. Данните от Програмата за глобален антимикробен надзор SENTRY 2006-2009, която включва различни центрове в

Северна Америка, Европа, Латинска Америка и Азиатско-тихоокеанския регион, показват, че средното ниво на колистинова резистентност в *K. pneumoniae* е 1.5%. Този процент е най-висок в Латинска Америка (2.1%), следвана от Северна Америка (1.8%). Колистиновата устойчивост в Латинска Америка постепенно се увеличава от 1.3% през 2006 г. до 3.0% през 2009 г., като това е съпроводено с намаляване на чувствителността към imipenem (AhYM, 2014).

За периода 2009 - 2012г. степента на резистентност към полимиксин в *Klebsiella spp.* е 2.7% в САЩ и 3.6%, в Европа. В болници в САЩ ESBL-продуциращите *Klebsiella spp.* и *E. coli* са показали по-висока степен на резистентност към полимиксини в сравнение с европейските болници: съответно 11.5% в ESBL *Klebsiella spp.* и 1.4% в ESBL *E. coli* от американските болници и 7.8% в ESBL *Klebsiella spp.* и 0.7% в ESBL *E. coli* от европейските болници (Sader, 2014; Srinivas, 2017).

Появата на colistin резистентни *Klebsiella pneumoniae* се съобщава в множество страни, като често се асоциира с клон ST258. Така например в Унгария първите colistin-резистентни *K. pneumoniae* щамове са открити между 2008 и 2009 г. по време на болничен взрив, причинен от KPC-2 продуциращ ST258 клон *K. pneumoniae*. По време на този взрив не са били използвани полимиксини в болничните отделения и в началото са идентифицирани colistin-чувствителни (MIC 0.125 µg/ml), а по-късно colistin резистентни (MIC 8-24 µg/ml) *K. pneumoniae* изолати. С пулсова гел електрофореза са идентифицирани идентични пулсотипове и на базата на MLST анализ всички са определени като ST258 (Kocsis, 2016).

Въпреки, че данните от Европейската мрежа за надзор на антибиотичната резистентност (EARS-Net) по отношение резистентността към colistin не са пълни, някои страни съобщават за голям брой изолати от семейство *Enterobacteriaceae*, устойчиви на препарата, особено страни с вече високо разпространение на карбапенемна резистентност (ECDC, 2014). Например в Италия, 43% от карбапенем-резистентните изолати *K. pneumoniae*, събрани за период от шест месеца от ноември 2013 г. до април 2014 г. (Monaco, 2014) и 13% от карбапенем-резистентните изолати *K. pneumoniae* от хемокултури, съобщени от EARS-Net през 2014 г. са резистентни на colistin (ECDC, 2014). В Румъния и Гърция приблизително 20% от изолатите *K. pneumoniae*, резистентни на карбапенем, от хемокултури през 2014г., са резистентни и на colistin (ECDC, 2014). В допълнение, Gonçalves и колектив съобщават за възникването на два епидемични взрива през 2015г. в отделения за интензивни грижи в Бразилия, причинени от щамове карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae*, 77% от които са карбапенемаза-продуциращи *Klebsiella pneumoniae*, една част от които - colistin резистентни (Gonçalves, 2016). При анализиране на резултатите от определянето чувствителността на

изолатите към colistin, трябва да се вземе под внимание начина на определяне (дифузионни или дилуционни методи). Вероятно това може да обясни големите разлики в проучванията.

2.5. Епидемиология на инфекциите, причинени от *Klebsiella pneumoniae*

2.5.1. Разпространение на *Klebsiella pneumoniae*

Бактериите от род *Klebsiella* са убиквитерни микроорганизми, разпространени навсякъде в околната среда (почва, водни басейни, плодове, зеленчуци). Откриват се и в храни от животински произход (Yaici, 2017). Те са също част от резидентната чревна микрофлора на хора и животни. Тези естествени местообитания благоприятстват разпространението на детерминанти на резистентност към различни антибактериални средства в това число и към стратегически антибиотици. Така например colistin е много стабилен във вода (Li, 2003b). Микроорганизмите присъстващи във водна среда са изложени на постоянна експозиция на остатъчен colistin, което резултира във възникване на мутации и поява на резистентност към препарата (Czekalski, 2014). Някои автори описват появата на colistin-резистентни щамове в сладководни басейни в околната среда (Singh S, 2017).

Колонизацията с резистентни щамове е рисков фактор и с важно значение за възникване на нозокомиални инфекции. От една страна хоспиталните щамове обикновено се характеризират с множествена резистентност, а от друга - в болниците се намират пациенти от различни рискови групи (новородени, пациенти от интензивни отделения, онкологични, неутропенични, оперирани и пациенти с уринарни или съдови катетри), които са особено чувствителни към инфекции, причинени от MDR микроорганизми (Madueno, 2017; Tofas, 2016). Мащабно скринингово проучване в университетска болница в Турция за пет годишен период (2009-2013г.), върху колонизацията с карбапенем резистентни *Klebsiella pneumoniae* са изследвани рисковите фактори за това състояние. Авторите установяват, че най-малко едно подлежащо заболяване (захарен диабет, остра или хронична органна недостатъчност, малигнено заболяване), имуносупресия (продължителна кортикостероидна терапия, трансплантация, неутропения, противоракова химиотерапия), удължен болничен престой и различни инвазивни диагностични или терапевтични процедури са сред най-важните рискови фактори за колонизация (Zarakolu, 2016).

В научната литература има многобройни съобщения за вътреболнично разпространение на проблемни за лечение множествено-резистентни *K. pneumoniae*. Например, автори от САЩ съобщават за изолиране в рамките на двугодишен период (януари 2012г. - юни 2014г.) на 113 карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* в болница във Виржиния, резистентни на аминогликозиди, tigecycline и / или colistin, въпреки ограниченото

използване на colistin в тази болница (Walker C, 2016). За вътреболнично разпространение на клонално свързани изолати *K. pneumoniae*, продуценти на GES-4 карбапенемаза в болница в Япония, съобщават Yamasaki и колектив (Yamasaki, 2017). В обширен обзор A. Campos и колектив обобщават за 13 вътреболнични взрива (от общо 586 публикувани в базата данни), причинени от карбапенемаза-продуциращи *K. pneumoniae* в болници и други медицински центрове в различни държави по света (САЩ, Гърция, Италия, Франция, Испания, Германия, Ирландия, Израел, Пуерто Рико) в периода 2006 – 2011г. Като основен механизъм на резистентност към карбапенемии са идентифицирани KPC-2, KPC-3 и KPC-8 карбапенемази (Campos, 2016)

Български автори също съобщават за възникване и болнично разпространение на множество резистентни *K. pneumoniae*. Марковска и кол. докладват за вътреболнична дисеминация на KPC-2 продуциращи ST15 и ST76 клонове *K. pneumoniae* в две български болници (Markovska, 2015) . През 2018г. Савов и кол. документират болничното клонално разпространение на NDM-1 продуциращи *Klebsiella pneumoniae* (Savov, 2018).

2.5.2. Инфекции, причинени от *K. pneumoniae*

Макар и условно патогенни бактерии, *K. pneumoniae* притежават значителен патогенен потенциал. Тези микроорганизми могат да причинят разнообразни инфекции, особено при имунокомпрометирани пациенти - уроинфекции, раневи инфекции, сепсиси, менингити, пневмонии и др. Rice обединява в група, наречена ESKAPE следните няколко бактериални вида, сред които и *K. pneumoniae*: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp., като едни от най-важните патогени в етиологичната структура на нозокомиалните инфекции (Rice, 2008). *Klebsiella pneumoniae* имат два основни пато-типа – хипервирулентен и класически. Най-често срещаният е класическият тип *Klebsiella pneumoniae* означаван като cKp и известен със своята антибиотична резистентност (Podschun R, 1998). Хипервирулентният тип, означаван hvKp, е описан за първи път през 1986г. и се характеризира с хипермуковискозност (Casanova C, 1989). Хипервирулентният тип *Klebsiella pneumoniae* може да предизвика различни тежки инфекции, както при болни пациенти, така и при млади, здрави, имунокомпетентни индивиди като напр чернодробни абсцеси (Fang, 2007).

Напоследък аеробактинът, който често съпътства мукоидния фенотип, се разглежда като критичен маркер за hvKp (Russo TA, 2014; Russo TA, 2015). Въз основа на тази констатация, в мултицентрови изследвания в Китай за първи път изтъкват клиничните и молекулни характеристики на hvKp и ги дефинират като аеробактин-позитивни изолати

(Zhang Y, 2016). Съобщение от 2019г. на Liu и Guo, които докладват резултати от ретроспективно проучване върху клинични изолати *Klebsiella pneumoniae* от различни клинични материали, получени от 175 гериатрични пациенти в периода 2008 - 2014г се докладва, че 45.7% от изолатите са hVКр (хипермуковискозни и аеробактин-позитивни) и се асоциират с по-тежки възпалителни реакции и инвазивни инфекции, чернодробен абсцес и септичен шок (Liu & Guo, 2019).

2.5.2.1. Уроинфекции / урогенитални инфекции

Най-честата анатомична локализация на *K. pneumoniae* инфекциите, придобити в обществото, е уринарния тракт. За това способства локализацията на тези бактерии в гастроинтестиналния тракт като представители на нормалната микрофлора, както и анатомичната близост на уретрата до перианалната област и асцендентното проникване на бактериите в долните пикочни пътища. В болнична обстановка при хоспитализирани пациенти този процес се благоприятства особено много от наличието на траен уретрален катетър. Особено уязвими са рискови групи като недоносени, новородени с вродени аномалии на отделителната система (Vergadi, 2017).

По данни на BulSTAR в етиологичната структура на уроинфекциите в България за периода 2001 – 2010г. е налице тенденция да нараства относителния дял на уроинфекциите причинени от *Klebsiella pneumoniae*, като този дял се движи от 6.1% за 2001г. до 10.1% за 2010г. <https://www.bam-bg.net/index.php/bg/>

K. pneumoniae може да причини и абсцес на простатата, но това е рядко срещащо се заболяване, с честота 0.5% - 2.5% от всички заболявания на простатата. Обикновено е съпътствано с имунокопрометирано състояние. Например, автори от Тайван описват случай на пациент с диабет и развитие на простатит, който се усложнява с абсцес, чиито етиологичен агент е *K. pneumoniae* и в последствие комплициран със септична белодробна емболия и менингит (Liu J, 2017).

2.5.2.2. Инфекции на дихателна система

K. pneumoniae е етиологичен причинител на лобарна пневмония и засяга предимно имунокомпрометирани пациенти, пациенти със съпътстващи заболявания, налагащи продължителна хоспитализация, включително в отделенията за интензивни грижи. Много от пациентите са на апаратна вентилация (Viaggi, 2015). Респираторните инфекции засягащи долните дихателни пътища са сериозни и нерядко завършват летално.

В ретроспективно проучване в университетска болница в Южна Корея върху етиологичния спектър на нозокомиалните пневмонии за десет годишен период (2007-2016г.)

сред най-честите причинители са установени *S. aureus* (37.9%), *K. pneumoniae* (20.5%), *A. baumannii* (15.7%), *P. aeruginosa* (12.5%), *S. pneumoniae* (9.4%) и *E. aerogenes* (7.7%) (Lee HS, 2019).

Резултати от програмата SENTRY в периода 1997 – 2008 показват, че в САЩ и Европа, *S. aureus* (23 - 36.2%) и *P. aeruginosa* (19.7–20.8%) са преобладаващите изолати в случаите на вътреболнични пневмонии, докато *K. pneumoniae* и *A. baumannii* съставляват по-малък дял - между 8.5–10.1% и 4.8 - 5.6% съответно (Jones RN, 2010). Наскоро публикувани данни за етиологичния спектър на пневмонии, развиващи се след инсулт, показват висок дял на *K. pneumoniae* - 21.8% (Kishore AK, 2018).

Chuang и колектив описват придобита в обществото пневмония, причинена от *K. pneumoniae* при предварително здрав мъж в Тайван, протекла фатално поради развитите се остра бъбречна недостатъчност, миокардит с ритъмни нарушения и септичен шок (Chuang, 2012).

Сравнително редки заболявания, засягащи дихателната система и причиняващи се от два подвида *Klebsiella pneumoniae*: *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* и *K. pneumoniae subsp. ozaenae* са риносклерома и озена. Риносклеромата е грануломатозно деструктивно заболяване на носната кухина, а озена се асоциира с атрофичен ринит (Brisse, 2009). Тези подвидове могат да се изолират и от други анатомични области. В Япония е описан случай на пневмония и сепсис причинени от *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*, демонстрираща хипермуковискозен фенотип. Еволюцията на заболяването е в рамките на 10 дни, като пациентът е хоспитализиран късно и екзитира скоро след хоспитализацията (Kumade, 2016).

2.5.2.3. Интра абдоминални инфекции

Гнойни чернодробни абсцеси и ендодталмит

Повечето от случаите на чернодробни абсцеси съобщавани по-рано са предимно от Азиатския континент (Тайван), като пациентите са на средна възраст, мъже с диабет и развиващи впоследствие метастатични усложнения, особено ендодталмит. Понастоящем съществуването на такъв синдром все повече се приема и в САЩ (Fazili, 2016; Deng, 2017). Наречен е „синдром на инвазивен чернодробен абсцес“, като е описан за първи път в Източна Азия, но вече има съобщения и от Европа и Америка. Причинява се от хипервирулентни щамове *Klebsiella pneumoniae* от серотип K1 и K2 с хипермуковискозен фенотип ((Fang, 2007). Авторите препоръчват пациентите със септичен ендодталмит да се преценяват за първичен гноен чернодробен абсцес и обратно, пациенти с установен чернодробен абсцес с етиологичен агент *K. pneumoniae* да се наблюдават за очни симптоми,

тъй като метастатичните очни инфекции са изключително трудни за лечение (Keer, 2017; Pichler, 2017; Wang X, 2018).

2.5.2.4. Инфекции на хирургичното място (Surgical Site Infections, SSI)

ECDC в доклад от 2016г. върху инфекциите на хирургическото място за периода 2013 - 2014г съобщава за общо 967 191 хирургични интервенции от различни болници в 16 държави от Европейския Съюз участващи в сървейланса с общ брой на изолатите - 9 858. На първите три позиции сред представителите на семейство *Enterobacteriaceae*, асоциирани с SSI са *E. coli* (16.9%), *Klebsiella spp.* (4.4%) и *Enterobacter spp.* (4.1%).

През 2011г. е описан епидемичен взрив от SSIs, причинени от карбапенемаза - продуцираща *K. pneumoniae* след неврохирургични интервенции в болница в Китайска провинция. Този взрив обхваща 7 пациенти с краниотомии в рамките на 10 дни. Всички изолати *K. pneumoniae* са с един и същи пулсотип и принадлежащи към клон ST11. Като източник на вътреболничните инфекции е доказан бръсначът за бръснене на оперативното поле (Dai, 2014).

2.5.2.5. Инфекции на сърдечно - съдова система

Бактериемии и сепсис, причинени от хипервирулентни и “класически” щамове *K. pneumoniae*

При проучване в Китай е установено, че и класическия и хипервирулентния тип *K. pneumoniae* могат да доведат до бактериемии и други инфекции на тялото, но пациентите с хипервирулентния щам обикновено развиват чернодробен абсцес без предхождащи инвазивни медицински процедури, а повечето пациенти с класическия щам *K. pneumoniae* имат анамнеза за предхождаща инвазивна манипулация (Wu, 2017). Инфекциите на кръвта, причинени от *K. pneumoniae*, особено карбапенемаза продуциращи щамове, се свързват с много висок леталитет (Neuner, 2011; Qureshi, 2012; Tumbarello, 2012; Giannella, 2014; Daikos, 2014). Например в неутропенични пациенти инфекциите на кръвта с карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* са често усложнение и се характеризират с висок леталитет (Tofas, 2016). В допълнение, смъртността при инфекциите, причинени от colistin-резистентните KPC-продуциращи *K. pneumoniae* е по-висока (до 51%) в сравнение с инфекциите, асоциирани с colistin-чувствителните щамове (до 39%). В тези случаи колистиновата резистентност се явява основен предиктор за смъртност при инфекции на кръвта с тези микроорганизми (Giacobbe, 2015).

Melot и съавтори описват придобити в обществото инфекции, причинени от *K. pneumoniae* с различни локализации, но протичащи с бактериемия – инфекции на пикочните пътища, пневмония, дълбоки абсцеси, чернодробни абсцеси, менингити. Множествените локализации на инфекцията се явяват рисков фактор за смъртност (Melot, 2015).

Ендокардит

В етиологичният спектър на инфекциозния ендокардит на първо място стоят Грам-положителните бактерии - *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp., а представителите на групата НАСЕК (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* и *Kingella* spp.) са сред водещите Грам - отрицателни бактерии. Грам - отрицателните бактериални ендокардити, причинени от различни от групата НАСЕК бактерии, представляват едва 4 -6% от всички бактериални ендокардити, като *K. pneumoniae* са рядко срещани изолати (Roodreuma, 2015). В литературата има описани единични случаи, в които при пациентите има съпътстваща (вродена) патология. В детска болница в Техеран, съобщават за случай на *K. pneumoniae* свързан ендокардит при десет годишно дете с вроден междукамерен дефект на сърцето (Roodreuma, 2015). Ендокардити асоциирани с *K. pneumoniae* придобити инфекции в обществото са редки находки. Например, в Корея описват случай започващ с пневмония, протичаща с бактериемия, довела до чернодробен абсцес и ендокардит (Hwang JA, 2013). При друг случай на ендокардит пак в Корея, причинен от ESBL продуциращ щам *K. pneumoniae*, авторите предполагат инфекция свързана със здравни грижи поради налични данни за предхождащи жлъчни процедури и резистентния фенотип на изолата (Jung HA, 2014).

2.5.2.6. Инфекции на ЦНС

Патогенетично способността на *K. pneumoniae* за инвазия в централната нервна система не е добре изяснена. Менингеални метастатични изолати, често възникват от чернодробен абсцес и са доказани като „хипервирулентни” *K. pneumoniae* hvKP, които обикновено са с хипермуковискозен фенотип (Russo TA, 2011). Други автори съобщават, че генът *tmpA* (regulator of the mucoid phenotype) в изолати *K. pneumoniae* се доказва както сред първичните менингити, така и в изолатите от чернодробен абсцес (Chuang YC, 2013). В допълнение, руски автори съобщават за случай на тежък гноен менингит, причинен от ESBL продуциращ hvKP у доносно новородено, като в изолата е доказан *tmpA* гена (Khaertynov, 2017).

Ку УН и колектив категоризират три различни форми на *K. pneumoniae* менингит: 1. първичен или спонтанен менингит, обикновено при възрастни пациенти с подлежащи

имунокомпрометирани състояния и обичайно причиняван от hVКР; 2. метастатичен менингит, обикновено свързан с чернодробни абсцеси; 3. пост-краниотомичен менингит след неврохирургични процедури по повод лезии на мозъка или травма на главата (Ку УН, 2017). Пост-краниотомичният менингит може да бъде причинен и от сКР поради нарушаване на бариерата на централната нервна система (Ку УН, 2017).

2.5.2.7. Остеомиелит

Abboud съобщава за случай на остеомиелит на стернума, причинен от *K. pneumoniae* при 71 годишен пациент от Бразилия, шест години след кардиохирургична интервенция (коронарен байпас), усложнена с медиастинит (Abboud, 2017). Остеомиелит, дължащ се на карбапенемаза-продуцираща *Klebsiella pneumoniae*, е рядко, но тежко заболяване, особено при пациенти с хематологични злокачествени заболявания и реципиенти на стволови клетки, особено изложени на риск от развитие на нозокомиални инфекции, причинени от тази бактерия. Например, в Португалия са докладвани 2 случая на остър и хроничен остеомиелит от карбапенемаза-продуцираща *Klebsiella pneumoniae* при възрастни пациенти с хематологични заболявания: пациент с остра лимфобластна левкемия и друг - с апластична анемия, развили бактериемия с MDR изолат *Klebsiella pneumoniae* след проведена имуносупресивна терапия (Alho AC, 2019).

2.5.3. Лечение на инфекции причинени от ESBL-продуциращи и карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*.

Лечението на инфекции, причинени от ESBL-продуциращи и карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* поставя сериозно предизвикателство пред лекарската общност. Обикновено това са болнични изолати от тежко болни, рискови и с продължителна хоспитализация пациенти.

Лечение на инфекции, причинени от ESBL - продуциращи *K. pneumoniae*

Карбапенемите (imipenem, meropenem, ertapenem и doripenem) се считат за средство на избор при всички тежки инфекции с *Enterobacteriaceae* чувствителни към тези антибиотици, включително ESBL-продуциращи *E. coli*, *K. pneumoniae* и други ентеробактерии, продуценти на ESBL и AmpC ензими (Perez, 2007; Paterson DL, 2005; Pitout JD, 2008; Jacoby GA, 2009). Разбира се и други антибиотични групи намират приложение в различни случаи на инфектиране с посочените проблемни клебсиели. Понякога успешно могат да се приложат класическите BL-BLI (бета-лактами с бета-лактамазни инхибитори), като amoxicillin/clav.acid, amoxicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/sulbactam и

cefoperazon/sulbactam. В литературата са представени различни проучвания в подкрепа, както на терапията с карбапенеми, така и с BL-BLI. В проучване в Съединените щати, което включва пациенти с инфекции на кръвта (BSIs), дължащи се на на ESBL-продуциращи бактерии, предимно *K. pneumoniae*, авторите са установили по-висока смъртност с емпиричната терапия с piperacillin/tazobactam, отколкото с карбапенеми (Tamma PD, 2015). Съществуват обаче и други проучвания, при които карбапенемите не показват превъзходство над BL-BLI (най-вече piperacillin/tazobactam) при пациенти основно с инфекции на кръвта. (Harris PN, 2015; Gutierrez-Gutierrez B, 2016 ; Ng TM, 2016 ; Gudiol C, 2017).

В последните години са разработени нови антибактериални препарати от групата на BL-BLI като Ceftolozane-Tazobactam и Ceftazidime-Avibactam.

Ceftolozane-Tazobactam съчетава нов цефалоспоринов антибиотик (Ceftolozane с повишена антипсевдомонасна активност) с класически бета-лактамазен инхибитор (Tazobactam). Установено е, че това съединение е активно *in vitro* срещу 90% от ESBL-продуциращите изолати *E. coli* и 42% до 98% от ESBL-продуциращите *K. pneumoniae* (van Duin D, 2016).

Ceftazidime-Avibactam съчетава добре известен цефалоспорин от трето поколение с нов бета-лактамазен инхибитор. Avibactam инхибира ензимите от клас А, включително ESBLs и KPC, ензими от клас С и някои OXA бета-лактамази, но не е активен срещу метало-бета-лактамази (MBLs) (van Duin D, 2016). Трябва да се отбележи, че нивото на резистентност сред ESBL-продуцентите е по-високо за ceftolozane-tazobactam, отколкото за ceftazidime-avibactam (van Duin D, 2016).

Съгласно препоръките от EUCAST и CLSI, някои ESBL-продуциращи *Enterobacteriaceae* са чувствителни към цефалоспорици и те могат да се използват успешно (Rodriguez-Bano J, 2012; Huang CC, 2012.) Освен това различните типове ESBL варират в способността си да хидролизират специфични цефалоспорици (Paterson DL, 2005).

Като цяло, високите дози ceferime изглеждат разумна алтернатива на карбапенемите за лечение на инвазивни инфекции, причинени от чувствителни *Enterobacteriaceae* с хромозомно кодиран AmpC. Има много малко опит по отношение ефикасността на ceferime срещу плазмид-медиран AmpC производители (Rodriguez-Bano, 2018).

Неспособността на ESBL ефикасно да хидролизират **цефамицини** (cefoxitin, cefotetan, cefmetazole, moxalactam и flomoxef) означава, че цефамицините са активни срещу ESBL продуцентите в отсъствието на други механизми на резистентност. Цефамицините не са активни спрямо производителите на AmpC. Наличните данни показват, че цефамицините могат да бъдат алтернатива на карбапенемите за някои не тежки инфекции, по-специално при уроинфекции (Rodriguez-Bano, 2018).

Temocillin е активен срещу представителите на семейство *Enterobacteriaceae* и е устойчив на хидролизиращото действие на ESBL и AmpC бета-лактамази. Неговата ефикасност изглежда корелира с по-високи дози (2 g на всеки 12 часа), въпреки че последните фармакокинетични-фармакодинамични данни предполагат 2 g на всеки 8 часа. (Rodriguez-Bano, 2018)

Употребата на аминогликозидите е най-ефикасна при уроинфекции, и не толкова при останалите инфекции (Vidal L, 2007). Във всички случаи обаче използването на аминогликозиди увеличава повече токсичността, отколкото ползата. Те не могат да бъдат препоръчани като емпирично средство в случаи на инфекции с ниска степен на резистентност към бета-лактами или други лекарства от първа линия. Но те се считат за емпирична възможност за спестяване на карбапенемни режими (самостоятелно или в комбинация с бета-лактамази) в случаи където ESBLs и / или AmpC са преобладаващи, особено при уроинфекции и сепсис. Аминогликозидите би следвало да се заменят с по-добре поносим антибиотик, след като резултатите от чувствителността са налични. Сред аминогликозидите amikacin обикновено осигурява по-добро покритие срещу продуценти на ESBL и AmpC (Jean SS, 2016).

Plazomicin е нов аминогликозид с добра активност срещу ESBL и AmpC-продуценти (Haidar G, 2016; Lopez-Diaz MD, 2017) .

Tigecycline представлява глицилциклинов препарат и като такъв не се влияе от ESBLs или AmpC бета-лактамази. Той проявява предимно бактериостатична активност, широкоспектърен е и е дериват на minocycline. Понастоящем употребата на този препарат е приета основно като алтернатива за лечение на инфекции предизвикани от мултирезистентни микроорганизми. Неговият спектър на активност включва Грам-положителни бактерии, *Enterobacteriaceae* (с изключение на Proteae), *A. baumannii* и анаероби. Той не е активен срещу *P. aeruginosa* (Peterson LR, 2008). Одобрен е в Европа и САЩ за лечение на усложнени инфекции на кожата и кожни структури. В Съединените щати също е одобрен за лечение на придобита в обществото бактериална пневмония. Препоръчва се само когато не са налични или са неподходящи други опции. Tigecyclin по-често се използва за лечение на инфекции с карбапенем резистентни *Enterobacteriaceae* (CRE).

В края на първата декада на новото хилядолетие нивата на чувствителност към tigecycline все още са близки до 100% в ESBL-продуциращи *E. coli* и малко по-ниски в изолати *K. pneumoniae*, продуциращи ESBL или с MDR фенотип. Монотерапия с този антибиотик се препоръчва само когато няма други възможности за лечение. Необходимо е

да се достигнат подходящи серумни концентрации, за да не изгуби активността си срещу MDR щамове (Falagas, 2009; Padmini, 2017). В последните години в САЩ в мултицентрово проучване на 287 хоспитализирани пациенти е съобщено високо ниво на тигециклинова нечувствителност при *K. pneumoniae*. Авторите установяват, че 46% от случаите с карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* са също tigesycline-нечувствителни (van Duin, 2015a). Има проучвания върху резистентността към тигециклин в *Enterobacteriaceae* асоциирана с повишената експресия на RND ефлуксни помпи (Ruilian, 2017; Villa, 2014). В *K. pneumoniae* ефлукс-помпите RamA-AcrAB и RarA-OqxAB участват в резистентността и към tigesycline (Ruilian, 2017; Chiu, 2017). Активирането на техните регулатори (като RamA, MarA, RarA и SoxS) може да доведе до увеличаване експресия на AcrAB или OqxAB ефлуксни системи. Lin и кол. откриват различни отрицателни мутации в регулаторни гени gamR и oqxR определящи свръхекспресия на gamA и rarA (Lin Y, 2016).

В Китай He F и кол. проучват общо 215 КРС-продуциращи изолати *K. pneumoniae* за резистентност към tigesyclin и нивата на експресия на гените на ефлуксните помпи (AcrB и OqxB) и техните гени-регулатори (gamA, marA, soxS и rarA). Авторите установяват степен на резистентност 11.2%, и висока експресия на OqxB както в tigesyclin-резистентни, така и в tigesyclin-чувствителни изолати (He F, 2015). В някои изолати авторите установяват мутации в acrR гена, което може частично да допринесе за тигециклинова резистентност, медирана от AcrAB ефлуксна помпа (He F, 2015).

Villa и съавтори прилагат геномно секвениране за определяне на генетични мутации, свързани с резистентност към tigesycline в *K. pneumoniae*, при което идентифицират потенциално нов механизъм на резистентност дължащ се на мутация на rpsJ ген. RpsJ е ген, кодиращ рибозомален протеин S10-30S, който медира тигециклинова резистентност в *K. pneumoniae*, поради по-слабо свързване на антибиотика към 16S rRNA (Villa, 2014). Nielsen и кол. наблюдават in vivo развитие на друг механизъм на резистентност, kpgABC генна свръхекспресия, дължаща се на IS5 (Nielsen, 2014).

Fosfomycin е стар антибиотик, инхибиращ UDP-N-ацетил-глюкозамин-енолпирувил-трансферазата (Mur A), ензим, който катализира синтеза на бактериалната клетъчна стена, като по този начин показва бактерицидна активност срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни патогени. Степента на чувствителност към този антибиотик е висока сред ESBL- и AmpC продуциращи *E. coli* и *K. pneumoniae* и други MDR *Enterobacteriaceae* (Ho P, 2010; Padmini, 2016; Vardakas KZ, 2016). Пероралната форма - fosfomycin-trometamol (monural) е налична в някои страни и е широко използвана за лечение на неусложнени уроинфекции, с добра ефикасност при цистит, причинен от ESBL-продуциращи щамове

(Falagas ME, 2010b). Парентерално Fosfomycin се използва като лекарство на последен избор в комбинация с други антибиотици за тежки инфекции с *Enterobacteriaceae*, които са резистентни на карбапенеми, colistin и tigecycline. Досега има ограничени данни за ефективността и адекватното дозиране при интравенозно приложение на препарата (Padmini, 2017). Един от основните проблеми е поява на резистентност по време на терапията, която е по-рядка при *E. coli*, отколкото при други бактерии (Karageorgopoulos DE, 2012b). Проведени неотдавна проучвания показват, че това, което всъщност се случва, е селекция на резистентни мутанти, които вече са присъствали, когато лечението е започнато (Docobo-Perez F, 2015). Поради това при тежки инфекции, fosfomycin традиционно се препоръчва за употреба в комбинация с други лекарства (Karageorgopoulos DE, 2012a).

Хинолоновите антибиотици постигат ограничен успех в лечението на инфекции, причинени от патогени, продуциращи ESBL. Ciprofloxacin се използва успешно за лечение на редица инфекции, причинени от *Enterobacteriaceae*, устойчиви на ceftazidime. Флуорохинолоните са особено полезни за лечението на уроинфекции (Drago, 2001) (Padmini, 2017), но резистентността към тях сред продуцентите на ESBL е много честа (Paterson DL, 2005; Pitout JD, 2008; Rodriguez-Martinez JM, 2016).

Лечение на инфекции, причинени от карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*

Възможностите за лечение на този тип инфекции са много ограничени. Най-често използваните активни антимикробни средства досега са били агенти от втора линия, включително полимиксини, tigecyclin, fosfomycin и (понякога) аминогликозиди (Munoz-Price L, 2013; Pitout JD, 2015; Lee CR, 2016; Rodriguez-Bano J, 2014; Delgado-Valverde M, 2013; Morrill HJ, 2015; Falagas ME, 2011). Някои изолати са чувствителни към minocyclin, doxycyclin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole и temocillin (Livermore DM, 2011; Ahn C, 2014; Mediavilla JR, 2016; Murri R, 2017). Новите инхибитори на бета-лактамази avibactam и vaborbactam, инхибират КРС карбапенемазите (avibactam също инхибира OXA-48), но не и MBLs (van Duin D, 2016; Falagas ME, 2011). Изследвани са потенциалните синергични или адитивни ефекти на някои комбинации от антимикробни средства. Най-често използваните комбинации са: colistin с карбапенем и rifampin или tigecyclin; colistin с двоен карбапенем. Ефектите от синергистичните комбинации (включително с meropenem) са по-чести, когато МПК на карбапенемите е ≤ 16 mg/l. Комбинации, включващи colistin и rifampin (с или без карбапенеми) често са синергистични срещу резистентни към colistin изолати. Във всички случаи комбинираната терапия е предпочитана за високорисковите пациенти (Fredborg M, 2017). Zusman O и кол. анализират инфекции, дължащи се на

устойчиви на карбапенем бактерии (не само *Enterobacteriaceae*) и установяват по-ниска смъртност при използване на комбинация с colistin, отколкото при колистинова монотерапия (Zusman O, 2017). Използването на карбапенем в комбинация с други антибиотици е оценено в ретроспективни кохортни изследвания. Някои автори откриват, че добавянето на меропенем във високи дози (2 g на всеки 8 часа чрез продължителна инфузия) към друго активно лекарство се свързва с по-ниска смъртност при пациенти с BSI и други видове инфекции с карбапенем-резистентни ентеробактерии, когато МПК е 8 mg/l (Daikos GL, 2014; Tumbarello M, 2012; Tumbarello M, 2014). Други проучвания обаче установяват, че добавянето на карбапенем не дава предимство на пациенти с BSI (Gomez-Simmonds A, 2016; Gutierrez-Gutierrez B, 2017). Неотдавнашно проучване установява, че лечението с меропенем при висока доза е свързано с по-ниска смъртност при пациенти с карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, дори при случай на изолати с МПК от 16 mg / l (Giannella M, 2017).

Някои автори предлагат използването на комбинация от два карбапенемни препарата. КРС показва по-голям афинитет към ertapенем, отколкото към други карбапенемни (Anderson KF, 2007). Това е довело до хипотезата, че използването на ertapенем може да позволи на другия карбапенем да действа. За ertapенем и меропенем е установено синергично действие *in vitro* срещу ентеробактерии, продуциращи карбапенемази (Fredborg M, 2017). Такава комбинация обаче трябва да се разглежда само когато няма други опции.

Полимиксините са в основата на лечението на инфекциите, дължащи се на CRE. В научната литература има повече информация за colistin. Zusman et al. установяват, че монотерапията с colistin е свързана с по-висока смъртност от тази при комбинации с colistin (Zusman O, 2017). Монотерапия с colistin се свързва с повишена смъртност в сравнение с тази при комбинации включително с tigecyclin, colistin и карбапенемни (Gutierrez-Gutierrez B, 2017). Най-подходящата доза на colistin е спорна. По-старият режим на дозиране за colistin, сега се счита за недостатъчен от повечето автори (Bergen PJ, 2011; Plachouras D, 2009; Garonzik SM, 2011; Mohamed AF, 2012). Европейската агенция по лекарствата препоръчва 9 MU натоварваща доза за критично болни пациенти, последвана от 9 MU / ден в 2 или 3 приема (EMA. 2017). FDA обаче не дава препоръки за начална доза и препоръчва 2,5 до 5 mg / kg телесно тегло / ден colistin за пациенти с нормална бъбречна функция (FDA. 2017). (1MU (един милион единици) colistimethate sodium = 80 mg colistimethate sodium = 34 mg активен colistin.)

Tigecycline: Понастоящем употребата на този препарат е приета основно като алтернатива за лечение на инфекции предизвикани от мултирезистентни микроорганизми. Монотерапията се препоръчва само когато няма други възможности за лечение. Необходимо е да се постигнат подходящи серумни концентрации, за да не изгуби препарата активността

си срещу MDR щамове (Falagas, 2009; Padmini, 2017). Tigecycline се препоръчва само когато други възможности са недостъпни или неподходящи (най-често при инфекции, дължащи се на CRE). Не бива да се забравя факта, че концентрациите на tigecycline в кръвта и урината са ниски, макар, че препаратът е използван в отделни случаи с добри резултати при инфекции на кръвта и ИУТ (Peterson LR, 2008; Palacios-Baena ZR, 2016; Brust K, 2014)

Аминогликозидите се използват както самостоятелно, така и в комбинация (по-често) при лечението на инфекции, причинени от CRE. В действителност, комбинираните терапии с аминогликозиди, са свързани с по-малка вероятност за неуспех (van Duin D, 2015b). Обикновено препоръчаната доза за аминогликозиди е 5 до 7 mg / kg / ден за gentamicin и tobramycin и 15 до 20 mg / kg / ден за amikacin (Rodriguez-Bano J, 2018).

Fosfomycin е активен срещу значителна част от CRE изолати и поради това често се включва като част от комбинираната терапия (Vardakas KZ, 2016; Falagas ME, 2010b; Livermore DM, 2011; Choudhury S, 2015). Някои автори описват развитието на резистентност към fosfomycin дори при използването му в комбинация за инфекции, причинени от KPC-продуценти (Karageorgopoulos DE, 2012b). Други автори докладват за фосфомицин-чувствителни XDR патогени (Pontikis K, 2014). Fosfomycin не е препарат на първи избор в случаите на сериозни CRE инфекции, когато са налични други активни препарати, но може да се приложи на пациенти с много ограничени възможности. В такива случаи, дозировката на fosfomycin е от 16 до 24 g дневно, като се препоръчва употребата му в комбинация (Rodriguez-Bano J, 2018).

Бета-Лактами, различни от карбапенеми: temocillin за KPC-продуценти, aztreonam за продуценти на MBL и цефалоспорици за OXA-48-продуценти

Temocillin е активен срещу малка част от продуцентите на KPC. OXA-48 продуцентите обаче показват висока устойчивост на този антибиотик, поради което той се предлага като диагностичен маркер за тези ензими (Woodford N, 2014). Aztreonam не се хидролизира ефективно от MBLs (Rodriguez-Bano J, 2014; Delgado-Valverde M, 2013). В in vitro модел, aztreonam показва бавна бактерицидна активност спрямо VIM-1 продуциращи *K. pneumoniae* (Panagiotakoroulou A, 2007). Проучвания върху животински модели показват ефикасност срещу чувствителни изолати, продуценти на NDM и VIM MBLs (Souli M, 2011; Crandon JL, 2013). Проблемът е, че голяма част от производителите на MBL са копродуценти на ESBLs, които обаче са резистентни на aztreonam (Psychogiou M, 2008).

Ceftazidime-Avibactam е активен in vitro срещу повечето KPC- и OXA-48 продуциращи *Enterobacteriaceae* и някои резистентни към карбапенем щамове поради загуба на пропускливост или производство на ESBL или AmpC. Липсата на in vitro активност на

ceftazidime-avibactam срещу MBL продуценти и факта, че много продуценти на MBL също произвеждат други β -лактамази (като ESBL, AmpC, OXA-48 и т.н.) насочва вниманието на изследователите към потенциалния ефект на комбинацията “ceftazidime/avibactam + азтреонам”. Синергистични ефекти от посочената комбинация са наблюдавани *in vitro* и *in vivo* (Monogue ML, 2017 ; Marshall S, 2017) и са докладвани случаи, успешно лекувани с тази комбинация (Davido B, 2017; Wenzler E, 2017).

Meropenem-Vaborbactam е нов комбиниран препарат. Vaborbactam е друг бета-лактамазен инхибитор, за който е доказано, че възстановява активността на меропенем при KPC-продуценти, но не и при NDM- или VIM- производители (Castanheira M, 2016; Castanheira M, 2017).

Plazomicin е нов аминокликозиден препарат. Той избягва активността на ензимите, модифициращи аминокликозиди и в този смисъл е по-активен срещу повечето CRE, отколкото gentamicin, tobramycin и amikacin. Независимо от това, като всички други аминокликозиди, той се влияе от 16S rRNA метилтрансферази (Almaghrabi R, 2014). Нефротоксичност, асоциирана с plazomicin е наблюдавана по-рядко (Connolly L, 2017).

Eravacycline (TP-434) е нов флуороциклин с *in vitro* активност срещу *Enterobacteriaceae*, носители на различни гени на резистентност (ESBL или карбапенемази) и потенциално активни срещу *A. baumannii*, но не и срещу *P. aeruginosa* (Sutcliffe, 2013). В сравнение с tigecycline, срещу Грам-отрицателни бактерии той е по-могътен *in vitro* от 2 до 8 пъти (Connors, 2014; Zhang, 2016b; Solomkin, 2017; Livermore DM, 2016).

Cefiderocol е нов сидерофорен цефалоспорин, който е активен срещу MDR Грам отрицателни бактерии, включително ентеробактерии, произвеждащи карбапенемази (Ito-Noriyama T, 2016; Dobias J, 2017). Falagas и кол. в проучване на колекция от карбапенем-резистентни ГОНФ и ентеробактерии съобщават за по-висока активност на cefiderocol (S-649266) спрямо meropenem, ceftazidime, cefepime, ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam, aztreonam, amikacin, ciprofloxacin, colistin и tigecycline. Този препарат използва нов механизъм за навлизане в периплазменото пространство на Грам отрицателните бактерии (Falagas, 2017).

Aztreonam-avibactam е интересна комбинация поради способността на avibactam да инхибира ESBL, AmpC, KPC и OXA-48 ензимите и стабилността на азтреонам срещу MBL. Следователно, това съединение е активно срещу много CRE изолати, независимо от продукцията на карбапенемази и се подлага на изпитвания срещу интраабдоминални инфекции, в комбинация с metronidazole (Wang X, 2014; Yoshizumi A, 2015).

Relebactam е друг инхибитор на бета-лактамази с активност срещу KPC и ESBL-продуценти, а също така продуценти на KPC с големи OmpK36 мутации, засягащи

пропускливостта. Той е по-малко активен срещу OXA-48 и не е активен срещу MBL (Lob SH, 2017).

2.6. Методи за епидемиологично типизиране на *K. pneumoniae*

За да се контролира вътреболничното разпространението на *K. pneumoniae* е необходимо да се идентифицират потенциалните резервоари на този микроорганизъм, както и пътищата за разпространение на епидемичните щамове. От изключителна важност по време на епидемия е възможността да се диференцират епидемично свързаните от случайните, спорадични щамове на същия бактериален вид. Методите, които правят възможно това се наричат методи за епидемиологично типизиране. Те се разделят на две категории: фенотипни и генотипни методи. Поради редица свои недостатъци (свързани с типабилност, възпроизводимост и дискриминативна способност), фенотипните техники, основаващи се на определяне на био -, резисто -, серо -, фаготипа, анализ на клетъчните протеини, днес широко са заменени от множество генотипни молекулярни техники, които представени в исторически ред са следните: определяне на плазмидния профил; макрорестрикционен анализ на хромозомната ДНК чрез използване на пулсиращо електрофоретично поле (PFGE); PCR-базираните методи RAPD PCR (random amplified polymorphic DNA) и rep-PCR (repetitive element sequence - based PCR); геномен фингърпринтинг чрез AFLP (amplified fragment length polymorphism analysis); integrase gene PCR; и най-новите MLST и PCR-ESI-MS.

Анализ на плазмидната ДНК (плазмиден профил)

Плазмиден профил (анализ на плазмидна ДНК) – определя се броя и размерите на плазмидите в даден изолат след агарова гел-електрофореза на плазмидния екстракт. Провежда се анализ на плазмидната ДНК след ензимен рестрикционен анализ. Този метод има висока разграничителна способност, но поради извънхромозомната природа на плазмидите има и недостатъци. Например епидемиологично свързани щамове могат да показват различен плазмиден профил, както и обратното - епидемиологично несвързани щамове да показват еднакъв плазмиден профил поради селективен натиск на антибиотици от околната среда (Quan, 2017; Jang, 2008).

Макрорестрикционен анализ чрез PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis)

Този метод се счита за златен стандарт при епидемиологичното типизиране (Katsiari, 2015), (Qi, 2011; Jang, 2008). Характеризира се с отлична дискриминираща способност и наличие на общоприети критерии за интерпретация на получените резултати. PFGE позволява големи ДНК фрагменти с размери до 10МВ да бъдат разделени според тяхното тегло в агарозен гел. ДНК макрорестрикционният анализ използва „рядко режещи“ рестрикционни ензими. Те разпознават 6-базови секвенции и срязват геномната ДНК, като генерират малък брой рестрикционни фрагменти в диапазон с размер между 20 и 600 килобази. Тези фрагменти обикновено са прекалено големи, за да бъдат разделени с конвенционална агарозна гелелектрофореза, но могат ефективно да бъдат анализирани чрез електрофореза в пулсово поле. PFGE съдейства за различното мигриране на големите фрагменти ДНК в агарозния гел чрез постоянно променяща се посока на електричното поле по време на електрофорезата. Електричното поле се променя през определени интервали от време. Получените PFGE фингърпринтинг профили могат да се сравняват визуално или чрез използване на специален софтуер, който позволява също и съхраняване на профилите в база данни. Недостатък на метода е по-дългото време, необходимо до получаване на крайния резултат и необходимостта от специално оборудване.

Редица проучвания демонстрират, че методът е намерил широко приложение при определяне клоналното разпространение на болнични изолати *K. pneumoniae* (Yamasaki, 2017) Qi, 2011), за идентифициране на основни клъстери и принадлежност към клонални групи на MDR *K. pneumoniae* в хода на вътреболнични инфекции и епидемии (Palmeiro JK, 2019).

ДНК методи, основани на полимеразо-верижната реакция (PCR)

RAPD PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) се основава на случайна амплификация на полиморфна ДНК чрез използване на единични праймери от произволни нуклеотидни последователности. Това е един от често прилаганите методи, характеризира се с добра дискриминираща способност, простота на изпълнение бързо достигане до окончателен резултат и относително ниска цена. Случайното амплифициране на полиморфна ДНК се осъществява чрез специфична селекция на места за свързване с праймерите, които откриват консенсусни секвенции с вариabilно разпределение в бактериалната хромозома. Получените фингърпринтинги се визуализират чрез оцветяване с етидиев бромид на електрофоретично разделената ДНК (van Belkum, 2007; Sabat, 2013). **AP-PCR (Arbitrarily primed PCR)** е вариант на оригиналния RAPD метод. Двата метода се различават по няколко технически детайли. При AP-PCR, амплификацията протича в три етапа и всеки един от етапите има характерна техника и концентрация на компонентите;

праймерите в първия цикъл са с висока концентрация; прилагат се праймери с вариабилна дължина (Sabat, 2013). **rep-PCR (repetitive element sequence - based PCR)** е метод, използващ праймери, които се свързват с некодиращи междугенни повтарящи се последователности, разпръснати в генома (Sabat, 2013). За rep-PCR типизиране успешно се използват няколко семейства от повтарящи се последователности, такива като "enterobacterial repetitive intergenic consensus" (**ERIC**), "повтарящи се екстрагенни палиндромни" (REP), и последователностите "BOX" (Versalovic J, 1994). ERIC-PCR дава възможност за класифициране на изолатите в геномовари.

