

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ
ОХРИДСКИ“**

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра „Обща и промишлена микробиология“



МУСТАФА ГЮЗЕЛ, дм

**„Фенотипно и генотипно изследване на метало- β -лактамази в
клинични изолати на Грам-отрицателни неферментиращи бактерии“**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация
за присъждане на образователната и научна степен “доктор”
Професионално направление 4.3 Биологически науки
Научна специалност
„Микробиология“

Научни ръководители:
проф. д-р **П. Мончева**
доц. д-р **П. Христова**

2016
София

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

ДДСТ – Двойно-дискос синергичен тест
ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина
КДДТ - Комбиниран дисково-дифузионен тест
МБЛ - Метало-бета-лактамаза
НФГБ - Неферментиращи глюкозата бактерии
AG - Аминогликозид
AMC - Амоксицилин/Клавуланат
AK - Амикацин
AZT - Азтреонам
Bla - Гени кодиращи беталактамази
CA - Клавуланова киселина
CAZ - Цефтазидим
CIP - Ципрофлоксацин
CLSI - Институт за клинични лабораторни стандарти
CRO - Цефтриаксон
CT - Колистин
CXM - Цефуросксим
DPA - Дипиколинова киселина
EDTA - Етилендиаминтетраацетат
EMB - Eosin Methylene Blue agar
ESBL - Extend-spectrum beta-lactamases (Широкоспектърни бета-лактамази)
ETP - етрапенем
EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP - Цефепим
GN - Гентамицин
IMP - Имипенем
KIN - Хинолон
KL - Хлорамфеникол
LA - Линкозамид
LPS - Липополизахарид
MEM - Меропенем
MIC - Минимална инхибираща концентрация
MILD - Motility–Indole-Lysine Decarboxylase
MPA - Меркаптопропионова киселина
MHA - Mueller-Hinton Agar
OXA - Оксацилинази
PBP - Пеницилин-свързващи протеини
PCR - Polymerase chain reaction
POL - Полимиксин
RT-PCR - Real-time PCR
QS - Quorum-sensing
RIF - Рифампицин
SMA - Натрий-меркаптооцетна киселина
SUL - Сулфонамид
SXT - Триметоприм / Сулфаметоксазол
TET - Тетрациклин
TMT - Триметоприм
TPZ - Тазобактам /Пиперацилин
TSI - Tri Sugar Iron Agar
TZB - Тазобактам

УВОД

Понастоящем Грам-отрицателните неферментиращи глюкозата бактерии (НФГБ), особено *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, са сред най-важните фактори за възникване на вътреболнични инфекции. Важността на този въпрос се дължи на множествената антибиотична резистентност на тези бактерии. Засилената употреба на широкоспектърни бета-лактамни антибиотици води до появата на мощни ензими, които могат да неутрализират повечето антибиотици от ново поколение. Това води до сериозни проблеми при лечението.

Множество механизми са отговорни за развитието на резистентност в Грам-отрицателните неферментиращи бактерии към антибиотиците от групата на карбапенем. Известно е, че бактериите придобиват резистентност чрез функционирането на лекарствена ефлукс помпа към меропенем (MEM), чрез намаляване на пропускливостта на външната мембрана към имипенем (IMP), поради наличието на някои бета-лактамази с разширен спектър (ESBL) тип OXA (оксацилинази) и на дерепресирани мутанти, синтезиращи високи нива на хромозомен ензим AmpC, който хидролизира IMP и MEM. През последните години най-често срещаният механизъм на резистентност към карбапенем е свързан с наличието на метало-бета-лактамази (МБЛ) (1).

МБЛ са поставени във функционална група 3 в класификацията на Буш или в клас Б в класификацията на Амблър и за разлика от останалите бета-лактамази са ензими, имащи в активните си центрове Zn^{2+} йони. Тези ензими не се влияят от класическите инхибитори на бета-лактамази като клавуланат, тазобактам (TZB) и сулбактам, но се инактивират от хелатори на метални йони като EDTA (етилен диамин тетраацетат). Най-важната особеност на тези ензими е, че хидролизират всички бета-лактами и карбапенеми, освен монобактами (2).

Гените, кодиращи МБЛ, които не се инактивират от инхибитори на бета-лактамази и имат широк субстратен профил се намират в генните касети на интегроните от клас 1, намиращи се върху хромозоми или плазмиди. Тези генни касети се преместват в различни интегрони чрез рекомбинация, в резултат на което резистентността се разпространява бързо между бактериите. Значението на присъствието на гени за МБЛ се свързва не само с развитието на резистентност към много антибиотици, включително карбапенеми, но така също и с тяхното лесно предаване в другите бактерии чрез хоризонтален трансфер (3).

При лечението на инфекции, при които се предпочитат антибиотици от групата на карбапенем е важно както изолирането на причинителя на инфекцията, така също и идентифицирането на карбапенемазния фактор и на синтеза на МБЛ с прост и надежден лабораторен метод. Както при бета-лактамазите с разширен спектър, за установяването на синтеза на МБЛ при неферментиращите Грам-отрицателни бактерии, не е създаден действителен фенотипен метод в съответствие с критериите на Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (4). Понастоящем липсата на стандартен тест за откриване наличието на МБЛ е насочило усилията на изследователите към откриване на тест с най-висока чувствителност и специфичност. Препоръчва се при откриването на МБЛ да се търсят гените, отговорни за тяхното синтезиране с молекулярни техники или да се разработят някои ензимни тестове (3). Поради това че не е практично в рутинните приложения да се използват молекулярни техники са разработени някои фенотипни методи, базирани на определяне на наличието на ензими. Най-често използвани са комбиниран дисков метод, двоен дисков синергичен тест, модифициран Hodge тест и градиентен E-тест (E-тест за МБЛ). Тези фенотипни тестове се основават на особеността на МБЛ да се инхибират от EDTA.

За първи път метало-бета-лактамазен ензим е установен в един щам на *P. aeruginosa* през 1988 г. в Япония, а по-късно и в бактериен щамове от други страни в Азия, Европа и Америка. Днес резистентността, дължаща се на МБЛ бързо се разпространява по целия свят

Ранната диагноза на изолатите, продуциращи МБЛ в клиничната микробиологична лаборатория е изключително важно както за предотвратяване на разпространението на резистентните щамове, така и от гледна точка на информиране на клиницистите относно лечението. Затова рутинното изследване за наличие на резистентност в изолирания причинител е от голямо значение. За да може това да бъде направено е необходим стандартизиран метод, който да може да бъде прилаган дори и в рутинните лабораторни, без да изисква съвременни технологии и големи разходи.

Настоящата работа има за цел да изследва в сравнителен аспект шест различни фенотипни методи, както и RT-PCR (Real-time PCR) за определяне на МБЛ в изолати от Грам-отрицателни НФГБ от различни клинични проби, изолирани между януари 2014 и декември 2014 година в медицинската микробиологична лаборатория на болницата Йълдъръм Беязът Дъшкапъ, Анкара, болница за обучение и изследване и на базата на това да се избере метод, който да е по-полезен в рутинната практика.

Това изследване е направено в сътрудничество с катедрата по медицинска микробиология в болницата на Министерство на здравеопазването на Република Турция Йълдъръм Беязът Дъшкапъ, Анкара - болница за обучение и изследване, като е взето от управлението на болницата необходимото одобрение на етичната комисия.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е проучването с фенотипни и генотипни методи на синтеза на метало-бета-лактамази в Грам-отрицателни неферментиращи глюкозата бактерии, изолирани от различни клинични проби в Турция, с оглед на избор на подходящ рутинен метод, приложим в клиничната практика.

За постигане на целта си поставихме следните задачи за изпълнение:

1. Изолиране и идентифициране на Грам-отрицателни неферментиращи бактерии от различни клинични проби.
2. Определяне на чувствителността на изолираните щамове към антибиотици и определяне на граничната стойност на MIC.
3. Установяване на синтеза на метало-бета-лактамази чрез фенотипни методи.
4. Установяване на гени за метало-бета-лактамази чрез Real-time PCR.
5. Сравнителен анализ на резултатите, получени с различните методи и избор на подходящ фенотипен метод за диагностика на синтеза на метало-бета-лактамази.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

1. Клинични проби - изследвани са 33474 проби, постъпили в болницата Дъшкапъ в Анкара в периода януари 2014 – декември 2014 г с различен произход, от които са изолирани бактериалните щамове, обект на настоящата дисертация. Щамовете са изолирани от проби (урина, рани, трахеален аспират, хрчка, кръв, конюнктива, катетър), от различни клиници, повечето от които от Интензивно отделение.

2. Микроорганизми – Първоначално са изолирани 1152 щамове на Грам-отрицателни неферментиращи бактерии, които са идентифицирани до род и вид с автоматизираната система BD Phoenix 100. След определяне на тяхната чувствителност са селектирани 53 щамове от вида *Pseudomonas aeruginosa*, един – *Pseudomonas fluorescens*, един – *Pseudomonas putida* и 33 щамове *Acinetobacter baumannii*, показали резистентност поне към един от антибиотиците цефтазидим, имипенем и меропенем. Селектирани са и два щамове *Burkholderia cerasia*, които са чувствителни към цефтазидим и меропенем.
3. Хранителни среди – използвани са 8 вида хранителни среди при определянето на морфологични и физиолого-биохимични характеристики на изолираните бактериални щамове)

Методи

За изпълнението на задачите са използвани различни методи – класически и молекулярни.

1. Методи за изолиране на чисти микробни култури.
2. Методи за култивиране на бактерии.
3. Класически методи за морфологична и физиолого-биохимична характеристика на изолираните бактериални щамове.
4. Система BD Phoenix 100 за видова идентификация на бактериалните изолати
5. Система BD Phoenix 100 и градиент Е-тест за определяне на чувствителността на бактериалните изолати към антибиотици и за определяне на MIC.
6. Диск-дифузионен метод за определяне на чувствителността на бактериалните изолати към антибиотици.
7. Методи за детекция и идентификация на метало-бета-лактамази
 - Градиентен Е-тест за метало-бета-лактамази
 - ROSCO бърз скринингов тест за карбапенемази
 - Модифициран Hodge тест
 - Комбиниран EDTA диск-дифузионен метод
 - ROSCO потвърдителен тест за метало-бета-лактамази
 - Двойно-диск синергичен тест с дипиколинова киселина
 - Real-time PCR с праймери за IMP, VIM, GIM, SPM и SIM метало-бета-лактамази
8. Статистически методи за обработка на резултатите

РЕЗУЛТАТИ

1.Изолиране и идентифициране на Грам-отрицателни неферментиращи бактерии от различни клинични проби.

През периода януари 2014 г. – декември 2014 г. в Медицинската микробиологична лаборатория към болницата Дъшкапъ в Анкара от различни клиници са били изпратени общо 33474 неповторяеми проби. От тях чрез посев върху среда Кръвен агар и ЕМВ агар са отбрани 500 щама, които формират бета-хемолитични R колонии върху среда Кръвен агар и отделят специфичен гроздов аромат. Върху ЕМВ агар образуват лактозо-отрицателни и оксидазо-положителни колонии, които са съставени от Грам-отрицателни пръчици, които не ферментират глюкоза, не обезцветяват TSI среда, могат да се размножават при 42°C, образуват пигмент и усвояват цитрат на Simmons citrat agar. Това са признаци, характерни за бактериите от род *Pseudomonas*. Чрез системата BD Phoenix 100 тяхната принадлежност към род *Pseudomonas* е доказана и са идентифицирани до вид, както следва – 95% от щамове са идентифицирани като *P. aeruginosa*, 2% - като *Pseudomonas fluorescens* и 3% - като *P. putida*.

