ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ
ORIGINAL ARTICLES

Надзор на антимикробната резистентност на клинични изолати Enterococcus spp. от български болници, 2012-2015 г.

Т. Стратева[1], Д. Атанасова[1], А. Трифонова[2], Е. Савов[2], Св. Димов[3] и И. Митов[1]

[1]Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, Медицински университет – София
[2]Лаборатория по микробиология, Катедра по военна епидемиология и хигиена, Военномедицинска академия – София
[3]Катедра Генетика, Биологически факултет, Софийски университет "Св. Климент Охридски"

Surveillance of antimicrobial resistance in clinical Enterococcus spp. isolates from Bulgarian hospitals, 2012-2015

T. Strateva[1], D. Atanasova[1], A. Trifonova[2], E. Savov[2], S. Dimov[3] and I. Mitov[1]

[1]Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Medical University of Sofia
[2]Laboratory of Microbiology, Department of Military Epidemiology and Hygiene, Military Medical Academy – Sofia
[3]Department of Genetics, Faculty of Biology, Sofia University "Sv. Kliment Ohridski"

Резюме:

Четиристотин и петдесет клинично значими изолата *Enterococcus* spp. (325 *Enterococcus faecalis* и 125 *Enterococcus faecium*) бяха събрани през периода 2012-2015 г. от седем големи болници в България, с цел изследване на тяхната чувствителност към антимикробни лекарствени средства (АМЛС) според критериите на Института за клинични и лабораторни стандарти от 2014 г. Близо една трета (32.7%) от проучените изолати показаха резистентност към аминопеницилини, 52.4% притежаваха високо ниво на устойчивост към аминогликозиди (HLAR), а 4.2% бяха vancomycin-резистентни (VRE). Общо 25.1% от изолатите се отличаваха с множествена лекарствена резистентност (MDR), като беше констатирано значително увеличаване ($p < 0.05$) на тяхната честота от 13.7% през 2012 г. до 45% през 2015 г. Беше установена по-висока резистентност ($p < 0.001$) на изолатите *E. faecium* спрямо *E. faecalis*, към следните АМЛС: ampicillin, gentamicin (високо ниво), хинолони, erythromycin, nitrofurantoin и vancomycin. Нарастването на честотата на ентерококови изолати с HLAR, с MDR, както и все по-честото изолиране на VRE, в съчетание с бързото им разпространение в българските болници, налагат: непрекъснат надзор на антибиотичната резистентност, детайлно изследване върху съответните механизми и оптимизиране на провежданата антибиотична политика при лечение на инфекциите, причинени от проблемни *Enterococcus* spp.

Ключови думи: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, клинични изолати, антимикробна резистентност, надзор

Адрес за кореспонденция: *Доц. д-р Таня Стратева, д.м., Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, Медицински университет, ул. "Здраве" № 2, 1431 София, тел. 02 9172750, e-mail: dr.strateva@abv.bg*

Abstract: A total of 450 clinically relevant isolates of *Enterococcus* spp. (325 *Enterococcus faecalis* and 125 *Enterococcus faecium*) was collected during the period 2012-2015 from seven large hospitals in Bulgaria, to assess the current levels of antimicrobial susceptibility, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute – 2014 criteria. Approximately one-third (32.7%) of the studied isolates showed resistance to aminopenicillins, 52.4% were determined as isolates with high-level aminoglycoside resistance (HLAR) and 4.2% were vancomycin-resistant (VRE). 25% of all strains were multidrug resistant (MDR) and it was recorded significant augmentation ($p < 0.05$) in their prevalence – from 13.7% in 2012 to 45% in 2015. Higher resistance ($p < 0.001$) was established among *E. faecium* isolates than that in *E. faecalis* to the following antimicrobial agents: ampicillin, gentamicin (HLAR), quinolones, erythromycin, nitrofurantoin, and vancomycin. The increase in the incidence of enterococcal isolates with HLAR, with MDR, and the increasing isolation of VRE, combined with their rapid spread in Bulgarian hospitals, justify: continuous antimicrobial resistance surveillance, detailed study of the mechanisms involved and optimizing of the ongoing antibiotic policy in the treatment of infections caused by problematic *Enterococcus* spp.

Key words: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, clinical isolates, antimicrobial resistance, surveillance

Address for correspondence: *Assoc. Prof. Dr. Tanya Strateva, PhD, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Medical University, 2 Zdrave Str., Bg – 1431 Sofia, tel. +359 2 917275,; e-mail: dr.strateva@abv.bg*

Въведение

През последните две десетилетия се увеличава честотата на вътреболничните и придобитите в обществото инфекции, причинени от бактерии от род *Enterococcus* (най-вече *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*) [1]. Спектърът им включва: инфекции на уринарния тракт [8], инфекции на хирургични и рани след изгаряне [17], бактериемии и сепсиси [32], ендокардити [24], холецистити [21], перитонити [28], неонатални менингити [11] и инфекции, свързани с чужди тела (напр. уретрални и интраваскуларни катетри).

Ентерококите се превръщат в нарастващ клинико-терапевтичен проблем поради: лесната си адаптация към неблагоприятни условия на околната среда, в т.ч. и болничната; вродената си резистентност към антимикробни лекарствени средства (АМЛС) (напр. clindamycin, цефалоспорини и аминогликозиди (ниско ниво); високия капацитет за придобиване и разпространение на детерминанти на устойчивост към стратегически антибиотици (напр. генни клъстери, кодиращи резистентност към vancomycin) и не на последно място, поради голямото разнообразие от фактори на вирулентност, които могат да се експресират в макроорганизма [4, 7, 27].

Бързото разпространение на vancomycin-резистентни ентерококи (VRE), а също така на нозокомиални щамове, показващи резистентност и към аминопеницилини, както и устойчивост с високи нива към аминогликозиди, е от особено значение. Способността на ентерококите да придобиват нови гени за резистентност, включително и към АМЛС за лечение на инфекциите, причинени от VRE (като напр. linezolid, quinopristin/dalfopristin и daptomycin), също допринася за приемането на бактериите от род *Enterococcus* като “emerging pathogens”, чиято антимикробна резистентност трябва да бъде обект на непрекъснат надзор.

