

ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА VANCOMYCIN-РЕЗИСТЕНТНИ НОЗОКОМИАЛНИ ИЗОЛАТИ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ОТ ТРИ ГОЛЕМИ БОЛНИЦИ В БЪЛГАРИЯ (2013-2017 г.)

Т. Стратева¹, Св. Димов², А. Трифонова³, И. Сираков¹, Е. Савов³ и И. Митов¹

¹Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, Медицински университет – София

²Катедра “Генетика”, Биологически факултет, СУ “Св. Климент Охридски” – София,

³Лаборатория по микробиология, Катедра по военна епидемиология и хигиена, Военномедицинска академия – София

EPIDEMIOLOGICAL TYPING OF VANCOMYCIN-RESISTANT NOSOCOMIAL *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ISOLATES FROM THREE LARGE HOSPITALS IN BULGARIA (2013-2017)

T. Strateva¹, S. Dimov², A. Trifonova³, I. Sirakov¹, E. Savov³ and I. Mitov¹

¹Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Medical University – Sofia

²Department of Genetics, Faculty of Biology, “Sv. Kliment Ohridski” Sofia University – Sofia

³Laboratory of Microbiology, Department of Military Epidemiology and Hygiene, Military Medical Academy – Sofia

| | |
|--|---|
| <p>Резюме:</p> <p>Ключови думи:</p> <p>Адрес за кореспонденция:</p> | <p>Бяха проведени епидемиологични проучвания при 51 vancomycin-резистентни щамове <i>Enterococcus faecium</i> (VREfm), изолирани в три големи болници в България, за периода 2013-2017 г., с използване профилите на антимикробна чувствителност и случайна амплификация на полиморфна ДНК чрез полимеразна верижна реакция (RAPD-PCR). Получените RAPD профили бяха подложени на UPGMA анализ. Всички изолати притежаваха еднакъв резистотип: резистентност към ampicillin, imipenem, gentamicin (високо ниво), vancomycin, teicoplanin, ciprofloxacin, levofloxacin и quinupristin-dalfopristin, и чувствителност към linezolid, daptomycin и tigecycline. Чрез RAPD-PCR с AP4 праймер, бяха установени само две клъстерни групи (CGs) с 81% клонална свързаност между тях – CG-I (23 щама, 93% сходство) и CG-II (28 щама, 95%). Приложението на P2 праймер показа: разпределение в пет основни CGs – CG-I (22 щама, 93%), CG-II (12 щама, 90.5%), CG-III (5 щама, 90%), CG-IV (2 щама, 96%) и CG-V (2 щама, 96%); 8 щама без клъстерна принадлежност и клонална връзка (70%) между 42 от проучените VREfm. В заключение, в мониторираните болници беше доказано циркулиране на епидемичен клон, включващ VREfm с множествена лекарствена резистентност, за период от над 4 години. Това налага упражняване на строг контрол върху разпространението на нозокомиалните инфекции, както и непрекъснат надзор на антимикробната резистентност на <i>E. faecium</i>.</p> <p>vancomycin-резистентни <i>Enterococcus faecium</i>, епидемиологично типизиране, RAPD-PCR, клонално свързани нозокомиални изолати</p> <p>Доц. д-р Таня Стратева, д.м., Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, Медицински университет, ул. “Здраве” № 2, 1431 София, тел. +359 2 9172750; e-mail: dr.strateva@abv.bg</p> |
| <p>Abstract:</p> | <p>Epidemiological studies were conducted on 51 vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> (VREfm) strains, isolated in three large hospitals in Bulgaria during 2013-2017, using the profiles of antimicrobial susceptibility and random amplification of polymorphic DNA by polymerase chain reaction (RAPD-PCR). The obtained RAPD profiles were subjected to UPGMA analysis. All isolates possessed the same resistotype: resistance to ampicillin, imipenem, gentamicin (high level), vancomycin, teicoplanin, ciprofloxacin, levofloxacin and quinupristin-dalfopristin, and susceptibility to linezolid, daptomycin and tigecycline. By RAPD-PCR with AP4 primer, only two cluster groups (CGs) with 81% clonal relatedness between them were found – CG-I (23 strains, 93% similarity) and CG-II (28 strains, 95%).</p> |

| | |
|------------------------------------|---|
| Key words: | The use of P2 primer showed: distribution in five major CGs – CG-I (22 strains, 93%), CG-II (12 strains, 90.5%), CG-III (5 strains, 90%), CG-IV (2 strains, 96%) and CG-V (2 strains, 96%); 8 strains without belonging to clusters and clonal relatedness (70%) between 42 of the studied VREfm. In conclusion, dissemination of an epidemic clone, consisting of VREfm with multidrug resistance, has been demonstrated in monitored hospitals, for a period of more than 4 years. This requires the exercise of strict control over the spread of nosocomial infections, as well as continuous surveillance of the antimicrobial resistance of <i>E. faecium</i> . |
| Address for correspondence: | vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> , epidemiological typing, RAPD-PCR, clonally related nosocomial isolates |
| | Assoc. Prof. Dr. Tanya Strateva, PhD, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Medical University, 2 Zdrave Str., Bg – 1431 Sofia, tel. +359 2 9172750; e-mail: dr.strateva@abv.bg |

ВЪВЕДЕНИЕ

Първоначалното изолиране на клинични vancomycin-резистентни *Enterococcus* (VRE) от вида *Enterococcus faecium* е в Европа (Англия и Франция) през 1986 г., последвано от VRE *faecalis* в САЩ, година по-късно [17, 22, 27]. В Европа употребата на гликопептидния антибиотик аворагсип като растежен фактор в животновъдството, води до предаване на VRE от животински продукти на хора и тяхното бързо разпространение в обществото [3]. В САЩ преобладават нозокомиалните VRE, което е пряко свързано с широкото приложение на vancomycin в болничните отделения [20].