За други 650 щама е характерно, че образуват нехемолитични, сиви, матови S колонии, които върху ЕМВ са лактозо- и оксидазо-отрицателни, проявяващи променлива реакция към цитрат и са съставени от Грам-отрицателни клетки с кокобациларна форма. Изброените признаци са характерни за представителите на род *Acinetobacter*. Чрез системата BD Phoenix 100 тяхната принадлежност към род *Acinetobacter* е доказана и са идентифицирани до вид, както следва – 95% като *A. baumannii* и 5% - към други видове.

Два изолата, при разсев върху среда ЕМВ, формират лактозо-отрицателни, оксидазо-положителни, неферментиращи колонии, съставени от Грам-отрицателни пръчици. Чрез системата BD Phoenix 100 те са идентифицирани като *B. cerasia*.

След определяне на антибиотичната чувствителност от всички 1152 щама са отбрани 55 щама от род *Pseudomonas* и 33 щама от род *Acinetobacter*, всички идентифицирани като *A. baumannii*, показали резистентност поне към един от антибиотиците IMP, MEM и CAZ. За по-нататъшни изследвания са включени и двата щама *B. cerasia*.

Анализът на получените резултати показва, че селектираните бактерии от род *Pseudomonas* се изолират най-често от рани, трахеален аспират и урина, докато тези от род *Acinetobacter* – от трахеален аспират. Двата щама *B. cepacia* са изолирани от трахеален аспират и катетър, съответно (Табл. 1).

По отношение на клиниките, от които са пристигнали клиничните проби, най-много бактерии от посочените по-горе родове са изолирани от пробите от Отделение за интензивно лечение, следвани от Пластична хирургия за род *Pseudomonas* (Табл. 2). В отделенията за интензивни грижи обикновено постъпват пациенти с тежки заболявания, които изискват продължително лечение. В много случаи тези болни са с потисната имунна система, нуждаят се от поставяне на различни видове катетри, от механична вентилация и други. Тези манипулации увеличават риска от инфекции и разпространение на тези опортюнистични микроорганизми, с което би могло да се обясни високият брой на изолатите именно от това отделение.

Табл.1. Разпределение на изолатите по родове в зависимост от произхода на клиничните проби

Проба	p. <i>Pseudomonas</i>	p. <i>Acinetobacter</i>	p. <i>Burkholderia</i>	Общо
Урина	10	5	-	15
Рани	19	3	-	22
Тр. аспират	16	17	1	34
Храчка	3	1	-	4
Кръв	1	5	-	6
Конюнктива	1	-	-	1
Катетър	-	1	1	2
Неизвестна*	5	1		6
Общо	55	33	2	90

* По време на регистрацията номерът на пробата върху петриевата паничка е бил изтрил, поради което ние означихме тези проби и отделения като неизвестни.

Табл.2. Разпределение на изолатите по родове в зависимост от мястото на изолиране

Клиника	<i>p. Pseudomonas</i>	<i>p. Acinetobacter</i>	<i>p. Burkholderia</i>	Общо
Отделение за интензивно лечение	22	26	2	50
УНГ	3	-	-	3
Пластична хирургия	7	-	-	7
Инфекциозни болести	3	1	-	4
Ортопедия	2	1	-	3
Обща хирургия	2	-	-	2
Гръдни болести	1	2	-	3
Сърдечно-съдова хирургия	2	-	-	2
Физикална медицина и рехабилитация	2	2	-	4
Очни болести				
Вътрешни болести				
Урология				
Поликлиника	6	-	-	6
Неизвестна*	5	1	-	6
Общо	55	33	2	90

* По време на регистрацията номерът на пробата върху петриевата паничка е бил изтрит, поради което ние означихме тези проби и отделения като неизвестни.

2. Определяне на чувствителността на изолираните щамове към антибиотици и на граничната стойност на MIC.

Чувствителността на всички 1152 изолата (500 щамове от род *Pseudomonas* и 650 от род *Acinetobacter*, както и 2 щамове *B. cepacia*) към 15 антибиотика от различни групи е определена с автоматизирана система и дисково-дифузионния метод (Табл. 3). В резултат на изследването са отбрани резистентни щамове поне към един от антибиотиците цефтазидим, имипенем и меропенем – 53 щамове, идентифицирани като *P. aeruginosa*, 1 – като *P. fluorescens*, 1 – като *P. putida*, 33 щамове, идентифицирани като *A. baumannii*, резултатите, за които са представени в Табл. 4. Двата щамове *B. cepacia* показват чувствителност към CAZ и MEM.

На Фиг. 1 е представен процентът само на резистентните щамове.

Табл.3. Чувствителност на щамовете към антибиотици според CLSI 2014 M100 S24

№ щам	Род	Антибиотици*														
		AK	AZT	FEP	CAZ	CRO	CXM	CIP	CT	ETP	GN	IMP	MEM	NET	TPZ	SXT
1	<i>Pseudomonas</i>	S	R	I	S			R	S		S	R	R		S	
2	<i>Pseudomonas</i>	S	I	S	I			R	S		S	S	S	S	S	
3	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	R			R	S		R	R	R		R	
4	<i>Pseudomonas</i>	S	I	R	I			R	S		R	R	R		R	
5	<i>Pseudomonas</i>	S	R	I	R			S	S		S	S	S		I	
6	<i>Pseudomonas</i>	R	R	R	R			R	S		R	R	R	R	R	

№ щам	Род	Антибиотици*														
		AK	AZT	FEP	CAZ	CRO	CXM	CIP	CT	ETP	GN	IMP	MEM	NET	TPZ	SXT
7	<i>Pseudomonas</i>	R	R	R	R			R	S		R	R	R		R	
8	<i>Pseudomonas</i>	I	R	R	R			R	S		R	R	R		I	
9	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	R			R	S		R	R	R	R	R	
10	<i>Pseudomonas</i>	S	I	S	S			S	S		S	I	S	S	S	
11	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	S		S	
12	<i>Pseudomonas</i>	I	R	S	I			I	S		R	R	R		S	
13	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	R			S	S		S	S	S		R	
14	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R
15	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	I			S	S		S	R	S	S	S	
16	<i>Pseudomonas</i>	S	I	I	S			R	S		R	R	R		S	
17	<i>Pseudomonas</i>	R	R	R	S			R	S		R	R	R		R	
18	<i>Pseudomonas</i>	S	R	I	R			R	S		R	I	R		I	
19	<i>Pseudomonas</i>	R	R	S	S			R	S		S	R	S		S	
20	<i>Pseudomonas</i>	S	I	S	R			R	S		R	R	S		S	
21	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	I	S	S	S	
22	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
23	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	S		S	
24	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	S	S	S	
25	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
26	<i>Pseudomonas</i>	R	I	R	R			R	S		R	R	R	R	R	
27	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	R		S	
28	<i>Pseudomonas</i>	S	I	R	S			R	S		R	R	R		R	
29	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	S		S	
30	<i>Pseudomonas</i>	S	R	I	R			R	S		S	S	S		S	
31	<i>Pseudomonas</i>	R	R	I	R			S	S		S	R	R	R	R	
32	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	R			R	S		R	R	R	R	R	
33	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	R			R	S		R	R	R		R	
34	<i>Pseudomonas</i>	R	I	R	R			R	S		R	R	R	R	R	
35	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	R			R	S		S	R	R		I	
36	<i>Pseudomonas</i>	R	R	R	R			R	S		R	R	R		R	
37	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	R		S	
38	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	R	S	S	
39	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	R		S	
40	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
41	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
42	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	S		S	
43	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
44	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
45	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R
46	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
47	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	I	S		S	
48	<i>Pseudomonas</i>	R	R	R	R			R	S		R	R	R	R	R	
49	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	S			R	S		R	R	R		R	
50	<i>Pseudomonas</i>	S	R	I	I			R	S		S	R	R		I	
51	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
52	<i>Pseudomonas</i>	S	R	I	S			R	S		S	R	R		I	
53	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	R			I	S		R	R	R	R	R	
54	<i>Pseudomonas</i>	S	R	I	S			R	S		S	R	R		S	
55	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
56	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
57	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
58	<i>Pseudomonas</i>	S		S	R				S		S	S	S	S	S	
59	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S				S		S	R	S	S	S	
60	<i>Pseudomonas</i>	S	R	I	R			R	S		R	S	S		S	
61	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	S			R	S		R	R	R		R	
62	<i>Pseudomonas</i>	R	R	R	R			R	S		R	R	R	R	R	
63	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
64	<i>Pseudomonas</i>	R	I	R	R			R	S		R	R	R	R	R	
65	<i>Pseudomonas</i>	R		I	R			R	S		R	R	R	R	I	
66	<i>Pseudomonas</i>	S	R	R	R			R	S		R	R	R	R	R	
67	<i>Pseudomonas</i>	S	S	S	S			S	S		S	R	S	S	S	

№ шам	Род	Антибиотици*														
		AK	AZT	FEP	CAZ	CRO	CXM	CIP	CT	ETP	GN	IMP	MEM	NET	TPZ	SXT
68	<i>Pseudomonas</i>	S	R	S	S			S	S		S	S	I	S	S	
69	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
70	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R
71	<i>Pseudomonas</i>	S	R	I	I			S	S		S	S	R		I	
72	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
73	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
74	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
75	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
76	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R
77	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
78	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R
79	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
80	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
81	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
82	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
83	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
84	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
85	<i>Burkholderia</i>			R	S			S					S			S
86	<i>Burkholderia</i>			R	S			S					S			S
87	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
88	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
89	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
90	<i>Acinetobacter</i>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R

S- чувствителни; I-междина чувствителност; R-резистентни
 АК-Амикацин; AZT-азтреонам; FEP-цефепим; CAZ-цефтазидим; CRO-цефтриаксон; CXM –
 цефуросим; CIP-ципрофлоксацин; CT – колистин; ETP-етрапенем; GN-гентамицин; IMP-имипенем;
 MEM-меропенем; NET-нетилмицин; TPZ-тазобактам/пиперацилин; SXT-триметорпим/сулфаметоксазол

Табл.4. Брой на резистентните шамове към изследваните антибиотици.