Целта на настоящото проучване беше да се определи и анализира чувствителността към АМЛС (обща, видова и според локализацията на инфекцията) на клинично значими изолати *Enterococcus* spp. от пациенти в седем големи болници в България, за периода 2012-2015 г.

Материал и методи

Клинични бактериални щамове

В настоящото проучване бяха включени общо 450 неповтарящи се, клинично значими щама *Enterococcus* spp., изолирани от 7 големи болници в България, през периода юни 2012 – юли 2015 г.,

от които 350 нозокомиални и 100 от нехоспитализирани (амбулаторни) пациенти. Всички щамове бяха изолирани от пациенти със симптоматични инфекции, а при уроинфекциите бактериурията беше сигнификантна (≥ 10^5 CFU/ml). Разпределението на изолатите по клинични материали беше следното: от урини – 164 броя; раневи секрети – 113; клинични материали от генитална система – 83 броя; хемокултури – 23; пунктати – 23; дренажи – 23; клинични материали от горни и долни дихателни пътища – 21 броя.

Описаните щамове бяха изолирани от пациенти, хоспитализирани или лекувани в следните болници в страната: Военномедицинска академия – София (n = 156), УМБАЛ "Св. Иван Рилски" – София (n = 117), МБАЛ "Д-р Тота Венкова" – Габрово (n = 63), МБАЛ "Благоевград" – Благоевград (n = 39), МБАЛ "Д-р Атанас Дафовски" – Кърджали (n = 35), МБАЛ "Св. Пантелеймон" – Ямбол (n = 25), и УМБАЛ "Света Марина" – Варна (n = 15).

Референтни бактериални щамове

Като контролни щамове при извършването на видова идентификация чрез биохимични и молекулярногенетични методи, както и при изпитване чувствителността на изолатите към АМЛС, бяха използвани референтните щамове *E. faecalis* ATCC 29212 и *E. faecium* 19434.

Идентификация чрез конвенционални биохимични тестове, търговски китове и системи

За видова идентификация бяха използвани: конвенционална биохимична схема, включваща тестове за разграждане с получаване на киселина на манитол, арабиноза, сорбитол, рафиноза, захароза, хидролиза на аргинин и доказване на подвижност – при 193 щама [6, 33], API Rapid ID 32 Strep (bioMérieux) (84 щама), BBL Crystal Gram-positive ID kit (Becton Dickinson) (37 щама) и автоматизираната система VITEK 2 (bioMérieux) (136 щама). Изпълнението на процедурите беше според изискванията на фирмата производител.

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 проучените щамове беше доказана чрез извършване на полимеразна верижна реакция (PCR), амплифицираща част от гена за 16S рибозомната РНК (рРНК). Чрез мултиплексна PCR бяха установени sodA гените (кодиращи ензима манган-зависима супероксид дисмутаза) на най-честите видове ентерококи (*E. faecalis, E. faecium* и *Enterococcus durans*), а при *E. faecali*s допълнително беше извършена и PCR за детекция на eda1 гена (кодиращ ензима 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконат (KDPG) алдолаза, който участва във видовоспецифичния метаболитен път на Entner-Doudoroff).

Олигонуклеотидите, използвани като праймери за амплификация, са публикувани в предишни наши проучвания [6, 31]. Реакциите на амплификация бяха извършвани в Gene Pro Thermal Cycler (Bioer), в обем 25.0 ml, 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 $MgCl_2$ 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 (от 50°C до 60°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 АМЛС

Антимикробната чувствителност на включените в проучването изолати Enterococcus spp. беше определяна чрез дифузионния дисков метод (ДДМ) на Bauer-Kirby, изпълнен съгласно инструкциите на Института по клинични и лабораторни стандарти (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI), документ M100-S24 [12]. Тестването беше извършено спрямо 12 АМЛС, както следва: ampicillin (Amp), amoxicillin/clavulanic acid (Am/Clav), ciprofloxacin (Cip), levofloxacin (Levo), gentamicin (дискове с концентрация 120 μg – G120) за доказване високо ниво на резистентност към аминогликозиди (high level aminoglycoside resistance – HLAR), vancomycin (Va), teicoplanin (Teico), tetracycline (Tet), linezolid (Lzd), erythromycin (Ery), Chloramphenicol (Chl), nitrofurantoin (NF – само при изолати *E. faecalis* и

E. faecium от урини) и fosfomycin (Fosfo – само за изолатите *E. faecalis* от урини).

Дефиниране на изолати с множествена лекарствена резистентност (MDR)

За MDR бяха считани всички клинични изолати *Enterococcus* spp., резистентни поне към три от следните АМЛС – Amp, Cip и/или Levo, G120, в съответствие с критериите, въведени от Magiorakos и сътр. [23].

Доказване продукцията на β-лактамаза

За бърза детекция на продукцията на ензима β-лактамаза, определящ резистентността към пеницилини и цефалоспорини, бяха използвани дискове, импрегнирани с нитроцефин (Liofilchem). Появата на розов или червен цвят се интерпретираше като положителна реакция, а липсата на промяна – като отрицателна.

