

**д-р Преслава Михайлова Христова -  
Трифенова**

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

**ДИ С Е Р Т А Ц И Я**

**София, 2022 г.**

**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**

**ДИСЕРТАЦИЯ**

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

**Научни ръководители:**

Доц. д-р Христина Йотова Хиткова, дм

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

**Научна специалност:**

„Медицинска микробиология“

**София, 2022 г.**

# СЪДЪРЖАНИЕ

<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>10</b>
<b>II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....</b>	<b>12</b>
<b>1. ВЪЗНИКВАНЕ И РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ВАНКОМИЦИН-РЕЗИСТЕНТНИ ЕНТЕРОКОКИ (VRE).....</b>	<b>12</b>
<b>2. РЕЗИСТЕНТНОСТ НА ЕНТЕРОКОКИТЕ КЪМ АНТИБИОТИЦИ .....</b>	<b>14</b>
2.1. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ГЛИКОПЕПТИДИ.....	15
2.1.1. Естествена резистентност.....	16
2.1.2. Придобита резистентност .....	17
2.1.3. Разпространение на фенотиповете на гликопептидна резистентност ..	21
2.2. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ В-ЛАКТАМИ .....	22
2.2.1. Естествена резистентност и толерантност .....	22
2.2.2. Придобита резистентност .....	23
2.3. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ АМИНОГЛИКОЗИДИ .....	24
2.3.1. Естествена резистентност.....	24
2.3.2. Придобита резистентност .....	25
2.4. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ФЛУОРОХИНОЛОНИ.....	26
2.5. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ LINEZOLID .....	27
2.6. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ DARTOMYCIN.....	28
2.7. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ СТРЕПТОГРАМИНИ .....	28
2.8. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ТЕТРАЦИКЛИНИ И ГЛИЦИЛЦИКЛИНИ .....	29
2.9. ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА ЕНТЕРОКОКИТЕ .....	30
<b>3. ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ ЕНТЕРОКОКИТЕ .....</b>	<b>32</b>
3.1. ГЕНЕТИЧНИ ДЕТЕРМИНАНТИ И ПАТОГЕНЕТИЧНА РОЛЯ НА РАЗЛИЧНИТЕ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ .....	33
3.1.1. Ентерококов повърхностен протеин .....	33
3.1.2. Агрегираща субстанция .....	36
3.1.3. Колаген-свързващ протеин .....	37
3.1.4. Протеин EfaA в клетъчната стена.....	38
3.1.5. Желатиназа .....	38
3.1.6. Хиалуронидаза .....	39
3.1.7. Цитолизин.....	40
3.1.8. Пили .....	41
3.2. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ФАКТОРИТЕ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ VRE... ..	42
<b>4. СКРИНИНГ НА ПАЦИЕНТИ ЗА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE.....</b>	<b>44</b>

4.1.	МАТЕРИАЛИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE .....	44
4.2.	СЕЛЕКТИВНИ СРЕДИ ЗА ИЗОЛИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE .....	44
4.2.1.	Жлъчка-ескулин агар с vancomycin .....	45
4.2.2.	Жлъчка-ескулин бульон с vancomycin .....	46
4.2.3.	Хромогенни хранителни среди .....	47
4.3.	ПРЕЗУМПТИВНА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE.....	50
<b>5.</b>	<b>ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE ПРИ ХОСПИТАЛИЗИРАНИ ПАЦИЕНТИ.....</b>	<b>53</b>
5.1.	РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE .....	53
5.2.	ЧЕСТОТА НА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE.....	56
<b>6.</b>	<b>ОБОБЩЕНИЕ НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР .....</b>	<b>58</b>
<b>III.</b>	<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....</b>	<b>61</b>
<b>IV.</b>	<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....</b>	<b>62</b>
<b>1.</b>	<b>БАКТЕРИАЛНИ ИЗОЛАТИ .....</b>	<b>62</b>
1.1.	КЛИНИЧНИ ЕНТЕРОКОКОВИ ИЗОЛАТИ .....	62
1.1.1.	УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен.....	62
1.1.2.	Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ „Токуда“, София.....	62
1.1.3.	МБАЛ „Сърце и мозък“, Плевен .....	62
1.1.4.	УМБАЛ „Св. Марина“, Плевен .....	63
1.2.	ИНТЕСТИНАЛНИ ЕНТЕРОКОКОВИ ИЗОЛАТИ .....	63
<b>2.</b>	<b>ФЕКАЛНИ ПРОБИ.....</b>	<b>63</b>
<b>3.</b>	<b>ПАЦИЕНТИ.....</b>	<b>64</b>
3.1.	ПАЦИЕНТИ, СКРИНИРАНИ ЗА ИНТЕСТИНАЛНО VRE НОСИТЕЛСТВО..	64
3.2.	ПАЦИЕНТИ С УСТАНОВЕНИ VR <i>E. FAECIUM</i> ИЗОЛАТИ .....	65
<b>4.</b>	<b>ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ И УСЛОВИЯ ЗА КУЛТИВИРАНЕ НА ЕНТЕРОКОКИ .....</b>	<b>66</b>
4.1.	ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНЕ НА КЛИНИЧНИ VRE .....	66
4.1.1.	Кръвен агар с 5% овнешка кръв .....	66
4.1.2.	CHROMID® CPS® Elite agar.....	66
4.1.3.	BBL™ CHROMagar™ Orientation.....	66
4.2.	ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE.....	66
4.2.1.	Brilliance™ VRE Agar.....	66
4.2.2.	chromID™ VRE Agar.....	66
4.2.3.	HiCrome™ VRE Modified Agar.....	67
4.2.4.	Bile Aesculin Azide Broth с 6 µg/ml vancomycin .....	67

4.3. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ, ИЗПОЛЗВАНИ ЗА СУБКУЛТИВИРАНЕ НА ПОЛОЖИТЕЛНИ ВАЕУ БУЛЪОНИ ИЛИ НА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE ОТ ХРОМОГЕННИ СРЕДИ.....	68
4.3.1. Кръвен агар с 5% овнешка кръв .....	68
4.3.2. CHROMID® CPS® Elite агар.....	68
4.4. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПРОУЧВАНЕ НА БИОХИМИЧНИ СВОЙСТВА НА ЕНТЕРОКОКИ.....	68
4.5. ХРАНИТЕЛНА СРЕДА ЗА ИЗПИТВАНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА .....	69
4.6. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ, ИЗПОЛЗВАНИ ПРИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ .....	69
4.7. ХРАНИТЕЛНА СРЕДА ЗА СЪХРАНЕНИЕ НА ЩАМОВЕТЕ .....	69
SKIN MILK POWDER .....	69
<b>5. АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА.....</b>	<b>70</b>
5.1. АНТИБИОТИЧНИ СУБСТАНЦИИ.....	70
5.2. АНТИБИОТИЧНИ ДИСКОВЕ .....	70
5.3. АНТИБИОТИЧНИ СТРИПОВЕ .....	70
<b>6. МЕТОДИ ЗА ФЕНОТИПНА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ЕНТЕРОКОКИ. 70</b>	<b>70</b>
6.1. КОНВЕНЦИОНАЛНИ МЕТОДИ .....	70
6.1.1. Тестове за презумптивна идентификация на ентерококи.....	70
6.1.2. Тестове за определяне на групова и видова принадлежност на ентерококи .....	71
6.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧРЕЗ RAPID™ STR SYSTEM .....	72
6.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧРЕЗ АВТОМАТИЗИРАНИ СИСТЕМИ .....	73
6.3.1. VITEK® 2 COMPACT .....	73
6.3.2. VITEK® MS .....	73
<b>7. МЕТОДИ ЗА ИЗПИТВАНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА.....</b>	<b>74</b>
7.1. ДИСКОВО-ДИФУЗИОНЕН МЕТОД НА KIRBY-BAUER .....	74
7.2. ГРАДИЕНТ-ДИФУЗИОНЕН МЕТОД .....	74
<b>8. ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ .....</b>	<b>75</b>
8.1. МЕТОДИ ЗА ИЗОЛИРАНЕ И ИЗМЕРВАНЕ НА ДНК .....	75
8.1.1. Методи за изолиране на ДНК.....	75
8.1.2. Определяне концентрацията на изолираната ДНК.....	76
8.2. ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR) ЗА ОТКРИВАНЕ НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ ВИДОВА ПРИНАДЛЕЖНОСТ, АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ .	77
8.2.1. Нуклеотидни последователности на използваните праймери .....	77

8.2.2.	Мултиплекс PCR за видова идентификация и доказване на гени за резистентност към гликопептиди .....	80
8.2.3.	Мултиплекс PCR за детекция на гени, обуславящи резистентност към аминокликозиди и фактори на вирулентност .....	81
8.2.4.	Гел-електрофореза за отчитане на резултатите от PCR.....	81
8.2.5.	Капилярна електрофореза за отчитане на резултатите от PCR.....	82
8.3.	<b>МЕТОДИ НА ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА VRE .....</b>	<b>83</b>
8.3.1.	Мултилокусен анализ на вариабилен брой от тандемни повтори (Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA) .....	83
8.3.2.	Пулсова гел електрофореза (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE).....	84
<b>9.</b>	<b>СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ .....</b>	<b>86</b>
9.1.	GRAPHPAD PRISM VERSION 7.00.....	86
9.2.	SPSS SOFTWARE VERSION 7.00 .....	87
<b>V.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....</b>	<b>90</b>
<b>1.</b>	<b>ОЦЕНКА НА СЕЛЕКТИВНИ ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE ....</b>	<b>90</b>
1.1.	РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА ЧЕТИРИ СЕЛЕКТИВНИ ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ.....	90
1.2.	РЕЗУЛТАТИ ОТ ИДЕНТИФИКАЦИЯТА С БАЗОВИ ФЕНОТИПНИ ТЕСТОВЕ .....	93
1.3.	РЕЗУЛТАТИ ОТ ИДЕНТИФИКАЦИЯТА С МАНУАЛНИ И АВТОМАТИЗИРАНИ СИСТЕМИ, И ДЕТЕКЦИЯТА НА ГЕНИ ЗА ВИДОВА ПРИНАДЛЕЖНОСТ .....	96
1.4.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТНОСНО ВЪЗМОЖНОСТИТЕ НА СЕЛЕКТИВНИ ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE .....	100
<b>2.</b>	<b>ПРОУЧВАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНАТА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВИСОК РИСК ЗА КОЛОНИЗАЦИЯ И ИНФЕКЦИЯ С ПРОБЛЕМНИ МИКРООРГАНИЗМИ .....</b>	<b>106</b>
2.1.	ДЕМОГРАФСКИ И КЛИНИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПРОУЧЕНИТЕ ПАЦИЕНТИ .....	106
2.2.	РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE .....	113
2.3.	ЧЕСТОТА НА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE.....	118
2.4.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТНОСНО ЧЕСТОТАТА И РИСКОВИТЕ ФАКТОРИ ЗА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВИСОК РИСК ЗА КОЛОНИЗАЦИЯ И ИНФЕКЦИЯ С ПРОБЛЕМНИ МИКРООРГАНИЗМИ.....	120
<b>3.</b>	<b>ХАРАКТЕРИСТИКИ НА VRE, ИЗОЛИРАНИ ПРИ ФЕКАЛЕН СКРИНИНГ НА ПАЦИЕНТИ С ВИСОК РИСК ЗА КОЛОНИЗАЦИЯ И ИНФЕКЦИЯ С ПРОБЛЕМНИ МИКРООРГАНИЗМИ .....</b>	<b>126</b>

3.1.	АНТИМИКРОБНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И ДЕТЕКЦИЯ НА VAN ГЕНИ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE .....	126
3.2.	ДЕТЕКЦИЯ НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ АМИНОГЛИКОЗИДИ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE .....	132
3.3.	ДЕТЕКЦИЯ НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE .....	133
3.4.	ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE .....	135
3.4.1.	Резултати от типизирането на интестинални <i>vanC</i> ентерококи при пациенти на хемодиализа .....	135
3.4.2.	Резултати от типизирането на интестинални <i>vanA E. faecium</i> от пациенти на хемодиализа .....	137
3.4.3.	Резултати от типизирането на всички интестинални <i>vanA E. faecium</i> .	137
3.5.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА АНТИМИКРОБНАТА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И ДЕТЕКЦИЯТА НА ГЕНИ КОДИРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ VANСОМУСИН И АМИНОГЛИКОЗИДИ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE.....	140
3.6.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE .....	144
3.7.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ЕПИДЕМИОЛОГИЧНОТО ТИПИЗИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE .....	145
<b>4.</b>	<b>РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА КЛИНИЧНИ VRE В УМБАЛ „Д-Р Г. СТРАНСКИ”, ПЛЕВЕН .....</b>	<b>148</b>
4.1.	РЕЗУЛТАТИ ЗА ЧЕСТОТА И ВИДОВО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА КЛИНИЧНИ VRE .....	148
4.2.	ДЕМОГРАФСКИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПАЦИЕНТИТЕ С VRE .....	151
4.3.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ЗА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА КЛИНИЧНИ VRE В УМБАЛ „Д-Р Г. СТРАНСКИ”, ПЛЕВЕН .....	153
<b>5.</b>	<b>ХАРАКТЕРИСТИКИ НА VRE, ИЗОЛИРАНИ ОТ КЛИНИЧНИ МАТЕРИАЛИ НА ХОСПИТАЛИЗИРАНИ ПАЦИЕНТИ .....</b>	<b>156</b>
5.1.	АНТИМИКРОБНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И ДЕТЕКЦИЯ НА VAN ГЕНИ ПРИ КЛИНИЧНИ VRE .....	156
5.1.1.	Резултати за УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен .....	156
5.1.2.	Резултати за други клинични центрове .....	161
5.2.	ДЕТЕКЦИЯ НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ АМИНОГЛИКОЗИДИ ПРИ КЛИНИЧНИ VRE .....	163
5.2.1.	Резултати за УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен .....	163
5.2.2.	Резултати за други клинични центрове .....	164
5.3.	РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ КЛИНИЧНИ VRE .....	165
5.3.1.	Резултати за УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен .....	165
5.3.2.	Резултати за други клинични центрове .....	166

5.4. ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ VR <i>E. FAECIUM</i> .....	167
5.4.1. Резултати за УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен.....	167
5.4.2. Резултати за други клинични центрове.....	171
5.5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА АНТИМИКРОБНАТА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И ДЕТЕКЦИЯТА НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ VANCOMYCIN И АМИНОГЛИКОЗИДИ ПРИ КЛИНИЧНИ VRE .....	172
5.6. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ КЛИНИЧНИ VRE.....	175
5.7. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ЕПИДЕМИОЛОГИЧНОТО ТИПИЗИРАНЕ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ VR <i>E. FAECIUM</i> .....	177
<b>VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>179</b>
<b>VII. ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ.....</b>	<b>181</b>
<b>VIII. БИБЛИОГРАФИЯ .....</b>	<b>183</b>
<b>IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>206</b>
<b>X. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>208</b>
1. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	208
2. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	208
<b>XI. ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>210</b>

## 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  
**AACs** – аминокликозид-N-ацетилтрансферази  
**Ace** – колаген-свързващ протеин на *E. faecalis*  
**ace/acm** – ген, кодиращ колаген-свързващ протеин  
**Acn** – колаген-свързващ протеин на *E. faecium*  
**agg/asa1** – ген, кодиращ агрегираща субстанция  
**AMEs** – аминокликозид-модифициращи ензими  
**AMP** – ampicillin  
**ANTs** – аминокликозид-нуклеотидилтрансферази  
**APHs** – аминокликозид-O-фосфотрансферази  
**ARA** – арабиноза  
**AS** – агрегиращата субстанция  
**AURA** – Australian report on antimicrobial use and resistance in human health  
**BEV** – жлъчка-ескулин с vancomycin  
**BEAV** – жлъчка-ескулин азид с vancomycin  
**BS** – свързваща субстанция  
**BSIs** – инфекции на кръвообращението  
**CC** – клонален комплекс  
**CARSS** – Канадска система за наблюдение на антимикробната резистентност  
**CDC** – Център за контрол и превенция на заболяванията  
**CI** – доверителен интервал  
**CIP** – ciprofloxacin  
**CLSI** – Институт за клинични и лабораторни стандарти  
**Cyl** – цитолизин  
**cyl** – ген, кодиращ цитолизин  
**DAP** – daptomycin  
**D-Ala-D-Ala** – D-аланил-D-аланин  
**D-Lac** – D-лактат  
**D-Ser** – D-серин  
**EARSS** – Европейска система за наблюдение на антимикробната резистентност  
**ECDC** – Европейски център за контрол и профилактика на заболяванията  
**EcbA** – колаген-свързващ протеин на *E. faecium*  
**EfaA** – протеин EfaA в клетъчната стена/ендокардит-специфичен антиген А на *E. faecalis*  
**efaA** – ген за ендокардит-специфичен антиген А  
**Esp** – ентерококов повърхностен протеин  
**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  
**geIE** – ген, кодиращ желатиназа  
**HLAR** – високо ниво на резистентност към аминокликозиди  
**HLGR** – високо ниво на резистентност към gentamicin  
**HLSR** – високо ниво на резистентност към streptomycin  
**Hyl** – хиалуронидаза  
**hyl** – ген, кодиращ хиалуронидаза  
**HiRECC** – високорисков ентерококов комплекс  
**IPM** – imipenem  
**LAP** – левцин аминопептидаза  
**LVX** – levofloxacin  
**LZD** – linezolid  
**MAN** – манитол  
**MDR** – множествена лекарствена резистентност  
**MGP** – метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид  
**MLST** – мултилокусно секвенционно типизиране  
**MLVA** – мултилокусен анализ на вариабилен брой от тандемни повтори  
**MOT** – подвижност  
**MRSA** – метицилин-резистентен *S. aureus*  
**MT** – мултилокусен тип  
**MSCRAMMs** – микробни повърхностни компоненти, разпознаващи адхезивни матриксни молекули  
**NHSN** – National Healthcare Safety Network  
**NNIS** – Национална система за надзор на вътреболничните инфекции  
**NPV** – отрицателна прогнозна стойност  
**PAI** – остров на патогенност  
**PBPs** – penicillin-свързващи протеини  
**PCR** – полимеразна верижна реакция  
**PDR** – лекарствена пан-резистентност  
**PIG** – пигмент  
**PFGE** – пулсова гел електрофореза  
**PGC** – генетичен клъстер на пилина  
**PMNLs** – полиморфонуклеарни левкоцити  
**PPV** – положителна прогнозна стойност  
**PYR** – L-пиролинидол ариламидаза  
**Q/D** – quinupristin/dalfopristin  
**RAF** – рафиноза  
**RGD** – аргинин, глицин, аспартат мотив  
**SAID** – The Surveillance Atlas of Infectious Diseases  
**SBL** – сорбитол  
**Scm** – втори колаген-свързващ протеин на *E. faecium*  
**ST** – секвенционен тип  
**STM** – streptomycin  
**TCS** – трансдукционна сигнална система  
**TEC** – teicoplanin  
**TGC** – tigecycline  
**TN** – истински отрицателни  
**TP** – истински положителни  
**VAN** – vancomycin  
**vanC** – ентерококи с вродени ниски нива на резистентност към гликопептиди  
**VNTR** – вариабилен брой от тандемни повторени локуси  
**VR** – ванкомицин-резистентен  
**VRE** – ванкомицин-резистентни ентерококи  
**VS** – ванкомицин-чувствителен  
**VSE** – ванкомицин-чувствителни ентерококи  
**WGS** – целогеномно секвениране  
**XDR** – разширена лекарствена резистентност

## 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 (Tannock GW and Cook G. 2002).

При определени обстоятелства ентерококите, колонизиращи интестиналния тракт, се разпространяват в други области и причиняват инфекции (Alevizakos et al. 2016). През последните години нарастват вътреболничните инфекции (ВБИ), свързани с тези микроорганизми (Brinkwirth et al. 2021). Ентерококите са втори по честота причинители на ВБИ в САЩ и съответно трети в Европа (ECDC-Net 2013; Weiner et al. 2016). 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 действително действие срещу ентерококите.

След появата на първите щамове ванкомицин-резистентни ентерококи (VRE) в края на 80-те години на миналия век, резистентността към vancomycin при *Enterococcus spp.* е нараснала значително и с бърз темп (Leclercq et al. 1988; Uttley et al. 1988). 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. (Ziakas et al. 2013; Zacharioudakis et al. 2015; Alevizakos et al. 2016). 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 (ECDC-Net 2019).

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. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### 1. ВЪЗНИКВАНЕ И РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ВАНКОМИЦИН-РЕЗИСТЕНТНИ ЕНТЕРОКОКИ (VRE)

Отличителна черта на ентерококите е тяхната естествена резистентност към почти всички основни класове антибиотици (Krogstad et al. 1978; Murray 1990; Leclercq et al. 1992). В допълнение, те могат да придобият резистентност към редица антимикробни препарати, като  $\beta$ -лактами, аминогликозиди, флуорохинолони и гликопептиди (Moellering 1991; Rice and Shlaes 1995).

През 1986 г. във Франция и Великобритания са описани първите два щама *Enterococcus faecium* с придобита резистентност към гликопептиди (Leclercq et al. 1988; Uttley et al. 1988). Една година по-късно е документиран първият случай на VR *E. faecium* в САЩ (Hayden et al. 1993). През 1988 г. са публикувани данни за вродена резистентност към vancomycin при *Enterococcus gallinarum* (Kaplan et al. 1988), а след това и при *Enterococcus casseliflavus* (Swenson et al. 1989).

Няколко години по-късно излиза първият анализ на National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system към Centers for Disease Control and Prevention (CDC), САЩ, според който честотата на нозокомиалните инфекции, причинени от VRE е нараснала 20-кратно (от 0.3 % на 7.9%) между 1989 г. – 1993 г. (CDC-Net 1993). През 1999 г. докладваният процент на VRE от болниците в САЩ достига 24.7%. За периода 2009 г. – 2010 г. в САЩ е установена резистентност към vancomycin при 35.5% от нозокомиалните ентерококови изолати, което ги нарежда на второ място сред причинителите на ВБИ в страната (Sievert et al. 2013). Данните на National Healthcare Safety Network (NHSN) system към CDC за видовото разпределение на ВБИ, причинени от VRE за периода 2011 г. – 2014 г. показват, че около 80% се дължат на *E. faecium* и 10% на *Enterococcus faecalis* (Weiner et al. 2016). Броят на нозокомиалните инфекции с VRE в САЩ през 2017 г. е около 54 500, което съставлява 30% от общо регистрираните инфекции, като 5 400 (9.9%) от тях са завършили фатално (CDC-Net 2019). В доклад на CDC от 2019 г. VRE са определени като сериозна заплаха за САЩ (CDC-Net 2019).

В проучване, проведено в Бразилия между 2007 г. – 2015 г., се съобщава за над 60% честота на изолиране на VR *E. faecium* (Sacramento et al. 2017). По данни на Second Australian report on antimicrobial use and resistance in human health (AURA) за 2015 г., делът на клиничните изолати VR *E. faecium* и VR *E. faecalis* е съответно 48.7% – 56.8% и 0.1 – 0.3 % (AURA-Net 2017). Отчетеният процент на резистентност към vancomycin при *E. faecium* в Австралия е един от най-високите в света за този период. Сравнително висока е и честотата на разпространение на VRE в Африка. През 2020 г. Alemayehu и Hailemariam (Alemayehu and Hailemariam 2020) проучват средната честотата на VRE за десет годишен период (2010 г. – 2019 г.) и установяват, че от общо 4073 ентерококови изолата, 1488 (26.8%) са VRE. Авторите доказват, че има значителна разлика в процента на изолираните VRE в отделните страни. Той е най-висок в Южна Африка (74.8%), следват Египет (37.2%), Уганда (9.8%), Мароко (8.2%), Етиопия (7.9%), Тунис (6.5%), Танзания (6.1%) и е най-нисък в Нигерия и Алжир (2.8%).

Значително по-ниска е честотата на разпространение на VRE в Азия и Канада. В мета-анализа на Shrestha и съавт. (Shrestha et al. 2021) е установена 8.1% средна честота на VRE в Азия за 2000 г. – 2020 г. Данните сочат, че процентът на VRE е нараснал от 6.4% за периода 2000 г. – 2010 г. до 9.1% през следващите години (2010 г. – 2020 г.). Анализът по региони показва, че VRE са най-разпространени в Западна Азия (11.4%) и Южна Азия (7.7%). Най-малък е техният дял в Югоизточна (1.8%) и Източна Азия (3.1%).

Simner и съавт. (Simner et al. 2015) докладват нисък относителен дял (4.2%) на вътреболнични инфекции от VRE в Канада за периода 2007 г. – 2013 г. Всички описани ентерококи са били идентифицирани като *E. faecium*. Според доклада на Canadian Antimicrobial System Report Resistance Surveillance от 2020 г. (CARSS-Net 2020) честотата на вътреболничната бактериемия, причинена от *Enterococcus* spp., е нараснала двукратно между 2014 г. – 2018 г., като 98.6% от VRE са идентифицирани като *E. faecium*, а 1.4% – като *E. faecalis*.

По последни данни на The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARS-Net 2018) делът на инвазивните VR *E. faecium* в Европа за 2018 г. е средно 17.3%. Той е най-голям в Кипър (59.1%), Румъния (40.3%), Ирландия (40.2%), Унгария (39.5%), Полша (35.8%), Латвия (35.4%), Словакия (32.3%) и Литва (31.3%). Под 2% остава честотата на VR *E. faecium* във Франция, Холандия, Швеция, Финландия и Белгия. Все още липсва доказана циркулация

на тези проблемни микроорганизми в Люксембург и Исландия. Както в света, така и в Европа, честотата на инвазивните VR *E. faecalis* е по-ниска и варира от 0% в Естония, Финландия, Исландия, Люксембург и Малта до 11.4% в Латвия.

Първото съобщение за появата на VRE в България датира от 2005 г., когато Lazarova и съавт. (Lazarova et al. 2005) описват два ентерококови изолата от урини (1 *E. faecium* и 1 *E. faecalis*) с високи нива на резистентност към vancomycin и чувствителност към teicoplanin. Според данни на The Surveillance Atlas of Infectious Diseases (SAID) (ECDC-Net 2019), до 2012 г. честотата на инвазивните VR *E. faecium* в България е 0%, след което се отбелязва тенденция към нарастване, съответно 2013 г. – 2.3%, 2014 г. – 13.3%, 2015 г. – 14.6%, 2016 г. – 18.2% и 2017 г. – 19.0%. През 2018 г. е отбелязан известен спад (9.9%), а през 2019 г. честотата се покачва отново (12.1%) (ECDC-Net 2019). В сравнение с честотата на VR *E. faecium* изолати, делът на инвазивните *E. faecalis* е значително по-нисък или дори липсва, съответно до 2012 г – 0%, 2013 г. – 2.8%, 2014 г. и 2015 г. – 0%, 2016 г. – 1.8%, 2017 г.– 2.3%, 2018 г. – 1.3%, през 2019 г. – 0% (ECDC-Net 2019).

Видно е, че публикуваните данни показват различия по отношение честотата на VRE в отделните региони на света, но навсякъде преобладават VR *E. faecium* изолати. Налице е тенденция към трайно нарастване на тези микроорганизми като причинители на нозокомиални инфекции (Cassini et al. 2019). Високата честота на VRE в някои страни се дължи на циркулацията на болнични клонове, принадлежащи към различни клонални комплекси (CC), най-често *E. faecium* CC17 и *E. faecalis* CC2. Появата и разпространението на VRE с множествена резистентност е глобален медицински проблем поради ограничените възможности за лечение на такива патогени.

## **2. РЕЗИСТЕНТНОСТ НА ЕНТЕРОКОКИТЕ КЪМ АНТИБИОТИЦИ**

Естествената (intrinsic) резистентност при ентерококите е свързана с хромозомно кодирани характеристики, които присъстват във всички или повечето видове. Обичайно естествената резистентност е с ниско ниво (low level) и възниква в резултат на следните механизми: редуциран афинитет на антибиотика към таргетната молекула ( $\beta$ -лактами и гликопептиди), наличие на ефлуксна помпа (флуорохинолони и clindamycin) и ограничено акумулиране на антибиотика в резултат на затруднено проникване в бактериалната клетка

(аминогликозиди и флуорохинолони). При ентерококите е доказана *in vitro* активност на комбинацията trimethoprim/sulfamethoxazole, която обаче липсва *in vivo*. Този факт се дължи на неспособността на тези бактерии да използват екзогенна фолиева киселина (Zervos and Schaberg 1985).

Придобитата (acquired) резистентност при ентерококите се дължи на мутации в гените, кодиращи синтеза на таргетните молекули или придобиване на нови генетични детерминанти, пренасящи се от плазмиди или транспозони (Smith and Murray 1992; Mundy et al. 2000). Описана е придобита резистентност към  $\beta$ -лактами, аминогликозиди, флуорохинолони, chloramphenicol, rifampin, nitrofurantoin, фузидиева киселина, тетрациклини, макролиди, линкозамиди, гликопептиди и дори към някои от по-новите налични препарати като linezolid, daptomycin и quinupristin/dalfopristin. Промяна в таргетната молекула, ензимно инактивиране на антибиотика или наличие на ефлуксна помпа са основните механизми за развитие на този тип резистентност. Повечето от циркулиращите болнични клонове VRE се характеризират с високо ниво на резистентност към пеницилини, аминогликозиди и флуорохинолони. Освен това са изолирани VR *E. faecium* щамове, резистентни на linezolid, daptomycin или quinupristin/dalfopristin.

## 2.1. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ГЛИКОПЕПТИДИ

Гликопептидните антибиотици, с представители vancomycin и teicoplanin, се отнасят към групата на инхибиторите на клетъчната стена. Те се свързват с терминалния D-аланил-D-аланин (D-Ala-D-Ala) участък на пентапептида, което води до прекратяване присъединяването на прекурсорните молекули към следващата пептидогликанна верига и блокиране на транспептидацията. В хода на своята еволюция някои клинично значими ентерококи развиват придобита резистентност към гликопептидите, а при единични видове е доказана и вродена такава.

Независимо от типа на резистентност към гликопептиди (естествена или придобита) продукцията на две групи ензими стои в основата ѝ. Първата група ензими е отговорна за модификацията на D-Ala-D-Ala (vancomycin-свързващ участък), при който терминалният D-Ala е заменен с D-лактат (D-Lac) или D-серин (D-Ser) (Gold 2001; Courvalin 2006). Втората група ензими – карбоксипептидази и дипептидази са насочени към отстраняване на vancomycin-свързващ участък (D-Ala-D-Ala) (Arthur et al. 1992, 1993; Wright et al. 1992).

Към настоящия момент на база фенотипни и генотипни характеристики са описани 9 клъстера (типа) на резистентност към гликопептиди при ентерококите (Courvalin 2006; Boyd et al. 2008; Xu et al. 2010; Lebreton et al. 2011). Осем от тях са резултат от придобита резистентност (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* и *vanN*) и един – *vanC* е резултат от естествена резистентност. Описаните клъстери се състоят от три групи гени, кодиращи съответно TCS (signal transduction system), ензими необходими за синтеза на модифицирания D-Ala-D-Ala и ензими, които разрушават D-Ala-D-Ala.

### **2.1.1. Естествена резистентност**

Естествената резистентност към гликопептидите е характерна за *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* (Navarro and Courvalin 1994). Тези два вида носят *vanC* ген, локализиран в бактериалната хромозома. За тях е типичен VanC фенотип – ниско ниво на резистентност към vancomycin с минимални потискащи концентрации (МПК) 2 – 32 µg/ml и чувствителност към teicoplanin (МПК 0.5 – 1 µg/ml).

Естествената гликопептидна резистентност се дължи на промяна на терминалния дипептид от D-Ala-D-Ala в D-Ala-D-Ser (Arias et al. 2000). Модифицираният терминален участък има 7 пъти по-малък афинитет към vancomycin и запазен афинитет към teicoplanin (Reynolds et al. 1994). Оперонът *vanC* е отговорен за продукцията на три ензима, причина за развитието на естествена резистентност: серин-рацемаза (VanT), който участва в синтеза на D-Ser; *vanC*-лигаза, който катализира формирането на D-Ala-D-Ser и *vanXY<sub>c</sub>*, който играе роля в отстраняването на D-Ala-D-Ala (Leclercq et al. 1992b; Navarro and Courvalin 1994). Известни са четири субтипа на *vanC* оперона: *vanC<sub>1</sub>* при *E. gallinarum* и *vanC<sub>2</sub>*, *vanC<sub>3</sub>*, *vanC<sub>4</sub>* при *E. casseliflavus* (Dutka-Malen et al. 1992; Navarro and Courvalin 1994; Clark et al. 1998; Watanabe et al. 2009). Освен естествена резистентност към гликопептидите тези видове ентерококи са способни да придобиват и други *van* гени, напр. *vanA*, *vanB*, *vanD* при *E. gallinarum* (Eshaghi et al. 2015; Teixeira et al. 2015) и *vanA* при *E. casseliflavus* (Haenni et al. 2009; Teixeira et al. 2015).

### 2.1.2. Придобита резистентност

Придобитата резистентност към гликопептидите е установена при видовете *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus raffinosus* и някои други. Тя се дължи на модификация на терминалния D-Ala-D-Ala в D-Ala-D-Lac или на D-Ala-D-Ala в D-Ala-D-Ser (Gold 2001; Courvalin 2006).

#### VanA фенотип

Характеризира се с високи нива на резистентност към vancomycin (МПК = 64 – > 1000 µg/ml) и teicoplanin (МПК 16 – 512 µg/ml). Гените за резистентността са разположени върху мобилен елемент Tn1546 в плазмид по посока на транскрипцията (Arthur et al. 1993):

***vanR* → *vanS* → *vanH* → *vanA* → *vanX* → *vanY* → *vanZ***

Експресията на *vanA* е индуцибелна и е под регулацията на два промотора. Първият е отговорен за транскрипцията на VanRS, TCS, която регулира функцията и експресията на *vanA* гена. VanS е рецептор (сензор) на системата. Той представлява трансмембранен протеин с хистадин-киназна активност, който при присъствието на гликопептиден антибиотик фосфорилира регулаторния VanR (Lancefield 1933). Веднъж активиран, VanR се свързва към втори промоторен регион, намиращ се преди гените за резистентност и активира тяхната транскрипция. Първата стъпка при експесиране на резистентността е транскрипцията на *vanH*, кодиращ дехидрогеназа, отговорна за образуването на D-лактат от пируват. Следващият ген, *vanA*, продуцира лигаза, която добавя D-Lac към D-Ala преди присъединяването ѝ към трипептидния прекурсор. Образуваният се пентадепсипептид се инкорпорира в растящата клетъчна стена. Това прави деструкцията на крайния D-Ala пептапептиден прекурсор решаваща за механизма на резистентност към гликопептиди. Предполага се, че *vanZ* кодира протеини с неясна функция, но според публикувани данни, независимата му експресия при щамовете *E. faecium* води до резистентност към teicoplanin.

