



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА МИКРОБИОЛОГИЯ**

**д-р Преслава Михайлова Христова - Трифонова**

**ФЕНОТИПНИ И ГЕНОТИПНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ  
ВАНКОМИЦИН-РЕЗИСТЕНТНИ ЕНТЕРОКОКИ ПРИ  
ПАЦИЕНТИ С ВИСОК РИСК ЗА КОЛОНИЗАЦИЯ И ИНФЕКЦИЯ  
С ПРОБЛЕМНИ МИКРООРГАНИЗМИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане  
на образователна и научна степен „Доктор“  
Научна специалност „Медицинска микробиология“

**Научни ръководители:**

Доц. д-р Христина Йотова Хиткова, дм

Доц. д-р Весела Васкова Узунова - Райкова, дм

**Официални рецензенти:**

Проф. д-р Таня Василева Стратева, дм

Проф. д-р Ива Стефанова Христова, дмн

**София  
2022**

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

**АДБПБ** – автозомно-доминантна бъбречна поликистозна болест  
**БКБ** – бъбречно-каменна болест  
**ВАОС** – вродена аномалия на отделителната система  
**ВБИ** – вътреболнични (нозокомиални) инфекции  
**ДДМ** – дисково-дифузионен метод  
**КА** – кръвен агар  
**КАИЛ** – Клиниката по анестезиология и интензивно лечение  
**МПК** – минимална потискаща концентрация  
**НЦЗПБ** – Национален център по заразни и паразитни болести  
**ОАИЛ** – Отделение по анестезиология и интензивно лечение  
**ОНКО** – онкологична  
**ХБН** – хронична бъбречна недостатъчност  
**ХГН** – хроничен гломерулонефрит  
**ХД** – хемодиализа  
**ХЗСН** – хронична застойна сърдечна недостатъчност  
**ХОББ** – хронична обструктивна белодробна болест  
**ХПН** – хроничен пиелонефрит  
**ХТ** – хематология  
**ace/acm** – ген, кодиращ колаген-свързващ протеин  
**agg/asa1** – ген, кодиращ агрегираща субстанция  
**AMEs** – аминокликозид-модифициращи ензими  
**AMP** – ampicillin  
**ARA** – арабиноза  
**BEAV** – жлъчка-ескулин азид с vancomycin  
**CI** – доверителен интервал  
**CIP** – ciprofloxacin  
**cyI** – ген, кодиращ цитолизин  
**DAP** – daptomycin  
**efaA** – ген за ендокардит-специфичен антиген А  
**esp** – ген, кодиращ ентерококов повърхностен протеин

**FN** – фалшиво отрицателни  
**FP** – фалшиво положителни  
**Fss** – повърхностен протеин на *E. faecalis*  
**EUCAST** – Европейски комитет за тестване на антимикробната чувствителност  
**GEN** – gentamicin  
**gelE** – ген, кодиращ желатиназа  
**HLGR** – високо ниво на резистентност към gentamicin  
**hyl** – ген, кодиращ хиалуронидаза  
**IPM** – imipenem  
**LAP** – левцин аминоксидлаза  
**LVX** – levofloxacin  
**LZD** – linezolid  
**MAN** – манитол  
**MGP** – метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид  
**MLVA** – мултилокусен анализ на вариабилен брой от тандемни повтори  
**MOT** – подвижност  
**NPV** – отрицателна прогнозна стойност  
**PCR** – полимеразна верижна реакция  
**PIG** – пигмент  
**PFGE** – пулсова гел електрофореза  
**PPV** – положителна прогнозна стойност  
**PYR** – L-пиролинидол ариламидаза  
**Q/D** – quinupristin/dalfopristin  
**RAF** – рафиноза  
**SBL** – сорбитол  
**STM** – streptomycin  
**TEC** – teicoplanin  
**TGC** – tigecycline  
**TN** – истински отрицателни  
**TP** – истински положителни  
**VAN** – vancomycin  
**vanC** – ентерококи с вродени ниски нива на резистентност към гликопептиди  
**VR** – ванкомицин-резистентен  
**VRE** – ванкомицин-резистентни ентерококи  
**VS** – ванкомицин-чувствителен  
**VSE** – ванкомицин-чувствителни ентерококи

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ентерококите са широко разпространени в природата и могат да бъдат намерени в почва, вода, храна и различни животни, включително бозайници, птици, насекоми и влечуги. При хората те са част от нормалната микрофлора на тънкото и дебелото черво и по-рядко се откриват в други области, като пикочно-половите пътища, устната кухина и перинеалната област.

При определени обстоятелства ентерококите, колонизиращи интестиналния тракт, се разпространяват в други области и причиняват инфекции. През последните години нарастват вътреболничните инфекции (ВБИ), свързани с тези микроорганизми. Ентерококите са втори по честота причинители на ВБИ в САЩ и съответно трети в Европа. Техният утвърден успех като водещи нозокомиални патогени се дължи до голяма степен на вродена им резистентност към основни класове антимикробни лекарствени средства и способността им да придобиват нови гени, кодиращи резистентност към почти всички антибиотици с антиентерококова активност. Обичайно прилаганите терапевтични препарати като пеницилини, аминогликозиди и флуорохинолони имат слабо изразена активност, а цефалоспорините нямат действие срещу ентерококите.

След появата на първите щамове ванкомицин-резистентни ентерококи (VRE) в края на 80-те години на миналия век, ванкомициновата резистентност при *Enterococcus* spp. е нараснала значително и с бърз темп. Разпространени са болнични клонове ванкомицин-резистентни (VR) *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis* с множество детерминанти на резистентност и фактори на патогенност. Понастоящем, VRE са описани навсякъде, като

честотата им варира широко в различните страни. Най-често колонизирани и/или инфектирани са възрастни и тежко болни пациенти с коморбидни заболявания, лекувани в хематологични и онкологични отделения, диализни центрове, отделения по анестезиология и интензивно лечение и др. Ендемичността на VRE в тези звена е най-висока, с варираща честота при различните групи пациенти.

На фона на високата резистентност на ентерококите към vancomycin в света, в България до 2012 г. не са регистрирани инвазивни VRE. Впоследствие, VRE и по-специално VR *E. faecium* се изолират с нарастващи темпове, и понастоящем те присъстват във всички големи болници в страната.

Независимо от изключително големия брой публикации за VRE в световен мащаб у нас проучванията в тази насока са малко. Оскъдни са данните за фенотипните и генотипните свойства на циркулиращите VRE изолати, за гените, кодиращи тяхната антимикробна резистентност и детерминанти на вирулентност, за рисковите фактори и честотата на фекална колонизация с VRE при хоспитализирани пациенти, за възможностите на различните хранителни среди при VRE фекален скрининг и т.н. Това обуславя необходимостта от задълбочени изследвания в тази насока, част от които са обект на настоящия дисертационен труд.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Целта** на настоящата дисертационна работа е да се проучат фенотипните и генотипни характеристики на клинични и интестинални ванкомицин-резистентни ентерококи (VRE) и рисковите фактори за колонизация и инфекция с тези бактерии при хоспитализирани пациенти.

За реализиране на тази цел бяха поставени следните **задачи**:

1. Да се оценят възможностите на различни видове селективни хранителни среди за първично изолиране и идентифициране на интестинални VRE.
2. Да се проучи интестиналната колонизация с VRE при групи пациенти с висок риск за колонизация и инфекция с проблемни микроорганизми.
3. Да се анализира разпространението на клинични VRE в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен.
4. Да се определи антимикробната чувствителност и гените, кодиращи резистентност към гликопептиди и аминогликозиди при изолираните клинични и интестинални VRE.
5. Да се проучат гените, кодиращи фактори на вирулентност, при изолираните клинични и интестинални VRE.
6. Да се извърши епидемиологично типизиране на изолираните клинични и интестинални VRE.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Бактериални изолати

Проучени са общо **186 VRE**, от които:

- **117** клинични изолати – **94 VRE** от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен (2016 г. – 2020 г.); **23 VRE** от Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ „Токуда“, София (2020 г.); **5 VRE** от МБАЛ „Сърце и мозък“ (2019 г.) и **4 VRE** от УМБАЛ „Св. Марина“, Плевен (2017 г. – 2020г.).
- **69** интестинални ентерококи, всички изолирани при фекален скрининг за VRE на имунокомпрометирани пациенти от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен, за периода 2017 г. – 2019 г.

#### 2. Фекални проби

Общо **506 проби** (250 ректални секрета и 256 фецеса)

- **159** ректални секрета от **97** пациенти на хемодиализа;
- **256** фецеса от **119** лица с малигнени хематологични заболявания;
- **91** ректални секрета от **91** пациенти, лекувани в интензивни звена.

#### 3. Пациенти

Проучени са демографските и клинични рискови фактори на общо **392** пациенти, лекувани в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен за периода 01.01.2016 г. – 31.12.2020 г.

**3.1.** **307** пациенти, скринирани за интестинално VRE носителство;

**3.2.** **85** пациенти с доказани VR *E. faecium* изолати.

#### 4. Хранителни среди и условия за култивиране

**4.1.** Хранителни среди за първично изолиране на клинични VRE.

**4.2.** Хранителни среди за първично изолиране на интестинални VRE – Brilliance™ VRE Agar (Oxoid, UK); chromID™ VRE Agar (bioMerieux, France); HiCrome™ VRE Modified Agar (HIMEDIA, India); Bile Aesculin Azide Vancomycin Broth (Liofilchem, Italy).

**4.3.** Хранителни среди, използвани за субкултивиране на положителни BAEV бульони или на първично изолирани интестинални VRE от хромогенни среди и др.

## **5. Антимикробни средства**

## **6. Методи за фенотипна идентификация на ентерококи**

**6.1.** Конвенционални методи.

**6.2.** Идентификация чрез Rapid™ STR System (Oxoid, UK).

**6.3.** Идентификация чрез автоматизирани системи.

## **7. Методи за изпитване на чувствителност**

**7.1.** Дисково-дифузионен метод на Kirby-Bauer .

**7.2.** Градиент-дифузионен метод (E-тест).

## **8. Генетични методи за изследване**

**8.1.** Методи за изолиране и измерване на ДНК.

**8.2.** Мултиплекс PCR за откриване на гени, кодиращи видова принадлежност, антибиотична резистентност и фактори на вирулентност.

**8.3.** Методи на епидемиологично типизиране на VRE

**8.3.1.** Мултилокусен анализ на вариабилен брой от тандемни повтори (MLVA)

**8.3.2.** Пулсова гел електрофореза (PFGE)

## **9. Статистически методи**

**9.1.** GraphPad Prism version 7.00

**9.2.** SPSS Software version 7.00

## IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

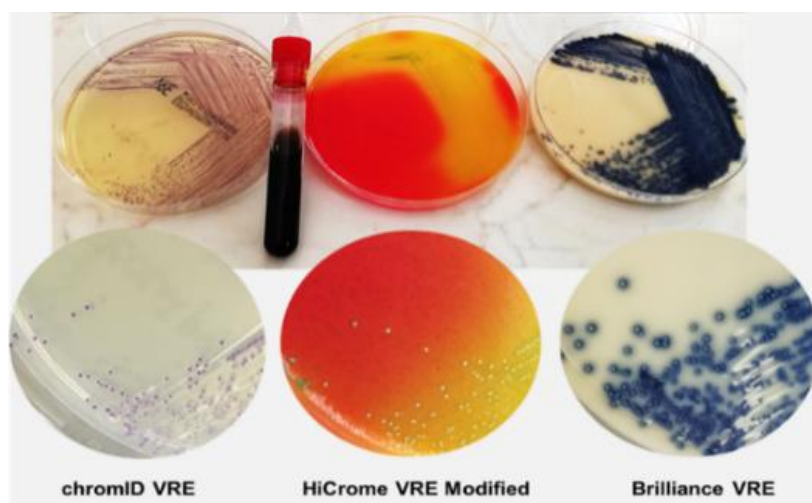
### 1. ОЦЕНКА НА СЕЛЕКТИВНИ ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE

#### 1.1. Резултати от проучването на четири селективни хранителни среди

При посявка на общо 159 ректални секрета върху четири селективни хранителни среди, бактериален растеж показаха 101 проби. Изолирани бяха общо 211 бактериални агента: 33 VRE, 7 ванкомицин-чувствителни ентерококи (VSE), 11 Грам-положителни, каталаза-отрицателни коки, не принадлежащи към род *Enterococcus*, 34 Грам-положителни пръчки и 126 Грам-отрицателни чревни бактерии (**Таблица 1**). Изолираните 33 VRE са представени от 7 VR *E. faecium* (3 неповтарящи се и 2 повтарящи се изолата), 1 *E. gallinarum* с VanA фенотип и 25 ентерококи с VanC фенотип, съответно 15 *E. gallinarum* (11 неповтарящи се и 2 повтарящи се изолата) и 10 *E. casseliflavus* (6 неповтарящи се и 2 повтарящи се изолата). Общият брой на неповтарящите се VR ентерококови изолати бе 27 – 5 *E. faecium*, 14 *E. gallinarum* и 8 *E. casseliflavus*.

Шест VR *E. faecium* (2 неповтарящи се и 2 повтарящи се изолата) са доказани от трите хромогенни среди и BEAV бульона, а един VR *E. faecium* – само от бульона. Един *E. gallinarum* и един *E. casseliflavus* са култивирани едновременно от HiCrome VRE Modified и BEAV бульон. В допълнение един *E. gallinarum* с VanA фенотип, 23 ентерококи с VanC фенотип, 2 VSE (1 *E. faecium* и 1 *E. faecalis*), 11 Грам-положителни, каталаза-отрицателни коки и 34 Грам-положителни пръчки са изолирани само от BEAV бульона.

Отчетлив растеж на шестте VR *E. faecium* с лилав цвят на колониите е установен върху Brilliance VRE и chromID VRE след 24 часа инкубиране (**Фигура 1**). На 48<sup>-ия</sup> час от инкубацията не са отчетени нови VRE на тези две среди. На тях е култивиран 1 VS *E. faecium* с лилав цвят на колониите, характерен за VR *E. faecium*. Освен това са изолирани 1 *E. hirae* със светло-син цвят на колониите върху Brilliance VRE и 1 VS *E. faecalis* със синьо-зелен цвят на колониите върху chromID VRE. Според инструкциите на фирмите-производители тези два щама би трябвало да бъдат презумптивно идентифицирани като VR *E. faecalis*. Възможността за растеж на VSE върху chromID VRE и Brilliance VRE е описана в редица публикации (Delmas et al. 2007; Grabsch et al. 2008; Asir et al. 2009; Ongut et al. 2013; Soares et al. 2017). Наличието на фалшиво-положителни VR ентерококови изолати е предпоставка за ненадеждна идентификация на VRE от една страна и намаляване специфичността на използваната хромогенна среда от друга.



**Фигура 1.** Колонии на VR *E. faecium* №17/ХД върху три хромогенни среди и позитивен BEAV бульон.

Всички BEAV бульони се позитивираха след 24 часа инкубация. При субкултивиране на положителните BAЕV бульони върху

неселективния хромогенен агар chromID CPS Elite, седемте VR *E. faecium* растяха с виолетов цвят на колониите. Щамът *E. gallinarum* с високо ниво на резистентност към vancomycin демонстрира тъмно син цвят на колониите, докато колониите на всички ентерококи с VanC фенотип показаха зелен цвят.