Статистически анализ

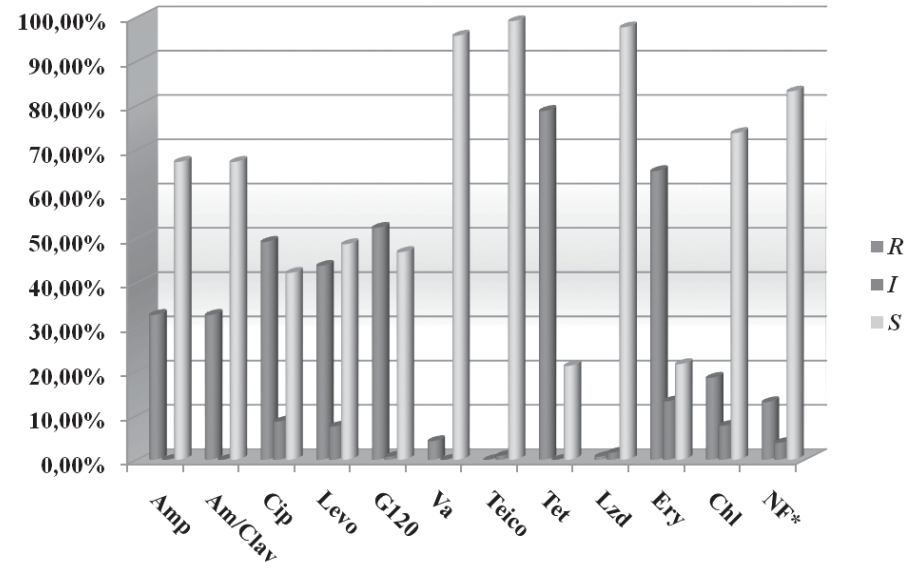
Нивата на антимикробна резистентност, в съответствие с вида и произхода на изолатите, бяха сравнявани и оценявани чрез t-тест на Стюдънт. За статистически значими бяха приемани стойности на p под 0.05.

Резултати и обсъждане

Обща антимикробна чувствителност на клинично значимите щамове Enterococcus spp.

Общата антимикробна резистентност (изразена в % резистентни щамове) беше, както следва: към Amp – 32.7%, G120 – 52.4% (съответстваща на щамове с HLAR), Cip – 49.2%, Levo – 43.8%, Ery – 65.2%, Tet – 78.8%, Chl – 18.5%, Va – 4.2%, Teico – 0%, Lzd – 0.7%, NF – 12.8% (само за изолатите от урини). Общо 147 от всичките 450 щама ентерококи (32.7%) бяха ampicillin-резистентни. При тях с нитроцефинов диск беше изследвана продукцията на β-лактамаза. Тестът беше отрицателен при всички изолати, което определя и устойчивост към комбинираните АМЛС, съдържащи ampicillin или amoxicillin плюс инхибитор на β-лактамазата (sulbactam или clavulanic acid). Беше установен висок дял на щамове, резистентни към Tet (78.8%) и хинолонови препарати – Cip (49.2%) и Levo (43.8%). HLAR беше открита сред близо половината изолати. Бяха изолирани общо 19 (4.2%) vancomycin-резистентни изолата. Щамовете показаха абсолютна *in vitro* чувствителност (100%) към Teico по ДДМ. Чувствителността към АМЛС на колекционираните клинично значими щамове *Enterococcus* spp. (n = 450), е представена на фиг. 1.

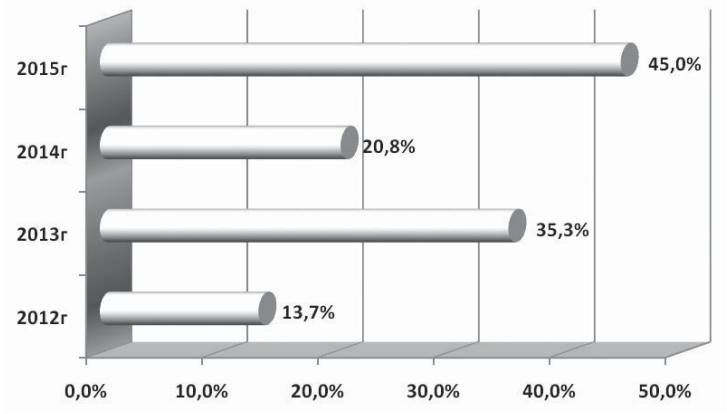
В настоящото проучване беше установена по-висока резистентност спрямо докладваната от Bender и колектив в Бразилия, като по отношение на някои антибиотици разликите бяха статистически значими. Щамовете от Бразилия показаха по-ниско ниво на резистентност спрямо докладваната за нашите – съотв. 2.5% срещу 32.7%, (p < 0.001) към Amp, 0.5% / 4.2% към Va, 2% / 13% към NF, 62.1% / 65.2% към Ery, 64.5% / 78.8% към Tet, 30% / 49.2% към Cip, 22.2% / 52.4% към G120 (p < 0.001) [9].



Фиг. 1. Обща антимикробна чувствителност (в %) на проучените 450 клинично значими изолата *Enterococcus* spp. Amp – ampicillin, Am/Clav – amoxicillin/clavulanic acid, Cip – ciprofloxacin, Levo – levofloxacin, G120 – gentamicin 120 μg (високо ниво на резистентност към аминогликозиди), Va – vancomycin, Teico – teicoplanin, Tet – tetracycline, Lzd – linezolid, Ery – erythromycin, Chl – chloramphenicol, NF – nitrofurantoin, S – чувствителни изолати, I – междинно чувствителни, R – резистентни изолати; *Антимикробна чувствителност, определена само при изолати от урини

В наскоро проведено проучване Bhatt и сътр. докладват значително по-висока резистентност сред изолати *Enterococcus* spp., колекционирани за периода 2011-2014 г. в Индия, спрямо установената в нашето изследване. Резистентността към тестваните АМЛС е, както следва: 97.5% срещу 32.7% (p < 0.001) към Amp; 14% / 4.2% към Va; 14% / 0% към Teico; 62% / 49.2% (p < 0.01) към Cip; 51% / 43.8% към Levo; 65% / 52.4% към G120 и 2% / 0.7% към Lzd. Екипът съобщава за значително висок дял на изолати с множествена резистентност (multidrug resistance, MDR) – 63%, като при някои от тях беше установена липса на чувствителност към всички тествани препарати [10]. В друго изследване, проведено също в Индия, е установена подобна значително по-висока резистентност, в сравнение с нашите резултати: 64.9% срещу 32.7% в нашето изследване (p < 0.001) към Amp; 19.6% / 4.2% към Va; 11.3% / 0% към Teico; 95.5% / 49.2% (p < 0.001) към Cip; 73.5% / 52.4% (p < 0.001) към G120; 2.4% / 0.7% към Lzd; 92.1% / 65.2% (p < 0.001) към Ery; 84.5% / 78.8% към Tet; 79.7% / 13% (p < 0.001) към NF и 42.3% / 18.5% (p < 0.001) към Chl [13].