VanA фенотип е доказан при видовете *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus thailandicus*, както и при видовете с вродена резистентност към гликопептиди *E. gallinarum* и

*E. casseliflavus* (Dutka-Malen et al. 1994; Corso et al. 2005; Courvalin 2006; Neves et al. 2009; Teixeira et al. 2015).

### **VanB фенотип**

Характеризира се с вариращи нива на резистентност към vancomycin (МПК 8 – 1000 µg/ml) и чувствителност към teicoplanin (МПК 0.5 – 1 µg/ml). Доказан е при видовете *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* и *E. gallinarum* (Teixeira et al. 2015). Гените за резистентността са разположени върху мобилните елементи Tn1547 или Tn1549/Tn5382 в плазмид по посока на транскрипцията (Teixeira et al. 2015):

***VanR<sub>B</sub>* → *vanS<sub>B</sub>* → *vanY<sub>B</sub>* → *vanW* → *vanH<sub>B</sub>* → *vanB* → *vanX<sub>B</sub>***

VanB функционира по сходен начин с VanA клъстера, но има няколко важни различия. Рецепторната киназа (*VanS<sub>B</sub>*) и регулаторът (*VanR<sub>B</sub>*) споделят далечни връзки с VanA хомолозите (Depardieu et al. 2007). *VanS<sub>B</sub>* не се активира в присъствието на teicoplanin, което е причина за чувствителността на ентерококите с VanB фенотип към този антибиотик. Въпреки това, резистентността към teicoplanin може да се увеличи при мутация в рецепторната киназа и последваща активация на системата в присъствието на антибиотика или нарушаване на *VanS<sub>B</sub>* фосфатазната активност, водещо до конститутивна експресия на резистентните гени (Baptista et al. 1997). При VanB клъстера липсва *vanZ* ген, заменен е с *vanW*, чиято функция не е ясна. Описани са три *vanB* субтипа – *vanB<sub>1</sub>*, *vanB<sub>2</sub>* и *vanB<sub>3</sub>*, но липсва корелация между субтипа и нивата на резистентност към vancomycin (Patel et al. 1998; Dahl et al. 1999).

### **VanD фенотип**

Характеризира се с умерено високо ниво на резистентност към vancomycin (МПК 64 – 128 µg/ml) и варираща резистентност към teicoplanin (МПК 4 – 64 µg/ml). Установен е при видовете *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. gallinarum* и *E. raffinosus* (Teixeira et al. 2015).

Оперонът *vanD* е локализиран в хромозомата и организацията на гените в него е сходна с тези при *vanA* и *vanB* опероните, но с някои съществени разлики. Организацията на VanD оперона е представена от 6 гена:

***vanR<sub>D</sub>* → *vanS<sub>D</sub>* → *vanY<sub>D</sub>* → *vanH<sub>D</sub>* → *vanD* → *vanX<sub>D</sub>***

Счита се, че дефект на TCS при VanD фенотипът може да доведе до серия от компенсаторни мутации (Depardieu et al. 2004). Ентерококите с VanD нямат активна сигнална TCS поради инактивиращи мутации във *VanS<sub>D</sub>* рецептора и

VanR<sub>D</sub> регулатора. Ето защо фенотипът се експресира конститутивно чрез константно активиране на оперон, отговорен за продукцията на D-Ala-D-Lac. Щамовете с VanD фенотип имат и мутация в *ddl* гена, кодиращ лигаза, отговорна за синтеза на нормални пептидогликанни прекурсори. Поради отсъствие на активност на D-аланин-D-лигазата, кодирана от *ddl* гена, не се синтезира D-Ala-D-Ala (Yowler et al. 2000). Освен това, липсва хомоложен на *vanZ* ген (при *vanA* оперон) или на *vanW* (при *vanB* оперон). Известни са пет *vanD* субтипа – *vanD*<sub>1</sub>, *vanD*<sub>2</sub>, *vanD*<sub>3</sub>, *vanD*<sub>4</sub> и *vanD*<sub>5</sub> (Woodford 2001; Teixeira et al. 2015).

### **VanE фенотип**

Характеризира се с ниско ниво на резистентност към vancomycin (МПК 8 – 12 µg/ml) и чувствителност към teicoplanin (МПК = 0.5 µg/ml). Този тип на резистентност е резултат от продукцията на модифицирани прекурсори на пептидогликана D-Ala-D-Ser (García-Solache and Rice 2019). Експресира се индуцибелно и е доказан само при *E. faecalis* видове.

Организацията на гените във *vanE* оперона е идентичен с *vanC* (Fines et al. 1999; Teixeira et al. 2015). Последователността на гените в оперона е следната:

***vanE* → *vanXYE* → *vanTE* → *vanRE* → *vanSE***

### **VanG фенотип**

Характеризира се с ниски нива на резистентност към vancomycin (МПК = 16 µg/ml) и чувствителност към teicoplanin (МПК = 0.5 µg/ml). Доказан е само при *E. faecalis* видове (Teixeira et al. 2015). Индуцибелен тип на експресия и модификация на пептидогликановия прекурсор в D-Ala-D-Ser са основните характеристики на VanG фенотипа (Depardieu et al. 2003; Teixeira et al. 2015).

Гените *vanR<sub>G</sub>* и *vanS<sub>G</sub>* са много сходни със същите гени при *vanD* оперона, но в регулаторната система при *vanG* участва и *vanU<sub>G</sub>* гена. Оперонът *vanG* е хромозомно локализиран и се състои от 8 гена в следната последователност (García-Solache and Rice 2019):

***vanU<sub>G</sub>* → *vanR<sub>G</sub>* → *vanS<sub>G</sub>* → *vanY<sub>G</sub>* → *vanW<sub>G</sub>* → *vanG* → *vanXY<sub>G</sub>* → *vanT<sub>G</sub>***

### VanL фенотип

Характеризира се с ниски нива на резистентност към vancomycin (МПК = 8 µg/ml) и чувствителност към teicoplanin (МПК = 0.5 µg/ml). Доказан е само при *E. faecalis* видове (Teixeria et al. 2015). Този тип на резистентност е резултат от продукцията на модифицирани прекурсори на пептидогликана – D-Ala-D-Ser (Boyd et al. 2008).

Организацията на гените в оперона е много сходна с *vanC* оперона с тази разлика, че *vanT<sub>L</sub>* серин-рацемазата се кодира от два отделни гена – *vnT<sub>M</sub>* и *vanTr<sub>L</sub>* (García-Solache and Rice 2019):

***vanL* → *vanXY<sub>L</sub>* → *vanT<sub>M</sub>* → *vanTr<sub>L</sub>* → *vanR<sub>L</sub>* → *vanS<sub>L</sub>***

### VanM фенотип

Характеризира се с високи нива на резистентност към vancomycin (МПК ≥ 256 µg/ml) и вариращи нива на резистентност към teicoplanin (МПК 6 – > 256 µg/ml). Доказан е само при отделни *E. faecium* видове (Teixeria et al. 2015). Модификация на пептидогликанния прекурсор в D-Ala-D-Lac е причина за този тип на резистентност (Xu et al. 2010).

Последователността на гените във *vanM* оперона е идентична с тази във *vanD* оперона. Оперонът *vanM* е съставен от 6 гена, представени в следната последователност (García-Solache and Rice 2019):

***vanR<sub>M</sub>* → *vanS<sub>M</sub>* → *vanY<sub>M</sub>* → *vanH<sub>M</sub>* → *vanM* → *vanX<sub>M</sub>***

### Van N фенотип

Характеризира се с ниски нива на резистентност към vancomycin (МПК 18 – 16 µg/ml) и чувствителност към teicoplanin (MIC = 0.5 µg/ml). Доказан е само при *E. faecium* видове (Teixeria et al. 2015). Модификация на терминалния пептидогликанен прекурсор в D-Ala-D-Ser е причината за този тип на придобита резистентност към гликопептиди (Lebreton et al. 2011).

Оперонът *VanN* е локализиран в плазмид, предава се чрез конюгация (както и *vanA*, *vanG* и *vanM*) и се експресира конститутивно. Структурата на *vanN* оперона е идентична с тази на *vanC* и *vanE* опероните и донякъде с *vanL* оперона, при който *vanT<sub>L</sub>* серин-рацемазата се кодира от два отделни гена. Последователността на гените във *vanN* оперона е следната (García-Solache and Rice 2019):

***vanN* → *vanXY<sub>N</sub>* → *vanT<sub>N</sub>* → *vanR<sub>N</sub>* → *vanS<sub>N</sub>***

### 2.1.3. Разпространение на фенотиповете на гликопептидна резистентност

Независимо от обособяването на 9 фенотипа на резистентност към гликопептиди, най-често се наблюдава VanA фенотип, следван от VanB. Според проучване на Pfaller и съавт. (Pfaller et al. 2019) географското разпространение на изолатите *E. faecium* с VanA фенотип варира широко – от 19% в Европа до 64.75% в Северна Америка, докато честотата на *E. faecium* с VanB фенотип е значително по-ниска – от 3.6% в Северна Америка до 7.5% в Азиатско-тихоокеанския регион. Същото проучване показва, че резистентността към vancomycin при *E. faecalis* е много по-ниска (2.5%), като 1.9% от изолатите са с VanA и 0.6% са с VanB фенотип. Simner и съавт. (Simner et al. 2015) докладват нисък относителен дял (4.2%) на вътреболнични инфекции от VRE в Канада за 2007 г. – 2013 г., като при всички е доказан *E. faecium* с преобладаващ vanA генотип (90% от изолатите). Авторите установяват, че през проучвания период разпространението на vanB генотипа е намаляло значително – от 37.5% през 2007 г. до 0% през 2013 г. Според The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program – глобална програма, която в продължение на 20 години (1997 г. – 2016 г.) събира последователно изолирани инвазивни и неинвазивни *Enterococcus* spp. от болници в Северна Америка, Латинска Америка, Европа и Азиатско-тихоокеанския регион, VanA фенотип е установен при 6788 изолата (13.7%), докато VanB фенотип е доказан едва при 827 изолата (1.7%) (Pfaller et al. 2019).

При проучване на 4 208 ентерококови изолата, събрани от 27 европейски страни, Schouten и съавт. (Schouten et al. 2000) установяват носителство на van гени при 94 от тях. Генът vanA е потвърден при 18 изолата (15 *E. faecium*, 2 *E. faecalis* и 1 *E. casseliflavus*), vanB – при 5 *E. faecium* изолата и vanC – при 71 ентерококи с вродена резистентност към vancomycin (22 *E. casseliflavus* и 49 *E. gallinarum*). В това проучване прави впечатление големият брой изолирани vanC ентерококи. Характерното за тези микроорганизми ниско ниво на резистентност към vancomycin и нарастване процента на инфекциите, причинени от тях, е потенциален медицински проблем. Още повече, че vanC ентерококите могат да придобият и нови генетични елементи, носещи vanA, vanB или и двата гена (Haenni et al. 2009; Shirano et al. 2011; Eshaghi et al. 2015). В литературата са описани редица клинични non-*faecalis* non-*faecium* ентерококови изолати с придобита резистентност към vancomycin. Kawalec и съавт. (Kawalec et al. 2007)

съобщават за взрив в голяма болница в Полша на клон *E. raffinosus* с *vanA* генотип. Резистентност към vancomycin е наблюдавана и при клинични изолати *E. durans* (Green et al. 2006; Todokoro et al. 2006; Ryu et al. 2019), *E. muntidii* (Fatholahzadeh et al. 2006), *E. hirae* (Todokoro et al. 2006) и *E. avium* (Lee et al. 2004).

В България, Попова и съавт. (Попова В et al. 2014) проучвайки 77 *E. faecium* от пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ за периода 01.03.2013 г. – 28.02.2014 г. установяват 13 VR изолата с потвърден *vanA* генотип. Това е началото на първия за нашата страна нозокомиален взрив от VRE, изолатите от който са обект на интензивни молекулярно-генетични проучвания в следващите години (Попова В et al. 2014; Ivanov I et al. 2018). През 2014 г. Strateva и съавт. (Strateva et al. 2014) публикуват данни за необичаен VanB фенотип-*vanA* генотип при *E. faecium* щам, изолиран от хемокултура. Същите автори проучват клоналното разпространение на общо 51 *vanA E. faecium* в три големи болници в България и доказват, че всички изолати се отнасят към ST 203, CC17 (Strateva et al. 2018). През 2019 г. Strateva и съавт. (Strateva et al. 2019) описват и първия за страната VanA-тип *E. faecalis*, изолиран от урина на пациент с хронична бъбречна недостатъчност. Като цяло, в България са налице ограничен брой проучвания, касаещи видовото разпределение на VRE и типа на гликопептидна резистентност.

## **2.2. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ В-ЛАКТАМИ**

### **2.2.1. Естествена резистентност и толерантност**

Ентерококите са естествено резистентни към повечето представители на  $\beta$ -лактамите антибиотици (вкл. цефалоспорини и монобактами) и само ограничен брой препарати са способни да потискат техния растеж (penicillin, ampicillin, piperacillin, mezlocillin и imipenem) (Thornsberry et al. 1974; Murray 1990; Moellering 1991). Причина за естествената резистентност е свръхпродукцията на penicillin-свързващи протеини (PBPs) с нисък афинитет към  $\beta$ -лактамите – PBP4 при *E. faecalis* и PBP5 при *E. faecium* (Williamson et al. 1985; Duez et al. 2001; Infante et al. 2016). Обичайно тази резистентност се експресира с ниски стойности на МПК към penicillin и ampicillin, които са в границите на 1 – 16  $\mu\text{g/ml}$  (Marothi et al. 2005). От друга страна, нивото на резистентност към penicillin е различно при

*E. faecalis* и *E. faecium*. При *E. faecalis* е установена 10 до 100 пъти по-ниска чувствителност към penicillin в сравнение със стрептококите, а чувствителността към penicillin при *E. faecium* е поне 4 до 16 пъти по-ниска от тази при *E. faecalis* (Murray 1997). Известно е, че по-голяма част от *E. faecalis* (99%) изолатите остават чувствителни на ampicillin, за разлика от *E. faecium*, където процентът на чувствителност е значително по-нисък (20%) (Protonotariou et al. 2010).

Много ентерококови щамове проявяват толерантност към бактерицидния ефект на активните  $\beta$ -лактами, чиито минимални бактерицидни концентрации значително надвишават МПК (Hodges et al. 1992). Според Gold (Gold 2001) толерантността е способността на един микроорганизъм да преживява в антибиотични концентрации няколко степени по-високи от МПК. Тази толерантност има клинично значение при лечението на ендокардит. Според някои публикации излекуваните пациенти с приложение само на  $\beta$ -лактам антибиотик са 40% (Geraci and Martin 1954). Установено е, че добавянето на streptomycin или gentamicin към  $\beta$ -лактам води до бактерициден синергизъм и нарастване делът на клинично излекуване до над 70% (Jawetz and Sonne 1966).

През последните години излязоха проучвания, които свидетелстват за успешното лечение на *E. faecalis* ендокардит с комбинация от ampicillin и ceftriaxone (Fernández-Hidalgo et al. 2013; Pericas et al. 2014). Въпреки че този механизъм на очевиден клиничен синергизъм не е напълно изяснен, се предполага, че комбинацията от двата антибиотика инхибира всички *E. faecalis* RBPs по-ефективно от самостоятелното им приложение (Mainardi et al. 1995).

### **2.2.2. Придобита резистентност**

Ентерококите могат да развият придобита резистентност към  $\beta$ -лактамите антибиотици по два основни механизма – чрез продукция на  $\beta$ -лактамази или RBP-медирана резистентност (Murray et al. 1986; Fontana et al. 1994; Rice et al. 2001).

Продукцията на  $\beta$ -лактамаза, кодирана от *blaZ*-гена, е първият описан придобит механизъм на резистентност към  $\beta$ -лактамите при ентерококите. Въпреки това, само ограничен брой *E. faecalis* щамове я произвеждат (McBride et al. 2007). Молекулярният анализ показва, че *E. faecalis*  $\beta$ -лактамазата е идентична с тази, продуцираната от *Staphylococcus aureus* (Rice and Marshall 1992). Към настоящия момент има единични съобщения за производството на  $\beta$ -

лактамаза от *E. faecium*, а щамове, които я експресират, не са широко анализирани (García-Solache and Rice 2019).

PBP-медираната придобита резистентност възниква в резултат на продукцията на модифициран PBP5 или свръхпродукцията на нормален PBP5. Настъпилите точкови мутации в *pbp5* гена са по-чести и са причина за образуване на модифициран PBP5, специално при *E. faecium* (PBP5fm) (Klare et al. 1992; Rybkine et al. 1998). Тези мутации водят до още по-намален афинитет на ентерококите към  $\beta$ -лактамите, което е причина за развитие на високи нива на резистентност към всички препарати от групата. Вариациите в последователността на PBP5 е от особено значение за разграничаване на две групи *E. faecium*. Едната, наричана Pbp5-R, се проявява с високо ниво на резистентност към ampicillin и се свързва с болничната среда. Втората, наричана Pbp5-S, се характеризира с по-ниски МПК към ampicillin (обикновено МПК < 64  $\mu\text{g/ml}$ ) и се свързва с извънболничната среда (Galloway-Рейна et al. 2011). Въпреки че, по-честият механизъм на PBP-медираната резистентност е резултат на мутации в *pbp5* гена, при някои щамове *E. faecium* се установява свръхпродукция на PBP5, която се проявява с умерено високи нива на резистентност към  $\beta$ -лактамите (МПК  $\leq$  16  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fontana et al. 1994; Ligozzi et al. 1996; Rice et al. 2001).

### **2.3. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ АМИНОГЛИКОЗИДИ**

#### **2.3.1. Естествена резистентност**

Естествена резистентност към аминогликозиди е установена при всички представители на род *Enterococcus*. За нея е характерно ниско ниво на резистентност (МПК 24 – 256  $\mu\text{g/ml}$ ) (Chow 2000), което е резултат от неефективния транспорт на антибиотика през цитоплазмената мембрана и от там ограниченото му акумулиране в бактериалната клетка (Moellering and Weinberg 1971). В допълнение всички щамове *E. faecium* произвеждат хромозомно-кодирани ензими – аминогликозид ацетилтрансфераза (AAC(6')-II), който елиминира синергизма между аминогликозидите (tobramycin, kanamycin, netilmicin и sisomicin) и антимикробните лекарствени средства, инхибиращи клетъчната стена (Costa et al. 1993; Wright and Ladak 1997).

### 2.3.2. Придобита резистентност

Придобита резистентност към аминогликозиди е доказана при определен брой ентерококови видове, най-често *E. faecium* и *E. faecalis*. Характеризира се с високо ниво на резистентност (high-level aminoglycoside resistance, HLAG) (МПК  $\geq$  2000  $\mu\text{g/ml}$ ) и пълна загуба на синергизъм с  $\beta$ -лактамните антибиотици (Chow 2000). Три са описаните механизми, които я медиират: продукцията на аминогликозид-модифициращи ензими (AMEs), промяна в таргетната молекула в резултат на хромозомни мутации и модификации в транспортната система на аминогликозида (Courvalin et al. 1980; Clark et al. 1999; Kao et al. 2000). Последните два са по-рядко срещани в сравнение с продукцията на AMEs, който е основен и най-широко разпространен механизъм на придобита резистентност към аминогликозиди при ентерококите.

Описани са три класа AMEs, които катализират съответните реакции: аминогликозид-N-ацетилтрансферази (AACs), катализиращи ацетилирането на аминокгрупата; аминогликозид-O-фосфотрансферази (APHs), катализиращи фосфорилирането на хидроксилната група; и аминогликозид-нуклеотидилтрансферази (ANTs), катализиращи нуклеотидирането на хидроксилните групи.

Особено значими за клиничната практика са следните AMEs:

- AAC(6')-APH(2'') е бифункционален ензим, притежаващ както 6'-ацетилтрансферазна, така и 2'-фосфотрансферазна активност и придаващ резистентност към всички аминогликозиди с изключение на streptomycin (Courvalin et al. 1980). Неговата продукция обичайно се свързва с високи нива на резистентност към gentamicin (HLGR) с МПК  $\geq$  500  $\mu\text{g/ml}$  и streptomycin с МПК  $\geq$  2000  $\mu\text{g/ml}$  (Shaw and Rather 1993). Генът *aac(6')-Ie-aph(2'')*, кодиращ AAC(6')-APH(2'') (Ferretti et al. 1986), се носи от Tn4001 – подобни транспозони, които се откриват както при ентерококи, така и при стафилококи (Lyon et al. 1984; Hodel-Christian and Murray 1991). Ензимът се доказва най-често при *E. faecium*, *E. faecalis*, но също така и при други видове като *E. avium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* (Padmasini et al. 2014; Niu et al. 2016; Diab et al. 2019).
- APH(2'')-Ib ензимът се кодира от *aph(2'')-Ib* ген. Този ензим е описан при *E. faecium* и неговото присъствие води до високо ниво на резистентност към всички аминогликозиди с изключение на streptomycin и amikacin (Chow 2000).

- APH(2'')-Ic ензимът се кодира от *aph(2'')-Ic* ген. Установен е първо при *E. gallinarum*, а по-късно и при видовете *E. faecium* и *E. faecalis* (Chow et al. 1997). Инактивира gentamicin и tobramycin, но не и amikacin и netilmicin (Miller et al. 2014). Установените МПК към gentamicin са приблизително 256 µg/ml, поради което могат да се допуснат грешки в интерпретацията на чувствителността при скриниращ тест с 500 или 1000 µg/ml gentamicin (Shaw and Rather 1993).
- APH(2'')-Id ензимът се кодира от *aph(2'')-Id* ген. Първо е доказан при *E. casseliflavus*, а по-късно и при *E. faecium*. Медира високи нива на резистентност към gentamicin, tobramycin, netilmicin и kanamycin (Tsai et al. 1998).
- APH(3')-IIIa ензимът се кодира от *aph(3')-IIIa* ген. Медира резистентност към kanamycin и amikacin (Miller et al. 2014).
- ANT(4')-Ia ензимът се кодира от *ant(4')-Ia* ген и медира високо ниво на резистентност към tobramycin, amikacin и kanamycin (Matsumura et al. 1984; Carlier and Courvalin 1990). Въпреки че ентерококите, които продуцират APH(3')-IIIa и/или ANT(4')-Ia демонстрират МПК към amikacin в границите на 64 – 256 mg/ml, те губят напълно синергизма на комбинацията ampicillin-amikacin (Krogstad et al. 1978; Calderwood et al. 1981; Carlier and Courvalin 1990; Leclercq et al. 1992a).
- ANT(3')-Ia ензимът се кодира от *ant(3')-Ia* ген и медира високо ниво на резистентност към streptomycin (HLSR) – МПК ≥ 1000 µg/ml (Clark et al. 1999; Hollingshead and Vapnek 1985; Vakulenko et al. 2003).
- ANT(6')-Ia ензимът се кодира от *ant(6')-Ia* ген и медира високо ниво на резистентност към streptomycin – МПК ≥ 1000 µg/ml (Vakulenko et al. 2003).

#### **2.4. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ФЛУОРОХИНОЛОНИ**

Ентерококите демонстрират ниски нива на естествена резистентност към флуорохинолони. В допълнение те развиват и придобита резистентност към тях чрез три механизма: мутации в *gyrA* и *parC* гените, наличие на ефлуксни помпи и синтез на протеин, предотвратяващ образуване на хинолон-гираза комплекс (López et al. 2011).

Мутациите в *gyrA* и *parC* гените са описани при видовете *E. faecium* и *E. faecalis*. (Werner et al. 2010; López et al. 2011; Kim and Woo 2017). Тези мутации засягат т.нар. „региони, определящи хинолоновата резистентност“ и вероятно променят афинитета на свързване на антибиотика, което води до високо ниво на резистентност. Другият добре познат механизъм на хинолонова резистентност е свързан с редуцирано акумулиране на антибиотика в бактериалната клетка, резултат от повишен екфлукс или намалено поемане. Ефлуксните помпи NorA и PmrA участват в хинолоновата резистентност при *S. aureus* и *S. pneumoniae* (Hooper 2000), като първата е описана и при *E. faecium* (Hawkey 2003). Третият механизъм на резистентност е открит при *E. faecalis* (Arsène and Leclercq 2007). Медиира се от *qnr* ген, който кодира протеин с пептидни последователности, подобни на плазмидните гени за резистентност към хинолоните, описани при ентеробактериите. Наличието на този протеин вероятно предпазва ДНК-гиразата чрез намаляване на ДНК-свързването на хинолона и последващото образуване на комплекс хинолон-гираза (Tran et al. 2005).

От групата на хинолоните препаратите, ciprofloxacin и levofloxacin имат активност срещу ентерококите. Употребата им е свързана с лечение на инфекции на пикочните пътища. Moxifloxacin е по-мощен срещу Грам-положителните бактерии, отколкото другите два препарата, но проявява само междинна активност спрямо ентерококите (Tankovic et al. 1999).

## 2.5. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ LINEZOLID

Най-често срещаният механизъм на линезолидна резистентност са мутации в гените, кодиращи 23S rRNA – мястото на свързване на лекарството в рибозомата (Marshall et al. 2002). Ентерококите могат също да развият резистентност към linezolid чрез придобиване на *cfr* или *cfr(B)* ген (Pillai et al. 2002b), което води до ензимна модификация на 23S рРНК чрез метилиране на аденина в позиция 2503 (Toh et al. 2007). Този механизъм е доказан при *E. faecalis*, както и при други клинично значими Грам-положителни бактерии, напр. стафилококи (Diaz et al. 2012). Описана е и плазмидно-медирана резистентност, дължаща се на придобиването на *optRA* ген, който кодира предполагаем ABC транспортер (Wang et al. 2015). Въпреки изброените механизми на резистентност към linezolid при ентерококите препаратът остава широко активен срещу видовете *E. faecalis* и *E. faecium*.

## 2.6. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ DAPTOMYCIN

Резистентността към daptomycin възниква в резултат на мутации, които имат различни ефекти в зависимост от вида ентерококи. При *E. faecalis* тя е свързана с движение на мембранните фосфолипиди далеч от септума, което отклонява daptomycin. От друга страна при *E. faecium* тя се асоциира с отблъскване на daptomycin от клетъчната мембрана поради промени в мембранните фосфолипиди, подобно на тези, наблюдавани при daptomycin-резистентни щамове *S. aureus* (Miller et al. 2016). Резистентността към daptomycin изглежда е по-честа при *E. faecium*, отколкото при *E. faecalis*. Проучване на клинична щамова двойка *E. faecalis*, развила резистентност към daptomycin в хода на терапията, разкрива наличието на три гена, отговорни за резистентния фенотип (Arias et al. 2011). Първият ген е *liaF*, който кодира представител на трикомпонентна регулаторна система (LiaFSR). Установено е, че еднократна делеция на изолевцин в позиция 177 от LiaF увеличава МПК на daptomycin от 1 на 4 µg/ml. Още по-важен е фактът, че тази мутация премахва бактерицидната активност на daptomycin (Munita et al. 2013). Другите два гена са свързани с фосфолипидния метаболизъм: *gpdD*, кодиращ глицерол-фосфодиестер фосфодиестераза и *cls*, кодиращ кардиолипинсинтаза (Cls) (Arias et al. 2011; Palmer et al. 2011). Мутация в системата liaFSR е доказана и при щамове *E. faecium* (Mishra et al. 2012). Въпреки че общите нива на резистентност към daptomycin остават ниски, рискът от придобиване на даптомицинова резистентност по време на терапията е значителен. Интересен е също така и фактът, че ентерококите са по-малко чувствителни към daptomycin от стафилококите – стойностите на МПК за ентерококови изолати са четири пъти по-високи, отколкото за стафилококови (Cantón et al. 2010).

## 2.7. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ СРЕПТОГРАМИНИ

Quinupristin и dalfopristin са производни на pristinamycin. Използват се в синергична комбинация, ефективна срещу *E. faecium*, но не срещу *E. faecalis*, *E. avium*, *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*, които са естествено резистентни. При *E. faecalis* е установен видово специфичния *lsa* ген, отговорен за естествената резистентност към стрептограмин А (Singh et al. 2002).

Придобитата резистентност на *E. faecium* към стрептограмини може да възникне по три механизма. Първият е резултат на модифициране на dalfopristin от ацетилтрансферазите VatD и VatE, което води до загуба на синергията му с quinupristin (Werner et al. 2002). Вторият механизъм, описан първо при стафилококите, включва ензимното разцепване на пръстеновидната структура на стрептограмин В от лактоназите VgbA и VgbB (Korczynska et al. 2007). Третият механизъм включва ефлуксни помпи като msrC (Portillo et al. 2000). Според последни публикации, мутация в *eatA* гена (за *Enterococcus* ABC транспортер) е причина за стрептограминовата резистентност при *E. faecium* щамове (Isnard et al. 2013).

## 2.8. РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ТЕТРАЦИКЛИНИ И ГЛИЦИЛЦИКЛИНИ

Резистентността на ентерококите към тетрациклини се дължи на действието на ефлуксни помпи и рибозомни протективни протеини (Chopra and Roberts 2001). Синтезът на ефлуксните протеини и функцията на ефлуксните помпи се кодира от гените *tet(K)* и *tet(L)*, в резултат на което се развива резистентност към tetracycline, но не и към minocycline. Гените *tet(M)*, *tet(O)* и *tet(S)* кодират продукцията на протеини, които променят рибозомната конформация и изместват свързания tetracycline. Този механизъм е отговорен за резистентността на ентерококите към doxycycline, minocycline и tetracycline.

Tigecycline е синтетично производно на minocycline с широк спектър на действие срещу Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии, включително метицилин-резистентни *S. aureus* (MRSA) и VRE. Подобно на всички тетрациклини, tigecycline се свързва с 16S рРНК на 30S рибозомалната субединица и инхибира асоциирането на аминоксил-тРНК (Bauer et al. 2004). За разлика от други тетрациклини МПК на tigecycline не се влияе от типичните детерминанти на резистентност към tetracycline. Според някои публикации резистентността към tigecycline на *E. faecium* щамове се приписва условно на свръхекспресията на плазмидно-медираните *tet(L)* и *tet(M)* гени (Fiedler et al. 2016). Към настоящия момент са описани ограничен брой случаи на резистентност към tigecycline при ентерококите (Werner et al. 2008b; Dabul et al. 2019; Bender et al. 2020).

## 2.9. ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА ЕНТЕРОКОКИТЕ

Въвеждането и приложението на различни молекулярни техники през последните години подобри значително способността за разграничаване на ентерококовите изолати от една страна, а от друга дава надеждна информация за епидемиологията на тези микроорганизми. Чрез методите за молекулярно типизиране беше доказана и възможността за екзогенно придобиване на ентерококи чрез директен или индиректен контакт между пациенти (Facklam et al. 2002; Freitas et al. 2009; Valdezate et al. 2009; Arias and Murray 2012).

Познати са различни молекулярни методи за типизиране на ентерококи (Werner 2013). Сред тях са Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), Multilocus sequence typing (MLST), Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) и Whole-genome sequencing (WGS). Обичайно PFGE се използва за епидемиологично характеризиране на ентерококови огнища. Методът има добра дискриминационна способност и дава възможност за определяне на клоналните комплекси сред ентерококите с множествена лекарствена резистентност, основно такива с високи ниви на резистентност към аминогликозиди и гликопептиди (Miranda et al. 1991; Gordon et al. 1992; Facklam et al. 2002; Freitas et al. 2009).

MLST се основава на идентификацията на алелен профил, определен след секвениране на избрани консервативни гени. Създава се числов профил, който отговаря на определен секвенционен тип (ST). Разработени са MLST схеми както за *E. faecium* (Homan et al. 2002), така и за *E. faecalis* (Ruiz-Garbajosa et al. 2006). Приложението на MLST направи възможно доказването на специфични *E. faecium* геногрупи. С този метод е установено преобладаване в някои географски области на определена болнично-адаптирана поликлонална субпопулация *E. faecium* (особено MLST ST17, ST18, ST78 и ST192) и съответно повишена честота на *E. faecium* в световен мащаб (Willems et al. 2005; Leavis et al. 2006; Zirakzadeh and Patel 2006; McBride et al. 2007; Top et al. 2007; Werner et al. 2008a; Valdezate et al. 2009). Тази болнично-адаптирана линия е наречена първоначално "C1 lineage", а по-късно е преименувана в „клонален комплекс-17“ (CC17). Последният е един от т. нар. високорискови ентерококови комплекси (high-risk enterococcal complex; HiRECC).

MLVA е базиран на промени във вариабилния брой от тандемни повторени (VNTR) локуси, разпръснати по ентерококовия геном. За всеки VNTR локус броят на повторите се определя чрез PCR, като се използват праймери базирани на консервативни области от тандемните повтори. PCR продуктите се разделят върху агарозни гелове и размерът на банда определя броя на повторите. Заедно тези числа образуват MLVA профил и всеки профил отговаря на MLVA тип (MT). MT типове могат да се съпоставят с ST типове. Сравнителни проучвания показват, че MLVA постига висока степен на дискриминация между изолатите и неговата дискриминационна способност е сравнима с тази на PFGE типизирането (Tor et al. 2004, 2008). Понастоящем са публикувани MLVA схеми за типизиране както на *E. faecalis* (Tor et al. 2008), така и на *E. faecium* (Tor et al. 2004).

Предимството на MLST и MLVA методите пред PFGE е, че правят значително по-лесен обмена на данни между различни лаборатории и информацията, която се генерира е подходяща за разработването на Web-базирани бази данни. WGS е сравнително нов метод с различни приложения, едно от които е типизирането на бактерии, в това число и ентерококи (Didelot et al. 2012; Reuter et al. 2013; Khan et al. 2018; Marbjerg et al. 2021; Rogers et al. 2021).