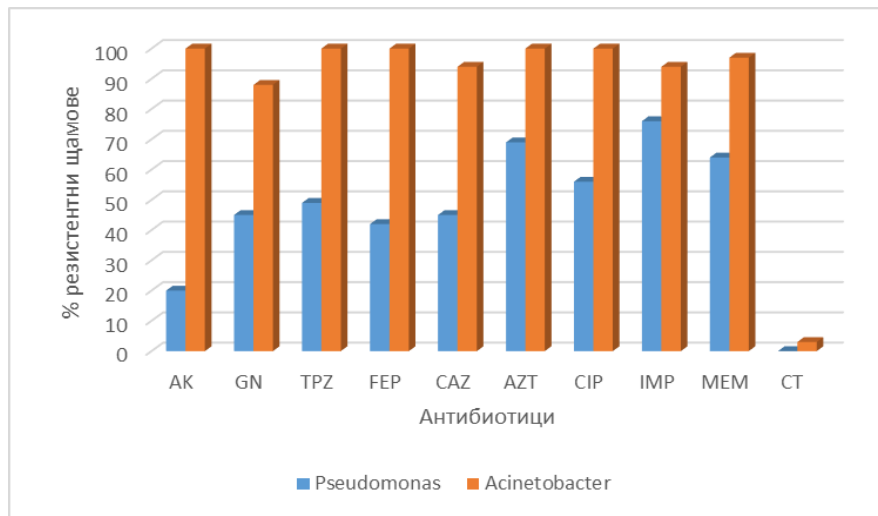
Род бактерии	Антибиотик / брой											
	AK	GN	TPZ	FEP	CAZ	AZT	CIP	IMP	MEM	CT	SXT	
<i>Pseudomonas</i>	11	25	27	23	25	38	31	42	35	0	-	
<i>Acinetobacter</i>	33	29	33	33	31	33	33	31	32	1	29	

«-» - не е оценена

AK-Амикацин; GN-гентамицин; TPZ-тазобактам/пиперацилин; FEP-цефепим; CAZ-цефтазидим; AZT-азтреонам; CIP-ципрофлоксацин; IMP-имипенем; MEM-меропенем; CT – колистин; SXT-триметорпим/сулфаметоксазол

От Табл. 4 и Фиг. 1 се вижда, че голяма част от шамовете проявяват резистентност към антибиотиците. Процентът на резистентните шамове от р. *Pseudomonas* се движи между 20 и 76 при 9 от антибиотиците, като е най-висок към IMP, AZT и MEM. Шамовете на *A. baumannii* проявяват 100% резистентност към 5 антибиотика – АК, TPZ, FEP, AZT. Малко по-нисък процент шамове на този вид са резистентни към MEM, IMP и CAZ. Като цяло *A. baumannii* е по-резистентен към изследваните антибиотици, в сравнение с *Pseudomonas* spp. Отбраните шамове се характеризират с

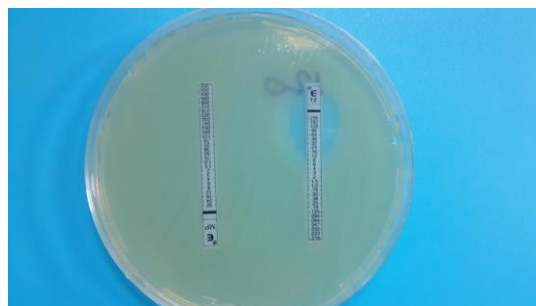
мултирезистентност, тъй като те проявяват резистентност към антибиотици от различни групи.



Фиг.1. Процентно разпределение на резистентните щамове към изследваните антибиотици

AK-Амикацин; GN-гентамицин; TPZ-тазобактам/пиперацилин; FEP-цефепим; CAZ-цефтазидим; AZT-азтреонам; CIP-ципрофлоксацин; IMP-имипенем; MEM-меропенем; CT – колистин.

Чувствителността на всички щамове към антибиотиците IMP, MEM и CAZ е повторно определена чрез системата BD Phoenix (за MIC) и по дисково-дифузионния метод на Kirby-Bauer според критериите на CLSI 2015. Резистентността на щамовете и MIC стойностите на IMP, MEM и CAZ е потвърдена и чрез градиентен E-тест (Фиг. 2). Тестовете за антимикробната чувствителност са направени според стандарт EUCAST 2015 за *Pseudomonas* spp. Граничните стойности за чувствителност за *Pseudomonas* spp. и резултатите от проведения анализ са показани в Табл. 5 и 6.



Фиг.2. Положителен E-тест за чувствителност към цефтазидим (вдясно) и отрицателен E-тест за чувствителност към меропенем (вляво)

Табл. 5. Гранични стойности за чувствителност и MIC за изследваните антибиотици за *Pseudomonas* spp. съгласно EUCAST 2015

Антибиотици	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Инхибиторна зона (mm)	
	S	R	S	R
CAZ	≤ 8	> 8	$16 \leq$	< 16
MEM	≤ 2	> 8	$24 \leq$	< 18
IMP	≤ 4	> 8	$20 \leq$	< 17

S – чувствителни; R - резистентни

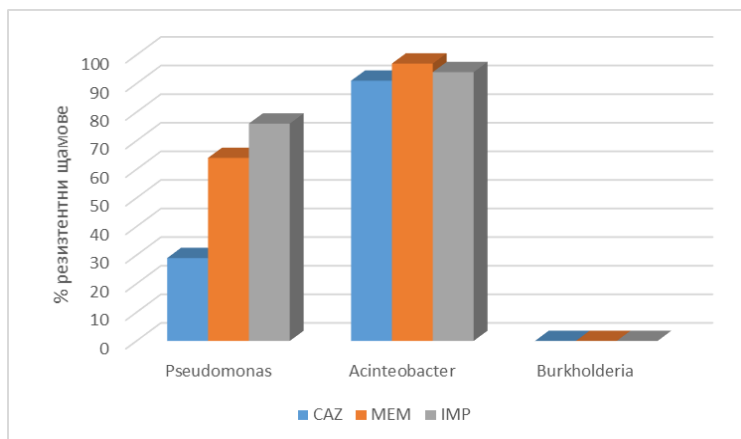
От направения анализ се вижда, че по отношение на MIC изолираните щамове от род *Pseudomonas* се различават както помежду си, така и по отношение на различните антибиотици. Най-висока чувствителност се наблюдава към антибиотика CAZ, към който 55% от щамове са чувствителни. Най-ниска е чувствителността към MEM – 18% от щамове се отнасят към групата на чувствителните. Висок процент на резистентност се наблюдава и при трите антибиотика по отношение на MIC – 58% за антибиотиците MEM и IMP и 45% за CAZ (Табл. 6). По подобен начин щамове се групират и по чувствителност към изследваните антибиотици в използваните концентрации (Фиг. 3 и Фиг. 4). Очевидно, при висок процент от щамове функционират механизми за резистентност към тези антибиотици.

Табл.6. Резултати за разпределение на щамове от род *Pseudomonas* в зависимост от чувствителността им към изследваните антибиотици

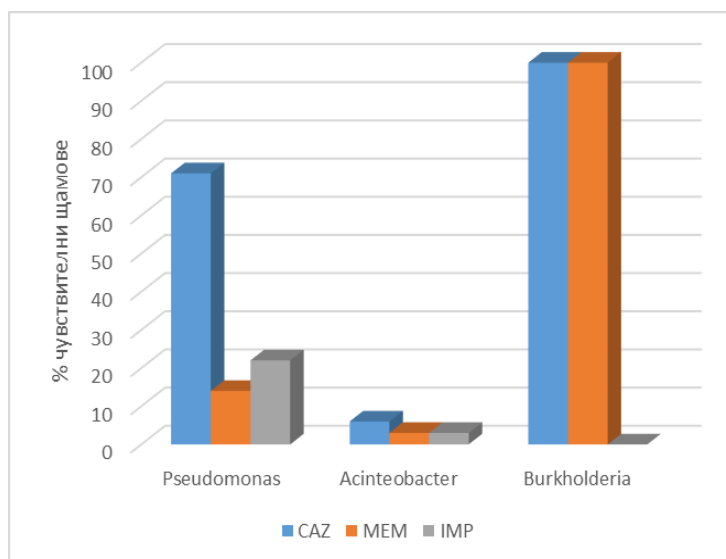
Антибиотици	Брой щамове (резултати за MIC)			Брой щамове според чувствителността (дисково-дифузионен метод)			Общ брой на щамове
	S	I	R	S	I	R	
CAZ	30	30	25	39	-	16	55
MEM	10	10	32	8	12	35	55
IMP	16	16	32	12	1	42	55

S – чувствителни; I – междинна чувствителност; R – резистентни

Граничните стойности за чувствителност и MIC за *A. baumannii* и резултатите от определяне на чувствителността са показани в Табл. 7 и 8. Цефтазидим е оценен според граничните стойности на CLSI 2015, а имипенем и меропенем са оценени според граничните стойности на EUCAST 2015 .



Фиг.3.Процент на резистентните щамове на *Pseudomonas* spp., *A. baumannii* и *B. ceratia* към CAZ, IMP и MEM



Фиг.4. Процент на чувствителните щамове на *Pseudomonas* spp., *A. baumannii* и *B. ceratia* към CAZ, IMP и MEM

Табл.7. Гранични стойности за чувствителност и MIC за *A. baumannii*, съгласно CLSI 2015 (за цефтазидим) и EUCAST 2015 (за имипенем и меропенем)

Антибиотици	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Инхибиторна зона (mm)	
	S	R	S	R
CAZ	≤ 8	≥ 32	$18 \leq$	≥ 14
MEM	≤ 2	> 8	$21 \leq$	< 15
IMP	≤ 2	> 8	$23 \leq$	< 17

S – чувствителни; I – междинна чувствителност; R – резистентни

Табл.8. Резултати за разпределение на щамове *A. baumannii* в зависимост от чувствителността им към изследваните антибиотици

Антибиотици	Брой щамове (резултати за MIC)			Брой щамове според чувствителността (дисково-дифузионен метод)			Общ брой на щамове
	S	I	R	S	I	R	
CAZ	1	1	31	2	1	30	33
MEM	1	-	32	1	-	32	33
IMP	1	1	31	1	1	31	33

S – чувствителни; I – междинна чувствителност; R – резистентни

Наблюдава се висок процент на резистентност и към трите антибиотика, както по отношение на MIC, така и по отношение на резултатите, получени с дисково-дифузионния метод (Табл. 8 и Фиг. 3 и 4). И с този метод се потвърждава високият процент на резистентност на тези щамове към трите антибиотика.

Вижда, се, че двата щам на *B. cereus* се категоризират като чувствителни спрямо MIC и действието на изследваните два антибиотика (Табл. 9 и 10 и Фиг. 3 и 4).

Табл.9. Гранични стойности за чувствителност и MIC за изследваните антибиотици за *B. cereacia* съгласно CLSI 2015

Антибиотици	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Инхибиторна зона (mm)	
	S	R	S	R
CAZ	≤ 8	≥ 32	$21 \leq$	≥ 17
MEM	≤ 4	> 16	$20 \leq$	< 15
IMP	-	-	-	-

S – чувствителни; I – междинна чувствителност; R – резистентни

Фиг. 10. Резултати за разпределение на щамове на *B. cereacia* в зависимост от чувствителността им към изследваните антибиотици

Антибиотици	Брой щамове (резултати за MIC)			Брой щамове според чувствителността (дисково-дифузионен метод)			Общ брой на щамове
	S	I	R	S	I	R	
CAZ	2	-	-	2	-	-	2
MEM	2	-	-	2	-	-	2

S – чувствителни; I – междинна чувствителност; R – резистентни

3. Установяване на синтеза на метало-бета-лактамази чрез фенотипни методи.

3.1. Градиентен тест за метало-бета-лактамази

При този метод са използвани E-тест ленти, които в единия край съдържат 4 - 256 $\mu\text{g/ml}$ IMP, а в другия край – 1- 64 μg $\mu\text{g/ml}$ IMP + EDTA и дават възможност да се определи MIC на антибиотика към съответния микроорганизъм. В резултат на сравняването на стойностите на MIC и при наличие на 8кратно намаляване на тази стойност (или наличието на зона фантом – допълнителна зона на инхибиране между IMP и IMP-EDTA) резултатът е оценяван като положителен (Фиг. 5).