Една четвърт (25.1%) от изследваните в настоящата работа щамове *Enterococcus* spp. (113/450) бяха MDR. MDR щамовете *E. faecalis* бяха 8% (26/325), а MDR *E. faecium* съответно 69.6% (87/125). Ентерококовите изолати с MDR фенотип лесно оцеляват в гастроинтестиналния тракт и могат да се превърнат в доминираща флора в резултат на продължителна антибиотична употреба, предшестващо тежко заболяване или налична имуносупресия [26]. Такива щамове представляват сериозно предизвикателство за съвременната медицина, тъй като лечението на инфекциите е много трудно и те са свързани с висок леталитет. На фиг. 2 е представена динамиката в разпространението на MDR щамове *Enterococcus* spp. в мониторираните болници, за периода от 2012 г. до 2015 г. Беше отчетено значимо нарастване (p < 0.05) на дела MDR *Enterococcus* spp. за проучения тригодишен период (от 13.7% (14 MDR от общо 102 изолата) през 2012 г. до 45% (27/60) през 2015 г.).



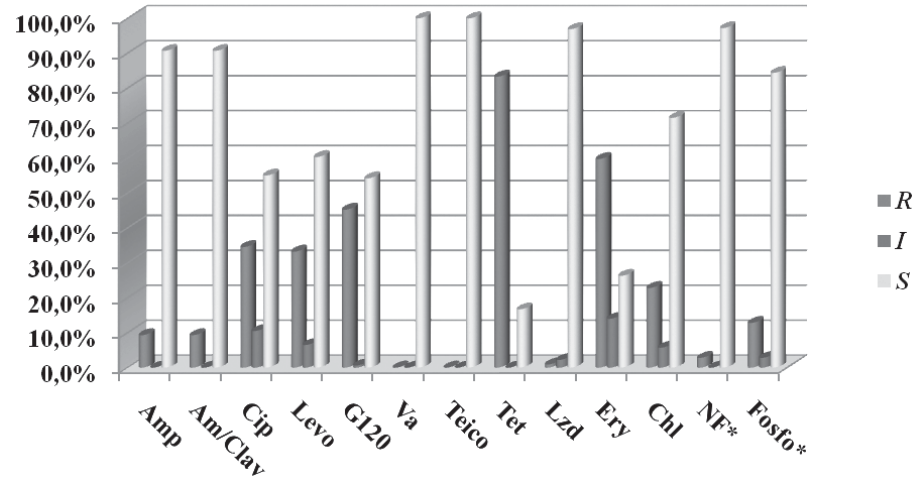
Фиг. 2. Хронологична динамика в разпространението на щамове Enterococcus spp. с множествена резистентност (в %) в мониторираните болници в България

В наскоро извършено проучване в Корея е изследвано нивото на резистентност сред изолати *Enterococcus* spp. с различен произход. Там е установена значително по-висока честота на MDR щамовете спрямо докладваната от нас (87.2%, p < 0.001) [22]. В Индия също е докладвана значително по-висока честота на MDR изолати ентерококи от последните години (63%, p < 0.001), като подобно на нашите данни MDR фенотипът е по-разпространен сред *E. faecium* (72% срещу 69.6%) в сравнение с *E. faecalis* (45% срещу 8%, p < 0.001) [10].

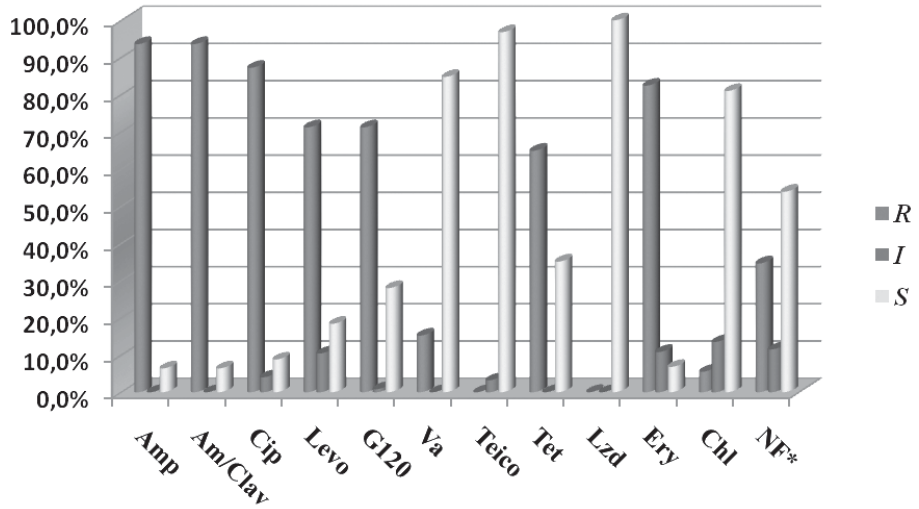
Нарастващото разпространение на MDR ентерококи превръща в голямо предизвикателство контрола на инфекциите, предизвикани от тях, в европейските страни. По данни на Европейския център за профилактика и контрол на инфекците (ECDC) за 2013 г. беше докладвано намаляване на процента HLAR изолати *E. faecalis* в редица европейски страни през последните години. От друга страна, бяха отчетени промени по отношение на VRE. Беше наблюдавано значително нарастване на честотата на VR *E. faecium* през последните четири години, което е индикатор за промяна в епидемиологията на заболяванията, предизвикани от VRE в Европа [16].