Vancomycin-резистентният *E. faecium* (VREfm) е един от най-важните и проблемни за лечение вътреболнични патогени в световен мащаб [23]. Освен типичен колонизатор на гастроинтестиналния тракт на хора и животни, той се характеризира и с продължително персистиране в болничната среда, пластичен геном, лесно придобиване на мобилни генетични елементи, кодиращи антимикуробна лекарствена резистентност, както и с нарастваща смъртност на причинените системни инфекции [29].

Продължителното присъствие на VREfm в различни екологични ниши, вкл. в болничната екосистема, налага необходимостта от изучаване на неговата популационна структура и генетична еволюция. Детайлното изследване чрез молекулнотипизиращи методи на епидемиологията на нозокомиалните инфекции, причинени от VREfm, осигурява идентификация на огнищата на патогена в болниците, откриване на взривове от вътреболнични инфекции (ВБИ) и тяхното разпространение в тесен и глобален мащаб [26].

Целта на настоящото проучване беше да се извърши епидемиологично типизиране, определящо степента на филогенетично родство на нозокомиални VREfm, изолирани в три големи болници в България през последните пет години.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Бактериални щамове

В проучването бяха включени 51 неповтарящи се VREfm, изолирани от пациенти в 3 големи болници в България, през периода февруари 2013-юни 2017 г. Всички изолати бяха от пациенти със симптоматични инфекции, а при уроинфекциите бактериурията беше сигнификантна ($\geq 10^5$ CFU/ml). Разпределението им по година на изолиране и клинични материали е представено на табл. 1, а разпределението по болници беше следното: Военномедицинска академия – София (n = 44), УМБАЛ “Св. Иван Рилски” – София (n = 5), и МБАЛ “Д-р Тота Венкова” – Габрово (n = 2). Референтен щам *E. faecium* ATCC 19434 беше добавен към колекцията от клинични щамове и използван в молекулярногенетичните техники за определяне на филогенетично родство между тях.

Таблица 1. Разпределение на проучените vancomycin-резистентни *E. faecium* – хронологично и по клинични материали

| Година | Брой | Клиничен материал | Брой |
|--------|------|------------------------|------|
| 2013 | 1 | Урина | 23 |
| 2014 | 14 | Ранев секрет | 8 |
| 2015 | 11 | Кръв | 5 |
| 2016 | 19 | Долни дихателни пътища | 2 |
| 2017 | 6 | Ликвор | 1 |
| | | Очен секрет | 1 |
| | | Жлъчка | 1 |
| | | Медицински устройства* | 9 |
| Общо | 51 | Общо | 51 |

*Врх от уретрален катетър (n = 8) и врх от централен венозен катетър (n = 1)

Идентификация чрез конвенционални биохимични тестове и автоматизирани системи

За видова идентификация бяха използвани: конвенционална биохимична схема, включваща тестове за разграждане с получаване на кисе-

лина на манитол, арабиноза, сорбитол, рафиноза, захароза, хидролиза на аргинин и доказване на подвижност (при 5 щам) [2], и автоматизираната система VITEK 2 (bioMérieux) с изпълнение на процедурата според изискванията на производителя (при 46 щам).

Изолиране на тотална ДНК

ДНК от проучените щамове беше изолирана с помощта на търговски кит GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich), в съответствие с инструкциите на производителя.

Молекулярногенетични методи за идентификация на щамовете

Родовата принадлежност на щамовете беше доказана чрез извършване на полимеразна верижна реакция (PCR), амплифицираща част от гена за 16S рибозомната РНК (рРНК). За видова идентификация беше използвана мултиплексна PCR за детекция на *sodA* гена, кодиращ ензима манган-зависима супероксид дисмутаза на най-честите видове ентерококи (*E. faecalis*, *E. faecium* и *Enterococcus durans*).

Олигонуклеотидите, използвани като праймери за амплификация, са публикувани в наше предишно проучване [2]. Реакциите на амплификация бяха извършвани в Gene Pro Thermal Cycler (Bioer), в обем 25 µl, като крайната концентрация на микса за всяка проба съдържаше: 0.25 µM от съответните праймери, 0.2 mM dNTPs, 1x Reaction Buffer, 2.0 mM MgCl₂ и 0.5 U Taq ДНК полимераза (*Prime Taq*™ DNA Polymerase, GENET BIO). Протоколът включваше еднакви условия за денатурация (5 min на 94 °C) и завършване на реакцията (7 min на 72 °C) и различни температура на прикачване на праймерите (50 °C и 55 °C) и време за удължаване на веригата според последователността на конкретните праймери и дължината на очаквания продукт. Отчитането на PCR продуктите беше осъществено посредством стандартна агарозна електрофореза в 1 % гел, с предварително включен в него етидиев бромид (0.5 µg/ml), и наблюдавано с UV трансилюминатор при λ = 312 nm.