Резултатите от култивирането на пробите дават възможност да се определи чувствителността, специфичността, положителната прогнозна стойност и отрицателната прогнозна стойност на всяка от хромогенните среди и BEAV бульона (**Таблица 2**). Представените данни показват, че от BEAV бульона са доказани най-голям брой истински положителни и фалшиво положителните VR ентерококови изолати, респективно 7 и 28. Чувствителността на трите тествани хромогенни агара е 85.7% (CI=48.7 – 99.3), а на BEAV бульона е 100% (CI=64.6 – 100). Brilliance VRE и chromID VRE демонстрират идентична специфичност от 98.7% (CI=95.3 – 99.8), докато специфичността на HiCrome VRE Modified и BEAV бульона е съответно 96.7% (CI=92.5 – 98.6) и 81.6% (CI=74.7 – 86.9). Относно положителната прогнозна стойност, тя е 20% (CI=10 – 35.9) за BEAV бульона, 54.6% (CI=28 – 78.7) за HiCrome VRE Modified и е еднаква за Brilliance VRE и chromID VRE – 75% (CI=40.9 – 95.6). Отрицателната прогнозна стойност е 100% (CI=97 – 100) за BEAV бульона и 99.3% (CI=96.3 – 100) за трите хромогенни среди. Suwantarat и съавт. (Suwantarat et al. 2014) тестват пет различни хромогенни агара за изолиране на VRE от фекални проби и установяват чувствителност 89.9% – 94.9% и специфичност 98.3% – 99.7%. Тези резултати са сравними с наблюдаваната в настоящето пручване чувствителност от 85.7% и специфичност от 96.7% до 98.7% за трите изпитани хромогенни среди.

**Таблица 1.** Брой и групиране на бактериите, изолирани при посявка върху селективни среди на 159 ректални секрета

Среда	Брой ентерококи с VanA фенотип <sup>a</sup>		Брой ентерококи с VanC фенотип <sup>b</sup>		Брой VSE изолати <sup>c</sup>			Брой неентерококови изолати
	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. hirae</i>	
<b>BAEV бульон</b>	7	1	15	10	1	1	NA <sup>g</sup>	Грам-положителни, каталаза-отрицателни коки <sup>d</sup> ( <i>S. mutans</i> (1), <i>S. gallolyticus</i> (1), <i>S. sanguinis</i> (1), <i>L. garvieae</i> (2), <i>L. mesenteroides</i> (2), <i>L. pseudomesenteroides</i> (3), <i>P. pentosaceus</i> (1)), Грам-положителни пръчки (34) <sup>e</sup>
<b>Brilliance VRE</b>	6	NA	NA	NA	1	NA	1	NA
<b>chromID VRE</b>	6	NA	NA	NA	1	1	NA	NA
<b>Himedia VRE</b>	6	NA	1	1	2	1	NA	Чревни бактерии, част от нормалната интестинална флора (126) <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Брой ентерококи с VanA фенотип, изолирани от хромогенна среда и BEAV бульон, идентифицирани с VITEK 2 Compact и VITEK MS, резистентни на vancomycin (MIC > 4µg/ml) и teicoplanin (MIC > 2µg/ml).

<sup>b</sup> Брой ентерококи с VanC фенотип, изолирани от хромогенна среда и BEAV бульон, идентифицирани с VITEK 2 Compact и VITEK MS, резистентни на vancomycin (MIC ≥ 4µg/ml) и чувствителни на teicoplanin.

<sup>c</sup> Брой VSE, изолирани от хромогенна среда и BEAV бульон, идентифицирани с VITEK 2 Compact и VITEK MS, чувствителни на vancomycin и teicoplanin.

<sup>d</sup> Брой Грам-положителни, каталаза-отрицателни коки, идентифицирани с VITEK 2 Compact.

<sup>e</sup> Брой Грам-положителни пръчки. Те не са напълно идентифицирани, но са групирани на база морфология на колониите и оцветяване по Грам.

<sup>f</sup> Брой чревни бактерии, част от нормалната интестинална флора. Те са групирани на база морфология на колониите и оцветяване по Грам.

<sup>g</sup>Неприложимо (not applicable, NA).

**Таблица 2.** Анализ на хромогенните среди и BEAV бульона за детекция на VRE при посявка на 159 ректални секрета

Среда	Брой изолати <sup>a</sup>				Производителност на тестовете % (95% CI) <sup>b</sup>			
	TP	FP	TN	FN	Чувствителност	Специфичност	PPV	NPV
<b>BEAV бульон</b>	7	28	124	0	100 (64.6 - 100)	81.6 (74.7 - 86.9)	20 (10 - 35.9)	100 (97 - 100)
<b>Brilliance VRE</b>	6	2	150	1	85.7 (48.7 - 99.3)	98.7 (95.3 - 99.8)	75 (40.9 - 95.6)	99.3 (96.3 - 100)
<b>chromID VRE</b>	6	2	150	1	85.7 (48.7 - 99.3)	98.7 (95.3 - 99.8)	75 (40.9 - 95.6)	99.3 (96.3 - 100)
<b>HiCrome VRE</b>	6	5	147	1	85.7 (48.7 - 99.3)	96.7 (92.5 - 98.6)	54.6 (28 - 78.7)	99.3 (96.3 - 100)

<sup>a</sup> Истински положителни (true positive, TP) – изолати с подходящо оцветени колонии, растящи директно върху хромогенна среда или на субкултура от BAЕV бульон, идентифицирани чрез базови фенотипни тестове и автоматизирани системи като *E. faecium*, резистентни на vancomycin (MIC > 4µg/ml). Фалшиво положителни (false positive, FP) – изолати с типично оцветени колонии на хромогенна среда или на субкултура от BAЕV бульон, които не са идентифицирани като VR *E. faecium*. Истински отрицателни (true negative, TN) – липса на растеж върху хромогенна среда или на субкултура от BAЕV бульон или растеж на колонии без типичното оцветяване и морфология за VR *E. faecium* на съответната среда. Фалшиво отрицателни (false negative, FN) – отсъствие на VR *E. faecium* изолат върху всички хромогенни среди, но наличен изолат от BEAV бульон.

<sup>b</sup> Доверителен интервал (confidence interval, CI); Положителна прогнозна стойност (positive predictive value, PPV) – вероятността на позитивиралите се за VRE селективни хранителни среди да бъдат истински положителни; Отрицателна прогнозна стойност (negative predictive value, NPV) – вероятността на негативните за VRE селективни хранителни среди да бъдат истински отрицателни.

## 1.2. Резултати от идентификацията с базови фенотипни тестове

На биохимична идентификация бяха подложени 45 неповтарящи се изолата, суспектни за VRE. Те показаха морфология на Грам-положителни коки и не продуцираха ензима каталаза. Общо 36 изолата позитивираха класическите фенотипни тестове, характерни за род *Enterococcus*: растеж в среда с 40% жлъчни соли и хидролиза на ескулин, растеж в 6.5% NaCl, позитивен PYR и LAP тест. Впоследствие 34 от тях бяха идентифицирани като вид ентерококи, а два – като *L. garvieae*. Останалите 9 Грам-положителни каталаза-отрицателни коки демонстрираха вариабилни резултати по отношение на посочените фенотипни тестове и бяха групирани като *Enterococcus*-like микроорганизми.

Резултатите от фенотипните тестове за презумптивно определяне на видовата принадлежност на всички неповтарящи се интестинални изолати от род *Enterococcus* показаха, че *E. faecium* изолатите са MGP отрицателни, ферментират манитол и арабиноза и хидролизират аргинин, а ферментация на сорбитол и рафиноза е доказана съответно при 2 и 3 от тях. Биохимичните тестове на *E. faecalis* изолатите са сходни с тези на *E. faecium*, с изключение на ферментацията на арабиноза. Данните за МПК към гликопептидите показват, че само 5 *E. faecium* са резистентни на vancomycin (МПК  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ) и teicoplanin (МПК 4 – 6  $\mu\text{g/ml}$ ). Останалите 3 *E. faecium*, 3 *E. faecalis* и *E. hirae* са чувствителни към двата гликопептида, поради което отпаднаха от проучването.

*E. gallinarum* и *E. casseliflavus* изолатите са подвижни, MGP положителни, ферментират манитол, арабиноза и рафиноза, а всички *E. casseliflavus* образуват жълт пигмент. Два *E. casseliflavus* ферментират сорбитол, а хидролиза на аргинин е доказана при 20 от общо 22 VanC щама. Нито един ентерококов изолат не ферментира сорбоза. Относно резистентността към гликопептиди, един *E. gallinarum* е с високо ниво на резистентност към vancomycin (МПК  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ ) и teicoplanin (МПК  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ ) – VanA фенотип, а останалите *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* са с ниски нива на резистентност към vancomycin (МПК 4 – 12  $\mu\text{g/ml}$ ) и чувствителност към teicoplanin (МПК 0.50 – 0.75  $\mu\text{g/ml}$ ) – VanC фенотип.

### **1.3. Резултати от идентификацията с мануални и автоматизирани системи, и детекцията на гени за видова принадлежност**

Всички 27 неповтарящи се VR ентерококови изолата бяха идентифицирани до вид посредством мануалния тест Rapid STR, автоматизираните системи VITEK 2 Compact и VITEK MS и PCR за детекция на видово специфични *ddl* гени.

Чрез Rapid STR е определена коректно видовата принадлежност на 20 (74.1%) ентерококови изолата, от които 5 *E. faecium* (вероятност  $> 99.9\%$ ), 10 *E. gallinarum* (вероятност: 89.45 –  $> 99.9\%$ ) и 5 *E. casseliflavus* (вероятност: 98.5% –  $> 99.9\%$ ). Седем vanC ентерококи са идентифицирани погрешно въпреки високия процент на достоверност (98.59 –  $> 99.9\%$ ). Четири *E. gallinarum* са определени първо като *E. casseliflavus*, а 3 *E. casseliflavus* обратно – като *E. gallinarum*. Appelbaum и съавт. (Appelbaum et al. 1986) използват Rapid STR за определяне на

видовата принадлежност на 48 изолата, от които 46 (93.7%) са коректно идентифицирани съответно като *E. faecalis* – 28, *E. faecium* – 9 и *E. durans* – 9.

Автоматизираната система Vitek 2 Compact дава дефинитивна биохимична идентификация при 21 от общо 27 VRE (77.8%), а при 6 (22.2%) е налице ниско ниво на видова дискриминация между *E. casseliflavus* и *E. gallinarum*. Резултатите от Vitek 2 Compact показват висока степен на сходство в субстратния профил на *E. faecium* изолатите и ниво на вероятност от 90% (Good identification) до 97% (Excellent identification). Системата Vitek MS определя точна видова принадлежност при всички VRE изолати, като данните напълно корелират с доказаните видово специфични *ddl* гени. Ramotar и съавт. (Ramotar et al. 2000) съобщават, че от 115 *vanC1* изолата, 13 са коректно определени като *E. gallinarum*, 45 са посочени като *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*, 27 са погрешно идентифицирани като *E. faecalis* или *E. faecium*, а 29 VRE са потвърдени само до родово ниво. Поради по-малката способност на VITEK за доказване на non-*faecalis* и non-*faecium* видове, през последните години се препоръчва употребата на системата MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight) (Teixeria et al. 2015).

## **2. ПРОУЧВАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНАТА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВИСОК РИСК ЗА КОЛОНИЗАЦИЯ И ИНФЕКЦИЯ С ПРОБЛЕМНИ МИКРООРГАНИЗМИ**

### **2.1. Демографски и клинични характеристики на проучените пациенти**

Данните за демографските показатели на 307 пациенти (97 от Клиниката по ХД, 119 от Клиниката по ХТ и 92 от КАИЛ), скринирани за фекално носителство на VRE показва, че възрастният им диапазон е 18 – 89 години, като най-голям е делът на пациентите от 70 до 79 години (общо 90) и от 60 до 69 (общо 82). Тези две възрастови групи преобладават и в трите клинични звена и съставляват общо 56% от всички болни.

Анализът на информацията за пола на всички проучени пациенти разкрива почти еквивалентно съотношение между мъжете – 158 (51.5%) и жените – 149 (48.5%). В отделните клинични звена, обаче, разпределението е неравномерно. В Клиниката по ХД мъжете са почти двойно повече от жените – мъже:жени 61:36, докато в КАИЛ е обратното – мъже:жени 27:64.

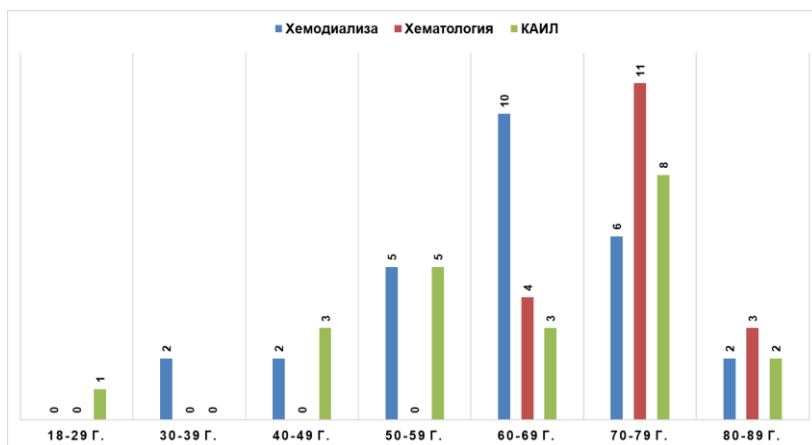
Обобщените резултати от проучването на основните демографски и клинични показатели на скринираните пациенти са следните:

- При пациентите на хемодиализа средната възраст е  $61.95 \pm 12.08$  години, (диапазон: 26-83 години), а средната продължителност на диализното лечение е 63 месеца (диапазон:1-337 месеца). При 94.9% от тях седмичният брой на диализата е трикратен, а при 71.1% съдовият достъп за осъществяване на диализната процедура е чрез артерио-венозна фистула. Прием на

антибиотици през последните 30 дни са имали 86.6% от всички лица.

- При пациентите с малигнени хематологични заболявания средната възраст е  $66.94 \pm 12.69$  години (диапазон: 20-88 години), а средната продължителност на болничния престой е 9 дни (диапазон 6-46 дни). Най-честото основно заболяване е миелодиспластичен синдром, установен при 23.5% от болните. Около 10% от всички пациенти са приемали антибиотици по време на болничния престой и/или през последните 30 дни.
- При пациентите на интензивно лечение средната възраст е  $58.60 \pm 16.25$  години (диапазон: 18-87 години), а средната продължителност на болничния престой е 15 дни (диапазон: 3-105 дни). Водеща причина за постъпване в интензивно отделение при 69.2% от болните е необходимостта от следоперативни грижи. Придружаващо сърдечно-съдово заболяване е регистрирано при около половината от пациентите (44%). По време на болничния престой 93.4% са приемали антибиотици.

На **Таблицы 3, 4 и 5** са отразени демографски и клинични данни на колонизирани и неколонизирани с VRE пациенти в трите рискови групи.