RAPD и rep-PCR не изискват специализирано оборудване и са сравнително евтини, бързи и лесни за изпълнение. На практика се извършва електрофоретично сепариране на ДНК фрагменти с различна дължина. Електрофоретичните резултати се представят като съвкупност от линии в гела, наречени електрофоретичен модел. Дискриминацията потенциал и на двата метода обаче е по-слаб от този на **PFGE и AFLP**.

AFLP (amplified fragment length polymorphism) е метод, базиран на селективно амплифициране на полиморфни ДНК рестриктазни фрагменти, чрез един или два рестрикционни („редки“ или „чести“) ензими. След въздействие с рестриктазите, получените фрагменти се лигират със специфични адаптори. Следва селектиране и амплифициране на рестриктираните фрагменти, електрофоретично сепариране в гел на ампликоните и визуализиране на получените фингърпринтинги (Sabat, 2013). AFLP е надежден метод както за видова идентификация, така и за идентифициране на епидемични щамове и клонове при проучване на вътреболнични епидемии.

MLST (Multi Locus Sequence Typing). Мултилокусно секвениране се разглежда като един от най-важните успехи в молекулярното типизиране за последните години. Методът е базиран на определяне на вариациите в ДНК последователностите на определен набор от гени (housekeeping genes) и характеризира щамовете въз основа на техните уникални алелни профили (Sabat, 2013; Lin J, 2014; Qi, 2011; Yamasaki, 2017). Техниката на MLST се състои в PCR амплифициране на подбраните гени и последващото им секвениране (Sabat, 2013). Предимства на метода са лесното изпълнение, недвусмислени резултати и възможност за междулабораторно съпоставяне чрез база данни в специализирани сайтове. Недостатък на метода е високата цена.

MLST е един от най-използваните методи в епидемиологичното типизиране на клинични изолати *K. pneumoniae*, особено при сравняване на изолати от различни страни. В основата на метода стои анализа на няколко основни housekeeping гени (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) (Diancourt L, 2005; Markovska R, 2015; Savov E, 2018; Palmeiro JK, 2019).

PCR – ESI – MS. В последните години за целите на епидемиологичното типизиране се използва PCR, съчетан с electrospray ionization mass spectroscopy и анализ на базовия състав (количеството на аденин, гуанин, цитозин, тимин). По същество това е метод подобен на традиционния MLST, но анализът на PCR ампликоните на няколко гена (*efp*, *trpE*, *adh*, *mutY*, *fumC*, *ppa*) се извършва вместо чрез ДНК секвениране с electrospray ionization mass spectroscopy (Kaleta, 2011). За *Klebsiella* spp. с този метод се анализират гени кодиращи карбапенемазна резистентност (*bla_{KPC}*) (Kaleta, 2011).

В последните години, в унисон със световните тенденции и в нашата страна зачестяват съобщенията за увеличаване относителния дял на *K. pneumoniae* в етиологичната структура на вътреболничните инфекции и за тревожно нарастване на резистентността на този патоген към редица стратегически антибактериални средства, вкл. карбапенеми, хинолони и colistin. Тези факти безспорно характеризират MDR *K. pneumoniae* като един от важните клинично-микробиологични и епидемиологични проблеми и в нашата страна. В този смисъл извършването на задълбочени микробиологични и молекулярно-генетични проучвания върху механизмите на антибиотична резистентност, както и проучвания върху вътреболничното разпространение на този микроорганизъм, ще имат като резултат натрупване и систематизиране на научни познания в областта на антибиотичната резистентност като база за научен анализ, както и ефективен трансфер на тези научни данни в диагностично - лабораторната и клинична практика за целите на персонализираната терапия на пациенти с инфекции, причинени от множествено-резистентни бактерии.

3. Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи чувствителността и механизмите на резистентността към бета-лактами и хинолони при клинично значими *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ - гр. Варна в периода 2014 - 2017г. и да се определи клоналната свързаност на изолатите.

Във връзка с изпълнение на основната цел си поставихме следните задачи:

1. Да се колекционират изолати *Klebsiella pneumoniae* резистентни на цефалоспорици от III генерация и/или карбапенеми и colistin.
2. Да се определи и анализира чувствителността на изолатите *Klebsiella pneumoniae* към набор от антимикробни лекарствени средства.
3. Да се определят Минималните Потискащи Концентрации на хинолони, colistin и tigecycline чрез метода на серийни разреждания в течна среда и/или чрез E тест.
4. Да се проучат механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони чрез фенотипни и молекулярно - генетични методи и да се определят групите и вида на установените ензими.
5. Да се извърши епидемиологично типизиране на изолатите *Klebsiella pneumoniae* чрез ERIC PCR и MLST.

4. Материали и методи

4.1. Бактериални изолати

За периода 2014 – 2017г. в УМБАЛ " Света Марина", Варна бяха изолирани 1048 *Klebsiella pneumoniae*, като 54.3% (n=589) бяха резистентни на цефалоспорици трета генерация. От тях 159 изолата (всички, които бяха налични) бяха включени в дисертационния труд, с цел определяне на механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони и извършване на епидемиологично типизиране.

Сто петдесетте и осем изолата *K. pneumoniae* бяха получени от клинични материали в периода януари 2014 г. - декември 2017г. Разпределението им според вида на материала е както следва: кръв (n=40), урина (n=65), раневи секрет (n=29), секрет от респираторен тракт (n=22) и ликворна течност (n=2). Един изолат беше от ръце на персонал.

Референтни щамове

При конюгационният пренос на R плазмиди като реципиент беше използван *E. coli* K12: W3110 Rif lac -, съхраняван в skim milk при температура -80°C. Щамът беше култивиран върху Mac Conkey агар (BD), като при ревитализиране бе извършвано предварително култивиране в Tryptic Soy broth .

4.2. Хранителни среди

За изолация, биохимична идентификация, изпитване на чувствителност към антимикробни лекарствени средства и съхраняване бяха използвани следните хранителни среди: Кръвен агар с 5% овнешка кръв, МакКонки агар, Мюлер-Хинтон агар, Клиглер агар, среда за доказване на L-аргинин, L-лизин и L- орнитин, среда на Симонс с цитрат, среда за доказване на индол и подвижност, среда за доказване на уреазна активност, среда за доказване на фенилаланин-деаминазна активност, триптично-соев бульон, skim milk, получени от Бул Био - НЦЗПБ, Vecton Dickinson и Елта 90.

4.3. Антибиотични субстанции и дискове

4.3.1. Антибиотични субстанции: Бяха използвани cefotaxime (ISN, Germany), rifampicin (Actavis, Balkanpharma, Bulgaria).

4.3.2. Антимикробни дискове: Бяха използвани amoxicillin/ clavulanic acid (AMC), ceftazidime 5 µg (CAZ), ceftriaxone (CRO), cefotaxime 5 µg (CTX), cefepime (FEP), ceftoxitin (FOX), imipenem (IMP), tetracycline (TET), gentamicin (GM), amikacin (AK), tobramycin (TOB),

trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LVX), imipenem (IMP) meropenem (MEM), piperacillin/tazobactam (TZP), ceftazidime/avibactam (CZA). Съдържанието на антибиотика в дисковете съответстваше на изискванията на EUCAST 2016.

4.4. Реактиви

Използвани бяха следните реактиви: 3% калиева основа, 1% тетраметил р-фенилендиамин дихидрохлорид, 3% водороден прекис, набор за оцветяване по Грам, 10% железен трихлорид, реактив на Ковач, получени от Becton Dickinson и Бул Био – НЦЗПБ.

4.5. Методи за идентификация на *Klebsiella pneumoniae*

4.5.1. Мануални методи

Всички 159 изолата бяха първоначално идентифицирани с конвенционални биохимични тестове: усвояване на глюкоза и лактоза до киселина и отделяне на газ в средата на Клиглер, продукция на индол от триптофан, уреазна активност, усвояване на цитрат от средата на Симонс, декарбоксилиране на аминокиселините лизин и орнитин.

4.5.2. Идентификация чрез полуавтоматизираната система Crystal E/NF (Becton Dickinson)

Системата Crystal E/NF (Becton Dickinson) бе използвана като потвърдителен метод при всички 159 изолати, идентифицирани като *Klebsiella pneumoniae* чрез мануалните биохимични методи. Системата разполага с набор от 30 хромогенни биохимични теста за ферментация, оксидация, деградация и хидролиза на различни хромогенни субстрати в панела и изисква допълнително тестване за оксидазна активност и продукция на индол. Настоящата софтуерна версия на системата идентифицира 38 рода и 104 вида от най-важните Грам-отрицателни бактериални видове.

4.5.3. Идентификация чрез автоматизирана система Phoenix 100 (Becton Dickinson)

За идентификацията на карбапенем-нечувствителните изолати *K. pneumoniae* (n=38) бе използвана и автоматизираната система Phoenix 100 (Becton Dickinson). Панелите NMIC/ID на Phoenix 100 идентифицират 161 различни бактериални Грам - отрицателни вида, които съставляват повечето от клинично значимите Грам - отрицателни стриктни аеробни и

факултативно анаеробни бактерии. Идентификацията се основава на метаболитната активност на тестваните бактериални изолати, като всеки панел съдържа 45 микроямки с лиофилизирани биохимични субстрати и 2 ямки за контрол на флуоресценцията. В панелите има 16 ензимни субстрата, 23 субстрата за източник на въглерод и 5 теста за утилизация и потискане на растежа.

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

4.6. Методи за изпитване на чувствителността на *Klebsiella pneumoniae* към антимикробни лекарствени средства

4.6.1. Дисково - дифузионен метод

Чувствителността на изолатите *Klebsiella pneumoniae* към 15 антибактериални лекарствени препарата бе проучена чрез дисково - дифузионния метод на Bauer – Kirby според изискванията на EUCAST, 2016/ EUCAST, 2017. Тестът бе проведен на стандартни петри с Мюлер-Хинтон агар, при гъстота на инокулума 0.5 по Mc Farland. Температурата на култивиране бе 35°C, а продължителността – 18-24 часа. При отчитането на диаметрите на зоната на задръжка на растежа, те се измерваха от външната страна на петрито на тъмен фон и отразена светлина. За отчитането на зоните на задръжка се използваха препоръките на EUCAST версия 6.0/2016 за 2015г - 2016г, версия 7.1/2017 за 2017г и CLSI-2015 за nalidix acid за отчитане на чувствителността при изолатите от 2014г.

Използвани бяха следните антибиотични дискове:

- ✓ amoxicillin/clav.acid (20/10 µg)
- ✓ ceftazidime (5µg)
- ✓ cefotaxime (5µg)
- ✓ ceftriaxone (30 µg)
- ✓ cefepime (30µg),
- ✓ trimethoprim/sulfametoxazole (1.25/23.75 µg),
- ✓ ciprofloxacin (5µg),
- ✓ levofloxacin (5µg),
- ✓ gentamicin (10µg),
- ✓ amikacin (30µg),
- ✓ tobramycin (10µg),

- ✓ piperacillin/tazobactam (30/6 µg)
- ✓ imipenem (10 µg)
- ✓ meropenem (10 µg)
- ✓ nalidixic acid (30 µg)
- ✓ ceftazidime/avibactam (10/4 µg)

За контрола на антибиотичните дискове бяха използвани следните референтни щамове: *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

4.6.2. Методи за определяне на Минимална Подтискаща Концентрация (МПК).

4.6.2.1. Определяне на МПК чрез използване на МІС стрип (Epsilon meter test)

При всички 159 изолати *Klebsiella pneumoniae* чувствителността към nalidixic acid, ciprofloxacin, levofloxacin бе изпитана чрез епсилотричния тест (Е-тест) МІС стрип (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy).

При Е - теста се използват стрипове, съдържащи точно определени, експоненциално нарастващи концентрации на изпитвания антибактериален препарат, които съответстват на определени МПК. Стрипът се нанася на инокулиран с бактериална суспензия (с гъстота 0.5 по скалата на Mc Farland) Мюлер - Хинтон агар и се отчита след 24 часа инкубиране при 37°C, при което се визуализира елипсовидна зона на инхибиране на растежа. Позицията, в която края на зоната пресича стрипа определя МПК на антибиотика спрямо тествания изолат. Граничните стойности на използваните стрипове (Liofilchem, Italy) позволяват определянето на МПК в следните граници (в µg/ml):

✓ nalidixic acid	0.016- 256
✓ ciprofloxacin	0.002 - 32
✓ levofloxacin	0.002 - 32

След определяне на МПК, изолатите бяха категоризирани като чувствителни, интермедиерни или резистентни. За целта бяха използвани критериите на EUCAST –2017г. Този стандарт определя гранични стойности на МПК за *Klebsiella pneumoniae* за ciprofloxacin и levofloxacin. Интерпретацията на резултатите за nalidixic acid беше извършвана според CLSI-2016.

4.6.2.2. Определяне на МПК на colistin и tygecycline чрез микродилуционния метод на серийните разреждания в бульон.

Чувствителността към colistin и tigecycline при 38 карбапенем-нечувствителни *K. pneumoniae* бе определена чрез микродилуционния метод на серийните разреждания в бульон. За целта бяха използвани SENSITITRE Susceptibility плаки (TREK Diagnostic systems). Плаките са натоварени с двукратно нарастващи концентрации на двата антибиотика (tigecycline: от 1 до 8 µg/ml и colistin: от 0.25 до 16 µg/ml). Използвахме 24-часова чиста култура от Мак Конки агар на изпитваните изолати *Klebsiella pneumoniae*. Според препоръката на производителя, няколко колонии от чистата култура суспендирахме в стерилна дестилирана вода до гъстота на инокулума 0.5 McFarland. 50µl от тази бульонна суспензия бе прехвърляна в Mueller-Hinton бульон до получаване на инокулум с гъстота 5×10^5 cfu/ml, с който бе инокулирана плаката. След 18-24 часова инкубация на 36°C отчитаме при отразена светлина на тъмен фон наличие или отсъствие на бактериален растеж във всяка ямка.

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

4.7.1. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) по V. Jarlier и сътр. (Jarlier, 1988) за доказване на щамове, продуценти на широко-спектърни β-лактамази.

Техника: След инокулиране на петри с Mueller-Hinton II агар (BD), както при рутинния дифузионно-дисков метод по CLSI, поставяхме в средата диск amoxicillin/clavulanic acid (AMC) и на разстояние център от център 20mm (намалено с 10mm спрямо оригиналния метод на Jarlier V, 1988г., за подобряване на чувствителността на метода) подреждахме следните антибиотични дискове:

ceftazidime (30 µg) ceftriaxone (30 µg)

cefotaxime (30 µg)

След култивиране 18 – 24 часа на 35-37°C, наличието на разширение на зоната на инхибиция между диска amoxicillin/clavulanic acid и диска широкоспектърен β-лактам (синергистичен ефект), се интерпретираше като наличие на ESBL.

4.7.2. Модифициран Hodge-test (МНТ)

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

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

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

4.7.3.1. Материали за изоелектрично фокусиране

- електродни ленти от филтърна хартия (размери 10-280-1 мм), Serva
- филтърни хартии (5-10 мм) (Serva) за нанасяне на пробите върху гела
- стъкла (120-280 мм), гумена пластинка 0.5 мм и щипки за приготвяне на камера за изливане на гела
- електроден разтвор за анода – 1 mol/L ортофосфорна киселина
- електроден разтвор за катода - 1 mol/L натриева основа
- 1 mol/L HCl
- Амфолити: Pharmalyte 3-10, LKB, България
- Разтвор на акриламид (Applichem GmbH) съдържащ 30 % акриламид и 1 % бисакриламид
- 87 % разтвор на глицерол (ISN)
- 1 % разтвор на амониев персулфат (Applichem GmbH)
- TEMED (ISN)
- Миоглобин (ISN) 1 % разтвор в дестилирана вода
- Nitrocefin (Becton Dickinson) – разтвор 500 mg/L
- Установка за хоризонтална електрофореза и електрически генератор, произведени в Развойна Техническа База – Медицински университет, София
- Охлаждаща система с течаща вода, произведена в Развойна Техническа База – Медицински университет, София.

4.7.3.2. Ензимни екстракти

За получаване на ензимните екстракти донорните щамове и получените трансконюганти бяха култивирани в 100 ml Tryptic Soy Broth (Difco) на водна баня с

разклащане при температура 37°C, до гъстота 10⁹ CFU/ml. Клетките бяха отделени чрез центрофугиране на 8000 rpm за 20 минути. Получените утайки бяха ресуспендирани с 1% глицин и след това лизирани чрез многократно замразяване на -70°C и размразяване. За получаване на ензимните екстракти центрофугирахме в хладилна центрофуга на 14000 rpm за 30 min при 4°C. Те бяха съхранявани на -20°C.

4.7.3.3. Тест за ензимна активност

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

4.7.3.4. Техника

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

Полиакриламидния гел беше приготвен от:

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

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

Визуализирането на ивиците на β-лактамазите се извършваше с разтвор на Nitrocefin

(BD) 500 mg/L. Изоелектричните точки на изследваните ензимни екстракти бяха определени чрез сравняване с β лактамази с известни pI, използвани като контроли.

4.7.4. Bioassay – биологичен тест за β -лактамозна хидролитична активност

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

4.8. Конюгационно предаване на плазмиди, детерминиращи продукцията на ESBL и гени за хинолонова резистентност

Конюгационното предаване на плазмиди, детерминиращи продукцията на ESBL, беше извършено на твърда хранителна среда. Донорите и трансконюгантите бяха култивирани в Tryptic Soy бульон (TSB) за 18-24 часа. За рецепиентни щамове бяха използвани *E. coli* K12: W3110 Rif^{lac} –. На повърхността на Mueller-Hinton II agar бяха смесвани 0.8 ml от бульонната култура на донора и рецепиента и разпределяни по повърхността на агара, както по метода на антибиограма със заливка, остатъкът беше отстраняван. Петритата бяха култивирани на 35°C за 18-24 часа. Селекцията извършвахме на MacConkey agar (BD) с CTX 2 mg/L и RIF 50 mg/L. На селективната среда освен конюгационната смес се посяваха контроли за растежа на донора и рецепиента. От съмнителните колонии се изолираше чиста култура на MacConkey agar и се проучваше антибиотичната чувствителност с дифузионно-дискос метод към следния набор от антимикробни лекарствени средства: amoxicillin/clavulanic acid, cefotaxime 30, ceftazidime 30, tobramycin, gentamicin, amikacin, trimethoprim/sulphamethoxazole, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol.

4.9. Молекулярно-генетична идентификация на видовете бета-лактамази (ESBLs, AmpC, карбапенемази) и механизмите на хинолонова резистентност – плазмидна и хромозомна.

4.9.1. Полимеразо-верижна реакция (PCR)

Принцип: Полимеразо-верижната реакция (PCR) представлява метод за размножаване

на търсен фрагмент ДНК, който служи за матрица. Двойно - верижната ДНК се денатурира термично, възникващите единични вериги се хибридизират с два къси олигонуклеотида, които служат като стартери (праймери) на синтеза на ДНК, и маркират точно интересуващата ни последователност. В резултат на този метод може точно да се охарактеризират изследваните бета-лактамази, използвайки специфични за отделните групи праймери (-SHV, -CTX-M, -DNA, -FOX) и за гените за плазмидна хинолонова резистентност (qnr, ефлуксни помпи и др.)

Техника:

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

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

Полимеразо- верижната реакция беше изпълнена в обем 25 µl, като вземахме 1.2 µl от така обработените термоекстракти. Реакционната смес включваше 1x reaction buffer (съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl), 1.5 или 2 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (GenetBio, Korea), 15 pmol от всеки праймер, 0.75 U Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea).

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

Таблица 4. Праймери използвани в PCR реакциите.

Праймер		Т на хибризация	Очакван размер	Литература
SHV	SHV-A: ACTGAATGAGGCGCTTCC SHV-B: TCCCGCAGATAAATCACC	61°C	297 bp	Markovska R, 2008
CTX-M	CTX-M-V: CVATGTGCAGYACCAAGTAA CTX-M-R: ARGTSACCAGAAAYMAGCGG	61°C	585 bp	Markovska R, 2008
CMY	CMY F - AACACACTGATTGCGTCTGAC CMY R - CTGGGCCTCATCGTCAGTTA	61°C	1,226 bp	Pérez-Pérez F, 2002
DHA	DHA F : AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T DHA R: CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	63°C	405 bp	Pérez-Pérez F, 2002
FOX	FOX F : AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G FOX R : CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	63°C	190 bp	Pérez-Pérez F, 2002
EBC	EBCF: TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG EBC R: CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	64°C	302 bp	Pérez-Pérez F, 2002
MOX	MOX F: GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT MOX R: CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	64°C	520 bp	Pérez-Pérez F, 2002
ACC	ACCMF AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA ACCMR TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	64°C	346 bp	Pérez-Pérez F, 2002
qnrA	qnrA F: ATT TCT CAC GCC AGG ATT TG qnrA R: GAT CGG CAA AGG TTA GGT CA	57°C	627 bp	Li B, 2012
qnrB	qnrB F : GAT CGT GAA AGC CAG AAA GG qnrB R : ACG ATG CCT GGT AGT TGT CC	57°C	469 bp	Li B, 2012
qnrC	qnrC F : GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC G qnrC R : CAC CTA CCC ATT TAT TTT CA	57°C	307 bp	Li B, 2012
qnrD	qnrD F : CGA GAT CAA TTTA CGG GGA ATA qnrD R : AAC AAG CTG AAG CGC CTG	57°C	533 bp	Li B, 2012
qnrS	qnrS F: ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA TAA qnrS R: ATT GGC ACC CTG TAG GC	57°C	417 bp	Li B, 2012
qepA	qepA F : AAC TGC TTG AGC CCG TAG AT qepA R : GTC TAC GCC ATG GAC CTC AC	57°C	596 bp	Li B, 2012
aacIb	aacIb F : TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA aacIb R : CTCGAATGCCTGGCGTGT	59°C	482 bp	Li B, 2012
oqxA	oqxA F : CTC GGC GCG ATG ATG CT oqxA R : CCA CTC TTC ACG GGA GAC GA	63°C	392 bp	Kim H, 2009
oqxB	oqxB F : TTC TCC CCC GGC GGG AAG TAC oqxB R : CTC GGC CAT TTT GGC GCG TA	64°C	512 bp	Kim H, 2009

KPC	F - CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG R - CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	57°C	798 bp	Poirel L, 2011
NDM	F - GGTGGGCGATCTGGTTTTC R - CGGAATGGCTCATCACGATC	57°C	621 bp	Poirel L, 2011
OXA-48	F- GCGTGGTTAAGGATGAACAC R- CATCAAGTTCAACCCAACCG	57°C	438 bp	Poirel L, 2011
VIM	GATGGTGTGGTTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	54°C	390 bp	Poirel L, 2011
IMP	F - GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC R - GGTTTAAAYAAAACAACCACC	54°C	270bp	Poirel L, 2011

Праймерите за *bla_{MOX}* амплифицират гените за MOX, CMY-1, CMY-8 до CMY-11 ензими. Праймерите за *bla_{CMY}* амплифицират гените за LAT, CMY-2 до CMY-7 ензими, докато EBC праймерите амплифицира *bla_{MIR/ACT}*.

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

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

PCR CMY : Амплификацията беше извършена за 30 цикъла:

- денатурация на 95°C за 40 сек.
- хибридизация (свързване на праймерите) 61°C за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 50 сек.;

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

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

PCR EBC : Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

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

PCR DNA : Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

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

PCR qnr, qerA и oqxAB: Амплификацията беше извършена за 35 цикъла:

- денатурация на 95°C за 30 сек.

- хибридизация (свързване на праймерите) - температурата беше специфична за всеки праймер (Таблица 4), за 30 сек.
- удължаване на 72 °C за 40 сек.;

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

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

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

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

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

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

4.9.2. Доказването на алелният вариант на ацетилтрансферазата - *aac(6')*-Ib-cr

За доказване на алелният вариант - *aac(6')*-Ib-cr на гена *aac(6')*-Ib според Li (Li B et al, 2012), рестрикция на 8 µl от PCR продукта (*aacIb* амплификация) беше извършена с 4 единици BtsCI (New England Biolabs, UK) ензим за три часа на 50°C според указанията на производителя. При появата на сегменти от 270 bp и 210 bp реакцията беше приемана за положителна.

4.9.3. ДНК секвениране

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

Таблица 5. Праймери използвани при нуклеотидното секвениране

ESBL	Праймери	Температура на хибридизация	Ампликон	
SHV	SHV-H: aacgccgggttattct SHV-E: ttacggttccagtgtctc	58°C	930bp	Markovska R, 2008
CTX-M-1 group	CTX-M-1/P1c: tcgtctctccagaataagg CTX-M-1/P2c: aaggagaaccaggaaccacg	56°C	1100bp	Markovska R, 2008
CMY-2 group	CMY-2-K - ggtgcaaatcaaaaca cac CMY-2-M - actgcagcaacgacgggc	61°C	1400bp	Markovska R, 2017
OXA III group	OXA-1-V: ccggagcctcattaattg OXA-1-R: aggggagccaaaagcttg	58°C	963bp	Markovska R, 2008
DHA	DHA-1A: ctgatgaaaaaatcggtatc DHA-1B: attccagtgcactcaaaata	52°C	1116 bp	Yan J, 2002
KPC	KPC1F - gctacacctagctccaccttc KPC-R -tcctagcctaaatgtgac	56°C	~1000bp	Moland et al., 2003
NDM	NDM-F-act cgt cgc aaa gcc cag NDM-R-ctc atg ttt gaa ttc gcc c	61.5°C	~1000bp	Rasheed J, 2013
VIM	IntI1-attI – tctatgcctcgggcatcc VIM-R - hwggttatgccgatctg	56°C	~1200bp	Markovska R, 2013
gyrA	gyrAF: cga cct tgc gag aga aat gyrAR: gtt cca tca gcc ctt caa	64°C	626 bp	Li B, 2012
parC	parCF: tac gtc atc atg gac agg parCR: gcc act tca cgc agg ttg	55°C	460 bp	Li B, 2012

Използваните праймери за амплификация на широкоспектърните бета-лактамази, OXA, CMY и карбапенемазите обхващаха целия ген. (Markovska, 2013; Markovska, 2017a;

Rasheed JK, 2013)

При секвенирането на *qnr* гените използвахме праймерите от таблица 4 като ампликоните бяха секвенирани с F и R праймерите (Li B, 2012).

Праймерите за *gyrA* и *parC* бяха използвани за амплифициране на участъци, детерминиращи хинолоновата резистентност (QRDR).

Анализът на секвенциите беше направен чрез Chromas Lite версия 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Australia), DNAMAN версия 8 (Lynnon Corporation, USA) и програмата BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Мутациите в *gyrA* и *parC* гените бяха установени чрез сравняване с ДНК последователностите на QRDR регионите на *E. cloacae* ATCC 13047 (GenBank accession numbers D88980 and D88981 for *gyrA* and *parC*, respectively) (Deguchi T, 1997).

4.10. PCR за типирание на репликони

За установяването на типа репликон се извърши Multiplex PCR според схемата на Carattoli и колектив. В таблица 6 са представени праймерите и броя на праймерите включени във всяка PCR реакция (Carattoli et al., 2005).

Таблица 6. Праймери използвани за Multiplex PCR

	Праймери	Ампликон bp	Номер на PCR микса
A/C	F GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA R ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465	1
FIC	F GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	265	1
P	F STATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534	1
L/M	F GGATGAAAАCTATCAGCATCTGAAG R CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785	1
FIA	F CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	2
Fib	F GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG R CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702	2
Y	F AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R GCGAGAATGGACGATTACAAAАCTTT	765	2

T	F TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750	2
II/y	F CGAAAGCCGGACGGCAGAA R TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	130	3
FIIA	F CTGTTCGTAAGCTGATGGC R CTCTGCCATAAACTTCAGC	270	3
HI2	F TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC R GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644	3
HI1	F GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471	3
N	F GTCTAACGAGCTTACCGAAG R GTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	3
FrepB	F TGATCGTTTAAGGAATTTTG R GAAGATCAGTCACACCATCC	270	4
IncR	F TCG CTT CAT TCC TGC TTC AGC R GTG TGC TGT GGT TAT GCC TCA	251	5

При мултиплекс реакциите използвахме стандартен PCR микс (описан по-горе), като праймерите бяха в концентрация 10 pmol за реакционната смес.

Multiplex PCR: Амплификацията беше извършена за 30 цикъла:

- денатурация на 95°C за 45 сек.;
- хибридизация (свързване на праймерите) - на 60°C за 30 сек.;
- удължаване на 72 °C за 60 сек.;

RepF PCR Амплификацията беше извършена за 30 цикъла:

- денатурация на 95°C за 45 сек.;
- хибридизация (свързване на праймерите) - на 53°C за 30 сек.;
- удължаване на 72 °C за 60 сек.;

За PCR реакцията доказваща R репликонните типове бяха използвани праймери, посочени в таблица 6, по метода на García-Fernández (García-Fernández, 2009).

4.11. Епидемиологичен анализ

4.11.1 ERIC-PCR

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

Техника: Извличането на тотална ДНК беше направено с кит GFX Genomic Blood Purification Kit (Amercham Biosciences, Buckinghamshire, UK) според указанията на

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

При ERIC-PCR метода бяха използвани следните праймери:

ERIC1R – ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C

ERIC2 AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC

(Amersham Pharmacia Biotech или Metabion).

ERIC PCR беше изпълняван в обем 25 µl, като вземахме 4 µl от ДНК екстрактите. Реакционната смес включваше 1x reaction buffer (съдържащ 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl), 4 mM MgCl₂, dNTP - 0,4 mM dNTP mix(ABViogune), 50 pmol от ERIC 1R и от ERIC 2, 1.5 U Taq полимераза (ABViogune).

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

Разлика от 2 ивички между изолатите определяше наличието на отделни ERIC типове, а разлика от една ивичка на подтипове.

4.11.2 MLST (Multi Locus Sequence Typing)

Мултилокусно секвениране (MLST).

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

Техника: Беше изолирана ДНК на проучваните изолати по описаният по горе начин. Амплифицирани бяха чрез стандартна PCR реакция седемте постоянно присъстващи гена –

gap, *inf*, *mdh*, *pgi*, *pho*, *rpo*, *ton* според Diancourt et al. J Clin Microbiol. 2005. Праймерите и температурата на свързване е показана на Таблица 7. Чрез ДНК секвениране (и в двете посоки) на получените ампликони се установява точният алел в сайта за MLST на *K pneumoniae* (<https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Комбинацията от седемте алела дава точния секвенционен тип – пак в сайта на Pasteur института (https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef&page=profiles).

Таблица 7. Праймери, използвани при MLST

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

4.12. Статистически анализ

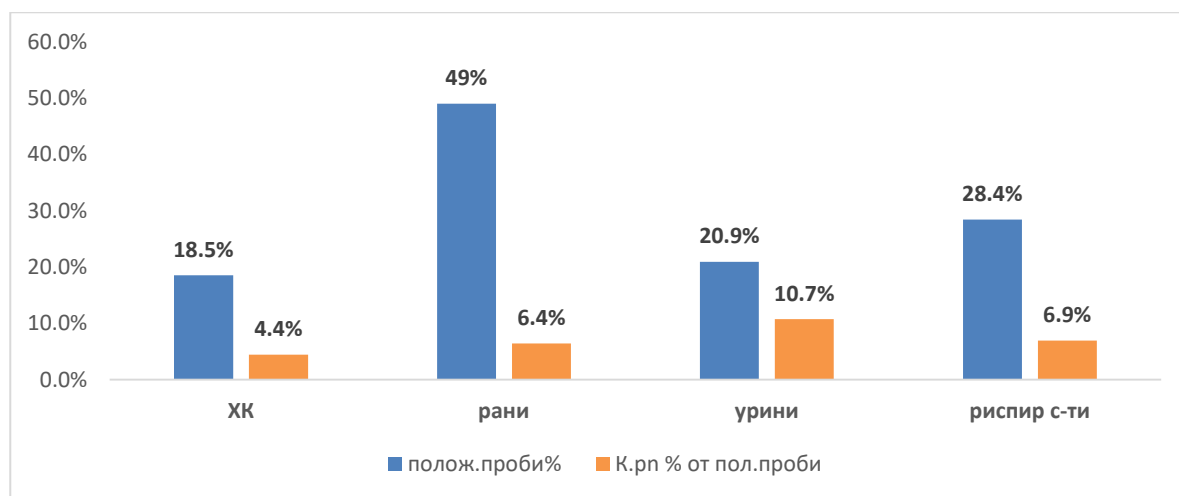
Статистически значимите разлики бяха оценени с chi-square тест или теста на Fisher (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>).

5. Резултати и обсъждане

5.1. Епидемиологична информация

В периода януари 2014 до декември 2017г. бяха проучени общо 1084 клинично значими изолата *Klebsiella pneumoniae*, получени от различни биологични материали на пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ – Варна, разпределени както следва: урини: n=540 (50%); раневи секрети: n=266 (24%); кръв: n=152 (14%) и респираторни секрети: n=126 (12%).

От всички изследвани биологични проби в проследявания период от време, дялът на положителните за *K. pneumoniae* клинични материали е както следва: кръв - 4.4% (n=152) (при 18.5% дял на положителните хемокултури от всички хемокултури); раневи секрети - 6.4% (n=266) (при 49% положителни проби); урини - 10.7% (n= 540) (при 20.9% положителни уринни проби) и респираторни секрети - 12% (n=126) (при 28.4% положителни материали от долен респираторен тракт) (фигура 1).

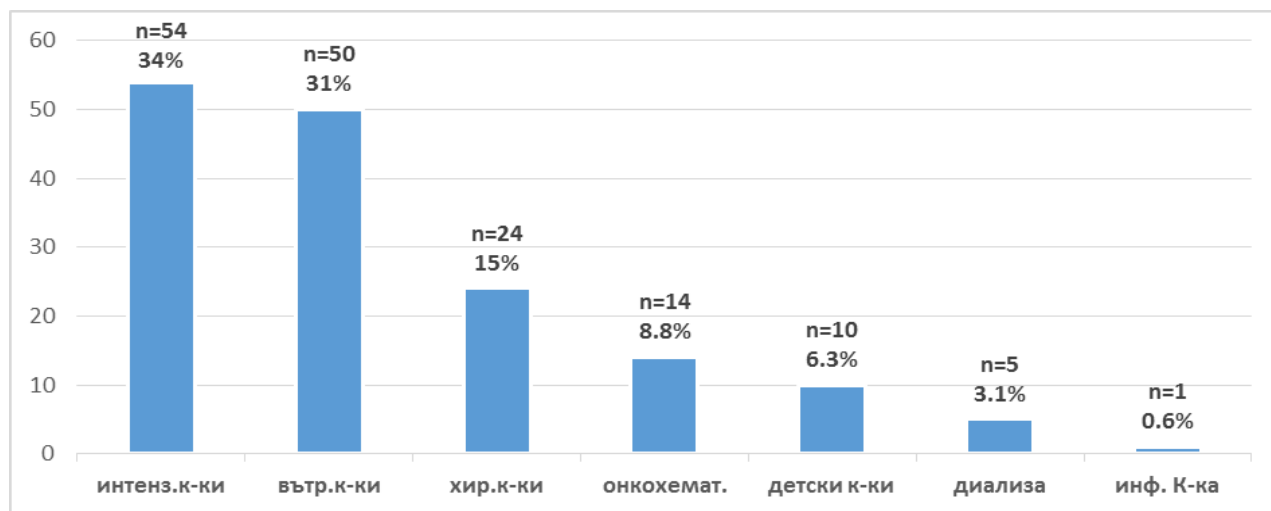


Фигура 1. Относителен дял на положителните клинични проби по видове материали и дял на положителните за *K. pneumoniae* материали (в %).

От изолираните общо 1084 клинични изолата *Klebsiella pneumoniae*, резистентни на цефалоспоринови трета генерация бяха 589 изолата и от тях в настоящия дисертационен труд са използвани 159 изолати (получени от недублиращи се пациенти) с цел по-детайлно проучване на механизмите на резистентност към бета-лактами и хинолони и за целите на епидемиологичното типизиране. Тридесет и четири процента от тези изолати (n=54) са получени от пациенти, хоспитализирани в интензивни клиници на болницата, а 66% (n=105)

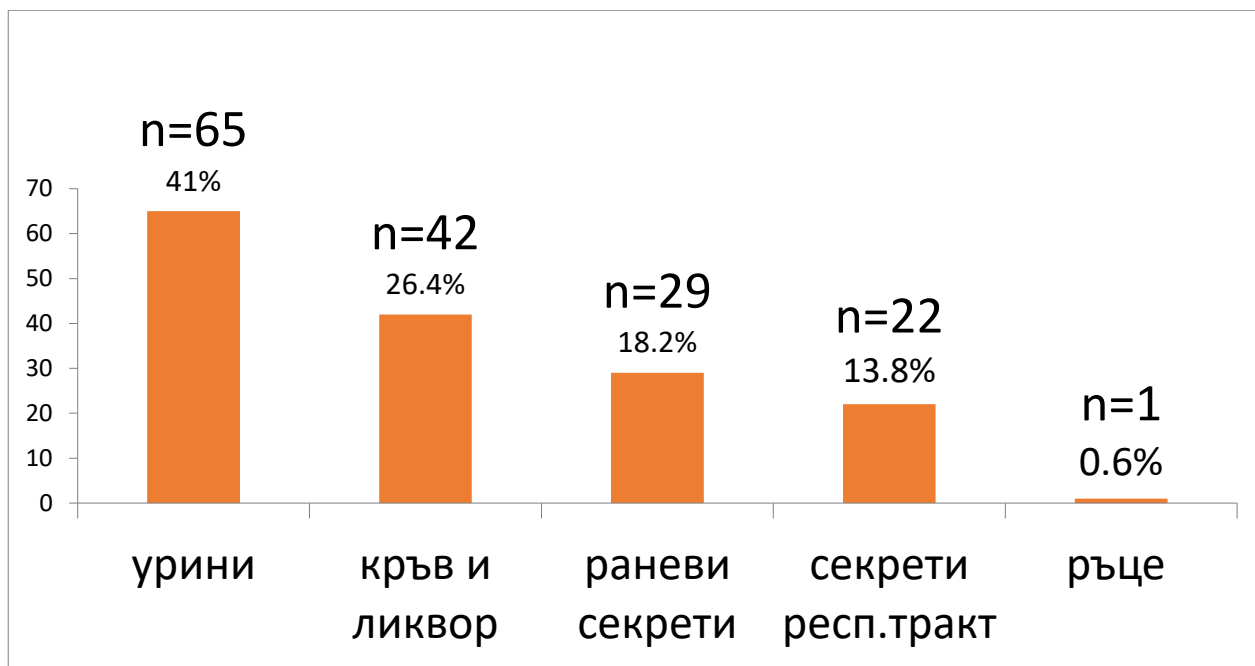
- от не-интензивните болнични звена (фигура 2). В колекцията е включен и един изолат *Klebsiella pneumoniae*, получен от ръце персонал.

Тридесет и осем от изолатите *K. pneumoniae* в колекцията, обект на дисертационния труд, са нечувствителни към карбапенемни антибиотици, като двадесет и пет от тях (66%) са от интензивни клиници. Според вида на клиничния материал, разпределението е както следва: n=21 – от хемокултури; n=6 – урини; n=7 - респираторни секрети и n=4 - от раневи секрети.



Фигура 2. Разпределение на изолатите *Klebsiella pneumoniae* според вида на клиниката, от която са изолирани (в брой и %).

Разпределението на изолатите *K. pneumoniae* според анатомичното място на изолация е както следва: урини: 41% (n=65); кръв и ликвор: 26.4% (n=42); раневи секрети: 18.2% (n=29); секрети от респираторен тракт: 13.8% (n=22); ръце персонал: 0.6% (n=1) (Фигура 3).



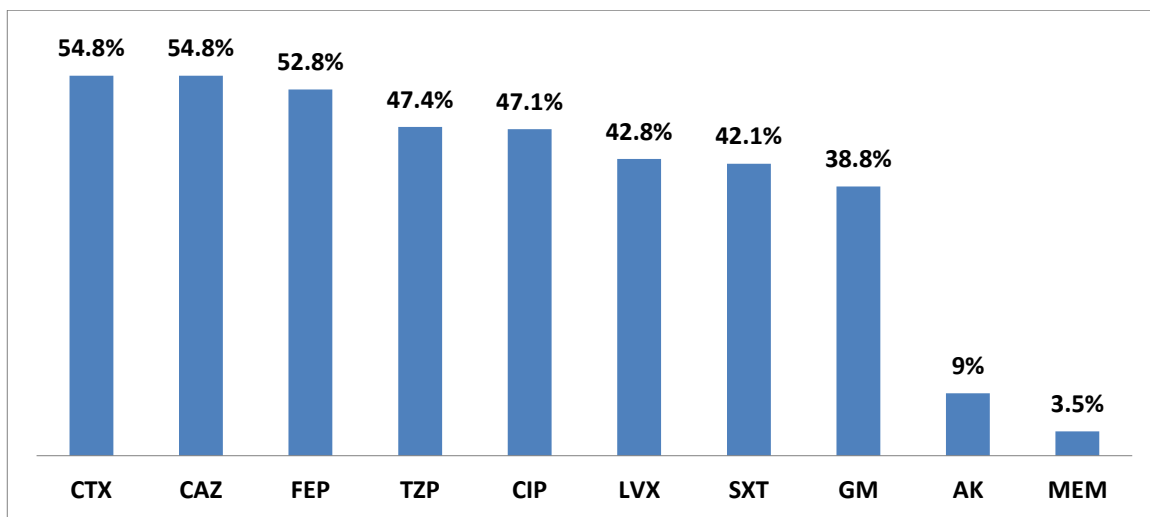
Фигура 3. Разпределение на изолатите *K. pneumoniae* (n=159) според мястото на изолация.

Всички 159 изолата *K. pneumoniae*, използвани за целите на дисертационния труд бяха идентифицирани първоначално чрез мануални биохимични методи и чрез полуавтоматизираната система Crystal E/NF (Becton Dickinson). Всички карбапенем-нечувствителни изолати (n=38) бяха идентифицирани и чрез автоматизираната система Phoenix 100 (Becton Dickinson).

5.2. Определяне чувствителността на изолатите *K. pneumoniae* към антимикробни лекарствени средства.

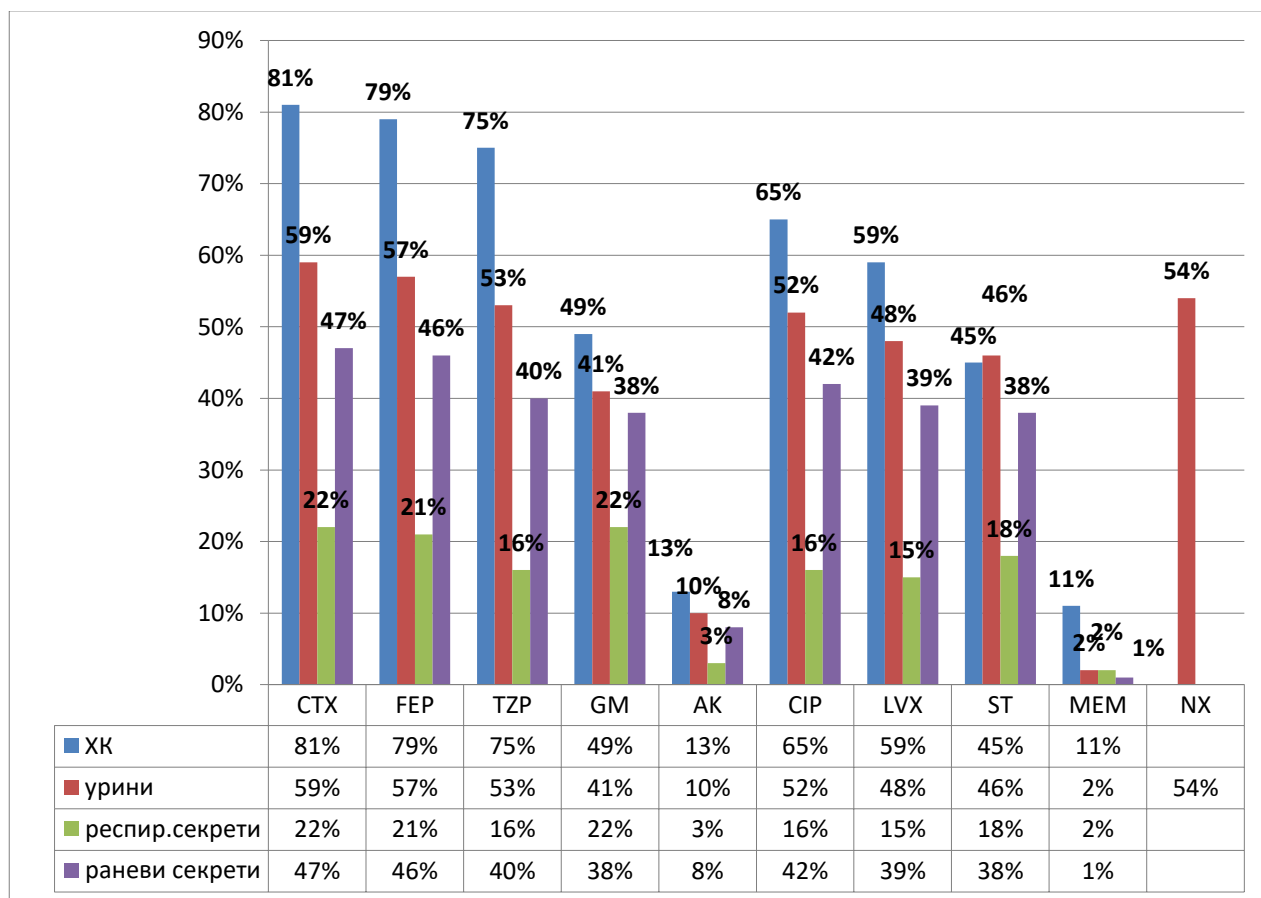
5.2.1. Изпитване на чувствителността към антимикробни лекарствени средства по дисково - дифузионния метод (ДДМ) на Bauer – Kirby.

Резистентността в цялата проучвана група изолати *K. pneumoniae* (n=1084), представена във възходящ ред е както следва: meropenem, 3.5% < amikacin, 9% < gentamicin, 38.3% < sulfamethoxazole/trimethoprim, 42.1% < levofloxacin, 42.8% < ciprofloxacin, 47.1% < piperacillin/tazobactam, 47.4% < cefepime, 52.8% < ceftazidime, 54.8% , cefotaxime, 54.8%. (фигура 4).