Сравнителна антимикробна чувствителност на изолатите E. faecalis и E. faecium

Проучените щамове *E. faecium* (n = 125) бяха значително по-резистентни към АМЛС (p < 0.001) в сравнение с *E. faecalis* (n = 325), съответно: към Amp – 93.6% / 9.3%, G120 – 71.2% / 45.2%, Cip – 87.2% / 34.5%, Levo – 71.2% / 33.2%, Va – 15.2% / 0%, Ery – 82.4% / 59.7%, NF – 34.6% / 2.8%, докато щамовете E. faecalis показаха по-висока резистентност към Tet – 83.3% / 64.9% (p < 0.01) и Chl – 22.8% / 5.5% (p < 0.001), спрямо E. faecium. На фиг. 3 и 4 е представена антимикробната чувствителност на изследваните щамове *E. faecalis* и *E. faecium*.



Фиг. 3. Антимикробна чувствителност (в %) на проучените 325 клинично значими изолата *E. faecalis*. Amp – ampicillin, Am/Clav – amoxicillin/clavulanic acid, Cip – ciprofloxacin, Levo – levofloxacin, G120 – gentamicin 120 μg (високо ниво на резистентност към аминогликозиди), Va – vancomycin, Teico – teicoplanin, Tet – tetracycline, Lzd – linezolid, Ery – erythromycin, Chl – chloramphenicol, NF – nitrofurantoin, Fosfo – fosfomycin, S – чувствителни изолати, I – междинно чувствителни, R – резистентни изолати;*Антимикробна чувствителност, определена само при изолати от урини



Фиг. 4. Антимикробна чувствителност (в %) на проучените 125 клинично значими изолата *E. faecium*. Amp – ampicillin, Am/Clav – amoxicillin/clavulanic acid, Cip – ciprofloxacin, Levo – levofloxacin, G120 – gentamicin 120 μg (високо ниво на резистентност към аминогликозиди), Va – vancomycin, Teico – teicoplanin, Tet – tetracycline, Lzd – linezolid, Ery – erythromycin, Chl – chloramphenicol, NF – nitrofurantoin, S – чувствителни изолати, I – междинно чувствителни, R – резистентни изолати;*Антимикробна чувствителност, определена само при изолати от урини

Подобни резултати са докладвани в проучване на индийски автори. Щамовете *E. faecium* от Индия показват по-висока резистентност спрямо съответната при E. faecalis към следните АМЛС: Amp – 98% / 97.3%, G120 – 76% / 61.3%, Cip – 74% / 58%, Levo – 64% / 46.7% и Va – 44% / 4%, p < 0.001 [10]. Наскоро, също в Индия, Deshpande и сътр. установяват по-висока резистентност на *E. faecium* срямо *E. faecalis*, както следва: Amp – 73.6% / 61.3%, G120 – 77% / 72.1%, Cip – 96.5% / 95.1%, Va – 21.8% / 18.6%, Ery – 96.5% / 90.2% и NF – 90.8% / 75% [13].

Мащабно проучване на Средкова [4], обобщаващо дългогодишни изследвания върху антимикробната резистентност на голям брой клинични изолати ентерококи (n = 575), определя приблизително половината от щамовете *E. faecium* като резистентни към Amp (42.8%), като установената резистентност е значително по-ниска (p < 0.001) от докладваната от нашия колектив (93.6%), което може да се обясни с изолирането на нашите щамове в по-късен период (след 2011 г.). По-ниска е резистентността и на изолатите *E. faecalis* (2%) спрямо установената в настоящото изследване (9.3%). Докладваната HLAR от Средкова също показва по-ниски нива, спрямо докладваните от нас (съотв., при щамовете *E. faecalis* – 38.0% спрямо 45.2% при нас, а при *E. faecium* 31.8% спрямо 71.2%, p < 0.001).

Във Военномедицинска академия – София, през 2011 г., не се съобщава значително нарастване спрямо предходните години на резистентността на ентерококите към Lzd и Teico, използвани при лечение на инфекции, причинени от VRE, като ванкомициновата резистентност в същата болница при *E. faecalis* е била 3.06%, а при *E.*

faecium – 5.3%. Впечатление прави обаче, че почти половината от всички изолирани през съответната година клинично значими ентерококи в болницата се характеризират с HLAR, което силно намалява опциите за използване на gentamicin в комбинация с антибактериални препарати, инхибиращи синтеза на пептидогликана, особено при лечението на животозастрашаващите инфекции на сърдечно-съдовата система [2, 3].

По данни на European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS, сега позната като EARS-Net) резистентността към Amp за нашата страна бележи постепенно увеличение при изолатите *E. faecalis* – от 4.7% през 2010 г. до 11.6% през 2012 г., а през 2013 г. се наблюдава рязко намаляване до 1.9%. При изолатите *E. faecium*, резистентността към Amp остава висока – 100% през 2010 г. и 88.4% през 2013 г. [14]. Установената в настоящата работа резистентност на *E. faecalis* и *E. faecium* към аминопеницилини е малко по-висока от докладваната средна устойчивост за България през 2013 г. [14].

Според годишния отчет на EARS-Net за 2012 г. процентът на HLAR за Европа при *E. faecalis* е 26.5%. Процентът на инвазивните изолати с HLAR за отделните страни варира между 10.4% (Кипър) и 56.2 % (Унгария). В четири страни (Кипър, Германия, Гърция и Испания) е установено статистически значимо намаляване на HLAR за периода 2009-2012 г. В нито една страна не е доказано статистически значимо повишаване на HLAR за същия период [15]. През 2013 г. средната HLAR в Европа при *E. faecalis* бележи повишаване (30.9%), като за отделните страни варира от 14.7% (Франция) до 61.1% (Латвия). Динамика в повишаването на HLAR за периода 2010-2013 г. е наблюдавана само в Белгия, докато в пет други държави (Чехия, Франция, Германия, Гърция и Люксембург) е отбелязан спад в нивото на HLAR [16]. HLAR при изолатите *E. faecalis* в настоящото проучване (45.2%) е по-висока спрямо средната (30.9%) за европейските страни през 2013 г. По данни на EARS-Net HLAR при изолатите *E. faecalis* от България постепенно нараства от 30.6% през 2011 г. до 47.1% през 2013 г. Наблюдавана е тенденция за леко понижаване на HLAR при *E. faecium* (от 79.4% през 2011 г. до 76.7% през 2013 г.), но въпреки това тя остава висока [14].