**Фигура 2.** Разпределение по възраст на колонизирани с VRE пациенти.

**Таблица 3.** Демографски и клинични данни на 97 пациенти на хемодиализа, изследвани за фекално носителство на VRE

Характеристики	VRE колонизирани	VRE неколонизирани	p-value
<b>Демографски</b>			
Възраст (години)	63.56 ± 2.3	61.33 ± 1.45	NS
Пол, мъже:жени	16:11	45:25	NS
<b>Основно заболяване; n (%)</b>			
Хроничен гломерулонефрит	9 (33.3)	14 (20)	NS
Артериална хипертония	9 (33.3)	22 (31.4)	NS
ВАОС	-	2 (2.9)	NS
Захарен диабет тип II	3 (11.1)	12 (17.1)	NS
Хроничен интерстициален нефрит	1 (3.7)	2 (2.9)	NS
Хроничен пиелонефрит	1 (3.7)	5 (7.1)	NS
Агенезия	-	4 (5.7)	NS
Балканска ендемична нефропатия	-	1 (1.4)	NS
АДБПБ	3 (11.1)	7 (10)	NS
Захарен диабет тип I	-	1 (1.4)	NS
Мултиплен миелом	1 (3.7)	-	NS
Продължителност на хемодиализата (месеци), средно (диапазон)	71.4 (2-252)	59.71 (1-337)	NS
0-12 месеца	7 (25.9)	12 (17.1)	NS
13-60 месеца	8 (29.6)	37 (52.9)	<b>0.040</b>
Над 60 месеца	12 (44.4)	21 (30)	NS
<b>Кратност на хемодиализата (за седмица); n (%)</b>			
Еднократна	-	2 (2.9)	NS
Двукратна	2 (7.4)	1 (1.4)	NS
Трикатна	25 (92.6)	67 (95.7)	NS
<b>Съдов достъп</b>			
Артерио-венозна фистула	17 (63)	52 (74.3)	NS
Постоянен тунелизиран катетър	13 (48.1)	19 (27.1)	<b>0.049</b>
Графт	-	1 (1.4)	NS
<b>Придружаващи заболявания; n (%)</b>			
Сърдечно-съдови	15 (55.6)	41 (58.6)	NS
- Артериална хипертония	7 (25.9)	27 (38.6)	NS
- Сърдечна недостатъчност	8 (29.6)	14 (20)	NS
Ендокринни	1 (3.7)	4 (5.7)	NS
- Захарен диабет тип II	1 (3.7)	3 (4.3)	NS
- Хипертиреозидизъм	0	1 (1.4)	NS
Респираторни	2 (7.4)	4 (5.7)	NS
- ХОББ	1 (3.7)	3 (4.3)	NS
- Астма	1 (3.7)	1 (1.4)	NS
Пикочо-полови	2 (7.4)	7 (10)	NS
- ХГН	-	1 (1.4)	NS
- БКБ	1 (3.7)	5 (7.1)	NS
- ХПН	1 (3.7)	1 (1.4)	NS
Хепатобилиарни	3 (11.1)	4 (5.7)	NS
Злокачествени образувания	3 (11.1)	5 (7.1)	NS
Подагра	1 (3.7)	3 (4.3)	NS

**Легенда** ВАОС: вродена аномалия на отделителната система; АДБПБ: аутозомно-доминантна бъбречна поликистозна болест ХОББ: хронична обструктивна белодробна болест; ХГН: хроничен гломерулонефрит; БКБ: бъбречно-каменна болест; ХПН: хроничен пиелонефрит.

Продължение на **Таблица 3.**

<b>Употреба на антибиотици през последните 30 дни; n (%)</b>			
Пеницилини	1 (3.7)	3 (4.3)	NS
1-ва генерация цефалоспорини	-	3 (4.3)	NS
2-ра генерация цефалоспорини	3 (11.1)	6 (8.6)	NS
3-та генерация цефалоспорини	21 (77.8)	55 (78.6)	NS
4-та генерация цефалоспорини	7 (25.9)	9 (12.9)	NS
Карбапеними	-	1 (1.4)	NS
Монобактами	-	4 (5.7)	NS
Аминогликозиди	9 (33.3)	26 (37.1)	NS
Флуорохинолони	4 (14.8)	10 (14.3)	NS
Антифунгални препарати	1 (3.7)	4 (5.7)	NS
Vancomycin	7 (25.9)	5 (7.1)	<b>0.033</b>
Metronidazole	2 (7.4)	6 (8.6)	NS

**Таблица 4.** Демографски и клинични данни на 119 пациенти с малигнени хематологични заболявания, изследвани за фекално носителство на VRE

<b>Характеристики</b>	<b>VRE колонизирани</b>	<b>VRE неколонизирани</b>	<b>P-value</b>
<b>Демографски</b>			
Възраст (години)	74.31±6.58	65.52±13.37	<b>0.025</b>
Пол, мъже:жени	12:6	57:44	NS
Средна продължителност на болничния престоя (дни)	11.15±4.705	8.57± 5.11	NS
<b>Основно хематологично заболяване; n (%)</b>			
Миелодиспластичен синдром	3 (23.08)	20 (20.83)	NS
Неходжкинов лимфом	0	25 (26.04)	NS
Мултиплен миелом	7 (53.85)	13 (13.54)	<b>0.001</b>
Хронична лимфоцитна левкемия	2 (15.38)	13 (13.54)	NS
Ходжкинов лимфом	0	9 (9.38)	NS
Хронична еритремия	0	4 (4.17)	NS
Остра миелобластна левкемия	1 (7.69)	4 (4.17)	NS
Остра лимфобластна левкемия	0	3 (3.13)	NS
Остра миеломоноцитна левкемия	0	2 (2.08)	NS
Остра промиелоцитна левкемия	0	1 (1.04)	NS
Космато клетъчна левкемия	0	1 (1.04)	NS
Хронична моноцитна левкемия	0	1 (1.04)	NS
<b>Рискови фактори; n (%)</b>			
ХЗСН	9 (69.23)	48 (50)	NS
ХОББ	1 (7.96)	10 (10.42)	NS
ХБН	2 (15.38)	7 (7.29)	NS
Захарен диабет тип II	5 (38.46)	18 (18.75)	NS
Затлъстяване	2 (15.38)	14 (14.58)	NS
Химиотерапия	8 (61.54)	45 (46.88)	NS
Употреба на кортикостероиди	7 (53.85)	39 (40.63)	NS
<b>Употреба на антибиотици по време на болничния престой и/или през последните 30 дни; n (%)</b>			
3-та генерация цефалоспорини	1 (7.96)	3 (3.13)	NS
Флуорохинолони	1 (7.96)	2 (2.08)	NS
Макролиди	0	4 (4.17)	NS
Антифунгални препарати	0	2 (2.08)	NS

**Легенда** ХЗСН: хронична застойна сърдечна недостатъчност; ХОББ: хронична обструктивна белодробна болест; ХБН: хронична бъбречна недостатъчност.

**Таблица 5.** Демографски и клинични данни на 91 пациенти на интензивно лечение, изследвани за фекално носителство на VRE

Характеристики	VRE колонизирани	VRE неколонизирани	p-value
<b>Демографски</b>			
Възраст (години)	62.5 ± 14.83	57.36 ± 16.59	NS
Пол, мъже:жени	7:15	20:49	NS
Средна продължителност на болничния престоя (дни)	16.86 (3-55)	14 (3-105)	NS
<b>Причина за постъпване в КАИЛ; n (%)</b>			
Септичен шок	2 (9.1)	5 (7.3)	NS
Следоперативни грижи	8 (36.4)	55 (79.7)	< 0.001
Дихателна недостатъчност	3 (13.6)	3 (4.3)	NS
Травма	2 (9.1)	2 (2.9)	NS
Други*	7 (31.8)	4 (5.8)	0.003
<b>Придружаващи заболявания; n (%)</b>			
Сърдечно-съдови	16 (72.7)	28 (40.6)	0.009
Респираторни	2 (9.1)	5 (7.2)	NS
Хепатобилиарни	1 (4.5)	4 (5.8)	NS
Гастроентерологични	1 (4.5)	3 (4.3)	NS
Пикочо-полови	1 (4.5)	3 (4.3)	NS
Ендокринни	5 (22.7)	14 (20.3)	NS
Злокачествени образувания	1 (4.5)	8 (11.6)	NS
Скорешни коремни операции	5 (22.7)	21 (30.4)	NS
<b>Употреба на инвазивни катетри; n (%)</b>			
ЦВК	21 (95.5)	57 (82.6)	NS
Дренажна тръба	16 (72.7)	57 (82.6)	NS
Назогастрална сонда	4 (18.2)	17 (24.6)	NS
Уретрален катетър	12 (54.5)	42 (60.9)	NS
Ендотрахеална тръба	15 (68.2)	65 (94.2)	0.003
<b>Употреба на антибиотици по време на болничния престой; n (%)</b>			
Пеницилини	1 (4.5)	4 (5.8)	NS
1-ва генерация цефалоспорини	1 (4.5)	1 (1.4)	NS
3-та генерация цефалоспорини	13 (65)	54(76.1)	NS
4-та генерация цефалоспорини	1 (4.5)	1 (1.4)	NS
Карбапенеми	3 (13.6)	4 (5.8)	NS
Аминогликозиди	-	7 (10.1)	NS
Metronidazole	7 (31.8)	31 (44.9)	NS
Флуорохинолони	1 (4.5)	3 (4.3)	NS
Tigecycline	-	3 (4.3)	NS
Vancomycin	1 (4.5)	3 (4.3)	NS
Антифунгални препарати	5 (22.7)	10 (14.5)	NS
Colistin	2 (9.1)	2 (2.9)	NS
Clindamycin	1 (4.5)	2 (2.9)	NS
Linezolid	-	3 (4.3)	NS

\*Други: Пътнотранспортни произшествия (n=5); Тежки интоксикации (n=4); Суицидни наранявания (n=2).

**Фигура 2** показва възрастта на колонизираните с VRE пациенти в обхванатите клинични звена. Видно е, че най-често са засегнати лицата от 70 до 79 години (25 от 67 – 37.3%) и от 60 до 69 години (17 от 67 – 25.4%), а най-рядко тези от 18 до 29 години (1 от 67 – 1.5%).

Тези данни кореспондират с демографските характеристики на групите проучени пациенти, т.е. и в трите клинични звена преобладават лицата във възрастовите групи от 70 до 79 години и от 60 до 69 години.



**Фигура 3.** Разпределение по пол на колонизираните с VRE пациенти.

**Фигура 3** илюстрира съотношението на колонизираните с VRE мъже и жени в трите клинични звена. Видно е, че фекалното носителство преобладава при мъжете в Клиниката по ХТ (мъже:жени, 12:6), докато в КАИЛ колонизираните жени са двойно повече от мъжете (мъже:жени, 7:15).

Обобщените резултати от проучването на основните демографски и клинични показатели на колонизираните с VRE пациенти са следните:

- При колонизираните пациенти на хемодиализа средната възраст е  $63.56 \pm 2.3$  с преобладаване на мъжете ( $n=16$ ; 59.3%), а средна продължителност на хемодиализата е 71.4 месеци (диапазон: 2-252 месеца). Водещо основно заболяване при 18 (66.6%) от VRE положителните лица е хроничния гломерулонефрит или артериалната хипертония, а при 15 (55.6%) заболяванията на сърдечно-съдовата система са потвърдени като придружаващи (артериална хипертония или сърдечна недостатъчност).

- При колонизираните пациентите с малигнени хематологични заболявания средната възраст е  $74.31 \pm 6.58$  години с преобладаване на мъжете ( $n=12$ , 66.7%). Средната продължителност на болничния престой е  $11.15 \pm 4.705$  дни. Най-честото основно заболяване е мултипленият миелом, установен при 53.9% от колонизираните лица, а ХЗСН е потвърдена като придружаващо заболяване при 69.2%.
- При колонизираните пациенти на интензивно лечение средната възраст е  $62.5 \pm 14.83$  години с преобладаване на жените ( $n=15$ , 68.2%). Средната продължителност на болничния престой е 17 дни. Водеща причина за постъпване в интензивно отделение при 36.4% от колонизираните е необходимостта от следоперативни грижи, а при 72.2% от лицата придружаващо е заболяване на сърдечно-съдовата система.

## **2.2. Рискови фактори за интестинална колонизация с VRE**

Включените в статистическия анализ пациенти на хемодиализа са разделени на две групи – случай и контрола. С доказана VRE колонизация са 27 пациенти, които са отнесени към групата на случаите. При останалите 70 лица не е доказана VRE колонизация/инфекции с VRE или друг микроорганизъм. Те са включени в контролната група.

Унивариантният анализ на рисковите фактори за интестинална колонизация с VRE при пациентите на хемодиализа установи статистически значима връзка между колонизацията и следните променливи: продължителност на хемодиализата между 13-60 месеца ( $p=0.040$ ), осигуряване на съдов достъп чрез постоянен тунелизиран катетър ( $p=0.049$ ) и прием на vancomycin ( $p=0.033$ ).

Приемът на vancomycin повишава 4.550 пъти риска за VRE колонизация [OR (95% CI) = 4.550 (1.301-15.918)]. В допълнение мултивариантният анализ потвърждава единствено приложението на vancomycin като независим рисков фактор за колонизация с VRE [ $p=0.027$ , OR (95% CI) = 0.236 (0.065-0.848)] при лицата на хемодиализа. D'Agata и съавт. (D'Agata et al. 2001) също съобщават, че употребата на vancomycin способства за фекална колонизация с VRE при пациенти на хемодиализа.

Относно пациентите с малигнени хематологични заболявания, от всички 18 VRE позитивни пациенти, 13 са отнесени към групата на случаите, тъй като при тях VRE колонизацията е придобита в болница. Останалите 5 пациенти са имали положителни култури за vanC ентерококи през първите 48 часа от болничния престой и са изключени от анализа. От всички 101 неколонизирани с VRE пациенти, 96 не са имали VRE колонизация/инфекция с VRE или друг микроорганизъм. Те са включени в контролната група.

Резултатите от унивариантния анализ на рисковите фактори за фекално носителство на VRE при пациентите с малигнени хематологични заболявания потвърдиха статистически значима връзка между колонизацията и следните променливи: възраст от 70 до 79 години ( $p=0.025$ ) и мултиплен миелом ( $p=0.001$ ). При лицата от 70 до 79 години рискът за придобиване на VRE е средно 4 пъти по-голям [OR (95% CI) = 3.697 (1.114-12.264)], в сравнение с останалите възрастови групи. Също така, вероятността за придобиване на VRE при пациентите с мултиплен миелом е средно 7 пъти по-висока [OR(95% CI) = 7.449 (2.161-25.669)]. Мултивариантният анализ потвърждава възрастта от 70 до 79 години като независим рисков фактор за фекална колонизация с VRE при лицата с малигнени

хематологични заболявания [ $p=0.019$ , OR (95% CI) = 4.328 (1.395-14.737)]. Metallidis и съавт. (Metallidis et al. 2006) също установяват корелация между възрастта на пациентите и VRE колонизацията, докато други автори не откриват връзка между тези две променливи (Suntharam et al. 2002; Batistão et al. 2012; Pan et al. 2012; Ford et al. 2015).

Колонизация с VRE е доказана при 22 пациенти на интензивно лечение, които са отнесени към групата на случаите. Останалите 69 лица, които не са имали VRE колонизация/инфекция с VRE или друг микроорганизъм са включени в контролната група.

Данните от унивариантния анализ на рисковите фактори за интестинална колонизация с VRE при пациентите на интензивно лечение доказаха статистически значима връзка между колонизацията и следните четири променливи: следоперативни грижи ( $p<0.001$ ), други причина за постъпване в КАИЛ ( $p=0.003$ ), сърдечно-съдови заболявания ( $p=0.009$ ) и наличие на ендотрахеална тръба ( $p=0.003$ ). Мултивариантният анализ доказва, че следоперативните грижи [ $p=0.021$ , OR (95% CI) = 0.223 (0.063-0.798)] и сърдечно-съдовите заболявания [ $p=0.018$ , OR (95% CI) = 4.128 (1.272-13.398)] са независими рискови фактори за интестинална колонизация с VRE при лицата на интензивно лечение. Amberpet и съавт. (Amberpet et al. 2016) установяват, че дългата продължителност на болничния престой ( $p=0.00$ ), помладата възраст на пациентите ( $p=0.030$ ), употребата на ceftriaxone ( $p=0.25$ ) и vancomycin ( $p=0.048$ ) са свързани с придобиването на VRE в интензивни звена. Проучване на Pan и съавт. (Pan et al. 2012) показва, че престоят на пациента в отделение за интензивно лечение е независим рисков фактор за колонизация с VRE ( $p=0.03$ ).