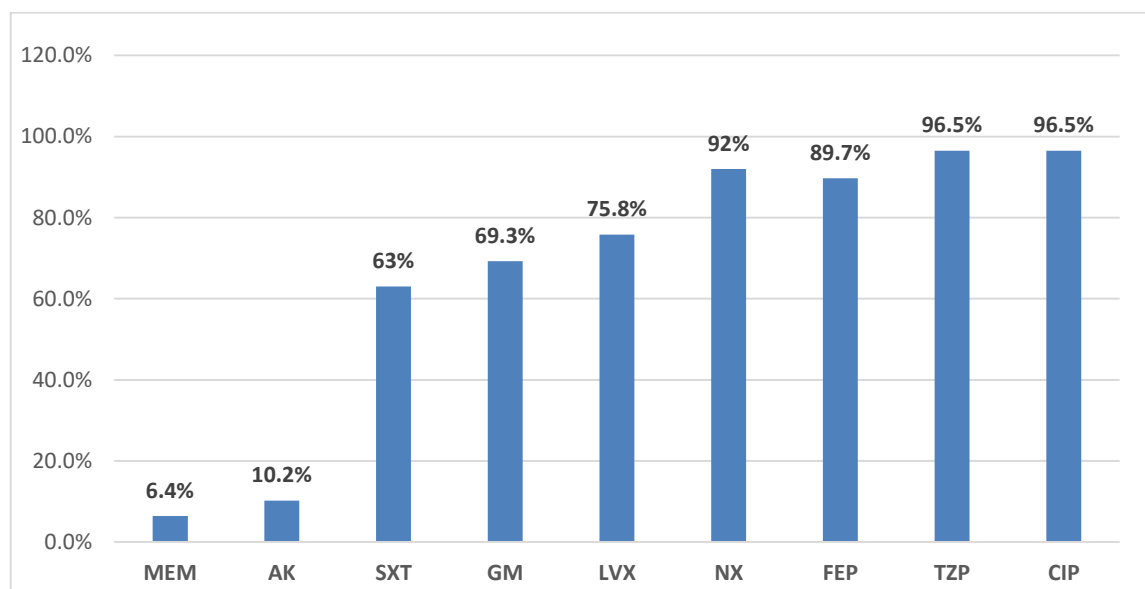
Фигура 4. Резистентност към антимикробни лекарствени средства в цялата проучвана група изолати *K. pneumoniae* (n=1084)

Резултатите от изпитването на чувствителността към набора от антимикробни лекарствени средства според анатомичното място на изолация са представени на фигура 5.



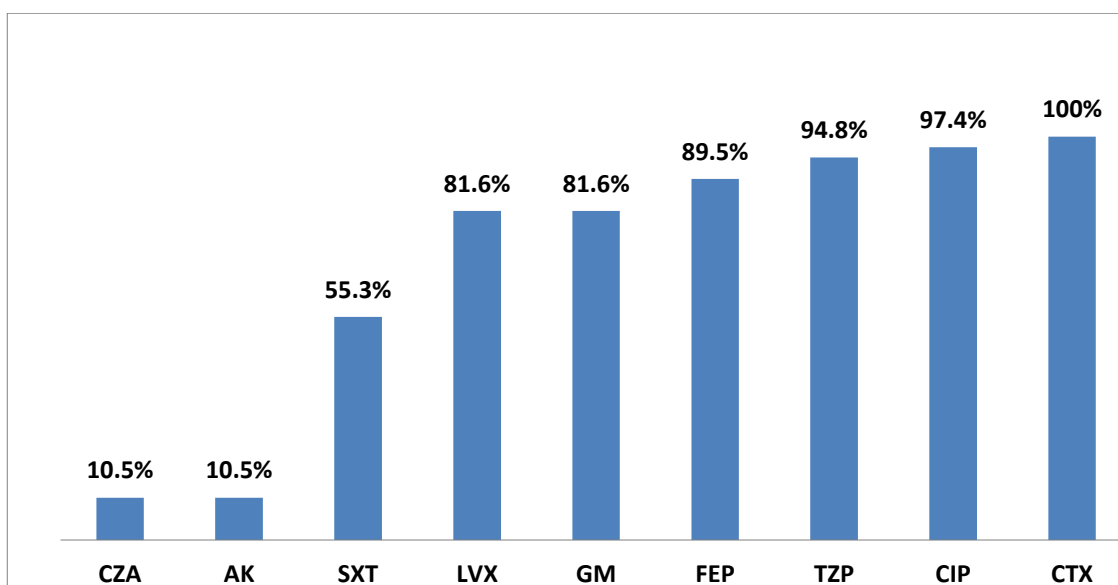
Фигура 5. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на 1084 клинични изолати *K. pneumoniae* според анатомичното място на изолация (%).

В групата на ceftazidime и cefotaxime резистентните изолати *K. pneumoniae* (n=589, 54.4%), нивото на антибиотична резистентност, показана във възходящ ред е както следва: meropenem, 6.4% < amikacin, 10.2% < sulfamethoxazole/trimethoprim, 63% < gentamicin, 69.3% < levofloxacin, 75.8% < ceferime, 89.7% < piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin, 96.5% и за двата (Фигура 6).



Фигура 6. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на 589 резистентни към трета генерация цефалоспорино изолати *K. pneumoniae* (%).

В групата на карбапенем-нечувствителните изолати *K. pneumoniae* (n=38), нивата на резистентност, показани във възходящ ред са както следва: ceftazidime/avibactam, amikacin, 10.5% < sulfamethoxazole/trimethoprim, 55.3% < gentamicin, 81.6%, levofloxacin, 81.6% < ceferime, 89.5% < piperacillin/tazobactam, 94.8 % < ciprofloxacin, 97.4% < cefotaxime, ceftazidime, 100%.



Фигура 7. Резистентност към антимикробни лекарствени средства на 38 карбапенем-нечувствителните изолати *K. pneumoniae* (%).

На таблица 8 е показана чувствителност към ceftazidime/avibactam на 38 карбапенем-нечувствителни изолати *K. pneumoniae*.

Таблица 8. Чувствителност към ceftazidime/avibactam на 38 карбапенем-нечувствителни изолати *K. pneumoniae* (брой) според носителство на карбапенемазни гени.

Брой изолати <i>K. pneumoniae</i> произвеждащи съответните карбапенемазни гени	CZA Чувствителност	CZA Резистентност
KPC-2 (n=32)	(n=32)	
KPC-2 / VIM-1(n=1)	(n=1)	
OXA-48 (n=1)	(n=1)	
VIM-1 (n=1)		(n=1)
NDM-1 (n=3)		(n=3)

Съкращения: CZA, ceftazidime/avibactam

На таблици 9 и 10 сравнително са предствени нивата на резистентност в цялата колекция изолати *K. pneumoniae*, в групата на ceftazidime, cefotaxime-резистентните и в групата на карбапенем-резистентните изолати.

Таблица 9. Сравнително представяне на нивата на резистентност в цялата колекция *K. pneumoniae* и групата на ceftazidime, cefotaxime-резистентните изолати.

антибиотик	Цяла колекция изолати (%) n=1084	Резистентни на цефалоспорино 3 ген (%) n=589	P
MEM	3.5%	6.4%	P = 0.0001
AK	9%	10.2%	P = 0.48
SXT	42.1%	63%	P = 0.0001
GM	38.8%	69.3%	P = 0.0001
LVX	42.8%	75.8%	P = 0.0001
FEP	52.8%	89.7%	P = 0.0001
TZP	47.4%	96.5%	P = 0.0001
CIP	47.1%	96.5%	P = 0.0001

В **bold** са означени статистически значимите P

Таблица 10. Сравнително представяне на нивата на резистентност в групата на ceftazidime, cefotaxime-резистентни и карбапенем-нечувствителни изолати *K.pneumoniae*.

Антибиотик	Резистентни на цефалоспорино 3 ген (%) n=589	Карбапенем – нечувствителни (%) n=38	P
MEM	6.4%	100%	P = 0.0001
AK	10.2%	10.5%	P = 1.0
SXT	63%	55.3%	P = 0.68
GM	69.3%	81.6%	P = 0.529
LVX	75.8%	81.6%	P = 0.8
FEP	89.7%	89.5%	P = 1.0
TZP	96.5%	94.8%	P = 1.0
CIP	96.5%	97.4%	P = 1.0

В **bold** са означени статистически значимите P

5.2.2. Изпитване на чувствителността към антимикробни лекарствени средства чрез определяне на МПК на антибиотика.

5.2.2.1. Изпитване на чувствителността към colistin и tigecycline чрез определяне на МПК чрез микродилуционен метод.

Чувствителността към colistin бе изпитана чрез определяне на МПК на антибиотика за всички карбапенем - нечувствителни изолати *K. pneumoniae* (n=38) по микродилуционния метод в бульон чрез използване на Sensititre ТМ плаки. За интерпретацията на МПК на colistin бяха използвани граничните стойности за colistin за *Enterobacteriaceae*, определени от EUCAST v. 7.1 (МПК $\leq 2\mu\text{g/ml}$ – чувствителни; МПК $> 2\mu\text{g/ml}$ – резистентни). Осем изолата (21%) бяха определени като резистентни, демонстрирайки МПК_{colistin} $> 4\mu\text{g/ml}$. При останалите 30 изолата (79%) стойността на МПК_{colistin} беше $\leq 2\mu\text{g/ml}$, което определи тези изолати като чувствителни (Таблица 11).

Таблица 11. Чувствителност към colistin на 38 карбапенем-нечувствителни изолата *K. pneumoniae*, определена чрез микродилуционен метод в бульон (Sensititre ТМ).

МПК на colistin ($\mu\text{g/ml}$)	Карбапенем-нечувствителни <i>K. pneumoniae</i> (n=38)	Интерпретация (EUCAST 2017)
$>4\mu\text{g/ml}$	n=8	R (21.05%)
$2\mu\text{g/ml}$	n=4	S (10.53%)
$1\mu\text{g/ml}$	n=10	S (26.32%)
$0.5\mu\text{g/ml}$	n=16	S (42.11%)

Чувствителността към tigecycline бе изпитана чрез определяне на МПК на антибиотика за всички карбапенем - нечувствителни изолати *K. pneumoniae* (n=38) по микродилуционния метод в бульон чрез използване на Sensititre ТМ плаки. За интерпретацията на МПК на tigecycline бяха използвани граничните стойности за tigecycline за *Enterobacteriaceae*, определени от EUCAST v. 7.1 (МПК $\leq 1\mu\text{g/ml}$ – чувствителност; МПК >1 и $\leq 2\mu\text{g/ml}$ – интермедиерна чувствителност; МПК $>2\mu\text{g/ml}$ – резистентност). Дванадесет изолата (31.6%) бяха определени като резистентни, демонстрирайки МПК_{tigecycline} = $4\mu\text{g/ml}$. Два изолата демонстрираха МПК_{tigecycline} = $2\mu\text{g/ml}$ (интермедиерна чувствителност), а при останалите 25

изолата (65.8%) стойността на МПК_{tigecycline} беше $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, което определи тези изолати като чувствителни (Таблица 12)

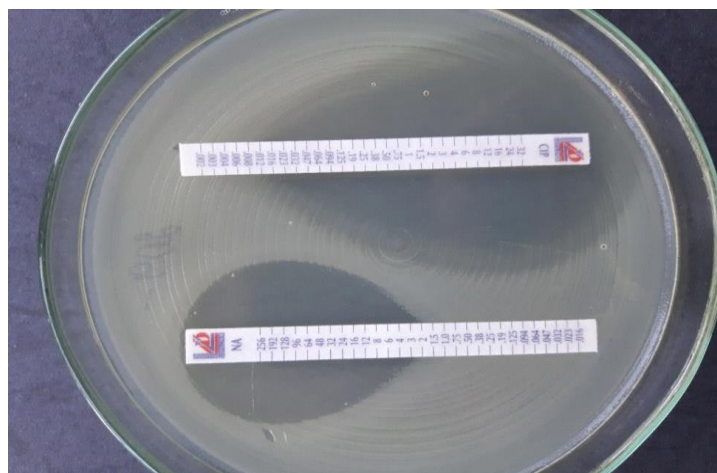
Таблица 12. Чувствителност към tigecycline на 38 карбапенем-нечувствителни изолата *K. pneumoniae*, определена чрез микродилуционен метод в бульон (Sensititre TM).

МПК на tigecycline ($\mu\text{g/ml}$)	Карбапенем-нечувствителни <i>K. pneumoniae</i> (n=38)	Интерпретация (EUCAST 2017)
4 $\mu\text{g/ml}$	n = 12	R (31.6%)
2 $\mu\text{g/ml}$	n = 1	I (2.6%)
1 $\mu\text{g/ml}$	n = 10	S (26.3%)
<1 $\mu\text{g/ml}$	n = 15	S (39.5%)

5.2.2.2. Изпитване на чувствителността към хинолони чрез определяне на МПК чрез Е-тест.

Чувствителността към хинолони на всички 159 изолата беше определена и чрез Е тест (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) (фигура 8).

Получените МПК на nalidix acid, ciprofloxacin и levofloxacin са показани на таблица 3.



Фигура 8. Е-тест за определяне на МПК на nalidix acid (NA) и ciprofloxacin (CIP) при клиничен изолат *K. pneumoniae*.

Таблица 13. Разпределение на МИК на nalidix acid, ciprofloxacin и levofloxacin при 159 изолата *Klebsiella pneumoniae*.

Антимикробен препарат	МИК mg/l																		
	0.04	0.125	0.19	0.25	0.38	0.5	0.75	1	1.5	2	3	6	8	12	16	24	≥32	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ciprofloxacin	1	-	-	-	-	2	-	-	2	4	-	2	3	6	5	-	136	≥32	≥32
Levofloxacin	-	1	-	-	-	7	4	4	1	2	-	7	15	10	15	-	93	≥32	≥32
	МИК mg/l																		
	≤0.75	1	1.5	2	3	6	8	12	16	24	32	48	64	98	128	≥256	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
Nalidix acid	-	-	-	-	4	3	1	2	1	2	-	-	-	-	-	146	≥256	≥256	

Обсъждане

В проучвания четири годишен период в УМБАЛ "Света Марина", Варна, *K. pneumoniae* е сред десетте най-често изолирани микроорганизми от общия брой изследвани клинични материали, като заема трето място по честота на изолируемост с относителен дял вариращ между 8.2% за 2014г. и 8.7% за 2017г. Голямата значимост на този причинител се подчертава от факта, че в етиологичната структура на бактериемииите за същия период, *Klebsiella pneumoniae* е най-честия изолат от кръв през 2014г. (7.2%), заема второ и трето място през 2017г. (8.8%) и 2016г. (8.4%), а през 2015г. е с относителен дял от 9.7% и с четвърто място в микробния спектър на бактериемииите.

Получените резултати в настоящото проучване демонстрират високи нива на резистентност при изолираните *K. pneumoniae* към основните антибиотични групи, използвани в клиничната практика. Най-високо ниво на резистентност се установява в групата на цефалоспорините от трета и четвърта генерация (ceftazime, cefotaxime, 54.8%, cefepime, 52.7%, piperacillin/tazobactam (47.4%), следвано от това към хинолоните (ciprofloxacin, levofloxacin - 47.1%, 42.8%) и към gentamicin (38.3%). Антимикробните средства с най-висока активност са меропенем (96% чувствителност), следван от amikacin (91%). За подобна колекция от 1021 изолата *K. pneumoniae*, изолирани от пациенти в Университетска болница в Бразилия през 2016г. Lorenzoni и колектив съобщават значително по-високи нива на резистентност към ciprofloxacin (68.7%), gentamicin (56.2%) и меропенем (52.6%), но по-ниски към amikacin (3.4%) (Lorenzoni, 2018). В това съобщение, високото ниво на резистентност към карбапенеми и фенотипът на множествена резистентност, демонстриран от изолатите се асоциира най-вече с продукцията на КРС карбапенемаза и честата употреба на карбапенемите като монотерапия в съответната болница. В скорошно проучване на S. Ryu и колектив върху антибиотичната резистентност на общо 6472 клинични изолати *K. pneumoniae*, изолирани от пациенти в Общинска болница в Южна Корея в периода 2012 – 2016г., се съобщава за статистически значимо нарастване на резистентността към piperacillin/tazobactam до 46% през 2016г. и за стабилизиране на относителния дял на levofloxacin и cefazidime резистентните *K. pneumoniae*, като се доказват средни нива от 30% и 34% съответно за проучвания 5 годишен период (Ryu, 2018), значително по-ниски от установените от нас -

54.8% към ceftazidime и 42.8% към levofloxacin. В допълнение, тридесет и седем медицински центъра в 12 азиатско-тихоокеански страни участващи в програмата SMART през периода 2008 - 2014 г. съобщават дори по-високи нива на резистентност към levofloxacin (64%), ciprofloxacin (72.9%), ceferime (86,3%) и ceftriaxone (99.7%) (Jean SS, 2017).

В настоящото проучване, се отчетоха статистически значими ($p = 0.0001$) разлики в нивата на резистентност към почти всички антибиотични препарати (с изключение на amikacin), сравнявайки цялата колекция 2014-2017г ($n=1084$) и групата изолати резистентни на трета генерация цефалоспорини ($n=589$) (таблица 9). В допълнение, в групата на резистентните на трета генерация цефалоспорини и тази на карбапенем-резистентните изолати, бяха отчетени статистически незначими разлики в нивата на резистентност към тестваните антибиотици, с изключение на карбапенемите ($p=0.0001$) (Таблица10.)

Сравняването на нивата на резистентност в групата на резистентните към цефалоспорини трета генерация и/или карбапенем и цялата група *K. pneumoniae* изолати показват ограничените терапевтични възможности в случаите на инфекции, причинени от такива щамове. Множество проучвания доказват, че подобни резултати се асоциират с продукцията на плазмидно кодирани карбапенемази и/или ESBLs. Различни типове плаزمиди, идентифицирани в семейство *Enterobacteriaceae*, играят важна роля за дисеминирането на бета-лактамазните гени. Някои от тези плазмиди (IncFI, IncFII, Inc A/C, Inc M/L and IncHI2) носят не само гени, кодиращи бета-лактамази, но също и гени, които медиат резистентността към хинолони (*qnr*, *aac*-(6)-Ib-cr, *qcrA*, *oqxAB*) и гени, асоцииращи се с резистентност към други антимикуробни препарати (аминогликозиди, trimethoprim/sulfamethoxazole). Този факт може да обясни честата асоциация на резистентността към бета-лактамните антибиотици (cefotaxime, ceftazidime, meropenem, imipenem) и резистентността към други антибиотични групи и фенотипа на множествена лекарствена резистентност, демонстриран от тези изолати.

Проучване от 2009г. върху ESBLs продукцията на резистентни към цефалоспорини от трета генерация клинични изолати *K. pneumoniae* от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ "Света Марина" – Варна идентифицира CTX-M-3 и CTX-M-15 ESBLs като

основен механизъм, асоцииран с резистентността към ceftazidime и cefotaxime (Марковска, 2012). Проучване, извършено през 2010г. върху динамиката в резистентността на най-честите бактериални патогени в болницата в периода 2004 - 2008г. установява нарастващи нива на резистентност в *K. pneumoniae* към цефалоспоринови от трета генерация, вариращи в диапазона 12% - 42%. В същото проучване резистентността към gentamicin е между 21% и 37%, а тази към ciprofloxacin – между 4% и 24%, с ясна тенденция за увеличаване (Стоева, 2010). Ежегодно мониторираните нива на резистентност към цефалоспоринови от трета генерация на основните бактериални видове от семейство *Enterobacteriaceae* в периода 2009 – 2013г. показват тенденция да остават високи при *K. pneumoniae*, като се стабилизират в диапазона 52-54% (непубликувани данни). Резултатите от настоящото проучване, отразяващо следващия 4 годишен период - 2014 - 2017г., потвърждават тази тенденция, като показват резистентност към cefotaxime (ceftazidime) от 54.8%. Сходно 10 годишно проучване върху резистентни към цефалоспоринови трета генерация Грам отрицателни бактерии в Университетска болница в Япония, обхващащо периода 2006 – 2015г., също установява нарастващ дял на резистентните към цефалоспоринови от трета генерация *K. pneumoniae* (вкл. ESBL продуциращи), но в значително по-слаба степен в сравнение с докладваните от нас нива: от 22% за 2006 г до 32% за 2015г. (Yamaguchi Hi 2018).

В настоящото проучване установяваме, че антибиотичната резистентност на тестваните изолати *K. pneumoniae* варира според анатомичното място на изолация. Инвазивните изолати от хемокултури демонстрират сигнификантно по-високо ниво на резистентност към всички тествани антибиотици в сравнение с изолатите от други видове клинични материали. Най-високо ниво на резистентност сред тази група изолати се доказва към цефалоспориновите от трета генерация cefotaxime и ceftazidime (81%). Този резултат е много близък до данните от по-ранно проучване върху проблемната антибиотична резистентност сред най-важните причинители на бактериемии в болницата в периода 2012 – 2014г., в което се установява много близък относителен дял на *K. pneumoniae*, резистентни към цефалоспоринови от трета генерация - 75% за 2012г. и 81% за 2013 и 2014г. (Стоева, 2016а). По данни на EARS-Net средната резистентност през 2016г. към цефалоспоринови от трета генерация за Европа за изолати *K. pneumoniae* от кръв и ликвори е 25.7%, като проследена в периода 2013-2016г. показва тенденция слабо да се

понижава <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>.

Данните показват широки вариации в стойностите на проследявания показател: от 0% за Исландия до 72.5% (2016г.) за България и Гърция. Гърция и нашата страна заемат първо място сред общо 30 държави - участнички в мониторинга. По данни на EARS-Net през 2016г. в общо 8 държави резистентността към цефалоспорици от трета генерация е над 50%. Страни с близки до средните европейски стойности са: Малта, Испания, Белгия, Словения, Франция. Нива над 30% се установяват в Унгария (35-37%), Португалия (40-47%), Латвия (52-47%) и Хърватия (47-49%) (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>). За периода 2013-2016г. за 6 страни (от общо 30) се установява сигнификантно увеличение на тази резистентност. За същия период националните данни сочат, че в България се наблюдава статистически незначима тенденция за намаляване на резистентността, като тя се движи от 74.8% през 2014г. до 75% през 2015г. и 72.5% през 2016г. Получените от нас локални данни за периода 2014 – 2016г. са много близки до съобщаваните на национално ниво. По-голяма част от cefotaxime – резистентните инвазивни изолати *K. pneumoniae*, изолирани от хемокултури, демонстрират множествена резистентност, което създава сериозно терапевтично затруднение и е значим фактор за изхода от инфекциите на кръвта, асоциирани с такива изолати. След бета-лактамната група антибиотици (ceftazidime, cefotaxime, piperacillin/tazobactam), най-високи нива на резистентност в нашето проучване се доказват за хинолоните ciprofloxacin и levofloxacin, както в цялата проучвана група, така в групата на изолатите от хемокултури (65% и 59% съответно). По данни на EARS-Net за 2016г. резистентността към хинолони в инвазивни изолати *K. pneumoniae* за Европа се движи от 0% за Исландия до 68.6% за Гърция. Заедно с Литва, Италия, Румъния, Чехия, Словакия и Полша, България е сред 8-те държави с нива на резистентност над 50% (55.6%), което съответства на получените от нас резултати. Средното Европейско ниво на резистентност към хинолони за 2016г. е 24.6%, като за периода 2014 – 2016г. данни за сигнификантно намаляване на тази резистентност се установява само в две от общо 30 мониториращи държави (Дания и Австрия) (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>).

Подобно на хинолоните, настоящото проучване установява силно редуциране на чувствителността на инвазивните изолати *K. pneumoniae* и към gentamicin (49%). По данни на EARS-Net за 2016г., България е страната, в която се регистрира най-високо ниво на

резистентност към аминогликозиди в инвазивни изолати *K. pneumoniae* (64.4%). Мониторингът установява значителни вариации за Европа: от 0% за Исландия до над 50% за страни като Гърция, Полша, Румъния, Словакия и България. Средното Европейско ниво на аминогликозидна резистентност за 2016г. е 19%, като за периода 2014 – 2016г. се установява сигнификантно намаляване (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>). Положителен резултат от настоящото проучване е съхранената активност на amikacin (13% резистентност), като този антибиотик е сред най-активните препарати срещу изолати *K. pneumoniae* от кръв, заедно с meropenem. В съответствие с нашите резултати, данните от EARS-Net 2015г. сочат, че само 17.2% от инвазивните изолати *K. pneumoniae* в Европа (15 421 изолата) са едновременно резистентни на gentamicin и amikacin (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2015>).

В настоящото проучване, подобно на изолатите от кръв, високи нива на антибиотична резистентност се установяват и сред групата изолати *K. pneumoniae* от урини: cefotaxime (59%), cefepime (57%), piperacillin/tazobactam (53%), gentamicin (41%), ciprofloxacin (52%) и levofloxacin (48%). Като част от програмата SMART 2013 – 2015, Karlowsky и колектив съобщават следните нива на резистентност сред 597 изолата *K. pneumoniae*, изолирани от хоспитализирани пациенти с инфекции на уринарния тракт (ИУТ) в 11 страни от Латинска Америка: ceftazidime – 48.9%, cefepime – 50.4%, amikacin – 7.7%, imipenem – 18.7%, levofloxacin – 42.7%, piperacillin/ tazobactam – 38.6% (Karlowsky, 2017a). Подобно проучване върху 575 изолата *K. pneumoniae*, изолирани от хоспитализирани пациенти с ИУТ в страни от Азиатско-Тихоокеанския регион в същия период, показва по-ниски нива на резистентност от установените в Латинска Америка: ceftazidime - 31.8%, cefepime - 29.3%, amikacin - 3.7%, imipenem - 4.6%, levofloxacin - 25.9%, piperacillin/tazobactam - 18.6% (Karlowsky, 2017b). За разлика от тези проучвания, ние установяваме по-високи нива на резистентност към всички тествани антибиотични групи с изключение на карбапенемите (2% резистентност). Съществени различия установяваме по отношение чувствителността към cefotaxime (ceftazidime), levofloxacin и piperacillin/tazobactam, като установените от нас нива на резистентност са съответно 59%, 48% и 53%.

В контраст с изолатите от кръв и урина, *K. pneumoniae* от респираторни секрети и в по-малка степен тези от раневи секрети демонстрират по-ниски нива на резистентност към всички изпитвани антибиотични групи: cefotaxime – 22% и 47% съответно, ceferime – 21% и 46%, piperacillin/tazobactam – 16% и 40%, ciprofloxacin – 16% и 42% и levofloxacin – 15% и 39%.

И в четирите групи изолати (кръв, урина, рани, респираторни секрети) най-активните антибиотици са меропенем с нива на резистентност, вариращи от 1 до 11% и amikacin - от 3 до 13%.

В настоящото проучване резистентността към карбапенеми в цялата колекция от изолати е 4%, като при *K. pneumoniae* от кръв това ниво е най-високо - 11% и е над средното за Европа за периода 2014 - 2016г. (6.1%) (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>). Карбапенемната резистентност в настоящото проучване се асоциира предимно с инвазивните изолати *K. pneumoniae* от кръв, като най-големият брой резистентни изолати бяха доказани през 2014г. (23%), а в следващите години наблюдавахме спад до 8.7% (2015г.), 5.4% (2016г.) и 2.5% (2017г.) съответно (непоказани данни). Сред причините за повишената изолируемост на инвазивни, карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* в УМБАЛ „Света Марина“ – Варна, са възможна вътреболнична дисеминация на епидемични, карбапенем-резистентни клонове *K. pneumoniae*, вътревидов хоризонтален трансфер на гените, кодиращи резистентност към карбапенемни антибиотици или внасяне на различни (в генетично отношение) карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* изолати в болницата. Мониторирането на тази проблемна резистентност в УМБАЛ „Света Марина“ показва, че в периода 2007-2011г. активността на карбапенемните антибиотици срещу инвазивни изолати *K. pneumoniae* е напълно съхранена (0% резистентност). Първите карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* са идентифицирани в периода април – август 2012г. (Markovska R, 2013; Стоева, 2013; Стоева, 2016а). В национален мащаб в периода 2007 – 2011г. карбапенемната резистентност сред изолатите *K. pneumoniae* от хемокултури в България е под 1%, а в периода 2013- 2016г. се движи в диапазона 0% - 7.2% (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>). Процентът на карбапенем-резистентните изолати сред всички 30 Европейски мониториранни държави за 2016г. варира в широки граници – от 0% в

Хърватска, Словения, Норвегия, Чехия, Естония, Исландия, Люксембург до 31.4% за Румъния, 33.9% - Италия и 66.9% за Гърция, където се доказва вътре- и междуболнична дисеминация на хиперепидемичен карбапенем-резистентен клон *K. pneumoniae*. (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>. Макап, че за сигнификантно увеличение на този тип резистентност сред *K. pneumoniae* за периода 2013 – 2016г. се съобщава единствено в Португалия и Гърция, положението е много тревожно, тъй като оставащите терапевтични алтернативи за инфекциите, причинени от карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* са изключително малко и често се ограничават до използването на colistin, tigecycline и fosfomycin. Това се потвърждава и от резултатите в настоящото проучване, които показват още по-изразена множествена резистентност, сравнена с тази при ESBL продуциращите изолати *K. pneumoniae* от хемокултури, като сред засегнатите антибиотици е и colistin (21% резистентност). По литературни данни инфекциите на кръвта, причинени от карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* се асоциират със значителна смъртност – между 22% и 72%, една от причините, за което е ненавременната и често липсваща ефективна антибиотична терапия (Стоева 2016а; Borer A, 2009; Diene S.M 2014).

В настоящото проучване беше определена чувствителността и към три антимикробни лекарствени препарата, определяни като стратегически антибиотици и средства на последен избор в случаите на инфекции, причинени от карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae* - ceftazidime/avibactam, colistin и tigecycline. Получените от нас резултати показват, че в групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, с най-добра активност заедно с amikacin (10.5% резистентност), са ceftazidime/avibactam (10.5%), следван от colistin (21%) и tigecycline (34.2%).

Avibactam е принципно нов, синтетичен бета-лактамазен инхибитор с не-бета-лактамна структура. Въведен официално в клинична употреба в началото на 2015г. в състава на комбиниран препарат заедно с цефалоспоринон от III генерация - ceftazidime, основните му показания за приложение се отнасят до интраабдоминални инфекции (в съчетание с metronidazole) и усложнени инфекции на уринарния тракт. Обширни клинични проучвания сочат добрата ефективност на препарата и при лечението на нозокомиални пневмонии, включително такива, асоциирани с механична вентилация (Sader HS, 2014;

Lagacé-Wiens, 2014). Терапевтичният спектър на ceftazidime-avibactam включва множество резистентни Грам-отрицателни бактерии от семейство *Enterobacteriaceae* (вкл. *Klebsiella pneumoniae*) и *Pseudomonas aeruginosa*, продуциращи широкоспектърни β -лактамази от клас А (ESBLs), карбапенемази от клас А (KPC) и/или β -лактамази от клас С (AmpC ензими – предимно цефалоспоринази). За разлика от тях, ензимите от клас В, известни като метало- β -лактамази, също с карбапенемазна активност (NDM, VIM, IMP, VEB, PER) са устойчиви на действието на avibactam, поради което бактерии, продуценти на този тип карбапенемази не се повлияват от комбинирания препарат. При лечение на инфекции, предизвикани от *Acinetobacter* spp., avibactam не повишава в значима степен активността на ceftazidime при самостоятелно приложение (Lagacé-Wiens, 2014).

Множество проучвания демонстрират добрата *in vitro* активност на ceftazidime/avibactam по отношение на карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, съобщавайки висок относителен дял на чувствителни изолати (Alatoom, 2017; Lagacé-Wiens, 2014). Получените от нас резултати напълно потвърждават тези данни. Практически всички изолати, доказани като продуценти на карбапенемазата от клас А - KPC-2 (таблица 8.), демонстрираха напълно съхранена чувствителност към ceftazidime/avibactam. Интерес представлява и факта, че единственият изолат, при който бе установена продукция на две различни бета-лактамази с карбапенемазна активност – KPC-2 и VIM-1 (клас В метало-бета лактамаза), също показва чувствителност към комбинирания препарат. Предвид неефективността на ceftazidime/avibactam спрямо метало-беталактамазите (вкл. VIM), тази находка свързахме с вероятно ниско ниво на експресия на *bla_{VIM-1}* гена при доминиращ ефект на KPC-2 карбапенемазата. Като се вземе под внимание характерния профил на активност на ceftazidime/avibactam, всички NDM-1 продуциращи изолати *K. pneumoniae* бяха доказани като резистентни към действието му. Потенциалният риск от клонално дисеминиране на NDM – продуциращи *K. pneumoniae* и често липсата на алтернатива за лечение на подобни проблемни изолати представляват сериозно предизвикателство при избора на подходящ терапевтичен режим. Получените от нас данни обаче, сочат много нисък относителен дял на NDM-1 продуциращи *K. pneumoniae* в проучвания период от време и доминиране на KPC-2 продуциращите изолати *K. pneumoniae* в интензивните болнични структури (виж т. 5.3.4.). В този смисъл, приложението на ceftazidime/avibactam е сред малкото добри терапевтични опции за

пациентите. Предимство на комбинирания препарат е добрата му поносимост, липсата на кумулативен ефект и сериозни странични ефекти при стандартен дозов режим от 2g ceftazidime и 500mg avibactam в интравенозна инфузия на всеки 8 часа.

Скорошно проспективно мултицентърно проучване от 2018г., сравняващо ефикасността на ceftazidime/avibactam и colistin при лечението на тежки инфекции, причинени от карбапенем-резистентни чревни бактерии (предимно *K. pneumoniae*) установява значимо по-ниски нива на смъртност и по-висока вероятност за благоприятен изход в групата пациенти, лекувани с ceftazidime/avibactam. Авторите определят ceftazidime/avibactam като добра алтернатива на colistin при лечението на асоциираните с карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* инфекции (Van Duin, 2018).

Полимиксиновият антибиотик colistin е одобрен за клинична употреба още в края на 50-те години на 20-ти век, но поради съобщения за висок риск от невро- и нефротоксичност не е бил широко използван в терапевтичната практика. Впоследствие проучванията показват, че рискът от потенциални токсични усложнения при употребата на colistin е по-нисък от първоначално установения и понастоящем той се използва успешно за лечение на инфекции, предизвикани от множество резистентни Грам - отрицателни бактерии, основно *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, но и карбапенем - резистентни ентеробактерии, сред които *K. pneumoniae* (Landman, 2008). Поради повсеместното разпространение на този тип патогени, употребата на colistin е нарастнала драматично, което закономерно води до повишаване на нивата на резистентност към този препарат (Mopoulos, 2014; Otter, 2017). Колистиновата резистентност сред *K. pneumoniae* е вече широко разпространена в много региони на Европа, Северна и Южна Америка, Азия и Южна Африка, като този феномен най-често бива обвързан със селективния натиск от употребата му (Ah YM, 2014). В настоящото проучване резистентността към colistin сред карбапенем-резистентните изолати е 21%. По-висок дял на колистинова резистентност съобщават Ю. Проевска и колектив при проучване върху клинични MDR изолати *K. pneumoniae*. Авторите установяват по-високо ниво на резистентност към colistin при карбапенем-нечувствителни (32.9%) в сравнение с карбапенем-чувствителни изолати *K. pneumoniae* (14.3%) (Проевска- Мартева). Савов също съобщава за резистентност към colistin в карбапенем-резистентни *K. pneumoniae*, продуценти на KPC-2 и SHV-5 бета-лактамази, изолирани в България (Savov, 2017). В допълнение, EARS Net докладва 8.8%

резистентност към colistin сред общо изследвани 26.3% от всички инвазивни изолати *K. pneumoniae* през 2015г. в Европа, като по-голяма част от тези изолати са докладвани от Гърция и Италия (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2015>). Сред тестваните на colistin карбапенем-резистентни изолати, 31.9% са резистентни, докато едва 2.6% от карбапенем-чувствителните *K. pneumoniae* са и colistin-резистентни. Много голям дял (95%) от изолатите с комбинирана (карбапенемна и колистинова) резистентност са съобщени от Гърция и Италия (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2015>; Ah, 2014). Наскоро публикувано обширно проучване в Гърция, обхващащо 15-годишен период, демонстрира сигнификантна зависимост между употребата на colistin и развитието на резистентност към препарата сред инвазивни, карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae*. Регистрирано е драматично покачване на колистиновата резистентност от 0 до 26% в проследявания период. Авторите допускат участието и на други, допълнителни фактори за появата на устойчивост в част от проследяваните пациенти (Tansarli, 2018). При проучване на свързани със здравето обслужване инфекции на кръвта, бързо нарастване на колистиновата резистентност сред *K. pneumoniae*, е установено и в друга съседна на България държава – Турция. Доказана е ясна зависимост между резистентността към colistin и карбапенемни от една страна и риска от фатален изход на заболяването от друга (Aydin, 2018).

Сред най-значимите фактори за възникване на резистентност към colistin се оценяват повишената консумация на антибиотика, като особено рискови са провеждането на монотерапия с colistin, продължителността на лечението (над 14 дни), както и субоптималното дозиране на препарата. За *K. pneumoniae* е характерен феноменът „хетерорезистентност“ към colistin, който се проявява с наличие на субпопулации с различно ниво на резистентност в щамове, определени като чувствителни при използване на стандартни методи за определяне на чувствителност (Silva 2016; El-Halfawy 2015). Смята се, че дори при оптимално дозиране на colistin съществува риск от развитие на резистентност, поради селектиране на хетерорезистентните субпопулации (El-Halfawy 2015; Blondeau, 2009). Не бива да се забравя обаче също, че повишаване нивото на колистинова резистентност в дадена болнична структура може да се дължи и на клонално

разпространение на даден епидемичен colistin резистентен щам в хода на вътреболнична епидемия с различна интензивност и продължителност във времето.

Tigecycline е първият глицилциклинов антибиотик и е един от малкото нови препарати с активност срещу Грам-отрицателни бактерии, включващи множество резистентни *Enterobacteriaceae* и *A. baumannii*. Освен кожни, мекотъканни и интраабдоминални инфекции, инфекциите, причинени от множество резистентни Грам отрицателни бактерии, също са сред показанията за приложение на препарата. В последните години обаче се появяват редица съобщения за резистентност към tigecycline при лечение на инфекции, причинени от мултирезистентни *K. pneumoniae*. В САЩ в мултицентрово проучване сред 287 хоспитализирани пациенти се съобщава за висок дял на tigecycline нечувствителни *K. pneumoniae*, асоциирани с различни инфекции. В това проучване Van Duin и кол. установяват, че в 46% от случаите на инфекции с карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* се доказва интермедиерна чувствителност или резистентност към tigecycline (van Duin, 2015a). Подобни данни съобщават Elgendy и кол. в университетска болница в Египет, установявайки 39.1% резистентност към tigecycline сред неутропенични пациенти от интензивно хематологично отделение, инфектирани с *K. pneumoniae*, без преди това да е провеждано лечение с tigecycline (Elgendy SG, 2018). В унисон с тези данни, нашите резултати показаха резистентност над 25% (34.2%) към tigecycline в групата на карбапенем-резистентните изолати *K. pneumoniae*. В този смисъл, към настоящия момент tigecycline би могъл да се използва като алтернатива за терапия на инфекции, причинени от карбапенем и/или и colistin резистентни *K. pneumoniae*, но след изпитване на чувствителността на izolata.

В заключение, изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства установи висок процент на резистентност към цефалоспоринони от III генерация (54.8%) на изолати *Klebsiella pneumoniae* за периода 2014 – 2017г. Резистентните на цефалоспоринони трета генерация изолати демонстрираха във висока степен резистентност към представители и на други антибиотични групи – piperacillin/tazobactam (96.5%), ciprofloxacin (96.5%), trimethoprim/sulphamethoxazole (63.0%) и gentamicin (69.3%). Значително по-високи нива на резистентност бяха установени при изолати *K. pneumoniae* от кръв и урина в сравнение с тези от раневи секрети и секрети от респираторния тракт. В

групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, единствено ceftazidime/avibactam и amikacin демонстрираха най-добра in vitro активност.

5.3. Проучване на механизмите на резистентност към β -лактами.

5.3.1. Фенотипни методи за доказване продукцията на β -лактамази

5.3.1.1. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукция на широко-спектърни β -лактамази.

С цел скрининг при 159 клинични изолата *K.pneumoniae* се приложи двойно - дисковия тест за синергизъм (DDST) по метода на Jarlier (таблица 14). Заложени бяха следните дискове: cefotaxime 30 μ g, ceftriaxone 30 μ g, ceftazidime 30 μ g и amoxicillin/clavulanic acid (20/10). При 122 изолата (76.7%) бе отчетен положителен резултат: синергизъм между дисковете, натоварени с цефалоспоринов препарат от III генерация (CTX 30, CRO 30 или CAZ 30) и диска amoxicillin/clavulanic acid (фигура 9). При 3 изолата (1.9%) се получи феномен на антагонизъм, при 5 (3.14%) се отчете едновременно синергизъм и антагонизъм (фигури 10, 11), а при 29 изолата липса на ефект.

Таблица 14. Разпределение на изолатите *K pneumoniae* според ефекта при DDST за определяне продукцията на ESBL.

Общ брой изпитвани клинични изолати <i>K. pneumoniae</i> (брой)	Ефект на синергизъм	Ефект на антагонизъм	Синергизъм + Антагонизъм	Липса на ефект
n = 159	n=122 76.7%	n=3 1.9%	n=5 3.14%	n=29 18.2%



Фигура 9. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукция на широко-спектърни β -лактамази: наличие на зона на синергизъм между дисковете amoxicillin/clavulanic acid 20/10 (AMC 30) и дискове ceftriaxone 30 μ g (CRO 30) и ceftazidime 30 μ g (CAZ 30).



Фигура 10. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукция на широко-спектърни β -лактамази: наличие на зона на антагонизъм между дисковете amoxicillin/clavulanic acid 20/10 (AMC 30) и дискове ceftriaxone 30 μ g (CRO 30) и ceftazidime 30 μ g (CAZ 30).



Фигура 11. Двойно - дисков синергичен тест (DDST) за доказване продукция на широко-спектърни β -лактамази: наличие на зони на синергизъм и антагонизъм между дисковете amoxicillin/clavulanic acid 20/10 (AMC 30) и дискове ceftriaxone 30 μ g (CRO 30) и ceftazidime 30 μ g (CAZ 30).

При последващите PCR реакции общо 149 изолата (93.7%) бяха определени като продуценти на ESBLs (виж т. 5.3.2.). Данните показват, че чувствителността на теста е 122/149 – 81,8%. Този сравнително висок процент е получен при намаляването на разстоянието между дисковете amoxicillin/clavulanic acid и ceftazidime или cefotaxime от 2.5 см на 2 см, което увеличи шанса за поява на синергизъм. В част от изолатите се установи феномен на антагонизъм (три изолата), а при други - синергизмът беше придружен с феномен на антагонизъм поради индуциране на AmpC ензимите от clavulanic acid, което по-късно при проведените молекулярно-генетични анализи бе потвърдено и в осемте изолата *K. pneumoniae*, които демонстрираха феномен на антагонизъм и бяха идентифицирани като DHA-1 продуценти (виж т. 5.3.2.)

5.3.1.2. Модифициран Hodge тест (МНТ).

При 38 карбапенем-нечувствителни изолата бе приложен модифициран Hodge тест. Положителни резултати получихме при 92% (n=35) от изолатите. При останалите 2 изолата се отчетоха отрицателни резултати, а при един много слабо положителен резултат.

При последващите PCR реакции всички 38 карбапенем-нечувствителни изолата

бяха доказани като продуценти на карбапенемази (вж т. 5.3.2.)

Обсъждане

Бързото идентифициране на продукцията на бета-лактамази с широк спектър на действие в медицински значими Грам отрицателни бактерии е от изключителна важност за провеждане на адекватна антибиотична терапия и ограничаване разпространението на такива щамове в болничната среда. Понастоящем са разработени множество тестове за детекция на ESBLs и AmpC ензими (Polsfuss, 2012; Fahim et al., 2017, Shaikh N. K 2016).

Един от най-често използваните фенотипни методи за детекция на широкоспектърни бета-лактамази сред представителите на семейство *Enterobacteriaceae* е т.нар. двойно дисков тест за синергизъм (DDST), въведен от Jarlier (Jarlier, 1988). Това е най-често използваният тест в рутинната микробиологична диагностична практика, чиято цел е извършване на бърз скрининг за ESBLs продукция сред клинично значимите изолати (http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/). Този тест е лесно изпълним, но не е неподходящ за детекция на ESBLs в присъствието на AmpC β -лактамази, тъй като последните са устойчиви на clavulanic acid (Jacoby, 2009).

Понастоящем CLSI (<http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2016-M100-S26.pdf>) препоръчва фенотипен метод за детекция на ESBLs единствено при *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* и *P. mirabilis*, но не и при AmpC – продуциращи представители на семейство *Enterobacteriaceae*. От 2015г. в България е утвърден Европейския стандарт EUCAST за определяне на микробна лекарствена резистентност. Според този стандарт (EUCAST, 2018) чувствителността в представителите на семейство *Enterobacteriaceae* към цефалоспорици трябва да се интерпретира според отчетените зони на задръжка, а фенотипните методи за скрининг за ESBLs продукция да се извършват с епидемиологична цел (<http://www.eucast.org>).

По-трудно и недостатъчно надеждно е осъществяване на детекция на AmpC-продуциращи бактерии с фенотипни тестове. Борониевата киселина и нейните деривати са известни като AmpC инхибитори. Поради тази причина борониевата киселина се използва в някои фенотипни тестове като AmpC инхибитор, но този метод се характеризира с незадоволителна специфичност, тъй като борониевата киселина успява да инхибира и други β -лактамази от клас А (Jacoby, 2009). Недостатък на фенотипните тестове е и

невъзможността им да разграничават различните семейства плазмид-медирани AmpC ензими и хромозомни такива (Jacoby, 2009). Поради тази причина multiplex PCR реакцията се явява основен метод и „златен стандарт“ за детекция на гените кодиращи AmpC ензимите.