В годишния отчет на EARS-Net за 2012 г. процентът на инвазивните VR *E. faecium* изолати, за периода 2009-2012 г., варира от нула (България, Хърватия, Естония, Исландия, Люксембург, Малта, Холандия, Словения и Швеция) до 44% (Ирлания), което е в пряка корелация с антибиотичната консумация на vancomycin в различните държави. Статистически значимо увеличаване на гликопептидната резистентност е наблюдавано в Чехия и Германия, а намаляването ѝ е констатирано в Хърватия, Гърция и Словения [15]. По данни на EARS-Net за 2013 г., процентът на резистентност към vancomycin при инвазивните изолати *E. faecium* е бил 8.9%, като варира от нула (Естония, Литва, Малта и Швеция) до 42.7% (Ирландия) [16]. Статистически значимо повишаване на резистентността към този антибиотик, за периода 2010-2013 г. е отчетено в четири страни (Дания, Германия, Унгария и Великобритания) за разлика от Белгия, в която се забелязват тенденции за намаляване на процента гликопептидна резистентност [16]. През 2013 г. честотата на VR *E. faecalis* за нашата страна е била 2.8%, а при *E. faecium* – 2.3% [14].

Сравнителна антимикробна чувствителност на изолатите Enterococcus spp. по клинични материали

Антимикробната резистентност на щамовете варира според вида на клиничните материали, от които са изолирани (табл. 1). Беше установена висока резистентност към Tet при изолатите от генитална система (90.3%), кръв (86.9%), дренажи (82.6%), пунктати (73.9%) и дихателна система (61.9%). Също така висока резистентност беше открита и спрямо Ery при изолатите от дренажи (78.2%), дихателна система (66.6%), кръв (60.8%), генитална система (60.2%) и пунктати (52.1%). Най-голяма резистентност към Amp (73.9%), HLAR (73.9%), хинолони (73.9% и 78.2%) и vancomycin (30.4%) беше доказана при щамовете *Enterococcus* spp. от дренажи. Прави впечатление значимо по-ниската ($p < 0.05$-0.001) аминопеницилинова резистентност на изолатите от генитална система (6%) в сравнение с отчетените стойности при ентерококовите изолати от всички други клинични материали (вариращи от 28.6% до 73.9%). Беше установен и значимо помалък дял ($p < 0.01$-0.001) на ентерококови изолати с HLAR от генитална система (31.3%), спрямо съответния от урини (54.3%), рани (60.1%), дихателна система (61.9%) и дренажи (73.9%). Също така изолатите *Enterococcus* spp. от генитална система се отличиха със сигнификантно по-ниска ($p < 0.05$-0.001) устойчивост към Cip (22.9%) в сравнение с тези от другите клинични материали с изключение на респираторните (51.3-78.2%). Находките, касаещи сравнител-

ната антимикробна резистентност на ентерококовите изолати от генитална система и другите клинични материали, могат да бъдат обяснени с видовата принадлежност на щамовете от тази група – 79 бр. *E. faecalis* и само 4 бр. *E. faecium*, а както беше дискутирано по-горе, *E. faecalis* обичайно се характеризира с по-ниска устойчивост към АМЛС.

Таблица 1. Сравнителна антимикробна резистентност (в % резистентни щамове) на проучените изолати *Enterococcus* spp. (n = 450) според вида на клиничните материали (CLSI / M100-S24, 2014)

Антимикробни лекарствени средства	Изолати от урини (n = 164)	Изолати от рани (n = 113)	Изолати от генитална система (n = 83)	Изолати от хемокултури (n = 23)	Изолати от дихателна система (n = 21)	Изолати от пунктати (n = 23)	Изолати от дренажи (n = 23)	Общо (n = 450)
Ampicillin	40.2	31.8	6.0	34.7	28.6	39.1	73.9	**32.7**
Vancomycin	2.4	3.5	1.2	8.7	4.7	0	30.4	**4.2**
Teicoplanin	0	0	0	0	0	0	0	**0**
Ciprofloxacin	57.3	51.3	22.9	52.1	33.3	56.5	78.2	**49.2**
Levofloxacin	21.9	50.4	22.9	47.8	33.3	43.5	73.9	**43.8**
Gentamicin $_{120}$*	54.3	60.1	31.3	52.1	61.9	47.8	73.9	**52.4**
Erythromycin	8.5	66.3	60.2	60.8	66.6	52.1	78.2	**65.2**
Tetracycline	3.7	73.4	90.3	86.9	61.9	73.9	82.6	**78.8**
Linezolid	0	0	2.4	0	0	0	0	**0.7**
Chloramphenicol	1.8	70.7	21.7	17.4	9.5	17.4	8.6	**18.5**
Nitrofurantoin**	12.8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	**-**
Fosfomycin**	26.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	**-**

* Антимикробен агент, използван за скрининг на ентерококи с високо ниво на резистентност към аминогликозиди (всички резистентни щамове); ** Антимикробни агенти, тествани само при изолатите от урини; fosfomycin – подходящ за уроинфекции, причинени от *E. faecalis*; N/A, not applicable (неприложим)

При изолатите от урини в настоящото проучване докладваната антимикробна резистентност беше, както следва: Cip >G_{120} > Amp > Levo > Fosfo > NF. В хода на проучването бяха изолирани 4 VR щама *E. faecium* от урокултури. Сходна със нашата HLAR (54.3%) е докладвана от Средкова при изолати от урокултури от Университетската болница в Плевен, вариращa от 46.34% до 48.80% през мониторирания период (2007-2010 г.) [4]. Сходни са и нивата на хинолонова резистентност в двете български проучвания. Данните за антимикробната резистентност към Cip на колектива от Плевен показват нарастване на честотата на нечувствителните към Cip ентерококи от 36.2% през 2007 г. до 56.5% през 2010 г., което логично е свързано с увеличената употреба на хинолонови препарати в болничната и извънболничната помощ [4].