### 2.3. Честота на интестинална колонизация с VRE

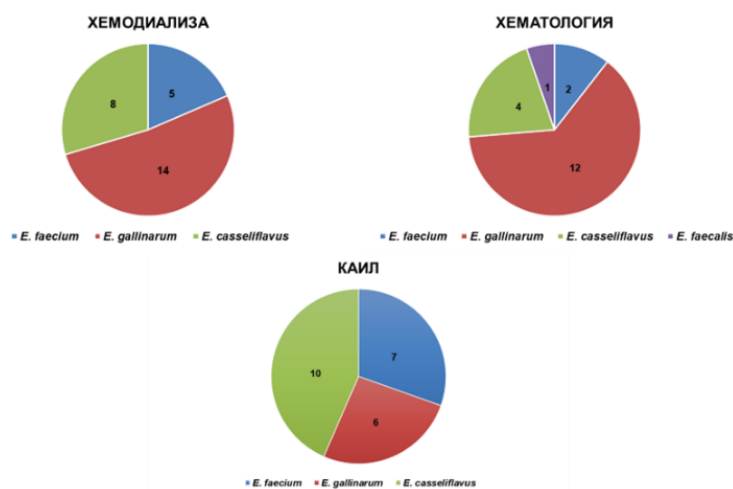
Резултатите от тестването на трите групи високорискови пациенти показват, че интестинална колонизация с VRE е открита:

- При 27 (27.8%) от 97 пациенти на хемодиализа, като при 24 от тях VRE са установени на първия скрининг, а при 3 – на втория. При скрининг на 1318 пациенти от 56 белгийски диализни центрове е установено, че 437 (33.2%) от тях са носители на VRE, като честотата на колонизация варира от 14.3% до 61.1% в различните центрове (Descheemaeker et al. 2000).
- При 18 (15.1%) от 119 пациенти с малигнени хематологични заболявания, като при 5 от тях VRE са доказани през първите 48 часа от хоспитализацията, при 12 – на 5<sup>-тия</sup> ден и при 1 – на 18<sup>-тия</sup> ден. Освен това при един болен са изолирани два вида VRE. От друга страна, Gedik и съавт. (Gedik et al. 2014) установяват, че общо 50 (39.7%) от 126 болни с хематологични злокачествени заболявания са колонизирани с VRE.
- При 22 (24.2%) от 91 пациенти на интензивно лечение, като при един болен са доказани два вида VRE. Сходни са данните от проучването на Amberpet и съавт. (Amberpet et al. 2016), които съобщават 29% честота на VRE колонизация в отделение за интензивно лечение.

Интестинална колонизация с VRE е доказана при общо 67 (21.8%) от 307 скринирани пациенти. Носителство на един вид VRE е установено при 65 пациенти, а при двама са открити два вида VRE. Най-голяма е честотата на колонизация в Клиниката по ХД (27.8%), следва КАИЛ (24.2%) и Клиниката по ХТ (15.1%).

От всички 67 колонизирани пациенти са изолирани общо 69 интестинални VRE – 1 (1.5%) *E. faecalis*, 14 (20.3%) *E. faecium*, 21 (30.4%) *E. casseliflavus* и 33 (47.8%) *E. gallinarum*. Нито един от колонизираните с VRE пациенти от трите рискови групи не е развил инфекция с VRE по време на болничния престой.

Видовото разпределение на VR ентерококови изолати по групи пациенти е представено на **Фигура 4**. Данните показват, че от 14 *E. faecium*, 7 са доказани при пациенти на интензивни грижи, 5 – при лица на хемодиализа и 2 – при хематологично болни. Двама пациенти от Клиниката по ХТ са колонизирани с *vanA* или *vanB* ентерококи. Приблизително еднакъв е броят на пациентите, носители на *E. casseliflavus* в Клиниката по ХД и КАИЛ, респективно 8 и 9, докато в Клиниката по ХТ този брой е двойно по-малък – 4. Относно *E. gallinarum*, най-голям е броят на колонизираните лица в Клиниката по ХД – 14, а най-малък в КАИЛ – 7 (**Фигура 4**).



**Фигура 4.** Видово разпределение на интестиналните VRE при пациентите от трите клинични звена.

Видовото разпределение на изолираните VRE показва, че и в трите клинични звена преобладават *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* (общо 54 или 78.3%) в сравнение с *E. faecium* и *E. faecalis* изолатите (общо 15 или 21.7%).

### 3. ХАРАКТЕРИСТИКИ НА VRE, ИЗОЛИРАНИ ПРИ ФЕКАЛЕН СКРИНИНГ НА ПАЦИЕНТИ С ВИСОК РИСК ЗА КОЛОНИЗАЦИЯ И ИНФЕКЦИЯ С ПРОБЛЕМНИ МИКРООРГАНИЗМИ

#### 3.1. Антимикробна чувствителност и детекция на *van* гени при интестинални VRE

На **Таблица 6** са представени резултатите за антимикробната чувствителност на 14 интестинални VR *E. faecium* и 1 VR *E. faecalis*, определени чрез *E*-тест и доказаните *van* гени при същите изолати.

**Таблица 6.** Стойности на МПК и *van* гени при 15 интестинални *E. faecium* и *E. faecalis*

Изолат №/ Клинично звено	Вид	МПК (µg/ml)									<i>van</i> ген
		AMP	GEN	CIP	VAN	TEC	TGC	LZD	Q/D	DAP	
56/ХТ	<i>E. faecalis</i>	0.25	≥1024	2	12	0.50	0.125	3	3	0.75	<i>vanB</i>
56/ХТ	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	96	0.047	3	≥32	2	<i>vanA</i>
58/ХТ	<i>E. faecium</i>	≥256	8	≥32	8	0.50	0.064	2	2	1	<i>vanB</i>
11/ХД	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	6	0.064	1.5	≥32	1	<i>vanA</i>
16/ХД	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	6	0.064	2	≥32	1	<i>vanA</i>
36/ХД	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	6	0.064	2	≥32	1	<i>vanA</i>
47/ХД	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	6	0.064	2	≥32	1	<i>vanA</i>
75/ХД	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	6	0.064	1.5	≥32	1	<i>vanA</i>
3/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	≥256	0.032	2	0.50	0.38	<i>vanA</i>
4/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	128	0.064	3	3	0.75	<i>vanA</i>
5/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	48	0.125	3	0.50	0.50	<i>vanA</i>
6/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	16	0.094	2	0.75	1	<i>vanA</i>
10/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	16	0.125	2	0.50	1	<i>vanA</i>
26/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥256	12	≥32	≥256	≥256	0.094	2	0.75	0.75	<i>vanA</i>
64/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	6	0.094	2	0.25	1	<i>vanA</i>

**Легенда** AMP: ampicillin; GEN: gentamicin; CIP: ciprofloxacin; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; TGC: tigecycline; LZD: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin; DAP: daptomycin.

Резултатите от ДДМ и *E*-теста показват, че *E. faecalis* №56/ХТ и *E. faecium* №58/ХТ от Клиниката по хематология са с ниско ниво на резистентност към vancomycin (МПК: 8 – 12 µg/ml) и чувствителност към teicoplanin (МПК = 0.50 µg/ml), което съответства на класическия VanB фенотип. И при двата изолата е потвърден *vanB* ген. *E. faecalis* №56/ХТ е с високо ниво на резистентност към gentamicin (МПК ≥ 1024 µg/ml), а *E. faecium* №58/ХТ – съответно към ampicillin (МПК ≥ 256 µg/ml) и ciprofloxacin (МПК ≥ 32 µg/ml).

При 12 *E. faecium* е установено високо ниво на резистентност към ampicillin (МПК  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ), gentamicin (МПК  $\geq 1024$   $\mu\text{g/ml}$ ), ciprofloxacin (МПК  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ ) и vancomycin (МПК  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ), вариращи нива на резистентност към teicoplanin (МПК 6 –  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ) и чувствителност към tigecycline, linezolid и daptomycin. Един *E. faecium* (№26/КАИЛ) показва подобна множествена резистентност с изключение на стойностите за gentamicin (МПК = 12  $\mu\text{g/ml}$ ). При всички 13 VR *E. faecium* е доказан *vanA* ген. Само 5 (38.5%) от 13 *vanA* изолата са с обичайните за фенотипа високи нива на резистентност към vancomycin (МПК  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ) и teicoplanin (МПК: 48 –  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ). Другите 8 (61.5%) показват ниска до умерена резистентност към teicoplanin (МПК: 6 – 16  $\mu\text{g/ml}$ ), което наподобява VanD фенотип (*VanD-vanA*). При проучване на 20 *VanD-vanA E. faecium*, изолирани при интестинален скрининг на пациенти на интензивно лечение, Song и съавт. (Song et al. 2013) установяват, че тези изолати са хетерогенна, нестабилна популация, която е способна да се трансформира във VanA фенотип след експозиция на гликопептиди. Поради тази причина авторите считат, че teicoplanin не е ефективен за лечение на *VanD-vanA* ентерококи.

Относно чувствителността към quinupristin/dalfopristin, двата *vanB* и половината от *vanA* изолатите са със запазена чувствителност към този препарат. Петте *E. faecium* от Клиниката по хемодиализа и *E. faecium* №56/ХТ от Клиниката по хематология са резистентни на quinupristin/dalfopristin (МПК  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ ).

На **Таблица 7** и **Таблица 8** са показани стойностите на МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> при 32 интестинални *E. gallinarum* и 21 *E. casseliflavus*.

**Таблица 7.** МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> при 32 интестинални *E. gallinarum* с VanC фенотип

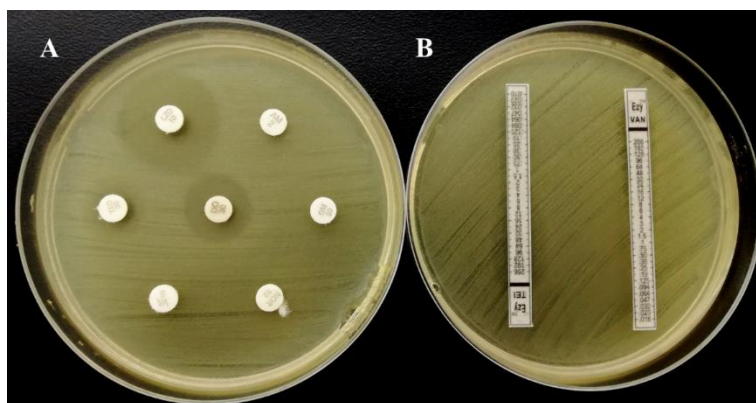
Антимикробен агент	МПК диапазон (µg/ml)	МПК <sub>50</sub> (µg/ml)	МПК <sub>90</sub> (µg/ml)	Чувствителност (%)
Ampicillin	0.75 - ≥ 256	1.5	2	96.9
Gentamicin	0.75 - ≥ 1024	1.5	4	96.9
Ciprofloxacin	1 - ≥ 32	3	4	93.8
Vancomycin	2 - 16	8	12	0
Teicoplanin	0.50 - 1	0.50	1	100
Linezolid	1 - 3	1.5	2	100
Tigecycline	0.038 - 0.19	0.064	0.125	100
Daptomycin	0.38 - 2	0.50	0.75	100

**Таблица 8.** Стойности на МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> при 21 интестинални *E. casseliflavus*

Антимикробен агент	МПК диапазон (µg/ml)	МПК <sub>50</sub> (µg/ml)	МПК <sub>90</sub> (µg/ml)	Чувствителност (%)
Ampicillin	0.38 - 2	1	1	100
Gentamicin	0.50 - 64	2	3	95.2
Ciprofloxacin	1 - 32	2	4	95.2
Vancomycin	2 - 12	4	6	0
Teicoplanin	0.5 - 1	0.50	1	100
Linezolid	1 - 3	2	2	100
Tigecycline	0.32 - 0.125	0.064	0.125	100
Daptomycin	0.38 - 2	0.50	1	100

*E. gallinarum* №31/ХД по ДДМ показа множествена резистентност, включително към vancomycin и teicoplanin, и чувствителност само към tigecycline и linezolid (**Фигура 5А**). Същият изолат е с доказано високи нива на резистентност към vancomycin и teicoplanin (МПК ≥ 256 µg/ml) (**Фигура 5Б**), характерни за VanA фенотипа, и е с потвърден *vanA* ген. Редица проучвания свидетелстват за придобиване на *van* гени при *non-faecium non-faecalis* интестинални ентерококи (Corso et al. 2005; Neves et al. 2009; Shirano et al. 2011; Eshaghi et al. 2015).

Стойностите на МПК по отношение на другите антибиотици са следните: ampicillin (МПК ≥ 256 µg/ml), gentamicin (МПК ≥ 1024 µg/ml), ciprofloxacin (МПК ≥ 32 µg/ml), quinupristin/dalfopristin (МПК ≥ 32 µg/ml), linezolid (МПК = 2 µg/ml), tigecycline (МПК = 0.064 µg/ml) и daptomycin (МПК = 2 µg/ml).



**Фигура 5.** Антибиотичен профил на *E. gallinarum* № 31/ХД с VanA фенотип, определен чрез (А) Дисково-дифузионен метод; (Б) E-тест метод.

С изключение на *E. gallinarum* №31/ХД, всички останали *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* са с ниски нива на резистентност към vancomycin, съответно  $MPK_{50} = 8 \mu\text{g/ml} / 4 \mu\text{g/ml}$  и  $MPK_{90} = 12 \mu\text{g/ml} / 6 \mu\text{g/ml}$ , и са чувствителни на teicoplanin (**Таблица 7** и **Таблица 8**), което съответства на VanC фенотипа. Генът *vanC1* е потвърден при 32 *E. gallinarum*, а *vanC2* – при всички *E. casseliflavus*.

Стойностите на МПК показват, че VanC изолатите са със запазена чувствителност към linezolid и tigecycline. Чувствителността на *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* към ampicillin е съответно 96.9%/100%; към gentamicin – 96.9%/95.2%, към ciprofloxacin – 93.8%/95.2% и към daptomycin – 100%/100%.

### **3.2. Детекция на гени, кодиращи резистентност към аминогликозиди при интестинални VRE**

От проучените 69 интестинални VRE резистентност към аминогликозиди показаха 18 – 14 *E. faecium*, 2 *E. gallinarum*, 1 *E. faecalis* и 1 *E. casseliflavus*. Петнадесет от изолатите са с високо ниво на резистентност към gentamicin ( $MPK \geq 1024 \mu\text{g/ml}$ ), а при 3 изолата (2 *E. faecium* и 1 *E. casseliflavus*) стойностите на МПК варират от 8 до 64  $\mu\text{g/ml}$ .

Данните от детекцията на гени, кодиращи аминокликозид-модифициращи ензими и стойностите на МПК към gentamicin показваха, че бифункционалният *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ген е доказан при 17 VRE – при всички 15 ентерококи с високо ниво на резистентност към аминокликозиди и при двата *E. faecium* с ниски стойности на МПК (8 µg/ml и 12 µg/ml). През 2021 г. Chen и съавт. (Chen et al. 2021) описват за първи път 15 *E. faecium* и 2 *E. faecalis* с non-HLGR фенотип, при които е установен *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ген. Тези данни свидетелстват за способността на *E. faecium* изолатите да изменят HLGR фенотипа, което може би спомага за адаптирането на патогена към вътреболничната среда (Chen et al. 2021).

При 15 от изолатите *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* се експресира самостоятелно, а при два *E. faecium* е в комбинация с *aph(3')-IIIa*. При *E. casseliflavus* изолата е открит *ant(3')-Ia*.