Tenover и съавт. (Tenover et al. 1995) въвеждат четири категории за определяне на генетично и епидемиологично родство между бактериалните изолати от един вид. Към първата категория се отнасят генетично неразличими изолати, които принадлежат към един щам. При тях рестрикционните модели имат еднакъв брой бандове, като кореспондиращите бандове са с еднакъв размер. Изолати, демонстриращи общ епидемиологичен модел представляват щама на епидемичния взрив (outbreak strain). Близко свързан (closely related) с щама на епидемичния взрив е изолат, чийто PFGE профил се различава от този на щама на епидемичния взрив чрез промени на едно генетично събитие, т.е. точкова мутация, инсерция или делеция на ДНК. Такива промени обикновено водят до 2-3 разлики в бандовете. Вероятно свързан (possibly related) с щама на епидемичния взрив е изолат, чийто PFGE профил се различава от този на епидемичния взрив чрез промени в две независими генетични събития (4-6 различни бандове, които могат да се обяснят с прости инсерции или делеции на ДНК или на добавяне или загуба на рестрикционни места). Несвързан (unrelated) с щама на епидемичния взрив е изолат, чийто PFGE профил се различава от

тази на щамата на епидемичния взрив чрез промени на три или повече независими генетични събития (обикновено 7 или повече различни бандове).

### 3. ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ ЕНТЕРОКОКИТЕ

Ентерококите са част от нормалната флора на интестиналния тракт, но могат да причинят широк спектър от нозокомиални инфекции с нарастваща честота през последните няколко десетилетия. Счита се, че основната причина за този феномен е вродената им резистентност към различни антимикробни лекарствени средства и развитието на придобита резистентност към основните антиентерококови препарати – пеницилини, гликопептиди и аминогликозиди (Средкова М 2012). Освен това, тяхната патогенност се свързва с възможността да адхерират към епитела на пикочните пътища, устната кухина и ембрионалните бъбречни клетки; да се прикрепват към екстрацелуларни матриксни протеини и инертни материали, каквито са редица медицински устройства; както и да избягват имунната система и да образуват биофилм, което ги прави устойчиви на действието на антибиотиците и фагоцитната атака (Sahm et al. 1989; Mohamed and Huang 2007). Способността на ентерококите да придобиват нови черти допринася за вирулентността, позволявайки им да колонизират нови области в гостоприемника и да причиняват инфекции (Shankar et al. 2002).

Вирулентността се регулира от специфични гени, намиращи се в определени региони на клетъчния геном, наречени „острови на патогенност“ (pathogenicity islands – PAIs) (Hacker and Kaper 2000). През 1991 г. се появяват първите данни за присъствието на PAIs в генома на множествено-резистентен вътреболничен щам *E. faecalis* (MMH594) (Huysck et al. 1991). Описаният геномен участък е с размер около 150kb и съдържа гени, кодиращи транспозази, регулатори на транскрипцията и протеини с роля във вирулентността. Впоследствие е установено, че *E. faecalis* PAI гените са отговорни за продукцията на ентерококов повърхностен протеин, секреторен цитолизин и агрегираща субстанция (Shankar et al. 1999; Upadhyaya et al. 2009). Обичайно PAIs са тясно свързани с вирулентни клонове ентерококи и често са модифицирани или дори липсват при по-слабо вирулентни щамове. Промените, които настъпват в ентерококовия PAI, са важен елемент за тяхната еволюция (Baghdayan et al. 2003; Shankar et al. 2002).

Факторите на вирулентност при ентерококите могат да бъдат разделени в три основни групи: повърхностни адхериращи фактори, хидролитични ензими и секретирани фактори на вирулентност (Sahm et al. 1989; Атанасова и съавт. 2013, Атанасова 2016). Първата група включва пили, агрегираща субстанция и екстрацелуларни повърхностни протеини. Към хидролитичните ензими се отнасят хиалуронидаза, желатиназа и серин-протеаза. Основен секретирани вирулентен фактор е цитолизинът, известен като хемолизин. На **Таблица 1** са представени факторите на вирулентност с техните функции, гените, които ги кодират и разпространението им сред ентерококовите видове.

### **3.1. ГЕНЕТИЧНИ ДЕТЕРМИНАНТИ И ПАТОГЕНЕТИЧНА РОЛЯ НА РАЗЛИЧНИТЕ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ**

#### **3.1.1. Ентерококов повърхностен протеин**

Ентерококовият повърхностен протеин (Esp) е голям протеин, разположен в клетъчната стена на *E. faecalis* и *E. faecium*. Неговата продукция се кодира от *esp* гена, локализиран в ентерококовия PAI (Shankar et al. 2002; Leavis et al. 2004). Esp е изграден от N-терминална сигнална последователност и N-терминален домейн, следван от три повтарящи се домейна (A, B и C) (Eaton and Gasson 2002; Leavis et al. 2004). Esp подпомага адхезията, колонизацията и избягването на защитните механизми на имунната система (Foulquié Moreno et al. 2006). Литературните данни свидетелстват за ролята на *E. faecalis* Esp при колонизацията на пикочните пътища (Shankar et al. 2001), но участието на този вирулентен фактор при формиране на биофилми е доста противоречиво. Tendolkar и съавт. (Tendolkar et al. 2004, 2005) определят Esp като ключов фактор за биофилм продукцията. Toledo-Arana и съавт. (Toledo-Arana et al. 2001) също установяват, че биофилмът е широко разпространен сред клинични *E. faecalis* изолати и само тези, които носят *esp* гена, са способни да го образуват. Други проучвания сочат липсата на корелация между наличието на Esp в клинични *E. faecalis* изолати и формирането на биофилми (Hancock and Perego 2004; Kristich et al. 2004; Rosa et al. 2006).

За разлика от *E. faecalis* Esp, който е широко разпространен сред различни щамове, *E. faecium* Esp присъства предимно в болнично-придобити изолати (Willems et al. 2001; Leavis et al. 2004). Установен е *in vitro* конюгационен трансфер

на *esp* гена при *E. faecium* и *E. faecalis* (Oancea 2004). Heikens и съавт. (Heikens et al. 2007) установяват, че *E. faecium* Esp е отговорен за образуването на биофилми и участва в патогенезата на ендокардита и бактериемията (Heikens et al. 2011), а според данни на Leendertse и съавт. (Leendertse et al. 2009) и в патогенезата на инфекциите на пикочните пътища. Доказано е, че експресията на *esp* гена е най-висока при 37°C и анаеробиоза, като корелира с първото прикрепване към полистирола и образуването на биофилми (Van Wamel et al. 2007).

**Таблица 1.** Характеристики на вирулентните фактори при ентерококите

Вирулентен фактор	Ентерококов повърхостен протеин (Esp)	Агрегираща субстанция (AS)	Колаген-свързващ протеин (Ace и Acm)	Протеин EfaA в клетъчната стена	Желатиназа (Gel)	Хиалуронидаза (Hyl)	Цитолизин (Cyl) (хемолизин/бактериоцин)	Пили
<b>Основни функции</b>	Избягване на имунната система на макроорганизма; образуване на биофилм; участие в патогенезата на ендокардит, бактериемия и уроинфекции.	Адхезия към клетките на макроорганизма и при конюгацията; повишена преживяемост в PMNLs; участие в патогенезата на ендокардит; подпомага интернализацията.	Адхезини, осигуряващи прикрепване към колаген тип I, IV, V и фибриноген; участие в патогенезата на ендокардит.	Адхезин, участващ в патогенезата на ендокардит.	Разграждане на тъканите на макроорганизма; формиране на биофилм; участие в патогенезата на перитонит, ендофталмит и ендокардит	Разграждане на хиалуроновата киселина; инвазия на тъканите; снабдяване на бактериите с хранителни вещества; участие в патогенезата на зъбния кариес; подпомагане на колонизацията.	Лизиране на Грам+ бактерии, еукариотни и имунни клетки; участие в патогенезата на ендокардит, бактериемия, ендофталмит, интраабдоминални инфекции.	Образуване на биофилм; първоначално прикрепване към тъканите; участие в патогенезата на ендокардит и уроинфекции.
<b>Кодиращ ген</b>	<i>esp</i>	<i>aggA, asa1</i>	<i>ace, acm, scm, ecbA</i>	<i>efaA</i>	<i>gelE</i>	<i>hyl</i>	<i>cylA, cylB, cylM</i>	<i>ebp, bee</i>
<b>Локализация на гена</b>	150-kb остров на патогенност в хромозомата	Феромон-реагиращ плазмид	Хромозома	Хромозома ( <i>efaCBA</i> оперон)	Хромозома ( <i>gelE-sprE</i> оперон)	Плазмиди	150-kb остров на патогенност в хромозомата или феромон-реагиращ плазмид ( <i>pAD1</i> )	Хромозома
<b>Видове ентерококи</b>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>

**Легенда** PMNLs: полиморфонуклеарни левкоцити

### 3.1.2. Агрегираща субстанция

Агрегиращата субстанция (AS) е група от феромон-зависими повърхностни протеини, кодирани от конюгативни плазмиди. Най-добре проучени са Asa1, Asp1 и Asc10 протеините с идентичност на аминокиселинната последователност над 90%. Те съдържат N-терминален домейн, променлив регион, централен домейн и два Arg-Gly-Asp (RGD) мотива. Най-вероятната функция на RGD мотива е да медира взаимодействията с еукариотните клетки (Vanek et al. 1999; Süssmuth et al. 2000). За Asc10 е доказано, че както N-терминалният, така и централният домейн са необходими за процеса на агрегиране, но само N-терминалният повишава свързването с липотейхоевата киселина на клетъчната стена (Waters et al. 2004).

Установено е, че AS подпомага конюгацията и улеснява плазмидния обмен чрез директна агрегация между донорната и реципиентната клетка (Olmsted et al. 1991). Експресията на AS се индуцира от пептиден феромон, който се секретира от реципиентна клетка без желани плазмид (Leonard et al. 1996), но по време на *in vivo* растеж може да се индуцира и от фактори на гостоприемника (Chandler et al. 2005). За да се осъществи процесът на конюгация е необходима както AS, която се експресира от донорната клетка, така и „свързваща субстанция“ (binding substance), експресираща се на повърхността на реципиентната клетка (Kayaoglu and Ørstavik 2004).

Освен описаната роля на AS в процеса на конюгация тази субстанция е и важен фактор на вирулентността при *E. faecalis*. Asa1 протеина повишава адхезията към бъбречните тубулни клетки (Kreft et al. 1992) и подпомага прикрепването и оцеляването на ентерококите в макрофагите (Süssmuth et al. 2000). От друга страна Asc10 увеличава интернализацията (Vanek et al. 1999) и вътреклетъчната преживяемост (Rakita et al. 1999) в полиморфонуклеарните левкоцити (PMNLs). И двата протеина, Asc10 и Asa1, участват в прикрепването към определени извънклетъчни матриксни протеини (Rozdzinski et al. 2001) и повишават вирулентността на *E. faecalis* при заешки модел на ендокардит (Chow et al. 1993; Schlievert et al. 1998). Според някои публикации N-терминалният агрегиращ домейн и RGD мотива на Asc10 протеина допринасят за вирулентността по време на експериментален ендокардит (Chuang et al. 2009). При проучвания на AS функциите върху чревни епителни клетки е установено,

че AS протеините улесняват бактериалната интернализация (Wells et al. 2000; Waters et al. 2003). Това показва, че те участват в транслокацията на *E. faecalis* през чревния епител и спомагат за развитието на системни инфекции.

### 3.1.3. Колаген-свързващ протеин

Много протеини са част от арсенала на патогенните ентерококи. Например микробните повърхностни компоненти, разпознаващи адхезивни матриксни молекули (MSCRAMMs) са повърхностни протеини, които подпомагат прикрепването на ентерококите към тъканите на гостоприемника, а с това и иницирането на инфекцията (Patti and Höök 1994). При видовете *E. faecalis* и *E. faecium* са описани съответно 17 и 15 MSCRAMMs, от които 7 са характеризирани в детайли: Ace (adhesion of collagen of *E. faecalis*), Fss1, Fss2 и Fss3 (*E. faecalis* surface proteins), Acm (adhesion of collagen of *E. faecium*), Scm (second collagen adhesin of *E. faecium*) и EcbA (*E. faecium* collagen binding protein A) (Sillanpää et al. 2004, 2008).

MSCRAMMs гените се намират в повечето *E. faecalis* щамове и се експресират *in vivo* по време на инфекцията (Sillanpää et al. 2004). Синтезът на Ace се кодира от *ace* гена. Установено е, че Ace се свързва с колаген тип I и IV, ламинин и дентин (Nallapareddy et al. 2000; Kowalski et al. 2006). Singh и съавт. (Singh et al. 2010) доказват, че при плъховете, имунизирани с рекомбинантен Ace (rAce) или получили специфични анти-rAce антитела, вероятността за развитие на *E. faecalis* ендокардит е по-малка. Основната функция на Fss1, Fss2 и Fss3 протеините е да се свързват към фибриногена с насоченост към различни негови полипептидни вериги (Sillanpää et al. 2009).

*E. faecium* Acm се свързва основно с колаген тип I, в по-малка степен с колаген тип IV (Nallapareddy et al. 2003) и допринася за патогенезата на експерименталните ендокардити (Nallapareddy et al. 2008). Продукцията на този пептид се кодира от *acm* гена. Интересен е фактът, че функционалният *acm* ген присъства предимно в клинични изолати, докато нефункционалният *acm* ген се носи от инсерционен елемент и се открива главно в неклинични изолати (Hendrickx et al. 2007). *E. faecium* Scm и EcbA, кодирани съответно от *scm* и *ecbA* гените, се свързват с колаген типа V, а EcbA – и с фибриногена (Sillanpää et al. 2008; Hendrickx et al. 2009). Наличието на *ecbA* гена свидетелства за болнични

изолати *E. faecium* (Hendrickx et al. 2009), докато останалите MSCRAMMs гени са разпространени както при болнични, така и при извънболнични изолати.

#### 3.1.4. Протеин EfaA в клетъчната стена

EfaA (*E. faecalis* антиген А) е основен повърхностно-клетъчен антиген при *E. faecalis*, идентифициран с помощта на серуми от пациенти с ендокардит (Lowe et al. 1995). EfaA се кодира от *efaA* гена, който е част от тригенния оперон *efaBCA*. В допълнение този ген кодира и компоненти на ABC транспортера (Low et al. 2003). Аминокиселината последователност на EfaA има потвърдена идентичност с група стрептококови ABC транспортни протеини, някои от които също са идентифицирани като повърхностни адхезини и/или като фактори, свързани с патогенезата на инфекцията (Kolenbrander et al. 1998). В проучване на Singh и съавт. (Singh et al. 1998a) е доказана за първи път ролята на EfaA при *E. faecalis* инфекции. Според някои публикации *efaA* генът присъства в почти всички *E. faecalis* изолати, като е открит негов хомолог и при *E. faecium* (Singh et al. 1998a; Eaton and Gasson 2001).

Low и съавт. (Low et al. 2003) съобщават, че *in vitro* продукцията на EfaA се регулира от ниската концентрация на  $Mn^{2+}$  в околната среда. Тези данни предполагат, че *efaBCA* оперонът кодира високо афинитетна манганова пермеаза, експресираща се в тъкани или серум. В тези области микроелементът  $Mn^{2+}$  не е свободно достъпен, което обяснява и значението на *E. faecalis* EfaA за инфекцията при човека.

#### 3.1.5. Желатиназа

Желатиназата е описана за първи път през 1964 г. от Bleiweis и съавт. (Bleiweis and Zimmerman 1964). Тя е добре проучен фактор на вирулентност при *E. faecalis*. Представява извънклетъчна Zn-съдържаща металопроотеиназа, която хидролизира желатин, колаген и други протеини (Kayaoglu and Ørstavik 2004). Генът, кодиращ продукцията на желатиназата (*gelE*), е разположен на оперон заедно с *fsrE* гена, кодиращ серин-протеазата (Qin et al. 2000). Секрецията на желатиназа се контролира от *fsr* двукомпонентна система, състояща се от четири гена (*fsrA*, *fsrB*, *fsrD* и *fsrC*) (Nakayama et al. 2006). Тази система е отговорна за извънклетъчното натрупване на пептида лактон, кодиран от *fsrD* (Nakayama et al. 2001). Счита се, че *fsr* локусът активира експресията на

редица други гени, които са потенциално замесени във вирулентността и метаболитните пътища на ентерококите (Bourgogne et al. 2006).

Мутации във *fsr* оперона и инактивиране на *fsr*-контролния ген *gelE* показват важната роля на желатиназата в образуването на биофилми при *E. faecalis* (Hancock and Perego 2004). Необходимостта от ензимната активност на желатиназата за формиране на биофилми е установена чрез С-терминална обработка на този протеин (Del Papa et al. 2007).

Желатиназата и системата *fsr* участват както във формирането на биофилми, така и във вирулентността при различни животински модели на инфекция, напр. миши перитонит (Singh et al. 1998b; Qin et al. 2000), заешки ендодталмит (Mylonakis et al. 2002) и инфекция с *Caenorhabditis elegans* (Sifri et al. 2002). Освен това тя играе роля в развитието на ендокардита (Thurlow et al. 2010) и инхибира комплемент-зависимия имунен отговор (Park et al. 2007). Данни от различни други проучвания също свидетелстват за участието на желатиназа и *fsr* локуса във вирулентността на *E. faecalis* (Coque et al. 1995; Pillai et al. 2002a).

### 3.1.6. Хиалуронидаза

Хиалуронидазата (Hyl) е хидролитичен ензим, разграждащ хиалуроновата киселина, с последваща инвазия на тъканите и снабдяване на бактериите с хранителни вещества. Продуцира се в големи количества от стрептококи и други бактерии (Hynes and Walton 2000), както и от *E. faecalis* и *E. faecium* (Strateva et al. 2016). Синтезът на Hyl се кодира от *hyl* гена, който се носи от плазмид.

Според данни на Hendrickx и съавт. (Parikh et al. 1965) *E. faecalis* Hyl играе роля при тъканната деструкция по време на образуване на зъбни кариеси. Установено е, че *E. faecium* Hyl показва хомология с протеини като глюкозаминидази или хиалуронидази, които се считат за фактор на вирулентност при други Грам-положителни бактерии като *S. pyogenes*, *L. monocytogenes* и *C. perfringens*.

*E. faecium* Hyl ензимът е описан първо като хиалуронидаза, но през 2006 г. е определен като гликозидна хидролаза (Sheldon et al. 2006). Panesso и съавт. (Panesso et al. 2011) отнасят *E. faecium* Hyl към „семейство 84“ гликозил хидролази и описват вероятната му  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазна активност, която обаче не допринася пряко за колонизационната активност. Изолати, носещи *hyl* гена, показват по-големи бактериални натоваарвания по време на

колонизацията (Panesso et al. 2011). Това предполага потенциалната роля на *E. faecium* Hyl като фактор на вирулентност, допринасящ за колонизацията. Gomez и съавт. (Laverde Gomez et al. 2011) описват при *E. faecium* мегаплазмид (*hylEfm*), съдържащ *hyl* гена, гени за антибиотична резистентност и метаболитни гени. Авторите допълват, че *hylEfm* мегаплазмидите са широко разпространени сред клинични *E. faecium* изолати и играят роля в процеса на колонизацията.

### 3.1.7. Цитолизин

Цитолизинът (Cyl), наричан още  $\beta$ -хемолизин или бактериоцин, представлява цитотоксин (Fisher and Phillips 2009), който допринася за вирулентността на *E. faecalis* при хора и животински модели (268a). През 1934 г. E. W. Todd (Todd 1934), правейки проучване върху хемолитичните свойства на стрептококите, публикува първите данни за цитолитичната активност на *Enterococcus*. При щамове *E. faecalis*, хемолитични на кръвен агар, не е открита хемолитична активност във филтрата, приготвени от течни култури. Според тези наблюдения, авторът класифицира Cyl като „псевдохемолизин“.

Cyl е структурно нов токсин, член на клас I бактериоцини, който се експресира от много щамове *E. faecalis* (Haas and Gilmore 1999; Van Tyne et al. 2013). Функционалният Cyl се състои от голяма (CylL) и малка (CylS) олигопептидна субединица. Цитолизиновият оперон се състои от шест гена – *cylL1*, *cylL2*, *cylM*, *cylB*, *cylA* и *cylI*. Той може да е хромозомно кодиран в рамките на 150-kb PAI или да е локализиран върху конюгативен, феромон-реагиращ плазмид (pAD) (Van Tyne et al. 2013). Синтезът и активацията на Cyl е сложен процес. Негови прекурсори са малки цистин-съдържащи полипептиди CylL1 и CylL2, които се модифицират от вътреклетъчния протеин CylM. Генът *cylB* се разполага непосредствено след *cylM* в оперона и кодира синтеза на АТФ-зависими транспортни системи, отговарящи за транспорта на високо специфични молекули. CylB участва в транспорта на постратранслагационно модифицираните CylL1 и CylL2 прекурсорните молекули. В последния етап на Cyl синтезата, серин-протеазата CylA разцепва протеолитично CylL1 и CylL2 в непосредствена близост на таргетната клетка и взаимодействието на двата компонента води до лизирането ѝ (Van Tyne et al. 2013).

*E. faecalis* Cyl има литична активност срещу различни видове еукариотни клетки, включително имунни клетки (Cox et al. 2005; Bierbaum and Sahl 2009).

Описана е и цитолитична активност на ентерококите срещу стрептококите и други Грам-положителни бактерии (Stark 1960). Вирулентната роля на *E. faecalis* Cyl е доказана при различни животински модели на инфекция – заешки ендодталмит (Jett et al. 1995), ендокардит (Chow et al. 1993), интраперитониална инфекция на мишки (Singh et al. 1998b).

Редица проучвания свидетелстват за ролята на *E. faecalis* Cyl в патогенезата на ентерококовата инфекция. Нууске и съавт. (Нууске et al. 1991) установяват, че леталитета при пациенти с бактериемия, причинена от хемолитични, gentamicin-резистентни щамове *E. faecalis* е пет пъти по-висок в сравнение с пациенти, инфектирани с нехемолитични, gentamicin-чувствителни щамове.

### **3.1.8. Пили**

При Грам-положителните бактерии пилите са свързани с два процеса критични за патогенезата на инфекцията: адхезия към различни видове човешки клетки и формиране на биофилм (Nallapareddy et al. 2006; Abbot et al. 2007; Maisey et al. 2007; Mandlik et al. 2007). *E. faecalis* и *E. faecium* носят генетични клъстери на пилина (PGCs). Тези клъстери включват гени, кодиращи повърхностни протеини, необходими за формирането на пилуса (Nallapareddy et al. 2006; Hendrickx et al. 2008).

*E. faecium* има четири PGCs – от PGC-1 до PGC-4. Експресия на PilA и PilB е установена при *E. faecium* изолат, придобит в болнична среда (Hendrickx et al. 2008). Това доказва, че *E. faecium* може да експресира два различни вида пили на повърхността на една клетка.

*E. faecalis* носи два PGCs – *ebp* локус (за ендокардит и биофилм-асоциирани пили) (Nallapareddy et al. 2006) и *bee* локус (за подобрител на биофилма при ентерококите) (Tendolkar et al. 2006). Локусът *bee* е разположен върху конюгативен плазмид и е доказан само в 5% от *E. faecalis* изолатите, докато *ebp* е открит в почти всички изолати (Cobomolinos et al. 2008). При болни с ендокардит са открити Ebp антигенни пили (Sillanpää et al. 2004). Ebp пилите изглежда участват в началното прикрепване и формирането на биофилм (Nallapareddy et al. 2006). Те допринасят за патогенезата на експерименталния ендокардит (Nallapareddy et al. 2006) и инфекцията на пикочните пътища (Kemp et al. 2007; Singh et al. 2007).

### 3.2. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ФАКТОРИТЕ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ VRE

Разпространението на гени, кодиращи факторите на вирулентност при ванкомицин-чувствителни (VS) *E. faecalis* и *E. faecium* е описано в редица проучвания (Heidari et al. 2016; Strateva et al. 2016; Shokoohizadeh et al. 2018). Strateva и съавт. (Strateva et al. 2016) сравняват честотата на 8 гени на вирулентност при 370 VS *E. faecalis* и 110 VS *E. faecium* и установяват *esp* при 59.5% от *E. faecalis* и 4.3% от *E. faecium*, *agg/asa1* респективно при 44.3% и 22.8%, *efaA* – 84.9%/88.5%, *ace/acm* – 61.1%/72.8%, *gelE* – 82.2%/17.1% и *hyl* – 25.3%/24.2%. Генът *eep* е доказан при 95.7% от *E. faecalis* изолатите, а *cyIA* при 64.9%. В друго проучване върху 160 ентерококови изолати (125 *E. faecalis* и 35 *E. faecium*) е доказано, че при *E. faecalis* най-чести са гените *cpd* (100%), *gelE* (88%) и *asa1* (74.4%), докато при *E. faecium* – *gelE* (85.7%), *hyl* (77.1%) и *asa1* (71.4%) (Jahansepas et al. 2018). Shokoohizadeh и съавт. (Shokoohizadeh et al. 2018) докладват *gelE* и *asa1*, респективно при 48.5% от *E. faecalis* и 43% от *E. faecium* изолати. Heidari и съавт. (Heidari et al. 2016) изследват носителството на гени, кодиращи фактори на вирулентност сред общо 57 ентерокока, изолирани от пациенти с изгаряния. При *E. faecalis* (n=46) са доказани *efaA* (100%), *ace* (89.1%), *asa1* (54.3%), *gelE* (50%), *cyIA* (30.4%), *esp* (23.9%) и *hyl* (8.7%). Двата *E. faecium* изолати носели *asa1* и *ace*, а един от тях и *gelE*. Сред останалите 9 видово неопределени ентерокока са разпространени гените *ace*, *efaA* и *cyIA*.

В литературата има и проучвания върху разпространението на фактори на вирулентност сред единични изолати VS non-*faecalis*, non-*faecium* (Biswas et al. 2016; Sieńko et al. 2017). Така например *esp* ген е установен при 5/33 *E. mundtii*, 4/36 *E. raffinosus*, 3/9 *E. solitariae*, 2/20 *E. malodoratus*, 2/10 *E. dispar*, 1/17 *E. hirae* (Biswas et al. 2016).

От своя страна Biswas и съавт. (Biswas et al. 2016) сравняват разпределението на детерминантите на вирулентност при VS и VR ентерококи, изолирани от клинични и интестинални проби. Авторите установяват, че честотата на вирулентните гени е по-висока сред VR в сравнение с VS ентерококови изолати от една страна, а от друга, че разпространението на проучените генетични детерминанти е сравнимо между клиничните VRE и интестиналните VRE.

В различните проучвания видът и броят на вирулентните фактори при VR *E. faecalis* и *E. faecium* варира (Jovanović et al. 2015; Yang et al. 2015; Nasaj et al. 2016; Haghi et al. 2019). Haghi и съавт. (Haghi et al. 2019) проучват честотата на гени, кодиращи фактори на вирулентност при 79 VRE (69 *E. faecalis* и 10 *E. faecium*) изолирани от урини и установяват *esp* при 67.1% от всички изолати, следван от *PAI* (45.5%) и *sprE* (41.7%). Носителство на два или повече гена е доказано при 67 (97.1%) *E. faecalis* и едва при половината 5 (50%) *E. faecium*. Други автори изследват 69 VR *E. faecium* и 7 VR *E. faecalis*, култивирани от различни клинични материали от болница в Пекин (Китай) и потвърждават *esp* при двата вида ентерококи, съответно при 62 (89.9%) *E. faecium* и 3 (42.9%) *E. faecalis*. Освен това е доказан и *hyl* при 19 (27.5%) *E. faecium* изолата, а при 3 (42.9%) *E. faecalis* – *gelE*, *asa1* и *cylA* гените (Yang et al. 2015). В иранско проучване от 2016 г. (Nasaj et al. 2016) е установено, че сред 190 VR *E. faecalis* и 75 VR *E. faecium* циркулира основно *asa1* ген. В допълнение и при двата вида са доказани също гените *esp* и *hyl*. Jovanović и съавт. (Jovanović et al. 2015) изследват разпространението на *esp* и *hyl* сред VRE изолирани от 5 болници в Белград. Авторите потвърждават тези гени съответно при 45 (29.2%) и 43 (27.9%) *E. faecium* изолати и при 16 (76.2%) и 0 (0%) *E. faecalis*. Едва при 8 *E. faecium* *esp* и *hyl* са в комбинация.

Всички посочени данни до тук свидетелстват за широкото разнообразие от детерминанти на вирулентност сред VR *E. faecium* и *E. faecalis*. От друга страна броят на проучвания върху разпространението на гени, кодиращи фактори на вирулентност сред други VR ентерококови видове, е силно ограничен (Dworniczek et al. 2003, 2005; Biswas et al. 2016; Sieńko et al. 2017), което налага по-задълбочени изследвания в тази посока.

## **4. СКРИНИНГ НА ПАЦИЕНТИ ЗА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE**

### **4.1. МАТЕРИАЛИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE**

Съгласно препоръките на CDC (Faron et al. 2016) за VRE интестинален скрининг може да се използва ректален секрет или фецес. Сравнявайки възможностите за откриване на VRE в ректални и периректални секрети, Weinstein и съавт. (Weinstein et al. 1996) доказват 100% съответствие между резултатите от двата вида проби, което ги определя като високо чувствителни и специфични материали.

Според някои публикации фецес, изпратен в лабораторията за *C. difficile* изследване може да бъде използван и за детекция на VRE (Özsoy and İlki 2017). Насек и съавт. (Насек et al. 2001) проучват възможностите за изолиране на VRE от фецеси за *C. difficile* и обикновени ректални секрети и установяват, че 10.4% от фецесите са позитивни за VRE в сравнение с 9.7% положителните ректални секрети. Тезата, че фекалните проби дават по-добри резултати от ректалните секрети е подкрепяна и от други автори. D'Agata и съавт. (D'Agata et al. 2002) култивират двойки интестнални проби – фецес и ректален секрет върху Enterococcus agar (BD, Franklin Lakes, NJ) и установяват, че чувствителността на ректалните секрети за изолиране на VRE е едва 58%. Авторите обясняват тези данни с хипотезата, че е малко вероятно VRE да бъдат открити при посевка върху селективна агарова среда на ректални секрети със съдържание на VRE  $\leq 4,5 \log_{10}$  CFU VRE/g фецес.

### **4.2. СЕЛЕКТИВНИ СРЕДИ ЗА ИЗОЛИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE**

Селективните хранителни среди съдържат съставки, които потискат избрани категории бактерии и същевременно позволяват растежа на други видове. Например жлъчка-ескулин агарът (с или без азид) съдържа висока концентрация на жлъчни соли, които инхибират растежа на повечето микроорганизми, но не и на ентерококите. Добавянето на vancomycin в концентрация  $\geq 6 \mu\text{g/ml}$  прави средата идеално селективна за изолиране на фекални VRE.

#### 4.2.1. Жлъчка-ескулин агар с vancomycin

За първи път през 1924 г. Rochaix (Rochaix 1924) отбелязва ролята на ескулиновата хидролиза при идентификацията на ентерококите. Две години по-късно Meyer и Schonfeld (Meyer and Schonfeld 1926) добавят жлъчка към ескулиновата среда и установяват, че 61 от тестваните 62 ентерококови щамове са в състояние да растат и да хидролизират ескулин, докато стрептококовите щамове не притежават тази способност. През 1954 г. Swan (Swan 1954) също използва жлъчка-ескулин агара в своето проучване, а през 1970 г. Facklam и Moody (Facklam et al. 2002) допълнително оценяват свойствата на тази среда за идентификация на ентерококите.

Към настоящия момент много микробиологични лаборатории предпочитат жлъчка-ескулин агар (с или без азид) с 6 µg/ml vancomycin (Bile aesculin broth/ Bile aesculin azide broth with vancomycin, BEV/BEAV агар) като традиционен метод за култивиране на фецес или ректален секрет (Novicki et al. 2004; Zirakzadeh and Patel 2006). Редица проучвания потвърждават силната селективност на средата за откриване на VR Грам-положителни бактерии, каквито са VR *E. faecium*, VR *E. faecalis* (Edberg et al. 1994; Landman et al. 1996; Sahm et al. 1997) и видовете с вродена резистентност *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* (Cuzon et al. 2008; Anderson et al. 2013; Ongut et al. 2013). При сравняване на BEAV агара с различни хромогенни среди е установено, че той е с по-ниска чувствителност и специфичност (Delmas et al. 2007; Cuzon et al. 2008; Peterson et al. 2010; Jenkins et al. 2011; Anderson et al. 2013; Ongut et al. 2013). От друга страна проучване на Suwantararat и съавт. (Suwantararat et al. 2014) показва, че от всички тествани агарови среди BEAV е с най-висока специфичност (100%). Невъзможността на BEAV агара да разграничава основните видове VRE на база цвят на колониите налага прилагане на допълнителни тестове, което удължава времето за идентификация на VRE.

Култивирането върху BEAV агар е евтин и достатъчно чувствителен метод, но има и някои недостатъци. Те са свързани с необходимостта от допълнителни тестове за идентификация и потвърждаване на резистентността към гликопептиди, поради способността за растеж върху тях и на други микроорганизми. Такива са Грам-положителните каталаза-отрицателни коки, растящи в присъствието на жлъчни соли и хидролизиращи ескулин (*Vagococcus* spp., *Pediococcus* spp.), коките с вродена резистентност към vancomycin

(*Leuconostoc spp.* и *Pediococcus spp.*), както и някои Грам-положителни каталаза-положителни коки, Грам-отрицателни или Грам-положителни пръчки и гъбички. Допълнителното уточняване на видовата принадлежност и чувствителността към гликопептиди изисква минимум 72 часа. За да се намали това време, някои автори прилагат културелен метод (BEAV агар) в комбинация с генетичен метод (PCR) (Sahm et al. 1997). Този подход е описан като „златен стандарт“ за откриване и потвърждаване на VRE от фекални проби (Ledeboger et al. 2007a).