Определяне на чувствителността на изолатите към антимикуробни лекарствени средства (АМЛС)

Антимикуробната чувствителност беше установена чрез градиентен тест за определяне на минимални потискащи концентрации (MIC) на антибиотиците – MIC Test Strip (Liofilchem), изпълнен съгласно инструкциите на Европейския комитет за тестване на антимикуробната чувствителност (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) от 2017 г. [11]. Тест-

ването беше извършено спрямо следните АМЛС: ampicillin (AMP), imipenem (IMP), gentamicin (GEN) за доказване на високо ниво на резистентност към аминогликозиди (high-level aminoglycoside resistance – HLAR), vancomycin (VAN), teicoplanin (TEC), ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LEV), quinupristin-dalfopristin (Q/D), linezolid (LNZ), tigecycline (TGC) и daptomycin (DAP). Чувствителността към DAP беше интерпретирана в съответствие с критериите на Института по клинични и лабораторни стандарти (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI), документ M100S [8].

Дефиниране на изолати с множествена лекарствена резистентност (MDR) и разширена лекарствена резистентност (XDR)

За изолати с MDR се приемат всички *E. faecium*, нечувствителни към едно или повече АМЛС в три или повече от следните групи: аминогликозиди (HLAR), streptomycin (високо ниво), флуорохинолони (CIP, LEV, moxifloxacin), гликопептиди (VAN, TEC), пеницилини (AMP), стрептограмини (Q/D), тетрациклини (doxycycline, minocycline), глицилциклини (TGC), оксазолидинони (LNZ) и липопептиди (DAP). При нечувствителност към поне един препарат от всяка от изброените групи АМЛС, с изключение на една или две от тях, антимикуробната резистентност се приема за XDR [19].

Епидемиологично типизиране посредством случайна амплификация на полиморфна ДНК чрез полимеразна верижна реакция (Random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR)

RAPD-PCR реакциите бяха осъществени в обем от 20 µl в буферна система с KCl при крайни концентрации на MgCl₂ 2 mM; на четирите dNTPs, съотв. по 0,2 mM от всяко (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); на AP4 (5'-TCACGCTGCA-3') или P2 (5'-ATGTAACGCC-3') праймера 0,2 mM [7, 12]; общо количество на ДНК около 40 ng и 0.5 U JumpStart™ Taq-полимераза (Sigma-Aldrich). След първоначалната стъпка на денатурация за 5 min при 94 °C последваха 4 цикъла на денатурация при 94 °C за 45 s, хибридизация на праймера при 30 °C за 2 min и синтез при 72 °C за 30 s; 10 цикъла на денатурация при 94°C за 5 s, хибридизация при 36 °C за 30 s и синтез при 72 °C за 30 s; 10 цикъла на денатурация при 94 °C за 5 s, хибридизация при 36 °C за 30 s и синтез при 72 °C за 40 s; 10 цикъла на денатурация при 94 °C за 5 s, хибридизация при 36 °C за 30 s и синтез при 72 °C за 50 s и 10 цикъла на денатурация при 94 °C за 5 s, хибридизация при 36 °C

за 30 s и синтез при 72 °C за 60 s. Накрая последва стъпка на досинтезиране при 72 °C за 10 min. По 6 µl от получените PCR продукти биваха нанасяни на 2% агарозен гел с етидиев бромид. След приключване на електрофорезата геловите биваха фотографирани под UV светлина.