От Фиг. 5 се вижда, че докато стойността на MIC за IMP е 48 $\mu\text{g/ml}$, то за IMP+EDTA тя е 1.5 $\mu\text{g/ml}$.

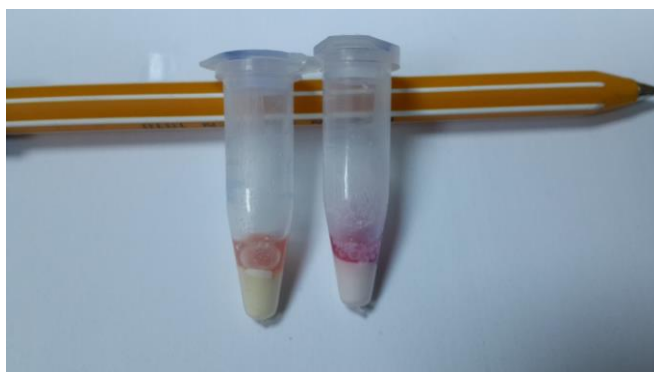


Фиг.5. Положителен резултат за метало-бета-лактамаза на избран щам при използването на градиентен Е-тест с IMP

Резултатите показват, че положителни по отношение синтезата на МБЛ са 14 изолата, т.е. 25% от щамовете, принадлежащи към род *Pseudomonas*. Сред представителите на *A. baumannii* положителен резултат се установява за 13 щама (39% от всички). Двата щама на *B. cerasia* са отрицателни по отношение на синтезата на МБЛ с този тест.

3.2. ROSCO бърз скринингов тест за карбапенази

Чрез този тест микроорганизмите се скринират за чувствителност към карбапеними. Вследствие на хидролизата на бета-лактамния пръстен се променя цветът на индикатора, прибавен към антибиотика, в сравнение с отрицателната контрола и се съди за синтезата на карбапенемаи. Промяната в цвета на епруветката с антибиотика и индикатора от червен в жълт се оценява като положителен резултат (Фиг. 6).



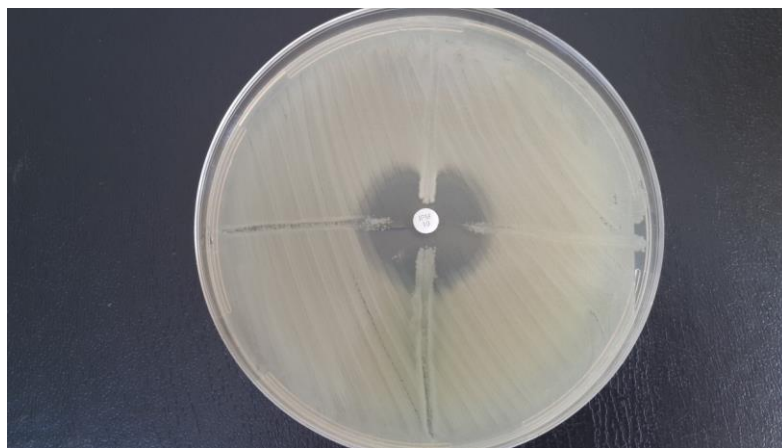
Фиг. 6. Положителен (в ляво) и отрицателен (в дясно) резултат за синтезата на карбапенази при избрани щамове при ROSCO бърз скринингов тест

В резултат на анализирането на щамове с този метод се установи, че положителни по отношение на синтеза на МБЛ са 12 щамове от род *Pseudomonas* (приблизително 22%). Въпреки, че този тест е разработен за *P. aeruginosa*, в нашето изследване ние го приложихме за *A. baumannii* и *B. ceracia*. Установихме, че положителни са само 7 щамове *A. baumannii* (21%), а при *B. ceracia* не са установени положителни щамове

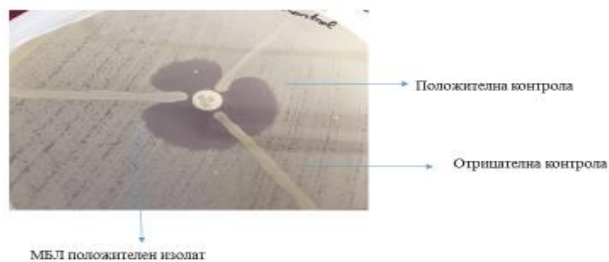
При сравняването на резултати от този тест с градиентния Е-тест, се вижда, че резултатите за щамове от род *Pseudomonas* са много близки помежду си, докато за *A. baumannii* те се различават съществено. Потвърждава се липсата на синтеза на МБЛ при *B. ceracia*.

3.3. Модифициран Hodge тест

Прилагането на този тест (Фиг. 7 и 8) към изследваните изолати даде следните резултати: само 5 щамове (9%) от род *Pseudomonas* и 7 щамове *A. baumannii* показаха положителен резултат. И с този метод се потвърди липсата на синтеза на МБЛ при двата щамове на *B. ceracia*. Модифицираният Hodge тест и ROSCO бърз скринингов тест за карбапенемази дават еднакви резултати както за *A. baumannii*, така и за *B. ceracia*.



Фиг.7. Положителен резултат за МБЛ на избран щам, установен с модифициран Hodge тест.



Фиг. 8. Положителен резултат за МБЛ на избран щам, установен с модифициран Hodge тест

В изследването с този тест са използвани задължително положителни и отрицателни щамове по отношение на продукцията на карбапенемази.

3.4. Комбиниран EDTA дисково-дифузионен тест

Методът се основава на способността на EDTA да свързва металните йони (в случая Zn^{2+}), които се намират в активния център на МБЛ и по-този начин, когато хелаторът е в комбинация с антибиотика се наблюдава увеличаване на инхибиторната зона в сравнение с тази, формирана само от антибиотика (Фиг. 9). Значим е резултатът, при който разликата в диаметъра на зоните е 7 mm. В това изследване са оценявани и резултатите, при които разликата е ≥ 6 mm.

Въз основа на казаното по-горе ние установяваме, че 27 (49%) от изолтаите от род *Pseudomonas* са МБЛ положителни ако граничната стойност за диаметъра на зоните е ≥ 6 mm и 18 щамове (33%) ако тази стойност е ≥ 7 mm. При прилагането на същите критерии за оценка на резултатите за *A. baumannii* положителни са съответно 28 (85%) и 22 (67%) щамове от всички изследвани. Двата щамове на *B. ceracia* отново са отрицателни по отношение на синтезата на МБЛ.



Фиг.9.Положителен резултат за МБЛ при комбиниран EDTA дисково дифузионен тест при избран щам

3.5. ROSCO потвърдителен тест за метало-бета-лактамази

Методът се основава на същия принцип като предходния, при който се използват инхибитори на МБЛ. Поради това, че при различните видове се наблюдава променлива резистентност към карбапенеми, наличието на двата карбапенема и комбинацията с дипиколинова киселина позволява идентифицирането на различни видове МБЛ. Напр. IMP+DPA идентифицират МБЛ в *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp., докато MEM+DPA идентифицират МБЛ в представители на сем. *Enterobacteriaceae*. Наличието на разлика в зоните, формирани от антибиотика и комбинацията му с инхибитор EDTA на МБЛ ≥ 7 mm е приет за положителен резултат, а при комбинация с DPA - ≥ 5 mm. Използвани са антибиотиците IMP, MEM и CAZ и комбинации с инхибитори на МБЛ – EDTA и DPA (Фиг. 10).

Използвани са три антибиотика – IMP, MEM и CAZ и комбинацията им с EDTA, както и комбинацията IMP+DPA. Резултатите са оценени при две гранични стойности на разликата в диаметъра на инхибиторните зони между антибиотика и комбинацията му с инхибитор. За IMP+EDTA при разлика ≥ 6 mm 35 изолата (64%) от род *Pseudomonas* са показали положителен резултат за синтезата на МБЛ, а при разлика ≥ 7 mm - 31 щам (56%). За MEM+EDTA и CAZ+EDTA положителните щамове са 30 (54%) и 27 (49%) и 19 (34%) и 15 (27%), съответно. При ROSCO IMP и IMP+DPA и при разлика ≥ 5 само 5 щам (9%) са показали положителен резултат.

За *A. baumannii* резултатите са оценявани по същия начин и се разпределят както следва: при сравняването на IMP и IMP+EDTA, 100% от щамове са положителни и при двете гранични стойности на разликата в диаметрите на зоните; при MEM и CAZ те са 28 (85%) и 24 (73%) и 24 (73%) и 17 (52%) щам, съответно. При ROSCO IMP и

IMP+DPA, само един щам *A. baumannii* показва положителен резултат за синтезата на МБЛ.



Фиг.10. Резултати от ROSCO потвърдителен тест на избран щам (IMP+EDTA и IMP+DPA положителни резултати, MEM+DPA синергичен тест отрицателен)

И с този анализ нито един от щамове на *B. ceracia* не показва способност да синтезира МБЛ.

3.6. Двойно-дискос синергичен тест с дипиколинова киселина

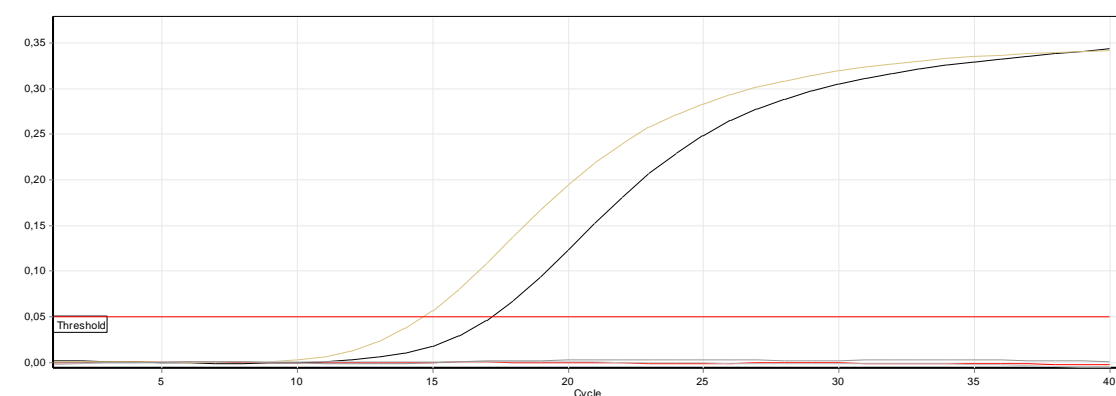
При прилагането на IMP+DPA и MEM+DPA синергичен тест (Фиг. 11) при щамове на *Pseudomonas* spp. се установи, че положителните за МБЛ щамове са съответно 20 (36%) и 30 (54%), при *A. baumannii* – по два щам за всеки антибиотик, докато и двата щам на *B. ceracia* са отрицателни.