Други автори използват tazobactam и ceftipime с цел разграничаване на фалшиво-отрицателните резултати при детекцията на ESBL в присъствието на AmpC β -лактамаза. Tazobactam е много слаб индуктор на AmpC β -лактамазите, а ceftipime (като индикаторен антибиотик) е по-надежден при детекцията на ESBLs в присъствие на AmpC β -лактамази, а така също е и по-устойчив при свръхпродукция на хромозомни AmpC β -лактамази. Така например в свое проучване Fahim и колектив изследват 70 изолата *E. coli*, от които 34 продуценти на ESBL. Чрез класическия DDST те доказват едва 12 от тези 34 ESBL продуциращи изолати, докато с модифицираният тест с tazobactam и ceftipime идентифицират ESBL продукцията в 33 от изолатите, включително и в 14 изолата, копродуценти на AmpC β -лактамази (Fahim, 2017).

В настоящата работа беше установена липса на синергизъм и/или наличие на синергизъм/антагонизъм при DDST при 29 изолата. Феноменът на антагонизъм може да се асоциира с наличие на плазмидни AmpC β -лактамази, които при наличие и на ESBL се комбинира със синергизъм. Липса на синергизъм при DDST в изолати, резистентни на широкоспектърни цефалоспорини и/или такива с намалена чувствителност към карбапенеми може да се асоциира със високите нива на резистентност при комбинациите от ESBL и карбапенемази и липса на каквато и да било зона около дисковете, както и с неензимно медирана резистентност напр загуба на OmpK35 и OmpK36 порини (Martínez-Martínez, 2008).

По отношение на продукцията на карбапенемази съществуват различни фенотипни методи за детекция, но нито един не е достатъчно надежден или универсален. Модифицираният тест Hodge е лесно изпълним и е добър за детекция на серин-базирани карбапенемази. Той обаче често дава фалшиво отрицателни или съвсем слабо положителни резултати при металобета-лактамазите. В настоящата работа положителните изолати от провеждането на МНТ в следствие се доказаха като продуценти на KPC-2 карбапенемазата (33 изолата), OXA-48 (един изолат) и VIM-1 (два изолата, единият от

които копродуцент на KPC-2). Двата изолата с отрицателен Ходж тест и единственият – със слабо позитивен, се доказаха като продуценти на NDM-1 карбапенемаза.(вж т. 5.3.2.)

По литературни данни най-използвани методи са двойно-дисковия синергистичен тест (DDST) и комбинирания дисков тест (CDT). При DDST се използва диск с карбапенем, поставен до диск с MBL инхибитор (най-често EDTA) (Miriagou, 2010; Hrabak, 2014). За детекция на MBLs се използват E-тест ленти натоварени с imipenem и imipenem плюс EDTA или meropenem и meropenem плюс EDTA (Miriagou, 2010; Girlich, 2013). Детекцията на KPC се базира на феномена на инхибиране на ензима от борониева киселина (Pasteran, 2008). Най-прецизната идентификация днес е доказването на карбапенемазни гени с молекулярно-генетичните техники - PCR (вкл. Real Time PCR) с последващо секвениране на гена (Nordmann, 2011a).

В заключение, проведеният двойно-дисков синергичен тест с цефалоспорино трета генерация и amoxicillin/clavulanic acid (20/10) за установяване наличието на ESBLs β -лактамази в изолати от *K. pneumoniae* очаквано се характеризира със сравнително добра чувствителност – 81 % , както и модифицирания тест за наличие на карбапенемази се характеризира с добра чувствителност - 92%.

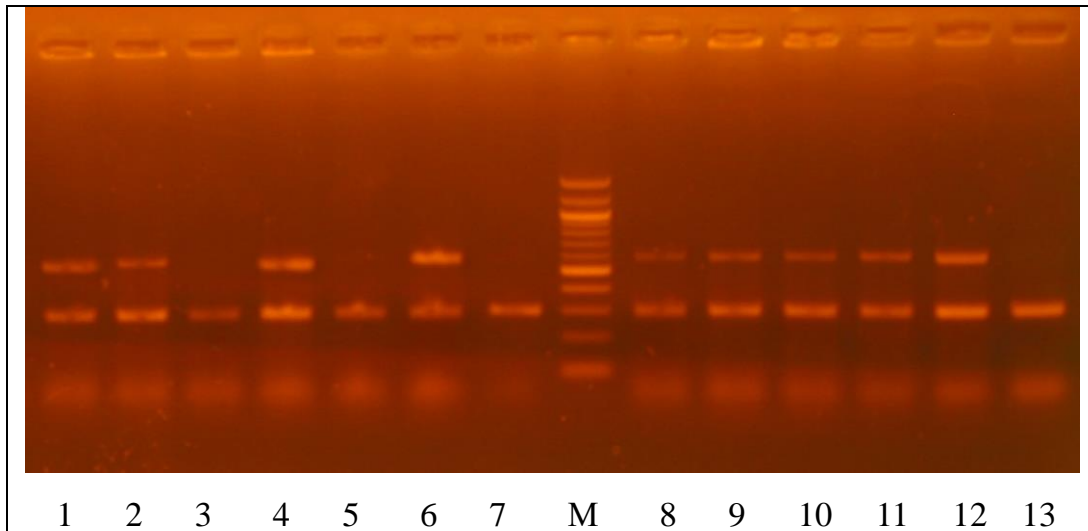
5.3.2. Молекулярно - генетична идентификация на ESBL

5.3.2.1. PCR метод за доказване на гени, кодиращи β -лактамази

С цел установяване на генетичните механизми на резистентност към β -лактами беше приложен PCR метода и секвениране за доказване на най-често срещаните гени, кодиращи широко спектърни β -лактамази (CTX-M и SHV ESBLs от клас A), карбапенемази (клас A, B, D), основните AmpC ензими от клас C, както и OXA β -лактамази от клас D, според установените от изоелектричното фокусиране резултати.

- **PCR за доказване на гени, кодиращи CTX-M и SHV ESBLs**

При всички 159 изолата *K. pneumoniae* беше приложен multiplex PCR за детекция на *bla*_{CTX-M} и *bla*_{SHV}. Генерираните PCR продукти бяха с големина 290 bp за *bla*_{SHV} и 585 bp за *bla*_{CTX-M} съответно (фигура 12). При 93.1% от изолатите (n=148) се доказа наличие на *bla*_{CTX-M}, а при 100% (n=159) - *bla*_{SHV}.

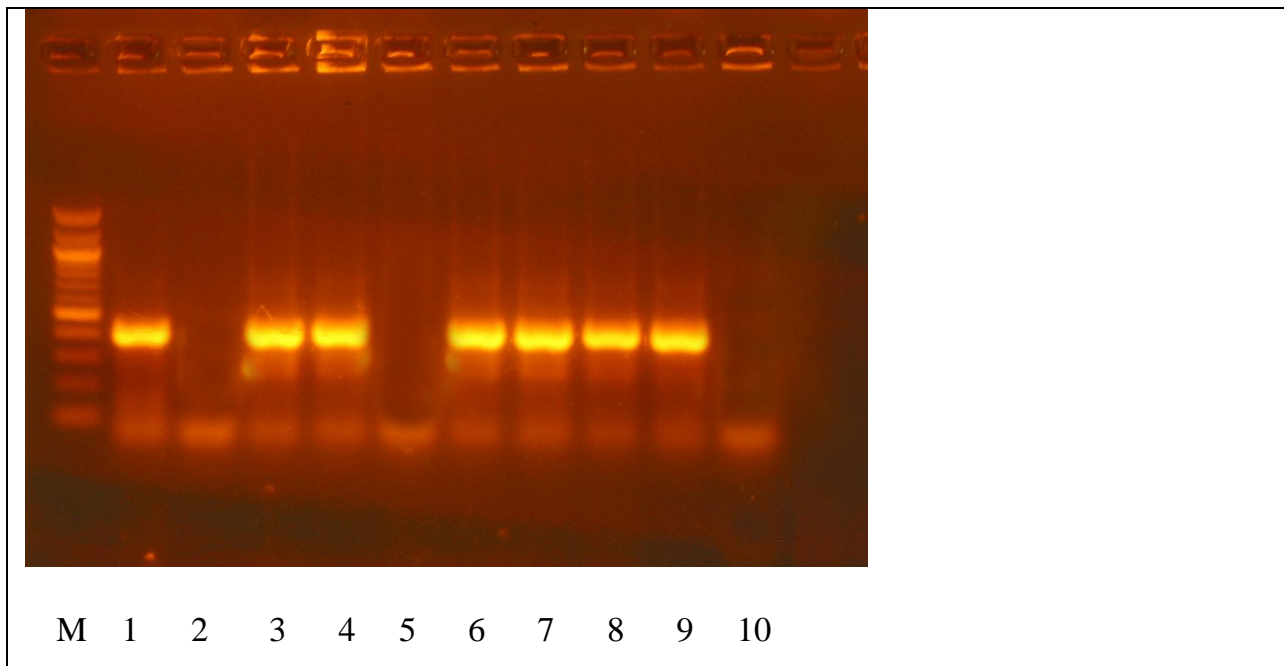


Фигура 12. Multiplex PCR за детекция на гени, кодиращи CTX-M и SHV ESBLs.

Изолати на позиция № 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12. – положителни за наличие на *bla*_{CTX-M}; изолати на позиция №1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13. – положителни за наличие на *bla*_{SHV}; M- маркер.

- **PCR за доказване на гени, кодиращи AmpC ензими (*DHA*, *FOX*, *EBC*, *MOX*, *ACC* и *CMY*).**

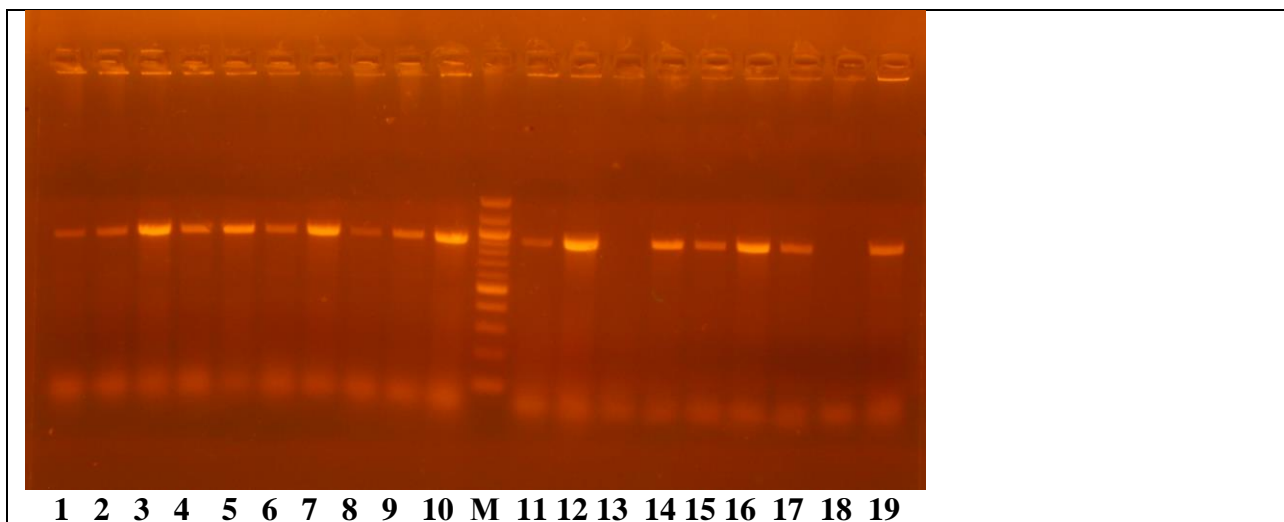
Общо 60 изолата *K. pneumoniae* - карбапенем резистентни и/или резистентни на sefoxitin и демонстриращи антагонизъм при DDST бяха тествани чрез PCR за продукция на AmpC ензими. Само три карбапенем резистентни изолата бяха положителни за наличие на *bla*_{CMY}, като големината на амплифицирания продукт беше 1000bp. От 8-те изолата, демонстриращи антагонизъм, всички бяха негативни за *bla*_{CMY}. И осемте изолата бяха позитивни за наличие на *bla*_{DHA}. Размерът на амплифицирания продукт беше 405 bp (фигура 13). Не бяха доказани *bla*_{EBC}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX} и *bla*_{ACC} гени.



Фигура 13. PCR за детекция на гени, кодиращи ДНА ензими. Изолати на позиция №1, 3, 4, 6, 7, 8– положителни за наличие на *bla*_{ДНА}; Изолати на позиция №2, 5, 10. – отрицателни за наличие на *bla*_{ДНА}; М- маркер. Позиция №9 положителна контрола.

- **PCR за доказване на гени, кодиращи ОХА бета-лактамази**

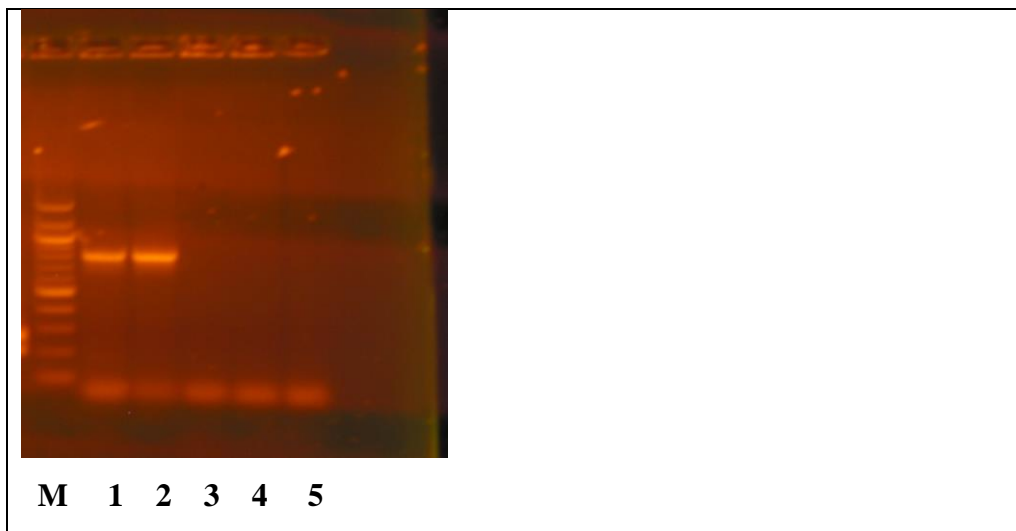
Чрез PCR за *bla*_{ОХА III гр} бяха изпитани общо 116 изолата, от които 75% (n=87) бяха положителни. При всички тези изолати *K. pneumoniae* се установи едновременно присъствие на *bla*_{СТХ-М} и *bla*_{SHV}.



Фигура 14. PCR за детекция на гени, кодиращи OXA ензими. Изолати на позиция №1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19 – положителни за наличие на *bla_{OXA}*; Изолати на позиция №13 и 18 – отрицателни за наличие на *bla_{OXA}*; М- маркер.

- **PCR за доказване на гени, кодиращи бета-лактамази с карбапенемазна активност.**

Общо 38 изолата *K. pneumoniae* с намалена или липсваща чувствителност към карбапенеми бяха тествани за наличие на гени, кодиращи карбапенемази от различни класове. При 33 изолата беше доказан *bla_{KPC}*, докато *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* и *bla_{OXA}* бяха идентифицирани в единични изолати, съответно - 3 за *bla_{NDM}*, 2 за *bla_{VIM}* и един за *bla_{OXA}* (фигура 15). Един изолат беше положителен едновременно за *bla_{VIM}* и *bla_{KPC}*.



Фигура 15. PCR за детекция на гени, кодиращи карбапенемази. Изолат на позиция №1 и 2 – положителен за наличие на *bla_{KPC}*; Изолати на позиция № 3, 4, 5 отрицателни за наличие на *bla_{KPC}*; М- маркер.

5.3.3. Определяне вида на бета-лактамазата чрез изоелектрично фокусиране IEF и биологичен тест за β -лактамазна хидролитична активност.

Изоелектрично фокусиране (IEF) беше извършено с 45 репрезентативни (според фенотипа на резистентност и резултатите от групово специфичния PCR за определяне на

вида ESBL/AmpC/карбапенемаза) изолати, с цел определяне спектъра на β -лактамазите. Изоелектричните точки (pI) на изследваните ензимни екстракти бяха определени чрез сравняване с β -лактамази с известни pI, а именно: CTX-M-15, pI 8.8; CTX-M-3, pI 8.4; SHV-5,-12, pI 8.2; SHV-3, pI 7.0; OXA-1, pI 7.4; TEM-1, pI 5.4; тясноспектърна бета-лактамаза SHV, pI 7.6; CMY-1, pI 8.0.

Резултатите от IEF показаха присъствие в тестваните изолати на 2 до 5 бета-лактамази. Продукция само на един ензим бе доказана в един изолат *K. pneumoniae*.

От групата на CTX-M положителните изолати (n=111) бяха изследвани 25 изолата. При 17 от изолатите присъстваше β - лактамаза с pI 8.8, която хидролизира cefotaxime, т.е. положителен биологичен тест (фигури 16 и 17). При четири изолата, чиято бета-лактамаза се фокусира в pI 8.4 се визуализира също положителен тест за хидролиза на cefotaxime. Тези изоелектрични точки отговарят на широкоспектърните бета-лактамаза от CTX-M тип. При четири изолата установихме две бета-лактамази от CTX-M тип едновременно продуцирани от един и същи изолат (таблица 15).

От групата на CTX-M и/или KPC положителните изолати бяха изследвани десет, като беше доказан ензим с pI 6.7, за който освен хидролитична активност към cefotaxime беше установена и хидролитична активност спрямо imipenem. На тази изоелектрична точка отговаря KPC-2 ензима. При седем изолата се визуализира и бета-лактамаза с pI 8.8. При един в допълнение към бета-лактамазата с pI 6.7 (активност спрямо imipenem) установихме и бета-лактамаза с pI 5.1(активност спрямо imipenem). В тази точка се фокусира VIM-1 метало-карбапенемазата.

При един изолат с намалена чувствителност към imipenem и положителен за OXA-48 и CTX-M се доказаха две бета-лактамази – с pI 8.8 (активност спрямо cefotaxime) и pI 7.2 (активност спрямо imipenem). На тази изоелектрична точка (pI 7.2) се фокусира OXA-48 карбапенемазата.

При четири изолата положителни за ДНА установихме бета-лактамаза с pI 6.9, като при три от тях се установи и ESBL фокусираща се в pI 8.4.

При един изолат (VIM и SHV положителен) не установихме CTX-M ензими. Той

продуцираше бета-лактамази с pI 8.2 и pI 5.1(активност спрямо imipenem).

В резултат на IEF потвърдихме продукцията на установените при PCR експериментите групи бета-лактамази, като те съответстваха на броя на доказаните с IEF ензими. ТЕМ ESBLs, фокусиращи се в ниска изоелектрична точка (под pI 7) не бяха установени. Само в групата на NDM продуцентите не беше потвърдена продукцията на NDM чрез IEF. Тази карбапенемаза не се визуализира при изоелектричното фокусиране. В литературата не успяхме да намерим съобщение, в което да се докладва успешно фокусиране на този тип ензими.

В допълнение, при 36 изолата се доказва β - лактамаза с pI 5.4, без хидролична активност към cefotaxime (отрицателен биологичен тест). При 18 изолата бяха установени и допълнителни бендове с pI 7.4 (без хидролитична активност). В тази изоелектрична точка се фокусират OXA-1 ензимите. При 29 изолата бяха визуализирани бета-лактамази с pI 7.6, всички без активност към cefotaxime.

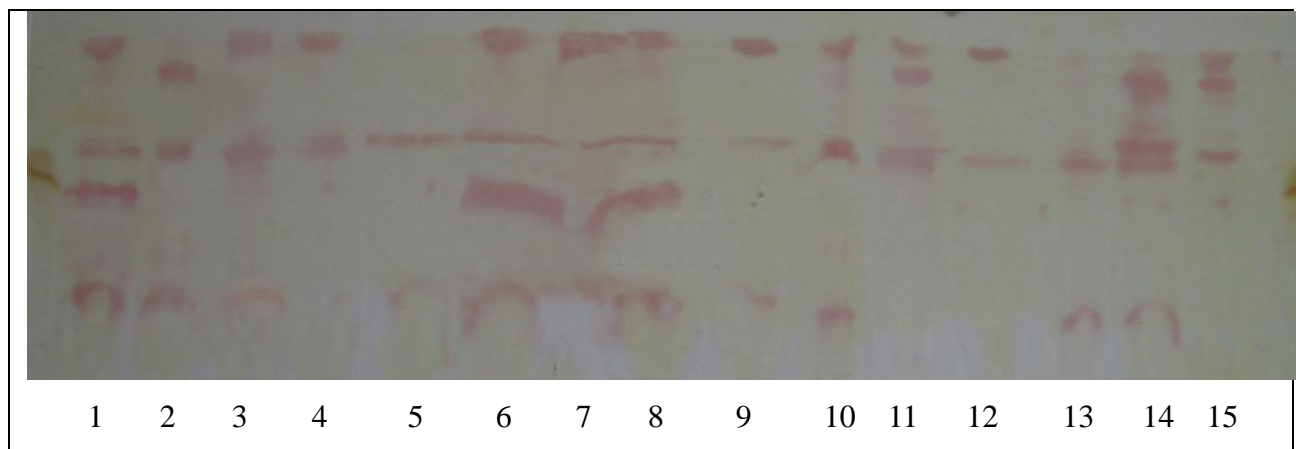
Обобщените резултати от IEF и биологичния тест за β -лактамазна хидролитична активност са представени в таблица 15.

Таблица 15. Обобщени резултати от IEF и биологичния тест за хидролитична активност за определяне наличието на β - лактамази сред изолати *Klebsiella pneumoniae*.

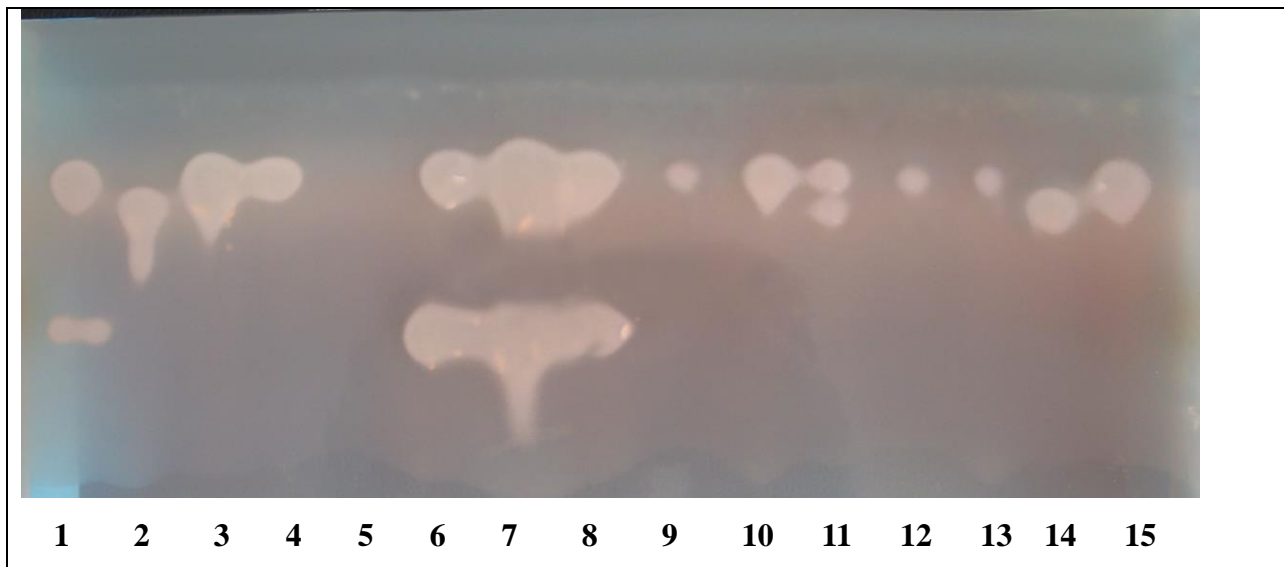
PCR положителни	Брой изолати, тествани с IEF	pI (IEF)	Bioassay: хидролиза на IMP 0.5 mg/L	Bioassay: хидролиза на CTX 2mg/L
CTX-M, SHV n=109	n=17	[5.4] / [7.4] / [7.6] / 8.8	-	При pI 8.8
	n=4	5.4 / [7.6] / 8.4	-	При pI 8.4
	n=4	5.4 / 7.6 / 8.4 / 8.8	-	При pI 8.4,8.8
CTX-M, KPC, SHV n=30	n=9	[5.4] / 6.7 / [7.4] / 8.8	При pI 6.7	При pI 8.8
KPC, SHV n=2	n=1	5.4 / 6.7 / 7.4	При pI 6.7	-
KPC, VIM, SHV n=1	n=1	5.1 / 6.7	При pI 5.1, 6.7	-
CTX-M, OXA-	n=1	5.4 / 7.2 / 7.4 / 8.8	При pI 7.2	При pI 8.8

48, SHV n=1				
CTX-M,NDM,CMY, SHV n=3	n=1	5.4 / 8.8	-	При pI 8.8, >9.0
VIM, SHV n=1	n=1	5.1 / 8.2	При pI 5.1,	При pI 8.2
DHA, SHV n=3	n=1	5.4 / 7.6 / 7.8	-	-
DHA,CTX-M, SHV n=5	n=3	5.4 / 7.6 / 7.8 / 8.4	-	При pI 8.4
SHV n=4	n=2	5.4 / 7.6	-	-

Съкращения: pI- изоелектрична точка, IEF- изоелектрично фокусиране, IMP – иміпренем; CTX – cefotaxime.



Фигура 16. Позиции №1 и 2 - контролни щамове *K. pneumoniae*, продуценти съответно на TEM-1 (pI 5.4), KPC-2 (pI 6.7), SHV-1 (pI 7.6) и CTX-M-15 (pI 8.8) (позиция 1); TEM-1 (pI 5.4), SHV-1 (pI 7.6) и CTX-M-3 (pI 8.4) (позиция 2) бета-лактамази; № 3, 4, 9, 10 - клинични изолати *K. pneumoniae*, продуценти на TEM-1, SHV-1, CTX-M-15 ; № 6, 7, 8 - клинични изолати *K. pneumoniae*, продуценти на TEM-1, KPC-2, SHV-1 и CTX-M-15; № 11 и 15 - клинични изолати *K. pneumoniae*, продуценти на SHV-1, CTX-M-3 и CTX-M-15; № 12 - клиничен изолат *K. pneumoniae*, продуцент на SHV-1 и CTX-M-15; № 13 - клиничен изолат *K. pneumoniae*, продуцент на TEM-1 и SHV-1; № 14 - клиничен изолат *K. pneumoniae*, продуцент на TEM-1, SHV-1 и CTX-M-3.



Фигура 17. Позиция № 1 и 2 – контролни щамове *K. pneumoniae* продуценти съответно на КРС-2 (pI 6.7) и СТХ-М-15 (pI 8.8) (позиция 1); СТХ-М-3 (pI 8.4) (позиция 2) бета-лактамази, хидролизиращи cefotaxime; Позиции № 4, 6, 8, 9, 10, 12, 13 и 15 - продуценти на СТХ-М-15 клинични изолати *K. pneumoniae*, които хидролизират cefotaxime при pI 8.8.; Позиции № 3, 7, 11, 14 - клинични изолати *K. pneumoniae*, които хидролизират cefotaxime при pI 8.4; Позиция №5 - продуцент на СТХ-М-15 клиничен изолат *K. pneumoniae*, който не хидролизира cefotaxime.

Обсъждане

Една от възможностите за определяне вида и броя на β -лактамазите е методът на изоелектрично фокусиране. При комбиниране на този метод с полимеразо-верижна реакция и секвениране могат да се идентифицират основните типове β -лактамази. Във възможностите на IEF е да се маркира продукция на ензим, който не е доказан с PCR. В настоящия експеримент изоелектричното фокусиране показва присъствие на различни β -лактамази и потвърди наличието и продукцията на всички ензими, доказани с PCR експериментите, а комбинацията на този метод с биологичния тест за хидролитична активност спрямо cefotaxime показва присъствие на тясноспектърни и широкоспектърни ензими с β -лактамазна активност, както и карбапенемази.

Доказаната в 78% (36/45) от изолатите *K. pneumoniae* β -лактамаза с pI 5.4, демонстрираща отрицателен биологичен тест за хидролитична активност, съответства на

тясноспектърната бета-лактамаза TEM-1 от молекулярен клас А, кодираща резистентност към ampicillin, карбокси- и уреидопеницилини. Резултатите от PCR експериментите показаха, че изолатите не продуцират ESBL от TEM тип.

В най-висок процент от тестваните изолати *K. pneumoniae* (76%, n=29) беше доказана бета-лактамаза, която се фокусира в pI 8.8 и демонстрира хидролитична активност спрямо cefotaxime. На тази изоелектрична точка отговаря CTX-M-15 ESBL (www.lahey.org/studies/webt.asp). Така получените от нас резултати са в съответствие с докладваното през 2014г. широко разпространение на CTX-M-15 бета-лактамаза сред български изолати *K. pneumoniae*, както е и в унисон с резултати от много други проучвания, доказващи разпространението на CTX-M-15 сред представители на семейство *Enterobacteriaceae* (Markovska, 2014).

В настоящата работа едва при седем изолата *K. pneumoniae* бяха визуализирани ензими с изоелектрична точка 8.4 с изразена хидролиза на cefotaxime при биологичния тест. На тази изоелектрична точка съответства CTX-M-3 ESBL (www.lahey.org/studies/webt.asp), което бе потвърдено и от молекулярно-генетичните изследвания (виж т. 5.3.2.). В контраст с този резултат, в по-ранно проучване върху основните механизми на резистентност към цефалоспорини от трета генерация в клинични изолати *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*, изолирани от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ”Света Марина” – Варна през 2009г., CTX-M-3 се доказва като доминиращия широкоспектърен тип бета-лактамаза в тези бактериални видове (89%) (Марковска, 2012).

В десет изолата (10/38) установихме ензим с изоелектрична точка 6.7, като в пет от изолатите биологичният тест за хидролиза на imipenem беше позитивен. В тази изоелектрична точка се фокусира бета-лактамазата с карбапенемазна активност от клас А - KPC-2 (www.lahey.org/studies/webt.asp). В пет от изследваните *K. pneumoniae* се доказва едновременна продукция на KPC-2 и бета-лактамаза с pI 8.8, съответстваща на CTX-M-15 ESBL. В България, KPC-2 продуциращи *K. pneumoniae* се доказват за първи път през 2012г. в клинични материали на пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ”Света Марина”, като изолатите са едновременно ко-продуценти на CTX-M-15 или CTX-M-14 ESBLs и тясноспектърната TEM-1 (Markovska, 2013 ; Markovska, 2015).

В настоящото проучване при 8 от изследваните изолати се установи наличие на β -лактамаза с pI 7.8, нехидролизираща cefotaxime. В тази изоелектрична точка се фокусира

DHA-1 AmpC β -лактамазата. Извършените PCR експерименти с типове специфични праймери в тези изолати доказаха наличието на *bla*_{DHA}. (виж т. 5.3.2.).

Установените в петнадесет и респективно деветнадесет изолатата *K. pneumoniae* ензими с изоелектрична точка 7.4 и 7.6 без хидролитична активност спрямо cefotaxime отговарят на тясно-спектърните OXA-1 и SHV-1/11 ензими.

В един изолат *K. pneumoniae* бе доказан ензим с изоелектрична точка pI 8.2. SHV-5, 9, 10, 12, 45 и SHV-90 бета-лактамази са ензими, които се фокусират в тази pI (www.lahey.org/studies/webt.asp).

В заключение, чрез метода на IEF в проучваните изолати се установи разнообразие от β -лактамази, като често изолатите ко-продуцираха няколко ензима. IEF в комбинация с биологичния тест за хидролитична активност потвърди в групата на проучваните изолати *K. pneumoniae* продукцията на два вида ESBLs, представени предимно от CTX-M и при един изолат от SHV ензими. В част от изолатите бяха доказани карбапенемази от KPC групата; при един изолат - OXA-48, при два - VIM и при три изолатата – NDM карбапенемаза. AmpC ензими (DHA) бяха доказани както самостоятелно продуцирани, така и в комбинация с CTX-M бета-лактамази. При четири изолатата установихме продукцията на два вида CTX-M ензими.

5.3.4. Секвениране на *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{DHA}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}

Всички CTX-M положителни изолати бяха тествани със CTX-M-P1/P2 праймери и дадоха положителна реакция, което доказва наличието на CTX-M 1-ва група. Репрезентативни изолати, положителни за *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} (според PCR резултата и ERIC профила) бяха избрани за установяване на точния тип на ESBLs чрез нуклеотидно секвениране. Бяха идентифицирани следните варианти бета-лактамази: CTX-M-3, CTX-M-15, SHV-1, SHV-11, SHV-12, SHV-28.

*bla*_{CTX-M-15} беше установен при 81.1% (n=129) от изолатите; *bla*_{CTX-M-3} - при 9.4% (n=15), като в 2.5% (четирите изолатата с pI 8.4 и pI 8.8) бяха идентифицирани и двата гена (*bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{CTX-M-3}). При *bla*_{SHV} позитивните изолати (n=159) доказахме следните варианти: SHV-1, SHV-11, SHV-12 и SHV-28 (Таблица 16).

*bla*_{OXA} положителните изолати *K. pneumoniae* бяха идентифицирани като продуценти на OXA-1 ензим и само при един изолат бе доказана продукцията на

карбапенемаза OXA-48. *Bla*_{DHA} (n=8) позитивните идентифицирахме като продуценти на DHA-1 бета-лактамазата от клас C (Таблица 16).

От групата на бета-лактамазите с карбапенемазна активност, освен OXA-48 в един изолат, беше доказана KPC-2 карбапенемазата в 31 изолата. От групата на метало-карбапенемазите бяха идентифицирани NDM-1 в три изолата, а VIM-1 - в два изолата, единият от които ко-продуциращ KPC-2, а другият - SHV-12 ESBL.

Таблица 16. Резултати от PCR експериментите за доказаните *bla* гени, кодиращи бета-лактамази в колекция от изолати *K. pneumoniae*.

<i>bla</i> гени	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{DHA}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{NDM}
Брой положителни спрямо брой изследвани изолати	148 / 159	159/ 159	87 /116	8/159	33 / 159	2 / 159	3 / 159
Относителен дял (в %)	93%	100%	75%	5%	20.6%	1.26%	1.9%
Варианти на основни <i>bla</i> гени	CTX-M-15 CTX-M -3	SHV-1 SHV-11 SHV-12 SHV-28	OXA-1 OXA-48	DHA-1	KPC-2	VIM-1	NDM-1

Таблица 17. Охарактеризиране на бета-лактамазната продукция при изолатите *K. pneumoniae*

PCR положителни	Брой изолати, тествани с IEF	pI (IEF)	Брой секвенирани	Секвениране
CTX-M, SHV n=109	n=17	[5.4] / [7.4] / [7.6] / <u>8.8</u>	9	OXA-1, SHV-1 / SHV-11, CTX-M-15
	n=4	5.4 / [7.6] / <u>8.4</u>	4	SHV-1, CTX-M-3
	n=4	5.4 / 7.6 / <u>8.4</u> / <u>8.8</u>	3	OXA-1, SHV-1
CTX-M, KPC, SHV n=30	n=9	[5.4] / 6.7 / [7.4] / <u>8.8</u>	9	[OXA-1], KPC-2, SHV-1 / SHV-28, CTX-M-15
KPC, SHV n=2	n=1	5.4 / 6.7 / 7.4	1	OXA-1, KPC-2
KPC, VIM, SHV n=1	n=1	5.1 / 6.7	1	VIM-1, KPC-2
CTX-M, OXA-48, SHV n=1	n=1	5.4 / 7.2 / 7.4 / <u>8.8</u>	1	OXA-1, OXA-48, CTX-M-15
CTX-M, NDM, CMY, SHV n=3	n=1	5.4 / <u>8.8</u> / >9.0	2	CTX-M-15, SHV-11, CMY-4, NDM-1
VIM, SHV n=1	n=1	5.1 / <u>8.2</u>	1	VIM-1, SHV-12
DHA, SHV n=3	n=1	5.4 / 7.6 / 7.8	1	SHV-1, DHA-1
DHA, CTX-M, SHV n=5	n=3	5.4 / 7.6 / 7.8 / <u>8.4</u>	3	SHV-1, DHA-1, CTX-M-3
, SHV n=4	n=2	5.4 / 7.6	2	SHV-1

Съкращения: [] – присъства не при всички изолати; **подчертаване** – хидролитична активност спрямо cefotaxime; в **“bold”** - хидролитична активност спрямо imipenem.

Обсъждане

В последните години интересът към *K. pneumoniae* като бактериален вид с медицинско значение е особено засилен заради тенденциите за непрекъснато нарастване нивата на резистентност към различни антимикробни лекарствени средства, вкл. такива приети като стратегически и препарати на последен избор. Множествената резистентност

сред представителите на този бактериален вид се свързва със способността на тези микроорганизми да оцеляват в болничната среда, селективния антибиотичен натиск и сравнително лесното придобиване на мобилни генетични елементи, често носители на цели генни касети, обуславящи резистентност към различни антибактериални лекарствени средства.

В настоящия момент *K. pneumoniae* демонстрира устойчивост към повечето β -лактамни антибиотици, особено характерно за изолатите от интензивните болнични звена (Lopez-Samacho, 2014; Madueno, 2017; Lai CC, 2019). Резистентността при *K. pneumoniae* към тази антибиотична група основно се асоциира с продукцията на β -лактамазни ензими от всички молекулярни класове (A, B, C, D), с водещото значение на широкоспектърните бета-лактамази от клас A (TEM, SHV, CTX-M) и в много по-малка степен с механизми, свързани с намалена проницаемост на клетъчната мембрана (Ghasemi, 2013; Ahmed, 2013; Bialvaei, 2016; Al-Agamy, 2017; Kao, 2016). Така в настоящото проучване чрез молекулярно-генетични методи беше доказано наличието на ESBLs и / или AmpC ензими и/или карбапенемаза при 155 изолата *K. pneumoniae*.

През последното десетилетие широкоспектърните бета-лактамази от TEM- и SHV-тип бяха заменени от CTX-M, които постепенно се установиха като доминиращите ензими в клинични изолати от семейство *Enterobacteriaceae* (Livermore et al., 2007; Zhou K, 2015). Плазмид-медираните CTX-M бета-лактамази са най-често срещаните ESBLs, особено при *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. mirabilis* (Zhao WH, 2013; Peirano and Pitout, 2010; Zhou K, 2015). Понастоящем са идентифицирани над 130 представителя на CTX-M семейството, разделени на седем клъстера според тяхното сходство. От всички CTX-M ензими, CTX-M-15 (от CTX-M-1 групата) и CTX-M-14 (от CTX-M-9 групата) са доминиращите варианти в семейството, следвани от CTX-M-2, CTX-M-3 и CTX-M-1 (Zhao WH, 2013).

През последните години значително се увеличиха научните съобщения за нозокомиални инфекции, причинени от множество резистентни CTX-M-15 продуциращи *Klebsiella pneumoniae* (Lee MY et al., 2011; Baraniak et al., 2013; D'Andrea et al., 2013; Rodrigues C et al., 2014)). В Европа най-широко разпространение на *bla*_{CTX-M-15} се докладва във Великобритания, Холандия, Дания, Германия, Чехия, Словакия и Франция (Bevan et al., 2017). В проучване на SENTRY за 2016г. за разпространението на *bla* гените

сред изолати *Klebsiella pneumoniae* в САЩ, се установява, че общо 60.3% са носители на *bla*_{CTX-M} варианти от групите CTX-M-1 и CTX-M-9, съответно в 52.7% и 7.6% (Mendes RE, 2019). За сравнение, в азиатско-тихоокеанския регион продукцията на CTX-M-15 сред чревните бактерии достига 72.8% (Sheng WH, 2013). При ретроспективно проучване на Ну и колектив в периода 2013 – 2015 върху MDR изолати *K. pneumoniae*, изолирани от пациенти с вентилаторна пневмония в Китай, се доказват различни гени, кодиращи ESBLs: *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} и *bla*_{TEM}, но отново с преобладаване на *bla*_{CTX-M-15} (63.3%) (Xu H, 2018). В скорошно епидемиологично проучване от Китай върху 38 болнични множествено-резистентни изолати *Klebsiella pneumoniae*, се съобщава за 94.7% носителство на *bla*_{SHV} гени, като са доказани следните варианти: *bla*_{SHV-11} (n=32), *bla*_{SHV-142} (n=3) и *bla*_{SHV-1} (n=1). *Bla*_{CTX-M} гени са установени също във висок процент (68.4%; n=26) от изолатите, с доминиране на *bla*_{CTX-M-14}, като е идентифицирано едновременно носителство на *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{CTX-M-3} (Lin D, 2018)

Като основен фактор за бързо разпространение на CTX-M в *K. pneumoniae* се смятат конюгативните плазмиди (D'Andrea, 2013; Mathers, 2015; Zhou K, 2015 или транспонируемите елементи (инсерционни последователности, транспозони и интегрони). Генът *bla*_{CTX-M-15} често се асоциира със специфични инсерционни последователности (например *ISEcp1*) и плазмиди от групата IncF (Carattoli, 2009; Zhou K, 2015).

В съответствие с Европейските и световни тенденции, в проучваната колекция от изолати *K. pneumoniae*, с най-висок относителен дял се представят CTX-M продуцентите, които са 93% (148/159) от всички изолати: *bla*_{CTX-M-15} се доказва в 81.1%, *bla*_{CTX-M-3} – в 9.4%, а носителството и на двата гена (*bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{CTX-M-3}) бе установено в 2.5%. Експресията на тези гени беше потвърдена чрез метода на изоелектричното фокусиране. Тези резултати са в унисон с данните от българско проучване върху изолати *K. pneumoniae* от 6 болници в 5 града в страната за 10-месечен период през 2014г., което установява CTX-M-15 продуценти в 87% и CTX-M-3 – в 9% (Markovska, 2017). Настоящото проучване доказва повече варианти на SHV бета-лактамазата: SHV-1, SHV-11, SHV-12 и SHV-28. В допълнение, установихме висок процент на асоциация между *bla*_{OXA-1} и *bla*_{CTX-M-15}: в 98.9% от положителните изолати за *bla*_{OXA-1} се установи присъствие и на *bla*_{CTX-M-15}. Вероятно тази находка се дължи на разположението на гените върху общ транспонируем елемент.

Резистентността на *K. pneumoniae* към карбапенемни антибиотици се асоциира най-

често с продукцията на четири основни групи карбапенемази, като *Klebsiella pneumoniae* карбапенемазата (KPC), Verona integron-encoded метало-бета латамазата (VIM), OXA-48 и New Delhi метало-беталактамазата (NDM) са най-разпространените.

Клас А карбапенемазата KPC е идентифицирана за първи път в изолат през 1996г. в САЩ, а няколко години по-късно продуценти на KPC се повсеместно разпространени. Високи нива на KPC продуценти се съобщават в САЩ, Южна Америка, Израел, Китай, Индия, а също и в Гърция, Франция, Италия, Полша, Обединеното Кралство и Ирландия. *bla_{KPC}*, предимно разположен върху плазмиди, често се асоциират с успешни клонове *K. pneumoniae*, каквито са ST258 и ST11, което улеснява тяхното бързо разпространение (Woodford N 2011; Nordmann P, 2014). През последното десетилетие се описват и нови лекарствено устойчиви международни клонове, сред които е KPC продуциращия *K. pneumoniae* клон ST307, доказан в страни като САЩ, Италия, Франция, Швейцария, Англия и Колумбия (Castanheira, 2013; Villa, 2017). В България KPC-2-продуциращи изолати *K. pneumoniae* са доказани за първи път през 2012г. (Markovska, 2013).

Клас D карбапенемазата OXA-48 за първи път е идентифицирана в изолат *K. pneumoniae* от Турция през 2003г. (Poirel, 2004). От тогава до сега, в Турция OXA-48 продуциращи *K. pneumoniae* се съобщават с особено голяма интензивност (Aktaş, 2008). OXA-48 продуценти *K. pneumoniae* са широко разпространени в много Европейски държави, сред които Белгия, Франция, Германия, Гърция, Холандия, Швейцария и Испания. Средният Изток и Африканските държави също са смятани за резервоар на OXA-48 продуценти (Poirel, 2012b; Nays, 2012; Kocsis, 2013; Dortet, 2012a; Shibl, 2013; Brink, 2013; Singh, 2016; Potron, 2011a).

NDM продуциращи изолати се появяват през 2008г. и много бързо се разпространяват в целия свят (Азия, Африка, Австралия, Америка и Европа). Главен резервоар за NDM-продуценти се явява Индийският субпонтинент (Индия, Пакистан, Шри Ланка), но Балканите и Арабския полуостров също се смятат за важен източник на NDM-карбапенемазите. В България до 2014г. честотата на карбапенемаза-продуциращите *Enterobacteriaceae* е много ниска. От 2014г. до настоящия момент съобщенията за такива изолати постепенно се увеличават. Двете карбапенемази KPC-2 и NDM-1 първоначално са доказани в изолати *E. coli* (Poirel et al, 2014; Markovska et al, 2017b). KPC-2 и NDM-1

продуциращи изолати *K. pneumoniae* се съобщават като единични случаи (Todorova, 2016; Kostyanev, 2016) или взривове (Markovska, 2015; Savov, 2018).

В настоящата работа в групата на карбапенем-резистентните изолати *K. pneumoniae* се доказва разнообразие от карбапенемази, с доминиране на КРС-2 карбапенемазата: КРС-2 в 86.8% (при 20.6% в наличната колекция), VIM-1 в 5.3% (при 1.3% в наличната колекция), NDM-1 в 7.9% (при 1.9% в наличната колекция) и ОХА-48 в 2.6% (при 0.6% в наличната колекция).

В скорошно проучване върху 88 карбапенемаза продуциращи *K. pneumoniae*, изолирани в периода 2014-2018г. в седем клинични центрове у нас, се доказва водещото значение на КРС-2 в едни болнични центрове, а на NDM-1 – в други (Markovska, 2019).