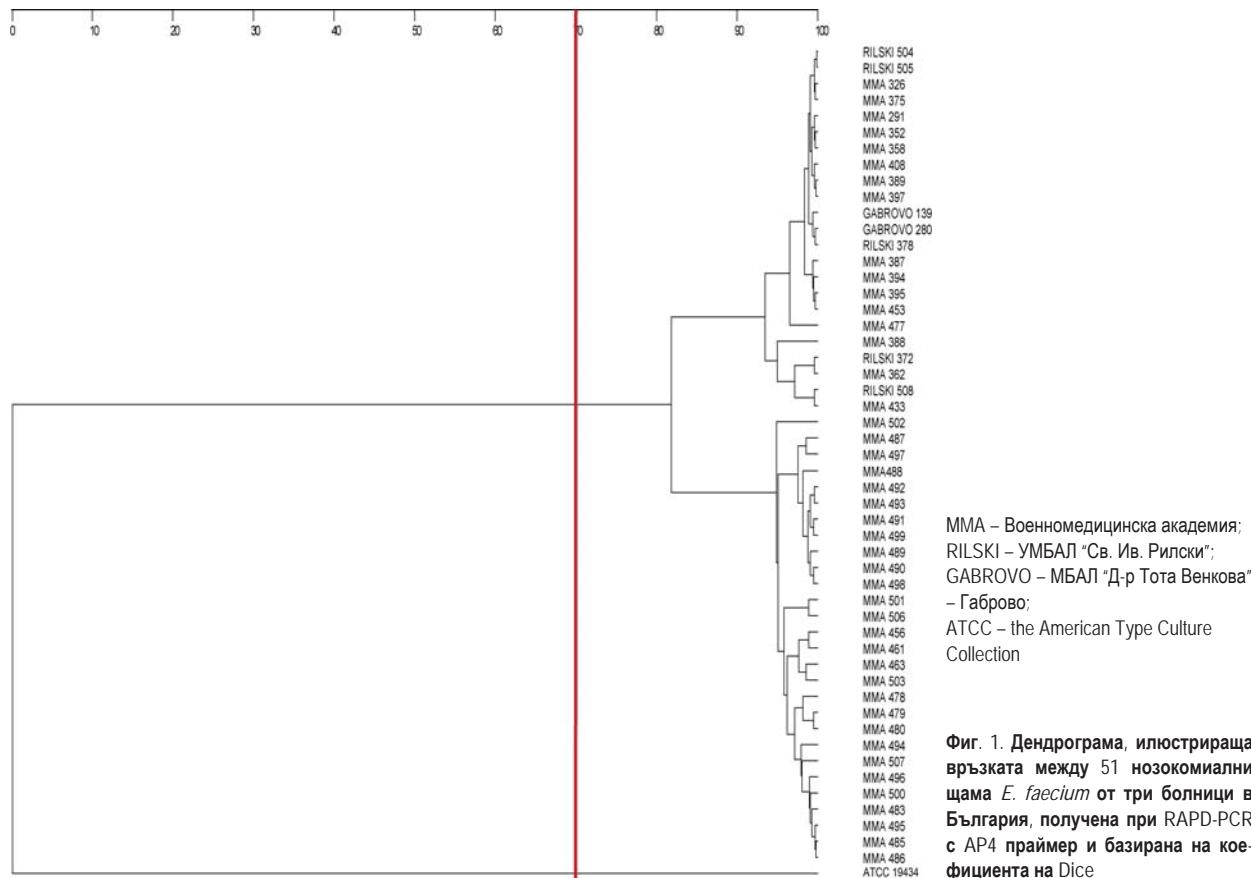
Непретеглен метод за групиране на двойки с помощта на средни аритметични стойности (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean – UPGMA) биоинформатичен анализ

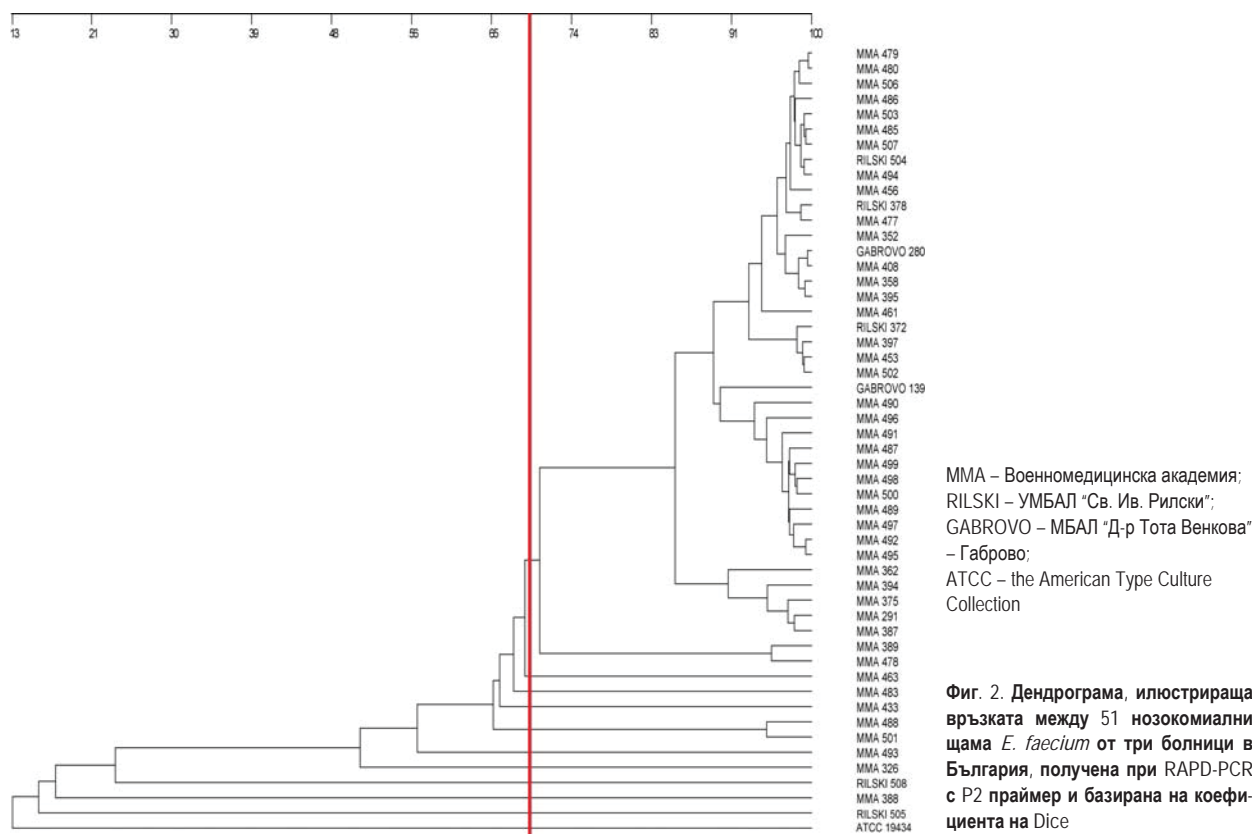
UPGMA методът [24] беше използван за определяне на филогенетичното родство между нозокомиалните VREfm от трите болници и за построяване на филогенетични дървета. Групирането на щамове се основаваше на пресмятането на т. нар. матрица на сходство и намирането на двойката от оперативни таксономични единици (operational taxonomic units, OTUs), която имаше най-голямо сходство. След това те се третираха като една нова OTU. Процесът се повтаряше до подреждането на всички OTUs и получаване на т. нар. вкоренено дърво. За построяване на дендрограмите беше използван специализиран софтуер *GeneTools* 4.01 (Syngene).