#### **4.2.2. Жлъчка-ескулин бульон с vancomycin**

При интестинален скрининг за VRE включването на обогатен бульон с vancomycin осигурява по-добра чувствителност, отколкото директното култивиране върху агарова среда (Landman et al. 1996; Ieven et al. 1999; Taylor et al. 1999; Gambarotto et al. 2000; Novicki et al. 2004). В това направление широко се прилага жлъчка-ескулин бульон (с или без азид) (BEV/BEAV бульон) с различни концентрации на vancomycin. Landman и съавт. (Landman et al. 1996) използват 64 µg/ml vancomycin в BEAV бульона, Novicki и съавт. (Novicki et al. 2004) – 15µg/ml, Gambarotto и съавт. (Gambarotto et al. 2000) – 4 µg/ml, но най-често концентрацията на антибиотика е 6 µg/ml (Ieven et al. 1999; Taylor et al. 1999; Suwantararat et al. 2014). Добавянето на 6 до 8 µg/ml vancomycin дава възможност за надеждно откриване както на *vanA* и *vanB*, така и на *vanC* ентерококи (Swenson et al. 1994). Suwantararat и съавт. (Suwantararat et al. 2014) сравняват възможностите на шест агарови среди (пет хромогенни и традиционен BEAV агар) с BEAV бульон за доказване на VRE от фекални проби и установяват, че BEAV бульонът е с най-висока чувствителност и специфичност, съответно 98% и 100%. В допълнение е доказано, че BEAV бульонът позволява детекция на повече *vanC* ентерококи от всеки хромогенен агар.

При различните проучвания времето за инкубиране на инокулирания BEAV бульон варира от 24 до 48 часа. Малко са публикуваните данни, потвърждаващи ползите от 48-часовото култивиране за степента на изолиране на VRE. Jo и съавт. (Jo et al. 2015) сравняват чувствителността и специфичността на BEAV бульона на 24<sup>-ия</sup> и 48<sup>-ия</sup> час и установяват, че при по-продължително инкубиране чувствителността се повишава значително – от 79.2% на 91.7%. От друга страна специфичността намалява от 85.3% на 79.4%, което се дължи на увеличаване брой фалшиво-положителни проби. В противовес на тези данни са

наблюденията на други автори (Suwantararat et al. 2014), показващи 100% специфичност на BEAV бульона на 48-ия час.

Продължителното начално инкубиране с последващо субкултивиране на положителните бульонове култури и необходимостта от потвърждаване на родовата и видовата принадлежност на изолираните VRE са основните недостатъци на BEAV бульонния метод. Въпреки това той е водещ и най-надежден метод за изолиране на интестинални VRE както с вродена, така и с придобита резистентност към гликопептиди.

#### **4.2.3. Хромогенни хранителни среди**

През последните години в микробиологичната практика бяха въведени хромогенните агарови среди за VRE. Тяхната цел е бързо и надеждно да се изолират и идентифицират най-честите клинично значими видове VR ентерококи *E. faecalis* и *E. faecium*. Понастоящем тези среди намират широко приложение при интестиналния скрининг на пациенти с висок риск за колонизация с проблемни микроорганизми.

Според стандартите на EUCAST, 2021 г. ([https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)), ентерококи с МПК на vancomycin  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  се приемат за vancomycin резистентни. Селективността на хромогенните среди се дължи на добавения vancomycin, чиято концентрация е обичайно  $8 \mu\text{g/ml}$ . Това количество на антибиотика дава възможност да бъдат засечени всички фенотипове на придобита резистентност към гликопептиди, включително най-честите VanA и/или VanB. Ограничен брой проучвания свидетелстват за способността на ентерококите с вродени ниски нива на резистентност към гликопептиди (vanC ентерококи) да растат върху хромогенни среди (Stamper et al. 2010; Suwantararat et al. 2014). Огромно предимство на хромогенните среди е способността им да различават видовете *E. faecalis* и *E. faecium* по цвета на колониите. Това се постига чрез добавяне на хромогенни субстрати, които са насочени към характерни за вида ензими ( $\alpha$ -глюкозидаза или  $\beta$ -галактозидаза) (Orenga et al. 2009). Тази диференцираща способност повишава специфичността на хромогенните среди, което води до намаляване броя на допълнителните тестове, необходими за потвърждаване на суспектните колонии.

Първата хромогенна среда chromID VRE (bioMerieux, France) е описана през 2007 г в проучване на Ledeboger и съавт. (Ledeboger et al. 2007a). При

сравнителен анализ на чувствителността и специфичността на chromID VRE и BEAV агар авторите установяват, че показателите им са не само съпоставими, а дори по-добри за новата хромогенна среда. Тези данни са подкрепени в още проучвания, които оценяват chromID VRE като идеален „инструмент“ за изолиране на VRE от фекални проби (Delmas et al. 2007; Ledebouer et al. 2007b; Cuzon et al. 2008; Grabsch et al. 2008; Asir et al. 2009; Kuch et al. 2009).

В литературата са описани седем други хромогенни агара за изолиране на VRE от фецеси или ректални секрети: Brilliance VRE (Oxoid) (Ongut et al. 2013; Suwantararat et al. 2014), AES VRE (AES Chemunex) (Asir et al. 2009), CHROMagar VRE (CHROMagar) (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2009; Kallstrom et al. 2010; Stamper et al. 2010), Spectra VRE (Remel) (Peterson et al. 2010; Jenkins et al. 2011; Nguyen et al. 2012; Suwantararat et al. 2014), VRESelect (Bio-Rad) (Anderson et al. 2013; Suwantararat et al. 2014), InTray Colorex VRE (BioMed) (Suwantararat et al. 2014) и HardyCHROM VRE (Hardy Diagnostic) (Suwantararat et al. 2014). Всички посочени среди, с изключение на AES VRE, осигуряват диференциация на видовете *E. faecalis* от *E. faecium* на база цвета на колониите им, в съответствие с инструкциите на фирмата-производител. Повечето хромогенни среди обаче не засичат присъствието на vanC ентерококи, поради обичайно ниските им нива на резистентност към vancomycin. Въпреки това, CHROMagar VRE ([http://www.chromagar.com/fichiers/1619421700LF\\_EXT\\_017\\_VR\\_V6.0.pdf](http://www.chromagar.com/fichiers/1619421700LF_EXT_017_VR_V6.0.pdf)) и InTray Colorex VRE (<https://biomeddiagnostics.com/prepared-culture-media/colorex-vre>) дават възможност за изолация и презумптивна идентификация на vanC ентерококи на база цвета на колониите.

Като цяло в малко на брой проучвания се прави сравнителен анализ на възможностите на различните хромогенни среди за изолиране на интестинални VRE. Peltroche-Llacsahuanga и съавт. (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2009) сравняват чувствителността на CHROMagar VRE и chromID VRE при 259 проби фецес на пациенти с висок риск за колонизация. Всяка проба първо е обогатена в бульон за 24 часа, след което е пресята върху хромогенна среда и е инкубирана допълнително за 48 часа. След анализ на получените резултати е установена идентична чувствителност на двете среди (98.2%) и еквивалентна специфичност. През 2014 г. Suwantararat и съавт. (Suwantararat et al. 2014) правят голямо сравнително проучване на пет различни хромогенни среди и BEAV агар, използвайки 400 фекални проби. Авторите описват редица фактори, които

определят избора на конкретна среда: чувствителност и специфичност на средата, време за детекция на VRE, необходимост от допълнителни тестове за видова идентификация и възможност за лесно разграничаване на цветовете на бактериалните колонии. При използваните хромогенни агари е установена значително по-висока чувствителност – chromID VRE (94.9%), Spectra VRE (93.9%), InTray Colorex VRE (91.9%), VRESelect (91.9%) и HardyCHROM VRE (89.9%), в сравнение с BEAV агара (84.8%). Въпреки че при chromID VRE е доказана най-висока чувствителност, разликите с останалите хромогенни среди са статистически незначими (Suwantarat et al. 2014).

Едно от най-големите предимства на всички хромогенни среди е възможността за директно инокулиране и култивиране на пробата. Въпреки че повечето изследвания се провеждат по тази методика, някои автори препоръчват обогатяване на фекалната проба преди инокулирането ѝ върху хромогенна среда (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2009; Gouliouris et al. 2016). Сравнявайки chromID VRE и Brilliance VRE за изолиране на VRE от 295 проби фецес, Gouliouris и съавт. (Gouliouris et al. 2016) съобщават за еквивалентна чувствителност на двата агара и отбелязват, че тяхната чувствителност е значително по-добра след 48 часа инкубация и включване на стъпка за предварително обогатяване. Освен това Brilliance VRE агарът е определен като по-високо селективен в сравнение с chromID VRE.

В друго проучване е оценена чувствителност на AES VRE, bioMerieux chromID VRE и Oxoid VRE агари за изолиране на VRE от едни и същи фекални проби – необогатени и предварително обогатени, като резултатите са отчитани на 22-ия и 48-ия час от инкубирането. Установено е, че само при две от средите – chromID VRE и BEV, предварителното обогатяване повишава чувствителността и, че по-дългото инкубиране (48 часа) повишава чувствителността на трите агара, инокулирани с необогатени проби и на два от агарите (AES VRE и Oxoid VRE), посети с обогатени проби (Asir et al. 2009).

Използването на хромогенни среди за изолиране на VRE от клинични материали, различни от фекалните проби, е обект на ограничен брой изследвания (Vijaya et al. 2014; Soares et al. 2017). Vijaya и съавт. (Vijaya et al. 2014) оценяват възможностите на HiChrome VRE (Himedia) и CHROMagar VRE за откриване на VRE в различни клинични материали и определят култивирането върху двете среди като по-бърз, лесен и рентабилен метод в сравнение с E-

теста. По данни на Soares и съавт. (Soares et al. 2017) от 2017 г. чувствителността на chromID VRE за откриване и диференциация на VR *E. faecium* и VR *E. faecalis* от различни клинични материали възлиза на 95.52%.

Въпреки описаните предимства на хромогенните среди пред BEV/BEAV агара трябва да се отбележат и някои затруднения, свързани с изолирането и видовото идентифициране на VRE. Grabsch и съавт. (Grabsch et al. 2008) при култивиране на 610 фекални проби върху chromID VRE изолират 271 щам с морфология на колониите (виолетови или синьо-зелени), наподобяваща VRE. От тях 126 са идентифицирани като гъбички, 56 – като Грам-отрицателни бактерии, 44 – като *van*-отрицателни *E. faecalis*, 38 – като Грам-положителни каталаза-положителни коки, 4 – като *van*-отрицателни *E. faecium*, 3 – като Грам-положителни пръчки и нито един изолат не е потвърден като VRE. Проучване на Stamper и съавт. (Stamper et al. 2010) също свидетелства за затруднения при използването на CHROMagar VRE за скрининг на интестинални VR *E. faecium* и VR *E. faecalis*. Авторите изолират 11 VS *E. faecalis*, 2 VS *E. raffinosus*, 1 VR *E. gallinarum* и 11 коагулазо-негативни *Staphylococcus* spp. с морфология на колониите (оцветени в зелено), характерна за VRE.

През последните години нараства интересът към детайлното проучване на видовете *E. casseliflavus* и *E. gallinarum* като колонизатори на интестиналния тракт и причинители на инфекции при човека. Повечето от хромогенните среди не засичат присъствието на *vanC* ентерококи във фекални проби поради обичайно ниските им нива на резистентност към *vancomycin*. Въпреки това CHROMagar VRE и InTray Colorex VRE дават възможност за презумптивна идентификация на растящи върху тях *vanC* ентерококите на база цвета на техните колонии.

#### **4.3. ПРЕЗУМПТИВНА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE**

Повечето хромогенни хранителни среди имат способността не само да селектират растежа на VRE, но и да разграничават видовете *E. faecium* и *E. faecalis* на база цвета на колониите, което значително намалява времето за идентификация. Например наличието на лилави колонии върху chromID VRE свидетелства за VR *E. faecium*, а синьо-зелените колонии са характерни за VR *E. faecalis*. При Brilliance VRE агара колониите на VR *E. faecium* също са оцветени в лилаво, но тези на VR *E. faecalis* изглеждат светло-сини.

Въпреки диференциращите възможности на хромогенните агари, има данни, които свидетелстват за присъствие на VRE с необичайно пигментирани колонии, за растеж на VSE или на други бактериални видове. Това налага допълнителни тестове, определящи видовата принадлежност на изолатите и тяхната чувствителност към vancomycin. Soares и съавт. (Soares et al. 2017) описват диференциращите способности на chromID VRE и установяват, че колониите на 6 от 47 *E. faecalis* изолати са оцветени в сиво – цвят, който не кореспондира с инструкциите на фирмата-производител. Освен това е наблюдаван растеж на VS *E. faecium* и VS *E. faecalis* изолати с цвят на колониите, напълно съответстващ на VR видове ентерококи. За да се избегне грешната интерпретация на резултатите, авторите препоръчват последваща видова идентификация на суспектните VRE чрез конвенционални тестове.

Растежът на черни колонии върху BEAV агара или потъмняване на BEAV бульона свидетелства за наличие на VRE. Обичайно позитивиралите се бульонни посеви изискват субкултивиране върху подходяща агарова среда преди последващата идентификация на растящите бактериални видове. Най-често използвана среда за субкултивиране е кръвният агар (KA) с 5% овнешки еритроцити. След 24-часово инкубиране на посевките върху 5% KA ентерококите обикновено образуват гладки, изпъкнали, непрозрачни, сивкави колонии с размер 1-2 мм в диаметър, най-често  $\alpha$ -хемолитични или нехемолитични. Според типа на добавената кръв към KA, има описани случаи на  $\beta$ -хемолитични колонии при *E. faecalis* и *E. durans* видовете (Teixeria et al. 2015).

Презумптивната идентификация на интестиналните VRE се основава на интерпретация на растящите колонии върху агаровата среда, микроскопско определянето на морфологията и Грамовата принадлежност, както и изпълнението на редица конвенционални тестове, характерни за представителите от род *Enterococcus*. В допълнение потвърждаването на изолата като VRE изисква определяне на антимикробната чувствителност към гликопептидните антибиотици.

Ентерококите са Грам-положителни коки, разположени по двойки или в къси верижки. Те са факултативни анаероби с хомоферментативен метаболизъм, който води до производството на L-(+)-млечна киселина като основен краен продукт на глюкозната ферментация. Тези микроорганизми се определят като типични млечнокисели бактерии поради способността им да

ферментират широк спектър от въглехидрати до млечна киселина без да отделят газ. Към най-често използваните конвенционалните тестове за презумптивна идентификация на микроорганизмите от род *Enterococcus* се отнасят: каталазен тест, растеж в среда съдържаща жлъчка-ескулин, хидролиза на L-пирилодонил- $\beta$ -нафтиламид (PYR тест) и хидролиза на левцин- $\beta$ -нафтиламид (LAP тест). Всички ентерококи са каталаза отрицателни, хидролизират левцин- $\beta$ -нафтиламид, растат в бульон с 6.5% NaCl, растат в присъствие на жлъчни соли и хидролизират ескулин. По-голямата част от видовете показват положителен PYR тест, с изключение на *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens*, *E. saccharolyticus* и някои от по-скоро описаните представители на род *Enterococcus* (Teixeria et al. 2015).

Най-често изолираните от човека ентерококови видове са класифицирани в групи на базата на фенотипни характеристики, доказани при прилагане на различни конвенционални тестове. Първо ентерококите са разделят на пет физиологични групи въз основа на образуването на киселина от манитол и сорбоза и хидролизата на аргинин. В допълнение се изпитва тяхната карболитична активност (ферментация на арабиноза, сорбитол, рафиноза, захароза, трехалоза, ксилоза, пируват, метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид и 2-нафтил- $\beta$ -D-галактопиранозид), растеж в присъствие на 0.04% телурит, подвижност и продукция на пигмент (Teixeria et al. 2015).

Описани са два подвижни вида ентерококи – *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*. Тестът за подвижност прави възможно разграничаването им от останалите неподвижни ентерококови видове. Друг диференциращ тест е доказването на ферментационна активност към метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид (MGP тест) (Devriese et al. 1998). Това е бърз и надежден метод за разграничаване на MGP-позитивните *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* от MGP-негативните *E. faecium* и *E. faecalis* (Carvalho et al. 1998). Известно е че някои ентерококи са пигментообразуващи, напр. *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. plantarum*, *E. rotai*, *E. sulfureus* и *E. ureilyticus* (Facklam et al. 2002; Huycke 2014). Тестът за доказване продукцията на пигмент се използва основно за разграничаване на двата вида подвижни ентерококи *E. casseliflavus* и *E. gallinarum*.

Освен презумптивна идентификация на изолираните VR ентерококови видове е необходимо да се потвърди резистентността им към vancomycin. В

проучване на Nguyen и съавт. (Nguyen et al. 2012) всички Грам-положителни коки, доказани чрез оцветяване по Грам, са тествани допълнително за L-пиролинидол ариламидаза (PYR), ферментация на арабиноза, продукцията на киселина от метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид (MGP) и е определена тяхната чувствителност към vancomycin чрез E-тест метода. В друго проучване за интестинално носителство на VRE, изолираните Грам-положителни коки, PYR позитивни, неподвижни, каталаза-отрицателни, необразуващи пигмент са идентифицирани първо като *E. faecium* и *E. faecalis*. В допълнение тези изолати са тествани за MGP и е определена чувствителността им към гликопептидите чрез E-тест (Grabsch et al. 2008).

## **5. ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE ПРИ ХОСПИТАЛИЗИРАНИ ПАЦИЕНТИ**

### **5.1. РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE**

Редица рискови фактори играят роля за развитието на фекална колонизация с VRE при хоспитализирани пациенти. Към тях са отнасят продължителния болничен престой, особено в близост до колонизирани или инфектирани болни, тежки основни и придружаващи заболявания, напреднала възраст, имуносупресия, вътреболничен трансфер, катетеризация на централен венозен източник, ендотрахеална интубация или други инвазивни процедури, хронична хемодиализа, прием на антибиотици, кортикостероиди и други (Mazuski 2008; Yoon et al. 2011; Papadimitriou-Olivgeris et al. 2014; Ford et al. 2015; Zacharioudakis et al. 2015).

По литературни данни (Patel 2003; Özkaya-Parlakay et al. 2014) две групи рискови фактори са значими за колонизация с VRE:

- фактори свързани с експозицията на пациента на VRE;
- фактори свързани с „чувствителността“ на пациента към VRE.

Възможността за експозиция на пациента на VRE се определя от неговата близост до други, вече колонизирани пациенти, а така също и от продължителността на болничния престой. По данни на Aktürk и съавт. (Aktürk et al. 2016) при 44 (89%) от общо 50 пациенти, колонизацията е настъпила по време на болничния престой. Друго проучване също доказва, че в болнична

среда са колонизирани 69 (84.2%) от общо 82 носители на VRE (Ford et al. 2015). Друг важен фактор е концентрацията на VRE във фекалиите при конкретния пациент. Green и съавт. (Green et al. 1991) съобщават, че наличието в изпражненията на VRE  $\geq 10^6$  CFU/ml е свързано с персистиране на колонизацията.

Продължителността на интестиналната колонизация е от съществено значение за разпространението на VRE и тя варира от няколко седмици (Yoon et al. 2011; Sohn et al. 2013; Özkaya-Parlakay et al. 2014) до 3 години (Roghmann M, Morris JG. Longitudinal follow-up of cancer patient colonized by vancomycin-resistant enterococcus (VRE). Presented at the 34th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; September 1996; New Orleans, LA. Abstract 51.). Нейното персистиране се дължи както на замяна с близко родствени VRE щамове, така и на придобиването на нови. Експозицията на пациента на контаминирано с VRE оборудване и непосредствената близост до други носители на тези проблемни микроорганизми може да повлияе върху продължителността на носителството чрез кръстосана колонизация (Drees et al. 2008). Sohn и съавт. (Sohn et al. 2013) проследяват 1027 колонизирани пациенти и установяват, че времето, необходимо за деколонизация след изписване от болница, е средно 8.86 (2-90) седмици.

Употребата на антимикробни лекарствени средства е сред водещите рискови фактори за колонизация с VRE. Високата антибиотична консумация води до нарастване концентрацията на VRE във фецеса на пациентите. По този начин се повишава и възможността за трансмисия от тези пациенти по повърхностите на околната среда и в медицинския персонал, както и вероятността за откриването на VRE във фекални култури (Donskey et al. 2000). Данните от литературата сочат като рискови фактори за колонизация с VRE продължителната и многократна употреба на различни антимикробни лекарствени средства – 3-та генерация цефалоспорини (Bonten et al. 1998; Mazuski 2008; Pan et al. 2012; Faron et al. 2016), аминогликозиди (Pan et al. 2012), vancomycin (Mazuski 2008; Batistão et al. 2012; Pan et al. 2012; Faron et al. 2016), флуорохинолони (Papadimitriou-Olivgeris et al. 2014), карбапенеми (Batistão et al. 2012; Ford et al. 2015), антианаеробни медикаменти (Donskey et al. 2000; Mazuski 2008; Pan et al. 2012; Faron et al. 2016). Yoon и съавт. (Yoon et al. 2011) определят употребата на vancomycin след установено носителство на VRE като единствен

независим рисков фактор, повишаващ 4 пъти възможността за продължителна колонизацията. Широката употреба на антимикробни препарати води до потискане на нормалната чревна флора и стимулира селективната пролиферация на VRE. Пациентите стават по-възприемчиви към колонизация и нараства възможността за развитие на инфекции с VRE (Faron et al. 2016).

Обикновено колонизацията с VRE не винаги се извява, но тя предшества и играе ключова роля в епидемиологията на нозокомиалните ентерококови инфекции. Честотата на тези инфекции е най-висока сред пациенти с хематологични заболявания, трансплантирани и лекувани в отделения за интензивни грижи, докато при имунокомпетентните лица е незначителна (Kara et al. 2015).

Редица проучвания потвърждават тезата, че колонизираните с VRE пациенти имат значително по-висок риск за развитие на инфекция от неколонизираните (Zacharioudakis et al. 2015; Alevizakos et al. 2016). Още в първото публикувано съобщение за разпространението на VRE сред онкологично болни, е отчетена не само висока честота на интестинална колонизацията с VR *E. faecium*, но и висок процент (12%) на лицата развили VRE инфекция. Най-често фекалните VRE се асоциират с инфекции на кръвообращението (blood stream infections, BSIs). Според Alevizakos и съавт. (Alevizakos et al. 2016) VRE колонизираните пациенти са 24 пъти по-склонни да развият VRE BSIs в сравнение с неколонизираните. Данните от мета-анализа на Alevizakos (Alevizakos et al. 2016) също свидетелстват за високата честота на VRE BSIs (13%) при пациенти с колонизация. В друго проучване е установено, че 26% от колонизираните пациенти развият бактериемия (Choi et al. 2011). В противовес на тези данни Oliver и съавт. (Oliver et al. 2008) съобщават за бактериемия само при 31 (4%) от 768 носители на VRE.

За развитието на колонизация и последваща инфекция с VRE при пациенти с малигнени заболявания съдействат не само посочените по-горе рискови фактори, а също и тежката имunosупресия (Alevizakos et al. 2016), развитието на мукозит по време на химиотерапията (Gedik et al. 2014; Alevizakos et al. 2016), неутропенията (Worth et al. 2007; Bossaer et al. 2011; Ford et al. 2015), честата употреба на съдови и уретрални катетри (Alevizakos et al. 2016). Химиотерапията и лошият функционален статус могат да доведат до увреждане на чревната мукоза, което позволява навлизането на VRE в кръвта (Alevizakos et

al. 2016). Kuehnert и съавт. (Kuehnert et al. 1999) определят мукозита като самостоятелен рисков фактор за развитие на ентерококова бактериемия при болни с малигнени хематологични заболявания, носители на VRE. В допълнение неутропенията повишава риска от бактериемия сред колонизираните пациенти поради неадекватното очистване на патогените от кръвоносната система (Peel et al. 2012). Bossaer и съавт. (Bossaer et al. 2011) съобщават за ентерококова инфекция при 20 (38%) от общо 53 колонизирани с VRE фебрилни неутропенични пациенти, като времето, необходимо за развитието на инфекцията, е от 1 ден до 2 седмици.

Данните от литературата сочат колонизираните пациенти за резервоар на VRE, а контролът върху разпространението на VRE се оценява като важен момент в предотвратяване развитието на колонизация и последваща инфекция (Patel 2003). Според препоръките на CDC и Society for Health Care Epidemiology of America (Shay et al. 1995; Siegel et al. 2007; Smith et al. 2008) е необходим активен скрининг на хоспитализираните пациенти за колонизация с VRE. Причината за неизпълнение на тези препоръки е свързана с ограничения брой проучвания, показващи ползите от лабораторния скрининг, както и липсата на точни критерии за тестване на рисковите групи пациенти.

## **5.2. ЧЕСТОТА НА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE**

Способността на VRE да колонизират интестиналния тракт на хоспитализирани пациенти е описана през 1995 г. от Montecalvo и съавт. (Montecalvo et al. 1995). Авторите проучват честотата на колонизацията с *VRE* *E. faecium* сред 306 болни от Онкологично отделение и доказват носителство при 86 (28%) от тях. Две години по-късно Roghmann и съавт. (Roghmann et al. 1997) дават детайлни сведения за пациенти с различни злокачествени заболявания, колонизирани с VRE. От общо 51 носители, 55% са страдали от остра левкемия, 25% – от други хематологични заболявания, 16% – от солидни карциноми и 6% – от други онкологични заболявания (Roghmann et al. 1997).

Честотата на интестинална колонизация с VRE варира при различните групи имунокомпрометирани пациенти. Според някои проучвания тя е 6.2% при лица на хемодиализа (Zacharioudakis et al. 2015), 8.8% при лекувани в интензивни звена (Ziakas et al. 2013) и 20% при болни с хематологични злокачествени заболявания (Alevizakos et al. 2016). Данните от мета-анализа на Ziakas и съавт.

(Ziakas et al. 2013) сочат известни географски различия в степента на фекална колонизация при пациенти в интензивни отделения. Тя е най-висока в САЩ (12.3%), следвана от Южна Америка (7%), Азия (5.4%), Океания (4.4%) и Европа (2.7%). Furtado и съавт. (Furtado et al. 2005) съобщават за VRE колонизация при 48 (32.6%) от общо 256 пациенти на интензивно лечение в Бразилия. Сред лица на диализа в Латинска Америка средната честота на VRE колонизация е 5.2% (Zacharioudakis et al. 2015), а в Ирландки диализен център – 13% (Humphreys et al. 2004). В България В. Попова (Попова В 2018) през 2012 г. установява фекално носителство на VRE при 21 (18.4%) от 114 пациенти на хемодиализа, като при 5 (5.38 %) от тях е изолиран VR *E. faecium*, а при останалите – *E. gallinarum* или *E. casseliflavus*.

Географското разпространение на VRE сред пациенти с онкологични заболявания е представено в мета-анализа на Alevizakos и съавт. (Alevizakos et al. 2016). Данните показват, че честотата на интестинални VRE сред тази таргетна група е най-висока в Азия (23%), Северна Америка (21%) и Европа (20%) и значително по-ниска в Океания (4%). Отделни проучвания докладват много висока степен на VRE колонизация сред трансплантирани пациентите с малигнени хематологични заболявания – над 40% (Weinstock et al. 2007). Gedik и съавт. (Gedik et al. 2014) откриват носителство на VRE в интестиналния тракт на 50 (39.68%) от 132 скринирани болни, а Ford и съавт. (Ford et al. 2015) – при 82 (38%) от 214 болни.

Повечето данни за честотата и разпространението на VRE се отнасят за лица над 18 г. Проучванията върху деца и новородени са значително по-малко, но въпреки това са налице сведения за висока степен на носителство в тази възраст. Aktürk и съавт. (Aktürk et al. 2016) скринират 229 деца с малигнени хематологични заболявания и установяват, че 72 (31.4%) от тях са колонизирани с VRE. През 2020 г. в Израел е докладван взрив от чревно VRE носителство сред 49 новородени, настанени в интензивни звена (Magom et al. 2020). Тези данни показват, че интестиналните VRE са широко разпространени сред всички възрастови групи.

Известно е, че интестиналният тракт се колонизира най-често от VR *E. faecium* и в по-малка степен от VR *E. faecalis*. В проучване на Gedik и съавт. (Gedik et al. 2014) 81% от всички VRE са идентифицирани като *E. faecium* и 19% като *E. faecalis*. Сходни са данните и от други публикации (Акрака et al. 2016).

Някои автори съобщават само за интестинални VR *E. faecium* щамове (Chhatwal et al. 2020), а други – за комбинации между VR *E. faecium* или VR *E. faecalis* и vanC ентерококи (Tresoldi et al. 2006; Batistão et al. 2012; Aktürk et al. 2016). Публикуваните данни сочат, че при интестиналните VRE доминантен фенотип на гликопептидна резистентност е VanA. Честотата на ентерококи с VanB фенотип е значително по-ниска и те са описани предимно в проучвания от Австралия (Ziakas et al. 2013; Zacharioudakis et al. 2015). Акрака и съавт. (Акрака et al. 2016) установяват *vanA* ген при всички интестинални VR *E. faecium*, докато носителство на *vanB* ген е доказано при всички *E. faecalis*.

Като цяло публикациите относно чревното носителство на ентерококи с VanC (Tresoldi et al. 2006; Batistão et al. 2012) или VanD-*vanA* (Song et al. 2013) тип са малко на брой. Известен е фактът, че пациентите с vanC ентерококи са потенциален резервоар на гени, кодиращи резистентност към антимикробни лекарствени средства. Нарастващата роля на тези микроорганизми като причинители на инфекции (Monticelli et al. 2018) определя необходимостта от детайлни проучвания върху честотата на колонизация с *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* особено при високо-рискови групи пациенти.

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 генотипни свойства на циркулиращите VR ентерококови 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.

## 6. ОБОБЩЕНИЕ НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

Ентерококите са уникални с естествената си резистентност към почти всички основни класове антибиотици. В допълнение те са развили придобита резистентност към използваните в клиничната практика антибиотици с активност срещу тях (Krogstad and Pargwette 1980; Murray 1990; Mishra et al. 2012; Bender et al. 2018).

Ентерококите вземат участие в редица заболявания като уроинфекции, интраабдоминални и постоперативни инфекции, бактериемии, ендокардити и др. (Sievert et al. 2013; Pfaller et al. 2019). Патогенността на тези микроорганизми е

свързана с наличието на различни фактори на вирулентност, от които най-чести са ентерококовия повърхностен протеин, колаген-свързващия протеин, хиалуронидазата, желатиназата, цитолизин агрегираща субстанция и др. (Duprè et al. 2003; Creti et al. 2004; Zou et al. 2011).

Сред познатите 9 типа на гликопептидна резистентности при VRE с най-голямо значение за клиничната практика са *vanA* и *vanB* генотиповете (Teixeria et al. 2015). Известно е, че разпространението на резистентността към vancomycin сред ентерококите се свързва основно с вида *E. faecium* и по-малко с *E. faecalis*. Този факт значително повиши интереса към детайлните фенотипни и генотипни проучвания на *E. faecium*.

През последните тридесет години VRE се оценяват като сериозна заплаха за хоспитализирани пациенти. Първоначално асоциирани с взривове на вътреболнични инфекции, понастоящем VRE са признати като ендемични патогени в редица болнични звена (Brinkwirth et al. 2021). Освен това е добре позната и способността на VRE да колонизират интестиналния тракт на човека (Montecalvo et al. 1995). Колонизацията с VRE предшества и играе ключова роля в епидемиологията на нозокомиалните VR ентерококови инфекции. Най-често колонизирани са имунокомпрометирани лица, като тези настанени в отделения за интензивни грижи, с онкологични или хематологични малигнени заболявания, подложени на хемодиализа и др. (Ziakas et al. 2013; Zacharioudakis et al. 2015; Alevizakos et al. 2016). Честотата на VRE носителство сред тези групи пациенти варира в широки граници. Тя зависи както от експозицията и възприемчивостта на болния към VRE, така и от редица рискови фактори благоприятстващи колонизацията. По-известни сред тях са напредналата възраст на пациента, продължителният болничен престой, тежестта на основното и придружаващи заболявания, приложението на инвазивни устройства и/или манипулации, приемът на антибиотици, кортикостероиди и химиотерапевтични средства (Mazuski 2008; Yoon et al. 2011; Papadimitriou-Olivgeris et al. 2014; Ford et al. 2015; Zacharioudakis et al. 2015).

Колонизираните лица са резервоар на VRE и контролът върху тяхното разпространение е от особено значение за предотвратяване развитието на колонизация/инфекция (Patel 2003). Поради тази причина е необходимо въвеждането на активен скрининг на високорисковите пациенти за VRE носителство. За нуждите на тази цел през последните години бяха разработени

редица хромогенни агарови хранителни среди позволяващи бързо и надеждно изолиране, и презумптивна идентификация на VRE с *vanA* или *vanB* генотип (Perry 2017). Комбинацията на една или няколко от тези среди с обогатен бульон дава възможност за откриване и на ентерококи с вродена резистентност към vancomycin (Suwantararat et al. 2014).

Ограниченият брой проучвания разкриващи ползите от лабораторния VRE скрининг, както и липсата на данни за рисковите групи пациенти е причината за неизпълнението му от болничните звена. От друга страна изследването за интестинално носителство на VRE е затруднено поради неналичен алгоритъм за изолиране и идентификация на тези терапевтично-проблемни микроорганизми.

В настоящият труд ще се проучат възможностите за изолиране и презумптивна идентификация на интестинални VRE чрез различни хромогенни агари и обогатена бульонна среда; честотата на интестинална колонизация с VRE и благоприятстващите я рискови фактори при три високо рискови групи пациенти; разпространението на VRE сред хоспитализирани пациенти за 5 годишен период; антимикробната чувствителност, разпространението на гени кодиращи резистентност към гликопептиди и аминогликозиди, фактори на вирулентност, както и генетичната връзка при интестинални и при клинични VRE изолати.

### III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел 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 антимикуробната 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.

## IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. БАКТЕРИАЛНИ ИЗОЛАТИ

В настоящият труд са проучени **общо 186 неповтарящи се ванкомицин-резистентни ентерококи (VRE) – 117** клинични и **69** интестинални изолата. Основна част от VRE са изолирани в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен – **163**, а останалите 23 са предоставени от: Аджибадем Сити Клиник МБАЛ УМБАЛ „Токуда“, София – **14**, МБАЛ „Сърце и мозък“, Плевен – **5** и УМБАЛ „Св. Марина“, Плевен – **4**.