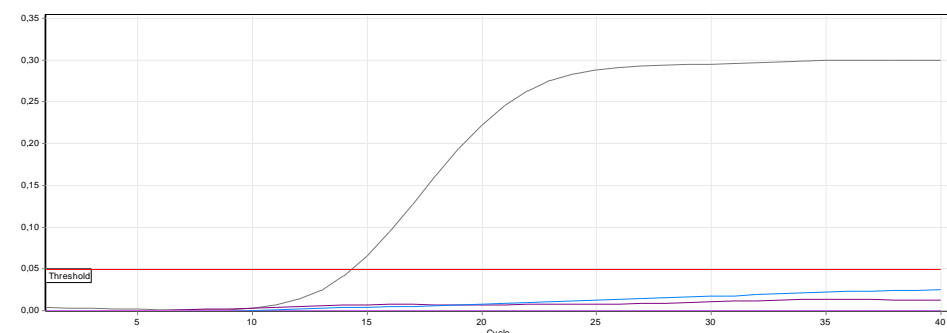
Фиг.11. Положителен резултат за синтеза на МБЛ от избран щам при двойно-дискос синергичен тест с дипиколинова киселина

4. Установяване на синтезата на метало-бета-лактамази чрез Real-time PCR.

Real-time PCR е избраният от нас молекулярно-генетичен метод за детекция и идентификация на продукцията на МБЛ. За тази цел са избрани 5 двойки праймери, които амплифицират гени за 5 групи МБЛ – IMP, VIM, GIM, SPM и SIM. С първите две двойки праймери са анализирани 99 щамове (всички наши селектирани щамове и 9 контролни щамове), с праймерите за GIM и SIM МБЛ – 78 наши щамове и с праймерите за SPM метало-бета-лактамази всички 90 селектирани от нас щамове и 8 контролни. Анализът показва, че само в три щамове се идентифицират гени за МБЛ (Фиг. 14 и 15) Два от щамове (щамове 27 и 64) съдържат гени за IMP МБЛ, а един щам (щам 36) – ген за VIM МБЛ. На Фиг. 12 и 13 са показани амплификационните криви за тези гени. Трябва да отбележим, че щамове, в които е доказано наличието на гени за МБЛ са изолирани в Интензивно отделение от трахеален аспират. Щамове, притежаващи ген за IMP МБЛ са идентифицирани като *P. aeruginosa*, а този с ген за VIM МБЛ – като *P. fluorescens*.



Фиг.12. Амплификационна крива на IMP положителните щамове *P. aeruginosa* 27 и 64



Фиг.13. Амплификационна крива на VIM положителния щам *P. fluorescens* 36

5. Сравнителен анализ на резултатите, получени с различните методи и избор на подходящ фенотипен метод за диагностика на продукцията на метало-бета-лактамази

5.1. Сравнение на фенотипните методи за детекция на МБЛ между изследваните видове Грам-отрицателни неферментиращи бактерии

На Табл. 11 са представени обобщените данни за положителните щамове по отношение на синтезата на МБЛ с всички приложени от нас методи.

Табл.11.Разпределение на положителните за синтезата на МБЛ щамове по родове в зависимост от приложени метод

Метод	<i>Pseudomonas</i> N=55		<i>Acinetobacter</i> N=33	P
	n (%)	генотип		
Градиентен тест	14 (26)	2 IMP, 1 VIM	13 (39)	0.1698
ROSCO бърз скринингов тест	12 (22)	2 IMP, 1 VIM	7 (21)	0.9466
Модифициран Hodge тест	5 (9)	2 IMP, 1 VIM	7 (21)	0.1086
Комбиниран EDTA ДДТ, 6 mm	27 (49)	2 IMP, 1 VIM	28 (85)	<0.0001
Комбиниран EDTA ДДТ, 7 mm	18 (33)	2 IMP, 1 VIM	22 (67)	<0.0001
ROSCO потвърдителен тест (IMP+EDTA), 6 mm	35 (64)	2 IMP, 1 VIM	33 (100)	<0.0001
ROSCO потвърдителен тест (IMP+EDTA), 7 mm	31 (56)	2 IMP, 1 VIM	33 (100)	<0.0001
ROSCO потвърдителен тест (MEM+EDTA), 6 mm	30 (54)	2 IMP, 1 VIM	28 (85)	<0.001
ROSCO потвърдителен тест (MEM+EDTA), 7 mm	27 (49)	2 IMP, 1 VIM	24 (73)	0.0296
ROSCO потвърдителен тест (CAZ+EDTA), 6 mm	19 (34)	2 IMP, 1 VIM	24 (73)	<0.0001
ROSCO потвърдителен тест (CAZ+EDTA), 7 mm	15 (27)	2 IMP, 1 VIM	17 (52)	0.0220
ROSCO потвърдителен тест (IMP+DPA), 5 mm	5 (9)	2 IMP	1 (3)	0.3586
Двойно-диск синергичен тест (IMP+DPA)	20 (36)	2 IMP	2 (6)	<0.0001
Двойно-диск синергичен тест (MEM+DPA)	30 (54)	2 IMP	2 (6)	<0.0001
RT PCR	3 (5)	2 IMP, 1 VIM	0 (0)	0.1900

При сравняване на резултатите от комбиниран EDTA ДДТ, ROSCO потвърдителен тест (IMP+EDTA), ROSCO потвърдителен тест (MEM+EDTA), ROSCO потвърдителен тест (CAZ+EDTA), ROSCO бърз скринингов тест, градиентен E-тест и RT PCR по отношение на честотата на положителните за МБЛ щамове между видовете *A. baumannii* и *Pseudomonas* spp. не е намерена статистически съществена разлика (Табл. 11). Този резултат показва, че изброените по-горе фенотипни методи, чрез които е определена честотата на щамовете, синтезиращи МБЛ не показват значими разлики между двата вида, т.е. тези методи дават подобни резултати и при двата вида. При останалите методи (двойно-дискосинергичен тест (IMP+DPA), двойно-дискосинергичен тест (MEM+DPA), се наблюдават съществени разлики между *A. baumannii* и *Pseudomonas* spp. (Табл. 11). Комбинацията на двойно-дискосинергичен тест IMP+DPA и двойно-дискосинергичен тест MEM+DPA с ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA се установяват по-висок брой МБЛ положителни щамове сред *Pseudomonas* spp., докато с модифицирания Hodge тест, броят на положителните щамове е по-висок при *A. baumannii*.

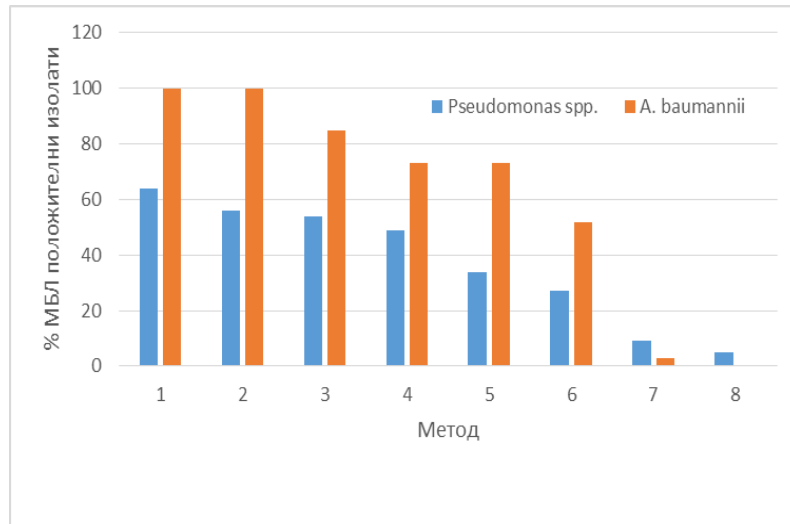
При вида *B. ceracia* не са установени положителни щамове, и поради непредставителния брой на щамовете те не са сравнявани статистически.

5.2. Сравнение на фенотипните методи за детекция на МБЛ с Real-time PCR и избор на подходящ фенотипен метод

Статистическият анализ на резултатите показва, че разликите в броя на положителните за МБЛ щамове при *Pseudomonas* spp., детектирани с фенотипните методи и с RT PCR са значителни при всички изследвани методи, с изключение на ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA и модифициран Hodge тест ($P=0.4774$), където разликите са несъществени. Прави впечатление, че процентът на установените положителни за МБЛ щамове с фенотипните методи е значително по-висок от този, установен с RT PCR. Фалшивата положителност е най-висока при ROSCO потвърдителен тест IMP+EDTA и MEM+EDTA и комбиниран EDTA ДДТ (Табл. 11 и Фиг. 14 и 15).

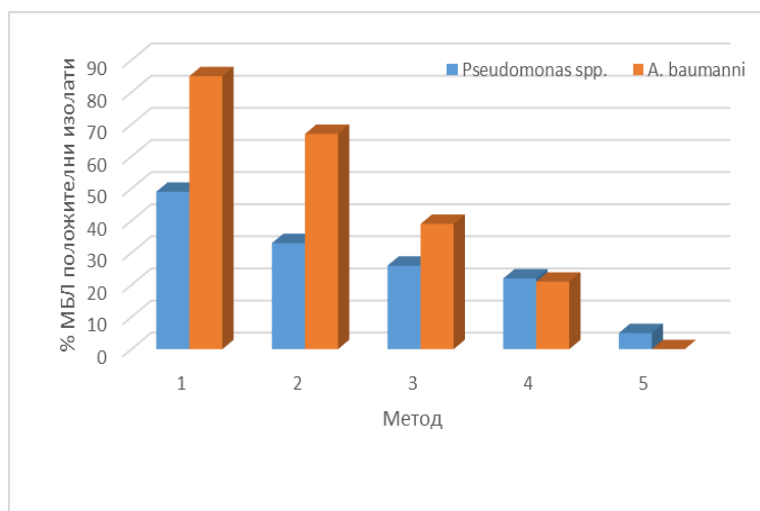
При *A. baumannii* разликите между броя на положителните за МБЛ щамове, установени с ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA (Фиг. 14), двойно-дискосинергичен тест IMP+DPA, двойно-дискосинергичен тест MEM+DPA (Фиг. 16) и този установен с RT PCR са несъществени ($P=0.5618$, $P=0.1600$ и $P=0.1600$, съответно).

Разликите между останалите методи и RT PCR са значими, като най-висок брой положителни за МБЛ щамове се идентифицират с ROSCO потвърдителен тест IMP+EDTA и MEM+EDTA и комбиниран EDTA ДДТ (Табл. 11).



Фиг. 14. Сравнение на резултатите, получени с ROSCO потвърдителен тест и с RT PCR

1 – ROSCO IMP+EDTA (6 mm); 2- ROSCO IMP+EDTA (7 mm); 3 – ROSCO MEM+EDTA (6 mm); 4- ROSCO MEM+EDTA (7 mm); 5 – ROSCO CAZ+EDTA (6 mm); 6 – ROSCO CAZ+EDTA (7 mm); 7 – ROSCO IMP+DPA; 8 – RT PCR

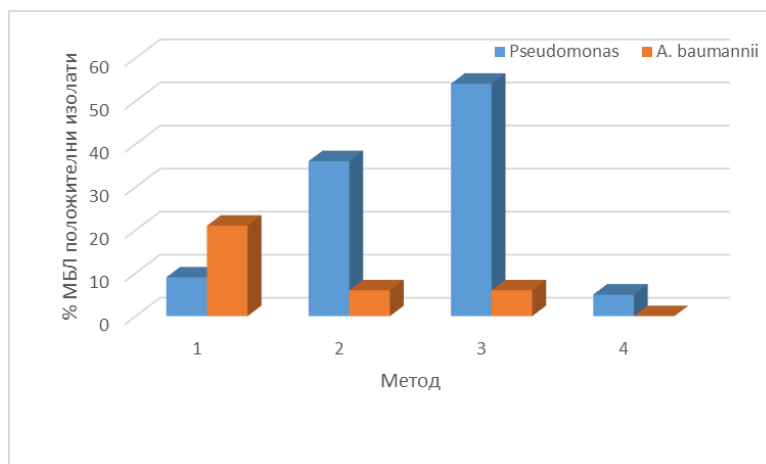


Фиг.15.Сравняване на резултатите от фенотипни тестове с тези от RT PCR

1 – Комбиниран EDTA ДДТ (6 mm); 2 - Комбиниран EDTA ДДТ (7 mm); 3 – Градиентен E-тест; 4 – ROSCO бърз скринингов тест; 5 – RT PCR

Трябва да отбележим, че трите щам, в които са идентифицирани гени за IMP и VIM МБЛ са разпознавани с почти всички фенотипни методи. Изключение правят

ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA и двойно-дисковият синергичен тест IMP+DPA и MEM+DPA, чрез които се детектират само IMP, но не VIM МБЛ.