РЕЗУЛТАТИ

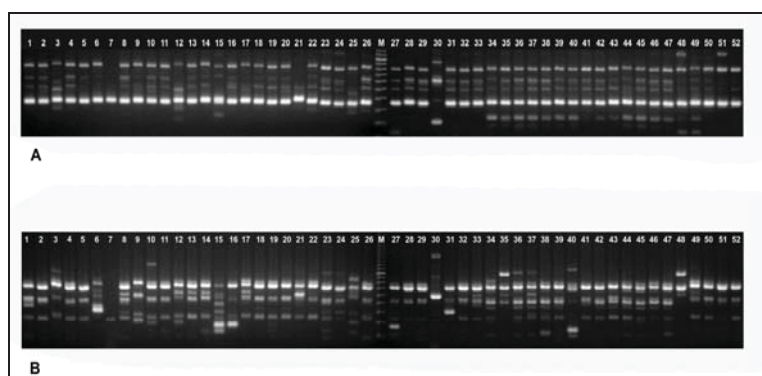
Събраните клинични VREfm щамове притежаваха напълно еднакъв профил на чувствителност към АМЛС, независимо от мястото и годината на изолиране. Освен резистентност към двата гликопептидни антибиотика (VAN и TEC), те показаха също резистентност към AMP, IMP, GEN (HLAR), CIP, LEV, Q/D и чувствителност единствено към LNZ, TGC и DAP, т.е. в мониторираните болници за проучения период (2013-2017 г.) беше наблюдавано циркулиране на нозокомиални VREfm от един и същ резистентен тип, отговарящ на MDR.

Епидемиологично типизиране на нозокомиалните VREfm изолати от трите болници беше извършено чрез RAPD-PCR с два различни праймера (AP4 и P2) и подложено на UPGMA биоинформатичен анализ. Дендрограмите, илюстриращи клоналната връзка между отделните щамове, базирана на коефициент на сходство (S_{AB}), или коефициент на Dice, са представени на фиг. 1 и фиг. 2. Дигиталните изображения на генерираните RAPD профили са показани на фиг. 3, а табл. 2 и 3 обобщават разпределението на типизираните VREfm в клъстерни групи.





Фиг. 2. Дендрограма, илюстрираща връзката между 51 нозокомиални щамове *E. faecium* от три болници в България, получена при RAPD-PCR с P2 праймер и базирана на коефициента на Dice



Линия М – 100-bp Ladder; линии 1-2 – щамове от МБАЛ “Д-р Тота Венкова” – Габрово; линии 3-7 – щамове от УМБАЛ “Св. Ив. Рилски”; линии 8-26, 27-29 и 31-52 – щамове от Военномедицинска академия; линия 30 – *E. faecium* ATCC 19434

Фиг. 3. RAPD профили на типизираните нозокомиални VREfm щамове, генерирани с AP4 (снимка А) и P2 (снимка В) праймери (агарозна гел-електрофореза)

Таблица 2. RAPD-PCR с AP4 праймер – групирани на VREfm в клъстерни групи от клонално свързани щамове, обособени при праг на сходство 70%

| Основни клъстерни групи (CGs) | Изолати: Номер/година на изолиране | Коефициент на сходство (S_{AB}) между изолатите в клъстера |
|-------------------------------|--|--|
| CG-I | RILSKI 504/2016, RILSKI 505/2017, MMA 326/2014, MMA 375/2014, MMA 291/2014, MMA 352/2014, MMA 358/2014, MMA 408/2015, MMA 389/2014, MMA 397/2014, GABROVO 139/2013, GABROVO 280/2014, RILSKI 378/2014, MMA 387/2014, MMA 394/2015, MMA 395/2014, MMA 453/2015, MMA 477/2015, MMA 388/2014, RILSKI 372/2014, MMA 362/2014, RILSKI 508/2017, MMA 433/2015 | 93% |
| CG-II | MMA 502/2017, MMA 487/2016, MMA 497/2016, MMA 488/2016, MMA 492/2016, MMA 493/2016, MMA 491/2016, MMA 499/2016, MMA 489/2016, MMA 490/2016, MMA 498/2016, MMA 501/2016, MMA 506/2017, MMA 456/2015, MMA 461/2015, MMA 463/2015, MMA 503/2017, MMA 478/2015, MMA 479/2015, MMA 480/2015, MMA 494/2016, MMA 507/2017, MMA 496/2016, MMA 500/2016, MMA 483/2016, MMA 495/2016, MMA 485/2016, MMA 486/2016 | 95% |