#### 1.1. КЛИНИЧНИ ЕНТЕРОКОКОВИ ИЗОЛАТИ – общо 117

**1.1.1. УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен – 94 VRE**, изолирани за периода 2016 г. – 2020 г. от следните клинични материали:

- раневи секрети – 45
- урини – 35
- хемокултури – 6
- пунктати – 2
- дренажи – 2
- стомашен аспират – 1
- асцитна течност – 1
- нефростома – 1
- уретрален катетър – 1

**1.1.2. Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ „Токуда“, София – 14 VR *E. faecium***, изолирани през 2020 г. от следните клинични материали:

- уруни – 5
- уретрални катетри – 3
- раневи секрети – 3
- жлъчна течност – 2
- стомашен аспират – 1

**1.1.3. МБАЛ „Сърце и мозък“, Плевен – 5 VR *E. faecium***, изолирани през 2019 г. от 3 раневи секрети и 2 уретрални катетри.

**1.1.4. УМБАЛ „Св. Марина“, Плевен – 4 VR *E. faecium***, изолирани за периода 2017 г. – 2020 г. от раневи секрет, секрет от таз, дренаж и пунктат.

## **1.2. ИНТЕСТИНАЛНИ ЕНТЕРОКОКОВИ ИЗОЛАТИ – общо 69**

Всички интестинални ентерококи са 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 в Клиниката по нефрология и хемодиализа (ХД) за периода ноември 2017 г. – януари, 2018 г., като 62<sup>-ма</sup> пациента са скринирани двукратно за VRE в две последователни седмици, а 35<sup>-ма</sup> – еднократно.
- 256 фецеса от 119 пациенти с малигнени хематологични заболявания от Клиниката по хематология (ХТ) за периода май 2018 г. – януари 2019 г. Пациентите са скринирани за VRE през първите 48 часа от хоспитализацията, на 5<sup>-ти</sup> и след това веднъж седмично до момента на дехоспитализация или леталитет. При доказана положителна за VRE първичната (през първите 48 часа) фекална проба се приема, че пациента е придобил колонизацията в обществото.
- 91 ректални секрета от 91 пациенти, лекувани в I<sup>-во</sup> Отделение по анестезиология и интензивно лечение (ОАИЛ) и II<sup>-ро</sup> ОАИЛ към Клиниката по анестезиология и интензивно лечение (КАИЛ) –за периода декември 2018 г. – май 2019 г. Пациентите са скринирани еднократно за VRE след 48 час от хоспитализацията.

### 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. ПАЦИЕНТИ, СКРИНИРАНИ ЗА ИНТЕСТИНАЛНО VRE НОСИТЕЛСТВО (ОБЩО 307)

Лицата са проучени във връзка с рисковите фактори за възникване на интестинална колонизация с VRE. Включващите и изключващите критерии за таргетните групи са представени на **Таблица 2**. Всеки пациент е запознат с целите и задачите на проучването чрез предварително предоставен Информационен лист за пациента (**Приложение 1**).

**Таблица 2.** Критерии за включване и изключване на пациенти в проучването

Клинично звено	Критерии за включване	Критерии за изключване
Клиника по нефрология и хемодиализа	<ul style="list-style-type: none"><li>- лица на възраст над 18 г.;</li><li>- лица от гр. Плевен и областта, провеждащи хемодиализа в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен;</li><li>- лица от други области, провеждащи хемодиализа в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- отказ от страна на пациента за участие в проучването;</li><li>- влошено основно състояние на пациента по време на проучването.</li><li>- екзит на пациента по време на проучването.</li></ul>
Клиника по хематология	<ul style="list-style-type: none"><li>- лица на възраст над 18 г.;</li><li>- лица с новодиагностицирани малигнени хематологични заболявания;</li><li>- лица с малигнени хематологични заболявания с давност.</li><li>- хоспитализация на лицата повече от 48 часа.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- отказ от страна на пациента за участие в проучването;</li><li>- влошено основно състояние на пациента по време на проучването.</li><li>- екзит на пациента по време на проучването.</li></ul>
Клиника за анестезиология и интензивно лечение	<ul style="list-style-type: none"><li>- лица на възраст над 18 г.;</li><li>- лица, постъпили за интензивни грижи в отделенията;</li><li>- хоспитализация на лицата повече от 48 часа.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- отказ от страна на пациента за участие в проучването;</li><li>- влошено основно състояние на пациента по време на проучването.</li><li>- екзит на пациента по време на проучването.</li></ul>

Възможните рискови фактори за колонизация с VRE са събрани с помощта на специално разработена за целта Карта за епидемиологично проучване (**Приложение 2**), включваща демографски характеристики на пациента – пол и възраст, основно заболяване, данни за специфичните и неспецифични рискови фактори за възникване на колонизация при всяка от целевите групи. За пациентите на хемодиализа като специфични рискови фактори бяха отчетени: продължителност на хемодиализата (месеци или години); кратност на хемодиализата (едно-, дву- или трикратна), съдов достъп за осъществяване на хемодиализата (артерио-венозна фистула, съдова протеза [графт], постоянен тунелизиран катетър). При пациентите с малигнени хематологични заболявания бяха взети в съображение следните специфични фактори: продължителност на болничния престой като дни; лечение с химиотерапевтици. При пациентите в интензивни отделения бяха проучени продължителност на болничния престой (дни); наличие на предходни операции; присъствие на инвазивен катетър (централен венозен катетър, уретрален катетър, назогастрална сонда, ендотрахеална тръба, дренаж). Като неспецифични рискови фактори бяха приети придружаващи заболявания, прием на антибиотици, прием на други лекарствени средства, различни от антибиотиките. Необходимата информация бе събирана от историите на заболяванията, от пациентите или техните близки, както и от лекуващите лекари. Данните от картите за епидемиологично проучване бяха въведени в електронна таблица на SPSS софтуер и бе проведена статистическа обработка.

### **3.2. ПАЦИЕНТИ С УСТАНОВЕНИ VR *E. FAECIUM* ИЗОЛАТИ (ОБЩО 85)**

Необходимите данни за пациентите с установени VR *E. faecium* изолати са събрани от историите на заболяванията, от лабораторните журналы и от болничната информационна система. Обобщените данни бяха въведени в електронна таблица на SPSS софтуер за статистическа обработка.

За целите на статистическия анализ проучените лица бяха разделени в три възрастови групи – I<sup>ва</sup> – от 22 до 39 г., II<sup>па</sup> – от 40 до 59 г. и III<sup>та</sup> –  $\geq 60$  г. За всяка група е търсена статистически значима разлика между:

- броя на пациентите с VR *E. faecium*, лекувани КАИЛ и I<sup>ва</sup> Клиника по хирургия, и тези, настанени в други клинични звена (II<sup>па</sup> Клиника по

хирургия, III<sup>-та</sup> Клиника по хирургия, Клиника по онкологична (ОНКО) хирургия, Клиника по нефрология и хемодиализа, Клиника по урология, Клиника по пневмология и фтизиатрия).

- броя на пациентите, от които е изследван ранев секрет, урина, и тези, от които са изследвани други клинични материали (хемокултура, пунктат, дренажна течност, асцитна течност, стомашен аспират).

#### **4. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ И УСЛОВИЯ ЗА КУЛТИВИРАНЕ НА ЕНТЕРОКОКИ**

##### **4.1. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНЕ НА КЛИНИЧНИ VRE**

**4.1.1. Кръвен агар с 5% овнешка кръв** (Бул Био, НЦЗПБ) – приготвен в лабораторията, в която са проведени проучванията.

*Начин на приготвяне:* Към 1000 ml хладка дН<sub>2</sub>O се добавят 20 gr суха среда. Получената смес се загрява при постоянно разбъркване до завиране. Стерилизира се за 20' при 121°C в автоклав. Готовата смес се охлажда до 45°C и към нея се прибавя 5% дефибринирана овнешка кръв (Ридаком, България). Смесва се добре и готовата среда се разлива по 12.5 ml в стерилни 45 mm петрита.

**4.1.2. CHROMID<sup>®</sup> CPS<sup>®</sup> Elite agar** (bioMerieux, France) – готови петрита.

**4.1.3. BBL<sup>™</sup> CHROMagar<sup>™</sup> Orientation** (Becton Dickinson, UK) – готови петрита.

*Условия за култивиране:* Клиничните проби, посяти върху всяка от хранителните среди се инкубират на 37°C за 24 часа при аеробни условия.

##### **4.2. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE**

**4.2.1. Brilliance<sup>™</sup> VRE Agar** (Oxoid, UK) – готови петрита.

**4.2.2. chromID<sup>™</sup> VRE Agar** (bioMerieux, France) – готови петрита.

**4.2.3. HiCrome™ VRE Modified Agar** (HIMEDIA, India) – приготвен в лабораторията, в която са проведени проучванията.

*Начин на приготвяне:* Към 1000 ml дН<sub>2</sub>O се добавят 53.70 gr суха среда HiCrome™ VRE Agar Base, Modified (HIMEDIA, India). Получената смес се загрева до завиране и пълно разтваряне на средата. Охлажда се до 45-50°C и се добавят два флакона HiCrome™ VRE Agar Supplement (HIMEDIA, India) рехидратирани в 10 ml дН<sub>2</sub>O. Смесва се добре и готовата среда се разлива по 25 ml в 90 mm стерилни петрита.

Всяка от посочените хромогенни агарови среди съдържа 8 µg/ml vancomycin и хромогенни субстрати за ензими на видовете *E. faecalis* и *E. faecium*, чиито колонии се оцветяват в различен цвят. Презумптивната идентификация на двата вида се основава на цвета на колониите (**Таблица 3**).

**Таблица 3.** Цвят на колониите на VRE върху хромогенни среди

Хромогенна среда	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Brilliance™ VRE Agar	светло-сини колонии	лилави колонии
chromID™ VRE Agar	сини до зелени колонии	лилави колонии
HiCrome™ VRE Modified Agar	сини колонии	зелени до жълти колонии

**4.2.4. Bile Aesculin Azide Broth с 6 µg/ml vancomycin** (Liofilchem, Italy) – приготвен в лабораторията, в която са проведени проучванията.

*Начин на приготвяне:* Към 1000 ml дН<sub>2</sub>O се добавят 41.70 gr суха среда Bile Aesculin Broth (Liofilchem, Italy). Получената смес се загрева до пълно разтваряне. Стерилизира се за 15' на 121°C в автоклав. Охлажда се до 45-50°C и се добавят два флакона Vancomycin Supplement (Liofilchem, Italy) рехидратирани в 4 ml дН<sub>2</sub>O. Смесва се добре и готовата среда се разлива по 3 ml в стерилни епруветки.

*Условия за култивиране:* Фекалните проби, посетни върху всяка от хранителните среди, се инкубират на 37°C за 24/48 часа при аеробни условия. Наличието на бактериален растеж с типичен цвят на колониите върху агаровите среди и/или потъмняване на BEAV бульона се отчита като положителен резултат.

#### **4.3. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ, ИЗПОЛЗВАНИ ЗА СУБКУЛТИВИРАНЕ НА ПОЛОЖИТЕЛНИ ВАЕV БУЛЪОНИ ИЛИ НА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE ОТ ХРОМОГЕННИ СРЕДИ**

**4.3.1. Кръвен агар с 5% овнешка кръв** (Бул Био, България) – за субкултивиране на положителни ВАЕV бульони.

**4.3.2. CHROMID® CPS® Elite agar** (bioMerieux, France) – за субкултивиране на положителни ВАЕV бульони.

*Условия за субкултивиране на първично изолираните интестинални VRE:* инкубиране на 37°C за 24 часа при аеробни условия.

#### **4.4. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПРОУЧВАНЕ НА БИОХИМИЧНИ СВОЙСТВА НА ЕНТЕРОКОКИ**

- Среда за определяне на ферментационната активност към арабиноза – амп. 1% (Бул Био, НЦЗПБ).
- Среда за определяне на ферментационната активност към захароза – амп. 1% (Бул Био, НЦЗПБ).
- Среда за определяне на ферментационната активност към рафиноза – амп. 1% (Бул Био, НЦЗПБ).
- Среда за определяне на ферментационната активност към манит – амп. 1% (Бул Био, НЦЗПБ).
- Среда за определяне на ферментационната активност към сорбит – амп. 1% (Бул Био, НЦЗПБ).
- Среда за определяне на декарбоксилаза и дехидролаза на L-аргинин – амп. (Бул Био, НЦЗПБ).
- Среда за определяне на подвижност – SIM Medium (Liofilchem, Italy) – приготвена в лабораторията.

*Начин на приготвяне:* Към 1000 ml дН<sub>2</sub>O се добавят 38.0 gr суха среда. Получената смес се загрява при постоянно разбъркване до завиране. Стерилизира се за 15' при 121°C в автоклав. Готовата смес се разлива 3 ml в 4.5 ml стерилни епруветки.

- Среда за определяне ферментация на метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид – Rapid MGP Medium (Oxoid, UK).
- Среда за определяне на хидролиза на ескулин и жлъчни соли – Bile Aesculin Agar (Liofilchem, Italy) – приготвена в лабораторията, в която са проведени проучванията.

*Начин на приготвяне:* Към 1000 ml дН<sub>2</sub>O се добавят 56.7 gr суха среда. Получената смес се загрява при постоянно разбъркване до завиране. Стерилизира се за 15' при 121°C в автоклав. Готовата смес се охлажда до 45-50°C и се разлива по 2.5 ml в 4.5 ml стерилни епруветки. Епруветките с хранителната среда се оставят на стайна температура в полулегнало положение до получаване на полегат агар.

**Условия за култивиране** на инокулираните хранителните среди: инкубиране на 37°C за 24 часа при аеробни условия.

#### **4.5. ХРАНИТЕЛНА СРЕДА ЗА ИЗПИТВАНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА**

- Мюлер-Хинтон агар (Бул Био, България) – приготвен в лабораторията, в която са проведени проучванията

*Начин на приготвяне:* Към 1000 ml хладка дН<sub>2</sub>O се добавят 38.0 gr суха среда. Получената смес се загрява при постоянно разбъркване до завиране. Стерилизира се за 20' при 121°C в автоклав. Готовата смес се охлажда до 45-50°C и се разлива по 25 ml в 90 mm стерилни петрита.

#### **4.6. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ, ИЗПОЛЗВАНИ ПРИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

- Кръвен агар с 5% овнешка кръв (Бул Био, България).
- Мюлер-Хинтон агар (Бул Био, България).

#### **4.7. ХРАНИТЕЛНА СРЕДА ЗА СЪХРАНЕНИЕ НА ЩАМОВЕТЕ**

- Skin Milk Powder (Oxoid, UK).

## 5. АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА

### 5.1. АНТИБИОТИЧНИ СУБСТАНЦИИ:

- Vancomycin Supplement (Liofilchem, Italy).

Всеки флакон съдържа 3 mg vancomycin. Използва се за приготвяне на Bile Aesculin Azide Broth (Liofilchem, Italy).

- HiCrome™ VRE Agar Supplement (HIMEDIA, India).

Всеки флакон съдържа vancomycin в концентрация 4 mg и fluconazole 5 mg. Използва се за приготвяне на HiCrome™ VRE Agar (HIMEDIA, India).

**5.2. АНТИБИОТИЧНИ ДИСКОВЕ:** ampicillin (2 µg), gentamicin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), levofloxacin (5 µg), streptomycin (300 µg), imipenem (10 µg), vancomycin (5 µg), teicoplanin (30 µg), linezolid (10 µg), tigecycline (15 µg), quinupristin/dalfopristin (15 µg) (Becton Dickinson, UK).

**5.3. АНТИБИОТИЧНИ СТРИПОВЕ:** ampicillin (0.016-256 µg/ml), gentamicin (0.064-1024 µg/ml), ciprofloxacin (0.002-32 µg/ml), vancomycin (0.016-256 µg/ml), teicoplanin (0.016-256 µg/ml), linezolid (0.016-256 µg/ml), quinupristin/dalfopristin (0.002-32 µg/ml), tigecycline (0.016-256 µg/ml), daptomycin (0.016-256 µg/ml) (Liofilchem, Italy).

## 6. МЕТОДИ ЗА ФЕНОТИПНА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ЕНТЕРОКОКИ

### 6.1. КОНВЕНЦИОНАЛНИ МЕТОДИ

#### 6.1.1. Тестове за презумптивна идентификация на ентерококи

- Оцветяване по Грам – набор за оцветяване по Грам (Becton Dickinson, UK).

Показва морфологията и Грамовата принадлежност на съмнителни за ентерококи микроорганизми.

- Каталазен тест – Върху предметно стъкло се смесва материал от чиста култура с капка 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Следи се за появата на мехурчета в резултат на разграждането на водородния прекис до кислород и вода. При липса на мехурчета тестът се отчита като отрицателен.

- Растеж в жлъчка-ескулин агар – няколко колонии от чиста бактериална култура се инокулират в средата и се инкубират при 37°C за 24 часа. За положителен тест се приема този, при който се наблюдава растеж и потъмняване на средата в резултат на настъпилата хидролиза на ескулина.
- Растеж в бульон с 6.5% NaCl.
- PYR (L-pyrrolidonyl arylamidase) тест (Liofilchem, Italy) – хидролизата на L-пиридонил-β-нафтиламид се доказва с тест ленти, импрегнирани с този субстрат и PYR-реактив (p-диметил-аминоцинамалдехид). Върху тест лентата се втриват няколко колонии от чиста бактериалната култура, добавя се реактив и се следи за розово-червено оцветяване.
- LAP (lucine amino peptidase) тест (Oxoid, UK) – хидролизата на левцин-β-нафтиламид се изследва с помощта на филтърни дискове, импрегнирани с този субстрат и LAP-реактив (p-диметиламиноцинамалдехид). Върху диск се втриват няколко колонии от чиста бактериалната култура, добавя се реактив и се наблюдава червено оцветяване.

#### **6.1.2. Тестове за определяне на групов и видова принадлежност на ентерококи**

- Тест за доказване ферментационна активност към арабиноза, манитол, сорбоза, захароза и рафиноза – към ампулите с хранителна среда се добавят няколко капки течна бактериална култура и се инкубират при 37°C за 24 часа в аеробни условия. Всяка хранителна среда съдържа цветен индикатор бромтимолово синьо, поради което цветът е синьо-зелен или син (pH 7.2 - 7.6). Реакцията се отчита като положителна при промяна на цвета в жълто в резултат на образуване на киселина и понижаване на pH.
- Тест за доказване хидролиза на аргинин – към ампулата с хранителна среда се добавят няколко капки течна бактериална култура, след което се наслояват с няколко капки парафин и се инкубира при 37°C за 24 часа в аеробни условия. Всяка хранителна среда съдържа цветен индикатор бромтимолово синьо, поради което цветът е синьо-зелен или син (pH 7.2 – 7.6). Реакцията се отчита като положителна при промяна на цвета в червено-виолетов до виолетов.

- Тест за определяне на подвижност – SIM Medium (Liofilchem, Italy). Няколко колонии от чиста бактериална култура се инокулират в среда с бод. Следва инкубация при 37°C за 24 часа в аеробни условия. Положителен тест за подвижност е наличието на дифузен растеж/мътност, разпростиращ се извън линията на инокулиране, а неподвижните бактерии дават растеж само по хода на бода.
- Тест за доказване образуване на пигмент – няколко колонии от чиста бактериална култура на 5% кръвен агар се втриват върху филтърна хартия и се следи за появата на пигмент.
- Тест за доказване ферментация на метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид (MDG) – няколко колонии от чиста бактериална култура се инокулират в епруветка с Rapid MGP среда (Oxoid, UK). Следва инкубация при 37°C за 5 часа в аеробна среда. Всяка епруветка съдържа цветен индикатор бромтимолово синьо. Реакцията се отчита като положителна при промяна на цвета на средата в жълто в резултат на образуване на киселини и понижено рН.

## **6.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧРЕЗ RAPID™ STR SYSTEM (OXOID, UK)**

Панелът съдържа 15 биохимични теста, включващи: L-аргинин, инулин, ескулин,  $p$ -нитрофенил- $\alpha$ , D-галактозидаза, манитол,  $p$ -нитрофенил- $\alpha$ , D-глюкозид, сорбитол,  $p$ -нитрофенил- $n$ -ацетил- $\beta$ ,D-глюкозамид, рафиноза,  $p$ -нитрофенил фосфат, тирозин  $\beta$ -нафтиламид, хидроксипролин  $\beta$ -нафтиламид, лизин  $\beta$ -нафтиламид, пиридин  $\beta$ -нафтиламид и хемолизен тест. Тестовите са поставени в 10 ямки на микротитърни плаки. Всяка ямка се накапва с 0.1ml суспензия от изследвания изолат с гъстота 1 по McFarland и се инкубира при 35-37°C за 4 часа. Следва отчитане на първите 10 биохимични реакции. Ямки 7-10 са бифункционални, съдържащи едновременно два отделни теста. Към тях се добавят по 2 капки реагент и след 30" до 3' се отчита резултатът. Тестът се определя като положителен или отрицателен по цвета и наличието на хемолиза, като промяната на цвета се сравнява с таблица, съгласно инструкциите на фирмата производител.

Миниатюризираната система за биохимична идентификация Rapid STR System е използвана за идентификация на 27 интестинални VR ентерококови изолата.

### 6.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧРЕЗ АВТОМАТИЗИРАНИ СИСТЕМИ

#### 6.3.1. VITEK® 2 COMPACT (bioMerieux, France)

Кarti за идентификация – VITEK® 2 GP. Всяка карта съдържа 43 биохимични теста и позволява идентифициране на общо 120 вида Грам-положителни бактерии, от които 11 вида ентерококи – *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*. Изпълнението на тест-процедурата е съгласно инструкциите на фирмата-производител. Няколко колонии от 18-24 часова култура на 5% кръвен агар се суспендират в епруветка с 3 ml 0.9% NaCl. Получената суспензия се стандартизира до 0.5-0.63 по McFarland и в нея се поставя VITEK® 2 GP картата. Епруветката с готовия инокулум и картата за идентификация се въвеждат в апарата и резултатът се отчита автоматично.

Автоматизираната система VITEK® 2 COMPACT е използвана за идентификация на всичките 186 VR ентерококови изолата.

#### 6.3.2. VITEK® MS (bioMerieux, France)

Системата използва технология Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) и има възможност за идентификация на 74 Грам-положителни бактерии, от които 7 вида ентерококи – *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*. Съгласно указанията на производителя няколко бактериални колонии от 18-24 часова чиста култура на 5% кръвен агар се поставят в ямка на плаката. Към всяка проба се добавя матриксен разтвор и плаката се поставя в апарата. Микроорганизмът се идентифицира автоматично чрез сравняване на получените спектри с базата данни на апарата.

Автоматизираната система VITEK® MS е използвана за идентификация на всички интестинални VR ентерококови изолати – общо 69.

## 7. МЕТОДИ ЗА ИЗПИТВАНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА

### 7.1. ДИСКОВО-ДИФУЗИОНЕН МЕТОД НА KIRBY-BAUER

Стандартен метод за определяне чувствителността на бактериите към антимикробни лекарствени средства.

*Тест-процедура:* Няколко колонии от 18-24 часова бактериална култура на 5% кръвен агар се суспендират в епруветка с 3 ml 0.9% NaCl. Пригответената суспензия се стандартизира до 0.5 по McFarland и се посява равномерно върху повърхността на петрита с Мюлер-Хинтон агар. За да се абсорбира излишната влага, петритата се оставят 15 мин. на стайна температура с полуотворени капаци, след което с помощта на диспансер се нанасят антибиотични дискове, натоварени със строго определена концентрация от даден антимикробен агент. Следва инкубация при  $35\pm 1^\circ\text{C}$  за 16-20 часа и измерване на зоните на инхибиране на бактериалния растеж. За качествен контрол на процедура е използван референтен щам *E. faecalis* ATCC 29212.

Резултатите от дисково-дифузионните тестове са интерпретирани съгласно указанията на European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)).

### 7.2. ГРАДИЕНТ-ДИФУЗИОНЕН МЕТОД (Epsilon meter test – E-тест)

Метод за определяне чувствителността на бактериите към антимикробни лекарствени средства посредством отчитане на минимални потискащи концентрации (МПК).

*Тест-процедура:* Върху повърхността на Мюлер-Хинтон агар, посят с чиста бактериална култура, се поставят E-тест лентички (Liofilchem, Italy) с експоненциални концентрации на определен антибиотик в  $\mu\text{g/ml}$ . Следва инкубация при  $35\pm 1^\circ\text{C}$  за 16-20 часа. Антибиотикът дифундира в агара и се образува елипсовидна зона на инхибиране на бактериалния растеж. Точката на пресичане на елипсата с тест лентата се отчита като МПК. Изискванията към хранителната среда, приготвянето и посяването на бактериалната суспензия са

същите, като при метода на Kirby-Bauer. За качествен контрол на цялостната процедура е използван референтен щам *E. faecalis* ATCC 29212.

Резултатите от *E*-тестовете са интерпретирани съгласно указанията на EUCAST ([https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)), с изключение на данните за daptomycin, които са интерпретирани според препоръките на Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx>).

## 8. ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ

### 8.1. МЕТОДИ ЗА ИЗОЛИРАНЕ И ИЗМЕРВАНЕ НА ДНК

#### 8.1.1. Методи за изолиране на ДНК

- Протокол за изолиране на ДНК чрез Chelex 100 (Bio-Rad, Canada)
  - От 24-часова култура на 5% кръвен агар или Мюлер Хинтон агар се вземат 3-4 колонии и се поставят на дъното на центрофужна епруветка с обем 1.5 ml.
  - Прибавя се 150 µl 10% Chelex 100 в 1x TE буфер (Bio-Rad).
  - Съдържанието в епруветките се хомогенизира на Вортекс за 40".
  - Във всяка епруветка се добавя 3 µl лизозим.
  - Епруветките се поставя в термоблок на 37°C за 15'.
  - Епруветките се поставя в термоблок на 96°C за 10'.
  - Епруветките са охлаждад на лед или във фризер за 1-2'.
  - Центрофугират се на 13 300 rpm за 5'.
  - Супернатантата с изолираната ДНК се отделя в нови епруветки и се съхранява на – 20°C.
- Протокол за изолиране на ДНК чрез Genomic Mini кит (A&A Biotechnology, Poland)
  - В центрофужна епруветка с обем 1,5 ml се слага 100 µl Tris буфер.
  - От 24-часова култура на 5% кръвен агар или Мюлер Хинтон агар се вземат 3-4 колонии и се поставят на дъното на епруветката.
  - Добавя се 200 µl LT буфер, 5 µl лизостафин и 20 µl протеиназа К.
  - Епруветките се поставя в термоблок на 37°C за 20'.
  - Епруветките се поставя в термоблок на 70°C за 5'.
  - Епруветките се вортексират за 20'.

- Центрофугира се на 10 000 – 15 000 rpm за 1'.
- Супернатантата с изолираната ДНК се прехвърля в епруветка с мембранен филтър т. нар. minicolumn.
- Центрофугира се на 10 000 – 15 000 rpm за 1'.
- Добавя се 500 µl A1 промиващ разтвор.
- Центрофугира се на 10 000 – 15 000 rpm за 1'.
- Minicolumn, съдържащ изолираната ДНК, се прехвърля в нова 2 ml епруветка.
- Добавя се 400 µl A1 промиващ разтвор.
- Центрофугира се на 10 000 – 15 000 rpm за 1'.
- Minicolumn, съдържащ изолираната ДНК, се прехвърля в нова центрофужна епруветка с обем 1.5 ml.
- Добавя се 200 µl буфер на Tris загрят на 70°C.
- Пробата се инкубира на стайна температура за 2'.
- Центрофугира се на 10 000 – 15 000 rpm за 1'.
- Отстранява се minicolumn и изолираната ДНК се съхранява на – 20°C.

При всички 186 VRE, изследвани в България, ДНК е изолирана чрез Chelex 100 (Bio-Rad, Canada) метода. При 27 интестинални VRE, подложени на допълнителни генетични проучвания в Полша, ДНК е изолирана посредством Genomic Mini кит (A&A Biotechnology, Poland).

### **8.1.2. Определяне концентрацията на изолираната ДНК**

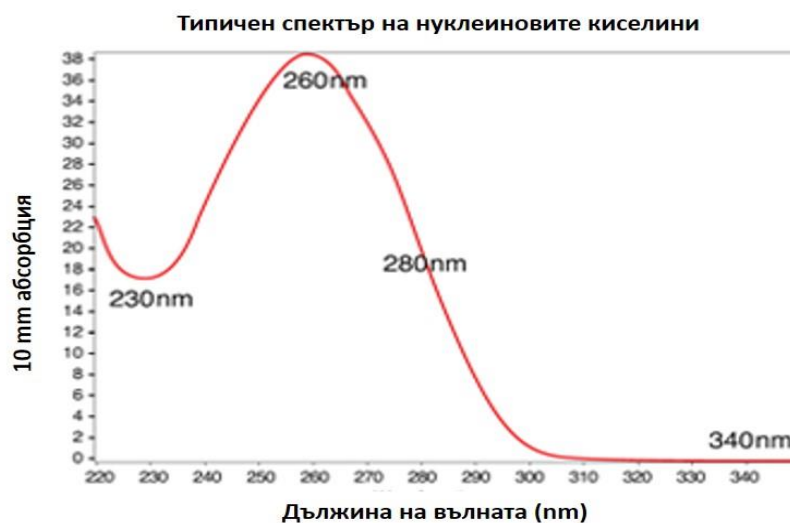
Използван е апарат NanoDrop™ One (Thermo Scientific™).

#### **Работен протокол:**

- Пипетират се 1-2 µl от пробата и се поставя директно върху измервателния пиедестал.
- Спуска се рамото на апарата върху пробата и започва измерване.

*Принцип на измерването:* Създава се повърхностно напрежение между двете оптични влакна, което задържа пробата на място. Светлината от ксенонова лампа преминава през горното оптично влакно надолу през пробата и се открива от вътрешния в апарата спектрометър.

- Концентрацията на ДНК се отчита автоматично на база спектралното изображение и абсорбцията при определена дължината на вълната (**Фигура 1**).



**Фигура 1.** Спектър на нуклеиновите киселини при измерване с NanoDrop One

- ✓ При съотношение на стойностите 260/280 приблизително равно на 1.8, ДНК се приема за “чиста”.
- ✓ При съотношение на стойностите 260/230 в границите на 1.8 – 2.2 , ДНК се приема за “чиста”.

## **8.2. ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR) ЗА ОТКРИВАНЕ НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ ВИДОВА ПРИНАДЛЕЖНОСТ, АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ**

### **8.2.1. Нуклеотидни последователности на използваните праймери**

Използвани са 8 двойки праймери за видова идентификация, 7 – за резистентност към гликопептиди, 8 – за резистентност към аминогликозиди и 7 – за детекция на фактори на вирулентност (**Таблица 4**). Лиофилизираните праймери (Microsynth AG, Switzerland) са доведени до концентрация 100 pmol/μl чрез добавяне на Ultrapure Water (Canvax, Spain). Така приготвените стокови разтвори е получен работен разтвор с концентрация 25 pmol/μl чрез добавяне на Ultrapure Water (Canvax, Spain).