Фиг. 16. Сравняване на резултатите от фенотипните методи с тези от RT PCR

1 – Модифициран Hodge тест; 2 – Двойно-дискос синергичен тест IMP+DPA;
3 – Двойно-дискос синергичен тест MEM+DPA; 4 – RT PCR

При цялостна оценка на резултатите се вижда, че фенотипният ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA дава най-близки резултати до тези, получени чрез RT PCR както при *Pseudomonas* spp., така и при *A. baumannii*. С този тест обаче, не се разпознават VIM МБЛ. По отношение само на *Pseudomonas* spp. фенотипният метод, който дава съпоставими резултати за детектиране на МБЛ с тези от RT PCR е модифицираният Hodge тест. За *A. baumannii*, въпреки че не е установен ген за МБЛ, най-съвместими с RT PCR са ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA, двойно-дискосият синергичен тест IMP+DPA и MEM+DPA, тъй като броят на положителните щамове е много нисък и най-близък като стойност до резултата, получен с молекулярния метод. За детектиране на МБЛ едновременно в *Pseudomonas* spp. и *A. baumannii* е препоръчително да се използва ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA.

Въпреки, отсъствието на положителни за МБЛ щамове сред представителите на *B. ceracia*, вероятно поради малкия брой изолати, ние считаме, че ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA би бил подходящ за детекция на тези ензими и при този вид.

ОБСЪЖДАНЕ

Факт е, че навсякъде по света има сериозни проблеми при употребата на антибиотици. Несъмнено, в тези проблеми резистентността развиваща се към антибиотиците заема важно място. Тя създава трудности при лечението на инфекциите, предизвикани от патогенни микроорганизми, но е причина и за икономически загуби. Във връзка с това голямо значение имат бактериите, продуциращи бета-лактамази, които показват резистентност към антибиотици от различни групи и главно към широкоспектърни бета-лактамни антибиотици (46, 82, 83). В сериозните инфекции, причинени от мултирезистентни Грам-отрицателни бактерии, резистентността към карбапенеми има специално значение, тъй като тези антибиотици са обикновено последна алтернатива (84).

Все повече се увеличава значението на МБЛ, причиняващи резистентност към карбапенеми в Грам-отрицателни бактерии. Това че МБЛ водят до резистентност към цефалоспорини, цефамицини и карбапенеми и поради вероятността от разпространение на гените за тях в различни видове Грам-отрицателни бактерии в резултат на предаване чрез интегрони, шамовете продуциращи МБЛ представляват клинична заплаха (85). Ето защо изследването на бактериите за продуциране на бета-лактамази, особено изследването на наличие на МБЛ, и проследяване на състоянието на антибиотичната резистентност и уведомяването на клиницистите ще позволи ранното и ефективно лечение с антибиотици на инфекциите, предизвикани от тези микроорганизми.

През последните години при инфекциите, предизвикани от Грам-отрицателните неферментиращи бактерии (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *B. cepacia*), особено в интензивните отделения, се наблюдава тенденция към нарастване. Тези бактерии могат да притежават мултилекарствена резистентност, което води до възникване на сериозен проблем при лечението (86). Както бе подчертано по-горе, резистентността към карбапенеми има особено значение. Процентът на резистентните щамове и евентуалните ензими, които могат да бъдат отговорни за резистентността са различни и се променят във всяка страна, но се забелязва тенденция към увеличаване. В доклада на European Resistance Surveillance System (EARSS) от 2014 г. се вижда, че в изолираните от инвазивни проби бактерии от род *Pseudomonas* резистентността към карбапенеми варира между 4-43%, а в бактерии от род *Acinetobacter* между 0-93% (87).

През същата година в доклада на мрежата за наблюдение Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) от 2014 г., в който има изпратени данни и от Турция е посочено, че в изолираните от инвазивни проби бактерии от род *Pseudomonas* резистентността към карбапенеми е между 10-87%, а при бактериите от род *Acinetobacter* между 11- 93% (88).

В изследване от Балканския регион, направено в България, в което са включени 203 изолата на *P. aeruginosa*, процентът на резистентност варира по следния начин: имипенем 42,3%, меропенем 45,5%, цефтазидим 45,8%, цефепим 48,9%, азтреонам 49,8%, пиперацилин-тазобактам 56,8%, гентамицин 79,7%, амикацин 59,1%, ципрофлоксацин 80,3% и в нито един изолат не е наблюдавана резистентност към полимиксин Б (89). В друго проучване, проведено в България, Savov et al. установяват, че от включените в изследването мултирезистентни изолати на *P. aeruginosa*, 80% притежават резистентност към ципрофлоксацин (90).

В Турция, резистентността към имипенем в Грам-отрицателни НФГБ показва различие в зависимост от географските райони и за бактериите от род *Pseudomonas* варира около 4-85% (50). В доклад на Националната система за надзор на антимикробната резистентност (UAMDSS) от 2013 г. в Турция са докладвани данни за резистентността сред щамове на *P. aeruginosa*, изолирани от кръв и проби от гръбначно-мозъчна течност: за имипенем, меропенем, цефтазидим, ципрофлоксацин, амикацин, тазобактам-пиперацилин тя е съответно 33.4%, 26.1%, 39,8%, 20,3%, 12,4%, 20.6%. (91). В нашето изследване са включени 55 изолата от р. *Pseudomonas* (с преобладаване на *P. aeruginosa*), а процентите на антибиотична резистентност към амикацин, гентамицин, пиперацилин-тазобактам, цефепим, цефтазидим, азтреонам, ципрофлоксацин, имипенем, меропенем и колистин са както следва: 20%, 45%, 49%, 42%, 45%, 69%, 56%, 76%, 64% и 0%, съответно.

Изследване на антибиотичната чувствителност на *A. baumannii* в Корея показва, че докато към имипенем и меропенем тя е 8,3% и 11,7%, съответно, то към амикацин и колистин тя е съответно 30,2% и 30,6% (92). В изследване, направено през 2008 и 2013 г. в България, Savov et al. установяват, че за 5 години резистентността на *A. baumannii* към антимикробни вещества се увеличава както следва: за меропенем се увеличава от 75% на 88%, за цефтазидим - от 43% на 80%, за триметоприм-сулфаметоксазол - от 33% на 72%, за гентамицин - от 35% на 52% и за амикацин - от 30% на 42% (93, 94). В проучване, проведено в Турция през 2011 г. с изолати на *A. baumannii* процентите на резистентност към цефепим, цефтазидим, пиперацилин-тазобактам, меропенем,

имипенем, амикацин, гентамицин, ципрофлоксацин, триметоприм-сулфаметоксазол и колистин са както следва: 91%, 91%, 82%, 71%, 70%, 52%, 86%, 88%, 67% и 5% , съответно (95).

В настоящето изследване са включени 33 щамове на *A. baumannii* и тяхната резистентност към антибиотици в проценти е следната: за амикацин, пиперацилин-тазобактам, цефепим, азтреонам, ципрофлоксацин – 100%, за цефтазидим и имипенем – 94%, за меропенем - 97%, за колистин - 3% и за гентамицин и триметоприм-сулфаметоксазол - 88%.

Въпреки че видът *B. ceracia* е по-рядко изолиран инфекциозен агент, той е микроорганизъм, чието лечение се превръща в проблем, особено при болни с кистозна фиброза. В изследване, направено от Zhou и сътрудници (96) е установено, че процентът на резистентност на *B. ceracia* към цефтазидим е 65%, към триметоприм-сулфаметоксазол - 95%. В изследване, проведено в Турция, с изолирани от отделение за интензивно лечение щамове на *B. ceracia* процентите на резистентност към цефтазидим, триметоприм-сулфаметоксазол и за левофлоксацин са както следва: 9%, 7%, 7%, съответно (97). Включените в нашето изследване два изолати на *B. ceracia* са чувствителни към цефтазидим и меропенем. В сравнение с други изследвания, включените в настоящата дисертация изолати от Грам-отрицателни НФГБ, с изключение на *B. ceracia*, са с по-високи нива на резистентност, което може да се дължи на това, че избраните щамове притежават множествена лекарствена резистентност.

Най-широко изследваният механизъм на резистентност към антибиотици от групата на карбапенемите в последните години при НФГБ е този, свързан със синтеза на МБЛ (1). При лечението на инфекции причинени от тези бактерии, тяхното изолиране и идентифициране е толкова важно, колкото и идентифицирането на карбапенемази и синтеза на МБЛ с прост и надежден лабораторен метод. В повечето от направените изследвания се прилагат един или повече фенотипни методи, а резултатите са потвърждавани с хидролизен тест и PCR анализ (77, 98). В нашето изследване ние сме използвали шест фенотипни метода, които се различават по своята чувствителност и специфичност, като едновременно с това в някои се наблюдава фалшива положителност. Понастоящем като най-надежден тест за установяване на МБЛ се приемат анализите, базирани се на PCR с последващо секвениране. PCR и секвенционният анализ обаче не са практично решение за рутинно лабораторно приложение, тъй като са скъпи, изискват специално оборудване и обучен персонал. Ето

защо разработването и изборът на фенотипен тест с висока чувствителност и специфичност е от голямо значение за рутинната микробиологична практика.