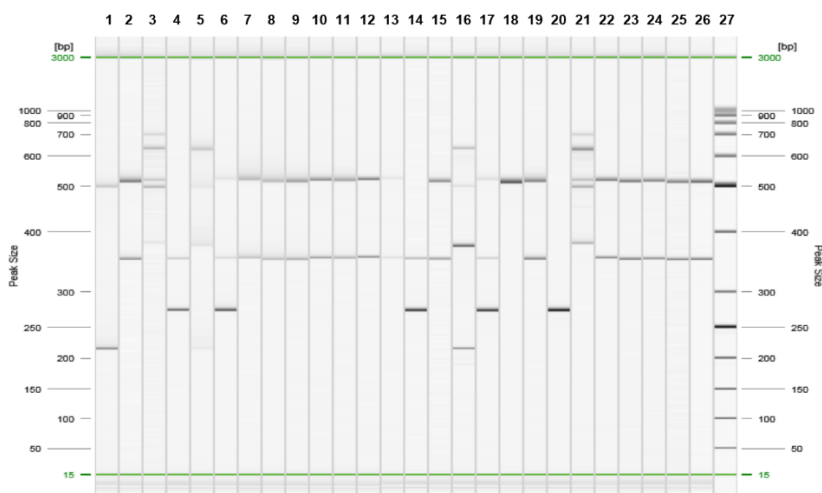
### **3.3. Детекция на гени, кодиращи фактори на вирулентност при интестинални VRE**

При 21 изолата (30.4%) – 1 *E. faecalis*, 14 *E. faecium* и 6 *E. gallinarum* са доказани един или повече гена (*ace/acm*, *asa1*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* и *hyl*). Най-често присъстват гените *esp* (n=18), *acm* (n=17) и *hyl* (n=4). При 27 *E. gallinarum* и 21 *E. casseliflavus* не са открити генетични детерминанти за фактори на вирулентност.

Резултатите от PCR анализа, илюстриращи позитивните генетични детерминанти при тестваните VRE, са показани на **Фигура 6**. Данните от разпространението на гените за фактори на вирулентност при интестиналните VRE са следните:

- *E. faecalis* изолатът е носител на четири гена за вирулентност (*gelE* + *asa1* + *efaA* + *ace*).

- Всички 14 VR *E. faecium* изолата са позитивни за фактори на вирулентност, като 12 от тях са носители на два гена (*act* + *esp*), а 2 са с три гена (*hyl* + *act* + *esp*).
- От 33 *E. gallinarum* 6 (18.2%) изолата са позитивни за фактори на вирулентност, като 2 са носители на един ген (1 с *hyl* и 1 с *esp*), 3 са с два гена (2 с *act* + *esp* и 1 с *hyl* + *act*), а 1 е с пет гена (*asa1* + *efaA* + *esp* + *ace* + *cyIA*).
- При 21 *E. casseliflavus* изолата не са открити генетични детерминанти за фактори на вирулентност.



**Фигура 6.** Откриване на *gelE*, *hyl*, *act*, *asa1*, *efaA*, *esp* и *cyIA* гени при 14 *E. faecium*, 6 *E. gallinarum* и 1 *E. faecalis* изолати чрез мултиплексен PCR. Линия 1 - Контролен щам за *gelE* и *efaA*; Линия 2 - Контролен щам № 5 за *act* и *esp*; Линия 3 - Контролен щам № 17 за *asa1*, *efaA*, *esp* и *cyIA*; Линия 4 - Контролен щам за *hyl* и *act*; Линия 5 - Контролен щам за *gelE* и *asa1*; Линия 6 - № 4 КАИЛ; Линия 7 - № 5 КАИЛ; Линия 8 - № 6 КАИЛ; Линия 9 - № 10 КАИЛ; Линия 10л - № 26 КАИЛ; Линия 11 - № 64 КАИЛ; Линия 12 - № 3 КАИЛ.; Линия 13 - № 66 КАИЛ; Линия 14 - № 79 КАИЛ; Линия 15 - № 56 ХТ; Линия 16 - № 56` ХТ; Линия 17 - № 58 ХТ; Линия 18 - № 88 ХТ; Линия 19 - № 11 ХД; Линия 20 - № 60 ХД; Линия 21 - № 17 ХД; Линия 22 - 31 № ХД; Линия 23 - № 16 ХД; Линия 24 - № 36 ХД; Линия 25 - № 47 ХД; Линия 26 - № 75 ХД; Линия 27 - маркер.

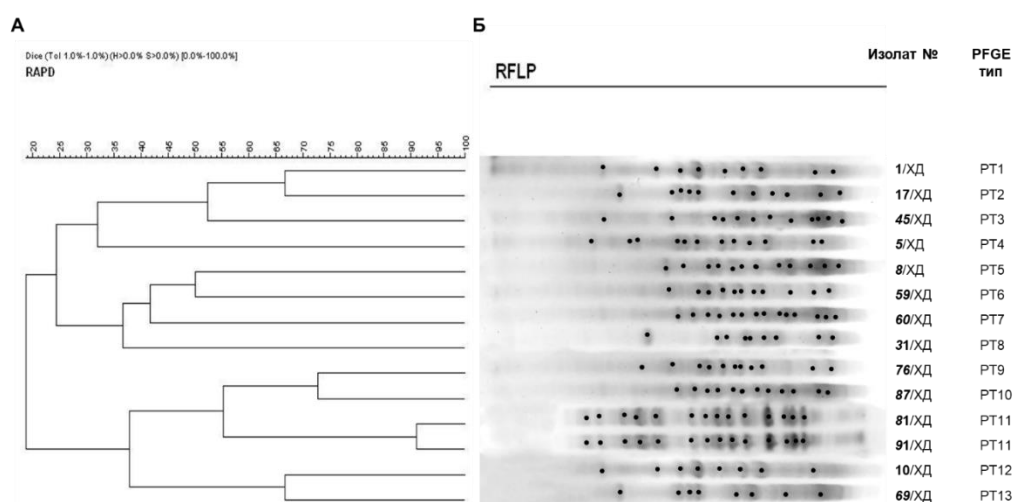
### 3.4. Епидемиологично типизиране на интестинални VRE

#### 3.4.1. Резултати от типизирането на интестинални *vanC* ентерококи при пациенти на хемодиализа

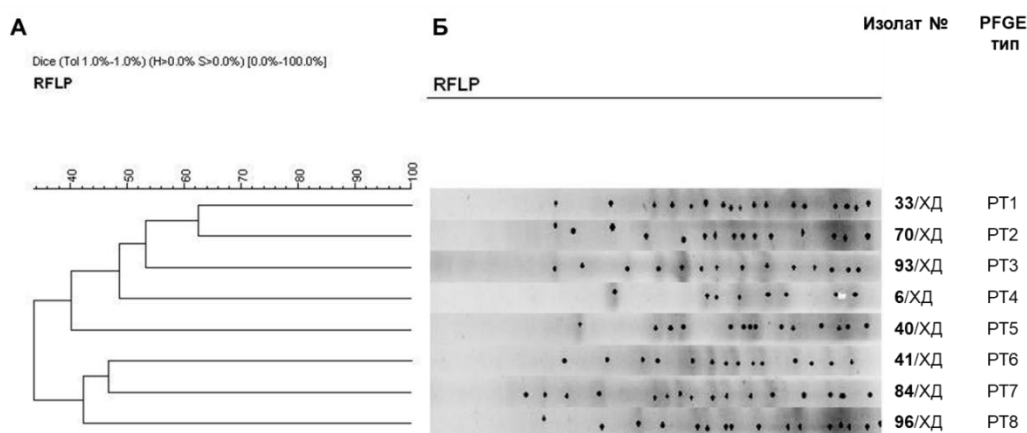
PFGE профилът на 14 *E. gallinarum* е показан на **Фигура 7**. Видно е, че сред тестваните ентерококи се оформят общо 13 пулсотипа, като към един тип (PT11) се отнасят само два изолата

(№81 и №91). Генетичното родство при останалите представители *E. gallinarum* варира от 18% до 74%.

Данните от PFGE анализа на 8 *E. casseliflavus* са представени на **Фигура 8**. Те показват, че всеки от проучените изолати се отнася към различен пулсотип, което оформя общо 8 пулсотипа – PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, PT6, PT7 и PT8. Най-голям процент на генетично родство се наблюдава между изолати №33/ХД и №70/ХД – 62%, докато при останалите представители процентът варира от 34% до 54%.



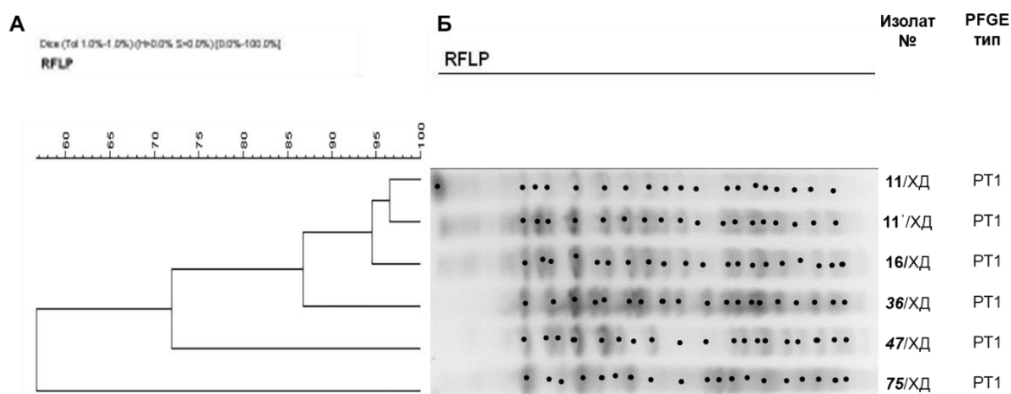
**Фигура 7.** PFGE профил на 14 *E. gallinarum* изолати след рестрикция на ДНК чрез *Sma*I ензим. Дендрограма (А), получена в резултат на автоматизиран анализ на хромозомно фрагментираната ДНК (Б) чрез PFGE.



**Фигура 8.** PFGE профил на 8 *E. casseliflavus* изолати след рестрикция на ДНК чрез *Sma*I ензим. Дендрограма (А), получена в резултат на автоматизиран анализ на хромозомно фрагментираната ДНК (Б) чрез PFGE.

### 3.4.2. Резултати от типизирането на интестинални *vanA E. faecium* от пациенти на хемодиализа

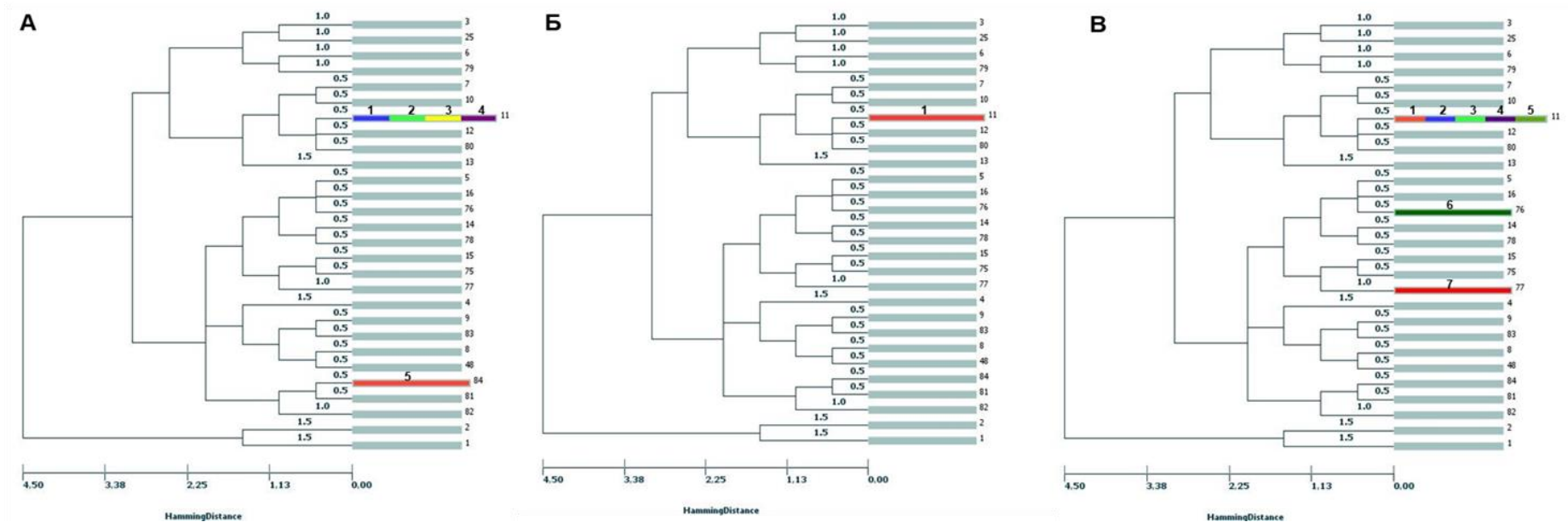
Данните от PFGE профила на 5 *E. faecium*, изолирани от пациенти на хемодиализа, са представени на **Фигура 9**. Те показват, че всички ентерококи принадлежат към един основен пулсотип 1 (PT1).



**Фигура 9.** PFGE профил на 5 *E. faecium* изолати след рестрикция на ДНК чрез *SmaI* ензим. Дендрограма (А), получена в резултат на автоматизиран анализ на хромозомно фрагментираната ДНК (Б) чрез PFGE.  
Забележка: Щамовете №11/ХТ и 11'/ХД са един и същи изолат, който е тестван два

### 3.4.3. Резултати от типизирането на всички интестинални *vanA E. faecium*

Резултатите от MLVA, отразяващи генетичната връзка между 13 интестинални *vanA E. faecium*, изолирани от високорискови пациенти в три клинични звена на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен, са представен на **Фигура 10**. Видно е, че 10 (76.9%) от изолатите (4 от Отделението по хемодиализа, 1 от Клиниката по хематология и 5 от КАИЛ) се отнасят към MT11 (**Фигура 10А, Б и В**), а към MT76 (**Фигура 10В**), MT77 (**Фигура 10В**) и MT84 (**Фигура 10А**) принадлежат по един изолат. Два от *E. faecium* изолатите, различни от основния доказан тип MT11, произхождат от КАИЛ (MT76 и MT77), а един е от Отделението по хемодиализа (MT84).



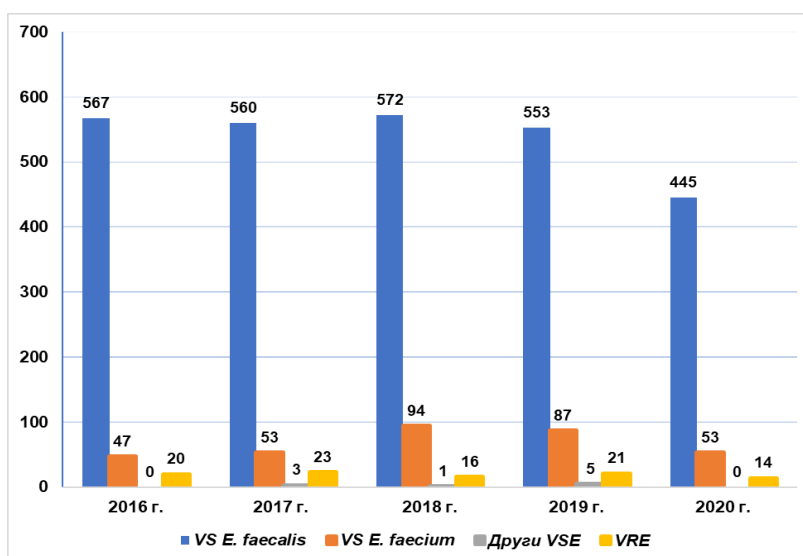
**Фигура 10.** Дендрограми, отразяващи генетичната връзка между интестиналните *vanA E. faecium*, генотипизирани с MLVA10.