В наскоро проведено изследване в Иран, анализиращо резистентността сред изолати *Enterococcus* spp. от урини, е докладвана по-висока хинолонова резистентност от тази на нашите изолати (65.4% / 57.3%), докато аминопеницилиновата резистентност е по-ниска (28.2% / 40.2%) [30]. В друго проучване в Индия резистентността при ентерококите, които се посочват като третия по-честота причинител на инфекции на уринарния тракт, е значително по-висока от докладваната от нашия колектив по отношение на следните АМЛС – Cip (78% / 57.3%, $p < 0.05$), G_{120} (78% / 54.3%, $p < 0.01$) и Amp (57% / 40.2%) [20].

При изолатите от рани най-висока беше резистентността към Tet – 73.4%. Сравнително висока устойчивост беше отбелязана и спрямо други антибиотици: Chl (70.7%), Ery (66.3%), G120 (60.1%), Cip (51.3%), Levo (50.4%) и Amp (31.8%). В наскоро проведено изследване върху ентерококи, причинители на раневи и мекотъканни инфекции при пациенти в травматологични отделения в Индия е установена значително по-висока резистентност към някои от използваните АМЛС спрямо установената от нас – Ery (91.4% / 66.3%, $p < 0.001$), G_{120} (93.9% / 60.1%, $p < 0.001$), Cip (86.5% / 51.3%, $p < 0.001$), Levo (79.2% / 50.4%, $p < 0.001$) и Amp (89% / 31.8%, $p < 0.001$). Единствено тетрациклиновата резистентност в индийското проучване беше по-ниска спрямо докладвана от нас – 59.7% / 73.4% [29].

В настоящото проучване най-висока резистентност при изолатите от хемокултури беше отчетена по отношение на Tet (86.9%). При другите тествани АМЛС тя беше, както следва: Ery (60.8%), G_{120} (52.1%), Cip (52.1%), Levo (47.8%), Amp (34.7%), Chl (17.4%) и Va (8.7%). Във вече споменатото проучване в Университетската болница в Плевен е установен по-малък процент

ентерококови изолати от хемокултури с HLAR (28.1%) [4] спрямо установената от нас (52.1%). В изследване на Стоева и колектив [5], проучващо тенденциите в развитието на проблемната антибиотична резистентност сред най-важните причинители на бактериемии в УМБАЛ "Св. Марина" – Варна, за периода 2007-2011 г., са анализирани общо 620 инвазивни изолата от хемокултури. Бактериите от род *Enterococcus* са докладвани като етиологични причинители в 8% от случаите, като чувствителността към гликопептидни антибиотици (Va и Teico) е напълно съхранена за разлика от установената ванкомицинова резистентност, открита в нашето проучване (8.7%).

Сходна с нашата HLAR (52.1%) при инвазивни изолати от хемокултури е докладвана от Mendiratta и сътр. (46%) сред *Enterococcus* spp. изолати, колекционирани в по-ранен период в Индия [25]. В по-ново индийско проучване сред изолати от хемокултури на пациенти със септицемия е докладвана значително по-висока резистентност към някои АМЛС спрямо установената от нас – Ery (76% / 60.8%), Cip (72% / 52.1%), Amp (58% / 34.7%, $p < 0.05$) и G_{120} (60% / 52.1%), като честотата на MDR щамовете в тяхната работа е 54% [19]. Близка до нашата HLAR е и установената от испански колектив (60%) сред ентерококови щамове от пациенти с бактериемия, изолирани за периода 2007-2009 г. [18].

Изводи

1. За периода 2012-2015 г. близо една трета (32.7%) от проучените клинични щамове *Enterococcus* spp. от седем големи болници в България показаха резистентност към аминопеницилини, 52.4% притежаваха високо ниво на устойчивост към аминогликозиди (HLAR), а 4.2% бяха vancomycin-резистентни.

2. За мониторирания тригодишен период бяха установени 25.1% изолати *Enterococcus* spp. с множествена лекарствена резистентност (MDR), като беше констатирано значително увеличаване ($p < 0.05$) на тяхната честотата – от 13.7% през 2012 г. до 45% през 2015 г., което затрудняваше избора на терапия при инфекции, причинени от такива изолати.

3. Беше установена сигнификантно по-висока резистентност ($p < 0.001$) на изолатите *E. faecium* спрямо *E. faecalis* по отношение на почти всички АМЛС: Amp, G_{120} (HLAR), Cip, Levo, Va, Ery и NF. От друга страна, констатираната HLAR при изследваните *E. faecalis* и честотата на vancomycin-резистентните *E. faecium* бяха по-високи от средната за Европа през последните години.

4. Нарастването на честотата на ентерококови изолати с HLAR, с MDR фенотип, както и все по-честото изолиране на VRE, в съчетание с бързото им разпространение в българските болници, налагат: непрекъснат надзор на антимикробната резистентност, детайлно изследване върху съответните механизми и оптимизиране на провежданата антибиотична политика при лечение на инфекциите, причинени от проблемни *Enterococcus* spp.