Градиентният Е-тест е често използван тест за фенотипно идентифициране на МБЛ и се доставя от различни производители. В същото време той е лесно приложим. В основата на този тест лежи инхибирането на МБЛ в присъствие на EDTA. Осемкратното намаляване на MIC стойността на имипенем в присъствието на EDTA фенотипно показва присъствието на МБЛ (99). Най-големият недостатък на този тест е, че за средно чувствителните и за чувствителните към имипенем изолати не е подходящ за установяване на МБЛ. В тест-лентите лекарствената концентрация варира между 4-256 µg/ml в единия край и между 1-64 µg/ml – в другия. Затова този тест не може да се прилага към чувствителни към имипенем щамове, а при тези със средна резистентност води до неправилно оценяване (50). Walsh et al., (57) оценяват 94% чувствителност на метода и 95% специфичност при изследване на щамове, които предварително са изследвани с PCR. В изследване направено в Корея през 2004 г. от 56 броя изолати на *A. baumannii*, положителни за *blaIMP-1* ген, всички са дали положителни резултати с градиентния Е-тест, от 21 броя изолати на същия вид, положителни за *blaIMP-2* ген, 20 са дали положителни резултати, от 44 броя МБЛ отрицателни за МБЛ изолати (ОХА-23 ген положителен), един е дал фалшив положителен резултат (99). В изследване направено в България през 2009 г. е установено, че с този тест 16 карбапенем-резистентни изолати на *A. baumannii* са дали фалшив положителен резултат. Впоследствие, с молекулярно-генетични изследвания е установено, че всички тези изолати продуцират оксацилиназа (ОХА-23) (100). В изследване направено в Италия с референтни методи в 21 имипенем-резистентни *A. baumannii* изолати не са открити положителни за МБЛ, а с градиентния метод са установени 4 фалшиво положителни изолата (101). Migliavacca (81), използвайки този тест докладва 15% положителни за МБЛ щамове. В едно изследване, направено в Турция през 2010 г. (102) в имипенем-резистентни изолати на *P. aeruginosa* процентът на положителни за МБЛ изолати е 28%, подобно на този, който ние установяваме в нашето изследване. Нашите резултати за процента на МБЛ положителните изолати за *A. baumannii*, установени с този тест, се различават значително от установените от Shivaprasad et al. (103) и Walsh et al. (80) – те идентифицират 100% и 64% положителни изолати, съответно, срещу 39% в нашето изследване. В нашето изследване ние не установяваме положителни за МБЛ изолати на *V. serasia* с този метод, което се потвърждава и от RT PCR. Въз основа на направеното обсъждане на резултатите, постигнати с градиентния Е-тест при установяване на МБЛ

положителност и сравняването им с резултатите, получени с т.нар. златен стандарт за изследване на МБЛ - RT PCR, се стига до заключението, че процентът на фалшивата положителност в *Pseudomonas spp.* и *A. baumannii*, установена с този фенотипен метод е висок.

ROSCO бърз скринингов тест е нов фенотипен тест за установяване на карбапенемази, който влезе в употреба. С този тест с помощта на индикатори бързо се доказва хидролизата на бета-лактамния пръстен на карбапенемите. Тестът е лесен за изпълнение и приложение, а оценяването на резултатите се извършва в рамките на 30-60 min след започване на реакцията. С използването на този тест се осигурява бързо сканиране на карбапенемазите в лабораториите. Abdelghani et al. (104) установяват, че чувствителността на ROSCO бърз скринингов тест е 99%, специфичността - 100% и защитават тезата, че за идентифициране на МБЛ този метод е достатъчно чувствителен и може да се използва като лесен и алтернативен. Освен това, Dortet et al. (105) докладват подобни стойности за чувствителността и специфичността на метода - 89,5% и 71%, съответно. В друго изследване също се потвърждава високата чувствителност на този метод (106). Наличието на гени за МБЛ в три от нашите изолати (2 IMP, 1 VIM) на *Pseudomonas spp.*, което е доказано чрез RT PCR е потвърдено и чрез този фенотипен метод. Чрез него общо 12 от нашите изолати от *Pseudomonas spp.* са доказани като положителни за МБЛ, което може да се дължи на наличието в тези изолати на неизследвани и неоткрити до сега карбапенемази.

Друг тест за фенотипно установяване на МБЛ е модифицираният Hodge тест (МНТ). Принципът на теста се базира на възвръщане на репродуктивната способност на имипенем-чувствителен щам *E. coli* при наличието на бактерии, продуциращи МБЛ в резултат на хидролизиране на имипенем от ензима (75). Освен МБЛ обаче, и други ензими са причина за хидролиза на имипенем. Ако в изолата има други ензими, като ОХА-23, ОХА-28 или изолатът е дерепресирани мутант, постоянното високо ниво на синтезиране на хромозомни AmpC ензими може да доведе до хидролиза на имипенем. В изследване направено с резистентни към имипенем Грам-отрицателни НФГБ, Jesudason et al. (107) установяват 56% положителни за МБЛ и карбапенемаза изолати. Сравнявайки резултатите, получени с този метод с двойно-дискския синергичен тест авторите установяват, че последният е по-добър за идентифициране на МБЛ. Подобни резултати (56%) са получени от Lee et al. (76), а в изследване на John et al. (108) процентът на положителните щамове е доста по-нисък - 14,8%. Въпреки че модифицираният Hodge тест е прост метод, често се установяват и фалшиво

положителни резултати. Показано е обаче, че с прибавянето на цинков сулфат към дисковете с IMP или в Mueller-Hinton агар, това може да се избегне (75). В нашето изследване с този тест ние установяваме, че 9% от изолатите от *Pseudomonas* spp. и 21% от *A. baumannii* са положителни. В *B. ceracia* положителност не е установена. Освен това, разликата между резултатите, получени с модифицирания Hodge тест и тези с RT PCR е статистически незначима, макар и по-голяма при *A. baumannii*.

Механизмът на комбиниран EDTA ДДТ се базира на свързване на карбапенемазата с хелатор на метали, какъвто е EDTA. Когато диаметърът на инхибиторната зона около диска с IMP+EDTA е по-голяма с повече от 7 mm от зоната на инхибиране около IMP в отсъствие на EDTA, резултатът е положителен. Този метод е приложен от Oh et al. (98) през 2003 г. за да бъде идентифицирана МБЛ в изолати на *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, след което резултатите са потвърдени с PCR анализ. Авторите посочват, че чувствителността на този фенотипен метод по отношение на изолати, за които се знае, че синтезират VIM-подобни ензими е 93,9%. Методът обаче се оказва неуспешен при идентификацията на IMP-подобни ензими. Yong et al. (109) оценяват този метод като доста чувствителен и специфичен за *Pseudomonas* spp. и в по-малка степен за *Acinetobacter* spp. Behra et al. (110) установяват 76% МБЛ положителност с този тест и сравнявайки го с двойно-дисковия синергичен тест показват неговата по-голяма чувствителност. В някои изследвания процентът на положителните за МБЛ изолати достига между 79 и 96% (103, 111, 112). В изследвания, проведени в Турция МБЛ положителност, установена с комбинирания EDTA ДДТ е различна. Така напр. Fidan et al. (113) установяват 5% МБЛ положителни изолати, Altoparlak et al. (114) - 55%, Dađı et al. (115) - 69% и Gayuurhan et al. (116) - 72%. В нашето изследване с този метод ние установихме, че 33% от *Pseudomonas* изолатите са МБЛ позитивни, а при в *A. baumannii* 66.7% (при повече от 7 mm разлика в зоните) и съответно 49 и 85% при разлика по-голяма от 6 mm. И с този метод се потвърди липсата на МБЛ положителни изолати при *B. ceracia*. Сравняването на резултатите, получени от нас с този фенотипен тест с резултатите от RT PCR показва, че процентът на фалшиво положителните изолати е висок както при *Pseudomans* spp., така и при *A. baumannii*. В *B. ceracia* не е установен положителен резултат.

Идентификацията на МБЛ с ROSCO потвърдителен тест се основава на това, че бактериите образувачи тези ензими хидролизат карбапенемите и се инхибират от EDTA и DPA. В теста са включени както самостоятелни дискове с определени концентрации IMP, MEM и CAZ, така и дискове с комбинация от антибиотиците с

EDTA, както и комбинация от IMP и DPA. Поради това, че в различните видове се наблюдава променлива резистентност към карбапенеми, наличието на комбинация с DPA и на двата карбапенема осигурява идентифициране на МБЛ. Разлика в диаметъра на зоните по-голяма от 7 mm в заподозрения за синтезата на МБЛ микроорганизъм се счита за положителен резултат. Bartolini et al. (117) считат този метод за най-подходящ от фенотипните методи за рутинно използване, заради високата му чувствителност (95%) и специфичност (99%). Hansen et al. (118) в изследване с *P. aeruginosa* и *A. baumannii* установяват, че чувствителността на всички комбинации е над 80%, а специфичността и положителната предиктивна стойност в изолати на *A. baumannii* на всички комбинации, освен IMP+DPA, е ниска. Други автори също показват висока чувствителност на този метод (89%) и специфичност 49% (119). В нашето изследване процентът на МБЛ положителност за изолати на *Pseudomonas* е различна при различните комбинации и зависи от приеманата гранична стойност на разликата в диаметрите на инхибиторната зона (6 или 7 mm), но е най-висока при комбинацията IMP + EDTA (64-56 %), следвана от комбинацията MEM+EDTA (54-49%). Процентът на положителните по отношение на синтезата на МБЛ изолати при *A. baumannii* също е най-висок при тези две комбинации, като при IMP+EDTA той е 100%. Сравняването на резултатите от този тест във всичките му варианти с резултатите от RT PCR показва, че само между комбинацията IMP+DPA и генотипния тест няма статистически доказана разлика, докато останалите комбинации са с доста по-висок процент на фалшива положителност.

Голяма част от прилаганите фенотипни методи за детекция на МБЛ се базират на инхибиране на ензима от хелатор на метали. Такъв метод е двойно-дисковият синергичен тест (3). Yong et al. (120) прилагат този метод за фенотипно доказване на наличието на МБЛ при изолати от родовете *Pseudomonas* и *Acinetobacter*, в които ензимите са били доказани предварително с PCR. Комбинацията IMP+DPA установява 93,2% положителност, а тази от MEM+DPA - 86,4%. При изолатите от род *Pseudomonas* първата комбинация е по-успешна. При повторение на тези тестове, но с EDTA се оказва, че DPA е по-добър инхибитор на МБЛ. Kimura et al. (121) провеждат изследване за фенотипно установяване на МБЛ в щамове на *P. aeruginosa*, продуциращи IMP и VIM МБЛ с двойно-дисков синергичен тест. Докато комбинациите CAZ+DPA и MEM+DPA установяват 100% наличие на МБЛ, то при комбинацията IMP+DPA този процент е по-нисък - 92%. В своето изследване Pícao et al. (122) подчертават, че двойно-дисковият синергичен тест е подходящ за рутинно използване, но кой метод е

най-добър за скрининг на МБЛ, зависи от видовата принадлежност на изолата и най-често наблюдаваната МБЛ в съответния район. Различен е процентът на положителност при използването на този тест в изследвания, проведени в Турция от различни автори, като той се движи от 5 до 84% (113, 123). В нашето изследване при използването на двойно-дисков синергичен тест процентът на положителните изолати е различен – по-висок е при *Pseudomonas* spp. (36 и 54%, съответно при комбинациите IMP+DPA и MEM+DPA). При изолатите на *A. baumannii*, резултатите получени с този тест са най-близки до тези, получени с RT PCR, като разликата между тях е статистически незначима. При *B. cepacia* положителен резултат не е получен. Фалшиво положителните резултати при изолатите от *Pseudomonas* spp. са значително по-големи.

Молекулярните методи за идентификация на МБЛ се считат за златен стандарт. Главните методи са клониране и секвениране, но методите, базиращи се на PCR са също често използвани за генотипна идентификация на МБЛ. В проучване Moosavian (124) включва 236 изолата на *P. aeruginosa*, в което с PCR изследва наличието на МБЛ. В 1.6% от изолатите установява гени за VIM и в 55% - за IMP МБЛ. При анализирането на 63 резистентни към имипенем изолати на *P. aeruginosa* с PCR, Mirbagheri et al. (125) установяват в 58,7% от тях ген за VIM1 МБЛ и в 3.17% - за VIM2. Чрез същия подход Ghamgosha et al. (126) показват, че от 9 резистентни към имипенем изолати на *P. aeruginosa*, 7 носят ген за VIM1 МБЛ. Poirel et al. (127), в изследване проведено в България, докладват, че в Балканските страни по-често се наблюдава МБЛ от тип NDM-1. Чрез молекулни методи Schneider et al. (128) установяват в два изолата на *P. aeruginosa*, изолирани от урина в България и Германия два нови варианта на VIM-2 метало-бета-лактамазни ензими – VIM-15 и VIM-16. Гените за тези ензими са част от интегрони от клас 1, локализирани в хромозомата.