Дендрограмата е създадена с помощта на специализирания софтуер PHYLOViZ 2.0. при използване на йерархичен клъстеринг с разстояние по Хеминг и алгоритъм за клъстериране Complete-Linkage method. С цифри са отбелязани разстоянията между отделните клъстери. Открити са следните MLVA типове (MT): **(А)** Отделение по хемодиализа – MT11 и MT84; **(Б)** Клиника по хематология – MT11; **(В)** Клиника за интензивно лечение и реанимация – MT11, MT76 и MT77. Разпределението на изолатите към всеки тип е, както следва: MT11: 10 *E. faecium*; MT 76: 1 *E. faecium*; MT77: 1 *E. faecium*; MT84: 1 *E. faecium*.

## 4. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА КЛИНИЧНИ VRE В УМБАЛ „Д-Р Г. СТРАНСКИ”, ПЛЕВЕН

### 4.1. Резултати за честота и видово разпространение на клинични VRE

За периода 2016 г. – 2020 г. от пациенти, лекувани в УМБАЛ „Д-р Г. Странски”, Плевен, са изолирани общо 3134 ентерококи, като 2697 (86.1%) от тях са VS *E. faecalis*, 334 (10.7%) са VS *E. faecium*, 94 (3%) са VRE и 9 (0.3%) са други видове VSE. Разпространението на видовете ентерококови изолати по години е представено на **Фигура 11**. Броят на VS *E. faecalis* и VS *E. faecium* през годините остава относително постоянен със сравнително запазено съотношение между VSE и VRE.

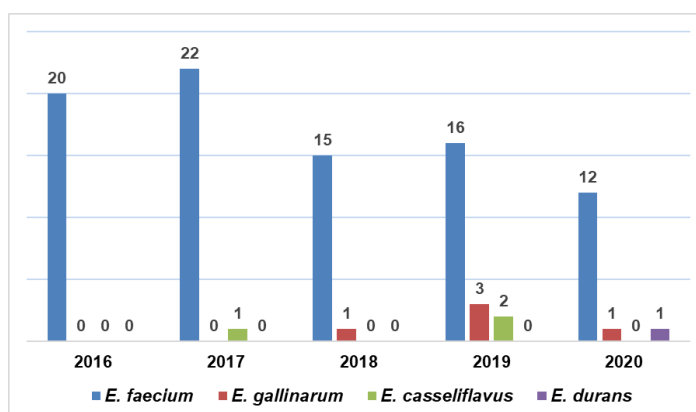


**Фигура 11.** Разпространение по години на видовете ентерококи, изолирани от пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски”, Плевен, за периода 2016 г. – 2020 г.

За същия период от клинични материали на болни са изолирани 94 неповтарящи се VR ентерококови изолата, които съставляват 3% от общия брой ентерококи. Попова и съавт. (Попова В и съавт. 2014) докладват 13 VRE изолати в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен за периода 01.03.2013 г. – 28.02.2014 г.

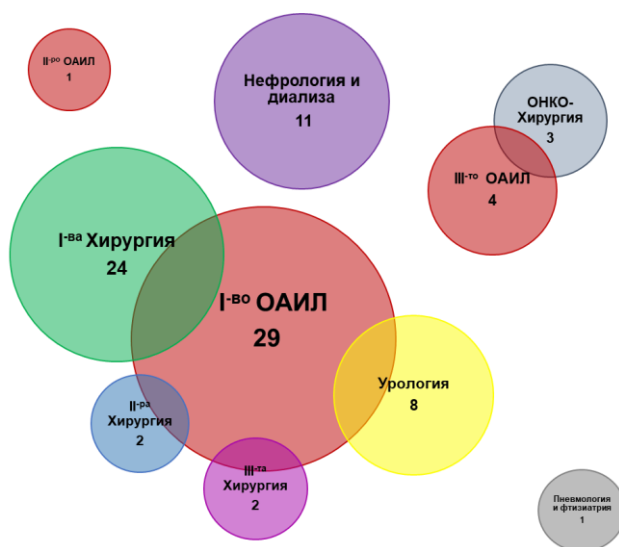
Видовото разпределение на VRE, изолирани от пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски”, Плевен, за периода 2016 г. – 2020 г. показва, че делът на VR *E. faecium* е най-голям – 85 броя (90.4%). Другите VRE са представени от единични изолати: *E. gallinarum* – 5 (5.3%), *E. casseliflavus* – 3 (3.2%) и *E. durans* – 1 (1.1%).

Разпространението на изолатите по години (**Фигура 12**) показва, че броят на VR *E. faecium* варира от 12 до 22. Въпреки това, отнесено към общия брой ентерококи, честотата на VR *E. faecium* остава относително постоянна през годините. През 2017 г. е доказан 1 *E. casseliflavus*, през 2018 г. и 2020 г. – съответно по 1 *E. gallinarum*, а през 2019 г. броят на изолираните vanC ентерококи е общо 5. Интерес представлява появата на 1 VR *E. durans* през 2020 г.



**Фигура 12.** Разпространение по години на 94 VRE, изолирани от пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски”, Плевен, за периода 2016 г. – 2020 г.

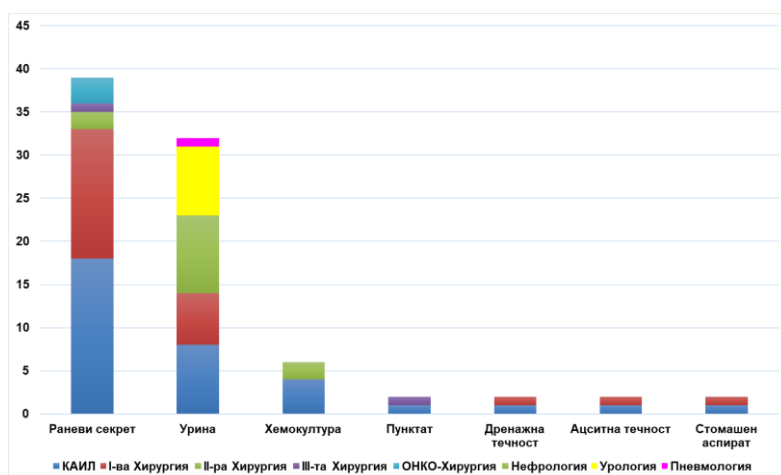
Данните за циркулацията на VR *E. faecium* в клиничните звена на болницата са представени на **Фигура 13**. Те показват, че основно са засегнати КАИЛ (I<sup>-во</sup> ОАИЛ, II<sup>-ро</sup> ОАИЛ и III<sup>-то</sup> ОАИЛ), Клиниките по Хирургия (I<sup>-ва</sup> Хирургия, II<sup>-ра</sup> Хирургия, III<sup>-та</sup> Хирургия и Клиниката по ОНКО хирургия), Клиниката по нефрология и хемодиализа, Клиниката по урология и Клиниката по пневмология и фтизиатрия. Най-голям е делът на изолатите от КАИЛ (34) и Хирургичните клиники (31), съставляващи 76.5% от общия брой.



**Фигура 13.** Разпределение на VR *E. faecium* в клиничните звена на УМБАЛ, Плевен.

**Легенда:** КАИЛ обединява I-vo, II-vo и III-то OAИЛ; I-va Хирургия обединява Отделение по жлъчно-чернодробна и панкреатична хирургия и Отделение по колопроктология и гнойно-септична хирургия; II-ра Хирургия обединява Отделение по детска хирургия и Отделение по пластично-възстановителна и естетична хирургия; III-та Хирургия обединява Отделение по Гръдна хирургия и Отделение по Съдова хирургия.

Разпределението на изолатите по клинични материали от съответните клиники е показано на **Фигура 14**. Видно е, че броят на раневите секрети с VR *E. faecium* е приблизително еднакъв в КАИЛ и Клиниките по хирургия, съответно 18 и 21. Относно урините с VR *E. faecium* най-много са тези от Клиниката по нефрология и хемодиализа – 9, Клиниката по урология – 8 и КАИЛ – 8, а най-малко от Клиниката по пневмология и фтизиатрия – 1. По отношение на видовете материали преобладават раневите секрети (39) и урините (32) – общо 71 (83.5%). Останалите 14 положителни проби (16.5%) се разпределят, както следва: хемокултури – 6 (4 от КАИЛ и 2 от Клиниката по нефрология), пунктати – 2, стомашни аспирати – 2, дренажи – 2, асцитни течности – 2, съответно по 1 от КАИЛ и Клиниките по хирургия.



**Фигура 14.** Разпределение на VR *E. faecium* изолатите по клинични материали и клинични звена.

## 4.2. Демографски характеристики на пациентите с VRE

Данните от проучването на демографските характеристики на всички 85 пациенти с VR *E. faecium* са следните: мъже – 55 (64.7%), жени – 30 (35.3%). Средната възраст е  $67 \pm 13.09$  г. (диапазон: 22-87 г.).

На **Таблица 9** са представени резултатите от анализа по възрастови групи и пребиваване в съответните клинични звена, а на **Таблица 10** – съответно по възраст и видове клинични материали. Прави впечатление, че 72.9% от лицата с VR *E. faecium* са  $\geq 60$  г., като в тази възраст най-засегната е групата на болните, лекувани в КАИЛ и в I<sup>ва</sup> Хирургия в сравнение с тези в другите клинични звена. Установената разлика е статистически значима ( $p=0.005$ ). Във възрастовата група 40-59 г. отново най-засегнати са пациентите в КАИЛ и в I<sup>ва</sup> Хирургия, в сравнение с тези, настанени в другите клинични звена, като разликата е статистически значима ( $p=0.039$ ). В най-младата възрастова група – 22-39 г. е налице равномерно разпределение на положителните за VR *E. faecium* пациенти.

**Таблица 9.** Разпределение на пациентите с VR *E. faecium* по възраст и клиници

Група	Възраст (години)	% от общия брой	Брой (%) от общия брой в съответната възрастова група				Съотношение КАИЛ и I <sup>ва</sup> Хирургия/Други
			Общо	КАИЛ и I <sup>ва</sup> Хирургия	Други*	p-value	
I	22 - 39	4.7	4	2	2	NS	1
II	40 - 59	22.4	19	14	5	<b>0.039</b>	0.36
III	≥ 60	72.9	62	42	20	<b>0.005</b>	0.48

**Легенда:** Възраст, клинично звено (брой, n) **1.** 22-39 г.- КАИЛ (n=2). **Други:** II<sup>ра</sup> Хирургия (n=1), ОНКО-Хирургия (n=1). **2.** 40-59 г. – КАИЛ (n=12), I<sup>ва</sup> Хирургия (n=2). **Други** III<sup>та</sup> Хирургия (n=1), ОНКО-Хирургия (n=1); Нефрология (n=3). **3.** ≥ 60 г. – КАИЛ (n=20), I<sup>ва</sup> Хирургия (n=22). **Други:** II<sup>ра</sup> Хирургия (n=1), III<sup>та</sup> Хирургия (n=1), ОНКО-Хирургия (n=1), Урология (n=8), Нефрология и хемодиализа (n=8) и Пневмология и фтизиатрия (n=1).

**Таблица 10.** Разпределение на пациентите с VR *E. faecium* по възраст и материали

Група	Възраст (години)	% от общия брой	Брой (%) от общия брой в съответната възрастова група						Съотношение	
			раневи секрет	други*	p-value	урини	други	p-value	раневи секрети/други*	урини/други*
I	22 - 39	4.7	2	1	NS	1	1	NS	2	1
II	40 - 59	22.4	9	4	<b>0.033</b>	6	4	NS	2.25	1.5
III	≥ 60	72.9	28	9	<b>0.003</b>	25	9	<b>0.008</b>	3.11	2.78

\*Други= хемокултури, пунктати, дренажни течности, асцитни течности и стомашни аспирати.

**Таблица 10** показва, че във възрастта 40-59 г. е установена статистически значима разлика между групата на положителните за VR *E. faecium* раневи секрети и тази на другите клинични материали ( $p=0.033$ ). Във възрастта ≥ 60 г. също са доказани статистически значими различия между положителните раневи секрети и другите материали ( $p=0.003$ ), както и между положителните урини и другите материали ( $p=0.008$ ). Sievert и съавт. (Sievert et al. 2013) съобщават за 3314 *E. faecium* изолата, от които 654 са причинители на катетър-асоциирани инфекции, а 517 на инфекции на хирургичното място.

## 5. ХАРАКТЕРИСТИКИ НА VRE, ИЗОЛИРАНИ ОТ КЛИНИЧНИ МАТЕРИАЛИ НА ХОСПИТАЛИЗИРАНИ ПАЦИЕНТИ

### 5.1. Антимикробна чувствителност и детекция на van гени при клинични VRE

#### 5.1.1. Резултати за УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен

На **Таблица 11** са представени стойностите на МПК и доказаните van гени при всички 85 клинични изолата VR *E. faecium*.

Данните показват, че сред тестваните VRE са налице два основни генотипа на гликопептидна резистентност – *vanA* и *vanB*. Генът *vanB* е установен само при един *E. faecium* №3239/18 г., който е с обичайните за VanB фенотипа ниски нива на резистентност към vancomycin (МПК = 8 µg/ml) и чувствителност към teicoplanin (МПК = 0.50 µg/ml). Този изолат експресира МПК към gentamicin 8 µg/ml, резистентен е на ampicillin, gentamicin, ciprofloxacin и е чувствителен на tigecycline, linezolid, quinupristin/dalfopristin и daptomycin.

Генът *vanA* е потвърден при останалите 84 *E. faecium*. Всички те са с високи нива на резистентност към vancomycin (МПК ≥ 256 µg/ml), но само 7 (8.3%) от тях са с обичайните за фенотипа високи нива на резистентност към teicoplanin (МПК: 32 – ≥ 256 µg/ml). Останалите 77 (91.7%) изолата показват ниска до умерена резистентност към teicoplanin (МПК: 6 – 16 µg/ml), което наподобява VanD фенотип (*VanD-vanA*). Такива необичайни VRE циркулират в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен от 2013 г. (Попова В 2018).

Като цяло *vanA* изолатите са с високи нива на резистентност към ampicillin, gentamicin, ciprofloxacin и са чувствителни на tigecycline, linezolid, quinupristin/dalfopristin и daptomycin. Изключение правят два изолата – *E. faecium* №1179/17 г. показващ МПК към

gentamicin 6 µg/ml и *E. faecium* №4234/16 г. с резистентност към quinupristin/dalfopristin (МПК ≥ 32 µg/ml).

При всички 8 vanC ентерококи е установен обичайния VanC фенотип с ниски нива на резистентност към vancomycin (МПК: 4 – 8 µg/ml) и чувствителност към teicoplanin (МПК: 0.50 – 1 µg/ml). Генът *vanC1* е потвърден при 5 *E. gallinarum*, а *vanC2* – при 3 *E. casseliflavus*. Всички vanC изолати са чувствителни на останалите тествани антимикробни лекарствени средства.

Единственият *E. durans* показва високо ниво на резистентност към vancomycin (МПК ≥ 256 µg/ml), умерена резистентност към teicoplanin (МПК = 16 µg/ml) и при него е доказан *vanA* ген. Този щам е с високи нива на резистентност към ampicillin, gentamicin, ciprofloxacin и е чувствителен на другите антибиотици.