Клоналната дисеминация е характерна особеност както за КРС-2 продуциращи щамове *K. pneumoniae*, така и за някои щамове, продуценти на NDM-1. Такава клонална дисеминация на NDM-1 *K. pneumoniae* вече е документирана и у нас (Markovska, 2019; Savov 2018). Мащабно проучване за периода 2015-2017г. върху карбапенемаза продуциращи *K. pneumoniae* показва разпространението на ST15, ST29, ST336 и ST902 клоновете при КРС-2 продуциращите изолати и на ST11 при NDM-1 продуциращите, като КРС-2 *K. pneumoniae* произвежда и СТХ-М-15, а NDM-1 положителните притежават и *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{СМУ-4} (Markovska, 2019). Савов и колектив също доказват седемнадесет NDM-1 продуциращи изолати, притежаващи също *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{СМУ-4} (Savov, 2018). В съответствие с това, в нашето проучване NDM-1 продуциращите изолати *K. pneumoniae* се доказва като ко-продуценти на СТХ-М-15 и СМУ-4 бета-лактамази. Подобни резултати за едновременна продукция на ESBLs и карбапенемази получават и автори от Испания, които съобщават, че 43% от ESBL продуциращите *K. pneumoniae* са били едновременно и карбапенемаза - продуценти. Като най-чести ESBLs те доказват бета-лактамазите от СТХ-М групата (83.2%), а от карбапенемазите - ОХА-48 (90.8%) (Díaz-Agero, 2019). В нашето проучване беше идентифициран само един изолат *K. pneumoniae*, продуциращ ОХА-48 карбапенемаза.

Подобни резултати на нашите се съобщават от Carrasco и колектив, които провеждат проучване върху карбапенем - резистентни *K. pneumoniae*, изолирани от различни болници в Чили. От общо 22 изолата, 20 се оказват продуценти на КРС

карбапенемаза, един – на NDM-1, а един е носител на *bla*_{OXA-370} (Carrasco-Anabalón S, 2018).

Доказателство за широкото разпространение на КРС карбапенемазите е съобщението от Сингапур от 2019г., което установява висок дял на полимиксин - и карбапенем - резистентни изолати от семейство *Enterobacteriaceae*, предимно сред *Enterobacter* spp. (54.1%) и *Klebsiella pneumoniae* (43.2%). Над 50% от тези изолати са идентифицирани като КРС-продуценти (59.5%), демонстрирайки високи нива на резистентност към всички изпитвани бета-лактамни антибиотици, но чувствителност към amikacin (100%), tigecyclin (89.2%), ceftazidime/avibactam (83.8%), fosfomycin (70.3%) и levofloxacin (64.9%) (Teo JQ, 2019). Аналогично, в Китай при епидемиологично проучване върху 38 болнични карбапенем-резистентни изолата *Klebsiella pneumoniae*, *bla*_{KPC-2} е доказан в 89.5%, а *bla*_{IMP} – в 4.9% (n=3). От гените, кодиращи AmpC ензими е идентифициран само *bla*_{DHA} в 18.4% (Lin D, 2018). В допълнение, като част от програмата SMART, свързана с проучване нивата на резистентност в клинично значими бактериални видове, изолирани в звена за интензивни грижи в Тайван, се съобщава също за носителство на *bla*_{KPC} и *bla*_{OXA-48} в карбапенем-нечувствителни *K. pneumoniae* (Lai CC, 2019).

В контраст на тези съобщения, проучване от Индия върху ESBL и карбапенемаза-продуциращи изолати *K. pneumoniae* (n=250), получени от пациенти в интензивни отделения за едногодишен период, установява 84% ESBL продуценти и 66% резистентност към карбапенеми. Сред карбапенем - резистентните изолати (n=165), 9.7% са били положителни за *bla*_{NDM-1}. Съпътстващите AmpC бета-лактамази при ESBL продуцентите са 7.8%, а при карбапенем-резистентните изолати – 3.6% съответно. При това проучване не са доказани *bla*_{KPC} гени (Bhaskar BH, 2019).

В настоящото проучване colistin-резистентни изолати (n=8) бяха доказани само в групата на карбапенем-нечувствителните изолати. Те се оказаха носители на *bla*_{KPC-2} (n=6) и *bla*_{NDM-1} (n=2) и демонстрираха напълно съхранена чувствителност към tigecycline. По отношение резистентността към ceftazidime/avibactam, носителите на *bla*_{KPC-2} показаха чувствителност, а носителите на *bla*_{NDM-1} бяха резистентни.

Свърхекспресия на хромозомно-кодирани AmpC бета-лактамази е характерна най-вече за предствителите на род *Enterobacter* (Jacoby, 2009). Плазмид-кодирани AmpC

ензими са доказвани обаче и в изолати, отнасящи към видовете *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и др. (Jacoby, 2009). В настоящото проучване гени, кодиращи AmpC ензими бяха доказани в 8 изолатата, като в шест от изолатите DHA-1 беше ко-продуцирана заедно с CTX-M-3, CTX-M-15 и SHV-11, а в останалите два изолатата - заедно с NDM-1 и CTX-M-15 бета-лактамази.

Проучвания от азиатско-тихоокеанския регион също съобщават за разпространение на CMY-2 бета-лактамазата, но предимно в *E. coli*, докато DHA-1 е доказана в изолати *K. pneumoniae*. Авторите потвърждават доминирането на ACT/MIR ензимите от групата на AmpC β -лактамазите в представители на *E. cloacae* complex (Sheng, 2013; Jean, 2017).

Проучвайки изолати *K. pneumoniae*, френски автори също установяват плазмидно кодирани DHA-1 бета – лактамази, като са идентифицирани плазмиди, принадлежащи към IncR, IncH и IncL/M групите (Henequen C, 2018).

В заключение, основният механизъм на резистентност към цефалоспоринови от трета генерация в настоящата колекция от изолати *K. pneumoniae* се асоциира с продукцията на ESBLs в 96.9%, като най-чести са CTX-M бета-лактамазите в 93%, с водещото значение на CTX-M-15 в 81.1% и CTX-M-3 в 9.4%. Резистентността към карбапенемни антибиотици се медира от продукцията на карбапенемази, като KPC-2 е най-често продуцираната бета-лактамаза с карбапенемна активност (21%). NDM-1 и VIM-1 продуцентите са единични.

5.4. Конюгационно предаване на плазмиди, носещи гени за ESBLs и хинолонова резистентност.

С цел проучване трансферабилността на гените за резистентност към β -лактамини и хинолонови антибиотици в проучваните изолати *K. pneumoniae* бяха извършени конюгационни експерименти. Като реципиент използвахме щам *E. coli* K12: W3110 Rif lac-

От проведените общо 146 конюгационни експеримента, маркери за резистентност към β -лактамини бяха предадени при 56 (38.4%), а към хинолонови - при 15 (10.3%) от общо 146-те донорни изолати *K. pneumoniae*. При всички трансконюганти беше установено предаване на детерминанти, определящи намаляване на чувствителността към цефалоспоринови трета генерация, а в осем от случаите и към карбапенемите imipenem и meropenem (донорите са *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CMY-4}, *bla*_{DHA-1} - положителни). Честотата на предаване на аминокликозидната резистентност, свързана с

ESBL гените е както следва: за tobramycin – 62.5% (35/56), за gentamicin – 70% (39/56), amikacin – 7% (4/56) и trimethoprim/sulphamethoxazole - 23% (13/56). Фенотипът на резистентност на трансконюгантите към β -лактами (amoxicillin/clavulanic acid (AMC), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), piperacillin/tazobactam (TZP), imipenem (IMP), meropenem (MEM)) и не- β -лактамни антибиотици (gentamicin, amikacin, tobramycin, ciprofloxacin, levofloxacin, tetracycline, trimethoprim/sulphamethoxazole, chloramphenicol) е показан на таблица 18.

5.5. Определяне типа на плазмида

С цел охарактеризиране на репликоните проведохме PCR - базирано типизиране на репликони при 118 донорни щамове и всички 56 трансконюганта. При изолатите, които ползвахме като донори установихме следните репликони: L/M (n=21), R (n=31), F (n=12), FI (n=3), FII (n=19), FIA (n=2), A/C (n=3), N (n=1), HI2 (n=1) (Таблица 18).

При трансконюгантите доказахме: L/M в 10.7% (n=6); F в 10.7% (n=6); R в 5.4% (n=3); FII в 12.5% (n=7); FIA в 1.8% (n=1); A/C в 1.8% (n=1) и 58.9% (n=33) - нетипируеми репликони (nt). В единия трансконюгант се установиха два репликона **L/M** и **R**. На таблица 18 е представена връзката между донорите, резистотипа и типа на репликоните, идентифицирани в получените трансконюганта.

Таблица 18. Връзка между bla гените в донорни клинични изолати K. pneumoniae и резистотипа и типа на репликоните при 56 трансконюганта.

Тип на донорите	Брой донор и	Брой получени трансконюганта/ензим, продуциран от трансконюганта	Резистотип на трансконюгантите	Тип репликон
CTX-M-15 продуценти	96	n=37/ CTX-M-15	CTX, AMC, CAZ, TB, GEN, TET (n=5) CTX, TB, TET (n=1) CTX, AMC, TET (n=1) CTX, AMC, CAZ, TB, CIP , SXT (n=1) CTX, AMC, TB, GEN, TET (n=6)	F F FIA R nt

			CTX, AMC, TB, CIP (n=3) CTX, AMC, TB, GEN, CIP (n=2) CTX, AMC, CHL (n=1) CTX, AMC, CAZ, TB, GEN (n=10) CTX, AMC, CAZ, TB, GEN, CIP , SXT (n=6) CTX, AMC, TB, GEN, TET, CIP , SXT (n=1)	nt nt nt nt nt nt
СТХ-М-3 продуценти	10	n=5/ СТХ-М-3	CTX, AMC, TB, GEM, AMK (n= 3) CTX, AMC (n=1) CTX, AMC, TB, GEN, TET, CIP , SXT, CHL(n=1)	L/M L/M L/M; R
СТХ-М-3/ СТХ-М-15/ ОХА -1 продуценти	4	n=1/ СТХ-М-3	CTX, AMC, GEN (n=1)	L/M
СТХ-М-15 /ОХА-48 продуценти	1	n=1/ ОХА-48	IMP, MEM n=1	R
КРС-2/ СТХ-М-15 продуценти	20	n=7/ КРС-2 n=4/ СТХ-М-15	CTX, AMC, CAZ, IMP, MEM, TZP (n=4) CTX, IMP, TZP (n=1) CTX, CAZ, IMP, TZP (n=2) AUG, CTX, TB, GEN (n=4)	FI FI FI nt
NDM-1/ СМУ-4/ СТХ-М-15 продуценти	2	n=1/ СМУ-4/ СТХ-М-15	CTX, CAZ, CIP , TET, CHL (n=1)	A/C
ДНА-1	7	0	-	

Обсъждане

Преносът на гени между хромозоми и плазмиди значително увеличава възможността за трансфер на детерминанти на резистентност и тяхната последваща дисеминация. Конюгативните плазмиди са едни от най-важните механизми за вътревидови, междувидови и междуродови генетични трансфери. Плазмидите обикновено се класифицират по тяхната несъвместимост (Inc), дефинирана като неспособност на два плазида да съществуват и реплицират стабилно в един и същ бактериален изолат. В този смисъл в трансконюгантите могат да бъдат установени плазмиди само от различни групи на несъвместимост (Novick, 1976). През 1988 г. Couturier и колектив предлагат схема за генетично типичане на плазмиди, базирано на Southern blot хибридизация, използвайки клонирани репликони като сонди (Couturier, 1988).

Понастоящем в семейство *Enterobacteriaceae* са признати 27 Inc групи от Плазмидната секция на Националната колекция от типови култури (Лондон, Обединеното

кралство), включително шест IncF (FII до FVII) и три IncI (I1, Iγ, I2) (Carattoli, 2009). Сред типизираните R-плазмиди, плазмидите IncFII, IncA/C, IncL/M и IncII са най-често доказваните (Carattoli, 2009). Отделни плазмидни семейства се откриват по-често сред представителите на семейство *Enterobacteriaceae*, като играят основна роля в разпространението на различни гени на резистентност. Например, плазмидите IncFII, IncA/C, IncL/M, IncN и IncI1, носещи гени за широкоспектърни бета-лактамази и AmpC бета-лактамази, се считат за "епидемични R-плазмиди", открити в бактериални изолати, принадлежащи към семейство *Enterobacteriaceae* с различен произход и източници. (Carattoli, 2011).

В настоящото проучване бяха извършени успешни конюгационни експерименти на пренос на *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-3} и *bla*_{KPC-2} гените в реципиентен щам *E. coli*, като в трансконюгантите бяха доказани IncFII за *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{KPC-2} положителните и IncL/M плазмиди за *bla*_{CTX-M-3} положителните трансконюганти, както и IncR - за *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{OXA-48}. Асоциацията на *K. pneumoniae* с *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{KPC-2} от една страна и IncFII от друга е установена и в по-ранно проучване в клинични изолати *K. pneumoniae* от нашата болница (Markovska, 2013; Markovska, 2015). Проучване върху дисеминация на KPC-2 продуциращ *K. pneumoniae* клон в България също доказва асоциацията на OXA-48 карбапенемаза с IncL/M (Markovska, 2015).

Молекулярно епидемиологични проучвания на Zhao и кол. също потвърждават тясната корелация на *bla*_{CTX-M} гените с плазмиди, главно принадлежащи към IncF, IncI, IncN, IncHI2, IncL/M и IncK групи. Авторите доказват, че IncF групата (FIA, FIB и FII) е с най-голямо значение при преноса на *bla*_{CTX-M-15}, докато IncF, IncK и IncI1 са свързани с широкото разпространение на *bla*_{CTX-M-14} гени. Според същите автори, *bla*_{CTX-M-1} се свързва предимно с IncN и IncII, *bla*_{CTX-M-3} гена – с IncL/M и IncI1, а *bla*_{CTX-M-9} - с IncHI2 (Zhao WH, 2013).

В унисон с нашите резултати, изследователи от Китай съобщават за изолиране на екстензивно резистентен щам *K. pneumoniae*, който ко-продуцира NDM-1 и KPC-2 карбапенемази. Посредством цялостно геномно секвениране на този изолат, авторите доказват следните плазмиди: IncN плазмид, носител на *bla*_{NDM-1} и *qnrS1* гени; IncFII(K) плазмид, съдържащ *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{TEM-1} и *bla*_{KPC-2}; IncHI1/IncFIB плазмид p30457-1,

носител на гени на вирулентност, идентичен с pLVPK, отговорен за регулацията на синтеза на капсулните полизахариди (Liu Y, 2019).

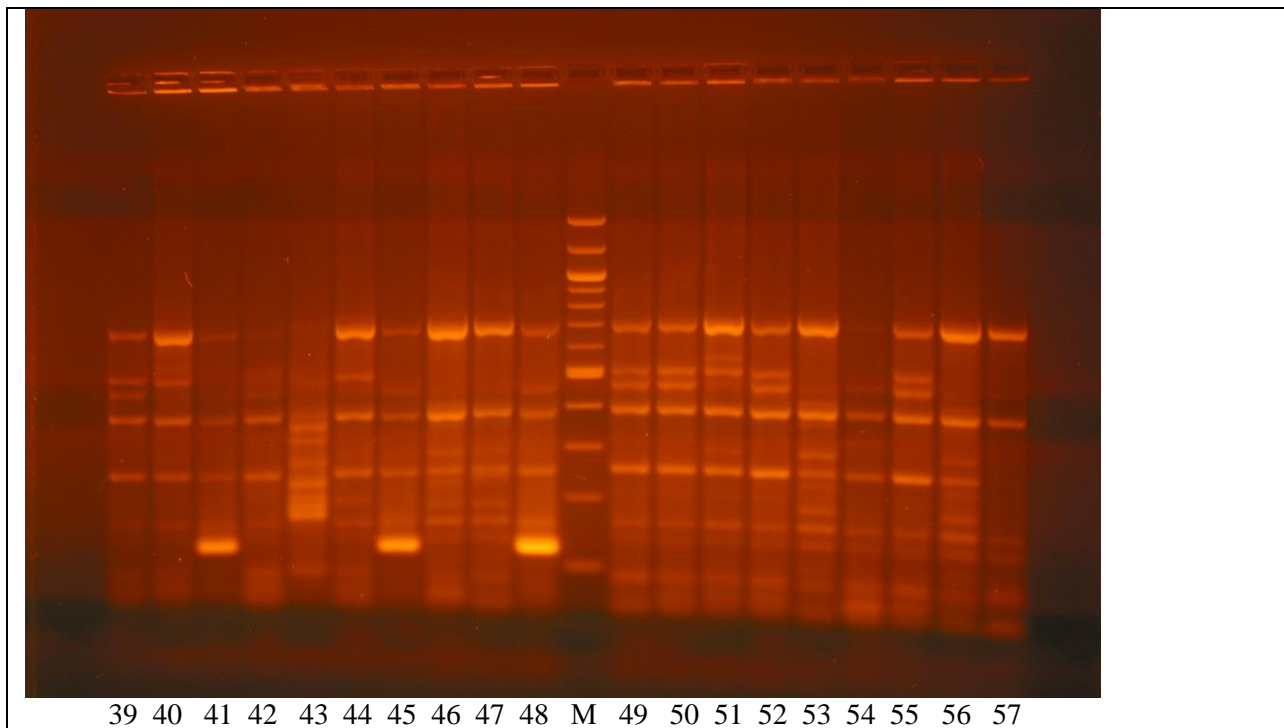
Често плазмидното носителство се свързва и с разпространение на гени, кодиращи и фактори на вирулентност. Чешки автори при изследване на мултирезистентни CTX-M-15-продуциращи ST416 *Klebsiella pneumoniae* доказват два FIIк плазида, pKDOI и pKPN-CZ, носители на голям набор от гени, кодиращи резистентност към токсични съединения, метали и антимикробни лекарства и показващи нови характеристики, свързани с адаптацията на бактериите в човешкия организъм като гостоприемник (Dolejska M, 2013).

В заключение, в настоящото проучване проведените успешни конюгационни експерименти с *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{CTX-M-3} позитивни изолати от нашата колекция потвърдиха плазмидната локализация на тези гени. При положителните за *bla*_{CTX-M-15} изолати се доказва присъствие на IncF и нетипируеми плаزمиди, а при положителни за *bla*_{CTX-M-3} – присъствие на плазмиди от IncL/M. В положителни за *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{KPC-2} изолати *K. pneumoniae* се установиха IncFII плазмиди. В единствения изолат ко-продуцент на *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{OXA-48} се доказва наличие на IncR плазмид.

5.6. Епидемиологично типизиране

Проучени бяха общо 159 изолата *K. pneumoniae*, изолирани в периода януари 2014 - декември 2017г. от различни пациенти, хоспитализирани в 24 клиники (6 интензивни и 18 не- интензивни звена) на УМБАЛ „Света Марина“, Варна. Петдесет и четири от изолатите *K. pneumoniae* са от пациенти в интензивни клиники, а 105 - от не-интензивни звена.

Всички изолати *K. pneumoniae* бяха типизирани чрез ERIC- PCR. Репрезентативни изолати от всеки ERIC бяха подложени на мултилокусно секвениране. За всеки изолат бяха генерирани разпознаваеми ERIC профили, съставени от 5 до 10 бенда. За клон приехме изолати с разлика в ERIC профилите до 2 ивици. Идентифицирани бяха 17 основни ERIC типа и 4 подтипа със следните означения: ERIC A, A1, B, D, D1, E, F, G, H, I, K, L, M, O, P, P1, P2, S, T, W, X (Таблица 19, Фигура 18). Всички ERIC типове (с изключение на F, O, W) са представени от клонални групи, съставени от 2 до 64 щама всеки. Типовете F, O, W и Uni са представени от единични изолати.



Фигура 18. ERIC профили на изолатите *K. pneumoniae*.

Клон А - позиции 46, 47, 53, 54, 56 ; клон Р – позиции 39, 42, 44, 49, 50, 52, 55; клон К – позиции 41, 45, 48; клон Х – позиции 40, 51, 57; М - маркер

ERIC тип А, съответстващ на секвенциален тип **ST15**, беше доминиращ, доказан в 40.3% (n=64) от всички изолати *K. pneumoniae*. Първият изолат от този тип беше доказан за през март 2014 г. в ИДО. Изолати с този профил се срещат през целия проучван период, като се намират в общо 20 клиники. Един изолат *K. pneumoniae*, получен от ръце на персонал в КАИЛ през февруари 2016г., също демонстрира ERIC профил А. В клиниките по Хирургия, Интензивна кардиохирургия, Съдова хирургия, Кардиология, Ендокринология, Гастроентерология и Инфекциозна клиника бяха доказани единични изолати *K. pneumoniae* от ERIC тип А, а в останалите клиники изолируемостта беше по-интензивна (от 2 до 12 изолата). ERIC тип А се идентифицира доминиращо в КАИЛ (n=8) и клиниката по нефрология (n=7), което представлява 12.5% и 10.9% съответно от изолатите с този профил (5% и 4.4% от цялата колекция съответно). През различни интервали от време се наблюдава струпване от 2 или 3 изолата от тип А.: през март 2014г. се доказват 3 изолата в КАИЛ, през декември същата година - 3 изолата в Клиниката по Неврология; септември 2016г. - 3 изолата в Клиниката по Нефрология; януари 2017г. - 3

изолата в Детска клиника, а през март 2017 - 2 изолата в клиниката по Кардиохирургия. Интензивно детско отделение, Вътрешна клиника и Детска клиника са представени с по 6 изолата, което е 9.4% от типа и 3.8% от цялата колекция. Изолатите *K. pneumoniae* от интензивните клиници (КАИЛ, n=8; ИДО, n=6; ИКО, n=3; ИНО, n=5; Интензивен съдов сектор, n=2 и Интензивен кардиохирургичен сектор, n=1) оформят най-високият дял (39%, n=25) в тип А и 15.7% в цялата колекция *K. pneumoniae*. ERIC тип А1 (един бенд разлика от А), представен от 3 изолата *K. pneumoniae*, се доказва в клиниката по Кардиохирургия през месец март 2016г. (2 изолата) и в Клиниката по Детска онкохематология през месец май на същата година.

Според вида на клиничните проби се установи следното разпределение на изолатите с ERIC тип А (MLST 15): с най-висок относителен дял са изолатите от урина, 39%, (n=25), следвани от инвазивните изолати (n=23) (от кръв, n=22 и ликвор, n=1) - 35.9%, секрети от респираторен тракт (n=9) - 14% и раневи секрети (n=6) - 9.4%. Над 50% от инвазивните изолати в настоящата колекция (54.8%, 23/42) се представят с ERIC профил А.

Изолатите с ERIC типове А и А1 (**ST15**) представляват 42.1% (n=67) от всички *K. pneumoniae* изолати. Тези изолати са продуценти на CTX-M-15 ESBL; някои от тях на KPC-2 карбапенемаза (30.3%, n=20) и само един изолат е продуцент на OXA-48 карбапенемаза. В тази група изолати, честотата на *qnr* гените е ниска: *qnrB9* - 7.5 % (n=5) и *qnrB1* 8.9% (n=6) (виж т.5.7.) (таблица 19).

ERIC тип Р, идентифициран като **MLST 11**, е втория по честота тип, доказан в 18.3% (n=29). С най-голяма интензивност този клон се установява в Клиниките по Нефрология (27.6%, n=8) и Урология (24%, n=7), но изолати с ERIC профил Р има и във Вътрешна клиника (10.3%, n=3), а в клиниките по Кардиохирургия, Хематология, КАИЛ, ИДО, ИНО и Хемодиализа се срещат като единични изолати. За първи път *K. pneumoniae* с ERIC профил Р е изолиран през август 2015 г. в клиника по Урология. По късно през март 2016г. в клиниката по Хематология бе доказан карбапенем-резистентен инвазивен изолат със същия профил от кръв и ранев секрет, но продуциращ NDM-1. Последният изолат с идентичен ERIC профил също е NDM-1 продуцент, но получен от хемокултура на кърмаче от ИДО през декември 2017г.

Най-висок относителен дял на изолатите *K. pneumoniae*, демонстриращи ERIC профил Р установяваме в групата на тези от урини (55.2%, n=16), следвани от тези от раневи секрети (17.2%, n=5) и кръв и респираторни секрети съответно (по 13.8% (n=4)).

Близките ERIC типове P1 и P2 (също **MLST 11**) се установяват в единични изолати от урина и ранев секрет на пациенти, хоспитализирани в КАИЛ през януари 2017г. и Неврохирургия през март 2017 г.

Всички изолати *K. pneumoniae* с ERIC профили Р, P1 и P2 (общо 31) са ESBL-продуценти, като в 80.7% (n=25) беше доказана CTX-M-15 ESBL, в 12.9% (n=4) - CTX-M3, а в 9.7% (n=3) - NDM-1 метало-карбапенемаза и CMY-4 AmpC ензимите (Таблица 19). В тази група изолати се установи по-висока честота на *qnr* гени: *qnrB9* - 19.4% (n=6), *qnrB4* - 32.3% (n=10) и *qnrB1* - 3.23% (n=1) (виж т. 5.7.) (таблица 19).

ERIC типове D и D1 (**MLST 35**) доказани в 4.4% (n=8) от всички изолати *K. pneumoniae*, се установяват в периода 2014 – 2016г. в следните клиники: КАИЛ, Интензивно неврологично отделение, Клиники по хематология, вътрешни болести, кардиология и нефрология (таблица 19). Всички изолати *K. pneumoniae* ST35 са продуценти на CTX-M-15, а един е ко-продуцент и на KPC-2 карбапенемаза.

ERIC тип I, съответстващ на **MLST 395** (n=7), беше установен само през 2016г. в Клиниката по вътрешни болести (n=3), но така също като единични изолати в КАИЛ и клиники по Кардиология и Нефрология. Всички изолати бяха положителни за *qnr S1*, и *bla_{CTX-M}* (виж т.5.7.), а един изолат и за *bla_{KPC-2}*.

Изолати *K. pneumoniae* с ERIC профил H (**MLST 147**), доказани в 3.8% (n=6), се установяват в целия проучван период (2014 – 2017) в следните клиники: КАИЛ (n=2), клиники по Хирургия, Хематология, Урология и Ревматология по един изолат. Първият изолат с този профил бе идентифициран през октомври 2014г. в клиниката по Хирургия и беше потвърден като ко-продуцент на две карбапенемази KPC-2 и VIM-1 метало-карбапенемаза. *bla_{VIM-1}* бе доказан също и в изолат *K. pneumoniae*, но през март 2015г. в КАИЛ, демонстриращ същия ERIC профил. В тази групата изолати бяха идентифицирани и гени, кодиращи ESBLs: CTX-M-15 (n=3), CTX-M-3 (n=1), SHV-12 (n=2).

ERIC тип T (**MLST 76**), представляващ 3.8% (n=6) от всички проучвани изолати *K. pneumoniae* бе доказан в периода 2014 – 2015г. в КАИЛ (n=1), Интензивно неврологично отделение (n=1), Интензивна кардиология (n=1), Интензивно детско отделение (n=1),

Клиника по Нефрология (n=1) и Клиника по Неврология (n=1). Всички шест изолата са продуценти на СТХ-М-15 и КРС - 2 карбапенемаза, а два са позитивни за *qnr B9* (виж т.5.7.).

ERIC типовете М, К и Х (съответно **MLST 659, 340, 307**) са представени от малък брой (5-6) изолати *K. pneumoniae*, получени от пациенти, хоспитализирани в различни клиники на болницата. Тези изолати се асоциират само с продукцията на СТХ-М ESBLs, но не и с карбапенемази. Нито един от тези ERIC типове не персистира през целия период на проучването, а се ограничава само в рамките на определена година: М - през 2014г., К - през 2016г. и Х - през 2017г. (таблица 19.)

ERIC тип Е (**MLST 37**) с 4 изолата беше доказан през април 2014г. в КАИЛ в един изолат, а през юни и юли 2016г. - в Детско Отделение и в Клиниката по Детска онко-хематология. Тези изолати се асоциираха с продукцията на СТХ-М ензими.

Представени от единични изолати, ERIC типовете G (**MLST 151**) и S (**MLST 1350**), подобно на А, D, H, I и T, също се асоциират с продукцията на КРС-2 карбапенемазата.

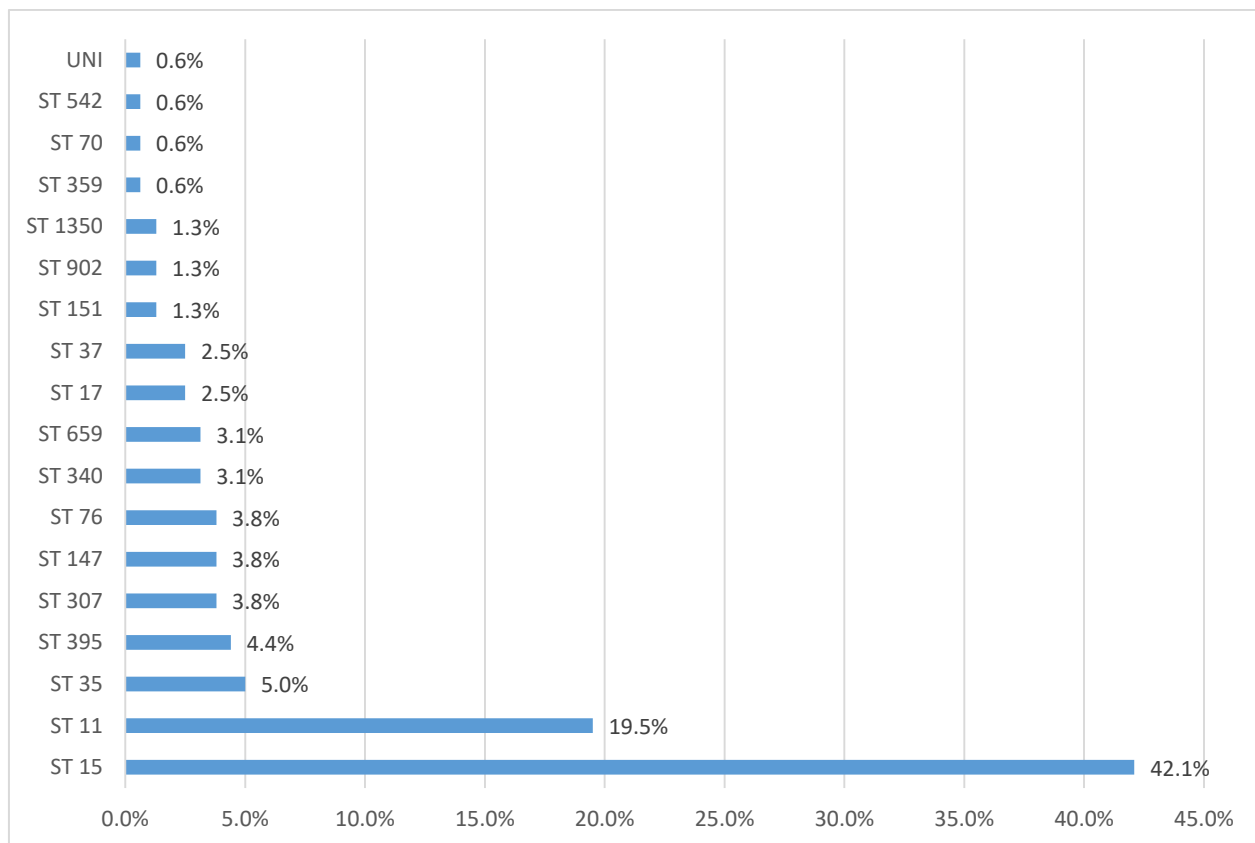
Резултатите от мулти-локусно секвениране показаха съществуването на 17 ST типа, много добре корелиращи на съответните ERIC типове (таблица 19, фигура 19).

Таблица 19. Разпределение на 159 изолата *K. pneumoniae* според ERIC профила, MLST, година на изолиране, клиничен материал, клиника, носителство на ESBL и карбапенемазни гени и детерминанти на хинолонова резистентност.

ERIC тип	MLST	Дата на изолиране	Материал	Клиника	ESBL и карбапенемазни гени	Детерминанти на хинолонова резистентност
A (n=64)	15	2014 - 2017	Кръв (n=22) Урина (n=25) Рани (n=6) ДС (n=9) Ликвор (n=1) Ръце на персонал (n=1)	КАИЛ (n=8) ИДО (n=6) И Съд.Хир. (n=2) ИНО (n=5) ИКО (n=3) И Кардиохир. (n=1) Нефрология (n=7) Урология (n=2) ВО (n=6) ДО (n=6) Хематология (n=3) ДОХ (n=1) Диализа (n=2) Хирургия (n=1) Съдова хирургия (n=1) Инфекц. к-ка (n=1) Кардиология (n=1) Гастроентерология (n=1) Ендокринология (n=1) Неврология (n=4) Ръце на персонал КАИЛ (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=64) <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=5) <i>bla</i> _{SHV} (n=48) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=20) <i>bla</i> _{OXA-48} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=64) <i>Oqx B</i> (n=56) <i>Qnr B1</i> (n=3) <i>Qnr B9</i> (n=5)
A1 n=3	15	2014 - 2017	Рана (n=2) Урина (n=1)	Кардиохирургия (n=2) Хематология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=3) <i>bla</i> _{SHV} (n=2)	<i>Oqx A</i> (n=3) <i>Oqx B</i> (n=3) <i>Qnr B1</i> (n=3)
B (n=4)	17	2014, 2017	Урина (n=3) Рана (n=1)	ВО (n=1) Хематология (n=1) Кардиохирургия (n=1) Гастроентерология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=2) <i>bla</i> _{SHV} (n=4)	<i>Oqx A</i> (n=2) <i>Oqx B</i> (n=2) <i>Qnr B9</i> (n=2)
P (n=29)	11	2015 – 2017	Кръв (n=4) ДС(n=4) Урина (n=16) Рани n=5	КАИЛ (n=1) ИДО (n=1) ИНО (n=2) Хематология (n=2) Урология (n=7) Нефрология (n=8) Кардиохирургия (n=2) Хемодиализа (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=24) <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=4) <i>bla</i> _{CMY-4} (n=3) <i>bla</i> _{SHV} n=24 <i>bla</i> _{NDM-1} (n=3)	<i>Oqx A</i> (n=29) <i>Oqx B</i> (n=24) <i>Qnr B9</i> (n=6) <i>Qnr B4</i> (n=10) <i>Qnr S1</i> (n=3)

				ВО (n=3) Онкология (n=1) Гастроентерология (n=1)		
P1 (n=1)	11	2017	Урина (n=1)	КАИЛ (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=1) <i>bla</i> _{SHV} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Qnr B1</i> (n=1)
P2 (n=1)	11	2017	Рана (n=1)	Неврохирургия (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1) <i>bla</i> _{SHV} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Oqx B</i> (n=1)
D (n=7)	35	2014 - 2016	Урина (n=4) Кръв (n=1) ДС (n=2)	КАИЛ (n=2) ИНО (n=1) Хематология (n=1) ВО (n=1) Нефрология (n=1) Кардиология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=7) <i>bla</i> _{SHV} (n=6) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=4) <i>Oqx B9</i> (n=4) <i>Qnr B1</i> (n=1)
D1 (n=1)	35	2014	ДС (n=1)	ИНО (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Oqx B9</i> (n=1)
E (n=4)	37	2014-2016	Урина (n=2) Кръв (n=1) рана (n=1)	ДО (n=2) Д Хематология (n=1) КАИЛ (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1) <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=3) <i>bla</i> _{SHV} (n=3) <i>bla</i> _{OXA-1} (n=3)	<i>Oqx A</i> (n=3) <i>Oqx B</i> (n=3)
F (n=1)	359	2014	Кръв (n=1)	Кардиохирургия (n=1)	<i>bla</i> _{SHV-12} (n=1) <i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Oqx B</i> (n=1)
G (n=2)	151	2014	ДС (n=2)	ИНО (n=2)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=2) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=2)	<i>Oqx A</i> (n=2) <i>Oqx B</i> (n=2) <i>Qnr B1</i> (n=1)
H (n=6)	147	2014 - 2017	Урина (n=3) Рани (n=3)	КАИЛ (n= 2) Хирургия (n=1) Хематология (n=1) Урология (n=1) Ревматология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=3) <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=1) <i>bla</i> _{SHV-12} (n=2) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=1) <i>bla</i> _{VIM-1} (n=2)	<i>Oqx A</i> (n=5) <i>Oqx B</i> (n=5) <i>Oqx B1</i> (n=3) <i>Qnr S1</i> (n=2)
I (n=7)	395	2016	Урина (n=4) Рани (n=2) ДС (n=1)	ВО (n=3) КАИЛ (n=2) Нефрология (n=1) Кардиология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=6) <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=6) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=7) <i>Oqx B</i> (n=7) <i>Qnr S1</i> (n=7)
K (n=5)	340	2016	Рани (n=1) Урина (n=1)	Съдова Хирургия (n=1) ВО (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=5) <i>bla</i> _{SHV} (n=5)	<i>Oqx A</i> (n=5) <i>Oqx B</i> (n=5)

			ДС (n=1) Кръв (n=2)	КАИЛ (n=3)		<i>Qnr B9</i> (n=5)
L (n=2)	902	2014	Кръв (n=1) Рана (n=1)	Нефрология (n=1) Перитонеална диализа (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1) <i>bla</i> _{CTX-M3} (n=1) <i>bla</i> _{SHV} (n=1) <i>bla</i> _{OXA-1} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Qnr B1</i> (n=1)
M (n=5)	659	2014	Урина n=5	Урология (n=3) ВО (n=1) Хематология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=5)	<i>Oqx A</i> (n=3) <i>Oqx B</i> (n=3) <i>Qnr B9</i> (n=3)
O (n=1)	70	2014	Кръв (n=1)	ИДО (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	<i>Qnr B9</i>
S (n=2)	1350	2014	Кръв (n=2)	ИНО (n=1) ИКО (n=1)	<i>bla</i> _{KPC-2} (n=2)	<i>Qnr B9</i> (n=2)
T (n=6)	76	2014 - 2015	Кръв (n=4) Ликвор (n=1) Урина (n=1)	КАИЛ (n=1) ИНО (n=1) ИКО (n=1) ИДО (n=1) Нефрология (n=1) Неврология (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=6) <i>bla</i> _{KPC-2} (n=6)	<i>Qnr B9</i> (n=2)
W (n=1)	542	2014	ДС (n=1)	ДО (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	
X (n=6)	307	2017	Урина (n=2) Рана (n=1) ДС (n=3)	КАИЛ (n=2) Нефрология (n=1) Кардиохирургия (n=1) ДО (n=1) Перитонеална диализа (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=5) <i>bla</i> _{SHV-11} (n=1)	<i>Qnr B1</i> (n=6)
Uni (n=1)		2016	кръв(n=1)	хематология(n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M15} (n=1)	<i>Oqx A</i> (n=1) <i>Oqx B</i> (n=1)



Фигура 19. Разпределение на ST типовете сред колекция от 159 клинични изолата *K. pneumoniae*.

Обсъждане

В последните години все по-често се появяват научни съобщения за вътреболнични инфекции и взривове предизвикани от мултирезистентни клонално свързани бактериални изолати. Международните високорискови клонове *Klebsiella pneumoniae* са сред най-честите и клинично значими вътреболнични патогени. Гените, кодиращи резистентност към бета-лактамни антибиотици и специално карбапенеми, са локализирани предимно върху плазмиди, често асоциирани с някои “успешни” *K. pneumoniae* секвенцилни типове (MLSTs) (напр. *K. pneumoniae* ST258, ST11), което изключително благоприятства тяхната дисеминация (REF) .

В настоящата работа за целите на епидемиологичния анализ са проучени общо 159 изолата *K. pneumoniae*, от които 38 карбапенем-резистентни. Всички карбапенем-резистентни изолати с изключение на 5 са продуценти на KPC-2 карбапенемаза. За широка

дисеминация на КРС-2 карбапенемази, предимно асоциирани с *K. pneumoniae* ST258 клон се съобщава в много проучвания, идващи от различни части на света (САЩ, Средният Изток, Южна Америка, Китай и Европа). Някои автори заключват, че почти всички КРС взривове в Европа са свързани с ST258 *K. pneumoniae*. В нашето проучване този ST тип не беше установен. В допълнение, другият секвенциален тип - ST11, също асоцииран с КРС карбапенемази и разпространен в Китай и други Азиатски страни, беше доказан в 31 изолата, от които само три са носители на *bla*_{NDM-1}, но не и на *bla*_{КРС-2}. ST11 клона има само 1 алел разлика с ST258, което обяснява високата разпространяемост и на двата клона.

Доминиращият ендемичен ST-тип сред КРС-2 продуциращите *K. pneumoniae* в настоящото проучване е ST15. Този тип представлява 41.5% от цялата колекция изолати (n=66), като се установява в различни клиники на болницата. Относителният дял на КРС-2 продуцентите от клон ST15 е 30% (n=20), от които 60% (12/20) са инвазивни изолати от КАИЛ, Клиника по Неврология, ИНО, ИДО, ИКО, Интензивно отделение към клиника по Кардиохирургия и Интензивен Съдов Сектор. В допълнение към ST258 и ST11, ST15 *K. pneumoniae* също е известен като “успешен” интернационален клон, престапител на комплекс 23 (Wang Q, 2013). Той по-често е доказван като носител на *bla*_{СТХ-М} (специално *bla*_{СТХ-М-15}), но също и NDM, VIM и OXA-48 гени (Wang Q, 2013; Rodrigues C, 2014; Melegh S, 2014, Poirel L, 2011c; Potron A, 2013a; Lam MMC 2019). Автори от Унгария съобщават за асоциация на ST15 с СТХ-М-15 продуциращи ciprofloxacin-резистентни *K. pneumoniae* (Damjanova I, 2008). Това съобщение е в унисон с нашите резултати, които установяват, че всички изолати, отнасящи се към ST15 са носители на *bla*_{СТХ-М-15}. В този смисъл високото ниво на СТХ-М-15 ензимите в нашето проучване и тяхното разпространение се асоциират с присъствието на епидемичния интернационален клон ST-15, който освен СТХ-М-15 ензимите ко-продуцира и SHV-28 и КРС-2 ензими. Този резултат показва способността на ST15 изолатите лесно да придобиват различни детерминанти на резистентност. Дисеминацията на *bla*_{СТХ-М-15} се медуират също и от други, не толкова широко разпространени ST типове – ST35, 395, 340, 659, 307, 151. Подобно на *bla*_{СТХ-М-15}, *bla*_{СТХ-М-3} дисеминацията също се асоциира с няколко различни ST типа: ST37, 395.

Доминирацият ST15 клон, установен още в началото на 2014г., персистира през целия 4 годишен проучван период. Разпространен е в почти всички клиники, но най-много в интензивните болнични звена. Изразения потенциал на ST15 клона да се разпространява сред пациенти от интензивни клиники е демонстриран и в предишни проучвания (липсва цитат). От друга страна, доказването на 30% от изолатите ST15 *K. pneumoniae* в проби кръв, категорично демонстрира инвазивния потенциал на този клон. Идентифицирането на изолат *K. pneumoniae* ST15 от ръце на персонал, доказва медицинския персонал като важен фактор за вътреболничната дисеминация на нозокомиалния патоген. Именно вътреболнично придобиване и разпространение чрез ръцете на медицинските работници (или контаминирани болнични източници) е едно от възможните обяснения на епидемичния процес в болницата, свързан с този ST тип. В допълнение, освен *K. pneumoniae* ST15, доминиращ сред инвазивните изолати (кръв и ликвор) от това проучване, в по-малка степен асоциирани с инвазивни изолати са също ST11 (9.5%) и ST76 (11.9%). В подобно проучване, автори от САЩ докладват ST307 (15.0%) като най-честият ST сред изолатите от кръв, а ST258 (28.3%) преобладаващ сред уропатогените (Mendes RE, 2019). В нашето проучване *K. pneumoniae* ST307 се доказва в едва 3.8% от изолатите (n=6) от урини, респираторни секрети и рани, като липсват инвазивни изолати от този секвенциален тип. *K. pneumoniae* ST307 беше установен през 2017г. в различни клиники на болницата (КАИЛ, Нефрология, Кардиохирургия, Детско отделение и Клиника перитонелна диализа). През целия проучван период не бяха доказани изолати *K. pneumoniae* от ST258 типа.

В унисон с множество проучвания, които доказват *K. pneumoniae* ST15 широко разпространен в Европа и свързан с продукция на карбапенемази като KPC-2, OXA-48, VIM-1) (Esteban-Cantos, 2017; Meleg, 2014; Potron, 2013; Rodrigues, 2014;), нашите резултати демонстрират, че в групата на карбапенем-нечувствителните изолати (n=38), най-висок е относителният дял на ST15 (52.6%), на второ място е *K. pneumoniae* ST76 (15.8%), следвани от единични карбапенем-нечувствителни изолати, отнасящи се към ST1350, ST151, ST35, ST147 и ST395. ST76 е single locus variant на *K. pneumoniae* ST495, доказан в Гърция през 2009 - 2010г. и асоцииран с продукцията на KPC-2 карбапенемаза (Giakkoupi P, 2011).

Резултатът от настоящото проучване по отношение на превалиращия ST15 клон, е в унисон с по-ранно проучване, проведено в България върху 35 изолати *K. pneumoniae* с намалена чувствителност към карбапенеми, колекционирани в периода 2012 – 2015г.: доминиращ MLST също е ST15, следван от ST76, а доминиращата карбапенемаза е KPC-2 (Markovska R, 2015). В същото проучване се съобщава за OXA-48 продуциращ изолат *K. pneumoniae*, принадлежащ към ST 101 (Markovska R, 2015). Единственият изолат *K. pneumoniae* в настоящото проучване, носител на *bla*_{OXA-48}, се отнася към ST15. Този резултат е в контраст с резултатите за широко дисеминиране на OXA-48 продуценти в Европейски страни (Полша, Германия) и Турция Есе, 2018; Kaase, 2016 .

В проучваната колекция, от всички карбапенем-нечувствителни изолати *K. pneumoniae*, само два са продуценти на VIM-1 метало-карбапенемаза и принадлежат към ST147. В нашата болница VIM-1 продуциращи *K. pneumoniae* за първи път бяха доказани през 2012г. (Markovska, 2013). За подобни щамове в Гърция съобщава Papagiannitsis и колектив (Papagiannitsis, 2013).