В проучване, включващо 51 изолати на *P. aeruginosa* Küçükbasmaç et al. (129) чрез мултиплекс PCR не установяват МБЛ в нито един изолат. В друго изследване с 52 резистентни към имипенем изолати на *A. baumannii*, Aksoy et al. (130), използвайки PCR не установяват гени за МБЛ в нито един изолат, но идентифицират OXA-23- и OXA-51-подобни гени за резистентност и считат, че изолатите на *Acinetobacter*, продуциращи МБЛ все още не представляват проблем. В изследване направено в Черноморския регион в Турция със 100 щамове на *P. aeruginosa*, в един щам е установен ген за VIM и в девет - гени за IMP-1 МБЛ. Впоследствие чрез PCR анализ е установено, че гените за IMP-1 тип са с клонална връзка (т.е. резултат на разпространяване от един и същи изолат) (131).

В нашето изследване с RT PCR наличие на МБЛ се установява само в три щамове, два от които от вида *P. aeruginosa*, а другия – от *P. fluorescens*. Установените гени за МБЛ в щамовете на първия вид са идентифицирани като *blaIMP*, а във втория вид - като *blaIVIM*.

Трудностите срещани в лечението на инфекции причинени от бактерии, продуциращи МБЛ се наблюдават с безпокойство по цял свят. Увеличаването на процента на щамовете, продуциращи МБЛ, което води до много лоши клинични резултати поради бързото разпространение на детерминантите на резистентност е довело до задължително търсене и намиране на чувствителни методи с висока специфичност и лесно приложимост в рутинната лабораторна практика. В резултат на нашето изследване се вижда, че ако вземем предвид само изолатите от *Pseudomonas* spp. и резултатите от сравняването на фенотипните методи с RT PCR, то най-съвместим с него е модифицираният Hodge тест. Въпреки че за щамовете на *A. baumannii* не са установени гени за МБЛ, най-близки по стойност с резултатите от RT PCR са тези, получени с двойно-дисковия синергичен тест с IMP+DPA и MEM+DPA. Най-добър общ метод за детекция на МБЛ, едновременно при *Pseudomonas* spp. и при *A. baumannii*, е ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA.

Двата щамове на *B. ceracia* са отрицателни по отношение на продукцията на МБЛ, което е установено с фенотипните методи и потвърдено с RT PCR, поради което те са изключени от статистическия анализ. Тъй като методът ROSCO потвърдителен тест (IMP+DPA) се установява като най-удобен за *Pseudomonas* spp. и за *A. baumannii* ние считаме, че той би могъл да се използва и при анализиране на *B. ceracia*.

Генетичните причини, които обуславят резистентност в резистентни към карбапенеми изолати могат да бъдат много разнообразни. Причини за резистентност към карбапенеми в Грам-отрицателни неферментиращи бактерии могат да бъдат същите като при Грам-отрицателните ферментиращи бактерии. Напр. Sabtcheva et al. (132) в изследване, проведено в България установяват, че *K. pneumoniae*, има намалена чувствителност към карбапенеми, което се дължи на продуциране на OXA-48, но запазват своята чувствителност към цефалоспорини с широк спектър на действие. В друго изследване, извършено отново в България от Markovska et al. (133) се установява, че почти всички изследвани щамове на *K. pneumoniae* (общо 38 щамове) продуцират KPC-2, най-често в комбинация с CTX-M-15, а един изолат синтезира OXA-48 и CTX-M-14. Наличието в *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp. на карбапенемази от вида OXA може да доведе както до резистентност към карбапенеми, така и до продуциране

на МБЛ. В рутинните лаборатории се срещат различни противоречия при сравняване на различните фенотипни и генотипни методи за идентифициране на МБЛ. Тези противоречия се изразяват най-често в получаването на фалшиво положителни резултати с фенотипните методи. В много от анализирани изолати, в които е установено наличие на МБЛ с фенотипните методи не са открити гени за тях чрез молекулни методи.

В нашето проучване ние изследвахме изолатите на *A. baumannii* и *P. aeruginosa* за наличието на гени за IMP, VIM, SPM, SIM и GIM МБЛ и подобно на много други изследвания по света ние идентифицирахме IMP и VIM МБЛ гени, които са най-често изолираните. Ние обаче не сме направили анализ за наличие на карбапенемази от вида ОХА. За да се докаже точно, че резистентността към карбапенеми, наблюдавана в изследваните от нас изолати се дължи освен на МБЛ, но че зависи и от структурата на карбапенемазите, е необходимо молекулно сканиране и на други дефинирани карбапенемази.

Поради това, че фенотипните изследвания дават фалшиви положителни резултати, особено в изолати в които наличието на МБЛ ген не се идентифицира с молекулярни методи, има необходимост от ефективен фенотипен метод, съпоставим с молекулярните за идентификация на МБЛ.

Поради ограничените възможности за лечение на инфекции, развиващи се в резултат от щамове, продуциращи МБЛ, предотвратяването на разпространението на изолати продуциращи такива ензими, особено в болнична среда, е много важно. Затова ранното идентифициране на МБЛ е от голямо значение. При пациенти, приети в интензивно отделение, определянето на способността към продукция на МБЛ от колонизиращия се щам е една от главните мерки, които трябва да бъдат предприети за ограничаване на разпространението на резистентността, свързана с МБЛ.

ИЗВОДИ

Въз основа на проведените анализи и получените резултати могат да се направят следните изводи:

1. От всички клинични проби, обект на настоящето изследване, трахеалният аспират е с най-богато видово разнообразие от Грам-отрицателни неферментиращи глюкозата бактерии. От него са изолирани щамове на пет вида бактерии – *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii* и *Burkholderia cepacia*.
2. *Pseudomonas aeruginosa* се открива най-често в проби от рани, трахеален аспират и урина, а *Acinetobacter baumannii* – от трахеален аспират, кръв и урина.
3. Бактериалните видове, обект на това изследване се изолират най-често в интензивно отделение (55.5%).
4. Щамовете, принадлежащи към видовете *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* се характеризират с висока резистентност към карбапенеми – между 45 и 58% и 91-97%, съответно.
5. Три от всички изолати синтезират метало-бета-лактамази, доказано чрез RT PCR – два щам на *Pseudomonas aeruginosa*, които синтезират тип IMP метало-бета-лактамази и един щам на *Pseudomonas fluorescens*, който синтезира тип VIM.
6. Сравнителният анализ на резултатите от фенотипните методи за детекция на метало-бета-лактамази с тези от RT PCR показват, че най-висок процент фалшиво положителни резултати за *Pseudomonas aeruginosa* се получават с ROSCO потвърдителен тест IMP+EDTA – 56% и 100% за *Acinetobacter baumannii*.
7. Фенотипните методи ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA, двойно-дисковият синергичен тест IMP+DPA и MEM+DPA, разпознават IMP, но не и VIM метало-бета-лактамази.
8. Най-подходящ фенотипен метод за идентификация на метало-бета-лактамази при *Pseudomonas aeruginosa* е модифицираният Hodge тест. За *Acinetobacter baumannii*, въпреки че не са установени гени за МБЛ, най-съвместими с RT PCR са ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA, двойно-дисковият синергичен тест IMP+DPA и MEM+DPA, тъй като броят на положителните щамове е много нисък и най-близък като стойност до резултата, получен с молекулярния метод.

9. Най-подходящ общ фенотипен метод за идентификация на метало-бета-лактамази при *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* е ROSCO потвърдителен тест IMP+DPA.
10. За да се избегнат фалшиво положителните резултати, получавани с фенотипните методи и за да бъде избран ефективен фенотипен метод, приложим за детекция на МБЛ в рутинната практика, трябва да се анализират по-голям брой щамове, в които предварително с генетични методи са идентифицирани гените за МБЛ.
11. Въпреки приложимостта на посочените по-горе фенотипни методи в рутинната практика, те имат характер на скринингови, а за окончателна идентификация на метало-бета-лактамазите трябва да се прилага молекулярно-генетичен метод.

ПРИНОСИ

1. Получена е информация за разпространението на Грам-отрицателните неферментиращи бактерии в различни клинични проби и отделения, която е важна при борба с вътреболничните инфекции, предизвикани от тези бактерии.
2. Получените от нас данни за профила на антибиотичната резистентност на изолираните от нас щамове *Pseudomonas aeruginosa*, *Acintebacter baumannii* и *Burkholderia cepacia* към антибиотици, вкл. и от групата на карбапенемите представляват полезна информация при прилагането на протоколите за лечение.
3. Установената честота на срещаемост на продукцията на метало-бета-лактамази сред Грам-отрицателните неферментиращи глюкозата бактерии е необходима информация за клиницистите при вземане на решение за лечението на инфекции, предизвикани от тях.
4. Препоръчват се фенотипни методи за детекция на метало-бета-лактамази, съвместими с RT PCR, които могат да бъдат рутинно прилагани за скрининг.

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Mustafa Güzel**, Yasemin Genç, Altan Aksoy Penka Moncheva, Petya Hristova. (2015) “Investigation of three different methods for detection of ESBL production and antibiotic resistance percentage of ESBL producing Gram-negative bacteria.” *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, v. 72 (2), p:131-138. DOI: 105505 Turkhijyen, 2015 – 33239 <http://www.turkhijyen.org>
2. **Mustafa Güzel**, Yasemin Genç, Altan Aksoy Penka Moncheva, Petya Hristova. (2016) “Antibiotic resistance and Metallo-beta-laktamase positivity in Carbapenem-Resistant Non-fermentative Gram-negative bacilli.” *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 73 (1), p:9-14. DOI: 10.5505.Turkhijyen 2016 - 55706. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology* <http://www.turkhijyen.org>

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Mustafa Güzel**, Yusuf Afşar, Doğan Akdoğan, Penka Monçeva, Petya Hristova. Gül Erdem. Изследване на Метало-беталактамаза в изолати *Pseudomonas spp.* с real time PCR и E-тест и присъствието на карбапенемаза с карбапенемова инактивационен метод (***Pseudomonas spp. izolatlarında real time PCR ve karbapenem inaktivasyon yöntemi ile karbapenemaz varlığının araştırılması***) KLİMUD – 2015, 18-22 Ноември Национален конгрес по Клинична микробиология. Анталия / ТУРЦИЯ
2. **Mustafa Güzel**, Yusuf Afşar, Doğan Akdoğan, Penka Monçeva, Petya Hristova. Gül Erdem. Изследване на Метало-беталактамаза в изолати *Acinetobacter baumannii* с real time PCR и E-тест и присъствието на карбапенемаза с карбапенемова инактивационен метод (***Acinetobacter baumannii izolatlarında real time PCR ve E-test ile MBL, karbapenem inaktivasyon yöntemi ile karbapenemaz varlığının araştırılması***) KLİMUD – 2015, 18-22 Ноември Национален конгрес по Клинична микробиология Анталия / ТУРЦИЯ