### **5.1.2. Резултати за други клинични центрове**

Сред тестваните 23 VRE са установени два основни генотипа на гликопептидна резистентност – *vanA* и *vanB*. Генът *vanB* е доказан само при един *E. faecium* (№4760/20 г.) от УМБАЛ „Токуда“, който показва МПК към vancomycin 8 µg/ml и МПК към teicoplanin 0.50 µg/ml. Този изолат е резистентен на ampicillin, gentamicin, ciprofloxacin и е чувствителен на другите тествани антибиотици.

Генът *vanA* е потвърден при останалите 22 *E. faecium*. Всички те са с високи нива на резистентност към vancomycin (МПК ≥ 256 µg/ml), но само 1 от тях е с обичайните за VanA фенотипа високи нива на резистентност към teicoplanin (МПК = 32 µg/ml). Останалите 21 изолата показват ниска до умерена резистентност към teicoplanin (МПК: 6 – 16 µg/ml). Два *vanA E. faecium* демонстрират МПК към gentamicin съответно 12 µg/ml и 96 µg/ml, а при всички останали изолати МПК към същия антибиотик е ≥ 1024 µg/ml.

**Таблица 11.** Стойности на МПК и *van* гени при 85 клинични VR *E. faecium*

Брой изолати	МПК или МПК диапазон ( $\mu\text{g/ml}$ )									<i>van</i> ген
	AMP	GEN	CIP	VAN	TEC	TGC	LZD	Q/D	DAP	
<b>2016 година</b>										
19	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	8-16	0.047-0.125	1-2	0.50-0.75	1.5- $\leq 8$	<i>vanA</i>
1	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	16	0.064	2	$\geq 32$	$\leq 8$	<i>vanA</i>
<b>2017 година</b>										
19	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	12-16	0.047-0.125	1-3	0.25-1	3- $\leq 8$	<i>vanA</i>
2	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	$\geq 256$	0.094	1.5-2	0.38-0.50	1.5-6	<i>vanA</i>
1	$\geq 256$	6	$\geq 32$	$\geq 256$	$\geq 256$	0.094	2	0.50	6	<i>vanA</i>
<b>2018 година</b>										
14	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	8-16	0.047-0.125	1-3	0.38-1	3- $\leq 8$	<i>vanA</i>
1	$\geq 256$	8	$\geq 32$	8	0.50	0.125	1	1	3	<i>vanB</i>
<b>2019 година</b>										
14	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	6-16	0.047-0.125	1-3	0.25-3	4- $\leq 8$	<i>vanA</i>
2	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	32-128	0.064-0.094	2	0.38-0.50	6	<i>vanA</i>
<b>2020 година</b>										
10	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	12-16	0.047-0.094	1-2	0.50-3	1.5- $\leq 8$	<i>vanA</i>
1	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	48	0.064	2	0.50	$\leq 8$	<i>vanA</i>
1	$\geq 256$	$\geq 1024$	$\geq 32$	$\geq 256$	$\geq 256$	0.064	2	0.38	4	<i>vanA</i>

**Легенда** AMP: ampicillin; GEN: gentamicin; CIP: ciprofloxacin; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; TGC: tigecycline; LZD: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin; DAP: daptomycin.

Всички *vanA E. faecium* са с високи нива на резистентност към ampicillin и ciprofloxacin и са чувствителни на tigecycline, linezolid, quinupristin/dalfopristin и daptomycin.

## **5.2. Детекция на гени, кодиращи резистентност към аминогликозиди при клинични VRE**

### **5.2.1. Резултати за УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен**

Всички 85 VR *E. faecium* са позитивни за *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, а при 3 от тях е налице и втори ген – *aph(3')-IIIa*. При 83 *vanA* изолата фенотипът на високо ниво на резистентност към gentamicin (МПК  $\geq$  1024  $\mu\text{g/ml}$ ) напълно кореспондира с установения генотип – *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ген. При два изолата – *vanB E. faecium* №3239/2018 г. и *vanA E. faecium* №1179/2017 г., демонстриращи ниски ниви на резистентност към gentamicin (МПК: 6 – 8  $\mu\text{g/ml}$ ), също е доказан този бифункционален ген.

Според SAID (ECDC-Net 2019) честотата на HLGR *E. faecium* в Европа през 2020 г. варира от 4.1% за Гърция до 51.6% за Полша. Данните за България показват 47.9% HLGR при *E. faecium*.

### **5.2.2. Резултати за други клинични центрове**

Генът *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* е потвърден при всички 14 VR *E. faecium*, изолирани от УМБАЛ „Токуда“-София, като два от тях са позитивни и за *aph(3')-IIIa*. При 12 *E. faecium* фенотипът на резистентност към gentamicin с МПК  $\geq$  1024  $\mu\text{g/ml}$  съответства на доказанния *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ген. При 2 *E. faecium*, обаче, наличието на този ген е съчетано с ниски нива на резистентност към gentamicin (МПК: 12  $\mu\text{g/ml}$  и 96  $\mu\text{g/ml}$ ).

Проучените 9 VR *E. faecium* (4 от УМБАЛ „Св. Марина“, Плевен и 5 от МБАЛ „Сърце и мозък“, Плевен) са с високи нива на

резистентност към gentamicin (МПК  $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ ) и при всички тях е открит *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Два *E. faecium* от УМБАЛ „Св. Марина“ са позитивни и за *aph(3')-IIIa* генът.

### **5.3. Разпространение на гени, кодиращи фактори на вирулентност, при клинични VRE**

#### **5.3.1. Резултати за УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен**

От общо 85 тествани клинични VR *E. faecium* 77 (90.6%) са позитивни за *act* и *esp*. При 6 изолата (7.1%) е доказан и трети вирулентен ген, съответно при 3 – *hyl* и при 3 – *gelE*. Един *E. faecium* е носител само на *gelE* ген, а при друг са налични четири гени за вирулентност – *gelE*, *asa1*, *esp* и *ace*. Strateva и съавт. (Strateva et al. 2016) проучват разпространението на детерминанти на вирулентност сред общо 110 клинични VS *E. faecium* и доказват *efaA* при 88.5%, *act* при 72.8%, *hyl* при 24.2%, *asa1* при 22.8%, *gelE* при 17.1% и *esp* при 4.3% от изолатите.

При нито един от тестваните клинични vanC ентерококи не е установено присъствие на гени за вирулентност, докато при *E. durans* е налице комбинация от 2 гена – *act* и *hyl*.

#### **5.3.2. Резултати за други клинични центрове**

Разпространението на гени, кодиращи фактори на вирулентност при клинични VRE от УМБАЛ „Токуда“, София показва, че от общо 14 *E. faecium* изолата, 12 са с доказани *act* и *esp* гени, а при 1 е установен само *efaA* ген. При *vanB E. faecium* е налице комбинация от 3 гена – *act*, *esp* и *hyl*. От изолатите на УМБАЛ „Св. Марина“, Плевен три *E. faecium* са носители на 3 гена – *act*, *esp* и *hyl*, а един е позитивен за 2 гена – *act* и *esp*. При петте изолата от МБАЛ „Сърце и мозък“, Плевен също са установени тези 2 гена – *act*

и *esp*. Най-често при клиничните *E. faecium* са идентифицирани гените *esp* (n=106), *act* (n=105) и *hyl* (n=7).

#### **5.4. Епидемиологично типизиране на клинични изолати VR *E. faecium***

##### **5.4.1. Резултати за УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен**

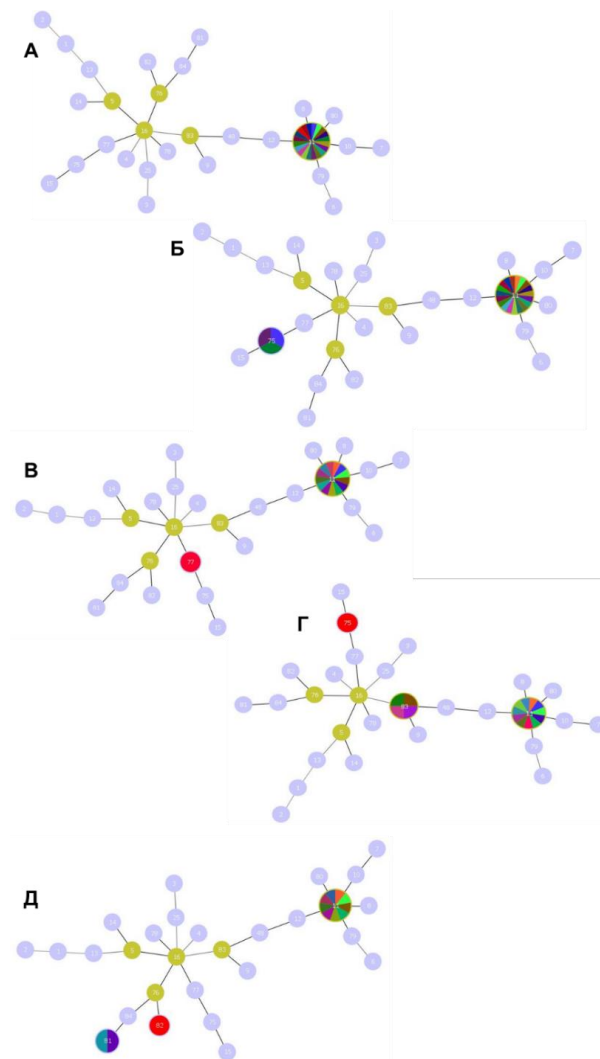
На **Фигура 15** са показани филогенетичните дървета, отразяващи генетичната връзка между *vanA E. faecium* изолатите, а **Фигура 16** илюстрира групирането им под формата на дендрограми в зависимост от броя на тандемните повтори във всеки локус.

Резултатите показват, че доминантен мултилокусен тип при 72 (85.7%) от изолатите е MT11. По 4 (4.8%) *E. faecium* се отнасят към MT75 и MT83, 2 (2.4%) са към MT81 и по един (1.2%) – съответно към MT77 и MT82. Sattari-Maraji и съавт. (Sattari-Maraji et al. 2019) типизират общо 108 *E. faecium* и установяват 27 мултилокусни типа, от които най-разпространени са MT1 (40%), MT2 (13.8%) и MT3 (12.9%). При тестване на 167 *E. faecium* Billstrom и съавт. (Billström et al. 2008) доказват 23 различни MLVA типа. От тях най-чести са MT1 (65%) и MT159 (13%). В друго проучване са доказани 8 мултилокусни типа при 71 VR *E. faecium* (Wardal et al. 2014).

За проучвания период се наблюдава определена динамика на мултилокусните типове, свързана с появата на нови такива. През 2016 г. всички 20 *E. faecium* се отнасят към MT11. През 2017 г. от 22 изолата, 19 принадлежат към MT11, а при 3 е доказан нов тип – MT75. Прави впечатление, че два изолата MT75 *E. faecium* са от ОНКО отделения (1 от ОНКО-АРО и 1 от ОНКО-Хирургия), а третият е от Клиниката по пневмология и фтизиатрия. И двете звена не са част от главната сграда на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен. През

2018 г. от 14 изолата, 13 се отнасят към МТ11, а 1 – към МТ77. Последният е изолиран от I<sup>BO</sup> ОАИЛ. През 2019 г. от 16 изолата, 11 принадлежат към МТ11, 4 – към МТ83 и 1 – към МТ75. Два МТ83 и единичният МТ75 са изолирани от I<sup>BO</sup> ОАИЛ, а други два МТ83 – от Клиниката по нефрология и хемодиализа. През 2020 г. от 12 изолата, 9 са към МТ11. Останалите три принадлежат към новопоявилите се МТ81 и МТ82, съответно 2 *E. faecium* към първия и 1 *E. faecium* към втория тип. МТ81 са изолирани респективно от I<sup>Ba</sup> Хирургия и I<sup>BO</sup> ОАИЛ, а МТ82 – от Клиниката по нефрология и хемодиализа.

При сравнение на фенотипните и генотипните характеристики на МТ11 изолатите е установено, че всички 72 *E. faecium* с МТ11 са носители на *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* гена за резистентност към аминогликозиди и като цяло споделят общи гени за фактори на вирулентност (*ast* и *esp*). При 69 от тях (95.8%) е налице сходен антибиотичен профил с висока резистентност към vancomycin (МПК  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ) и стойности на teicoplanin 6 – 16  $\mu\text{g/ml}$ . Изключение правят 3 изолата (4.2%) показващи високи нива на резистентност към teicoplanin (МПК: 48 –  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ).

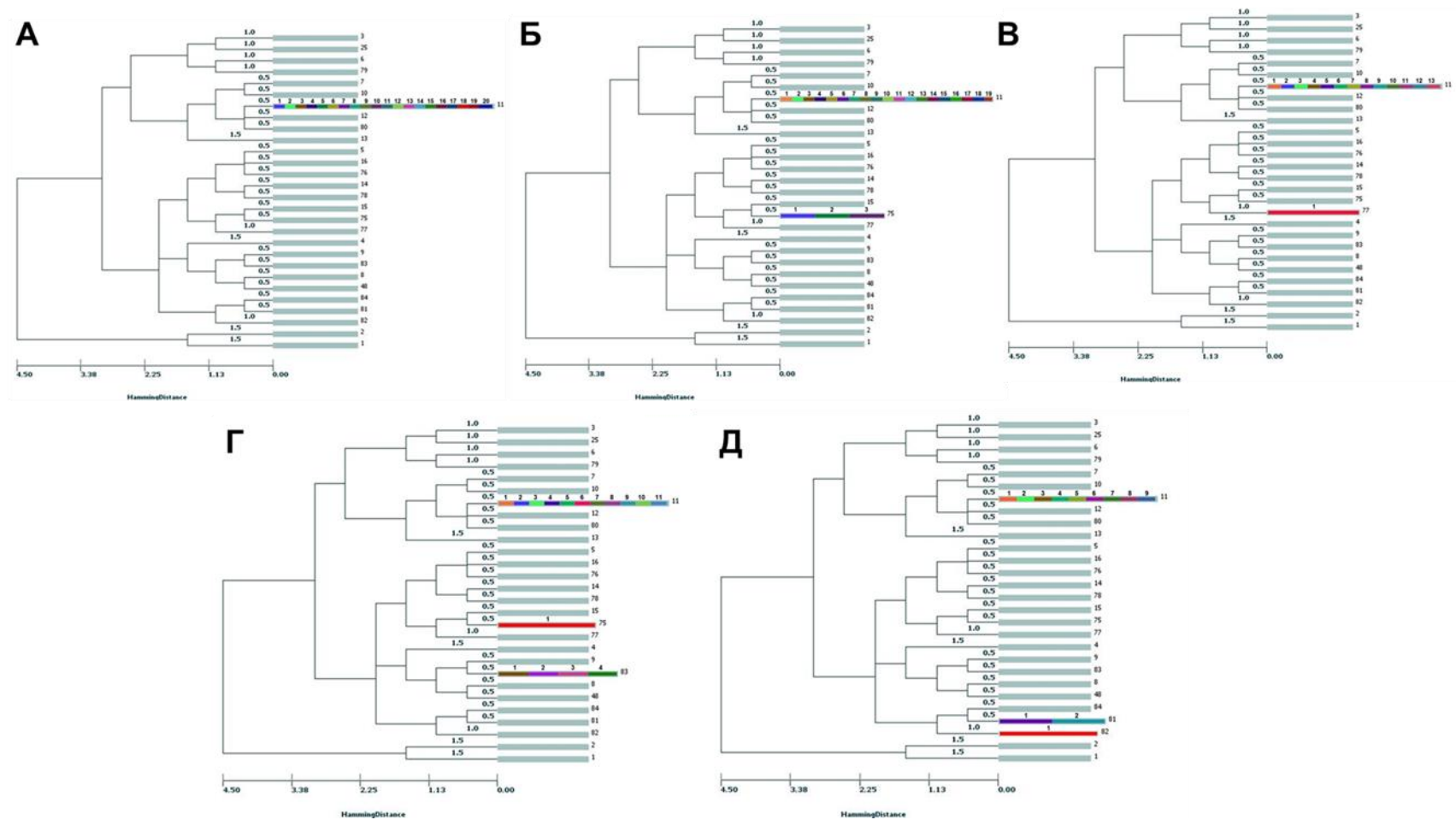


**Фигура 15.** Филогенетично дърво (Minimum spanning tree) на 84 *vanA E. faecium*, генотипизирани с MLVA10. Филогенетичното дърво илюстрира групирането на щамовете в зависимост от броя на тандемните повтори във всеки локус. Всеки кръг представя един генотип, като големината на кръга е пропорционална на броя типизирани изолати. Детектирани са следните MLVA типове (MT): (А) 2016 г. – MT11; (Б) 2017 г. – MT11 и MT75; (В) 2018 г. – MT11 и MT77; (Г) 2019 г. – MT11, MT75 и MT83; (Д) 2020 г. – MT11, MT81 и MT82. Разпределението на изолатите към всеки тип е, както следва: MT11: 72 *E. faecium*; MT 75: 4 *E. faecium*; MT77: 1 *E. faecium*; MT81: 2 *E. faecium*; MT82: 1 *E. faecium*; MT83: 4 *E. faecium*. В жълт цвят са отбелязани MLVA типове, които са генетично близки до някои от детектираните в лечебните заведения типове, но към които не са регистрирани принадлежащи изолати. Фигурата е създадена чрез специализирания софтуер PHYLOViZ 2.0.