Втори по честота на разпространение в настоящото проучване е *K. pneumoniae* ST11 тип (19.5%), който основно се асоциира с носителство на *bla*_{CTX-M-15} и само в 3 изолата - с *bla*_{NDM-1}. Този клон се появява в болницата през 2015 г., разпространявайки се в много клиники, но най-вече в Нефрология и Урология като изолатите са предимно от проби урина. Този клон персистира до 2017г. В научната литература *K. pneumoniae* ST11 е известен като един от основните патогенни клонове *K. pneumoniae*, широко разпространен в страни от Азия, Латинска Америка, САЩ и Европа (Чехия, Испания, Гърция, Швейцария) (Sun, 2015; Pitout, 2015). В допълнение, *K. pneumoniae* ST11 се асоциира с вътреболнични инфекции с различна анатомична локализация като уроинфекции, бактериемии, инфекции на долен респираторен тракт и др. (Ко, 2010). Някои автори докладват за хипервирулентни щамове *K. pneumoniae* ST11, продуциращи капсулен полизахарид, сидерофори и адхезивни фактори като тип 1 и тип 3 пили, а други за изолати *K. pneumoniae* от същия тип - носители на гени, кодиращи множествена лекарствена резистентност (Zhan, 2017; Lee CR, 2018; Dong, 2018; Liu J, 2018; Dsouza, 2017). В скорошно проучване на Fu и кол. в Китай, като водещ тип сред KPC-продуциращите *K. pneumoniae* се съобщава ST11 (87.1%). Същите автори доказват, че KPC-продуциращите *K. pneumoniae* ST11 в 100% се асоциират с IncFII плазмиди. За сравнение, в KPC-

продуциращи *K. pneumoniae*, принадлежащи клон ST11, тези плазмиди се установяват в 16% , а при непродуциращите KPC едва в 7.5% (Fu P, 2019). В сходно на нашето проучване, проучване на Тео и кол. върху разпространението на различни MLST типове в бактериални видове от семейство *Enterobacteriaceae* се установява, че colistin-резистентните *K. pneumoniae* се отнасят към девет различни типа - ST11, 15, 20, 273, 392, 513, 719, 841, 978, от които ST11 и ST20 са най-честите (Тео JQ, 2019), което е в съответствие с нашите резултати. В проучване на Carrasco-Anabalón и кол. се доказват десет различни MLST типа, като доминиращите са ST258 и ST1161, а резистентността към colistin в колекцията изолати достига 73% (Carrasco-Anabalón S, 2018).

Подобно доказателство за асоцииране на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae* с различни ST типове дават също китайски учени, които изследват 170 карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* и установяват 16 различни секвенциални типа, като най-често идентифицираният е ST15 (41.76%). В допълнение, тези автори съобщават, че карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, продуциращи OXA-232 карбапенемаза се отнасят към ST15, докато продуцентите на NDM-1 и KPC-2 към ST37 и ST11 съответно (Tian D, 2018). По подобие на нашите резултати, проучване в Китай върху 38 карбапенем-резистентни *K. pneumoniae* установява носителство на *bla*_{KPC-2} гени в 89.5%, в 7.9% - на *bla*_{IMP-4}, както и разпространение на пет секвенциални типа (ST23, ST15, ST1373, ST1415), от които ST11 доминиращ (86.8%) (Lin D 2018). Сред резултатите от нашето проучване прави впечатление, че генът *bla*_{KPC-2}, кодиращ KPC-2 карбапенемазата се асоциира с шест различни секвенциални типа: ST15, ST76, ST1350, ST151, ST35 и ST395. Предаването на *bla*_{KPC-2} основно се свързва с пренос на IncFIIAs плазмиди. Дисеминацията на *bla*_{KPC-2} съдържащи плазмиди между различни клонове *K. pneumoniae* или внасянето на нови карбапенем-резистентни ST типове с висок епидемичен потенциал може да бъде възможно обяснение на развитието на епидемичния процес в болницата. Трябва да се подчертае, че високият селективен натиск в Българските болници също може да допринася за по-нататъшната експанзия на някои от клоновете. Употребата на цефалоспорини от трета генерация в България е най-високата от всички Европейски страни (<http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-latest-data-antibiotic-consumption-eu-2017>).

В настоящата работа установихме едва три карбапенем-нечувствителни изолати *K. pneumoniae*, които са положителни за *bla*_{NDM-1} и се отнасят към ST11 типа. Понастоящем този ген е широко дисеминиран в световен мащаб, което се обяснява с неговата плазмидна локализация (Voulgari, 2014). През 2011-2012г. в Гърция са описани два взрива от вътреболнични инфекции, причинени от *K. pneumoniae*, продуциращи NDM-1 и принадлежащи към MLST11. Същите автори съобщават и за други секвенциални типове, също асоциирани с NDM-1 метало-карбапенемазата, но представени спорадично - ST15, ST70, ST258 и ST1883 (Politi, 2019). Автори от Китай съобщават за епидемичен взрив сред новородени, предизвикан от NDM-1-продуциращи *K. pneumoniae* ST1419 (Yu J, 2017). На Балканите също има документирани взривове от клонално свързани NDM-1 продуциращи *K. pneumoniae*. Автори от Албания докладват за colistin резистентен щам *Klebsiella pneumoniae* ST15, също продуциращ NDM-1 (Tafaj S, 2018). В България NDM-1 продуциращи изолати *K. pneumoniae* ST11 за първи път са описани от Тодорова (2016) и Костянев (2016) (Kostyanev, 2016; Todorova, 2016). По-късно Савов и кол. съобщават първия поликлонален вътреболничен взрив, причинен от NDM-1 продуциращи *K. pneumoniae* изолати в България, принадлежащи към 4 секвенциални типа - ST11, ST16, ST15 и ST391, като ST11 е доминиращият (Savov, 2018). В настоящото проучване, установихме, че в допълнение на продукцията на NDM-1, трите изолати ко-продуцират CTX-M-15 и CMY-4 (AmpC тип бета-лактамаза), резултат съобщен за изолати *K. pneumoniae* от Чехия (Studentova, 2015). Може да се предположи, че комбинацията от трите различни ензима в тези изолати, допринася за тяхната дисеминация.

Алармиращ резултат от настоящата работа е доказването на четири едновременно резистентни на карбапеними и colistin изолати *K. pneumoniae*, получени от инвазивни инфекции (сепсиси и инфекции на ЦНС). В тези случаи дори colistin, който се приема като медикамент на последен избор при инфекции, причинени от множество и екстензивно резистентни *K. pneumoniae*, е неефективен. Тези четири изолати се отнасят към доминиращите типове ST15 (n=3) и ST11 (n=1).

В заключение, епидемиологичното типизиране чрез ERIC PCR и MLST доказва широко вътреболнично разпространение на няколко клона множество резистентни *K. pneumoniae* в УМБАЛ „Света Марина“ в периода 2014 – 2017г., продуциращи CTX-M-15 ESBL. Беше установено, че ST15, съответстващ на ERIC тип А е доминиращият тип,

персистиращ през целия проучван период (2014-2017г.), следван от ST11 (ERIC тип P), който се появява през 2015г. и присъства до края на периода. Доминиращият ST15 тип демонстрира висок епидемичен и инвазивен потенциал. Карбапенемаза-продуциращите изолати *K. pneumoniae* в това проучване се асоциират с няколко различни секвенциални типа: ST15, ST76, ST11, ST1350, ST151, ST35, ST395 и ST147. ST15 е носител на *bla*_{KPC-2} и *bla*_{OXA-48}, ST76, ST1350, ST151, ST35 и ST395 – на *bla*_{KPC-2}, ST11 - *bla*_{NDM-1}, а ST147 – на *bla*_{VIM-1}.

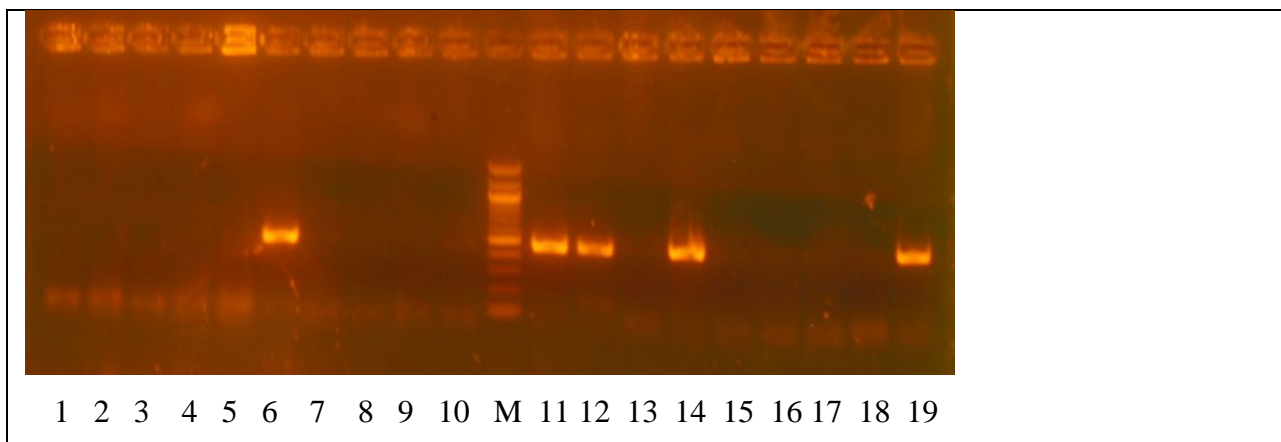
5.7. Доказване на гени, кодиращи хинолонова резистентност

5.7.1. Доказване на гени, кодиращи плазмидна хинолонова резистентност

Всички 159 изолата бяха подложени на детекция чрез PCR за гените *qnr A*, *qnr B*, *qnr C*, *qnr D*, *qnr S*, *qep A*, *oqxAB* и *aac (6')-Ib-cr*.

При всички 159 изолата *K. pneumoniae* бяха установени различни детерминанти на плазмид-медирана хинолонова резистентност (PMQR).

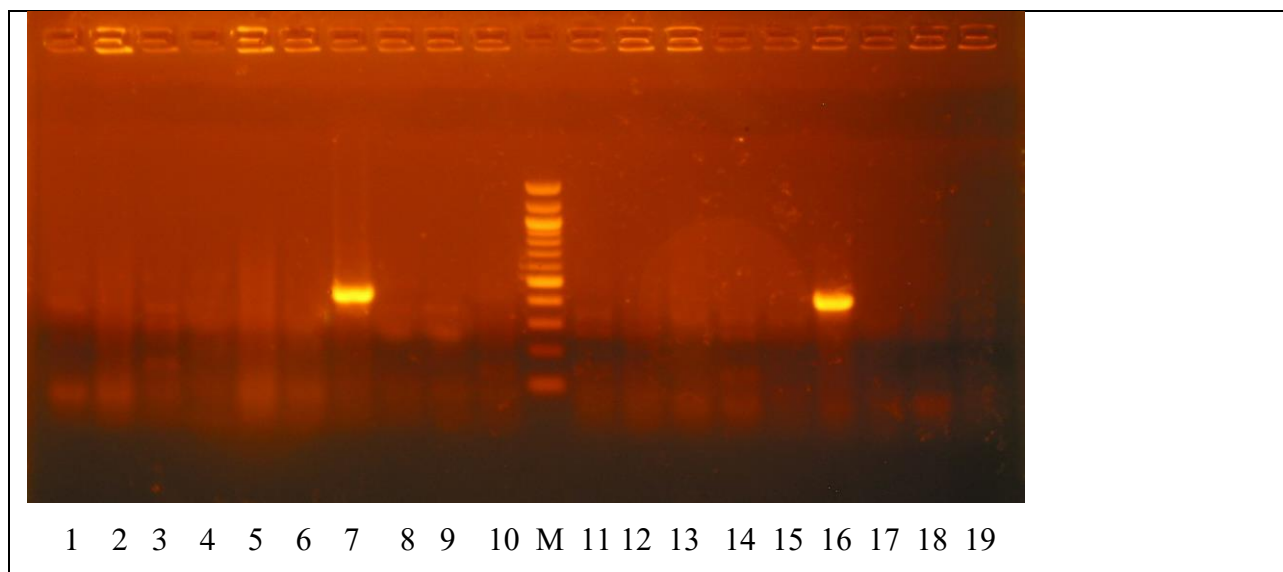
QnrB генът беше доказан в 39.6% (n=63) от изолатите. Чрез секвениране бяха идентифицирани следните три алелни варианта: *qnrB9* - 47.6% (n=30), *qnrB1* - 36.5% (n=23) и *qnrB4* – 17.5% (n=11) (фигура 20). По един изолат от групите, положителни за *qnrB1* и *qnrB4*, показва наличие на втори *qnr* алел - *qnrA1* и *qnrS1*.



Фигура 20. PCR за детекция на *qnr B* гена. М – маркер; позиции № 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17 и 18 - клинични изолати *K. pneumoniae*, отрицателни за *qnr B*. Изолати на позиции № 6, 11, 12, 14 и 19 – положителни за наличие на *qnr B* ген.

Тринадесет изолата *K. pneumoniae* (8.2%) бяха положителни за *qnrS1* (фигура 21).

В единични изолати установихме *qnrA1* в комбинация с *qnrB1*, както и асоциация на *qnrB4* с *qnr S1* (Таблица 21). Нашето проучване не установи носителство на *qnrC* и *qnrD* гени в проучваните изолати *K. pneumoniae*.



Фигура 21. PCR за детекция на *qnrS* ген. М – маркер. Позиции № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13 14, 15, 17, 18 и 19 - клинични изолати *K. pneumoniae*, негативни за *qnrS* гена. Изолати на позиции № 7 и 16 – положителни за *qnr S*

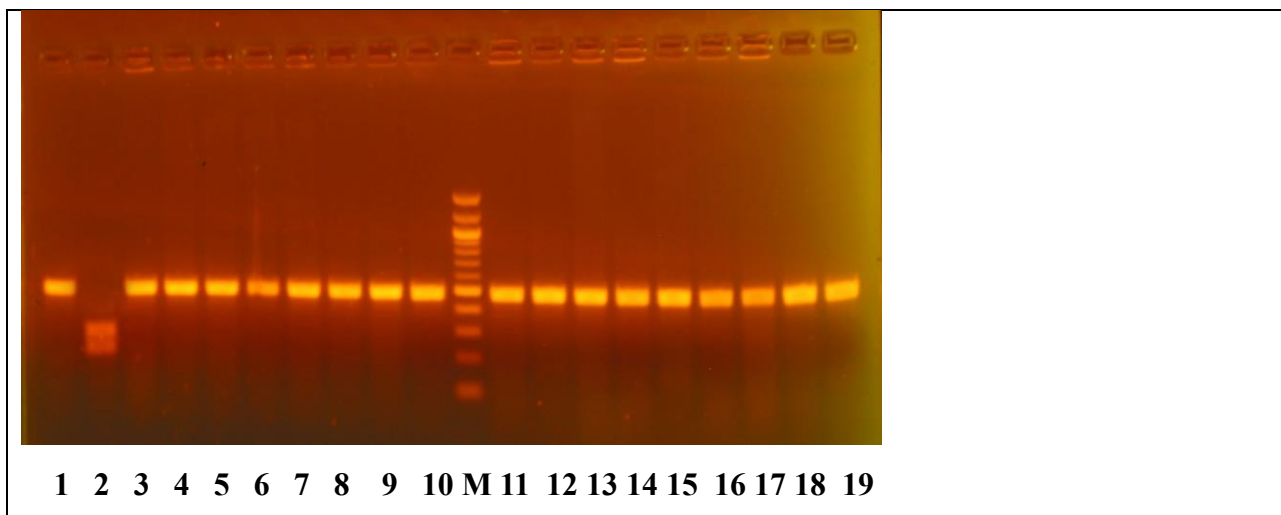
OqxA генът бе доказан в 100% от изолатите (n=159), а *oqxB* - в 93% (n=148). Не бяха идентифицирани изолати, носители на *QepA*.

При 159 изолата *K. pneumoniae* беше приложен PCR метод за детекция на *aac (6')-Ib* гена, кодиращ *aac (6')-Ib* ацетилтрансферазата. В 84 % (n=134) от изследваните изолати беше идентифициран *aac(6')-Ib*. PCR експериментите с 11 трансконюганта, потвърдиха присъствието на гена *aac(6')-Ib* в седем от тях (R+3, R+6, R+10, R+45, R+56, R+57, R+81).

При 6 изолата *K. pneumoniae* бе доказан алелния вариант на гена - *aac(6')-Ib-cr* (фигура 22).

На таблица 21 е показано разпространението на PMQR гени спрямо продуцираните

ESBL/AmpC ензими и ERIC профилите на проучваните 159 клинични изолата *K. pneumoniae*.



Фигура 22. PCR и рестрикция на клинични изолати *K. pneumoniae* за доказване на *aac(6')-Ib-cr* гените. Позиция М – маркер. Позиции № 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19 – изолати, положителни за *aac(6')-Ib*. Позиция № 2 – изолат, положителен за *aac(6')-Ib-cr* ген.

5.7.2. PCR метод за детекция на мутации в *gyr A* и *par C* гените, асоциирани с хромозомно медирана хинолонова резистентност.

Общо 159 изолата *K. pneumoniae* бяха изследвани за наличие на мутации в гените, медиращи хромозомната хинолонова резистентност (QRDR, Quinolone Resistance Determinant Region). В 71% от тях (n=113) бяха установени субституции в QRDR за *gyrA* и/или *parC*. При 5% от изолатите (n=8) бяха доказаха мутации само в *gyrA* гените, а в 66% (n=105) – в *gyrA* и *parC* едновременно. Изолати *K. pneumoniae* с мутации само в *par C* гените не бяха установени.

В *gyrA* гените бяха установени следните 5 субституции: Ser83Phe, Asp87Ala, Ser83Ile, Asp87Tyr, Asp87Asn. В 63 изолата идентифицирахме двойни субституции: Ser83Phe + Asp87Ala. Субституцията Ser83Ile открихме в 44 изолата (27.7%) В единични изолати бяха доказани Ser83Phe (n=3), Asp87Asn (n=1) и Asp87Tyr (n=1). В *par C* гените беше идентифицирана само една субституция - Ser80Ile в 66% от изолатите (n=105), като

при всички изолати тази мутация бе установена съвместно с различни замени в *gyrA* гените (Таблица 20.).

На таблица 20 е представена асоциацията между генетичните механизми на хинолонова резистентност (хромозомна и плазмидно-медирана), заедно с отражението им върху Минималните потискащи концентрации на хинолоновите антибиотици, ESBL продукцията и ERIC профила на изследваните изолати *K. pneumoniae*.

Таблица 20. Разпределение на 159 изолата *K. pneumoniae* според установените мутации в *gyrA* и *parC*, PMQR гени, МПК на хинолони, вид ESBL и ERIC профил.

Група изолати (n, брой)	Мутации в QRDR		Nx	Cip	Lev	PMQR	ESBLs	ERIC
	<i>gyrA</i>	<i>Par C</i>						
Първа (n=63) 39.6%	Ser83Phe / Asp87Ala	Ser80Phe	≥256	32 (58) 8-16(5)	16- 32 (33) 12-16 (25) 6-8 (5)	<i>oqxAB + qnrB9</i> (5) <i>oqxAB + qnrB4</i> (3) <i>oqxAB + qnrB1</i> (1) <i>oqxAB + qnrS1</i> (1) <i>oqxAB + aac(6')-Ib-cr</i> (3) <i>oqxAB</i> (50)	CTX-M-15 (61) CTX-M-3 (5) KPC-2 (15) NDM-1 (3) OXA-48(1)	A (59) P (4)
Втора (n=44) 27.7%	Ser83Phe	Ser80Phe	256 (44)	32 (43) 16 (1)	32 (35) 8-16 (6)	<i>oqxAB + qnrB9</i> (10) <i>oqxAB + qnrB4</i> (7) <i>oqxAB + qnrB1</i> (5) <i>oqxAB + qnrS1</i> (11) <i>oqxAB + aac(6')-Ib-cr</i> (1) <i>oqxAB</i> (10)	CTX-M15 (39) CTX-M-3 (7) DHA-1 (5) KPC-2(4) VIM-1(2)	P (23), P2 (2), K (5). I (7), H (3). A (1) X (3)
Трета (n=3) 1.9%	Ser83Phe	-	256 (3)	16 (1) 12 (2)	12 (1) 6-8 (2)	<i>oqxAB</i> (2) <i>oqxAB + aac(6')-Ib-cr</i> (1)	CTX-M-3 (3)	E (3)
Четвърта (n=2) 1.26	Asp87Asn	-	256 (2)	6-8 (2)	1.5-3 (2)	<i>oqxAB + qnrB1</i> (1) <i>oqxAB</i> (1)	CTX-M-15 (2)	A (2)
Пета (n=1) 0.6%	Asp87Tyr	-	256 (1)	32 (1)	32 (1)	<i>oqxAB + qnrB1</i> (1)	CTX-M-15 (1)	A (1)
Шеста (n= 46) 28.9%	-	-	24-12 (33) 3-6 (10)	32 -8 (24) 6-8 (10) 1.5-2 (6) 0.5 (2) 0.04 (1)	32-16 (17) 1-2 (7) 0.75 (4) 0.5 (7) 0.25 (1)	<i>oqxAB + qnrB9</i> (15) <i>oqxAB + qnrB1</i> (13) <i>oqxAB + qnrA</i> (1) <i>oqxAB + qnrS1</i> (2) <i>oqxAB + aac(6')-Ib-cr</i> (1) <i>oqxAB</i> (14)	CTX-M15 (37) CTX-M-3 (4) KPC-2 (13)	A (3),A1 (2),B (2),B1(2),D (7),D1 (1),E(1) F (1),G (2),H (3),M (5),O (1) P (1),L (2),S (2),T (5),W (1) X (3),Уникален профил (1)

Таблица 21. Разпространение на PMQR гени спрямо ESBL/AmpC ензими и ERIC профилите на 159 клинични изолата *K. pneumoniae*.

PMQR/ (брой)	Детерминанти на бета-лактамна резистентност (брой)									ERIC	
	CTX-M-15	CTX-M-3	CTX-M-15 CTX-M-3	DHA-1	KPC-2	KPC-2 CTX-M-15	KPC-2 VIM-1	VIM-1	NDM-1 CMY-4 CTX-M-15		OXA-48 CTX-M-15
<i>qnrB1</i> (22)	17	1	1			1	1			1	L(2)G(1)H(3)A(5)X(6) D(1)P(1)B(1)L(1)uni(1)
<i>qnrB4</i> (10)	1	1		4					3		P(10)
<i>qnrB4+</i> <i>aac(6')Ib-cr</i> (1)	1										P(1)
<i>qnrB9</i> (30)	22	1			2	5					A(5)B(2)D(4)D1(1)K(5)M(2) O(1)P(6)S(2)T(2)
<i>qnrA1+</i> <i>qnrB1</i> (1)	1										F(1)
<i>qnrB4+</i> <i>qnrS1</i> (1)				1							P(1)
<i>qnrS1</i> (12)	5	1	5					1			H(3) P(2) I(7)
<i>aac(6')Ib-cr</i> (5)	1	1							3		P(3) E(2)

Обсъждане

Хинолоните ciprofloxacin и levofloxacin са сред най-често използваните антимикробни лекарствени средства за лечението на инфекции, причинени от бактериални видове, отнасящи се към семейство *Enterobacteriaceae*. Плазмид-медираната хинолонова резистентност (PMQR) е доказана в много представители на това семейство, особено сред *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. и *Salmonella* spp. (Yanat, 2017). Различни автори докладват, че PMQR детерминантите се асоциират предимно с ниско ниво на резистентност към хинолони, но водят до селектиране на изолати с хромозомни мутации и впоследствие до неуспех на антибиотичната терапия (Hooper, 2015; Martinez-Martinez, 2008).

В нашето проучване беше установено присъствие на *OqxA* ген в 100% и *OqxB* в 93% от изпитваните изолати. В научната литературата има множество съобщения за широкото разпространение на *oqxAB* сред MDR клинични изолати *K. pneumoniae* (Сао Х, 2014). Генът *oqxAB* е докладван в 87.5% от изолатите *K. pneumoniae*, получени от пациенти в болници в Тайван, Австралия, Аржентина, Белгия, Турция, Южна Африка и САЩ още през 1996-97г. (Perez F, 2013). *OqxAB* е установен в 100% както при резистентни, така и при чувствителни на хинолони КРС-продуциращи *K. pneumoniae* изолати от Охайо (Perez F, 2013).

В епидемиологично проучване, проведено в Китай се съобщава за 67% резистентност на *K. pneumoniae* към ciprofloxacin и присъствие на *oqxAB* гена във всички изолати (Yuan JY, 2012). При проучване върху 22 щамове ciprofloxacin-нечувствителни инвазивни *K. pneumoniae* в болница в Корея от 2005 до 2010 г., *oqxAB* се открива в 50% от изолатите (Yang HY, 2014). Други автори проучват нозокомиални уроинфекции и установяват *oqxA* и *oqxB* съответно в 56.7 и 54.6% сред ESBL- продуциращи *K. pneumoniae* (Goudarzi M, 2015).

Сред 74 карбапенемаза-продуциращи *K. pneumoniae* от болница в Китай, изолирани в периода 2012 - 2014г., *oqxAB* е открит в 48 хинолон-резистентни и 2 хинолон-чувствителни изолата, като авторите са идентифицирали няколко варианти - *oqxA11*, *oqxB13*, *oqxB27* и *oqxB28* (Cheng L, 2016).

Унгарски автори в проучване върху инвазивни ципрофлоксацин-резистентни изолати *E. coli* и ципрофлоксацин-резистентни, ESBL-продуциращи *Klebsiella* spp. доказват *oqxA* и *oqxB* съответно в 48% и 40% от изолатите (Domokos J, 2016). Ferjani и кол. установяват *oqxAB* в 65% от изолатите *K. pneumoniae* в тунизийска болница (Ferjani S, 2015), като тези гени имат както хромозомна, така и плазмидна локализация. Автори от Индия при секвениране на целия геном на хипермукозен, MDR, биофилм-продуциращ изолат *K. pneumoniae*, доказват *OqxAB* в хромозомата (Rafiq Z, 2016). *OqxAB* е доказан в IncR плазмид заедно с *bla_{NDM-1}* в карбапенем-резистентни изолати *K. pneumoniae*, изолирани от

урина на пациенти, хоспитализирани в Алжирска университетската болница през 2014 г. Abderrahim A, 2017; Li J, 2019

Проучвания от последните години откриват, че *OqxAB* гените са хромозомно локализирани при *K. pneumoniae* и *Raoultella* spp. изолатите (Wong M, 2015). Тези автори предполагат, че най-вероятно тези видове са прогенитори на плазмид медираната *oqxAB*. Различни плазмиди се докладват да пренасят *oqxAB* гена - IncF, IncH, IncHI2 and IncX (Li J, 2019). Свърхекспресията на *oqxAB* гена може да доведе до мултирезистентен фенотип, като трябва да се отбележи, че при плазмидно предаване генът е свърхекспресиран – над 80 пъти над нивото му, ако е локализиран в хромозомата (Wong M, 2015). В настоящият дисертационен труд не беше установена плазмидна локализация на този ген.

Друг механизъм, обуславящ резистентността към флуорхинолони е свързан с продукцията на ензима *aac(6')-Ib-cr*. Това е бифункционален ензим, който засяга главно ciprofloxacin, причинявайки предимно ниско ниво на резистентност, а също и аминокликозидите tobramycin и amikacin (Jacoby, 2014).

В нашето проучване *aac(6')-Ib-cr* се доказва едва в шест изолата, като четири от тях бяха носители на *qnr* B4 ген. В противовес на това, чилийски автори установяват в 71% от проучваните изолати *K. pneumoniae* (всички носители на *bla_{TEM}* и *bla_{SHV}*) продукцията на *aac(6') Ib-cr*, а в 57% - наличие на *qnr* ген (A, B, C, D или S) (Carrasco-Anabalón S, 2018).

Подобна находка е съобщена от Hamed SM и кол., които проучват 169 изолата Грам-отрицателни бактерии. Авторите доказват PMQR детерминанти в 56.8%, като тези гени са по-честа находка сред ентеробактериите (66.7%), отколкото сред неферментиращите глюкоза микроорганизми (7.1%). Гените *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS*, *qnrB* и *qnrA* са доказани съответно в 51.1%, 31.2%, 7.1% и 0.7%. *Qnr* в комбинация с *aac(6') - Ib-cr* се доказват при 21.9% от изолатите (Hamed SM, 2018).

Сходни с нашите резултати са тези и от проучване в болница в Шри Ланка върху карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae*, сред които 10 изолата *Klebsiella pneumoniae*. Гените, кодиращи ESBLs (*bla_{TEM-1}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{SHV-11}*, *bla_{CTX-M-15}*) и *bla_{OXA-181}*, кодиращ оксацилиназа с карбапенемазна активност, PMQR детерминантите - *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* и *oqxAB* присъстват във всичките 10 щама *K. pneumoniae*. В допълнение, авторите установяват мутации в QRDR (*gyrA* (Ser83Ile) и *parC* (Ser80Ile)) (Zhu C, 2018).

В проучване, подобно на нашето, проведено в иранска болница по изгаряния в периода октомври 2015 - февруари 2016г, в 30 карбапенемаза-продуциращи изолати *K. pneumoniae* са доказани следните гените: *qnrB* (30%), *qnrS* (6.7%), *oqxA* (60%) и *oqxB* (43.3%) (Kiaei S, 2019).

Сходно на нашето проучване е и това в Китай: Y Liu и кол. проучват разпространението на детерминанти на плазмид-медираната хинолонова резистентност сред 35 хипервирулентни изолати *K. pneumoniae* серотип K1, изолирани през 2017г. В 51.4% от изолатите се доказват PMQR гени, като най-често откриваният ген е *qnrS1* (37.5%), следван от *aac(6')-Ib-cr* (15%) и *qnrB4* (2.5%). В някои от изолатите, носители на *qnr* гени, са установени една или повече мутации в *GyrA* или *ParC*, но резистентност към хинолони е доказана едва в 11.4% (Liu Y, 2019). Успешните конюгационни експерименти в това проучване демонстрират намалена чувствителност към хинолони и ко-трансфер на *bla_{CTX-M-15}* и *qnrS1* алелите (Liu Y, 2019).

В световен мащаб са идентифицирани над 90 *qnrB* гени (<https://www.lahey.org/qnrstudies/>), като най-често съобщавани са вариантите *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB5*, *qnrB6* и *qnrB19* (Rodríguez-Martínez, 2016; Hooper, 2015; Yanat, 2017).

През 2017г. Albornoz et al. съобщават за нов член на семейството на PMQR, означен като *qnrE1*. Авторите предполагат мобилизация на този ген чрез *ISEcp1* от хромозомата на *Enterobacter* spp. върху плаزمиди в *K. pneumoniae*. (Albornoz E, 2017).

По-късно други автори съобщават за идентификацията на *qnrE1* в *K. pneumoniae*, изолиран от папагал с респираторно заболяване. Пълното ДНК секвениране разкрива наличието на MDR IncM1 плазмид в генома на изолата (Cunha MPV, 2017).

В настоящата работа *qnr* гени бяха доказани в 47.8 % (76/159) от всички тествани за детерминанти на PMQR изолати. *QnrB* гена е най-често доказваната *qnr* детерминанта на плазмидна хинолонова резистентност, идентифицирана в 39.6% (63/159) от всички изследвани изолати. Най-често доказваният алелен вариант е *qnrB9* (47.6%) , следван от *qnrB1* (36.5%).

За висока честота на разпространение на *qnr* гени сред чревни бактерии (*K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Providencia stuartii*, *Salmonella* spp.) съобщават и автори от Венецуела. Те установяват 33.6% носителство на *qnrB* и само 0.9% на *qnrA*, като при изолатите *E. coli* *qnrB* присъства в 15.4%, а при *K. pneumoniae* – в 12.5% (García J, 2018).

Аналогично, проучвайки плазмид-медираната хинолонова резистентност в клинични изолати *Enterobacteriaceae*, автори от Иран идентифицират в щамове *K. pneumoniae* *qnrB* в 47.8%, *qnrS* – в 4.34% и *aac(6')-Ib-cr* – в 56.5% (Majlesi A, 2018).

Друго проучване в Иран на Izadi и кол., провеждано сред 130 болнични изолати *K. pneumoniae* (ESBL- и не-ESBL-продуциращи), колекционирани за 18-месечен период (2011-2012г.), установява 61% от изолатите положителни за различни *qnr* гени: *qnrA*, *qnrS*, и *qnrB* са установени в 10.8%, 15.4% и 20.8% съответно. Авторите установяват, че по-често

хинолон-резистентните щамове *K. pneumoniae* са и ESBL-продуциращи, като сред ESBL-продуциращите *qnrB* вариантите се оказват най-чести (43%) (Izadi N, 2017).

В много случаи сред представителите на ентеробактериите, детерминантите на PMQR са комбинирани с мутации в QRDR. Много автори съобщават, че вероятно наличието на *qnr* гените повишава възможността за възникване на мутации в *gyr* гените в хода на лечение с флуорохинолони (Rodríguez-Martínez, 2016; Hooper, 2015).

Наличие на хромозомни мутации в детерминиращите хинолонова резистентност региони (QRDR) в настоящото проучване беше установено в 71% от тестваните изолати *K. pneumoniae*, като мутациите в *gyrA* и *parC* и самостоятелно в *gyrA* гените бяха доказани съответно в 66% и 5% от QRDR тестваните *K. pneumoniae*. Високото ниво на хромозомни мутации може да се свърже с наличието на PMQR детерминанти, основно *qnr* гени или наличието на *oqxAB*. Има проучвания, които установяват по-висока честота на мутации при *oqxAB* положителните, в сравнение с *qnr* положителните изолати (Li J, 2019).

Най-честата мутация в *gyrA* (n=63) е двойната субституция Ser83Phe /Asp87Ala, в комбинация с мутацията в *parC* Ser80Ile и наличие на *oqx AB*. Тези изолати са обединени в група 1 и демонстрират високо ниво на резистентност към хинолони (таблица 20). Стойностите на МПК на nalidix acid са над 256 µg/ml, а на ciprofloxacin и levofloxacin от 8-32 µg/ml и от 6-32 µg/ml съответно. В 96.8% изолатите от тази група са продуценти на СТХ-М-15, а 23.8% от тях са продуценти на КРС-2 карбапенемазата. В тази група установяваме сравнително ниско ниво на плазмидната резистентност, асоциирана с *qnr* гените (16%).

В група 2 са обединени 44 изолата *K. pneumoniae* с единична субституция в *gyrA* (Ser83Ile) и *parC* (Ser80Ile), в комбинация с *oqx AB* гени и продукция на СТХ-М ESBLs и ДНА-1 бета-лактамази. В 33 изолата (75%) бяха доказани *qnr* гени, с доминиране на *qnrS1* и *qnrB9*. По подобие на първа група, в тази група са отчетени също високи стойности на МПК на nalidix acid, ciprofloxacin и levofloxacin.

Група 3 е представена от три изолата с мутация само в *gyrA*, представена от единичната субституция Ser83Phe, наличие на *oqxAB* и при един изолат - *aac(6')-Ib-cr*. Asp87Asn и Asp87Tyr самостоятелни мутации в *gyrA* установихме в единични изолати от групи 4 и 5, в които присъстваха и ефлуксните помпи *oqx AB* и *qnrB1* гена (таблица 20). В унисон с установените от нас мутации, засягащи QRDR, Araújo и кол. проучват 40 резистентни към флуорохинолони *K. pneumoniae* и *E. coli*, изолирани от вътреболнични и придобити в обществото инфекции и установяват следните нуклеотидни субституции в *gyrA* (Ser83Ile, Val37Leu, Lys154Arg, Ser171Ala, Ser19Asn, Ile198Val, Ser83Tyr, Ser83Leu, Asp87Asn и Asp87Gly) и *parC* гените (Ser80Ile, Glu84Lys, Ala129Ser, Val141Ala и Glu84Gly) (Araújo BF, 2017).

В настоящото проучване хромозомни мутации, засягащи *gyrA* и *parC* гените, не бяха установени в 46 изолата в група 6. Хинолоновата резистентност в тези изолати се асоциира с присъствието на *oqxAB* (n=46) и *qnr* гени (A1, B1, B9, S1) (n=31) в 67.4% (таблица 20). Именно в тази група попадат изолатите с най-ниско ниво на резистентност към флуорхинолони, вкл. такива, чувствителни на levofloxacin и ciproflonacin.

В заключение, в изследваните изолати *K. pneumoniae* установихме широко разпространение на *oqxA* (100%), *oqxB* (93%) и *qnrB* (40%) в асоциация с *bla*_{CTX-M-15}. Доминиращият *qnrB* ген беше представен от *qnrB9* (47.6%), следван от *qnrB1* (36.5%) и *qnrB4* (16%). В настоящото проучване *qnrS1*, *qnrA* и *aac-(6')-Ib-cr* са слабо разпространени детерминанти на хинолонова резистентност. В над 70% от изолатите бяха доказани хромозомни мутации в *gyrA* и/или *parC* гените, като в 66% от тях се установиха едновременни мутации в двата гена. Замените в позиции Ser83Phe /Asp87Ala, Ser83Ile, Asp87Asn, Asp87Tyr за *gyrA* и позиции Ser80Ile за *parC* бяха доказани в изолатите с високо ниво на резистентност.

5.8. Доказване на гени, кодиращи плазмидна колистинова резистентност

Общо 8 изолата *K. pneumoniae*, резистентни на colistin бяха подложени на детекция на *mcr* гените (*mcr1*, *mcr2*, *mcr3*, *mcr4*, *mcr5*). PCR експериментите при всички изпитани изолати бяха негативни.

Обсъждане

В глобален план проблемът с колистиновата резистентност сред Грам-отрицателните бактерии, включително *K. pneumoniae*, стои с особена острота. Доскоро причините за възникване на резистентност към colistin се свързваха основно с модификация на липополизахаридите от външната мембрана на бактериалната клетка (Ah, Y. M., 2014). Различни автори съобщават за мутации в *mcrB* гена и за промени в двукомпонентните регулаторни системи PhoPQ и PmrAB с отношение към резистентността към colistin (Ah, Y. M., 2014; Poirel, 2014; Cannatelli, 2013; Lopez-Camacho, 2014; Kocsis, 2016; Paul M, 2019)

В последните години редица автори идентифицират *mcr-1* гена, като детерминантата, кодираща плазмид-медирана резистентност към colistin (Quan, 2017; Liu, 2016)

В научната литература има множество съобщения за трансмисия на тази резистентност от животни върху хора, вкл. от хранителни продукти (месо) към хора. (Liu, 2016; Olaitan, 2015). Понастоящем се доказва широко разпространение на *mcr-1*-медираната резистентност към colistin сред ентеробактерии, изолирани от хранителни продукти, което се асоциира със значителен риск от разпространението на плазмидна колистинова

резистентност в глобален мащаб (Gelbicova T, 2019). Mcr-1 генът придобива все по-широко разпространение сред изолати *Escherichia coli* сред домашни животни (Liu, 2016; Kawahara R, 2019). Междувидов трансфер на mcr-1 се докладват от различни изследователи (Stoesser, 2016; Du, 2016). Хоризонталният трансфер на mcr-1 гена особено към продуценти на карбапенемази в болнични условия може да доведе до изключителни терапевтични затруднения особено в случаи на тежки инфекции (Nordmann, 2016; Nordmann & Poirel 2016). Редица автори съобщават за клинично значими изолати *E. coli* и *K. pneumoniae*, носители на mcr-1 ген и същевременно продуценти на VIM-1, KPC-2 и NDM-5 карбапенемази (Poirel, 2016; Falgenhauer L, 2016; Du H, 2016).

В настоящото проучване не беше доказано присъствие на mcr гени. В този смисъл, резистентността към colistin в изпитваните изолати *K. pneumoniae* е в резултат от действието на други, вероятно хромозомни механизми.

В заключение, въпреки широкото разпространение на mcr гени в глобален план, в изследваните от нас изолати *K. pneumoniae* тези гени, асоцииращи се с плазмид-медирана резистентност към colistin не бяха доказани.

6. Изводи

Анализът на резултатите, получени в нашите изследвания и сравняването им с литературните данни ни дават основание да направим следните изводи:

1. Изпитването на чувствителността към антимикробни лекарствени средства установи висок процент на резистентност към цефалоспорини от III генерация (54.8%) в проучваната колекция от 1084 изолата *Klebsiella pneumoniae*. Резистентните на цефалоспорини трета генерация изолати демонстрираха във висока степен резистентност към представители и на други антибиотични групи – piperacillin/tazobactam (96.5%), ciprofloxacin (96.5%), trimethoprim/sulphamethoxazole (63.0%) и gentamicin (69.3%). Значително по-високи нива на резистентност бяха установени при изолати *K. pneumoniae* от кръв и урина в сравнение с тези от раневи секрети и секрети от респираторния тракт. В групата на карбапенем-резистентните *K. pneumoniae*, единствено ceftazidime/avibactam и amikacin демонстрираха най-добра *in vitro* активност.
2. Проведеният двойно-дисков синергистичен тест с цефалоспорини трета генерация и amoxicillin/clavulanic acid (20/10) за детекция на ESBL в изолати от *K. pneumoniae*, както и модифицираният Hodge тест, показаха сравнително добра чувствителност (81 % и 92% съответно).
3. Чрез метода на IEF в проучваните изолати се установи разнообразие от β -лактамази, включително и ко-продукция на няколко ензима. IEF в комбинация с биологичния тест за хидролитична активност потвърди в групата на проучваните изолати *K. pneumoniae* продукцията на два вида ESBLs (представени предимно от CTX-M и при един изолат от SHV тип). В част от изолатите бяха доказани карбапенемази от KPC групата, VIM и OXA-48. AmpC ензими (DNA) бяха доказани както самостоятелно продуцирани така и в комбинация с CTX-M. При четири изолата се установи продукция на два вида CTX-M ензими.
4. Основният механизъм на резистентност към цефалоспорини от трета генерация в настоящата колекция от изолати *K. pneumoniae* се асоциира с продукцията на ESBLs в 96.9%, като най-чести са CTX-M бета-лактамазите в 93%, с водещото значение на CTX-M-15 (81.1%), следван от CTX-M-3 (9.4%). Резистентността към карбапенемни антибиотици се медира от продукцията на карбапенемази, като

КРС-2 е най-често продуцираната бета-лактамаза с карбапенемазна активност (21%). В единични изолати са доказани NDM-1 и VIM-1 метало-карбапенемази.

5. При положителните за *bla*_{CTX-M-15} изолати се доказва присъствие на IncF и нетипируеми плазмиди, а при положителни за *bla*_{CTX-M-3} – присъствие на IncL/M плазмиди. Проведените успешни конюгационни експерименти с *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{CTX-M-3} позитивни изолати потвърдиха плазмидната локализация на тези гени. В положителни за *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{КРС-2} изолати *K. pneumoniae* се установиха IncFII плазмиди. В единствения изолат ко-продуцент на *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{ОХА-48} се доказва наличие на IncR плазмид.
6. Епидемиологичното типизиране чрез ERIC PCR и MLST доказва широко вътреболнично разпространение на няколко клона множествено резистентни *K. pneumoniae*, продуциращи CTX-M-15 ESBL. ST15, съответстващ на ERIC тип А, е доминиращият секвенционен тип, персистиращ през целия проучван период (2014-2017г.), следван от ST11 (ERIC тип Р), появяващ се през 2015г. и присъстващ до края на проучвания период. Доминиращият ST15 тип демонстрира висок епидемичен и инвазивен потенциал. Карбапенемаза-продуциращите изолати *K. pneumoniae* се асоциират с няколко различни STs: ST15, ST76, ST11, ST1350, ST151, ST35, ST395 и ST147. ST15 е носител на *bla*_{КРС-2} и *bla*_{ОХА-48}, ST76, ST1350, ST151, ST35 и ST395 – на *bla*_{КРС-2}, а ST11 и ST147 – на *bla*_{NDM-1} и *bla*_{VIM-1} съответно.
7. В изследваните изолати *K. pneumoniae* се установи широко разпространение на *oqxA* (100%), *oqxB* (93%) и *qnrB* (40%) в асоциация с *bla*_{CTX-M-15}. Доминиращият *qnrB* ген беше представен от *qnrB9* (47.6%), следван от *qnrB1* (36.5%), *qnrB4* (16%) и слаба разпространеност на *qnrS1*, *qnrA* и Aac-(6')-Ib-cr. В над 70% от изолатите бяха доказани хромозомни мутации за *gyrA* и/или *parC* гените, като в 66% от тях се установиха едновременни мутации в двата гена. Субституциите в позиции Ser83Phe /Asp87Ala, Ser83Ple, Asp87Asn, Asp87Tyr за *gyrA* и позиции Ser80Ple за *parC* бяха доказани в изолатите с високо ниво на хинолонова резистентност.
8. В изследваните от нас изолати *K. pneumoniae* не бяха доказани *mcr* гени, асоцииращи се с плазмид-медирана резистентност към colistin.

7. Справка за приносите на дисертационния труд

Приноси с оригинален характер

1. Извършено е детайлно проучване на плазмидните и хромозомни механизмите на резистентност към хинолони в голяма колекция от клинични изолати *K. pneumoniae*, като бяха доказани предимно *qnrB* гени, единични изолати с *qnrA* и *qnrS* алели и слаба разпространеност на *aac-(6')-Ib-cr*. В над 70% от изолатите бяха доказани хромозомни мутации в *gyrA* и/или *parC* гените.
2. Проучена е MLST структурата на колекция от 159 изолати *K. pneumoniae*, събрани в рамките на 4 годишен период от пациенти на УМБАЛ "Света Марина" - Варна, като е установено разнообразие от циркулиращи секвенциални типове на фона на широко доминиране и персистиране на "успешния" международен клон *K. pneumoniae* ST15 и в по-малка степен на ST11.

Приноси с потвърдителен характер

1. Установено е доминиращото участие на ESBLs при развитието на резистентност към цефалоспорини от III-та генерация в клинични изолати *K. pneumoniae*.
2. Потвърдено е широкото разпространение на CTX-M β -лактамазите, в частност на CTX-M-15 и в по-малка степен на CTX-M-3 ESBL в *K. pneumoniae*.
3. Резистентността към карбапенемни антибиотици в проучваната колекция от изолати *K. pneumoniae* се медира от продукцията на карбапенемази от различни класове (клас А - KPC-2, Клас В - NDM-1, VIM-1 и клас D - OXA-48), с водещата роля на KPC-2 ензимите.
4. Потвърждава се ролята на хоризонталното вътревидово плазмидно предаване за разпространението на ESBLs и гените, кодиращи карбапенемази.
5. Потвърдено е значението на клоналното вътреболнично разпространение на *K. pneumoniae* в епидемиологията на инфекциите, причинени от този микроорганизъм.

Приноси с научно-приложен характер

1. Оценена е чувствителността на фенотипните тестове за детекция на ESBLs при изолати *K. pneumoniae*, резистентни на III-та генерация цефалоспорини.
2. Анализирани са чувствителността на колекция от карбапенем-резистентните изолати *K. pneumoniae* към новия за клиничната практика антибиотик ceftazidime-avibactam,

както и към colistin и tigecycline, всички смятани за алтернатива за лечение на инфекции, причинени от множествено резистентни *K. pneumoniae*.

3. Въведена е методика за определяне на плазмидни и хромозомни детерминанти за хинолонова резистентност при изолати *K pneumoniae*.