RAPD-PCR – случайна амплификация на полиморфна ДНК чрез полимеразна верижна реакция; VREfm – vancomycin-резистентни *E. faecium*; RILSKI – УМБАЛ “Св. Ив. Рилски” – София; MMA – Военномедицинска академия – София; GABROVO – МБАЛ “Д-р Тота Венкова” – Габрово

Таблица 3. RAPD-PCR с P2 праймер – групиране на VREfm в клъстерни групи от клонално свързани щамове, обособени при праг на сходство 70%

| Основни клъстерни групи (CGs) | Изолати: Номер/година на изолиране | Коефициент на сходство (S _{AB}) между изолатите в клъстера |
|-------------------------------|---|--|
| CG-I | MMA 479/2015, MMA 480/2015, MMA 506/2017, MMA 486/2016, MMA 503/2017, MMA 485/2016, MMA 507/2017, RILSKI 504/2016, MMA 494/2016, MMA 456/2015, RILSKI 378/2014, MMA 477/2015, MMA 352/2014, GABROVO 280/2014, MMA 408/2015, MMA 358/2014, MMA 395/2014, MMA 461/2015, RILSKI 372/2014, MMA 397/2014, MMA 453/2015, MMA 502/2017 | 93% |
| CG-II | GABROVO 139/2013, MMA 490/2016, MMA 496/2016, MMA 491/2016, MMA 487/2016, MMA 499/2016, MMA 498/2016, MMA 500/2016, MMA 489/2016, MMA 497/2016, MMA 492/2016, MMA 495/2016 | 90.5% |
| CG-III | MMA 362/2014, MMA 394/2015, MMA 375/2014, MMA 291/2014, MMA 387/2014 | 90% |
| CG-IV | MMA 389/2014, MMA 478/2015 | 96% |
| CG-V | MMA 488/2016, MMA 501/2016 | 96% |
| Без клъстерна принадлежност | MMA 463/2015, MMA 483/2016, MMA 433/2015, MMA 493/2016, MMA 326/2014, RILSKI 508/2017, MMA 388/2014, RILSKI 505/2017 | |

RAPD-PCR – случайна амплификация на полиморфна ДНК чрез полимеразна верижна реакция; VREfm – vancomycin-резистентни *E. faecium*; RILSKI – УМБАЛ “Св. Ив. Рилски” – София; MMA – Военномедицинска академия – София; GABROVO – МБАЛ “Д-р Тота Венкова” – Габрово

Както е видно от фиг. 1 и табл. 2, клъстерният анализ от RAPD-PCR с AP4 праймер при приложение на най-широко използвания критерий за клонална свързаност на типизираните изолати (S_{AB} ≥ 70%) (Grundmann HJ et al., 1997) показва групиране на проучените VREfm в две основни клъстерни групи (CGs) – CG-I и CG-II. В CG-I попаднаха общо 23 щамове с 93% сходство помежду им. Тази група обедини 16 изолата от Военномедицинска академия (11 от 2014 г. и 5 от 2015 г.) и всички изолати от другите две болници. CG-II включи само изолати от Военномедицинска академия (n = 28) – 6 от 2015 г. и новите изолати (2016-2017 г.), като клоналната връзка между тях беше 95%. Много високо беше сходството между всички типизирани изолати (81%), което внушава идеята за разпространение на епидемичен клон от VREfm с MDR в мониторираните болници в страната през последните години (2013-2017 г.).

Клъстерният анализ от RAPD-PCR с P2 праймер демонстрира по-голяма хетерогенност на типизираните VREfm изолати от трите болници, което се потвърждава от по-големия брой CGs, както и от наличието на щамове без клъстерна принадлежност (фиг. 2, табл. 3). Щамове с идентични или много близки RAPD профили образуваха пет главни CGs, както следва: CG-I (22 щамове, 93% клонално сходство между тях), CG-II (12 щамове, 90.5%), CG-III (5 щамове, 90%), CG-IV (2 щамове, 96%) и CG-V (2 щамове, 96%). Осем от изследваните VREfm (MMA 463, MMA 483, MMA 433, MMA 493, MMA 326, RILSKI 508, MMA 388, RILSKI 505) генерираха уникални RAPD профили и не попаднаха в нито една клъстерна група. От табл. 3 е видно, че CG-I се характеризира с най-голямо разнообразие на изолатите по отношение на мястото (от трите болници) и времето на изолиране (2014-2017 г.). CG-II обедини само щамове от Военномедицинска

академия от 2016 г. и първия VREfm, изолиран през 2013 г. в болницата в Габрово. Въпреки по-голямото разнообразие на полиморфни RAPD профили при използване на P2 праймера, 42 от типизираните общо 51 щамове (CG-I, CG-II, CG-III, CG-IV, MMA 463) показаха много висока клонална връзка помежду си (коефициент на Dice 70%), което съвпада с общоприетия критичен праг за клонална свързаност и е индикация за циркулиране на епидемични нозокомиални VREfm изолати в българските болници за периода 2013-2017 г.