#### 5.4.2. Резултати за други клинични центрове

MLVA анализът, отразяващ генетичната връзка между 13 *vanA E. faecium* от УМБАЛ „Токуда“, София потвърди, че 8 от изолатите се отнасят към MT11, 2 – към MT80 и по един – към MT25, MT78 и MT79.

MLVA анализът на 4 *E. faecium* от УМБАЛ „Св. Марина“, Плевен и 5 от МБАЛ „Сърце и мозък“, Плевен показва, че всички те принадлежат към един тип – MT11.



**Фигура 16.** Дендрограми, отразяващи генетичната връзка между клинични *vanA E. faecium*, генотипизирани с MLVA10.

Дендрограмата е създадена с помощта на специализирания софтуер PHYLOViZ 2.0. при използване на йерархичен клъстеринг с разстояние по Хеминг и алгоритъм за клъстериране Complete-Linkage method. С цифри са отбелязани разстоянията между отделните клъстери. Открити са следните MLVA типове (MT): **(А)** 2016 г. – MT11; **(Б)** 2017 г. – MT11 и MT75; **(B)** 2018 г. – MT11 и MT77; **(Г)** 2019 г. – MT11, MT75 и MT83; **(Д)** 2020 г. – MT11, MT81 и MT82. Разпределението на изолатите към всеки тип е както следва: MT11: 72 *E. faecium*; MT 75: 4 *E. faecium*; MT77: 1 *E. faecium*; MT81: 2 *E. faecium*; MT82: 1 *E. faecium*; MT83: 4 *E. faecium*.

## V.ИЗВОДИ

1. При изпитване на Brilliance VRE, chromID VRE, HiCrome VRE Modified и BEAV бульон е установено, че трите хромогенни агара показват еднаква чувствителност (85.7%), като Brilliance VRE и chromID VRE демонстрират идентична специфичност (98.7%), а специфичността на HiCrome VRE Modified е с минимални различия (96.7%). Чувствителността и специфичността на BEAV бульона са съответно 100% и 81.6%.
2. Честотата на интестинална колонизация с VRE е най-голяма при пациенти в Клиниката по ХД (27.8%), следва КАИЛ (24.2%) и Клиниката по ХТ (15.1%).
3. Видовете *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* съставляват 78.3% от всички интестинални VRE и преобладават и при трите групи високорискови пациенти.
4. Статистически значими рискови фактори за интестинална колонизация с VRE при лица на хемодиализа са продължителност на хемодиализата 13-60 месеца, съдов достъп чрез постоянен тунелизиран катетър и прием на vancomycin; при пациенти на интензивно лечение с необходимост от следоперативни грижи, сърдечно-съдови заболявания и наличие на ендотрахеална тръба; при болни с малигнени хематологични заболявания на възраст 70 - 79 г. и заболяването мултиплен миелом.

5. VRE съставляват 3% от ентерококите в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен, за периода 2016 г. – 2020 г. Най-голям е дялът на VR *E. faecium* (90.4%), който циркулира основно в отделенията за интензивни грижи и прилежащите им хирургични звена, където са установени 76.5% от изолатите.
6. При VR *E. faecium* преобладаващ е *vanA* генотипът, наличен при 98.2% от клиничните и 92.9% от интестиналните изолати.
7. Корелация между фенотипа и генотипа на гликопептидна резистентност е установена при всички *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *vanB E. faecium* изолатите и при 13 *vanA E. faecium*, докато VanD-*vanA* тип са показали 106 *E. faecium*.
8. Бифункционалният аминогликозиден ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* е доказан при всички VRE с HLGR и при 6 VR *E. faecium* с ниско ниво на резистентност към gentamicin.
9. Носители на една или повече детерминанти на вирулентност са всички VR *E. faecium* и VR *E. faecalis*, 6 интестинални *E. gallinarum* и 1 VR *E. durans*, като преобладаващи са гените *ast* и *esp*.
10. Общо 85.7% от клиничните и 76.9% от интестиналните *vanA E. faecium* от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, както и 77.3% от *vanA E. faecium* от други болнични центрове принадлежат към MT11. Всички те експресират сходни антибиотични профили и споделят общи гени за резистентност и вирулентност.

## VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Приноси с оригинален характер

1. За първи път в България са оценени възможностите на различни видове селективни хранителни среди за първично изолиране и идентифициране на интестинални VRE.
2. За първи път в България е проучена честотата на интестинална колонизация с VRE сред три групи пациенти с висок риск за колонизация и инфекция с проблемни микроорганизми (провеждащи хемодиализа, страдащи от малигнени хематологични заболявания и лекувани в отделения за интензивни грижи) и са анализирани съответните рисковите фактори.
3. За първи път в България са проведени детайлни микробиологични и генетични изследвания и е извършено генотипизиране на интестинални VRE ентерококи.
4. За първи път в УМБАЛ „д-р Г. Странски“, Плевен е направено епидемиологично проучване сред пациенти с VR *E. faecium* изолати за период от 5 години.
5. За първи път в България за проучени фенотипните и генотипни характеристики на клинични и интестинални vanC ентерококи.

### Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е селективната и диференцираща роля на хромогенните среди за изолиране на VR *E. faecium*/*E. faecalis* от фекални проби.
2. Потвърдена е селективната роля на BEAV бульона за изолиране на VR *E. faecium*/*E. faecalis* и на vanC ентерококи.

3. Потвърдена е ролята на следните рискови фактори благоприятстващи VRE колонизацията: напреднала възраст на пациента, прием на vancomycin, продължителност на хемодиализата, съдов достъп чрез постоянен тунелизиран катетър, наличие на ендотрахеална тръба, необходимост от следоперативни грижи, сърдечно-съдови заболявания и мултиплен миелом.
4. Потвърдена е ниската честота на разпространение на фактори на вирулентност при vanC ентерококите и високата честота при VR *E. faecium*.
5. Потвърдена е ролята на *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* гена за HLGR при VRE.
6. Потвърдена е циркулацията на *vanA* VR *E. faecium* с необичаен фенотип на гликопептидна резистентност (VanD-*vanA*) в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ и други клинични центрове.

### **Приноси с научно-приложен характер**

1. Разработен е алгоритъм за изолиране и презумптивно идентифициране на интестинални VRE при скрининг на пациенти с висок риск за колонизация/инфекция с проблемни микроорганизми.
2. Модифицирани са PCR протоколи за детекция на гени, кодиращи резистентност към аминогликозиди и фактори на вирулентност при vanC ентерококи.
3. Модифициран е PFGE протокол за типизиране на vanC ентерококи.

## VII. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Публикации, свързани с дисертационния труд

1. **Hristova PM**, Nankov VM, Stoikov I, Ivanov IN, Ouzounova-Raykova VV, Hitkova HY. Prevalence of genes encoding resistance to aminoglycosides and virulence factors among intestinal vancomycin-resistant enterococci. Jundishapur Journal of Microbiology. **2022**; 15(9):e128003. DOI: 10.5812/jjm-128003

(IF<sub>2021</sub>–0.820)

2. **Hristova PM**, Hitkova HY, Georgieva DS, Todorova GV, Sredkova MP. Evaluation of three chromogenic media and a selective broth for detection of vancomycin-resistant enterococci from rectal swab specimens. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences. **2021**;74(8):1146-1154. DOI: 10.7546/CRABS.2021.08.05.

(IF<sub>2021</sub>–0.326)

3. **Hristova P**, Hitkova H. Enterococcus and Enterococcus-like organisms recovered in faecal screening for vancomycin-resistance. Journal of IMAB. **2019**;25(3):2649-2654. DOI: 10.5272/jimab.2019253.2649.

### Научни съобщения, свързани с дисертационния труд

1. **Hristova P**, Hitkova H, Szymon Walter de Walthoffen, Sredkova M. Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci isolated from patients undergoing haemodialysis. 8<sup>th</sup> Congress of European Microbiologist (FEMS 2019), Glasgow, Scotland, July 7-11, **2019**. PM 287.

2. **Hristova P**, Nankov V, Georgieva D, Bulgaranova T, Walter de Walthoffen S, Ivanov I, Hitkova H. Prevalence of genes for virulence factors and glycopeptide resistance in intestinal isolates of *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. World Microbe Forum, 20-24 June, **2021**. Online Worldwide. Poster ID: WMF21-2002.
3. **Hristova P**, Nankov V, Stoikov I, Ivanov I, Hitkova H. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in a University hospital in Bulgaria. 32<sup>nd</sup> ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Lisbon, Portugal, 23-26 April, **2022**. Abstract N: 3539.
4. **Hristova P**, Walter de Walthoffen S. Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in transplanted patients. XIV International medical scientific conference for students and young doctors, Medical University-Pleven, Bulgaria, 10-15 October, **2016**, P.134.
5. **Христова П**, Хиткова Х, Тодорова Г, Тодоров В, Митков Я, Георгиева Д, Едрева В, Драгоев К, Средкова М. Изолиране на ванкомицин-резистентни ентерококи от фекални проби чрез селективни хранителни среди и селективен жлъчка-ескулин бульон. XVI Национален Конгрес по Клинична Микробиология и инфекции на Българската асоциация на Микробиолозите, София, 10-12 май, **2018**, Сб. рез. стр. 50.
6. **Христова П**, Хиткова Х, Христов И, Георгиева Д, Средкова М. Скрининг за интестинална колонизация с ванкомицин-резистентни ентерококи при пациенти с малигнени хематологични заболявания. XVII Национален Конгрес по

Клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на Микробиолозите, София, 9-11 Май, **2019**, Сб. рез. стр. 47.

7. **Hristova P**, Hitkova H, Bogdanov S, Mihaylov I, Ivanov I, Georgieva D, Sredkova M. Faecal colonization with vancomycin-resistant enterococci among patients in intensive care units. Journal of Biomedical & Clinical Research. Volume 12, number 1, supplement 2, **2019**. PM 136.
8. **Христова П**, Хиткова Х, Валтер де Валтхофен С, Георгиева Д, Българанова Т, Тодорова Г, Нанков В, Едрева В, Средкова М. Фенотипни и генотипни характеристики на интестинални ванкомицин-резистентни ентерококи при пациенти на хемодиализа. XVIII Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на Микробиолозите, София, 30 Септември-2 Октомври, **2020**, Сб. рез. стр. 59.
9. **Христова П**, Нанков В, Георгиева Д, Българанова Т, Стойков И, Стаменов К, Иванов И, Хиткова Х. Откриване на гени за антимикробна резистентност и вирулентни фактори при интестинални ванкомицин-резистентни ентерококи. XIX Национален Конгрес по Клинична Микробиология и Инфекции, София, 14-16 Септември, **2021**, Сбор. рез. стр. 95-96.
10. **Христова П**, Тодорова Г, Георгиева Д, Хиткова Х. Разпространение на интестинални ванкомицин-резистентни ентерококи и рискови фактори за колонизация при пациенти на хемодиализа. XX Юбилеен Национален Конгрес по Клинична Микробиология и Инфекции, Пловдив, 16-18 Септември, **2022**, Сбор. рез. стр.18-19.

## SUMMARY

The **objectives** of the current work were to study the phenotypic and genotypic characteristics of 186 non-repetitive clinical (n=117) and intestinal (n=69) vancomycin-resistant enterococci (VRE) and the risk factors for colonization and infection with these bacteria in hospitalized patients.

**Results:** The three tested chromogenic agars for isolation and preliminary identification of intestinal VRE showed equal sensitivity (85.7%). Brilliance VRE and chromID VRE demonstrated identical specificity (98.7%), while the specificity of HiCrome VRE Modified was with minimal differences (96.7%). The sensitivity and specificity of BEAV broth were 100% and 81.6%, respectively.

The frequency of intestinal colonization with VRE was the highest in patients in the Hemodialysis ward (27.8%), followed by the ICU (24.2%) and the Hematology ward (15.1%). Among the three groups of high-risk patients *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* species (78.3%) were the dominant intestinal isolates. Risk factors, statistically significant, for intestinal colonization with VRE in patients undergoing hemodialysis were duration of hemodialysis between 13-60 months, the vascular access through an indwelling tunneled catheter and the use of vancomycin; in intensive care patients the risk factors were the need for postoperative cares, the cardiovascular diseases and the presence of an endotracheal tube; in patients with hematological malignancies the risk factors for colonization with VRE were the aged 70-79 years and the multiple myeloma.

For the period 2016 – 2020 in UMHAT "Dr. G. Stranski", Pleven 3% of the enterococcal isolates were VRE with prevalence of VR *E. faecium*

(90.4%). The VR *E. faecium* was circulating mainly in the intensive care units and their adjacent surgical units.

Among the VR *E. faecium* isolates, the *vanA* genotype was prevalent and confirmed in 98.2% of clinical and 92.9% of intestinal isolates. A correlation between the phenotype and genotype of glycopeptide resistance was found in all *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *vanB E. faecium* isolates and in 13 *vanA E. faecium*, whereas 106 *E. faecium* showed VanD-*vanA* type. The bifunctional aminoglycoside gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* was demonstrated in all VRE with HLGR and in 6 VR *E. faecium* with low-level gentamicin resistance. One or more virulence determinants were founded in all VR *E. faecium* and VR *E. faecalis*, 6 intestinal *E. gallinarum* and 1 VR *E. durans*. The predominant genes were *acm* and *esp*. 85.7% of the clinical and 76.9% of the intestinal *vanA E. faecium* from UMHAT "Dr. G. Stranski", as well as 77.3% of *vanA E. faecium* from other clinical centers belong to MT11. They all expressed similar antibiotic resistance profiles and share common virulence genes.

**Conclusions:** The current detailed phenotypic and genotypic study of large number of clinical and intestinal VRE might be useful for prediction of the type of circulating enterococci in the UMHAT "Dr. G. Stranski", Pleven. In addition, the evaluation of frequency of colonization/infection with VRE among the hospitalized patients and the contributing risk factors is an advanced approach to prevent spreading of these problematic microorganisms in hospitals.