8. Научни публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд

Публикации в научни списания

1. R. Markovska, T. Stoeva, L. Boyanova, D. Pencheva, E. Keuleyan, M. Murjeva, M. Sredkova, D. Ivanova, G. Lazarova, **G. Nedelcheva**, R. Kaneva, I. Mitov. Dissemination of succesful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. Diagnostic Microbiology & Infectious Diseases 2017 Dec; 89(4):310-313
2. **Г. Неделчева**, Т. Стоева, Р. Марковска, Д. Димитрова, П. Станкова, И. Митов. Антибиотична чувствителност на клинично значими изолати *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Света Марина“ - Варна за периода 2014-2017г. *Обща медицина*, 2019; 3: 9-16
3. **Г. Неделчева**, М. Божкова, Р. Марковска, Д. Димитрова и Т. Стоева. In vitro чувствителност към colistin и ceftazidim/avibactam на карбапенем-резистентни *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти в интензивни и неинтензивни клиници на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. *Медицински преглед*, 2019;55(3): 31-37

Съобщения, изнесени на научни форуми

1. **Nedelcheva G**, Markovska R, Bozhkova M, Dimitrova D, Stoeva T: Antimicrobial susceptibility of clinically significant isolates of *Klebsiella pneumoniae* recovered from patients, hospitalized in Varna University hospital, period 2014–2017 28-th Annual Assembly of IMAV and 5-th International Meeting of Alumni Club at Medical University Varna 13 - 16 May 2018, *Varna, Bulgaria*.
2. **Г. Неделчева**, М. Божкова, Р. Марковска, Д. Димитрова, Т. Стоева. In vitro чувствителност към colistin и ceftazidime/avibactam на карбапенем - резистентни *Klebsiella pneumoniae*, изолирани от пациенти на УМБАЛ”Света Марина” – Варна. 17 национален конгрес по Клинична микробиология и Инфекции на БАМ 9-11 май 2019г., София.

9. Литература

1. Марковска Р, Стоева Т, Божкова К и Митов И. Проучване на широкоспектърните бета-лактамази при щамове *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* в две университетски болници – Варна. Медицински преглед 2012, 48, (1), 43-49
2. Мартева-Проевска Ю.С. Проучвания върху чувствителността към colistin на проблемни Грам-отрицателни бактерии, изолирани в УМБАЛ "Александровска" - дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен "доктор". София, 2018
3. Стоева Т, Божкова К, Снегарова В и др. Динамика в резистентността на най-честите бактериални изолати в УМБАЛ "Св. Марина" – Варна и употребата на някои антибиотици в периода 2004 – 2008. Медицински преглед, 2010, XLVI,(3), 67-72.
4. Стоева Т, Божкова К, Божкава М. Тенденции в развитието на проблемната резистентност сред най-важните причинители на бактериемии в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, за периода 2007-2011 г. като част от Европейската мрежа за надзор над антибиотичната резистентност (EARS-Net). Медицински преглед, 2013, 49 (1), 41-49
5. (a) Стоева Т, Божкова М, Марковска Р., Каменова В., Божкова К. Проблемна антибиотична резистентност сред най-важните причинители на бактериемии в Университетска болница. Клинична микробиология и инфекции 2016.,(1), 24-33.
6. (b) Стоева Т, Марковска Р, Божкова М, Димитрова Д, Божкова К, Митов И. Детекция на продуценти на карбапенемази сред клинични изолати *Klebsiella pneumoniae* чрез използване на фенотипни методи. Медицински преглед, 2016, 52 (1) 35-41
7. Abboud, C., Miglioli, L., Romero, A., Ibanes, A., Della Togna, D., Pereira, R., & et al. (2017). First report of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* sternum osteomyelitis relapsing 6 years after mediastinitis following cardiac surgery. International Journal of Antimicrobial Agents 2017, 49, 259-268.
8. Abdallah, H., Reuland, E., Wintermans, B., Al Naiemi, N., Koek, A., Abdelwahab, A., & et al. (2015). Extended-Spectrum β -Lactamases and/or Carbapenemases-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Retail Chicken Meat in Zagazig, Egypt. PLoS One.2015, 10, :e0136052.
9. Abdelaziz, M., Bonura, C., Aleo, A., El-Domany, R., Fasciana, T., & Mammina, C. (2012). OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae* in Cairo, Egypt, in 2009 and 2010. J Clin Microbiol.2012, 50, 2489-2491.
10. Abderrahim A, Djahmi N, Pujol C, Nedjai S, Bentakouk MC, Kirane-Gacemi D, Dekhil M, Sotto A, Lavigne J-P, Pantel A. First case of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Annaba University hospital, Algeria. Microb Drug Resist (Larchmont, N Y) 2017; 23:895–900.
11. (a) Adler, A., Shklyar, M., Schwabe, M., Navon-Venezia, S., Dhaher, Y., Edgar, R., & et al. (2011). Introduction of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* to Israeli hospitals by medical tourism. J Antimicrob Chemother.2011, 66, 2763-2766.
12. (b) Adler, A., Navon-Venezia, S., Moran-Gilad, J., Marcos, E., Schwartz, D., & Carmeli, Y. (2011). Laboratory and Clinical Evaluation of Screening Agar Plates for Detection of

- Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* from Surveillance Rectal Swabs. *J Clin Microbiol*.2011, 49, 2239–2242.
13. Ahn C, Syed A, Hu F, O'Hara JA, Rivera JI, Doi Y. 2014. Microbiological features of KPC-producing *Enterobacter* isolates identified in a U.S. hospital system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 80:154 –158. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.06.010>.
 14. Ah, Y. M., Kim, A. J., & Lee, J. Y. (2014). Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*,2014; 44, 8-15.
 15. Ahmed, O., El-Hady, S., Ahmed, T., & Ahmed, I. (2013). Detection of bla SHV and bla CTX-M genes in ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Egyptian patients with suspected nosocomial infections. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*,2013; 14, 277-283.
 16. Aktaş, Z., Bal Kayacan, C., Schneider, I., Can, B., Midilli, K., & Bauernfeind, A. (2008). Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase, OXA-48, Persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy*,2008; 54, 101-106.
 17. Al-Agamy, M., Aljallal, A., Radwan, H., & Shibl, A. (2017). Characterization of carbapenemases, ESBLs, and plasmid-mediated quinolone determinants in carbapenem-insensitive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh hospitals. *Journal of Infection and Public Health*,2017 xxx, xxx.
 18. Alatoon A., Elsayed H, Lawlor K, AbdelWareth L, El-Lababidi R, Cardona L et al. Comparison of antimicrobial activity between ceftolozane–tazobactam and ceftazidime–avibactam against multidrug-resistant isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Infectious Diseases*, 2017,62, 39-43.
 19. Albornoz E, Tijet N, De Belder D, Gomez S, Martino F, Corso A, et al. *qnrE1*, a Member of a New Family of Plasmid-Located Quinolone Resistance Genes, Originated from the Chromosome of *Enterobacter* Species *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 May; 61(5): e02555-16.1
 20. Aldred, K., Kerns, R., & Osherof, N. (mar 2014 r.). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*,2014; 53(10), 1565-1574.
 21. Alho AC, Infante J, Carmo E, and Raposo J. Osteomyelitis Caused by Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: A Diagnosis to Consider in Patients with Hematologic Malignancies and Stem Cell Transplant Recipients. *Am J Case Rep*. 2019; 20: 482–488.
 22. Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, et al. 2014. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrob Agents Chemother*,2014; 58:4443– 4451. <https://doi.org/10.1128/AAC.00099-14>.
 23. Amit, S., Mishali, H., Kotlovsky, T., Schwaber, M., & Carmeli, Y. (2015). Bloodstream infections among carriers of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: etiology, incidence and predictors. *Clin Microbiol Infect*,2015; 21, 30-34.
 24. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*,2007; 45:2723–2725. <https://doi.org/10.1128/JCM.00015-07>.
 25. Araújo BF, Campos PA, Royer S, Ferreira ML, Gonçalves IR, Batistão DWDF et al. High frequency of the combined presence of QRDR mutations and PMQR determinants in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from nosocomial

and community-acquired infections. J Med Microbiol. 2017 Aug 4. doi: 10.1099/jmm.0.000551.

26. Arduino, S. M., Quiroga, M. P., Ramirez, M. S., Merkier, A. K., Errecalde, L., Di Martino, A., & et al. (2012). Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. Journal of Medical Microbiology, 2012; 61, 1417-1420.
27. Avolio, M., Vignaroli, C., Crapis, M., & Camporese, A. (2017). Co-production of NDM-1 and OXA-232 by ST16 *Klebsiella pneumoniae*, Italy, 2016. Future Microbiol, 2017; 12, 1119-1122.
28. Aydin M, Ergönül Ö, Azap A, Bilgin H, Aydın G, Çavuş SA, et al. Rapid emergence of colistin resistance and its impact on fatality among healthcare-associated infections. Journal of Hospital Infection 98 (2018) 260e263.
29. Ball P.R., S. S. (march 1980 r.). Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1980; 93(1), 74-81.
30. BARR J. G. *Klebsiella*: Taxonomy, nomenclature, and communication. J. clin. Path., 1977, 30, 943-944
31. Baraniak, A., Izdebski, R., Fielt, J., Sadowy, E., Adler, A., Kazma, M., et al. (2013). Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. Antimicrob. Agents Chemother. 2013; 57, 1992–1997. doi: 10.1128/AAC.02571-12
32. Barlow, M., & Hall, B. (2002). Origin and Evolution of the AmpC β -Lactamases of *Citrobacter freundii*. Antimicrob. Agents Chemother, 2002; 48, 1190-1198.
33. Bergen, P. J., Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Coulthard, K., & Milne, R. W. (2008). Comparison of once-, twice- and thrice-daily dosing of colistin on antibacterialeffect and emergence of resistance: studies with *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. J Antimicrob Chemother, 2008; 61(3), 636-642.
34. Bergen PJ, Li J, Nation RL. 2011. Dosing of colistin—back to basic PK/PD. Curr Opin Pharmacol 2011; 11:464–469. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.004>.
35. Bergen, P J., Landersdorfer, CB., Zhang, J., Zhao, M., Lee, H. J., Nation, R. L., & Li, J. (2012). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ‘old’ polymyxins: what is new? Diagn Microbiol Infect Dis, 2012; 74(3), 213-223.
36. Berrazeg, M., Diene, S., Medjahed, L., Parola, P., Drissi, M., Raoult, D., & et al. (2014). New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: An eReview using Google Maps. EuroSurveill, 2014; 19, pii=20809.
37. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. J Antimicrob Chemother. 2017 Aug 1;72(8):2145-2155.
38. Bhaskar BH, Mulki SS, Joshi S, Adhikary R, Venkatesh BM. Molecular Characterization of Extended Spectrum β -lactamase and Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae* from a Tertiary Care Hospital. Indian J Crit Care Med. 2019 Feb;23(2):61-66. doi: 10.5005/jp-journals-10071-23118.
39. Bialvaei, A., Kafil, H., Asgharzadeh, M., Aghazadeh, M., & Yousefi, M. (2016). CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp and *Escherichia coli* isolates in Iranian hospitals. Brazilian journal of microbiology, 2016; 47, 706-711.

40. Bisiklis, A., Papageorgiou, F., Frantzidou, F., & Alexiou-Daniel, S. (2007). Specific detection of blaVIM and blaIMP metallo- β -lactamase genes in a single real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*,2007; 13, 1201–1203.
41. Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY*,2015; 13(1), 42-51.
42. Blondeau JM New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Vet Dermatol* 2009; 20, (5-6) 383-396
43. Bogaerts , P., Naas, T., de Castro, R., Endimiani, A., Nordmann , P., Glupczynski , Y., & et al. (2011). Multicenter evaluation of a new DNA microarray for rapid detection of clinically relevant bla genes from beta-lactam-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*.2011;., 55, 4457-4460.
44. Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum beta-Lactamases:the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*,2004; 48(1), 1-14.
45. Borer A, Saidel-Odes,L, Riesenber,K, Eskira S, Peled N, Nativ R et al. Attributable Mortality Rate for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Infect Control Hospital Epidemiol*, 2009, 30, (10), 972-976.
46. Boye, K., & Hansen, D. S. (2003). Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Medical Microbiology*,2003; 292(7-8), 495-503.
47. Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst Appl Microbiol*. 2013 Jul;36(5):309-19. doi: 10.1016/j.syapm.2013.03.005.
48. Brink , A., Coetzee, J., Corcoran , C., Clay , C., Hari-Makkan , D., Jacobson, R., & et al. (2013). Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *J Clin Microbiol*.2013;., 51, 369-372.
49. Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., & et al. (2009). Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. *PLoS ONE*,2009; 4(3), e4982.
50. Brisse, S., Passet, V., & Grimont, P. (2014). Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp.nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp.*quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp.nov., and demonstration that . *Int J of Systematic and Evolutionary Microbiology*,2014; 64, 3146–3152.
51. Brust K, Evans A, Plemmons R. 2014. Tigecycline in treatment of multidrug-resistant Gram-negative bacillus urinary tract infections: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*.2014; 69:2606 –2610. <https://doi.org/10.1093/jac/dku189>.

52. Cannatelli, A., D'Andrea, M., Giani, T., Di Pilato, V., Arena, F., Ambretti, S., & et al. (2013). In Vivo Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB Regulator. *Antimicrob Agents Chemother*,2013; 57, 5521-5526.
53. Cao X, Xu X, Zhang Z, Shen H, Chen J, Zhang K. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Ann Clin Microb Anti*. 2014;13:16.
54. Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother*.2009; 53, 2227–2238. doi: 10.1128/AAC.01707-08
55. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol*. 2011 Dec; 301 (8): 654-8.
56. Carrasco-Anabalón S, Vera-Leiva A, Quezada-Aguiluz M, Morales-Rivera MF, Lima CA, Fernández J, et al. Genetic Platforms of *bla*_{CTX-M} in Carbapenemase-Producing Strains of *K. pneumoniae* Isolated in Chile. *Front Microbiol*. 2018 Mar 6;9:324. doi: 10.3389/fmicb.2018.00324
57. Carvalhaes , C., Picão, R., Nicoletti , A., Xavier , D., & Gales, A. (2010). Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother.*,2010; 65, 249-251.
58. Casanova C, Lorente JA, Carrillo F, Perez-Rodriguez E, Nunez N. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch Intern Med*. 1989;149:1467.
59. Castanheira, M., Farrell, S. E., Wanger, A., Rolston, K. V., Jones, R. N., and Mendes, R. E. Rapid expansion of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in two Texas hospitals due to clonal spread of ST258 and ST307 lineages. *Microb. Drug Resist*. 2013; 19, 295–297. *Microb Drug Resist*. 2013 Aug;19(4):295-7.
60. Castanheira M, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. 2016. Effect of the beta-lactamase inhibitor vaborbactam combined with meropenem against serine carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016; 60:5454 –5458. <https://doi.org/10.1128/AAC.00711-16>.
61. Castanheira M, Huband MD, Mendes RE, Flamm RK. 2017. Meropenem-vaborbactam tested against contemporary Gramnegative isolates collected worldwide during 2014, including carbapenem-resistant, KPC-producing, multidrug-resistant, and extensively drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017; 61:e00567-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00567-17>.
62. Chen HD, Groisman EA. The biology of the PmrA/PmrB two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:83-112.
63. Chen, L., Mediavilla, J., Endimiani, A., Rosenthal, M., Zhao, Y., Bonomo, R., & et al. (2011). Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection and Classification of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Gene (*bla*_{KPC}) Variants[∇]. *J Clin Microbiol*,2011; 49, 579–585.

64. Chen, L., Chavda, K., Mediavilla, J., Zhao, Y., Fraimow, H., Jenkins, S., & et al. (2012). Multiplex Real-Time PCR for Detection of an Epidemic KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 Clone. *Antimicrob Agents Chemother*,2012; 56, 3444–3447.
65. Cheng L, Cao XL, Zhang ZF, Ning MZ, Xu XJ, Zhou W, et al. Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of *oqxAB* and *rmtB* in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:1.
66. Cheong, H., Chung, D., Lee, C., Kim, S., Kang, C., Peck, K., & et al. (2016). Emergence of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains co-producing the plasmid-mediated AmpC beta-lactamase DHA-1 and an extended-spectrum beta-lactamase in Korea. *Antimicrob Resist Infect Control*., 2016; 5, 50.
67. Chiu S K, Chan M C , Huang L Y , Lin Y T , Lin J C, Lu P L, et al. Tigecycline resistance among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Clinical characteristics and expression levels of efflux pump genes. *PLOS ONE journal*.pone.0175140 April 7, 2017, 1-15 | <https://doi.org/10.1371/>
68. Choudhury S, Yeng JL, Krishnan PU. 2015. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* to fosfomycin and tigecycline. *Clin Microbiol Infect*,2015; 21:e75– e76. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.005>.
69. Choo, Y. Y., Pui, S. C., Yun, F. N., Wai-Fong, Y., & Kok-Gan, C. (2016). Emergence of *mcr-1*-mediated colistin. *International Journal of Antimicrobial Agents*,2016; 47(6), 504-505.
70. Chuang, T., Lin, C., Lee, S., Chuang, C., Jong, Y., Chen, W., & et al. (2012). Rapidly fatal community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae* complicated with acute myocarditis and accelerated idioventricular rhythm. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*,2012; 45, 321-323.
71. Chuang YC, YC, Lee MF, Tan CK, Ko WC, Wang FD, Yu WL. Can the *rmpA* gene predict metastatic meningitis among patients with primary *Klebsiella pneumoniae* liver abscess? *J Infect*. 2013 Aug;67(2):166-8.
72. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 27th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
73. Cohen S H, Y. W. (1993). Cohen S H, Yan W, Levy S B. A multidrug resistance regulatory chromosomal locus is widespread among enteric bacteria. *J Infect Dis* , 1993; 168(2), 484-488.
74. Connolly L, Jubb A, O’Keeffe B, Serio A, Smith A, Gall J, et al. 2017. Plazomicin (PLZ) associated with improved survival and safety compared to colistin (CST) in serious carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections: results of the CARE Study, abstr OS0250F. Abstr 27th Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis.2017; https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid_43221
75. Connors, K., Housman, S., Pope, J., Russomanno, J., Salerno, E., Shore, E., & et al. (2014). Phase I, open-label, safety and pharmacokinetic study to assess bronchopulmonary disposition of intravenous eravacycline in healthy men and women. *Antimicrob. Agents Chemother.*,2014; 58, 2113-2118.

76. Cornaglia, G., Giamarellou, H., & Rossolini, G. (2011). Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*, 2011; 11, 381–393.
77. Correia, S., Poeta, P., Hebraud, M., Capelo, J., & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology* 2017, 66, 551–559.
78. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* 1988 Sep; 52(3):375-95.
79. Crandon JL, Nicolau DP. 2013. Human simulated studies of aztreonam and aztreonam-avibactam to evaluate activity against challenging gram-negative organisms, including metallo-beta-lactamase producers. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:3299 –3306. <https://doi.org/10.1128/AAC.01989-12>.
80. Crowley B, Benedi VJ, Domenech-Sanchez A. Expression of SHV-2 beta-lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3679–3682.
81. Cuzon, G., Naas, T., & Nordmann, P. (2011). Functional Characterization of Tn4401, a Tn3-Based Transposon Involved in blaKPC Gene Mobilization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011; 55, 5370–5373.
82. Cuzon, G., Naas, T., Truong, H., Villegas, M.-V., Wisell, K., Carmeli, Y., & et al. (2010). Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce β -Lactamase blaKPC-2 Gene1. *16*, 1349–1356.
83. Cunha MPV, Davies YM, Cerdeira L, Dropa M, Lincopan N, Knöbl T. Complete DNA Sequence of an IncM1 Plasmid Bearing the Novel qnrE1 Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Variant and blaCTX-M-8 from *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 147. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 ; 61 (9) e00592-17
84. Czekalski, N., Diez, E., & Burgmann, H. (2014). Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *International Society for Microbial Ecology*, 2014; 8, 1381-1390.
85. D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., and Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013; 303, 305–317. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.008
86. Dai, Y., Zhang, C., Ma, X., Chang, W., Hu, S., Jia, H., & et al. (2014). Outbreak of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* neurosurgical site infections associated with a contaminated shaving razor. *American Journal of Infection Control*, 2014; 42, 805-806.
87. Daikos, G., Tsaousi, S., Tzouvelekis, L., Anyfantis, I., Psychogiou, M., Argyropoulou, A., & et al. (2014). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections: Lowering Mortality by Antibiotic Combination Schemes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014; 58, 2322-2328.
88. Dalhoff, A., (2012). Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012 (ID976273), 37 pages.
89. Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.*, 2010; 65, 490-495.
90. Dasgupta, N., Paul, D., DharChanda, D., Ingti, B., Bhattacharjee, D., Chakravarty, A., & et al. (2017). An insight into selection specificity of quinolone resistance determinants within *Enterobacteriaceae* family. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017 Sep; 10:40-46.

91. Davido B, Fellous L, Lawrence C, Maxime V, Rottman M, Dinh A. 2017. Ceftazidime-avibactam and aztreonam an interesting strategy to overcome beta-lactam resistance conferred by metallo-beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e01008-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01008-17>
92. Day , M., Rodríguez, I., van Essen-Zandbergen , A., Dierikx, C., Kadlec, K., Schink, A., & et al. (2016). Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. *J Antimicrob Chemother.*,2016; 71, 1178-1182.
93. Day, K., Salman, M., Kazi, B., Sidjabat, H., Silvey, A., Lanyon, C., & et al. (2013). Prevalence of NDM-1 carbapenemase in patients with diarrhoea in Pakistan and evaluation of two chromogenic culture media. *J Appl Microbiol*,2013; 114, 1810–1816.
94. Delgado-Valverde M, Sojo-Dorado J, Pascual A, Rodriguez-Bano J. 2013. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Ther Adv Infect Dis*, 2013; 1:49–69. <https://doi.org/10.1177/ 2049936113476284>.
95. Deng L, Jia R, Li W, Xue Q, Liu J, Miao Y, Wang J. A *Klebsiella pneumoniae* liver abscess presenting with myasthenia and tea-colored urine: A case report and review of 77 cases of bacterial rhabdomyolysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Dec;96(51):e9458. doi:10.1097/MD.00000000000009458.
96. Deris, Z. Z., Yu, H. H., Davis, K., Soon, R. L., Jacob, J., Ku, C. K., & et al. (2012). The combination of colistin and doripenem is synergistic against *Klebsiella pneumoniae* at multiple inocula and suppresses colistin resistance in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012; 56(10), 5103-5112.
97. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug; 43(8):4178-82.
98. Díaz-Agero Pérez C, López-Fresneña N, Rincon Carlavilla AL, Hernandez Garcia M, Ruiz-Garbajosa P, Aranz-Andrés JM et al. Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: a prevalence survey in a Spanish University Hospital. *BMJ Open*. 2019 Mar 1;9(3): e024879.
99. Diene, S., & Rolain, J.M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*,2014; 20, 831–838.
100. Dierikx , C., van der Goot, J., Smith, H., Kant , A., & Mevius, D. (2013). Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS One*,2013; 8, e79005.
101. Dobias J, Denervaud-Tendon V, Poirel L, Nordmann P. 2017. Activity of the novel siderophore cephalosporin cefiderocol against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36:2319 –2327. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3063-z>.
102. Docobo-Perez F, Drusano GL, Johnson A, Goodwin J, Whalley S, Ramos-Martin V, et al. 2015. Pharmacodynamics of fosfomicin: insights into clinical use for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:5602–5610. <https://doi.org/10.1128/AAC.00752-15>.

103. Doi , Y., O'Hara, J., Lando , J., Query, A., Townsend, B., Pasculle, A., & et al. (2014). Co-production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Infect Dis.*,2014; 20, 163-165.
104. Dolejska M, Villa L, Dobiasova H, Fortini D, Feudi C, Carattoli A. Plasmid Content of a Clinically Relevant *Klebsiella pneumoniae* Clone from the Czech Republic Producing CTX-M-15 and QnrB1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013 : 57 (2) p. 1073–1076
105. Domokos J, Kristof K, Szabo D. Plasmid-mediated quinolone resistance among extended-Spectrum Beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* from bloodstream infections. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2016; 63:313–323.
106. Donati, V., Feltrin, F., Hendriksen, R., Svendsen, C., Cordaro, G., García-Fernández, A., & et al. (2014). Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Klebsiella* spp. from Companion Animals in Italy. *PLoS One*,2014; 9, e90564.
107. Dong N, Zhang R, Liu L, Li R, Lin D, Chan EW, et al (2018) Genome analysis of clinical multilocus sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* from China. *Microb Genom* 4. 2018; <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000149>
108. Dortet , L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. *Biomed Res Int.*, 2014; 249856.
109. (a) Dortet, L., Poirel, L., Al Yaqoubi, F., & Nordmann, P. (2012). NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. *Clin Microbiol Infect*,2012; 18, E144–E148.
110. (b) Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Rapid Identification of Carbapenemase Types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by Using a Biochemical Test. *Antimicrob. Agents Chemother*,2012; 56, 6437-6440.
111. Drago, L., De Vecchi, E., Mombelli, B., Nicola, L., Valli, M., & Gismondo, M. (2001). Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. *J Antimicrob Chemother*,2001; 48, 37-45.
112. Drancourt, M. B., Carta, A., & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov.,with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J of Systematic and Evolutionary Microbiology*,2001; 51, 925-932.
113. Dsouza R, Pinto NA, Hwang I, Younjee H, Cho Y, Kim H, Yong D, Choi J, Lee K, Chong Y (2017) Molecular epidemiology and resistome analysis of multidrug-resistant ST11 *Klebsiella pneumoniae* strain containing multiple copies of extended-spectrum β -lactamase genes using whole-genome sequencing. *New Microbiol* 2017; 40:38–44
114. Du H, Chen L, Tan TW, Kreiswirth BN. Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Lancet Infect Dis* 2016. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00056-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00056-6).
115. Du, H., Chen, L., Tang, Y., & Kreiswirth, B. (2016). Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Lancet Infect Dis*, 2016; 16, 287-288.
116. Ece, G., Tunc, E., Otlu, B., Aslan, D., Ece, C., 2018 Apr 27. Detection of blaOXA-48 and clonal relationship in carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolates at a tertiary care center in Western Turkey. *J. Infect. Public Health*.2018; <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.003>. (pii: S1876 0341(18)30039-X).

117. ECDC. (2014). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Свалено от <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>.
118. Elgendy SG, Abdel Hameed MR, El-Mokhtar MA. Tigecycline resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolated from febrile neutropenic patients. *J Med Microbiol.* 2018 Jul;67(7):972-975.
119. El-Halfawy O M, Valvano M A. Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity. *Clin Microbiol Rev.* 2015 , 28 (1), 191-207
120. Elkins, C., & Nikaido, H. (2003). Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its C-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.*,2003; 185, 5349–5356.
121. Ellington, M., Kistler, J., Livermore, D., & Woodford, N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59, 321-322.
122. EMA. 2017. European Medicines Agency completes review of polymyxin-based medicines. Recommendations issued for safe use in patients with serious infections resistant to standard antibiotics.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Polymyxin_31/WC500176333.pdf.
123. Endimiani, A., Hujer, K., Hujer, A., Sampath, R., Ecker, D., & Bonomo, R. (2010). Rapid identification of blaKPC-possessing *Enterobacteriaceae* by PCR/electrospray ionization-mass spectrometry. *J Antimicrob Chemother.*, 2010; 65, 1833–1834.
124. Esteban-Cantos, A., Aracil, B., Bautista, V., Ortega, A., Lara, N., Saez, D., et al ., EuSCAPE-Spain Network, 2017 Mar 24. The carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* population is distinct and more clonal than the carbapenem-susceptible population. *Antimicrob Agents Chemother.*2017; 61 (4) (pii: e02520–16).
125. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0. <http://www.eucast.org>.
126. Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther , S., & Wieler , L. (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.*, 2012; 18, 646-55.
127. Ewers, C., Stamm, I., Pfeifer, Y., Wieler , L., Kopp , P., Schønning, K., & et al. (2014). Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother.*,2014; 69, 2676-2680.
128. Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., & Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol*,2009; 2, 40-61.
129. Fahim Q, Hameed F, Khalid A, Anwar MS. Comparison of different phenotypic detection methods for extended spectrum beta lactamases in *Escherichia coli*, and in AMP C co-producing phenotypes through single plate detection technique. *Pak J Pathol.* 2017; 28(2): 61-68.
130. Falagas, M., Makris, G., Dimopoulos, G., & Matthaiou, D. (2008). Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clin Microbiol Infect*,2008; 14, 101-104.

131. Falagas, M., Karageorgopoulos, D., & Dimopoulos, G. (2009). Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of tigecycline. *Curr Drug Metab*,2009; 10, 13-21.
132. (a) Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Katoris AC, Mavromanolakis E, Samonis G. 2010. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *Enterobacteriaceae* isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:240–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.019>.
133. (b) Falagas ME, Katoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. 2010. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:43–50. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70325-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70325-1).
134. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. 2011. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol* 2011; 6:653–666. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.49>.
135. Falagas, M., Skolidis, T., Vardakas, K., & Legakis, N. (2017). Activity of cefiderocol (S-649266) against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria collected from inpatients in Greek hospitals. *J Antimicrob Chemother*,2017; 72, 1704–1708.
136. Falgenhauer L, Waezsada S-E, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099>.
137. Fang, C., Lai, S., Yi, W. C., Hsueh, P., Liu, K., & Chang, S. (2007). *Klebsiella pneumoniae* Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess. *Clinical Infectious Diseases*,2007; 45, 284-293.
138. Faure, S. (2008). Les quinolones et fluorquinolones. *Act Pharm*,2008; 47(480), 49-53.
139. Fazili, T., Shamgoe, C., Endy, T., Kiska, D., Javaid, W., & Polhemus, M. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: An Emerging Disease. *The American Journal of the Medical Sciences*,2016; 351(3), 297-304.
140. FDA. 2017. Approved drug products. Label and approval history for Coly-Mycin M, NDA 050108. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/050108s030lbl.pdf.
141. Fernández, L., & Hancock, R. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2012; 25, 661-681.
142. Ferjani S, Saidani M, Amine FS, Boutiba-Ben BI. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Tunisian hospital. *Microb Drug Resist.* 2015; 21:158–166.
143. Fredborg M, Sondergaard TE, Wang M. 2017. Synergistic activities of meropenem double and triple combinations against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 88:355–360. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.04.015>.

144. Fu P, Tang Y, Li G, Yu L, Wang Y, Jiang X. Pandemic spread of bla_{KPC-2} among *Klebsiella pneumoniae* ST11 in China is associated with horizontal transfer mediated by IncFII-like plasmids. *Int J Antimicrob Agents*. 2019 Mar 15. pii: S0924-8579(19)30067-6.
145. Fu, Y., Zhang, W., Wang, H., Zhao, S., Chen, Y., Meng, F., & et al. (2013). Specific patterns of gyr A mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis* 2013;7, 13;8.
146. García J, Martínez D, Caña L, González D, Rodríguez L, Rodolfo H, et al. qnr genes in *Enterobacteriaceae* isolated from at a hospital in Venezuela. *Rev Chilena Infectol*. 2018 Apr;35(2):147-154.
147. Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Paterson DL, Shoham S, Jacob J, et al. 2011. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:3284 –3294. <https://doi.org/10.1128/AAC.01733-10>
148. Gelbicova T, Kolackova I, Krutova M, Karpiskova R. The emergence of mcr-1-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in domestic and imported turkey meat in the Czech Republic 2017-2018. *Folia Microbiol (Praha)*. 2019 Apr 17. doi: 10.1007/s12223-019-00709-z.
149. Ghasemi, Y., Archin, T., Kargar, M., & Mohkam, M. (2013). A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum beta-lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in Intensive Care Units of a referral hospital in Shiraz, Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2013; 703-708.
150. Giacobbe, D., Bono, V., Trecarichi, E., De Rosa, F., Giannella, M., Bassetti, M., & et al. (2015). Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case–control–control study. *Clin Microbiol Infect*, 2015; 21, 1106e1-1106e8.
151. Giakkoupi, P., Pappa, O., Polemis, M., & Vatopoulos, A. (2009). Emerging *Klebsiella pneumoniae* Isolates Coproducing KPC-2 and VIM-1 Carbapenemases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2009; 53, 4048-4050.
152. Giakkoupi, P., Xanthaki, A., Kanelopoulou, M., Vlahaki, A., Miriagou, V., Kontou, S., & et al. (2003). VIM-1 Metallo-β-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Greek Hospitals. *J CLIN MICROBIOL*, 2003; 3893–3896.
153. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, et al. An update of the evolving epidemic of bla_{KPC-2}-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jul; 66 (7):1510-3.
154. Giannella, M., Trecarichi, E., De Rosa, F., Del Bono, V., Bassetti, M., Lewis, R., & et al. (2014). Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. *Clin Microbiol Infect*, 2014; 20, 1357-1362.
155. Giannella M, Trecarichi EM, Giacobbe DR, De FG, Bassetti M, Bartoloni A, et al 2017. Effect of combination therapy containing a high dose carbapenem on mortality in patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *Int J*

156. Girlich, D., Halimi, D., Zambardi, G., & Nordmann, P. (2013). Evaluation of Etest® strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 ; 77, 200-201.
157. Glupczynski, Y., Huang, T.-D., Bouchahrouf, W., Rezende de Castro, R., Bauraing, C., Gérard, M., & et al. (2012). Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents*, 2012; 39, 168-172.
158. Gomez, S., Pasteran, F., Faccone, D., Bettioli, M., Veliz, O., De Belder, D., & et al. (2013). Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.*, 2013; 19, E233-E235.
159. Gomez-Simmonds A, Nelson B, Eiras DP, Loo A, Jenkins SG, Whittier S, et al. 2016. Combination regimens for treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:3601–3607. <https://doi.org/10.1128/AAC.03007-15>.
160. Gonçalves, I. R., Ferreira, M. L., Araujo, B. F., Campos, P. A., Royer, S., Batistão, D. W., & et al. (2016). Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 2016; 94(4), 322-329.
161. Goudarzi M, Azad M, Seyedjavadi SS. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and OqxAB efflux pumps among extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with nosocomial urinary tract infection in Tehran, Iran. *Scientifica*. 2015; 2015:518167.
162. GROISMAN, E. (2001). The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 2001; 183, 1835-1842.
163. Guan X, Xue X, Liu Y (2013). Plasmid-mediated quinolone resistance – current knowledge and future perspectives. *Journal of International Medical Research*, 2013; 41(1), 20-30.
164. Gudiol C, Royo-Cebrecos C, Abdala E, Akova M, Alvarez R, Maestro-de la Calle G, et al. 2017. Efficacy of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for the treatment of bloodstream infection due to extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in hematological patients with neutropenia. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e00164-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00164-17>.
165. Guillard T, Lebreil AL, Hansen LH, Kisserli A, Berger S, Lozniewski A, Alauzet C, de Champs C. Discrimination between native and Tn6010-associated *oqxAB* in *Klebsiella* spp., *Raoultella* spp., and other *Enterobacteriaceae* by using a two-step strategy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep; 59(9): 5838–5840.
166. Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B., & Kallen, A. J. (2011). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. 2011; 53(1), 60-67.
167. Gutierrez-Gutierrez B, Perez-Galera S, Salamanca E, de Cueto M, Calbo E, Almirante B, et al. 2016. A multinational, preregistered cohort study of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for treatment of bloodstream infections due to extended-

- spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016; 60: 4159–4169. <https://doi.org/10.1128/AAC.00365-16>.
168. Gutierrez-Gutierrez B, Salamanca E, de Cueto M, Hsueh PR, Viale P, Pano-Pardo JR, et al. 2017. Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (INCREMENT): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2017; 17:726 –734. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30228-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30228-1).
 169. Haenni, M., Ponsin, C., Métayer, V., Médaille, C., & Madec, J. (2012). Veterinary hospital-acquired infections in pets with a ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone. *J Antimicrob Chemother.*,2012; 67, 770-771.
 170. Haidar G, Alkroud A, Cheng S, Churilla TM, Churilla BM, Shields RK, et al. 2016. Association between the presence of aminoglycoside-modifying enzymes and in vitro activity of gentamicin, tobramycin, amikacin, and plazomicin against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase- and extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016; 60:5208 –5214. <https://doi.org/10.1128/AAC.00869-16>.
 171. Halaby, T., Reuland, A., Naiemi, N., Potron, A., Savelkoul, P., Vandembroucke-Grauls, C., & et al. (2012). A Case of New Delhi Metallo- β -Lactamase 1 (NDM-1)-Producing *Klebsiella pneumoniae* with Putative Secondary Transmission from the Balkan Region in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*,2012; 56, 2790–2791.
 172. Hamed SM, Elkhatib WF, El-Mahallawy HA, Helmy MM, Ashour MS, Aboshanab KMA. Multiple mechanisms contributing to ciprofloxacin resistance among Gram negative bacteria causing infections to cancer patients. *Sci Rep*. 2018 Aug 16;8(1):12268. doi: 10.1038/s41598-018-30756-4.
 173. Hampton, T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. *JAMA* 310, 1661–1663 (2013).
 174. Harris PN, Yin M, Jureen R, Chew J, Ali J, Paynter Paterson DL, et al. 2015. Comparable outcomes for β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations and carbapenems in definitive treatment of bloodstream infections caused by cefotaxime-resistant *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Resist Infect Control* 2015; 4:14. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0055-6>.
 175. Hays, C., Benouda, A., Poirel, L., Elouennass, M., & Nordmann, P. (2012). Nosocomial occurrence of OXA-48-producing enterobacterial isolates in a Moroccan hospital. *Int J Antimicrob Agents*, 2012; 39, 545–547.
 176. He F, Fu Y, Chen Q , Ruan Z , Hua X, Zhou H, Yu Y. Tigecycline Susceptibility and the Role of Efflux Pumps in Tigecycline Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *PloS one journal.pone.0119064* March 3, 2015 1-13 | DOI:10.1371/
 177. He, T., Wang , Y., Sun, L., Pang, M., Zhang, L., & Wang , R. (2017). Occurrence and characterization of blaNDM-5-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from dairy cows in Jiangsu, China. *J Antimicrob Chemother.*,2017; 72, 90-94.
 178. Hendrik W. van Veen*, W. N. (1998). The ABC family of multidrug transporters in microorganisms . *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; (1365), 31-36.
 179. Henequen C, Chlilek A, Beyrouthy R, Bonnet R, Robin F. Diversity of DHA-1-encoding plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 16 French hospitals. *J Antimicrob Chemother*,2018; Volume 73, Issue 11, November 2018, Pages 2981–2989.

180. Hernandez-Alles S, Albertı S, Alvarez D et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* 1999; 145: 673–679.
181. Ho, P., Yip, K., Chow, K., Lo, J., Que, T., & Yuen, K. (2010). Antimicrobial resistance among uropathogens that cause acute uncomplicated cystitis in women in Hong Kong: a prospective multicenter study in 2006 to 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*,2010; 66, 87-93.
182. Hooper, D. (feb 1999 r.). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*,1999; 2(1), 38-55.
183. Hooper, D. (march-april 2001 r.). Emerging Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 2001; 337-341.
184. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Sep; 1354(1): 12–31.
185. Hrabak, J., Chudackova, E., & Papagiannitsis, C. (2014). Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 2014; 20, 839-853.
186. <https://www.bam-bg.net/index.php/bg/>
187. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>.
188. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf>
189. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2015>.
190. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-plasmid-mediated-colistin-resistance-enterobacteriaceae-16>
191. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>.
192. <http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-latest-data-antibiotic-consumption-eu-2017>.
193. Huang CC, Chen YS, Toh HS, Lee YL, Liu YM, Ho CM, et al. 2012. Impact of revised CLSI breakpoints for susceptibility to third-generation cephalosporins and carbapenems among *Enterobacteriaceae* isolates in the Asia-Pacific region: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2002–2010. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40(Suppl):S4 –S10. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(12\)70003-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(12)70003-1).
194. Hwang JA, Her C, Kim YW. Endocarditis Caused by Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Korean J Crit Care Med* 2013 Feb 28(1):41-45
195. Ito-Horiyama T, Ishii Y, Ito A, Sato T, Nakamura R, Fukuhara N, et al 2016. Stability of novel siderophore cephalosporin S-649266 against clinically relevant carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:4384–4386. <https://doi.org/10.1128/AAC.03098-15>.

196. Ivanov, I., Sabtcheva, S., Dobрева, E., Todorova, B., Velinov, T., Borissova, V., & et al. (2014). Prevalence of carbapenemase genes among 16S rRNA methyltransferase producing. *Probl. Inf. Parasit. Dis*, 2014; 42(1), 10-13.
197. Izadi N, Naderi Nasab M, Harifi Mood E, Meshkat Z. The Frequency of *qnr* Genes in Extended-Spectrum β -lactamases and non-ESBLs *Klebsiella pneumoniae* Species Isolated from Patients in Mashhad, Iran. *Iran J Pathol*. 2017 Fall;12(4):377-383.
198. Jacoby, G. (2005). Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis*, 2005; 41.
199. Jacoby, G. (2009). AmpC Beta-Lactamases. *CLIN MICROBIOL REV*, 2009; 22, 161–182.
200. Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martinez-Martinez, L., Nordmann, P., Pascual, A., & et al. (2008). *qnr* Gene Nomenclature. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER*, 2008; 52(7), 2297-2299.
201. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr*. 2014; 2(2): 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013.
202. Jang, Y., Zhou, Z., Qian, Y., Wei, Z., Yu, Y., Hu, S., & et al. (feb 2008 r.). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008; 61, 1003-1006.
203. Jaidane N, Bonnin RA, Mansour W, Girlich D, Creton E, Cotellon G, et al. Genomic Insights into Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from a Tunisian Teaching Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Jan 25;62(2). pii: e01601-17.
204. Jarlier V, Nicolas MH. Fournier G Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer betalactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; Jul-Aug;10(4):867-78.
205. Jean SS, Hsueh PR, SMART Asia-Pacific Group. Distribution of ESBLs, AmpC β -lactamases and carbapenemases among *Enterobacteriaceae* isolates causing intra-abdominal and urinary tract infections in the Asia-Pacific region during 2008–14: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(1):166–71.
206. Jean SS, Coombs G, Ling T, Balaji V, Rodrigues C, Mikamo H, et al. 2016. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of pathogens causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2010–2013. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 47: 328 –334. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.01.008>.
207. Johnson , A., & Woodford, N. (2013). Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol*, 2013; 62, 499-513.
208. Jones RN. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2010 Aug 1;51 Suppl 1:S81-7. doi: 10.1086/653053.

209. Jung HA , Ha YE , Kim D , Park J , Kang CI , Chung DR ,et al. Native valve endocarditis due to extended spectrum b-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. Korean J Intern Med 2014; 29:398-401
210. Kaase, M., Schimanski, S., Schiller, R., Beyreis, B., Thurmer, A., Steinmann, J., et al. 2016. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in German hospitals. Int. J. Med. Microbiol. 2016; 306, 415–420
211. Kaleta, E., Clark, A., Johnson, D., Gamage, D., Wysocki, V., Cherkaoui, A., & et al. (2011). Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. J Clin Microbiol.,2011; 49, 345-353.
212. Kao, C.-Y., Udval, U., Huang, Y.-T., Wu, H., Huang, A., Bolormaa, E., & et al. (2016). Molecular characterization of extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates in Mongolia. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2016; 49, 692e700.
213. (a) Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu XY, Falagas ME. 2012. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. J Antimicrob Chemother 2012; 67:255–268. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr466>.
214. (b) Karageorgopoulos DE, Miriagou V, Tzouveleki LS, Spyridopoulou K, Daikos GL. 2012. Emergence of resistance to fosfomycin used as adjunct therapy in KPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: report of three cases. J Antimicrob Chemother 2012; 67:2777–2779. <https://doi.org/10.1093/jac/dks270>.
215. (a) Karlowsky JA, Hoban DJ, Hackel MA, Lob SH, Sahn DF. Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013-2015. Braz J Infect Dis. 2017 May-Jun;21(3):343-8. [PubMed] [CrossRef]
216. (6) Karlowsky JA, Hoban DJ, Hackel MA, Lob SH, Sahn DF. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries: SMART 2013-2015. J Med Microbiol. 2017 Jan; 66(1):61-9. [PubMed] [CrossRef]
217. Katsiari, M., Panagiota, G., Likousi, S., Roussou, Z., Polemis, M., Alkiviadis Vatopoulos, C., & et al. (2015). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a Greek intensive care unit: Molecular characterisation and treatment challenges. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2015; 3, 123-127.
218. Kawahara R, Fujiya Y, Yamaguchi T, Khong DT, Nguyen TN, Tran HT, et al. Most domestic livestock possess colistin-resistant commensal *Escherichia coli* harboring *mcr* in a rural community in Vietnam. Antimicrob Agents Chemother. 2019 Apr 15. pii: AAC.00594-19
219. Keer, J. V., Keer, K., Calster, J., & Derdelinckx, I. (2017). More than meets the eye: *Klebsiella pneumoniae* invasive liver abscess syndrome presenting with endophthalmitis. The Journal of Emergency Medicine, 2017; 1-3.

220. Khaertynov, K., Anokhin, V., Davidyuk, Y., Nicolaeva, I., Khalioullina, S., Semyenova, D., & et al. (2017). Case of Meningitis in a Neonate Caused by an Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 2017 8, 1-6. doi:doi: 10.3389/fmicb.2017.01576
221. Kiaei S, Moradi M, Hosseini Nave H, Hashemizadeh Z, Taati-Moghadam M, Kalantar-Neyestanaki D. Emergence of co-existence of bla_{NDM} with rmtC and qnrB genes in clinical carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in burning center from southeast of Iran. *Folia Microbiol (Praha)*. 2019 Jan;64(1):55-62.
222. Kim, S., Hong, S., Moland, E., & Thomson, K. (2007). Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo-beta-lactamases in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.*,2007; 45, 2798-801.
223. Kis, Z., Tóth, A., Janvari, L., & Damjanova, I. (2016). Countrywide dissemination of a DHA-1-type plasmid-mediated AmpC b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international highrisk clone in Hungary, 2009–2013. *Journal of Medical Microbiology*, 2016; 65, 1020–1027.
224. Kishore AK, Vail A, Jeans AR, Chamorro A, Di Napoli M, Kalra L, et al. Microbiological Etiologies of Pneumonia Complicating Stroke A Systematic Review. Originally published 30 Jul 2018 <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.020250> Stroke. 2018; 49:1602–1609
225. Kluytmans, J., Overvest, I., Willemsen, I., Kluytmans-van den Bergh, M., van der Zwaluw, K., Heck, M., & et al. (2013). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin Infect Dis.*,2013; 56, 478-487.
226. Ko KS, Lee JY, Baek JY, Suh JY, Lee MY, Choi JY, et al (2010) Predominance of an ST11 extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J Med Microbiol* 2010; 59:822–828.
227. Kocsis, E., Savio, C., Piccoli, M., Cornaglia, G., & Mazzariol, A. (2013). *Klebsiella pneumoniae* harbouring OXA-48 carbapenemase in a Libyan refugee in Italy. *Clin Microbiol Infect*, 2013; 19, E409-E411.
228. Kocsis, B., Kadar, B., Toth, A., Fullar, A., & Szabo, D. (2016). MgrB variants in colistin-susceptible and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2016; 1-2.
229. Köhler, T., & Pechere, J. (1998). Bacterial resistance to quinolones: mechanisms and clinical implications in the quinolones. Academic Press, London, UK, 1998; 117-142.
230. Kostyanev T, Bonten MJ, O'Brien S, Steel H, Ross S, François B, et al. The Innovative Medicines Initiative's New Drugs for Bad Bugs programme: European public-private partnerships for the development of new strategies to tackle antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Feb;71(2):290-5.
231. Ku, Y., Chen, C., Lee, M., Chuang, Y., Tang, H., & Yu, W. (2017). Comparison of synergism between colistin, fosfomycin and tigecycline against extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates or with carbapenem resistance. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*,2017; xx, 1-9.