Библиография

1. Атанасова, Д., И. Митов, Т. Стратева. Ентерококите – етиологични причинители на различни клинични инфекции. Здраве и наука, VI, 2016, № 2: 3-8.
2. Савов, Е. и съавт. Резистентността към антибиотици – световно предизвикателство. Превантивна медицина, 2, 2014, № 7: 3-9.
3. Савов, Е. На прага ли сме на постантибиотичния апокалипсис? София, 2015, Издателски център "Военно издателство".
4. Средкова, М. Терапевтично проблемни ентерококи. Плевен, 2012, Издателски център "МУ – Плевен".
5. Стоева, Т., К. Божкова и М. Божкова. Тенденции в развитието на проблемната антибиотична резистентност сред най-важните причинители на бактериемии в УМБАЛ "Св. Марина" – Варна, за периода 2007-2011 г., като част от Европейската мрежа за надзор над антибиотичната резистентност (EARS-Net). Мед. преглед, 49, 2013, № 1: 41-49.
6. Стратева, Т. и др. Видова идентификация на клинично значими щамове от род Enterococcus – приложение на микробиологични и молекулярно-генетични методи в лабораторната практика. Мед. преглед, 50, 2014, № 3: 24-30.
7. Arias, C. A. et B. E. Murray. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. Nat. Rev. Microbiol., 10, 2012, № 4: 266-278.
8. Barros, M., R. Martinelli et H. Rocha. Enterococcal urinary tract infections in a university hospital: clinical studies. Braz. J. Infect. Dis., 13, 2009, № 4: 294-296.
9. Bender, E. A. et al. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of Enterococcus spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. Braz. J. Microbiol. 40, 2009, № 3: 693-700.
10. Bhatt, P. et al. Emergence of multidrug resistant enterococci at a tertiary care centre. Med. J. Armed. Forces India, 71, 2015, № 2: 139-144.
11. Bretón, J. R. et al. Neonatal meningitis due to Enterococcus spp.: presentation of four cases. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 20, 2002, № 9: 443-447.
12. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Four Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
13. Deshpande, V. R., M. G. Karmarkar et P. R. Mehta. Prevalence of multidrug-resistant enterococci in a tertiary care

hospital in Mumbai, India. J. Infect. Dev. Ctries., 7, 2013, № 2: 155-158.
14. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). http://www.rivm.nl/earss/result/.
15. European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).Stockholm: ECDC; EARSS results Available from: http://www.rimv.nl/earss/result/
16. European Centre for Disease Prevention and Control. (2014). Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2013. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance network (EARS-Net).Stockholm: ECDC; EARSS results. available from: http://www.rimv.nl/earss/result/
17. Falk, P. S. et al. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a burn unit. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 21, 2000, № 9: 575-582.
18. García-Vázquez, E. et al. Study of a cohort of patients with Enterococcus spp. bacteraemia. Risk factors associated to high-level resistance to aminoglycosides. Rev. Esp. Quimioter., 26, 2013, № 3: 203-213.
19. Jain, S. et al. Clinico-epidemiological profile and high-level aminoglycoside resistance in enterococcal septicemia from a tertiary care hospital in east Delhi. Int. J. Appl. Basic Med. Res., 1, 2011, № 2: 80-83.
20. Kaur, N. et al. Urinary tract infection: aetiology and antimicrobial resistance pattern in infants from a tertiary care hospital in northern India. J. Clin. Diagn. Res., 8, 2014, № 10: DC01-03.
21. Khardori, N. et al. Infections associated with biliary drainage procedures in patients with cancer. Rev. Infect. Dis., 13, 1991, № 4: 587-591.
22. Kwon, K. H. et al. Occurrence of antimicrobial resistance and virulence genes, and distribution of enterococcal clonal complex 17 from animals and human beings in Korea. J. Vet. Diagn. Invest., 24, 2012, № 5: 924-931.
23. Magiorakos, A. P. 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., 18, 2012, № 3: 268-281.
24. McDonald, J. R. et al. Enterococcal endocarditis: 107 cases from the international collaboration on endocarditis merged database. Am. J. Med., 118, 2005, № 7: 759-766.
25. Mendiratta, D. K. et al. Status of high level aminoglycoside resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis in a rural hospital of central India. Indian J. Med. Microbiol., 26, 2008, № 4: 369-371.
26. Miller, W. R., J. M. Munita et C. A. Arias. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert Rev. Anti Infect. Ther., 12, 2014, № 10: 1221-1236.
27. Mundy, L. M., D. F. Sahm et M. Gilmore. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev., 13, 2000, № 4: 513-522.
28. Pérez-Fontán, M., A. Rodríguez-Carmona et M. Rodríguez-Mayo. Enterococcal peritonitis in peritoneal dialysis patients: last name matters. Perit. Dial. Int., 31, 2011, № 5: 513-517.
29. Rajkumari, N., P. Mathur et M. C. Misra. Soft tissue and wound infections due to Enterococcus spp. among hospitalized trauma patients in a developing country. J. Glob. Infect. Dis., 6, 2014, № 4: 189-193.
30. Sharifi, Y. et al. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. Adv Pharm Bull., 3, 2013, № 1: 197-201.
31. Strateva, T. et al. Incidence and expression of bacteriocin-encoding genes in Enterococcus spp. isolates from clinical specimens and traditional Bulgarian artisanal cheeses. Comptes Rendus de l'Academie bulgare des Sciences, 68, 2015, № 7: 925-934.
32. Suppli, M. et al. Mortality in enterococcal bloodstream infections increases with inappropriate antimicrobial therapy. Clin. Microbiol. Infect., 17, 2011, № 7: 1078-1083.
33. Teixeira, L. M. et al. Enterococcus. In: Manual of clinical microbiology. 10th ed., vol. 1, J. Versalovi, K. C. Carroll, G. Funce, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, and D. W. Warnock (Eds). Washington, ASM Press, 2011, 350-364.

Постъпила за печат на 9 януари 2016 г.

ОФЕРТИ ЗА РЕКЛАМНО УЧАСТИЕ В ИЗДАНИЯТА НА ЦМБ:

1. Отпечатване на многоцветна рекламна страница:
- на корица – 720 лв.;
- в книжното тяло – 600 лв.

2. Отпечатване на черно-бяла реклама и/или текст за 1 страница – 150 лв.

3. Разпространение на готова вложка със списание – 1.20 лв./брой.

При отпечатване на повече от една реклама се правят отстъпки по договаряне.

По желание на рекламодателя многоцветните реклами могат да бъдат придружени от безплатно отпечатване на 1 страница текст след съгласуване на съдържанието му с редколегията.

Всеки рекламодател получава книжки от списанието.