**Таблица 4.** PCR праймери, използвани при амплификация на видово-специфични, резистентни и гени за вирулентност

ГЕН	ОПИСАНИЕ	БАЗОВА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ (5'-3')	РАЗМЕР НА АМПЛИКОНА (bp)	Ref.
<i>ddl<sub>E. hiraе</sub></i>	<i>E. hiraе</i> _DDL_праймер_F5 <i>E. hiraе</i> _DDL_праймер_R3	GATTCTCGTGCGATCGTTGA TTGCGTGAATCCAGGCATTG	327	(Nomura et al. 2018)
<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	<i>E. faecium</i> _DDL_праймер_F2 <i>E. faecium</i> _DDL_праймер_R2	CAGTGCATGTGCCATGGATA ACTTCGGCTGGAATCTGCAT	426	(Nomura et al. 2018)
<i>ddl<sub>E. durans</sub></i>	<i>E. durans</i> _DDL_праймер_F6 <i>E. durans</i> _DDL_праймер_R3	ATTTACSTTATGTGGGCGCG GGCAAGTTTCGCATACTCCT	517	(Nomura et al. 2018)
<i>ddl<sub>E. raffinosus</sub></i>	<i>E. raffinosus</i> _DDL_праймер_F2 <i>E. raffinosus</i> _DDL_праймер_R2	ATCCTGCAAGCAGCCGGTAT GCTCATGACGCTTTGTACCT	634	(Nomura et al. 2018)
<i>ddl<sub>E. faecalis</sub></i>	<i>E. faecalis</i> _DDL_праймер_F4 <i>E. faecalis</i> _DDL_праймер_R3	CAGAAGTGAAGAGCACGATG GCGACATCTTTCACCACTTC	711	(Nomura et al. 2018)
<i>ddl<sub>E. avium</sub></i>	<i>E. avium</i> _DDL_праймер_F1 <i>E. avium</i> _DDL_праймер_R1	AGTTGAAGTTTCAGCGGCA GCCTGTTGTTCTAGCGCTT	837	(Nomura et al. 2018)
<i>ddl<sub>E. casseliflavus/flavescens</sub></i>	<i>E. casseliflavus/E. flavescens</i> _DDL_праймер_F2 <i>E. casseliflavus/E. flavescens</i> _DDL_праймер_R1	GAAGGACGCTGGTAAAAGG GGTCAAGAACGAACGTCTTTG	917	(Nomura et al. 2018)
<i>ddl<sub>E. gallinarum</sub></i>	<i>E. gallinarum</i> _праймер_F1 <i>E. gallinarum</i> _праймер_R1	GATGTATCGCTTCTATCCGC CGACATCGGTAAAAGGCTTG	1009	(Nomura et al. 2018)
16S rRNA	16S_праймер_FC 16S_праймер_RC	AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC GYCCCCGTCAATTCMTTTRAGTTT	151	(Nomura et al. 2018)
<i>vanD</i>	VanD_праймер_F1 VanD_праймер_R2	TGGAATCACAAAATCCGGCG TWCCCGCATTTTTACAACS	311	(Nomura et al. 2018)
<i>vanM</i>	VanM_праймер_F1 VanM_праймер_R1	GGCAGAGATTGCCAACAACA AGGTAACGAATCTGCCGCT	425	(Nomura et al. 2018)
<i>vanC2</i>	VanC2_праймер_F1 VanC2_праймер_R4	GCAAACGTTGGTACCTGATG GGTGATTTGGCGCTGATCA	523	(Nomura et al. 2018)
<i>vanB</i>	VanB_праймер_F1 VanB_праймер_R1	GATGTGTCGGTAAAATCCGC CCACTTCGCCGACAATCAAA	640	(Nomura et al. 2018)
<i>vanA</i>	VanA_праймер_F1 VanA_праймер_R1	GCAAGTCAGGTGAAGATGGA GCTAATACGATCAAGCGGTC	721	(Nomura et al. 2018)
<i>vanC1</i>	VanC1_праймер_5 VanC1_primer_6	GTATCAAGGAAACCTCGCGA CGTAGGATAACCCGACTTCC	836	(Nomura et al. 2018)

<i>vanN</i>	VanN_primer_F1 VanN_primer_R1	CCTCAAATCAGCAGCTAGTG GCTCCTGATAAGTGATACCC	941	(Nomura et al. 2018)
<i>ant(3')-Ia</i>	3'-О-аденилтрансфераза - ANT(3')	TGA TTT GCT GGT TAC GGT GAC CGC TAT GTT CTC TTG CTT TTG	284	(Clark et al. 1999)
<i>ant(4')-Ia</i>	4'-О-аденилтрансфераза - ANT(4')	CAAACGCTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294	(Vakulenko et al. 2003)
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	6'-N-ацетилтрансфераза-2'-О-фосфотрансфераза - AAC(6')-APH(2'')	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	369	(Vakulenko et al. 2003)
<i>aph(2'')-Ic</i>	2'-О-фосфотрансфераза - APH(2'')	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTCCGATAGCAAGAG	444	(Vakulenko et al. 2003)
<i>aph(3')-IIIa</i>	3'-О-фосфотрансфераза - APH(3')	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523	(Vakulenko et al. 2003)
<i>ant(6')-Ia</i>	6'-О-аденилтрансфераза - ANT(6')	ACT GGC TTA ATC AAT TTG GG GCC TTT CCG CCA CCT CAC CG	597	(Clark et al. 1999)
<i>aph(2'')-Id</i>	2'-О-фосфотрансфераза - APH(2'')	GGTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	642	(Kao et al. 2000)
<i>aph(2'')-Ib</i>	2'-О-фосфотрансфераза - APH(2'')	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867	(Vakulenko et al. 2003)
<i>gelE</i>	желатиназа	TATGACAATGCTTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	213	(Vankerckhoven et al. 2004)
<i>hyl</i>	хуалуронидаза	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276	(Vankerckhoven et al. 2004)
<i>asa1</i>	агрегираща субстанция	CACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACACGA	375	(Vankerckhoven et al. 2004)
<i>efaA</i>	антиген на ендокардита	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA CTACTAACACGTCACGAATG	499	(Duprè et al. 2003)
<i>esp</i>	ентерококов повърхностен протеин	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	(Vankerckhoven et al. 2004)
<i>act</i>	<i>E. faecium</i> колаген-свързващ протеин	GGCCAGAAACGTAACCGATA CGCTGGGGAAATCTTGTA	353	(Camargo et al. 2006)
<i>ace</i>	<i>E. faecalis</i> колаген-свързващ протеин	GGAATGACCGAGAACGATGGC GCTTGATGTTGGCCTGCTTCCG	616	(Creti et al. 2004)
<i>cyIA</i>	цитолозин	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	(Vankerckhoven et al. 2004)

### 8.2.2. Мултиплекс PCR за видова идентификация и доказване на гени за резистентност към гликопептиди

Методът включва праймери за диференциация на 7 *van* гени (*vanABC1C2DMN*), обуславящи резистентност към гликопептиди, както и за детекция на гени, кодиращи видовата принадлежност на 8 от най-разпространените видове ентерококи (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. raffinosus* и *E. avium*). За качествен контрол на PCR са използвани 16S rRNA, ATCC® 700221™ *E. faecium*, ATCC® 51299™ *E. faecalis* (*vanB* ген, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ген), ATCC® 49608™ *E. gallinarum* (*vanC1* ген), ATCC® 700668™ *E. casseliflavus* (*vanC2/3* ген).

Приложен е мултиплекс PCR протокол по методиката на Nomura и съавт. (Nomura et al. 2018) с **модифицирана PCR смес** с краен обем 20 µl, съдържаща следните компоненти за една проба:

- 0.4 µM от всеки праймер
- 1X реакционен буфер (Canvax, Spain)
- 200 µM от всяко dNTP (Canvax, Spain)
- 1 U Taq полимераза (Canvax, Spain)
- 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Canvax, Spain)
- ultrapure PCR H<sub>2</sub>O (Canvax, Spain)
- 10 ng изходна ДНК

**Температурният режим бе модифициран** и бе осъществен на qTOWER<sup>3</sup> G touch Real-Time PCR Thermal Cycler (Analytik Jena, Germany) в следните етапи:

- Начална денатурация и активиране на Taq полимеразата – 94°C за 4'
  - Денатурация – 94°C за 30"
  - Хибридизация – 62°C за 35"
  - Екстензия – 68°C за 1'
  - Крайна екстензия – 68°C за 7'
- х 30 цикъла

### 8.2.3. Мултиплекс PCR за детекция на гени, обуславящи резистентност към аминогликозиди и фактори на вирулентност

Методът е използван за детекция на 8 гени, обуславящи резистентност към аминогликозиди (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Id*, *ant(3'')-Ia* и *ant(6')-Ia*) и 7 гени, кодиращи продукцията на фактори на вирулентност (*ace/act*, *asa1*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* и *hyl*). За качествен контрол на PCR при доказване на АМЕ гени е използван ATCC® 51299™ *E. faecalis* (*vanB* ген, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ген).

Приложен е мултиплекс PCR протокол по методиката на Li и съавт. (Li et al. 2015), с **модифицирана PCR смес** с краен обем 20 µl, съдържаща следните компоненти за една проба:

- 0.4 µM от всеки праймер
- 200 µM от всяко dNTP (Canvax, Spain)
- 1 U Taq полимераза (Canvax, Spain)
- 1X реакционен буфер (Canvax, Spain)
- 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Canvax, Spain)
- ultrapure PCR H<sub>2</sub>O (Canvax, Spain)
- 10 ng изходна ДНК

Температурният режим **бе модифициран** и бе осъществен на qTOWER<sup>3</sup> G touch Real-Time PCR Thermal Cycler (Analytik Jena, Germany) в следните етапи:

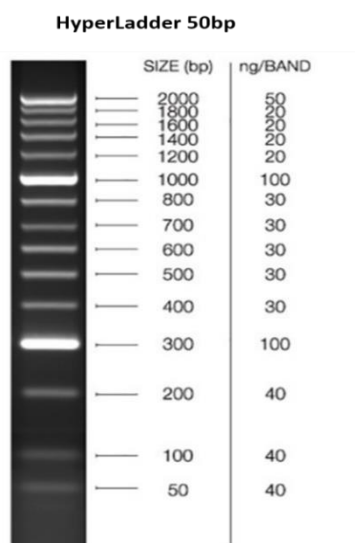
- Начална денатурация и активиране на Taq полимеразата – 94°C за 4'
  - Денатурация – 94°C за 40"
  - Хибридизация – 55°C за 40"
  - Екстензия – 72°C за 45"
  - Крайна екстензия – 72°C за 5'
- } x 35 цикъла

### 8.2.4. Гел-електрофореза за отчитане на резултатите от PCR

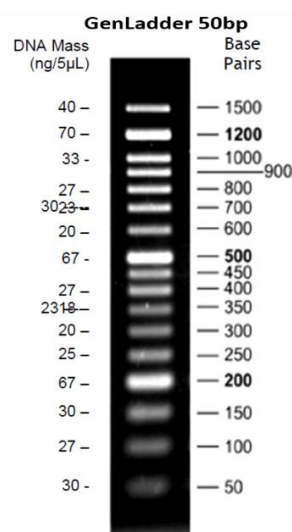
**Методика:** Към амплифицираната PCR смес се добавят 0.4 µl 6X DNA Gel Loading Dye (ThermoFisher Scientific, USA). По 10 µl от всяка маркирана PCR смес се поставят в ямките на предварително приготвен 2% TAE агарозен гел с добавен етидиев бромид. В първата ямка на гела се слага молекулен маркер

HyperLadder 50bp (Bioline, USA) (**Фигура 2**) или GenLadder 50bp (Genaxxon, Germany) (**Фигура 3**).

Електрофорезата бе осъществена в електрофоретична ваничка CRHU15 Midi Horizontal Gel Unit (Scie-Plas, UK) и захранващо устройство (Consort EV245, Belgium) при следните условия: 110 V, 7-11 W, 200-300 mA за 55 мин. Визуализацията и заснемането на PCR продуктите се извърши чрез UV трансилюминатор със система за гел документиране Gerix 1000 (Bioster, Germany).



**Фигура 2.** HyperLadder 50 bp



**Фигура 3.** GenLadder 50 bp

### 8.2.5. Капилярна електрофореза за отчитане на резултатите от PCR

Електрофоретичното разделяне на продуктите от PCR реакцията беше извършено чрез автоматизирана система за капилярна гел електрофореза QiAxcel (Qiagen). Използвана беше касета съставена от 12 капилярки изпълнени с гел (QiAxcel DNA High Resolution Kit).

Получените данни бяха обработени чрез „BioCalculator v3.2” (Qiagen, Germany) софтуер и резултатите се визуализираха под формата на електрофореграма. За определяне размера на ампликоните бяха използвани два маркера – първият за подравняване, т.нар. alignment маркер с размер 15/3000bp (Qiagen, Germany) и втори за определяне на големината, т.нар. size маркер (GeneRuler 50 bp DNA Ladder (TermoFisher Scientific, USA)).

### 8.3. МЕТОДИ НА ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА VRE

#### 8.3.1. Мултилокусен анализ на вариабилен брой от тандемни повтори (Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)

Използвани са пет двойки праймери, групирани в два отделни мултиплексни PCR. В PCR1 са включени следните двойки праймери: 0.25 µM VNTR90, 0.2 µM VNTR89, 0.5 µM VNTR94, 0.5 µM VNTR121 и 0.35 µM VNTR148. За провеждане на мултиплексен PCR2 са използвани праймерните двойки: 0.225 µM VNTR152, 0.35 µM VNTR96, 0.15 µM VNTR93, 0.25 µM VNTR153 и 0.05 µM VNTR9. Общата характеристика на всички посочени праймери е представена в **Таблица 5.**

**Таблица 5.** Обща характеристика на праймерите, използвани за MLVA анализ на *E. faecium*

VNTR локус	Размер на повтор (bp)	Праймер	Последователност	Диапазон на размера на продукта (bp)	Брой алели
VNTR9	121	F	TCGACCAATCTCCACATAGCC	666-911	0-2
		R	TCGCCTGCATTTCCACCTAG		
VNTR89	33-36	F	TTGGAGCCGGAGTACTACTTC	298-475	2-7
		R	CAACAAGCTGCACAAGAAAAAG		
VNTR90	57	F	TTATCAGCGACAATGGTACAGA	331-1048	6-18
		R	CGTGTATCGCTTGTGGTAGAC		
VNTR93	24	F	CTGGTATTCCTTGGTCTCTTG	201-465	2-13
		R	TACCGCCTACAGAAAATCCAG		
VNTR94	12	F	AATCGCKTATATYCGTTTTGC	164-248	2-9
		R	AGCATTTTCCAAGGAAATGCC		
VNTR96	10	F	CAAGCAGGAAATCGAGGCTA	129-148	1-2.5
		R	CCCAGCCTCTTCTTTTTTATAG		
VNTR121	12	F	CTGCACGAACAACTATGGAC	128-140	1-2
		R	CAGCCAAGKATATGAATGTAAACG		
VNTR148	5	F	CCAGAACGATCACCACAAAA	90-95	1-2
		R	AAGAAAAGAGTAACAATCGCT		
VNTR152	6	F	CATCGGCTGGAATATTTTCGTC	106-112	1-2
		R	GCAGCTGAAAGTCTAGTTGTC		
VNTR153	12	F	TTTTACGTCGTTCTGCTCT	56-68	1-2
		R	AACGACGGACCTTGAAGC		

Приложен е мултиплекс PCR протокол по методиката на Stoikov и съавт. (Stoikov et al. 2020), с краен обем на PCR сместа 20  $\mu$ l, съдържаща следните компоненти за една проба:

- 1X PCR буфер
- 24 mM тетраетиламониев хлорид (TEA-CL)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.045 U/ $\mu$ L perpetual Taq ДНК полимераза
- 10 ng изходна ДНК

Температурният режим за амплификацията на локусите бе осъществен на qTOWER<sup>3</sup> G touch Real-Time PCR Thermal Cycler (Analytik Jena, Germany) в следните етапи:

- Начална денатурация на ДНК – 95°C за 4'
  - Денатурация – 93°C за 20"
  - Хибридизация – 59°C за 40"
  - Екстензия – 69°C за 90"
  - Крайна екстензия – 70°C за 15'
- } x 35 цикъла

Визуализацията на амплификационните продукти и определянето на техния размер се осъществи с капилярна гел електрофореза. Резултатите са анализирани с помощта на дигиталната платформа PHYLOViZ 2.0.

### 8.3.2. Пулсова гел електрофореза (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

Използваният метод е модификация на Murray и съавт. (Murray et al. 1990).

#### ➤ Подготовка за макро рестрикционен PFGE анализ на изолати *E. faecium*, *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*

1. От 24-часова бактериална култура, посята на 5% КА агар, се приготвя суспензия в ВНИ бульон с обем 5 ml и се инкубира за 24 часа на 37°C.

2. 1.5 ml от бульона се центрофугират за 5', след което супертанантата се отнема. Стъпката се повтаря.
3. Утаените бактерии се суспендират в 0.5 ml PIV буфер (1 M NaCl, 10 mM Tris hydrochloride [pH 7.6]) и се центрофугират за 5'.
4. Супернатантата се отнема и се добавя 150 µl PIV буфер.
5. Към суспензията се добавя 150 ml 2% агароза с ниска точка на топене InCert (Lonza, Switzerland) във вода с температура от 40°C до 50°C.
6. Получената смес от бактериална суспензия и агароза се нанася на специални форми (Bio-Rad Laboratories, Inc, UK) и се инкубира за 20' на 4°C. При втвърдяването се образуват т.нар. агарозни дискове. За един диск е нужна смес с обем 20 µl.
7. 1-4 агарозни диска се слагат в 1 ml лизиращ разтвор, който съдържа ЕС буфер (6 mM Tris hydrochloride [pH 7.6], 1 M NaCl, 100 mM EDTA [pH 7.5], 0.5% Brij 58, 0.2% deoxycholate, 0.5% sodium lauroyl sarcosine), 5 µl РНК-аза [свободна от ДНК-аза] (10 mg/ml) и 20µl лизозим (50 mg/ml). Инкубират се за 4 часа на 37°C.
8. Лизиращият разтвор се отнема и се замества с 1 ml ES буфер (0.5 M EDTA [pH 9 – 9.5] и 1% sodium lauroyl sarcosine) с добавена 50 µl протеиназа К (20 mg/ml). Инкубира се за 18 часа на 50°C в шейкър KS 4000 i control (IKA Industry, Germany).
9. Лизиращият разтвор се отнема и дисковете се промиват с 1 ml ТЕ буфер (10 mM Tris hydrochloride [pH 7.5], 0.1 mM EDTA) за 1 час на 20°C. Стъпката се повтаря 4 пъти.
10. Агарозните дискове се съхраняват в ТЕ буфер при 4°C.

➤ **Рестрикция на агарозните блокчета**

11. Пре-рестрикция: В епруветка с обем 2 ml се поставя един агарозен диск и 150 µl рестрикционна смес, която съдържа: 135 µl дейонизирана H<sub>2</sub>O и 15 µl 10x SmaI рестрикционен буфер (ThermoFisher Scientific, USA). Дисковете се инкубират за 30' на 30°C в тази смес. Пре-рестрикционната смес се отстранява и се пристъпва към рестрикция.
12. Рестрикция: приготвя се 50 µl рестрикционната смес, която съдържа: 1 µl SmaI (10 U/µl, ThermoFisher Scientific), 5µl 10x SmaI рестрикционен буфер (ThermoFisher Scientific) и 44 µl дейонизирана H<sub>2</sub>O. Дисковете се инкубират за 18 часа на 30°C в тази смес.

13. Рестрикционната смес се отстранява, след което се добавят 150 µl TBE буфер (1 M Tris-borate 0.5 EDTA [pH 7.5]) и дисковете са готови да бъдат натоварени на стартовете на гел.

➤ **Подготовка и натоварване на гела**

14. Приготвя се 1% гел, която съдържа 100 ml 0.5 x TBE буфер и 1 g SeaKem Gold агароза (Lonza).

15. Дисковете се поставят в ямките на гела и се добавя 0.5 x TBE буфер.

Пулсовата гел електрофореза бе осъществена на CHEF DRII (Bio-Rad) при следните параметри: *Voltage density: 6 V/cm, Included angle: 120°, Initial switch time: 1 sec, Final switch time: 25 sec, Runtime: 23 h.*

➤ **Оцветяване на гела и визуализация на ДНК фрагментите**

Гелът бе оцветен в 500 ml 0.5 x TBE буфер с 50 µl етидиев бромид (10mg/ml) за 30' и след това бе промит в 500 ml 0.5 x TBE буфер за 30'. Резултатите бяха заснети чрез фотодокументационна система Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories).

## **9. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ**

### **9.1. GRAPHPAD PRISM VERSION 7.00**

Методът е използван за статистически анализ на чувствителност (sensitivity), специфичност (specificity), положителна прогнозна стойност (positive predictive value, PPV) и отрицателна прогнозна стойност (negative predictive value, NPV) на използваните среди за първично изолиране на интестинални VRE.

- Чувствителност – броят на истинските положителни резултати, разделен на сумата от истински положителни + фалшиво отрицателни резултати, изразен като процент.
- Специфичност – броят на фалшиво положителните резултати, разделен на сумата от фалшиво положителни + истински отрицателни, изразен като процент.
- Положителна прогнозна стойност – вероятността на позитивиралите се за VRE селективни хранителни среди да бъдат истински положителни.

- Отрицателна прогнозна стойност – вероятността на негативните за VRE селективни хранителни среди да бъдат истински отрицателни.
- Истински положителни (true positive, TP) – изолат с типично оцветени колонии, растящ директно върху хромогенна среда или на субкултура от BAEV бульон, който е потвърден като VRE.
- Фалшиво положителни (false positive, FP) – изолат с типично оцветени колонии на съответната среда, който не е идентифициран като VRE.
- Истински отрицателни (true negative, TN) – липса на растеж или растеж на колонии без типично оцветяване и морфология за съответната среда.
- Фалшиво отрицателни (false negative, FN) – отсъствие на изолат върху определена агарова среда, който е идентифициран като VRE на друга (една или повече) от използваните среди.
- Доверителен интервал (confidence interval, CI) 95%.

## 9.2. SPSS SOFTWARE VERSION 7.00

Статистическият анализ беше извършен чрез платформата IBM SPSS Statistics 27 и отразява връзката между интестиналната колонизация с VRE и демографските и клинични характеристики на изследваните пациенти. За нуждите на анализа всички пациенти с положителни за VRE фекални проби и без инфекции причинени от VRE или други микроорганизми са причислени към група на случаите. Контролната група включва пациенти без открита VRE колонизация/инфекции.

За да се установи дали съществува свързаност между носителството на VRE и някои основни епидемиологични и клинични характеристики, бяха използвани следните непараметрични статистически методи за номинални данни: хи-квадрат  $\chi^2$  тест за съгласуваност, хи-квадрат  $\chi^2$  тест за независимост, коефициентите фи (phi) и V на Крамер (Cramer's V).

Хи-квадрат  $\chi^2$  тестът за съгласуваност се приложи за сравнение на пропорцията на наблюденията от една извадка с теоретичните (хипотетични) стойности или с пропорциите, получени от предишни проучвания. Чрез  $\chi^2$  теста за независимост се определи дали наблюдаваната честота при изследваните групи се различава статистически от очакваната честота. Тъй като при всеки от

проведените  $\chi^2$  анализи бяха включени две променливи, се приложи методът на кръстосаните таблици (crosstabulation, contingency tables). С  $\chi^2$  теста за независимост беше изследвано дали съществува статистически значима връзка между две променливи, но този тест не беше подходящ за определяне силата на евентуална зависимост и наличието на причинно-следствена връзка. Поради тази причина се използваха коефициентите  $\phi$  и  $V$  на Крамер. Коефициентът  $\phi$  е в диапазона 0-1: равен е на 0, когато двете променливи са независими, и е равен на 1, когато двете променливи са напълно свързани помежду си. Когато изследваните променливи имаха повече от две нива с  $\phi > 1$ , за определяне силата на връзката между две променливи се използваше коефициентът  $V$  на Крамер. За да се проведе хи-квадрат  $\chi^2$  теста за независимост и за да бъдат определени стойностите на коефициентите  $\phi$  и  $V$  на Крамер, бяха изпълнени следните предпоставки: 1) независимост на извадката; 2) обработка на номинални данни; 3) при наличие на очаквана честота по-малка от 5 в някои клетки, бяха използвани  $p$  стойностите от точния тест на Фишер (Fisher's exact test).

За изследване причинно-следствената взаимовръзка между някои основни епидемиологични показатели и клинични характеристики на изследваните пациенти (независими променливи) и интестинална колонизация с VRE (зависима променлива) се използва бинарна логистична регресия. Този метод позволява да се прогнозира стойностите на зависимата променлива  $Y$  (колонизация), която приема две категории – присъствие или отсъствие на колонизация. Целта на бинарната логистична регресия е да се прогнозира вероятността на принадлежност към една от двете възможни категории на  $Y$ , които се кодират: 0 – отсъствие на колонизация; 1 – присъствие на колонизация. За изпълнение на логистична регресия бяха изпълнени следните предпоставки: 1) независимост на извадката; 2) дихотомна зависима променлива; 3) категориите на зависимата променлива са взаимно изключващи се. За интерпретация на статистическите резултати бяха използвани изходни таблици от статистическия анализ, обединени в три главни части. Част първа, дескриптивна статистика, включва две таблици: 1) Case Processing Summary (Обобщение на обработените наблюдения) – дава информация за размера на извадката и 2) Dependent Variable Encoding (Кодиране на зависимата променлива) – показва начина, по който статистическият пакет е използвал

кодовете на зависимата променлива. В част втора – Block 0 – се отчетоха резултатите от анализа, без да са използвани независимите променливи в регресионното уравнение. В част трета бяха анализирани резултатите от статистическото проучване, когато са включени всички независими променливи. За определяне дали дадена независима променлива има ( $p < 0.05$ ) или няма ( $p > 0.05$ ) статистически значимо участие в регресионното уравнение бяха използвани стойностите на статистиката на Wald (Валд), представени в колона Sig. (значимост) на таблицата Variables in the Equation (Променливи в уравнението). От таблицата Variables in the Equation беше взет също така и коефициентът на логистичната регресия, който служи за прогнозиране на стойностите на зависимата променлива.

## V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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

Във връзка с оценка на възможностите за първично изолиране и идентифициране на интестинални VRE са проучени три хромогенни агарови среди – Brilliance VRE, chromID VRE и HiCrome VRE Modified и BEAV бульон. Проучването се осъществи чрез култивиране на 159 ректални секрета, взети от 97 пациенти на хемодиализа – 62<sup>-ма</sup> с две проби и 35<sup>-ма</sup> с една проба. Всяка проба беше посята на четирите среди с последваща инкубация на 37°C за 24-48 часа (Виж Материали и методи 4.2.). Култивираните Грам-положителни, каталаза-отрицателни коки бяха идентифицирани посредством базови фенотипни тестове, мануални и автоматизирани системи, а при VR ентерококови изолати бяха изследвани и гени за видова принадлежност.

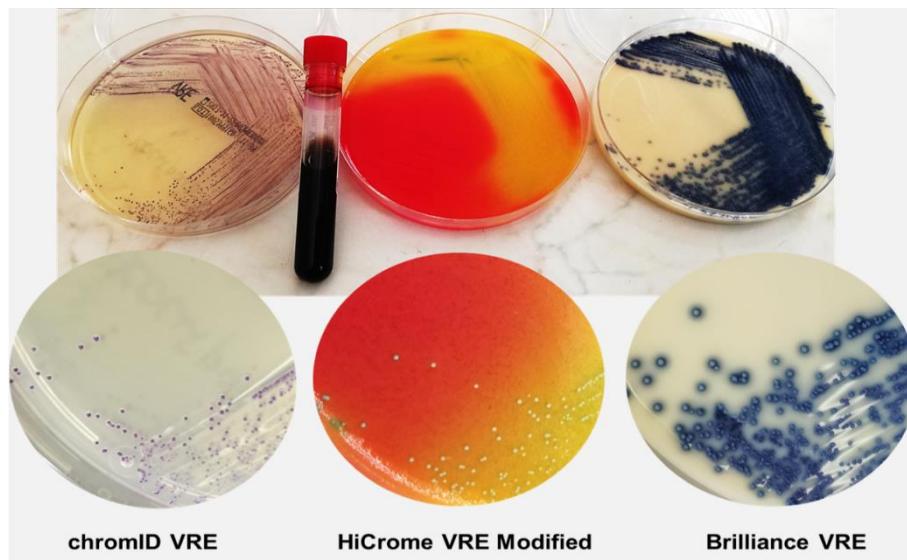
#### 1.1. РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА ЧЕТИРИ СЕЛЕКТИВНИ ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ

При посевка 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, непринадлежащи към род *Enterococcus*, 34 Грам-положителни пръчки и 126 Грам-отрицателни чревни бактерии (**Таблица 6**). 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, катализа-отрицателни коки и 34 Грам-положителни пръчки са изолирани само от BEAV бульона.

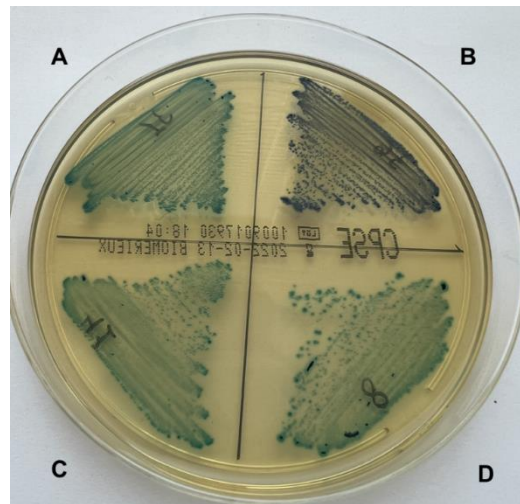
Отчетлив растеж на шестте VR *E. faecium* с лилав цвят на колониите е установен върху Brilliance VRE и chromID VRE след 24 часа инкубиране (**Фигура 4**). На 48-ия час от инкубацията не са отчетени нови VRE на тези две среди. На тях е култивиран 1 VS *E. faecium* с лилав цвят на колониите, характерен 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-производител тези два щамове би трябвало да бъдат презумптивно идентифицирани като VR *E. faecalis*.



**Фигура 4.** Колонии на VR *E. faecium* №17/ХД върху три хромогенни среди и позитивен BEAV бульон.

Култивирането на VRE от HiCrome VRE Modified беше компрометирано от растежа на Грам-отрицателни чревни бактерии, наблюдавани в 96 (60.4%) от пробите, както и от вариации в цвета на колониите на ентерококите. Върху тази среда шестте VR *E. faecium* растяха с белезникав цвят на колониите след 24 часа инкубация и чак след 48 часа четири от тях демонстрираха зелен цвят, напълно съответстващ на описанията на фирмата-производител. Освен това, на 48-ия час от инкубацията зелени колонии показаха 1 *E. gallinarum* и 1 *E. casseliflavus*, а белезникави – 2 VS *E. faecium* (1 неповтарящ се и 1 повтарящ се изолат) и 1 VS *E. faecalis*.

Всички BEAV бульони се позитивираха след 24 часа инкубация. При субкултивиране на положителните BAEV 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 (**Фигура 5**).



**Фигура 5.** Културелни характеристики на 4 VRE върху хромогенна среда chromID CPS: (A) *vanA E. gallinarum*; (B) *vanA E. faecium*; (C) *vanC2 E. casseliflavus*; (D) *vanC1 E. gallinarum*.

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 7**). 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.

## 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. Видовата принадлежност на тези изолати, определена с автоматизираната система Vitek 2 Compact, е представена на **Таблица 8**.

**Таблица 8.** Видово разпределение на 11 *Enterococcus*-like микроорганизми идентифицирани с Vitek 2 Compact

№	Изолат №/ Отделение	Бактериален вид	Биономер	Вероятност
1	16/ХД	<i>Lactococcus garvieae</i>	101010321753461	95%
2	19/ХД	<i>Lactococcus garvieae</i>	111012321773661	99%
3	38/ХД	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	010000140111071	99%
4	62/ХД	<i>Streptococcus gallolyticus</i> <i>ssp pasteurianus</i>	161055364713731	96%
5	77/ХД	<i>Streptococcus mutans</i>	140010765773631	86%
6	85/ХД	<i>Streptococcus sanguinis</i>	001010365731631	89%
7	73/ХД	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>ssp mesenteroides</i>	570001064733771	90%
8	98/ХД	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>ssp cremoris</i>	020001000000121	90%
9	20/ХД	<i>Leuconostoc</i> <i>pseudomesenteroides</i>	400000000300111	95%
10	57/ХД	<i>Leuconostoc</i> <i>pseudomesenteroides</i>	020101140311031	95%
11	82/ХД	<i>Leuconostoc</i> <i>pseudomesenteroides</i>	400000020331111	95%

**Таблица 6.** 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 7.** 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.

Резултатите от фенотипните тестове за презумптивно определяне на видовата принадлежност на всички неповтарящи се интестинални изолати от род *Enterococcus* и стойностите на МПК за vancomycin и teicoplanin са представени на **Таблица 9**. Видно е, 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 щамове. 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.

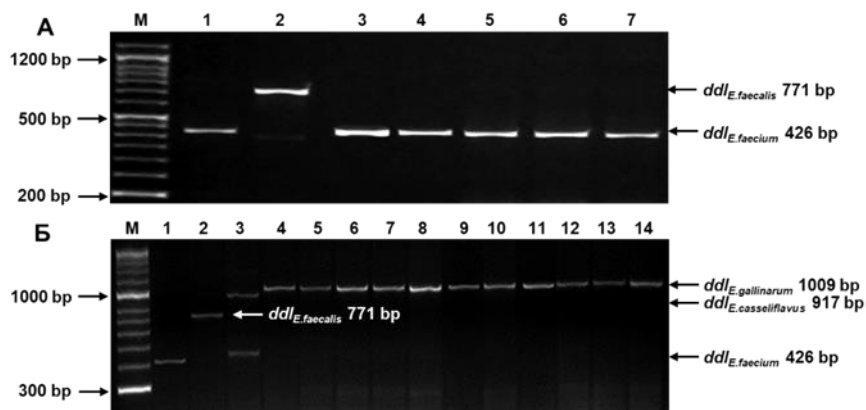
### **1.3. РЕЗУЛТАТИ ОТ ИДЕНТИФИКАЦИЯТА С МАНУАЛНИ И АВТОМАТИЗИРАНИ СИСТЕМИ, И ДЕТЕКЦИЯТА НА ГЕНИ ЗА ВИДОВА ПРИНАДЛЕЖНОСТ**

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. Резултатите от идентификацията с различните методи са представени на **Таблица 10**.

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 ентерококови 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*.

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 (**Фигура 6**).



**Фигура 6. (А)** Позитивиране на *ddl* гени при *E. faecium* изолати чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № ATCC 700221 *E. faecium*; Линия 2 - ATCC 51299 *E. faecalis*; Линия 3 - № 11 ХД; Линия 4 - № 16 ХД; Линия 5 - № 36 ХД; Линия 6 - № 47 ХД; Линия 7 - № 75 ХД.

**(Б)** Позитивиране на *ddl* гени при *E. gallinarum* изолати чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Bioline*); Линия 1 - ATCC 700221 *E. faecium*; Линия 2 - ATCC 51299 *E. faecalis*; Линия 3 - ATCC 700668 *E. casseliflavus*; Линия 4 - ATCC 49608 *E. gallinarum*; Линия 5 - № 1 ХД; Линия 6 - № 5 ХД; Линия 7 - № 8 ХД; Линия 8 - № 17 ХД; Линия 9 - № 31 ХД; Линия 10 - № 45 ХД; Линия 11 - № 59 ХД; Линия 12 - № 60 ХД; Линия 13 - № 69 ХД; Линия 14 - № 72 ХД.

**Таблица 9.** Резултати от фенотипни тестове за презумптивна видова принадлежност и стойности на МПК за vancomycin и teicoplanin на 34 интестинални ентерококови изолата

№	Изолат №/ Отделение	Вид	MAN	SBL	ARG	SOR	ARA	RAF	MOT	PIG	MGP	VAN	TEC
1	11/ХД	<i>E. faecium</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-	≥256	6
2	16/ХД	<i>E. faecium</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	≥256	6
3	36/ХД	<i>E. faecium</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	≥256	6
4	47/ХД	<i>E. faecium</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-	≥256	6
5	75/ХД	<i>E. faecium</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-	≥256	6
6	31/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	≥256	6
7	1/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	≥256	≥256
8	5/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	4	0.50
9	8/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	8	0.50
10	17/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	6	0.50
11	45/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	6	0.50
12	59/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	12	0.50
13	60/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	4	0.50
14	69/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	6	0.50
15	72/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	8	0.50
16	76/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	6	0.75
17	81/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	4	0.50
18	87/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	12	0.50
19	91/ХД	<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	+	8	0.50
20	6/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	6	0.75
21	33/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	4	0.50
22	40/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	6	0.50
23	41/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	4	0.50
24	70/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	4	0.50
25	84/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	4	0.50
26	93/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	6	0.50
27	96/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	4	0.50
28	6'/ХД	<i>E. faecium</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	0.75	0.38
29	31'/ХД	<i>E. faecium</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	0.75	0.50
30	40'/ХД	<i>E. faecium</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	1	0.50
31	57'/ХД	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	0.75	0.50
32	95/ХД	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	1	0.38
33	96/ХД	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	0.75	0.75
34	95'/ХД	<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	0.75	0.50

**Легенда** PYR: L-пирилодонил ариламидаза; LAP: левцин аминокпептидаз; MAN: манитол; SBL: сорбитол; ARG: L-аргинин; SOR: сорбоза; ARA: арабиноза; RAF: рафиноза; MOT: подвижност; PIG: пигмент; MGP: метил-α-D-глюкопиранозид; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin.