232. Ku YH, Chuang YC, Chen CC, Lee MF, Yang YC, Tang HJ et al. *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Meningitis: Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance. **SCIENTIFIC REPOrTS** | 2017 7: 6634
233. Kumade, E., Furusyo, N., Takeshima, N., Kishihara, Y., Kaseida, F., Etoh, Y., & et al. (2016). A case of lobar pneumonia and sepsis with death caused by invasive *Klebsiella rhinoscleromatis* infection. *J Infect Chemother*, 2016; 22, 707-711.
234. Kumar, M., Lakshmi, V., & Rajagopalan, R. (2006). Occurrence of extended spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* spp. isolated at a tertiary care institute. *Indian J Med Microbiol*, 2006; 24, 208-211.
235. Kumarasamy, K., Toleman, M., Walsh, T., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., & et al. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.*, 2010; 10, 597-602.
236. Kumarasamy, K., & Kalyanasundaram, A. (2012). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. *J Antimicrob Chemother*, 2012; 67, 243-244.
237. Lagacé-Wiens P, Walkty A, Karlowsky J A Ceftazidime–avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections *Core Evidence* 2014; 9; 13-25:
238. Lam MMC, Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Fostervold A, Holt KE, et al . Convergence of virulence and MDR in a single plasmid vector in MDR *Klebsiella pneumoniae* ST15. *J Antimicrob Chemother*. 2019 May; 74(5): 1218–1222.
239. Lai CC, Chen YS, Lee NY, Tang HJ, Lee SS, Lin CF, et al. Susceptibility rates of clinically important bacteria collected from intensive care units against colistin, carbapenems, and other comparative agents: results from Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART). *Infect Drug Resist*. 2019 Mar 14;12:627-640.
240. Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A., & Quale, J. (2008). Polymyxins Revisited. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 2008; 21(3), 449–465.
241. Lascos, C., Peirano, G., Hackel, M., Laupland, K., & Pitout, J. (2013). Surveillance and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Isolates That Produce Carbapenemases: First Report of OXA-48-Like Enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemothe*, 2013; 57, 130-136.
242. Lauretti, L., Riccio, M., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., & et al. (1999). Cloning and Characterization of bla VIM, a New Integron-Borne Metallo-β-Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999; 43, 1584–1590.
243. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. 2016. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context treatment options, and detection methods. *Front Microbiol* 2016; 7:895. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>.
244. Lee HS, Moon J, Shin HR, Ahn SJ, Kim TJ, Jun JS, et al. Pneumonia in hospitalized neurologic patients: trends in pathogen distribution and antibiotic susceptibility. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Feb 1;8:25. doi: 10.1186/s13756-019-0475-9.

245. Lee, M. Y., Ko, K. S., Kang, C. I., Chung, D. R., Peck, K. R., and Song, J. H. (2011). High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011; 38, 160–163. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.03.020
246. Lee CR, Park KS, Lee JH, Jeon JH, Kim YB, Jeong BC, et al (2018) The threat of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (CR-HvKP). *Biomed Res* 2018; 29:2438–2441
247. (a) Li, J., Coulthard, K., Milne, R., Nation, R. L., Conway, S., Peckham, D., & et al. (2003). Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*, 2003; 52(6), 987-992.
248. (b) Li, J., Milne, R., Nation, R., Turnidge, J., & Coulthard, k. (2003). Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob agents chemother*, 2003; 47(4), 1364-1370.
249. (a) Li, J., Nation, R. L., Milne, R. W., Turnidge, J. D., & Coulthard, K. (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005; 25, 11-25.
250. (b) Li, J., Rayner, C. R., Nation, R. L., Deans, R., Boots, R., Widdecombe, N., & et al. (2005). Pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and colistin in a critically ill patient receiving continuous venovenous hemodiafiltration. *Antmicrob Agents Chemother*, 2005; 49(11), 4814-4815.
251. Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, et al. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Feb 22;8:44. doi: 10.1186/s13756-019-0489-3
252. Li X, Zhang D, Chen F, Ma J, Dong Y, Zhang L. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004 Nov;54(Pt 6):2131-6.
253. Lin, J., Koh, T. H., Lee, N., Fung, C., Chang, F., Tsai, Y., & et al. (2014). Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. *Gut Pathogens*, 2014; 6, 21.
254. Lin, Y., Huang, Y., Huang, H., Yang, T., Wang, F., & Fung, C. (2016). In vivo evolution of tigecycline-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strains in patients: relationship between virulence and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 2016; 48, 485-491.
255. Lin D, Chen J, Yang Y, Cheng J, Sun C. Epidemiological Study of Carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumoniae*. *Open Med (Wars)*. 2018 Oct 16;13:460-466.
256. Liu, J., Lin, T., Chang, Y., Tsai, C., & Hu, S. (2017). Prostatic abscess of *Klebsiella pneumoniae* complicating septic pulmonary emboli and meningitis: A. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2017; 10(1), 102-105.
257. Liu J, Yu J, Chen F, Yu J, Simner P, Tamma P, Liu Y, Shen L (2018) Emergence and establishment of KPC-2-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Shanghai, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37:293–299.
258. Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., YI, L. X., Zhang, R., Spencer, J., & et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and

- human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 2016; 16, 161-168.
259. Liu Y, Long D, Xiang TX, Du FL, Wei DD, Wan LG, et al. Whole genome assembly and functional portrait of hypervirulent extensively drug-resistant NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST86. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Mar 6. pii: dkz023. doi: 10.1093/jac/dkz023.
260. Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2019 Jan 21;18(1):4 doi: 10.1186/s12941-018-0302-9
261. Livermore, D. (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*,1995; 8, 557-584.
262. Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., et al. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*2007; 59, 165–174. doi: 10.1093/jac/dkl483
263. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. 2011. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37:415– 419. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012>.
264. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Woodford N. 2016. *In vitro* activity of eravacycline against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 260: 3840–3844. <https://doi.org/10.1128/AAC.00436-16>.
265. Lob SH, Hackel MA, Kazmierczak KM, Young K, Motyl MR, Karlowsky JA, et al. 2017. *In vitro* activity of imipenem-relebactam against Gramnegative ESKAPE pathogens isolated by clinical laboratories in the United States in 2015 (results from the SMART global surveillance program). *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e02209-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02209-16>.
266. Lomovskaya, O., & Bostian, K. (2006). Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. *Biochem. Pharmacol*,2006; 71, 910-918.
267. Lopez-Diaz MD, Culebras E, Rodriguez-Avial I, Rios E, Vinuela-Prieto JM, Picazo JJ, et al. 2017. Plazomicin activity against 346 extended-spectrum- β -lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* urinary isolates in relation to aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*,2017; 61:e02454-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02454-16>.
268. Lopez-Camacho, E., Gomez-Gil, R., Tobes, R., Manrique, M., Lorenzo, M., Galvan, B., & et al. (2014). Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *J Antimicrob Chemother*,2014; 69, 632-636.
269. Lorenzoni V., Rubert F, Rampelotto R, Horner R. Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from University Hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Soc Med Trop* 2018. 51(5):676-679.

270. Luk, S., Wong, W., Ho, A., Yu, K., To, W., & Ng, T. (2016). Clinical features and molecular epidemiology of plasmid-mediated DHA-type AmpC β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* blood culture isolates, Hong Kong. *J Glob Antimicrob Resist*, 2016; 7, 37-42.
271. Madec, J., Poirel, L., Saras, E., Gourguechon, A., Girlich, D., Nordmann, P., & et al. (2012). Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like blaCTX-M-15-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother*, 2012; 67, 578-581.
272. Madec, J., Haenni, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2017). Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemas-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? *Clinical Microbiology and Infection*, 2017; 23, 826-833.
273. Madueno, A., Gonzalez Garcia, J., Fernandez-Romero, S., Oteo, J., & Lecuona, M. (2017). Dissemination and clinical implications of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 in a Spanish hospital. *Journal of Hospital Infection*, 2017; xxx, 1-7.
274. Majlesi, A., Kakhki, R., Nejad, A., Mashouf, R., Roointan, A., Abazari, M., & et al. (2016). Detection of plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* strains in Hamadan, West of Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016
275. Markovska R, Schneider I, Stoeva T, Bojkova K, Boyanova L, Bauernfeind A, Mitov I. First identification of KPC-2 and VIM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Nov;77(3):252-3.
276. Markovska RD, Stoeva TJ, Bojkova KD, Mitov IG. Epidemiology and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter spp.*, *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* isolates from a Bulgarian hospital. *Microb Drug Resist*. 2014 Apr; 20(2):131-7.
277. Markovska R, Stoeva T, Schneider I, Boyanova L, Popova V, Dacheva D, et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *APMIS*. 2015 Oct;123(10):887-94.
278. (a) Markovska R, Stoeva T, Boyanova L, Stankova P, Pencheva D, Keuleyan E, et al. Dissemination of successful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 89 (2017) 310–313
279. (b) Markovska, R., Schneider, I., Keuleyan, E., Ivanova, D., Lesseva, M., Stoeva, T., Sredkova, M., Bauernfeind, A., Mitov, I., 2017. Dissemination of a multidrug-resistant VIM-1-and CMY-99-producing *Proteus mirabilis* clone in Bulgaria. *Microb. Drug Resist*. 2017; 23, 345–350.
280. Markovska R, Stoeva T, Boyanova L, Stankova P, Schneider I, Keuleyan E, et al. Multicentre investigation of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Bulgarian hospitals – Interregional spread of ST11 NDM-1-producing *K. pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution* 69 (2019) 61–67
281. Marshall S, Hujer AM, Rojas LJ, Papp-Wallace KM, Humphries RM, Spellberg B, et al. 2017. Can ceftazidime-avibactam and aztreonam overcome beta-lactam resistance conferred by metallo-beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*? *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e02243-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02243-16>.

282. Martínez-Martínez L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl. 1): 82–89
283. Mathers, A. J., Peirano, G., and Pitout, J. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Rev.*2015; 28, 565–591. doi: 10.1128/CMR.00116-14
284. Mazzariol, A., Zuliani, J., Cornaglia, G., Rossolini, G., & Fontana, R. (2002). AcrAB Efflux System: Expression and Contribution to Fluoroquinolone Resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob Agents Chemother.*,2002; 46, 3984–3986.
285. McMury L.M., P. R. (jul 1980 r.). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1980; 77(7), 3974-3977.
286. Mediavilla JR, Patrawalla A, Chen L, Chavda KD, Mathema B, Vinnard C, et al. 2016. Colistin- and carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla*NDM-5, causing a complicated urinary tract infection in a patient from the United States. *mBio* 2016; 7:e01191-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01191-16>.
287. Meleg S, Kovacs K, Gam T, Nyul A, Patko B, Toth A, et al. Emergence of VIM-4 metallo- β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone in the Clinical Centre University of Pecs, Hungary. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:O27–9.
288. Melot, B., Colot, J., & Guerrier, G. (2015). Bacteremic community-acquired infections due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological presentation in New Caledonia, 2008–2013. *International Journal of Infectious Diseases*, 2015; 41, 29-31.
289. Mendes RE, Jones RN, Woosley LN, Cattoir V, Castanheira M. Application of Next-Generation Sequencing for Characterization of Surveillance and Clinical Trial Isolates: Analysis of the Distribution of β -lactamase Resistance Genes and Lineage Background in the United States. *Open Forum Infect Dis.* 2019 Mar 15;6(Suppl 1):S69-S78.
290. Mezghani, M. S., Rekik, M. M., Mahjoubi, F., & Hammami, A. (2012). Epidemiological study of *Enterobacteriaceae* resistance to colistin in Sfax(Tunisia). *Med Mal Infect*,2012; 42(6), 256-263.
291. Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C., Gniadkowski, M., & et al. (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*, 2010; 16, 112-122.
292. Miriagou, V., Tzelepi, E., Gianneli, D., & Tzouveleki, L. (2003). *Escherichia coli* with a Self-Transferable, Multiresistant Plasmid Coding for Metallo- β -Lactamase VIM-1. 2003; 47, 395–397.
293. Mohamed AF, Karaiskos I, Plachouras D, Karvanen M, Pontikis K, Jansson B, et al. 2012. Application of a loading dose of colistin methanesulfonate in critically ill patients: population pharmacokinetics, protein binding, and prediction of bacterial kill. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:4241– 4249. <https://doi.org/10.1128/AAC.06426-11>.
294. Monaco, M., Giani, T., Raffone, M., Arena, F., Garcia-Fernandez, A., Pollini, S., & et al. (2014). Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy. <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V19N42/art20939.pdf>.

295. Monogue ML, Abbo LM, Rosa R, Camargo JF, Martinez O, Bonomo RA, et al. 2017. *In vitro* discordance with *in vivo* activity: humanized exposures of ceftazidime-avibactam, aztreonam, and tigecycline alone and in combination against New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a murine lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e00486-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00486-17>.
296. Monteiro, J., Widen, R., Pignatari, A., Kubasek, C., & Silbert, S. (2012). Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*, 2012; 67, 906–909.
297. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. 2015. Treatment options for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Open Forum Infect Dis* 2015; 2:ofv050. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv050>.
298. Munoz-Price , L., Poirel , L., Bonomo, B., Schwaber, M., Daikos , G., Cormican , M., & et al. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.*,2013; 13, 785-796.
299. Murri R, Fiori B, Spanu T, Mastroianni I, Giovannenze F, Taccari F, et al. 2017. Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for patients with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: retrospective single-center case series. *Infection* 2017; 45:209–213. <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0968-x>.
300. Naas, T., Cuzon, G., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., & Nordmann, P. (2011). Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol*, 2011; 49, 1608-1613.
301. Naseer , U., & Sundsfjord, A. (2011). The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist.*,2011; 17, 83-97.
302. Neuner, E., Yeh, J., Hall, G., Sekeres, J., Endimiani, A., Bonomo, R., & et al. (2011). Treatment and outcomes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.*,2011; 69(4), 357-362.
303. Ng TM, Khong WX, Harris PN, De PP, Chow A, Tambyah PA, et al. 2016. Empiric piperacillin-tazobactam versus carbapenems in the treatment of bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *PLoS One* 2016; 11:e0153696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153696>.
304. Nielsen, L., Snesrud, E., Onmus-Leone, F., Kwak, Y., Avilés, R., Steele, E., & et al. (2014). IS5 Element Integration, a Novel Mechanism for Rapid In Vivo Emergence of Tigecycline Nonsusceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.*,2014; 58, 6151–6156.
305. Nikaido, H. (1998). Antibiotic Resistance Caused by Gram-Negative Multidrug Efflux Pumps. *Clin Infect Dis*, 27(suppl1), S32-41.
306. Nilsson, O., Börjesson, S., Landén , A., & Bengtsson, B. (2014). Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *J Antimicrob Chemother.*, 2014; 69, 1497-1500.
307. Nordmann, P., & Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*,2014; 20, 821–830.

308. (a) Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.*, 2011; 17, 1791–1798.
309. (b) Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T., & Livermore, D. (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol*, 2011; 19, 588-595.
310. Nordmann P, Lienhard R, Kieffer N, Clerc O, Poirel L. Plasmid mediated colistin resistance in *Escherichia coli* in bacteremia in Switzerland. *Clin Infect Dis* 2016. pii: ciw124.
311. Nordmann P and Poirel L. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 398–400
312. Norman, A., L. H. Hansen, Q. She, and S. J. Sørensen. 2008. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 2008; 60:59–74
313. Novick RP, Clowes RC, Cohen SN, Curtiss R 3rd, Datta N, Falkow S. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev.* 1976 Mar; 40(1):168-89.
314. Okade, H., Nakagawa, S., Sakagami, T., Hisada, H., Nomura, N., Mitsuyama, J., & et al. (dec 2014.). Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Tokai, Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2014; 20(12), 778-783.
315. Olaitan, A., Thongmalayvong, B., Akkhavong, K., Somphavong, S., Paboriboune, P., Khounsy, S., & et al. (2015). Clonal transmission of a colistinresistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. *J Antimicrob Chemother*, 2015; 70, 3402-3404.
316. Otter JA , Doumith M , Davies F ,Mookerjee S, Dyakova E, Gilchrist M et al. Emergence and clonal spread of colistin resistance due to multiple mutational mechanisms in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in London. *Sci Rep* 2017; 7:12711
317. Ozsurekci, Y., & et al. (2016). Is colistin effective in the treatment of infections caused by multidrug-resistant (MDR) or extremely drug-resistant (XDR) gram-negative microorganisms in children? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2016; 85, 233-238.
318. Padmini, N., Ajilda, A., Sivakumar, N., & Selvakumar, G. (2017). Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: critical tools for antibiotic resistance pattern. *J Basic Microbiol*, 2017; 57, 460–470.
319. Pakzad I, Z. K. (Nov 2013 r.). Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. *GMS Hyg Infect Control*. 2013; , 8(2), Doc15.
320. Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Larrosa MN, Bou G, Fernandez-Martinez M, et al. 2016. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain. *J Infect* 2016; 72:152–160. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.10.008>.
321. Palmeiro JK, de Souza RF, Schörner MA, Passarelli-Araujo H, Grazziotin AL, Vidal NM et al. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital. *Front Microbiol*. 2019 Jul 23;10:1669. doi: 10.3389/fmicb.2019.01669.

322. Panagiotakopoulou A, Daikos GL, Miriagou V, Loli A, Tzelepi E, Tzouvelekis LS. 2007. Comparative in vitro killing of carbapenems and aztreonam against *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29:360–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.11.004>.
323. Papagiannitsis , C., Tryfinopoulou, K., Giakkoupi, P., Pappa, O., Polemis, M., Tzelepi , E., & et al. (2012). Diversity of acquired β -lactamases amongst *Klebsiella pneumoniae* in Greek hospitals. *Int J Antimicrob Agents.*, 2012; 39, 178-180.
324. Papagiannitsis CC, Miriagou V, Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC. Characterization of pKP1780, a novel IncR plasmid from the emerging *Klebsiella pneumoniae* ST147, encoding the VIM-1 metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Oct;68(10):2259-62. doi: 10.1093/jac/dkt196.
325. Pasteran, F., Otaegui, L., Guerriero, L., Radice, G., Maggiora, R., Rapoport., M., & et al. (2008). *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*, 2008; 14, 1178-1180.
326. Paterson DL, Bonomo R. 2005. Extended-spectrum β -lactamase: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:657– 686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.
327. Paul M, Narendrakumar L, R Vasanthakumary A, Joseph I, Thomas S. Genome sequence of a multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* ST78 with high colistin resistance isolated from a patient. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019 Apr 18. pii: S2213-7165(19)30097-9.
328. Paulsen IAN T., M. H. (dec 1996 r.). Proton-Dependent Multidrug Efflux Systems. *Microbiol Rev*, 1996; 575-608.
329. Peirano, G., and Pitout, J. D. (2010). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010; 35, 316–321. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003
330. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013, 11, 297–308.
331. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):2153-62.
332. Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K., & Bonomo, R. (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol*, 2007; 7, 459-469.
333. Perez F, Rudin SD, Marshall SH, Coakley P, Chen L, Kreiswirth BN, et al. OqxAB, a quinolone and olaquinox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57:4602–4603.
334. Perilli, M., Bottoni, C., Grimaldi, A., Segatore, B., Celenza, G., Mariani, M., & et al. (2013). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC-3 and blaVIM-2 from central Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013; 75, 218-221.
335. Peterson LR. 2008. A review of tigecycline—the first glycylicycline. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(Suppl 4):S215–S222. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(09\)70005-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70005-6).

336. Pichler, C., Büchsel, M., Rossen, J., Vavra, M., Reuter, S., Kern, W., & et al. (2017). First report of invasive liver abscess syndrome with endophthalmitis caused by a K2 serotype ST2398 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Germany, 2016. *New Microbes and New Infections*, 2017; 17, 77-80.
337. Pitout JD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:159 – 166. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0).
338. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L (2015) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:5873–5884.
339. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, et al. 2009. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3430 –3436. <https://doi.org/10.1128/AAC.01361-08>.
340. Podschun, R., & Ullmann, U. (1992). Isolation of *Klebsiella terrigena* from clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.*, 1992; 11(4), 349-352.
341. Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *CLIN MICROBIOL REV*, 1998; 589–603.
342. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Mar;44(3):622-32.
343. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48, 15-22.
344. Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2010; 54, 24-38.
345. (a) Poirel, L., Castanheira, M., Carrër, A., Rodriguez, C., Jones, R., Smayevsky, J., & et al. (2011). OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2011; 55, 2546-2551.
346. (b) Poirel, L., Walsh, T., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011; 70, 119-125.
347. (c) Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011; 70: 119 – 123
348. (a) Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.*, 2012; 67, 1597-606.
349. (b) Poirel, L., Bonnin, R., & Nordmann, P. (2012). Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012; 56, 559-562.

350. Poirel, L., Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M., Ozdamar, M., Turkoglu, S., & et al. (2014). The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 2014; 3, 1-6.
351. Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Than D, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis* 2016. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\) 00006-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16) 00006-2).
352. Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, Zarkotou O, Poulou A, Skoura L, Vrioni G, Tsakris A. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: evidence of a widespread clonal outbreak. *J Antimicrob Chemother*. 2019 May 7. pii: dkz176. doi: 10.1093/jac/dkz176.
353. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection*. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Dec;18(12):1194-204.
354. Pontikis K, Karaiskos I, Bastani S, Dimopoulos G, Kalogirou M, Katsiari M, et al. 2014. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 2014; 43:52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.09.010>.
355. Poole, K. (sep 2000 r.). Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; 44(9), 2233-2241.
356. (a) Potron, A., Kalpoe, J., Poirel, L., & Nordmann, P. (2011). European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect*, 2011; 17, E24–E26.
357. (b) Potron, A., Nordmann, P., Lafeuille, E., Al Maskari, Z., Al Rashdi, F., & Poirel, L. (2011). Characterization of OXA-181, a Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55, 4896-4899.
358. (a) Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 2013; 1:18. pii: 20549..
359. (b) Potron, A., Nordmann, P., & Poirel, L. (2013). Characterization of OXA-204, a Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013; 57, 633-636.
360. Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). Derepressed Transfer Properties Leading to the Efficient Spread of the Plasmid Encoding Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014; 58, 467–471.
361. Poudyal, A., Howden, B. P., Bell, J. M., Gao, W., Owen, R. J., Turnidge, J. D., & et al. (2008). In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 2008; 62(6), 1311-1318.
362. Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, Stefanou I, Kosmidis C, Platsouka E, et al. 2008. Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother*, 2008; 61:59–63. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm443>.

363. Qi, Y., Wei, Z., Ji, S., Du, x., Shen, P., & Yu, Y. (2011). ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*, 2011; 66(2), 307-312.
364. Quan, J., Li, X., Chen, Y., Zhou, Z., Zhang, H., Sun, L., & et al. (2017). Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. *Lancet Infect Dis*, 2017; 17(4), 400-410.
365. Queenan, A., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 2007; 20, 440-458.
366. Qureshi, Z., Paterson, D., Potoski, B., Kilayko, M., Sandovsky, G., Sordillo, E., & et al. (2012). Treatment outcome of Bacteremia Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of Combination Antimicrobial Regimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012; 56, 2118-2113.
367. Quesada, A., Ugarte-Ruiz, M., Iglesias, M. R., Porrero, M. C., Martínez, R., Florez-Cuadrado, D., & et al. (2016). Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Research in Veterinary Science*, 2016; 105, 134-135.
368. Rafiq Z, Sam N, Vaidyanathan R. Whole genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* U25, a hypermucoviscous, multidrug resistant, biofilm producing isolate from India. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111:144–146.
369. Rahman, M., Shukla, S., Prasad, K., Ovejero, C., Pati, B., Tripathi, A., & et al. (2014). Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from India. *Int J Antimicrob Agents*, 2014; 44, 30-37.
370. Rasheed JK, Kitchel B, Zhu W, Anderson KF, Clark NC, Ferraro MJ, Savard P, Humphries RM, Kallen AJ, Limbago BM. New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, United States. *Emerg Infect Dis*. 2013 Jun;19(6):870-8.
371. Rhouma, M., Beaudry, F., & Letellier, A. (2016). Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2016; 48(2), 119-126.
372. Ribeiro, V., Falci, D., Rozales, F., Barth, A., & Zavascki, A. (2014). Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. *Braz J Infect Dis*, 2014; 18, 231-232.
373. Rice, L. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*, 2008; 197(8), 1079-1081.
374. Rice LB. Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2010; 31(S1), S7-S10.
375. Ryu S, Klein E, Chun B. Temporal association between antibiotic use and resistance in *Klebsiella pneumoniae* at a tertiary care hospital. *Antimicrob Res Infect Control*, 2018, 7:83.
376. Robicsek, A., Jacoby, G., & Hooper, D. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*, 2006; 6, 629-640.

377. Rodríguez-Bano J, Picon E, Navarro MD, Lopez-Cerero L, Pascual A. 2012. Impact of changes in CLSI and EUCAST breakpoints for susceptibility in bloodstream infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*, 2012; 18: 894–900. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03673.x>.
378. Rodríguez-Bano J, Cisneros JM, Gudiol C, Martínez JA. 2014. Treatment of infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32(Suppl 4):S49 –S55. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70174-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70174-0).
379. Rodríguez-Bano J, Gutierrez-Gutierrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Reviews*, April 2018; Volume 31 Issue 2 e00079-17
380. Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais A. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). *Int J Med Microbiol*. 2014; 304:1100–8.)
381. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat*. 2016 Nov;29:13-29. doi: 10.1016/j.drug.2016.09.001.
382. Rodríguez-Zulueta, P., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., Reyes-Mar, J., Vélez-Pérez, F., Arroyo-Escalante, S., & et al. (2013). First Outbreak of KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) Clinical Isolates in a Mexican Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2013; 57, 4086–4088.
383. Roodpeyma Shahla. *Klebsiella pneumoniae* Endocarditis. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2015 April; 3(2): e20079.
384. Ruilian, L., Yujia, H., Yiheng, Z., Zemin, D., Hao, W., Jing, W., & et al. (2017). Tigecycline Susceptibility and Molecular Resistance Mechanisms Among Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated During Non-Tigecycline Treatment. *Microbial Drug Resistance*, 2017; 23, 139-46.
385. Russo TA, Olson R, Macdonald U, Metzger D, Maltese LM, Drake EJ, et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 2014; 82:2356–67.
386. Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo. *Infect Immun*. 2015; 83:3325–33.
387. Sabat, A., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijk, J., Laurent, F., & et al. (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. www.eurosurveillance.org.
388. Sader, H., Farrell, D., Flamm, R., & Jones, R. (2014). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and

- European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2014; 2009–2012. *Int J Antimicrob Agents*, 43, 328–334.
389. Saha, R., Farrance, C., Verghese, B., Hong, S., & Donofrio, R. (2013). *Klebsiella michiganensis* sp. nov., A New Bacterium Isolated from a Tooth Brush Holder. *Curr Microbiol*, 2013; 66, 72-78.
 390. Saier, M., Tam, R., Reizer, A., & Reizer, J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molecular Microbiology*, 1994; 11(5), 841-847.
 391. Salamat, S., Ejaz, H., Zafar, A., & Javed, H. (2016). Detection of AmpC β -lactamase producing bacteria isolated in neonatal sepsis. *Pak J Med Sci.*, 2016; 32, 1512–1516.
 392. Samuelsen, O., Naseer, U., Karah, N., Lindemann, P., Kanestrøm, A., Leegaard, T., & et al. (2013). Identification of *Enterobacteriaceae* isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. *J Antimicrob Chemother*, 2013; 68, 1682-1685.
 393. Savov E, Todorova I, Politi L, et al. Colistin Resistance in KPC-2- and SHV-5-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in Bulgaria. *Chemotherapy*, 2017, 62(6), 339-342 .
 394. Savov E, Politi L, Spanakis N, Trifonova A, Kioseva E, Tsakris A. NDM-1 Hazard in the Balkan States: Evidence of the First Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *Microb Drug Resist.* 2018 Apr;24(3):253-259. doi: 10.1089/mdr.2017.0230. Epub 2017 Sep 6.
 395. Seah, C., Low, D., Patel, S., & Melano, R. (2011). Comparative Evaluation of a Chromogenic Agar Medium, the Modified Hodge Test, and a Battery of Meropenem-Inhibitor Discs for Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.*, 2011; 49, 1965-1969.
 396. Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S., & Kamal, M. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2015; 22, 90-101.
 397. Shaikh N. K., Mundhada S. G., Lalngaihuali R., Ingole K. V. Comparison of different phenotypic methods for the detection of extended spectrum b- lactamase (esbl) in bacterial isolates from tertiary care centre. *Int J Cur Res Rev*, 2016;| Vol 8 • Issue 11 • June 2016 p10-14
 398. Sharma, R., Park, T., & Moy, S. (2016). Ceftazidime-Avibactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Resistant Gram-negative Organisms. *Clinical Therapeutics*, 2016; 38, 431-444.
 399. Sheng WH, Badal RE, and Hsueh PR. Distribution of Extended-Spectrum β -Lactamases, AmpC β -Lactamases, and Carbapenemases among *Enterobacteriaceae* Isolates Causing Intra-Abdominal Infections in the Asia-Pacific Region: Results of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jul; 57(7): 2981–2988.
 400. Shibl, A., Al-Agamy, M., Memish, Z., Senok, A., Khader, S., & Assiri, A. (2013). The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Infect Dis*, 2013; 17, e1130-e1133.

401. Silva A, Sousa AM, Alves D, Lourenço A, Pereira MO. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* is triggered by small colony variants sub-populations within biofilms. *Pathog Dis.* 2016 ;74(5).1-8
402. Singh, S., & Gupta, M. (2016). blaOXA-48 carrying clonal colistin resistant-carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in neonate intensive care unit, India. *Microbial Pathogenesis*, 2016; 100, 75-77.
403. Singh, S., Mishra, M., Sahoo, M., Patole, S., & Mohapatra, H. (2017). Efflux mediated colistin resistance in diverse clones of *Klebsiella pneumoniae* from aquatic environment. *Microbial Pathogenesis*, 2017; 102, 109-112.
404. Solomkin , J., Evans, D., Slepavicius, A., Lee , P., Marsh, A., Tsai, L., & et al. (2017). Assessing the Efficacy and Safety of Eravacycline vs Ertapenem in Complicated Intra-abdominal Infections in the Investigating Gram-Negative Infections Treated With Eravacycline (IGNITE 1) Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg*, 2017; 152, 224-232.
405. Souli M, Konstantinidou E, Tzepi I, Tsaganos T, Pefanis A, Chryssouli Z, et al. 2011. Efficacy of carbapenems against a metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* clinical isolate in a rabbit intra-abdominal abscess model. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:611–617. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq470>.
406. Srinivas, P., & Rivard, K. (2017). Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Curr Infect Dis Rep*, 2017; 19, 38.
407. Steinmann , J., Kaase, M., Gatermann, S., Popp , W., Steinmann, E., Damman, M., & et al. (2011). Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill.*, 2011; 16, pii: 19944.
408. STEPHANIE S. PAO, I. T. (mar 1998 r.). Major Facilitator Superfamily. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 1998; 1-34.
409. Stoesser, N., Mathers, A. J., Moore, C. E., Day, N. P., & Crook, D. W. (2016). Colistin resistance gene mcr-1 and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016; 16(3), 285-286.
410. Studentova, V., Dobiasova, H., Hedlova, D., Dolejska, M., Papagiannitsis, C.C., Hrabak, J., 2015. Complete nucleotide sequences of two NDM-1-encoding plasmids from the same sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59, 1325–1328.
411. Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014; 453, 254-267.
412. Sun K, Chen X, Li C, Yu Z, Zhou Q, Yan Y (2015) Clonal dissemination of multilocus sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - producing *K. pneumoniae* in a Chinese teaching hospital. *APMIS*, 2015; 123:123–127.
413. Sutcliffe , J., O'Brien , W., & Fyfe, C. (2013). Antibacterial Activity of Eravacycline (TP-434), a Novel Fluorocycline, against Hospital and Community Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013; 57, 5548-5558.

414. Tamma PD, Han JH, Rock C, Harris AD, Lautenbach E, Hsu AJ et al. 2015. Carbapenem therapy is associated with improved survival compared with piperacillin-tazobactam for patients with extended-spectrum β -lactamase bacteremia. *Clin Infect Dis*, 2015; 60: 1319–1325. <https://doi.org/10.1093/cid/civ003>.
415. Tansarli GS, Papaparaskevas J, Balaska M, Samarkos M, Pantazatou A, Markogiannakis A, et al. Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: Evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 52 (2018) 397–403.
416. Tafaj S, Gona F, Kapisyzi P, Cani A, Hatibi A, Bino S, et al. Isolation of the first New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type **ST15** from a digestive carrier in Albania, May 2018. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018 Dec 14;17:142-144. doi: 10.1016/j.jgar.2018.12.002.
417. Teo JQ, Chang CW, Leck H, Tang CY, Lee SJ, Cai Y et al . Risk factors and outcomes associated with the isolation of polymyxin B and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* spp.: A case-control study. *Int J Antimicrob Agents*. 2019 Mar 14. pii: S0924-8579(19)30064-0
418. Tian D, Pan F, Wang C, Sun Y, Zhang H. Resistance phenotype and clinical molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among pediatric patients in Shanghai. *Infect Drug Resist*. 2018 Oct 24;11:1935-1943
419. Todorova, B., Sabtcheva, S., Ivanov, I., Lesseva, M., Chalashkanov, T., Ioneva, M., & et al. (2016). First clinical cases of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from two hospitals in Bulgaria. *J Infect Chemother*, 2016; 22, 837-840.
420. Tofas, P., Skiada, A., Angelopoulou, M., Sipsas, N., Pavlopoulou, I., Tsaousi, S., & et al. (2016). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in neutropenic patients with haematological malignancies or aplastic anaemia: Analysis of 50 cases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2016; 47, 335-339.
421. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16;99(8):5638-42.
422. Tran JH, (jan 2005 r.). Interaction of the Plasmid-encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with E.coli DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49(1), 118-125.
423. Tsakris, A., Poulou, A., Pournaras, S., Voulgari, E., Vrioni, G., Themeli-Digalaki, K., & et al. (2010). A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.*, 2010; 65, 1664-1671.
424. Tumbarello, M., Viale, P., Viscoli, C., Treccarichi, E., Tumietto, F., Marchese, A., & et al. (2012). Predictors of mortality in Bloodstream Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Importance of Combination Therapy. *Clin Infect Dis*, 2012; 55(7), 943-950.
425. Tumbarello M, Treccarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M et al. 2015. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 70: 2133–2143. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv086>.

426. Tzouveleakis, L., & Bonomo, R. (1999). SHV-Type Beta-Lactamases. *Curr.Pharm.Design*, 2015; 5, 847-864.
427. Ulyashova, M., Khalilova, Y., Rubtsova, M., Edelstein, M., Alexandrova, I., & Egorov, A. (2010). Oligonucleotide Microarray for the Identification of Carbapenemase Genes of Molecular Classes A, B, and D. *Acta Naturae*, 2010; 2, 101–109.
428. van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., & et al. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2007; 13(s 3), 1-46.
429. (a) van Duin, D., Cober, E., Richter, S., Perez, F., Kalayjian, R., Salata, R., & et al. (2015). Residence in Skilled Nursing Facilities is Associated with Tigecycline Non-Susceptibility in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 2015; 36, 942-948.
430. (b).van Duin D, Cober E, Richter SS, Perez F, Kalayjian RC, Salata RA, et al 2015. Impact of therapy and strain type on outcomes in urinary tract infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 2015; 70:1203–1211. <https://doi.org/10.1093/jac/dku495>.
431. van Duin D, Bonomo RA. 2016. Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam: second-generation β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Clin Infect Dis*, 2016; 63:234 –241. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw243>.
432. van Duin D, Lok JJ, Earley M, Cober E, Richter SS, Perez F et al. Colistin Versus Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*, *Clinical Infectious Diseases*, 2018; Volume 66, Issue 2, 6 January 2018, Pages 163–171, <https://doi.org/10.1093/cid/cix783>
433. Vardakas KZ, Legakis NJ, Triarides N, Falagas ME. 2016. Susceptibility of contemporary isolates to fosfomycin: a systematic review of the literature. *Int J Antimicrob Agents*, 2016; 47:269 –285. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.02.001>.
434. Vergadi, E., Bitsori, M., Maraki, S., & Galanakis, E. (2017). Community-onset carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infections in infancy following NICU hospitalisation. *J Pediatr Urol*. 2017 Oct;13(5):495.e1-495.e6.
435. Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using the repetitive sequencebased polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol*. 1994;5(1):25–40..
436. Viaggi, B., Sbrana, F., Malacarne, P., & Tascini, C. (2015). Ventilator-associated pneumonia caused by colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: *Respir Investig*. 2015 May;53(3):124-8.
437. Vidal L, Gafter-Vili Borok S, Fraser A, Leibovici L, Paul M. 2007. Efficacy and safety of aminoglycoside monotherapy: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother*, 2007; 60:247–257. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm193>.
438. Villa, L., Feudi, C., Fortini, D., García-Fernández , A., & Carattoli , A. (2014). Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2014; 58, 1707-1712.

439. Villa, L., Feudi, C., Fortini, D., Brisse, S., Passet, V., Bonura, C., et al. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microb Genom.* 2017 Apr 26;3(4):e000110.
440. Voets, G., Fluit, A., Scharringa, J., Stuart, J., & Leverstein-van Hall, M. (2011). A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*, 2011; 37, 356-359.
441. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, Tsakris A. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece..*J Antimicrob Chemother.* 2014 Aug; 69(8):2091-7. Epub 2014 Apr 15.
442. Vrioni, G., Daniil, I., Voulgari, E., Ranellou, K., Koumaki, V., Ghirardi, S., & et al. (2012). Comparative Evaluation of a Prototype Chromogenic Medium (ChromID CARBA) for Detecting Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Surveillance Rectal Swabs. *J Clin Microbiol*, 2012; 50, 1841–1846.
443. Walker, D. & Fowler, T. Annual Report of the Chief Medical Officer: Volume Two, 2011: Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance (Department of Health, 2011).
444. Walker, C., & Shankaran, S. (2016). Extended antibiotic resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: A case series. *American Journal of Infection Control*, 2016; 44, 1050-1052.
445. Walsh T R, Toleman , M., Poirel , L., & Nordmann , P. (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005 Apr;18(2):306-25.
446. Wang M, S. D. (Apr 2004 r.). Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2004; 48(4), 1295-1299.
447. Wang Q, Li B, Tsang AK, Yi Y, Woo PC, Liu CH. Genotypic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Beijing Hospital reveals high genetic diversity and clonal population structure of drug-resistant isolates. *PLoS One* 2013; 8:e57091..
448. Wang, Y., Cao, W., Zhu, X., Chen, L., Li, l., Zhang, B., & et al. (2012). Characterization of a novel *Klebsiella pneumoniae* sequence type 476 carrying both blaKPC-2 and blaIMP-4. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012; 31, 1867-1872.
449. Wang X, Xie Y, Li G, Liu J, Li X, Tian L, Sun J, Ou HY, Qu H. Whole-Genome-Sequencing characterization of bloodstream infection-causing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST374 Virulence. 2018; 9(1): 510–521
450. Wang X, Zhang F, Zhao C, Wang Z, Nichols WW, Testa R, et al. 2014. *In vitro* activities of ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam against 372 Gram-negative bacilli collected in 2011 and 2012 from 11 teaching hospitals in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014; 58:1774 –1778. <https://doi.org/10.1128/AAC.02123-13>.
451. Wendel, A., Brodner, A., Wydra, S., Ressina, S., Henrich, B., Pfeffer, K., & et al. (2013). Genetic Characterization and Emergence of the Metallo- β -Lactamase GIM-1 in

- Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* during a Long-Term Outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013; 57, 5162–5165.
452. Wenzler E, Deraedt MF, Harrington AT, Danizger LH. 2017. Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo-beta-lactamase-producing gram-negative pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2017; 88:352–354. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.009>.
453. Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012; 93(3), 965-974.
454. Wohlwend, N., Endimiani, A., Francey, T., & Perreten, V. (2015). Third-Generation-Cephalosporin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Humans and Companion Animals in Switzerland: Spread of a DHA-Producing Sequence Type 11 Clone in a Veterinary Setting. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2015; 59, 2949–2955.
455. Wong MH, Chan EW, Chen S. Evolution and dissemination of OqxAB-like efflux pumps, an emerging quinolone resistance determinant among members of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(6):3290-7. doi: 10.1128/AAC.00310-15.
456. Woodford N, Turton J, Livermore D. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35: 736–55.
457. Woodford N, Pike R, Meunier D, Loy R, Hill R, Hopkins KL. 2014. *In vitro* activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp., and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother*, 2014; 69:564 –567. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt383>.
458. World Economic Forum. Global Risks 2013 Eighth Edition <http://www.weforum.org/reports/global-risks2013-eighth-edition> (2013).
459. World Economic Forum. Global Risks 2014 Report <http://www.weforum.org/reports/global-risks-2014-report> (2014).
460. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014 <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (2014)
461. Wu, H., Li, D., Zhou, H., Sun, Y., Guo, I., & Shen, D. (2017). Bacteremia and other body site infection caused by hypervirulent and classic *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 2017; 104, 254-262.
462. Xu H, Huo C, Sun Y, Zhou Y, Xiong Y, Zhao Z, et al. Emergence and molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla_{CTX-M-15} extended-spectrum β-lactamases causing ventilator-associated pneumonia in China. *Infect Drug Resist.* 2018 Dec 20;12:33-43.
463. Yanat B, Rodríguez-Martínez JM, Touati A. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Mar;36(3):421-435.

464. Yaici, L., Haenni, M., Métayer, V., Saras, E., Zekar, F., Ayad, M., & et al. (2017). Spread of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the community through ready-to-eat sandwiches in Algeria. *International Journal of Food Microbiology*, 2017; 245, 66-72.
465. Yamaguchi H, Takuma A, Fukuoka E, Nakamura H., Suzuki K., Horiuchi K., et al Significant increase of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing bacteria prevalence in a Japanese university hospital. *Int Jour of Infect Diseases* 2018, 73 s, p 125
466. Yamasaki, K., Komatsu, M., Ono, T., Nishio, H., Sueyoshi, N., Kida, K., & et al. (2017). Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing blaGES-4 carbapenemase at a Japanese hospital. *J Infect Chemother*, 2017; 23, 40-44.
467. Yang HY, Nam YS, Lee HJ. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2014; 25:163–169.
468. Yigit , H., Queenan , A. M., Anderson , G. J., Domenech-Sanchez , A., Biddle , J. W., Steward, C. D., & et al. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2001; 45(4), 1151-1161.
469. Yong , D., Lee, K., Yum, J., Shin, H., Rossolini , G., & Chong, Y. (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.*, 2002; 40, 3798-801.
470. Yong, D., Toleman, M., Giske, G., Cho, H., Sundman, K., Lee, K., & et al. (2009). Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2009; 53, 5046–5054.
471. Yoshizumi A, Ishii Y, Aoki K, Testa R, Nichols WW, Tateda K. 2015. *In vitro* susceptibility of characterized beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria isolated in Japan to ceftazidime-, ceftaroline-, and aztreonam-avibactam combinations. *J Infect Chemother*, 2015; 21:148 –151. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.028>.
472. Yu J, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Tian L, Li L, Sun Z . Outbreak of nosocomial NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST1419 in a neonatal unit. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017 Mar; 8:135-139. Epub 2017 Jan 18.
473. Yuan JY, Xu XG, Guo QL, Zhao X, Ye XY, Guo Y, Wang MG. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67:1655–1659.
474. Zarakolu, P., Eser, O., Aladag, E., Al-Zahrani, I., Day, K., Atmaca, O., & et al. (2016). Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization: a surveillance study at a Turkish university hospital from 2009 to 2013. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2016; 85, 466-470.

475. Zhan L, Wang S, Guo Y, Jin Y, Duan J, Hao Z, et al (2017) Outbreak by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates with carbapenem resistance in a tertiary hospital in China. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017; 7:1–9.
476. (a) Zhang Y, Zhao C, Wang Q, Wang X, Chen H, Li H, et al. High prevalence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in china: geographic distribution, clinical characteristics, and antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60:6115–20.
477. (b) Zhang, Y., Lin, X., & Bush, K. (2016). In vitro susceptibility of β -lactamase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) to eravacycline. *J Antibiot (Tokyo)*, 2016; 69, 600-604.
478. Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2013 Feb; 39(1):79-101.
479. Zhou K, Lokate M , Deurenberg RH , Arends J, Foe JLT , Grundmann H , et al. Characterization of a CTX-M-15 Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak Strain Assigned to a Novel Sequence Type (1427) *Frontiers in Microbiology* November 2015 | Volume 6 | Article 1250
480. Zhu C, Liyanapathirana V, Li C, Pinto V, Hui M, Lo N, et al. Characterizing Mobilized Virulence Factors and Multidrug Resistance Genes in Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a SriLankan Hospital. *Front Microbiol*. 2018 Aug; 31;9:2044. doi: 10.3389/fmicb.2018.02044. eCollection 2018.
481. Zowaw, H., Balkhy, H., Walsh, T., & Paterson, D. (2013). β -Lactamase Production in Key Gram-Negative Pathogen Isolates from the Arabian Peninsula. *Clin Microbiol Rev.*, 2013; 26, 361–380.
482. Zusman O, Altunin S, Koppel F, Dishon Benattar Y, Gedik H, Paul M. 2017. Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem resistant bacteria: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72:29 –39. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw377>