ОБСЪЖДАНЕ

Нарастващата роля на бактериите от род *Enterococcus* като водещи причинители на нозокомиални инфекции, както и увеличаващата се MDR сред представителите на рода, засилват необходимостта от епидемиологично типизиране на тези микроорганизми с цел подпомагане на контрола на инфекциите в лечебните заведения [25]. Проучванията върху вътреболничните взривове и разпространението на щамове *Enterococcus* spp., притежаващи разнообразни маркери на резистентност, представляват голям интерес през последните години, в които се очертава увеличаването на VRE като причинители на опортюнистични инфекции.

Най-ранните епидемиологични проучвания на ентерококовите инфекции са се основавали на фенотипни характеристики на микроорганизмите. Класическите фенотипни методи отнемат няколко дни за изпълнение и интерпретация, а често трудно разграничават щамовете. Поради тази причина те имат ограничена стойност и се използват в комбинация с подходяща молекулярногенетична техника, което осигурява комплексен подход при изучаване разпространението на ентерококовите инфекции, тяхната епидемиология,

популационна структура, антимикробна резистентност и потенциала на вирулентност на представителите на род *Enterococcus* [10, 25].

От деведесетте години на миналия век до наши дни RAPD-PCR се прилага успешно за епидемиологично типизиране на изолати *Enterococcus* spp. [7, 21]. Този молекулярногенетичен метод притежава редица предимства: голяма флексибилност, техническа простота, относително широка достъпност на апаратура и реагенти, бърз резултат [16]. Получените полиморфни електрофоретични модели се подлагат на биоинформатичен анализ, напр. чрез непреглетения метод за групиране на двойки с помощта на средни аритметични стойности (UPGMA). Резултатите се представят във вид на дендрограми, визуално възприемащи се като филогенетични дървета, в които щамовете се обединяват в групи от по-близко свързани такива. Правилната интерпретация на дендрограмите изисква да се определи праг от процент на сходство, на чиято база се образуват клъстери от клонално свързани щамове. Сред научната общественост като критичен за клонална свързаност на щамовете най-често се приема праг от 70-75% [13, 28].

В наскоро проведено проучване беше проверена достоверността на различни прагове на коефициенти на сходство от извършен RAPD-UPGMA анализ (70%, 90% и 95%) при определяне на филогенетичното родство и способността за образуването на клъстери сред бактериоциногенни щамове *Enterococcus* spp. с различен произход (клинични и непатогенни от млечнокисели продукти) и различна географска принадлежност [9]. Беше доказано, че използването на 70% праг е неподходящо за разделяне на щамовете на базата на техния произход и географска принадлежност, както и че пълно разделяне на клиничните от непатогенните изолати *Enterococcus* spp. се постига само с прилагането на 95% праг.

Епидемиологично типизиране чрез RAPD-PCR, проведено сред нозокомиални вансомисинчувствителни *E. faecium*, изолирани през периода 2012-2015 г. от четири болници в България (трите от настоящото проучване и УМБАЛ "Св. Марина" във Варна), не установи формиране на големи географски обособени групи от клонално свързани щамове, а множество малки клъстерни групи (софийски, включващи изолати от двете болници; варненска; габровска и смесени), както и откриване на изолати без клъстерна принадлежност (25% от всички щамове), независимо от географския произход [1]. За съответния хронологичен период, във Военномедицинска академия, УМБАЛ "Св. Ив. Рилски" и МБАЛ "Д-р Тота Венкова" беше установено циркулиране на ендемични клонално свързани щамове *E. faecium*, създаващи възможности за развитие на взривове от ВБИ [1].

Преди едно десетилетие чрез RAPD-PCR беше доказано поликлонално разпространение на *vanA*-положителни VREfm в университетска болница в Истанбул [5]. Подобна поликлонална циркулация на нозокомиални VREfm беше констатирана при проучване, извършено в университетска болница в Тайван преди две десетилетия [14]. Тези открития се различават от установения единствен клон от VREfm в настоящото проучване, включващ всички изследвани щамове при използването на AP4 праймер, и 82.4% от тях при използване на P2 праймер.

В друго голямо изследване, проведено в рамките на четиригодишен период в лондонска университетска болница, бяха проучени VREfm изолати [15], при които бяха доказани няколко различни генотипа. Някои от щамовете притежаваха клонална връзка помежду си, а при други бяха установени уникални RAPD профили, както при изпълнения от нас метод с P2 праймер.

В наскоро проведено изследване, в рамките на една година, в университетска болница в Индия [6], щамове *E. faecium*, изолирани от хоспитализирани пациенти с уроинфекции, бяха генотипно охарактеризирани с цел доказване на тяхната клонална свързаност и източника на инфекцията. Резултатите от RAPD типизирането показаха формиране на два основни клъстера. В единия попаднаха щамове със 100% идентичност, изолирани от хоспитализирани по различно време пациенти в урологичното отделение на болницата, докато изолатите от втория клъстер произхождаха от други отделения. Двете клъстерни групи, включващи MDR щамове *E. faecium*, бяха с висока степен на клонално сходство, даващо основание за отнасянето им към един общ клон. Аналогични резултати бяха докладвани и от френски автори, описващи клоналното разпространение на VREfm, притежаващи *vanA* ген, по време на болничен взрив през 2015 г. във френска университетска болница [18].