**Таблица 10.** Видова идентификация на 27 VRE чрез автоматизирани системи и PCR метод

№	№ пациент/ Отделение	RapID STR System	Вероятност (%)	VITEK 2 COMPACT	Биономер	Вероятност (%)	VITEK MS	PCR ( <i>ddl</i> gene)
1	11/ХД	<i>E. faecium</i>	> 99.9	<i>E. faecium</i>	132003265771771	92	<i>E. faecium</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. faecium</i></sub>
2	16/ХД	<i>E. faecium</i>	> 99.9	<i>E. faecium</i>	010047065771771	90	<i>E. faecium</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. faecium</i></sub>
3	36/ХД	<i>E. faecium</i>	> 99.9	<i>E. faecium</i>	010047065771771	90	<i>E. faecium</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. faecium</i></sub>
4	47/ХД	<i>E. faecium</i>	> 99.9	<i>E. faecium</i>	010003265771771	97	<i>E. faecium</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. faecium</i></sub>
5	75/ХД	<i>E. faecium</i>	> 99.9	<i>E. faecium</i>	010047025771771	90	<i>E. faecium</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. faecium</i></sub>
6	31/ХД	<i>E. gallinarum</i>	> 99.9	<i>E. casseliflavus/ E. gallinarum</i>	036067365771771	Low Discrimination	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
7	1/ХД	<b><i>E. casseliflavus</i></b>	> 99.9	<i>E. gallinarum</i>	526002265773771	95	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
8	5/ХД	<i>E. gallinarum</i>	> 99.9	<i>E. gallinarum</i>	536002265773771	99	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
9	8/ХД	<b><i>E. casseliflavus</i></b>	> 99.9	<i>E. casseliflavus/ E. gallinarum</i>	526003265773771	Low Discrimination	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
10	17/ХД	<i>E. gallinarum</i>	> 99.9	<i>E. gallinarum</i>	516002265773771	99	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
11	45/ХД	<i>E. gallinarum</i>	> 99.9	<i>E. gallinarum</i>	536013265773771	99	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
12	59/ХД	<i>E. gallinarum</i>	> 99.9	<i>E. gallinarum</i>	516002265733671	99	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
13	60/ХД	<i>E. gallinarum</i>	> 99.9	<i>E. gallinarum</i>	536012265773671	98	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
14	69/ХД	<b><i>E. casseliflavus</i></b>	> 99.9	<i>E. casseliflavus/ E. gallinarum</i>	526003265773771	Low Discrimination	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
15	72/ХД	<i>E. gallinarum</i>	= 98.59	<i>E. gallinarum</i>	536013265773771	99	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
16	76/ХД	<i>E. gallinarum</i>	> 99.9	<i>E. gallinarum</i>	536003265773771	99	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
17	81/ХД	<i>E. gallinarum</i>	> 99.9	<i>E. gallinarum</i>	534002265773671	97	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
18	87/ХД	<b><i>E. casseliflavus</i></b>	> 99.9	<i>E. gallinarum</i>	516003265773771	96	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
19	91/ХД	<i>E. gallinarum</i>	= 89.45	<i>E. gallinarum</i>	536002265773771	99	<i>E. gallinarum</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. gallinarum</i></sub>
20	6/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	> 99.9	<i>E. casseliflavus/ E. gallinarum</i>	534213265773771	Low Discrimination	<i>E. casseliflavus</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. casseliflavus</i></sub>
21	33/ХД	<b><i>E. gallinarum</i></b>	> 99.9	<i>E. casseliflavus/ E. gallinarum</i>	534012264773671	Low Discrimination	<i>E. casseliflavus</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. casseliflavus</i></sub>
22	40/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	= 99.51	<i>E. casseliflavus</i>	524003264773731	95	<i>E. casseliflavus</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. casseliflavus</i></sub>
23	41/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	> 99.9	<i>E. casseliflavus/ E. gallinarum</i>	534003265773771	Low Discrimination	<i>E. casseliflavus</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. casseliflavus</i></sub>
24	70/ХД	<b><i>E. gallinarum</i></b>	= 98.59	<i>E. casseliflavus/ E. gallinarum</i>	534203365773771	Low Discrimination	<i>E. casseliflavus</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. casseliflavus</i></sub>
25	84/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	> 99.9	<i>E. casseliflavus</i>	534003665773771	97	<i>E. casseliflavus</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. casseliflavus</i></sub>
26	93/ХД	<b><i>E. gallinarum</i></b>	= 98.59	<i>E. casseliflavus/ E. gallinarum</i>	534003265763771	Low Discrimination	<i>E. casseliflavus</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. casseliflavus</i></sub>
27	96/ХД	<i>E. casseliflavus</i>	> 99.9	<i>E. casseliflavus</i>	534003665773771	97	<i>E. casseliflavus</i>	<i>ddl</i> <sub><i>E. casseliflavus</i></sub>

#### **1.4. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТНОСНО ВЪЗМОЖНОСТИТЕ НА СЕЛЕКТИВНИ ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ ЗА ПЪРВИЧНО ИЗОЛИРАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE**

Надеждното откриване на колонизирани с VRE пациенти изисква точни скринингови тестове, които да се тълкуват бързо и лесно. Към момента са познати два основни метода за откриване на VRE във фекални проби: културелно-базиран метод и метод за амплификация на нуклеинови киселини (nucleic acid amplification testing, NAAT) (Kallstrom et al. 2010; Faron et al. 2016). Молекулярният скрининг за VRE е по-бърз и точен метод, но е доста по-сложен и скъп от културелния. Поради тази причина последният остава метод на избор в рутинната микробиологична лабораторна дейност. Понастоящем са разработени различни хромогенни среди за култивиране на VRE (Perry 2017), оценени като надежден подход за изолиране и идентифициране на VRE от ректални секрети или фекални проби (Cuzon et al. 2008; Asir et al. 2009; Anderson et al. 2013).

В много съвременни проучвания се сравняват възможностите на различни хромогенни среди с BEAV агара за откриване на интестинални VRE. От друга страна публикациите, които оценяват повече от един хромогенен агар, както и чувствителността и специфичността на различни хромогенни среди и BEAV бульона, са ограничени. Suwantararat и съавт. (Suwantararat 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 от нас чувствителност от 85.7% и специфичност от 96.7% до 98.7% за трите изпитани хромогенни среди.

При изследване на 87 пациенти за интестинално носителство на VRE с Brilliance VRE и BEAV агар. Ongut и съавт. (Ongut et al. 2013) разкриват, че на 24<sup>-ия</sup> час от инкубацията чувствителността и специфичността на Brilliance VRE са съответно 95% и 87.1%. Проучване на Ledeboger и съавт. (Ledeboger et al. 2007a) с chromID VRE и BEAV агар показва, че на 24<sup>-ия</sup> час от инкубацията chromID VRE е с чувствителност 96.4% и специфичност 96.9%. Цитираните данни напълно корелират с установените от нас резултати за чувствителността и специфичността на Brilliance VRE и chromID VRE. Важно е да отбележим, че в настоящето проучване всички VRE изолати растяха на двете хромогенни среди

още на 24<sup>-ия</sup> час от инкубацията. Подобни данни се срещат и в други публикации (Lee et al. 2010; Seo et al. 2011). Според Grabsch и съавт. (Grabsch et al. 2008), откриването на VRE още на 24<sup>-ия</sup> час позволява ранното доказване на интестинална колонизация с тези микроорганизми, улеснява прилагането на стратегии за контрол на инфекциите и намалява риска за разпространение на VRE сред неколонизирани пациенти.

Всички доказани от нас VR *E. faecium* изолати растяха с ясен лилав цвят на колониите върху Brilliance VRE и chromID VRE, но освен това върху тези среди наблюдавахме и VSE с подобна морфология на колониите. Например, отчетеният на двете хромогенни среди VS *E. faecium* показва същия цвят на колониите както VR *E. faecium*. Освен това, изолираният от chromID VRE VS *E. faecalis* и култивираният от Brilliance VRE VS *E. hirae* демонстрираха цвят на колониите, типичен за VR *E. faecalis*.

Възможността за растеж на VSE върху chromID 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. В изследване на Soares и съавт. (Soares et al. 2017) е установено, че при посевка на 50 VSE (43 *E. faecalis* и 7 *E. faecium*) върху chromID VRE, 35 от тях (33 *E. faecalis* и 2 *E. faecium*) са показали морфология на колониите, характерна за съответния VRE вид. Доказаната специфичност на средата е едва 30%, поради което авторите препоръчват допълнителна VRE идентификация, за да се избегне грешна интерпретация на резултатите. Друго проучване също свидетелства за растеж на VSE върху chromID VRE – от общо 610 (тествани) култивирани фекални проби са изолирани 48 VSE (44 *E. faecalis* и 4 *E. faecium*) (Grabsch et al. 2008). Това налага необходимостта от потвърдителни фенотипни или молекулярни тестове за идентификация и определяне на чувствителността към vancomycin при ентерококите, изолирани от хромогенни агарови среди.

Според нашата библиографска справка липсват публикации, оценяващи способността на HiCrome VRE Modified за изолиране на VRE. Vijaya и съавт. (Vijaya et al. 2014) проучват възможностите на сходна хромогенна среда – HiCrome VRE (Himedia, India), приложима за откриване само на VR *E. faecalis*. Авторите използват предварително идентифицирани ентерококови изолати и

съобщават за 100% чувствителност и 99% специфичност на този агар. Несъответствието в изчислената чувствителност (85.7%) и специфичност (96.7%) на HiCrome VRE Modified в нашето проучване, и средата HiCrome VRE, използвана от Vijaya и съавт. (Vijaya et al. 2014) вероятно се дължи на факта, че двете тествани среди са различни. Освен това трябва да се вземе предвид, че в настоящата работа са посявани клинични проби, а не чисти култури от ентерококови изолати.

Въпреки наблюдаваната висока чувствителност на HiCrome VRE Modified, бяха установени няколко недостатъка на средата, свързани с растеж на Грам-отрицателни бактерии, вариации в цвета на колонииите на VR *E. faecium* и наличие на VSE или ентерококи с VanC фенотип. Свърхрастежът на Грам-отрицателни бактерии в повече от половината изследвани проби изискваше субкултивиране на съмнителните колонии. Освен това, вариациите в цвета на колонииите при някои ентерококови изолати наложи необходимостта от допълнителни тестове за идентификация (оцветяване по Грам, тест за каталаза, PYR/LAP тест и др.) и определяне на чувствителността към гликопептиди. Поради тези причини времето за изолиране и идентифициране на VRE от HiCrome VRE Modified беше по-дълго от другите две тествани хромогенни среди и подобно на времето, необходимо за изолиране и идентифициране на VRE от BEAV бульона. Също така, изпълнението на допълнителни потвърдителни тестове увеличи обема на работа за доказване на VRE чрез HiCrome VRE Modified, в сравнение с Brilliance VRE и chromID VRE.

Възможностите на vancomycin обогатения бульон за откриване на VRE са проучени преди въвеждането в микробиологичната практика на хромогенните среди (Landman et al. 1996; Ieven et al. 1999; Taylor et al. 1999; Gambarotto et al. 2000; Brown 2003; Novicki et al. 2004). Според различни публикации той е значително по-чувствителен за изолиране на VRE от директния агаров културелен метод (Landman et al. 1996; Ieven et al. 1999; Novicki et al. 2004; Suwantararat et al. 2014). Високата чувствителност (100%) и специфичност (81.6%) на използвания в настоящото изследване BEAV бульон е сравнима с данните на Suwantararat и съавт. (Suwantararat et al. 2014), показващи 98% чувствителност и 100% специфичност на BEAV бульона.

В настоящият труд BEAV бульона е използван не само като селективна, но и като обогатяваща среда за тестваните проби. Това трябва да се вземе предвид

при сравняване и оценка на чувствителността на хромогенните среди за откриване на VRE. Резултатите показват, че от BEAV бульона са изолирани повече VR *E. faecium*, отколкото от всяка хромогенна среда, което обяснява високата чувствителност на средата. Високият брой на фалшиво-положителните изолати (28) е причина за отчетената най-ниска специфичност на тази селективна среда. Специфичността на BEAV бульона вероятно ще се повиши при по-висока концентрация на vancomycin (напр. 8 µg/ml), но това би довело да намаление на чувствителността на средата, особено що се отнася до изолатите с VanC фенотип. Jo и съавт. (Jo et al. 2015) описват значителна разлика в чувствителността на Enterococcosel бульон (EB), съдържащ 8 µg/ml vancomycin на 24-ия и на 48-ия час от инкубацията – съответно 79.2% и 91.7%. В настоящето проучване обаче всички BEAV бульони позитивираха на 24-я час от инкубацията и показаха 100% чувствителност.

При култивиране на ректалните проби бяха доказани общо 45 неповтарящи се изолата Грам-положителни, каталаза-отрицателни коки. От тях 27 VRE, 7 VSE и 11 други видове. Brown и Walpole (Brown and Walpole 2003) съобщават за 145 VRE, 36 VSE и повече от 200 Грам-положителни *Enterococcus*-like микроорганизми, изолирани при фекален скрининг за VRE. В проучване на Gordts и съавт. (Gordts et al. 1995) от общо 135 *Enterococcus*-like микроорганизми 113 са идентифицирани като *Leuconostoc* spp. или vancomycin и teicoplanin чувствителни ентерококи.

В настоящето проучване общо 36 Грам-положителни, каталаза-отрицателни коки позитивираха класическите фенотипни тестове за род *Enterococcus*. Поради голямата степен на сходство в морфологията и биохимичните свойства между родовете *Enterococcus* и *Lactococcus* (Christensen and Ruoffa 2015), използваните презумптивни тестове за идентификация не успяха да разграничат двата *L. garvieae* от ентерококовите изолати. Определянето на груповата и видова принадлежност на изолираните ентерококи се базираше на следните биохимични характеристики: ферментация на MGP, хидролиза на аргинин, производство на киселина от арабиноза, манитол, сорбоза, захароза и рафиноза, подвижност и продукция на пигмент. Резултатите от посочените тестове отнесоха 33 ентерококови изолата към 2<sup>pa</sup> група и позволиха да се определи техния вид: *E. faecalis* – 3, *E. faecium* – 8, *E. gallinarum* – 14 и *E. casseliflavus* – 8. Данните от автоматизираните системи за

идентификация и генетичните методи потвърдиха видова принадлежност на изолатите. Затруднение в идентифицирането имаше при единствения изолат *E. hirae*, отнесен към 3<sup>-та</sup> група. Най-вероятно това се дължи на недостатъчния брой биохимични тестове, използвани в нашето проучване.

Възможностите на RapID STR за идентификация на *Enterococcus* spp. са описани от редица автори (Appelbaum et al. 1986; You and Facklam 1986; Jensen et al. 1999). Appelbaum и съавт. (Appelbaum et al. 1986) използват системата 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. You и Facklam (You and Facklam 1986) също докладват за висок процент (98%) на точно идентифицирани ентерококови видове с RapID STR. В сравнение с данните тези проучвания, нашите резултати показват, че само 74.1% от тестваните VRE са идентифицирани правилно с тази система. Интересен е фактът, че изолатите с погрешно видово определяне принадлежат към групата на vanC ентерококите.

Използваната от нас автоматизирана система VITEK 2 Compact идентифицира правилно всички *E. faecium* изолати, но около 20% от vanC ентерококите бяха определени като *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*. Всички vanC изолати бяха подвижни, а продукцията на жълт пигмент помогна да се разграничат *E. casseliflavus* от *E. gallinarum*. Ramotar и съавт. (Ramotar et al. 2000) описват недостатъците на системата VITEK при идентифицирането на vanC ентерококите. Авторите 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. Освен това, от 26 vanC2 изолата, нито един не е идентифициран до ниво вид. 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). В допълнение, молекулярно-генетичният анализ за детекция на видово-специфични *ddl* гени е също препоръчителен метод за идентифициране на основните ентерококови видове (Nomura et al. 2018).

В настоящето проучване е установено, че трите хромогенни среди за откриване на VRE в ректални секрети са с еднаква чувствителност – 85.7%.

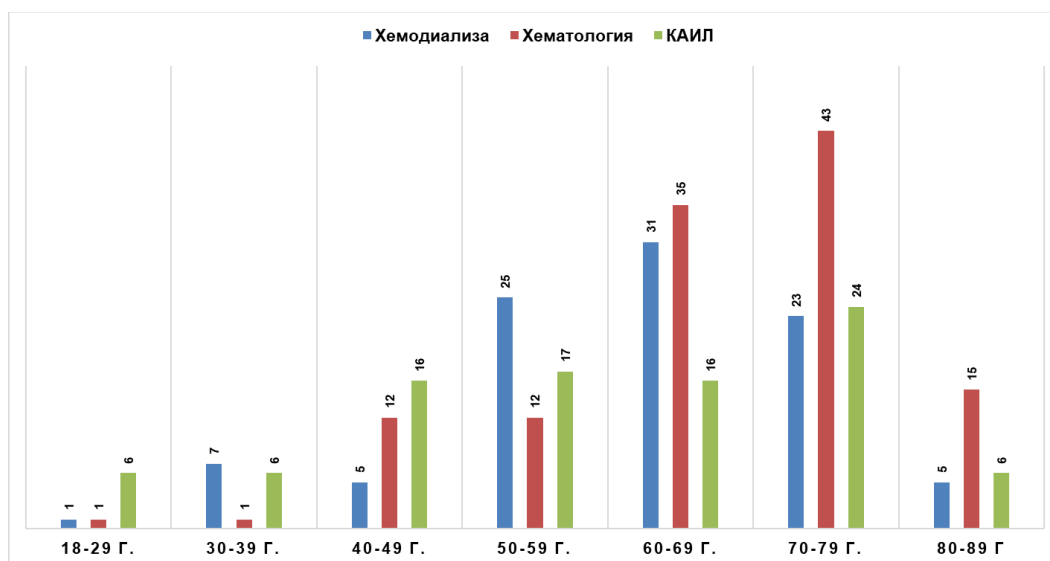
Brilliance VRE и chromID VRE демонстрират идентична специфичност – 98.7%, а специфичността на HiCrome VRE Modified е с минимални различия – 96.7%. В сравнение с хромогенните среди BEAV бульонът е с най-висока чувствителност – 100% и с най-ниска специфичност – 81.6%, като времето за позитивиране е 24 часа.

Получените резултати са използвани като основа за разработване на алгоритъм за изолиране на интестинални VRE, включващ комбинация от един хромогенен агар - Brilliance VRE и BEAV бульон (**Приложение 3**). Това позволи да се оптимизира лабораторната работа, като се намали количеството на използваните хранителни среди и консумативи за допълнителни тестове и да се съкрати времето за откриване на VRE. След анализ на резултатите от тестовете за родова и видова принадлежност на интестиналните VRE, доказването на видово-специфични гени и чувствителност към гликопептиди е разработен алгоритъм за презумптивна идентификация на VRE от фекални проби (**Приложение 3**). При последващите проучвания относно честотата на колонизацията с VRE при пациенти с малигнени хематологични заболявания и такива на интензивно лечение всички фекални проби са изследвани в съответствие с изработения алгоритъм.

## 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, са представени на **Фигура 7** и **Фигура 8**. **Фигура 7** показва, че възрастовият 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.



**Фигура 7.** Разпределение по възраст на скринираните за VRE пациенти.

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 (**Фигура 8**).



**Фигура 8.** Разпределение по пол на скринираните за VRE пациенти.

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.

**Таблица 11.** 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
Подягра	1 (3.7)	3 (4.3)	NS

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

Продължение на **Таблица 11.**

<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 12.** 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
Косматоклетъчна 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.

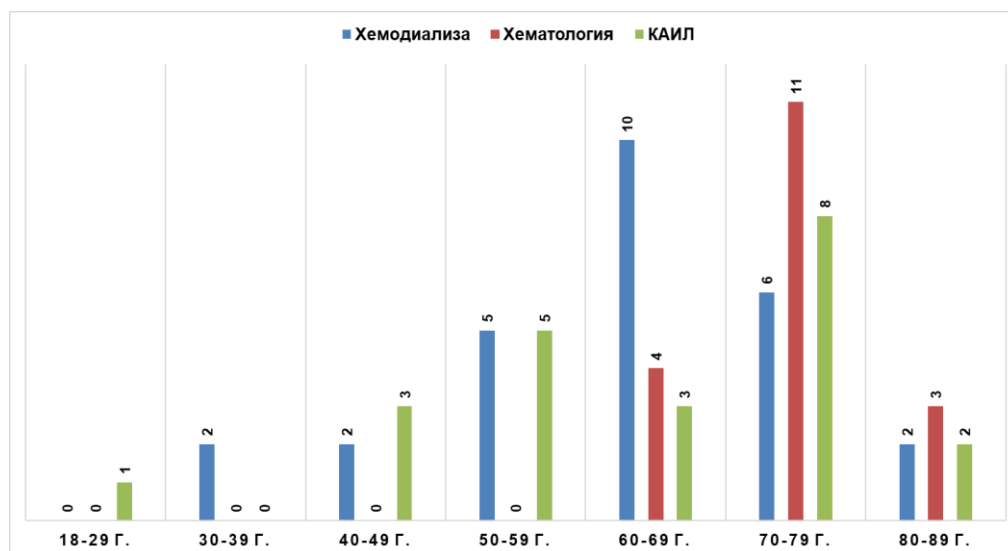
**Таблица 13.** Демографски и клинични данни на 91 пациенти на интензивно лечение, изследвани за фекално носителство на VRE

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 образования	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).

На **Таблицы 11, 12 и 13** са отразени демографски и клинични данни на колонизирани и неколонизирани с VRE пациенти в трите рискови групи.

Демографските характеристики на пациентите с фекално носителство на VRE са представени на **Фигура 9** и **Фигура 10**.



**Фигура 9.** Разпределение по възраст на колонизираните с VRE пациенти.

**Фигура 9** 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 10.** Разпределение по пол на колонизираните с VRE пациенти.

**Фигура 10** 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

Данните от унивариантния анализ на рисковите фактори за интестинална колонизация с VRE при пациентите на хемодиализа са представени на **Таблица 14**. Включените в анализа пациенти 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/инфекция с VRE или друг микроорганизъм. Те са включени в контролната група.

Установена е 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.

Резултатите от унивариантния анализ на рисковите фактори за фекално носителство на VRE при пациентите с малигнен хематологичен заболявания са показани на **Таблица 15**. 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.

Намерена е 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)].

Данните от унивариантния анализ на рисковите фактори за интестинална колонизация с VRE при пациентите на интензивно лечение са представени на **Таблица 16**. С доказана VRE колонизация са 22 пациенти, 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.

Установена е 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.

**Таблица 14.** Унивариантен статистически анализ на рисковите фактори за колонизация с VRE при пациенти на хемодиализа

Характеристики	OR (95% CI)	p-value
<b>Демографски</b>		
Възраст (години)	1.373 (0.540-3.491)	0.505
Пол, мъже:жени	1.238 (0.498-3.075)	0.646
<b>Основно заболяване</b>		
Хроничен гломерулонефрит	2 (0.742-5.391)	0.166
Артериална хипертония	1.091 (0.424-2.809)	0.857
ВАОС	0.5 (0.02-10.71)	0.375
Захарен диабет тип II	0.604 (0.156 - 2.334)	0.548
Хроничен интерстициален нефрит	1.308 (0.114 - 15.043)	0.829
Хроничен пиелонефрит	0.5 (0.056 - 4.489)	0.529
Агенезия	0.27 (0.01-5.16)	0.573
Балканска ендемична нефропатия	0.84 (0.03-21.32)	0.532
АДБГБ	1.25 (0.269-4.710)	0.872
Захарен диабет тип I	0.84 (0.03-21.32)	0.532
Мултиплен миелом	7.98 (0.32-202.09)	0.278
<b>Продължителност на хемодиализата (месеци)</b>		
0-12 месеца	1.692 (0.585-4.891)	0.329
13-60 месеца	0.376 (0.145-0.971)	<b>0.040</b>
над 60 месеца	1.867 (0.748-4.661)	0.178
<b>Кратност на хемодиализата (за седмица)</b>		
Еднократна	0.5 (0.02-10.71)	0.375
Двукратна	5.520 (0.479-63.564)	0.186
Трикатна	0.560 (0.088-3.550)	0.616
<b>Съдов достъп</b>		

Артерио-венозна фистула	1.699 (0.659-4.382)	0.270
Постоянен тунелизиран катетър	0.401 (0.160-1.007)	<b>0.049</b>
Графт	0.84 (0.03-21.32)	0.532
<b>Придружаващи заболявания</b>		
Сърдечно-съдови	0.884 (0.361-2.165)	0.788
- Артериална хипертония	0.557 (0.208-1.494)	0.242
- Сърдечна недостатъчност	1.684 (0.612-4.636)	0.310
Ендокринни	0.635 (0.068-5.948)	0.688
- Захарен диабет тип II	0.859 (0.085-8.637)	0.897
- Хипертиреозидизъм	0.84 (0.03-21.32)	0.532
Респираторни	1.320 (0.227-7.662)	0.669
- ХОББ	0.859 (0.085-8.637)	0.897
- Астма	2.654 (0.160-44.004)	0.481
Пикочо-полови	0.720 (0.140-3.706)	0.693
- ХГН	0.84 (0.03-21.32)	0.532
- БКБ	0.5 (0.056-4.489)	0.529
- ХПН	2.654 (0.160-44.004)	0.481
Хепатобилиарни	2.063 (0.430-9.895)	0.394
Злокачествени образувания	1.625 (0.360-7.326)	0.682
Подагра	0.859 (0.085-8.637)	0.897
<b>Употреба на антибиотици през последните 30 дни</b>		
Пеницилини	0.859 (0.085-8.637)	0.897
1 <sup>-ва</sup> генерация цефалоспорини	0.35 (0.02-7.02)	0.258
2 <sup>-ра</sup> генерация цефалоспорини	1.333 (0.309-5.759)	0.706
3 <sup>-та</sup> генерация цефалоспорини	0.955 (0.327-2.788)	0.932
4 <sup>-та</sup> генерация цефалоспорини	2.372 (0.782-7.193)	0.136
Карбапенеми	0.84 (0.03-21.32)	0.532
Монобактами	0.27 (0.01-5.16)	0.573
Аминогликозиди	0.846 (0.332-2.157)	0.726
Флуорохинолони	1.043 (0.297-3.661)	0.947
Антифунгални препарати	0.635 (0.068-5.948)	0.688
Vancomycin	4.550 (1.301-15.918)	<b>0.033</b>
Metronidazole	0.853 (0.161-4.514)	0.852

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

**Таблица 15.** Унивариантен статистически анализ на рисковите фактори за колонизация с VRE при пациенти с малигнени хематологични заболявания

Характеристики	OR (95% CI)	p-value
<b>Демографски</b>		
Възраст	3.697 (1.114-12.264)	<b>0.025</b>
Пол	0.571 (0.165-1.984)	0.374
Средна продължителност на болничния престоя (дни)	1.524 (-5.602-0.440)	0.093
<b>Основно хематологично заболяване</b>		
Миелодиспластичен синдром	1.140 (0.287-4.536)	0.852
Неходжкинов лимфом	0.1 (0.01-1.81)	0.081
Мултиплен миелом	7.449 (2.161-25.669)	<b>0.001</b>
Хронична лимфоцитна левкемия	1.161 (0.231-5.843)	0.856
Ходжкинов лимфом	0.34 (0.02-6.21)	0.249
Хронична еритремия	0.76 (0.04-14.94)	0.453
Остра миелобластна левкемия	1.917 (0.198-18.596)	0.569
Остра лимфобластна левкемия	0.99 (0.05-20.23)	0.518
Остра миеломоноцитна левкемия	1.4 (0.06-30.75)	0.599
Остра промиелоцитна левкемия	2.36 (0.09-60.87)	0.712
Косматоклетъчна левкемия	2.36 (0.09-60.87)	0.712
Хронична моноцитна левкемия	2.36 (0.09-60.87)	0.712
<b>Рискови фактори</b>		
ХЗСН	2.250 (0.649-7.805)	0.193
ХОББ	0.717 (0.084-6.107)	0.760
ХБН	2.312 (0.426-12.550)	0.332
Захарен диабет тип II	2.708 (0.792-9.259)	0.112
Затлъстяване	1.065 (0.213-5.326)	0.939
Химиотерапия	1.813 (0.553-5.943)	0.326
Употреба на кортикостероиди	1.705 (0.532-5.461)	0.369
<b>Употреба на антибиотици по време на болничния престой и/или през последните 30 дни</b>		
3-та генерация цефалоспорини	2.583 (0.248-26.863)	0.403
Флуорохинолони	3.917 (0.330-46.514)	0.319
Макролиди	0.76 (0.04-14.94)	0.453
Антифунгални препарати	1.4 (0.06-30.75)	0.599

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

**Таблица 16.** Унивариантен статистически анализ на рисковите фактори за колонизация с VRE при пациенти на интензивно лечение

Характеристики	OR (95% CI)	P-value
<b>Демографски</b>		
Възраст (години)	1.670 (0.631-4.418)	0.299
Пол, мъже: жени	0.875 (0.310-2.467)	0.800
Средна продължителност на болничния престоя (дни)	1.560 (0.594-4.094)	0.365
<b>Причина за постъпване в КАИЛ</b>		
Септичен шок	1.28 (0.23-7.11)	0.247
Следоперативни грижи	0.145 (0.051-0.415)	<b>&lt; 0.001</b>
Дихателна недостатъчност	3.474 (0.648-18.632)	0.150
Травма	3.350 (0.443-25.319)	0.245
Други*	7.583 (1.965-29.272)	<b>0.003</b>
<b>Придружаващи заболявания</b>		
Сърдечно-съдови	3.905 (1.361-11.205)	<b>0.009</b>
Респираторни	1.280 (0.230-7.112)	0.674
Хепатобилиарни	0.774 (0.082-7.311)	0.651
Гастроентерологични	1.048 (0.103-10.616)	0.969
Пикочо-полови	1.048 (0.103-10.616)	0.969
Ендокринни	1.155 (0.363-3.675)	0.772
Злокачествени образования	0.363 (0.043-3.077)	0.446
Скорешни коремни операции	0.672 (0.219 -2.063)	0.486
<b>Употреба на инвазивни катетри</b>		
ЦВК	4.421 (0.541-36.119)	0.176
Дренажна тръба	0.561 (0.182 -1.731)	0.360
Назогастрална сонда	0.680 (0.202-2.288)	0.531
Уретрален катетър	0.771 (0.293-2.032)	0.599
Ендотрахеална тръба	0.132 (0.034-0.509)	<b>0.003</b>
<b>Употреба на антибиотици по време на болничния престой</b>		
Пеницилини	0.774 (0.082-7.311)	0.822
1-ва генерация цефалоспорини	3.238 (0.194-54.036)	0.427
3-та генерация цефалоспорини	0.585 (0.201-1.702)	0.322
4-та генерация цефалоспорини	3.238 (0.194-54.036)	0.427
Карбапенеми	2.566 (0.528-12.479)	0.353
Аминогликозиди	0.19 (0.01-3.38)	0.189
Metronidazole	0.572 (0.207-1.578)	0.278
Флуорохинолони	1.048 (0.103-10.616)	0.969
Tigecycline	0.42 (0.02-8.49)	0.610
Vancomycin	1.048 (0.103-10.616)	0.969
Антифунгални препарати	1.735 (0.522-5.770)	0.509
Colistin	3.350 (0.443-25.319)	0.245
Clindamycin	1.595 (1.138-18.486)	0.569
Linezolid	0.42 (0.02-8.49)	0.320

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

### 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 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.
- При 22 (24.2%) от 91 пациенти на интензивно лечение, като при един болен са доказани два вида VRE.

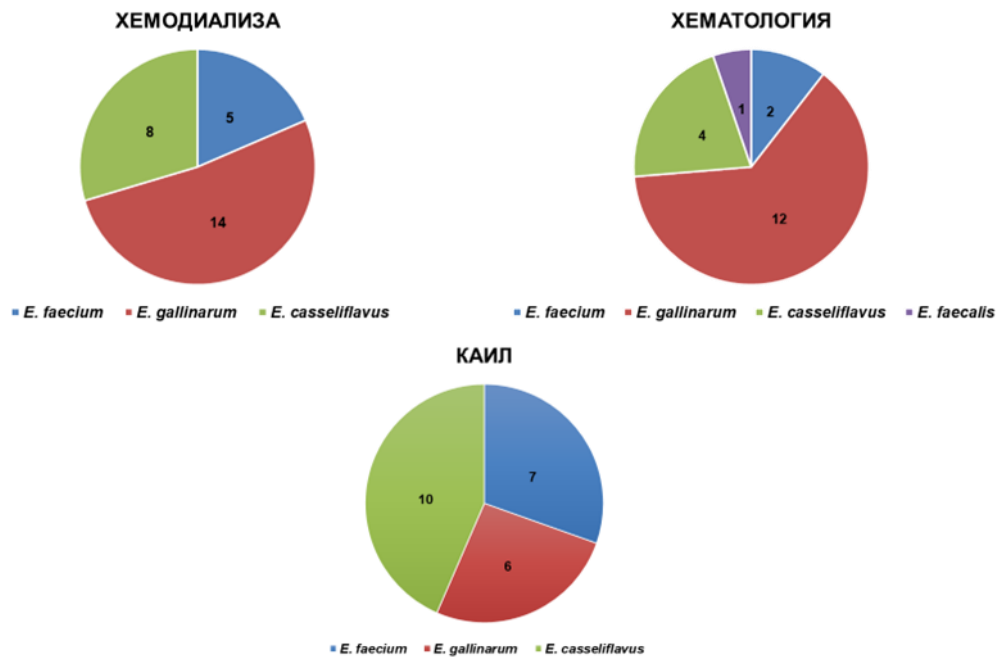
Интестинална колонизация с VRE е доказана при общо 67 (21.8%) от 307 скринирани пациенти. Носителство на един вид VRE е установено при 65 пациенти, а при двама са открити два вида VRE. Най-голяма е честотата на колонизация в Клиниката по ХД (27.8%), следва КАИЛ (24.2%) и Клиниката по ХТ (15.1%).