Циркулиране на VR изолати *E. faecalis* от един клон в рамките на една година (август 2009-юни 2010), в педиатрично отделение на иранска болница, беше докладвано от Pourakbari и колектив [21]. Персистирането на клонално свързани щамове в болничната среда за дълго време създавало предпоставки за колонизиране на новопостъпилите пациенти и опасност от развитие на вътреболнични взривове.

Наскоро извършено мащабно проучване, обхващащо пет регионални болници в Тринидат и Тобаго, беше насочено към разпространението на нозокомиални VRE. Генотипирането показа наличие на пет различни клона при VREfm, с преобладаване на два от тях, и само един клон, състоящ се от VRE *faecalis* [4]. Беше докладвана поликлонална дисеминация на VRE в мониторираните болници и хетерогенност на ентерококовата популация.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В мониторираните болници в България беше установено циркулиране на ендемичен клон, включващ VREfm с MDR, за период от над 4 години (2013-2017 г.). Това налага упражняване на строг контрол върху разпространението на нозокомиалните ентерококови инфекции, непрекъснат надзор на антимикробната лекарствена резистентност и задълбочено епидемиологично типизиране чрез съвременни молекулярно-генетични методи на нозокомиалните VRE.

Благодарност: Проучването е финансирано по Проект с вх. № 8328/06.12.2016 г., Договор № Д-57/2017 г. от Конкурса „Грант 2017“ на СМН, Медицински университет – София.

Библиография

- Атанасова Д. Фактори на вирулентност, бактериоцини и епидемиологично типизиране на клинично значими изолати от род *Enterococcus*. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “доктор”. Медицински университет – София, 2016, 206 стр.
- Стратева Т, Атанасова Д, Димов Св, и съавт. Видова идентификация на клинично значими щамове от род *Enterococcus* – приложение на микробиологични и молекулярно-генетични методи в лабораторната практика. Медицински преглед, 2014, 50 (3), 24-30.
- Acar J, Casewell M, Freeman J, et al. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2000, 6 (9), 477-482.
- Akpaka PE, Kisson S, Jayaratne P. Molecular analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from regional hospitals in Trinidad and Tobago. *Adv. Med.*, 2016, doi: 10.1155/2016/8762691.
- Aktaş Z, Diyarbakirli P, Bal C, et al. Investigation of phenotypic and genotypic characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *Mikrobiyol. Bul.*, 2007, 41 (3), 347-56.
- Banerjee T. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) typing of multidrug resistant *Enterococcus faecium* urinary isolates from a Tertiary Care Centre, Northern India. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2013, 7 (12), 2721-2723.
- Barbier N, Saulnier P, Chachaty E, et al. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34 (5), 1096-1099.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, Pennsylvania, USA, 2016.
- Dimov SG, Strateva T, Petkova P, et al. Phylogenetic relatedness clustering thresholds of potentially bacteriocinogenic clinical and dairy *Enterococcus* spp. strains with respect to their geographic origins in Bulgaria. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.*, 2015/16, 5 (3), 286-289.
- Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, 88 (2-3), 165-188.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0, 2017. <http://eucast.org>.
- Fitzsimons NA, Cogan TM, Condon S, et al. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65 (8), 3418-3426.
- Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, et al. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35 (12), 3071-3077.
- Hsueh PR, Teng LJ, Pan HJ, et al. Emergence of vancomycin-resistant enterococci at a university hospital in Taiwan: persistence of multiple species and multiple clones. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 1999, 20 (12), 828-833.
- Issack MI, Power EG, French GL. Investigation of an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *J. Hosp. Infect.*, 1996, 33 (3), 191-200.
- Kumar NS, Gurusubramanian G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci. Vis.*, 2011, 11 (3), 116-124.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.*, 1988, 319 (3), 157-161.
- Lucet JC, Armand-Lefevre L, Laurichesse JJ, et al. Rapid control of an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a French university hospital. *J. Hosp. Infect.*, 2007, 67 (1), 42-48.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, 18 (3), 268-281.
- O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect. Drug Resist.*, 2015, 8, 217-230.
- Pourakbari B, Mahmoudi S, Aghdam MK, et al. Clonal spread of vancomycin resistance *Enterococcus faecalis* in an Iranian referral pediatrics center. *J. Prev. Med. Hyg.*, 2013, 54 (2), 87-89.
- Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, et al. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, 33 (9), 1588-1591.
- Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 2013, 34 (1), 1-14.
- Sneath PHA, Soka RR. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman Publishing, 1973, 573 p.
- Teixeira LM, Carvalho MGS, Shewmaker PL, et al. *Enterococcus*. In: Manual of clinical microbiology. 10th ed., vol. 1, J. Versalovi, K. C. Carroll, G. Funce, et al. (Eds). Washington, ASM Press, 2011, 350-364.
- Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008, 52 (3), 297-308.
- Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, et al. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, 1988, 1 (8575-6), 57-58.
- Webster CA, Towner KJ, Humphreys H, et al. Comparison of rapid automated laser fluorescence analysis of DNA fingerprints with four other computer-assisted approaches for studying relationships between *Acinetobacter baumannii* isolates. *J. Med. Microbiol.*, 1996, 44 (3), 185-194.
- Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin. Proc.*, 2006, 81 (4), 529-536.