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 11**. 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. Първият, 85-годишна жена с множествен миелом, е носител едновременно на *vanA E. faecium* и *vanB E. faecalis*. Тя е приета в Клиниката поради влошена анемия и сегашната хоспитализация е деветата за последните пет години. По време на настоящата хоспитализация е направена хемотрансфузия, като пациентката е лекувана с кортикостероиди и 3<sup>-та</sup> генерация цефалоспорин. След потвърждение на VRE носителство жената е изолирана в самостоятелна стая. Поради появата на остър диаричен синдром на 15<sup>-ия</sup> ден от хоспитализацията и положителна проба за *Clostridium difficile* токсин

A/B жената е преместена в Клиниката по инфекциозни болести. Вторият пациент е 75-годишен мъж с хронична лимфоцитна левкемия, колонизиран с *vanB E. faecium*. За последната година това е пета хоспитализация с цел редовна химиотерапия. По време на болничния престой пациентът е приемал кортикостероиди, но не и антибиотици. След потвърждение на VRE носителство той е изолиран в самостоятелна стая.

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 11**).



**Фигура 11.** 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%).

## **2.4. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТНОСНО ЧЕСТОТАТА И РИСКОВИТЕ ФАКТОРИ ЗА ИНТЕСТИНАЛНА КОЛОНИЗАЦИЯ С VRE ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВИСОК РИСК ЗА КОЛОНИЗАЦИЯ И ИНФЕКЦИЯ С ПРОБЛЕМНИ МИКРООРГАНИЗМИ**

Микробиомът на ГИТ при човека е представен от над 100 култивирани се видове и много други, които разчитат на симбиотични взаимоотношения с представителите на микробната флора за своя растеж (Ley et al. 2006). Ентерококите са добре адаптирани към стомашно-чревния тракт на човека, но при обикновени условия те представляват малка част от микробния ареал. При здрави лица нормалните представители на ГИТ ограничават способността на множество-резистентни бактериални щамове, като напр. VRE, да колонизират тази област. Феноменът е известен още като „резистентност към колонизация“ (Keith and Pamer 2019). Употреба на антибиотици, хоспитализация, настаняване на пациента в заведения за продължително лечение, хемодиализа са само част от предразполагащите рискови фактори за VRE колонизация и всички те нарушават нормалната микробна флора на ГИТ по директен или индиректен начин. Веднъж колонизирани, пациентите стават потенциален източник на VRE за останалите хоспитализирани лица (Patel 2003). Поради тази причина активният фекален скрининг за VRE е от съществено значение за правилното прилагане на предпазни мерки за изолация на колонизираните пациенти, целящи намаляване на риска от разпространение на тези проблемни микроорганизми в болничните звена (Fagon et al. 2016). Освен това, ранната детекция на VRE във фекални проби е от особено значение за превенцията на нозокомиална VR ентерококова инфекция.

В настоящето проучване са скринирани за носителство на фекални VRE общо 307 пациенти от Клиниката по ХД, Клиниката по ХТ и КАИЛ в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен. Броят на изследваните лица от всяко клинично звено е приблизително еднакъв, съответно 97 пациенти от Клиниката по ХД, 91 от Клиниката по ХТ и 119 от КАИЛ. Броят на колонизираните с VRE болни с малигнени хематологични заболявания е най-малък (n=18), за разлика от колонизираните лица на интензивно лечение (n=22) и тези подложени на хемодиализа (n=27).

Пациентите подложени на редовна хемодиализа са високорискова популация за разпространение на антибиотично резистентни микроорганизми (D'Agata 2002; Berns 2003; Zacharioudakis et al. 2014). Техните чести хоспитализации и съпътстващи заболявания, както и естеството на самото диализно лечение включващо продължително споделяне на болничната среда с други високорискови пациенти прави тази група изключително възприемчива за колонизация с интестинални VRE.

Assadian и съавт. (Assadian et al. 2007) проучват общо 146 пациенти на хемодиализа и доказват, че 9 (6.2%) от тях са положителни за интестинални VRE. Средната възраст на лицата е 50 г. с преобладаване на мъжете (n=5), а средната продължителност на хемодиализа е 18 месеца (диапазон: 1-168). Диабет тип II и артериалната хипертония са основните придружаващи заболявания при колонизираните пациенти. Идентична с потвърдена от Assadian и съавт. (Assadian et al. 2007) честота на VRE колонизация (6.2%) е доказана сред общо 4842 пациенти от 100 хемодиализни центъра (Zacharioudakis et al. 2014). Humphreys и съавт. (Humphreys et al. 2004) съобщават за по-висок процент на интестинални VRE при хемодиализирани пациенти – 13%, а Tokars и съавт. (Tokars et al. 2001) за по-нисък – 5.8%. 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. Носителство на *vanA* ентерококи (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. avium*, *E. dispar*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*) е потвърдено при 185 от лицата, а *vanC* ентерококи (*E. gallinarum* и *E. casseliflavus*) са доказани при 264 пациенти. При 23 от тях е налице смесена колонизация, като 12 са колонизирани едновременно с *vanA* и *vanC1* ентерококи, 5 – с *vanA* и *vanC2*, други 5 – с *vanC1* и *vanC2* и 1 е с два изолата – 1 *vanA* и 1 *vanA* + *vanC1* (Descheemaeker et al. 2000).

От положителните за VRE пациенти на хемодиализа в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ са изолирани 5 *vanA E. faecium*, 14 *E. gallinarum* (13 *vanC1* и 1 *vanA*) и 8 *E. casseliflavus*. При нито едно от лицата не е наблюдавано носителство на повече от един VR ентерококов вид или носителство на повече от един ген за гликопептидна резистентност в ентерококов VR изолат. Анализът на рискови фактори показва, че продължителността на хемодиализата 13-60 месеца ( $p=0.040$ ), съдовият достъп чрез постоянен тунелизиран катетър ( $p=0.049$ ) и

употребата на vancomycin ( $p=0.033$ ) благоприятстват VRE колонизацията сред проучените пациенти. 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. Humphreys и съавт. (Humphreys et al. 2004) доказват, че следните променливи са рискови за VRE колонизация сред хемодиализирани пациенти: хронична хемодиализа ( $p<0.001$ ), перитонеална диализа ( $p=0.02$ ), болничен престой ( $p<0.001$ ), многобройни хоспитализации ( $p<0.001$ ) и напреднала възраст ( $p=0.01$ ), а последната е потвърдена като независим фактор чрез мултивариантния анализ. Употреба на антибиотици през последните месеци и при хоспитализации през предходната година (Assadian et al. 2007; Zacharioudakis et al. 2015) също допринасят за придобиване на интестинални VRE при пациенти на хемодиализа.

Пациентите с хематологични малигнени заболявания са едни от най-често колонизираните с VRE. Особено застрашени са преминалите химиотерапевтични курсове и/или трансплантираните с хемопоеични стволови клетки. Честотата на интестинално VRE носителство при тях е особено висока и може да достигне до 40% (Gedik et al. 2014; Ford et al. 2015; Kara et al. 2015; Aktürk et al. 2016).

Сред скринираните в настоящето проучване пациенти с малигнени хематологични заболявания VR *E. faecium* и/или VR *E. faecalis* са установени само при двама пациенти (1.7%), докато vanC ентерококи са доказани при 16 (13.4%) от пациентите. Ролята на vanC ентерококите като колонизатори на ГИТ при хоспитализирани болни е документирана в различни проучвания. Изследване на Batista и съавт. (Batistão et al. 2012) показва, че 77 от 78 VRE колонизирани пациенти са положителни за vanC ентерококи. Tresoldi и съавт. (Tresoldi et al. 2006) също публикуват подобни резултати – 7 от 9 колонизирани пациенти са носители на *E. gallinarum* или *E. casseliflavus*. Maschieto и съавт. (Maschieto et al. 2004) не изолират нито един VR *E. faecium* или VR *E. faecalis*, но отчитат висока честота на vanC ентерококи – *E. gallinarum* (23.7%) и *E. casseliflavus/E. flavescens* (5.2%). За разлика от по-горе описаните проучвания, Gedik и съавт. (Gedik et al. 2014) установяват, че общо 50 (39.7%) от 126 болни с хематологични злокачествени заболявания са колонизирани с VR *E. faecium* или VR *E. faecalis*. Други изследователи доказват, че 72 (31.4%) от 229 деца настанени в хематологично-онкологични отделения са носители на VRE и броят

на VR *E. faecium* изолатите е значително по-висок от vanC ентерококите (Aktürk et al. 2016). Suzuki и съавт. (Suzuki et al. 2017) изследват епидемиологията на BSIs за 10-годишен период в Япония и установяват, че 9% и 2.7% от тях са причинени съответно от *E. casseliflavus/E. flavescens* и *E. gallinarum*. Всички тези данни свидетелстват за нарастващия брой пациенти, инфектирани/колонизирани с vanC ентерококи.

В настоящото проучване са оценени редица рискови фактори, които могат да допринесат за придобиване на VRE при пациенти с хематологични злокачествени заболявания. Анализът на резултатите показва, че има статистически значима връзка между напреднала възраст на пациента (70-79 г.;  $p=0.025$ ) и фекалното носителство на VRE, както и че пациентите, които страдат от множествен миелом се колонизират най-често с VRE ( $p=0.001$ ). 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). Изследванията на Mioljevic и съавт. (Mioljevic et al. 2013) и Worth и съавт. (Worth 2014) демонстрират значително висока честота на VRE носителство при болни с остра миелоидна левкемия (AML), които обикновено имат по-дълъг болничен престой. В настоящия труд броят на пациентите с AML е малък и при нито един от тях не е потвърдена колонизация с VRE.

Сред различните групи имунокомпрометирани пациенти като значими рискови фактори за придобиване на VRE са определени редица променливи (Suntharam et al. 2002; Batistão et al. 2012; Papadimitriou-Olivgeris et al. 2014). Suntharam и съавт. (Suntharam et al. 2002) установяват, че продължителността на болничния престой, предходната хоспитализация или предходното лечение в отделения за интензивни грижи, както и употребата на amikacin играят роля при VRE колонизация на хематологично-онкологични пациенти. В друго проучване нефропатията, предишната употреба на антибиотици и приложението на карбапенеми са идентифицирани като рискови фактори за придобиване на VRE сред критично болни пациенти (Batistão et al. 2012). Papadimitriou-Olivgeris и съавт. (Papadimitriou-Olivgeris et al. 2014) съобщават за следните рискови фактори благоприятстващи VRE колонизацията по време на болничен престой в интензивни отделения: употреба на хинолони, брой положителни пациенти с VRE, чиито легла са в близост, хронична бъбречна недостатъчност и хронична

обструктивна белодробна болест. В настоящия труд не е намерена зависимост между придобиването на фекални VRE и продължителността на болничния престой; придружаващото заболяване и употреба на антибиотици при хематологично болните. Интересно е да се отбележи, че само при 11 (9.2%) от 119 изследвани пациенти в Клиниката по ХТ на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен са прилагани антибиотици по време на текущия болничен престой и/или през последните 30 дни. В контраст на тези данни е проучването на Mioljević и съавт. (Mioljević et al. 2013), в което само 11 (15.4%) пациенти не са приемали антибиотик по време на хоспитализацията в хематологично звено за интензивни грижи.

VRE са сред групата на множествено-резистентните патогени с най-голяма честота в болниците. Тяхната способност да колонизират околната среда, стомашно-чревния тракт на човека и продължителната деколонизация след това улеснява вътреболничното им разпространение особено в отделенията за интензивно лечение.

Честотата на VRE колонизация сред пациентите в интензивни отделения варира широко в различните страни и континенти. Мета-анализът на Ziakas и съавт. (Ziakas et al. 2013) установява, че тя е най-висока в Америка (12.3%), следвана от Азия (5.3%), Австралия (4.4%) и най-ниска в Европа (2.7%). В настоящия труд колонизация с VRE е доказана при 22 (24.2%) от изследваните пациенти, лекувани в КАИЛ на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен. Amberpet и съавт. (Amberpet et al. 2016) съобщават 29% честота на VRE колонизация в отделение за интензивно лечение. При проучване върху разпространението на VRE сред новородени в интензивни звена Duarte и съавт. (Duarte et al. 2019) установяват, че 18.6% са носители на VRE. Farhadi и съавт. (Farhadi et al. 2022) съобщават значително по-висока честотата сред същата таргетна група (42.2%).

От скринираните 91 пациенти в КАИЛ на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен един показва носителство на два ентерококови вида, в резултат на което са изолирани общо 23 VRE разпределени както следва: 9 *E. casseliflavus*, 5 *E. faecium* и 7 *E. gallinarum*. Tresoldi и съавт. (Tresoldi et al. 2006) изолират от 112 пациенти само 9 щамове VRE – 5 *E. gallinarum*, 2 *E. faecalis* и 2 *E. casseliflavus*.

В настоящата работа е доказана статистически значима връзка между придобиването на VRE от пациентите на интензивно лечение и следните променливи: следоперативните грижи ( $p < 0.001$ ), други причини за постъпване в

КАИЛ ( $p=0.003$ ), заболявания на сърдечно-съдовата система ( $p=0.009$ ) и наличието на ендотрахеална тръба ( $p=0.003$ ). Хоспитализация през последната година ( $p=0.001$ ), предходна употреба на широкоспектърни антибиотици ( $p=0.000$ ) или употреба на два или повече широкоспектърни антибиотика през последната година ( $p=0.009$ ), предишна хоспитализация във високорискови звена ( $p=0.000$ ), употреба на имunosупресори ( $p=0.001$ ) са други потвърдени рискови фактори, благоприятстващи VRE колонизацията (Duarte et al. 2019). Установено е, че дългата продължителност на болничния престой ( $p=0.00$ ), по-младата 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 (Amberpet et al. 2016). Проучване на Pan и съавт. (Pan et al. 2012) показва, че престоят на пациента в отделение за интензивно лечение е независим рисков фактор за VRE ( $p=0.03$ ). От друга страна авторите доказват, че предходната употреба на цефалоспорин от първа генерация е фактор, който играе защитна роля срещу нова колонизация с VRE ( $p=0.0007$ ). Според Yoon и съавт. (Yoon et al. 2011) при продължителна колонизация с VRE сигнификантни са следните променливи: централно-венозната катетеризация и/или ендотрахеалната интубация. В допълнение, приложението на vancomycin след установяване на VRE удължава 4 пъти интестиналното носителство.

В настоящето проучване интестинална колонизация с VRE е доказана при общо 67 (21.8%) от 307 скринирани пациенти. От всички положителни за VRE фекални проби *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* съставляват общо 78.3% и преобладават и при трите таргетни групи. Честотата на колонизация с VRE при 97 лица на хемодиализа е 27.8%, а статистически значимите рискови фактори са продължителност на хемодиализата 13-60 месеца, съдов достъп чрез постоянен тунелизиран катетър и прием на vancomycin. Честотата на колонизация с VRE при 119 пациенти с малигнени хематологични заболявания е 15.1%, а статистически значимите рискови фактори са възраст 70 - 79 години и заболяването мултиплен миелом. Честотата на колонизация с VRE при 91 пациенти на интензивно лечение е 24.2%, а статистически значимите рискови фактори са необходимост от следоперативни грижи, сърдечно-съдови заболявания и наличие на ендотрахеална тръба.

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

Общо 69 VRE изолирани при фекален скрининг на високорискови пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен са тествани за чувствителност към 12 антимикробни препарата, изследвани са за гени, детерминиращи резистентност към гликопептидни и аминогликозидни антибиотици и за гени, кодиращи фактори на вирулентност. Извършено е епидемиологично типизиране на по-голяма част от изолатите.

#### 3.1. АНТИМИКРОБНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И ДЕТЕКЦИЯ НА VAN ГЕНИ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE

На **Таблица 17** са представени резултатите за антимикробната чувствителност на 14 интестинални VR *E. faecium* и 1 VR *E. faecalis*, определени чрез ДДМ, а на **Таблица 18** – стойностите на МПК, определени чрез E-тест и доказаните *van* гени при същите изолати.

**Таблица 17.** Антимикробна чувствителност на 15 интестинални VR *E. faecium* и VR *E. faecalis*, определена чрез ДДМ

Изолат №/ Клинично звено	ВИД	Резистентност (R) / Чувствителност (S)										
		AMP	GEN	STM	CIP	LVX	VAN*	TEC*	IPM	TGC	LZD	Q/D
56/ХТ	<i>E. faecalis</i>	S	R	R	S	S	11	14	R	S	S	S
56/ХТ	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	11	R	S	S	R
58/ХТ	<i>E. faecium</i>	R	S	R	R	R	10	15	R	S	S	S
11/ХД	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	6	R	S	S	R
16/ХД	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	11	R	S	S	R
36/ХД	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	11	R	S	S	R
47/ХД	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	9	R	S	S	R
75/ХД	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	11	R	S	S	R
3/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	12	R	S	S	S
4/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	10	R	S	S	S
5/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	10	R	S	S	S
6/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	11	R	S	S	S
10/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	8	R	S	S	S
26/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	R	S	R	R	R	6	12	R	S	S	S
64/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	6	12	R	S	S	S

**Легенда** AMP: ampicillin; GEN: gentamicin; STM: streptomycin; CIP: ciprofloxacin; LVX: levofloxacin; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; IPM: imipenem; TGC: tigecycline; LZD: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin.

\* Зоните на потискане на растеж са отбелязани в милиметри (mm).

**Таблица 18.** Стойности на МПК и *van* гени при 15 интестинални *E. faecium* и *E. faecalis*

Изолат №/ Клинично звено	Вид	МПК (µg/ml)									van 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 Е-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 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 ≥ 256 µg/ml), gentamicin (МПК ≥ 1024 µg/ml), ciprofloxacin (МПК ≥ 32 µg/ml) и vancomycin (МПК ≥ 256 µg/ml), вариращи нива на резистентност към teicoplanin (МПК 6 – ≥ 256 µg/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 µg/ml). При всички 13 VR *E. faecium* е доказан *vanA* ген (**Фигура 13 А и Б**). Само 5 (38.5%) от 13 *vanA* изолата са с обичайните за фенотипа високи нива на резистентност към vancomycin (МПК ≥ 256 µg/ml) и teicoplanin (МПК: 48 – ≥ 256 µg/ml). Другите 8 (61.5%) показват ниска до умерена резистентност към teicoplanin (МПК: 6 – 16 µg/ml), което наподобява VanD фенотип (VanD-*vanA*).

Петте *E. faecium*, изолирани от Клиниката по хемодиализа, имат еднотипен профил на множествена резистентност и еднакви стойности на МПК.

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  $\mu\text{g/ml}$ ).

**Таблица 19.** Антимикробна чувствителност на 33 интестинални *E. gallinarum*, определена чрез ДДМ

Изолат №/ Клинично звено	Резистентност (R) / Чувствителност (S)									
	AMP	GEN	STM	CIP	LVX	VAN	TEC	IPM	TGC	LZD
31/ХД	R	R	R	R	R	6	8	R	S	S
1/ХД	S	S	S	S	S	8	19	S	S	S
5/ХД	S	S	S	S	S	9	18	S	S	S
8/ХД	S	S	S	S	S	9	18	S	S	S
17/ХД	S	S	S	S	S	8	18	S	S	S
45/ХД	S	S	S	S	S	9	19	S	S	S
59/ХД	S	S	S	S	S	9	19	S	S	S
60/ХД	S	S	S	S	S	9	18	S	S	S
69/ХД	S	S	S	S	S	9	18	S	S	S
72/ХД	S	S	S	S	S	9	19	S	S	S
76/ХД	S	S	S	S	S	9	19	S	S	S
81/ХД	S	S	S	S	S	9	19	S	S	S
87/ХД	S	S	S	S	S	9	19	S	S	S
91/ХД	S	S	S	S	S	9	18	S	S	S
4/ХТ	S	S	S	S	S	11	20	S	S	S
17/ХТ	S	S	S	S	S	10	20	S	S	S
19/ХТ	S	S	S	S	S	11	20	S	S	S
24/ХТ	S	S	S	S	S	10	16	S	S	S
28/ХТ	S	S	S	S	S	10	16	S	S	S
35/ХТ	S	S	R	S	S	10	18	S	S	S
66/ХТ	S	S	R	S	S	10	19	S	S	S
68/ХТ	S	S	S	S	S	9	19	S	S	S
77/ХТ	S	S	S	S	S	14	23	S	S	S
88/ХТ	S	S	S	S	S	9	19	S	S	S
90/ХТ	S	S	S	S	S	13	21	S	S	S
95/ХТ	S	S	S	S	S	9	22	S	S	S
10 /КАИЛ	S	S	S	S	S	10	15	S	S	S
37/КАИЛ	S	S	S	S	S	11	20	S	S	S
49/КАИЛ	S	S	S	S	S	10	20	S	S	S
66/КАИЛ	S	S	S	S	S	11	18	S	S	S
67/КАИЛ	S	S	S	S	S	13	20	S	S	S
76/КАИЛ	S	S	S	S	S	10	19	S	S	S
79/КАИЛ	R	R	R	R	R	11	19	S	S	S

**Легенда** AMP: ampicillin; GEN: gentamicin; STM: streptomycin; CIP: ciprofloxacin; LVX: levofloxacin; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; IPM: imipenem; TGC: tigecycline; LZD: linezolid.  
\* Зоните на потискане на растеж са отбелязани в милиметри (mm).

**Таблица 20.** Антимикробна чувствителност на 21 интестинални *E. casseliflavus*, определена чрез ДДМ

Изолат №/ Клинично звено	Резистентност (R) / Чувствителност (S)									
	AMP	GEN	STM	CIP	LVX	VAN	TEC	IPM	TGC	LZD
6/ХД	S	S	S	S	S	10	18	S	S	S
33/ХД	S	S	S	S	S	10	16	S	S	S
40/ХД	S	S	S	S	S	9	16	S	S	S
41/ХД	S	S	S	S	S	10	19	S	S	S
70/ХД	S	S	S	S	S	10	19	S	S	S
84/ХД	S	S	S	S	S	10	19	S	S	S
93/ХД	S	S	S	S	S	11	19	S	S	S
96/ХД	S	S	S	S	S	10	18	S	S	S
6/ХТ	S	S	S	S	S	11	20	S	S	S
10/ХТ	S	S	S	S	S	11	20	S	S	S
11/ХТ	S	S	S	S	S	11	16	S	S	S
57/ХТ	S	S	S	S	S	11	18	S	S	S
1/КАИЛ	S	S	S	S	S	11	16	S	S	S
7/КАИЛ	S	S	S	S	S	11	17	S	S	S
35/КАИЛ	S	S	S	S	S	11	17	S	S	S
47/КАИЛ	S	S	S	S	S	11	19	S	S	S
63/КАИЛ	S	S	S	S	S	11	18	S	S	S
75/КАИЛ	S	R	R	R	R	9	18	S	S	S
77/КАИЛ	S	S	S	S	S	12	19	S	S	S
80/КАИЛ	S	S	S	S	S	12	18	S	S	S
81/КАИЛ	S	S	S	S	S	10	16	S	S	S

**Легенда** AMP: ampicillin; GEN: gentamicin; STM: streptomycin; CIP: ciprofloxacin; LVX: levofloxacin; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; IPM: imipenem; TGC: tigecycline; LZD: linezolid.

\* Зоните на потискане на растеж са отбелязани в милиметри (mm).

**Таблица 21.** 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 22.** 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

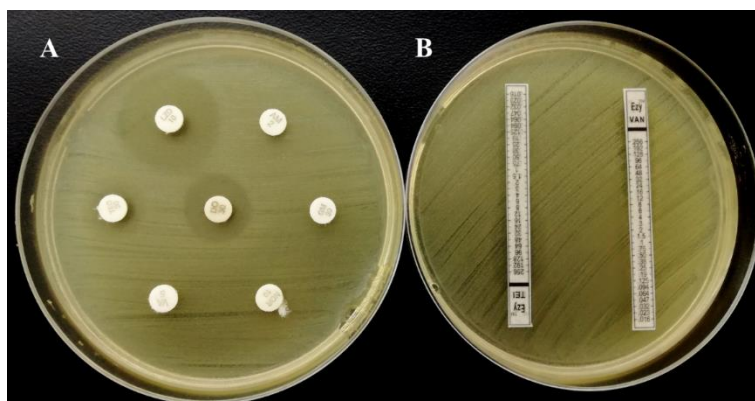
На **Таблица 19** и **Таблица 20** са показани данните за чувствителността към 11 антимикробни препарата на 33 интестинални *E. gallinarum* и 21 *E. casseliflavus*, определени чрез ДДМ, а **Таблица 21** и **Таблица 22** – стойностите на МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> при същите изолати.

При почти всички *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* зоните на потискане на бактериалния растеж около диска с 5 mg vancomycin са в интервала 6-11 mm, което определя резистентност към посочения антибиотик (**Таблица 19** и **Таблица 20**). При 3 *E. gallinarum* и 2 *E. casseliflavus* са отчетени зони с диаметър 12-14 mm, което би трябвало да определи изолатите като чувствителни на vancomycin по критериите на EUCAST.

Резултатите от ДДМ свидетелстват, че преобладаващата част от *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* са чувствителни на ampicillin, gentamicin, streptomycin, ciprofloxacin, levofloxacin, teicoplanin, imipenem, tigecycline и linezolid. Изключение правят няколко изолата: *E. casseliflavus* № 75/КАИЛ, демонстриращ резистентност към streptomycin, gentamicin, ciprofloxacin и levofloxacin; *E. gallinarum* № 35/ХТ и № 66/ХТ – с липсваща чувствителност към streptomycin и *E. gallinarum* № 79/КАИЛ – с резистентност към ampicillin, gentamicin, streptomycin, ciprofloxacin и levofloxacin.

*E. gallinarum* № 31/ХД по ДДМ показва множествена резистентност, включително към vancomycin и teicoplanin, и чувствителност само към tigecycline и linezolid (**Фигура 12 А**). Същият изолат е с доказано високи нива на резистентност към vancomycin и teicoplanin (МПК  $\geq$  256 µg/ml) (**Фигура 12 Б**), характерни за VanA фенотипа, и е с потвърден vanA ген (**Фигура 13 А**). Стойностите на МПК по отношение на другите антибиотици са следните: ampicillin (МПК  $\geq$  256 µg/ml), gentamicin (МПК  $\geq$  1024 µg/ml), ciprofloxacin (МПК  $\geq$

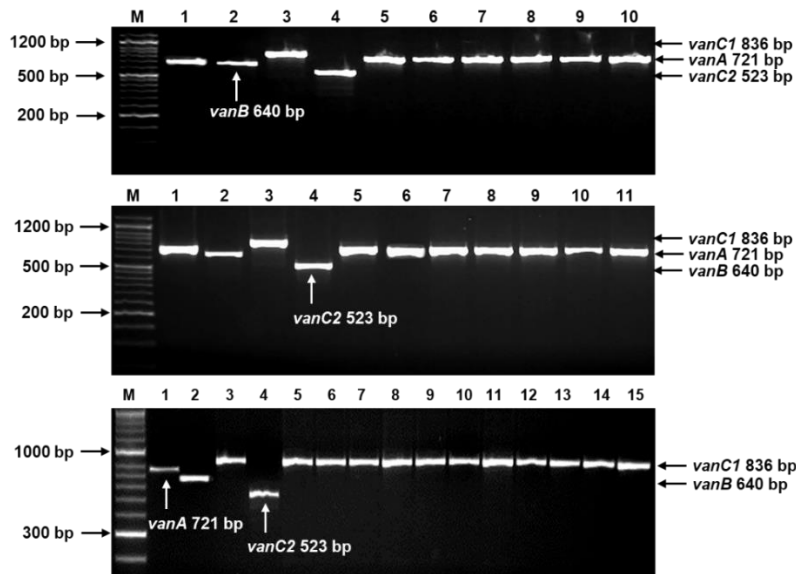
32 µg/ml), quinupristin/dalfopristin (МПК ≥ 32 µg/ml), linezolid (МПК = 2 µg/ml), tigecycline (МПК = 0.064 µg/ml) и daptomycin (МПК = 2 µg/ml).



**Фигура 12.** 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 МПК<sub>50</sub> = 8 µg/ml / 4 µg/ml и МПК<sub>90</sub> = 12 µg/ml / 6 µg/ml, и са чувствителни на teicoplanin (**Таблица 21** и **Таблица 22**), което съответства на VanC фенотипа. Генът *vanC1* е потвърден при 32 *E. gallinarum* (**Фигура 13В**), 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%.



**Фигура 13. (А)** Откриване на *vanA* гени при 5 *E. faecium* и 1 *E. gallinarum* изолати чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № ATCC 700221 *E. faecium*; Линия 2 - ATCC 51299 *E. faecalis*; Линия 3 - ATCC 49608 *E. gallinarum*; Линия 4 - ATCC 700668 *E. casseliflavus*; Линия 5 - № 11 ХД; Линия 6 - № 16 ХД; Линия 7 - № 36 ХД; Линия 8 - № 47 ХД; Линия 9 - № ХД; Линия 5 - № 31 ХД (*E. gallinarum*).

**(Б)** Откриване на *vanA* гени при *E. faecium* изолати чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № ATCC 700221 *E. faecium*; Линия 2 - ATCC 51299 *E. faecalis*; Линия 3 - ATCC 49608 *E. gallinarum*; Линия 4 - ATCC 700668 *E. casseliflavus*; Линия 5 - № 3 ОАРИЛ; Линия 6 - № 4 ОАРИЛ; Линия 7 - № 5 ОАРИЛ; Линия 8 - № 6 ОАРИЛ; Линия 9 - № ОАРИЛ; Линия 10 - № 26 ОАРИЛ; Линия 11 - № 64 ОАРИЛ.

**(В)** Откриване на *vanC1* гени при *E. gallinarum* изолати чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Bioline*); Линия 1 - ATCC 700221 *E. faecium*; Линия 2 - ATCC 51299 *E. faecalis*; Линия 3 - ATCC 700668 *E. casseliflavus*; Линия 4 - ATCC 49608 *E. gallinarum*; Линия 5 - № 1 ХД; Линия 6 - № 5 ХД; Линия 7 - № 8 ХД; Линия 8 - № 17 ХД; Линия 9 - № 45 ХД; Линия 10 - № 59 ХД; Линия 11 - № 60 ХД; Линия 12 - № 69 ХД; Линия 13 - № 72 ХД; Линия 14 - № 76 ХД; Линия 15 - № 81 ХД.

### 3.2. ДЕТЕКЦИЯ НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ АМИНОГЛИКОЗИДИ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE

От проучените 69 интестинални VRE резистентност към аминокликозиди 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 (МПК  $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ ), а при 3 изолата (2 *E. faecium* и 1 *E. casseliflavus*) стойностите на МПК варират от 8 до 64  $\mu\text{g/ml}$ .

Резултатите от детекцията на гени, кодиращи аминокликозид-модифициращи ензими и стойностите на МПК към gentamicin при 18 изолата, са представени на **Таблица 23**. Данните показват, 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  $\mu\text{g/ml}$  и 12  $\mu\text{g/ml}$ ). При 15 от изолатите този ген се експресира

самостоятелно, а при два е в комбинация с *aph(3')-IIIa*. При *E. casseliflavus* изолата е открит *ant(3')-Ia*.

**Таблица 23.** Разпространение на АМЕ гени сред 18 интестинални VRE изолати

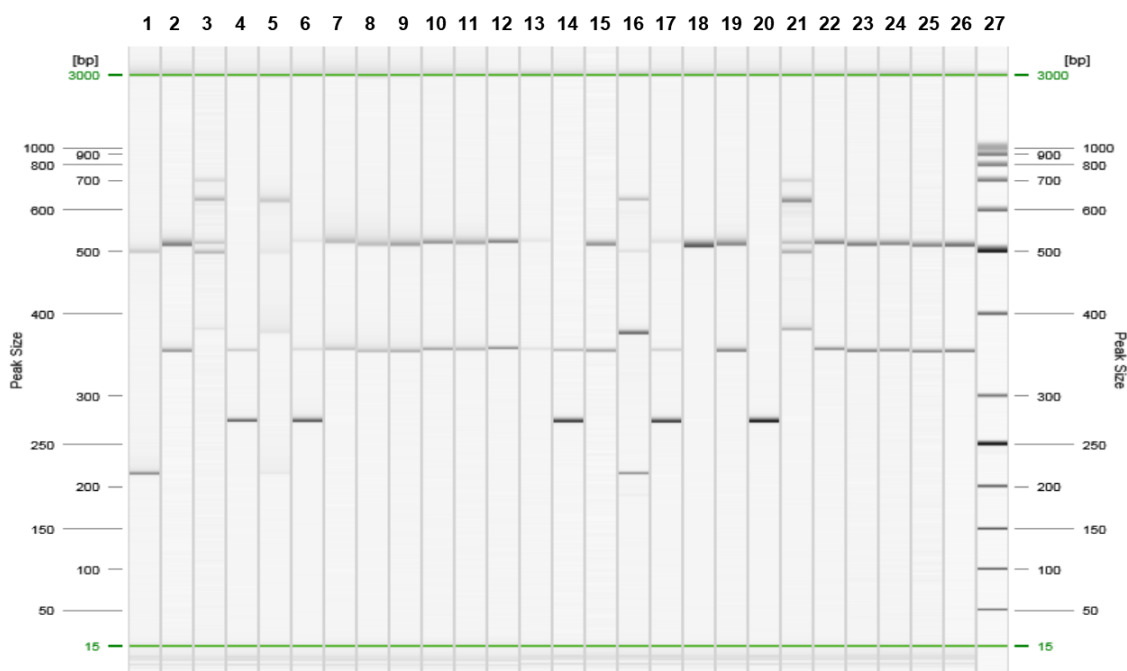
Изолат №/ Клинично звено	Вид	GEN (µg/ml)	АМЕ <sup>6</sup> гени		
			<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>ant(3')-Ia</i>
56'/ХТ	<i>E. faecalis</i>	≥1024	+	-	-
56/ХТ	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
58/ХТ	<i>E. faecium</i>	8	+	+	-
11/ХД	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
16/ХД	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
36/ХД	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
47/ХД	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
75/ХД	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
3/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
4/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	+	-
5/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
6/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
10/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
26/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	12	+	-	-
64/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	≥1024	+	-	-
31/ХД	<i>E. gallinarum</i>	≥1024	+	-	-
79/КАИЛ	<i>E. gallinarum</i>	≥1024	+	-	-
75/КАИЛ	<i>E. casseliflavus</i>	64	-	-	+

**Легенда:** GEN: gentamicin; АМЕs: аминогликозид-модифициращи ензими.

### 3.3. ДЕТЕКЦИЯ НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE

Всички 69 интестинални VRE (1 *E. faecalis*, 14 *E. faecium*, 33 *E. gallinarum* и 21 *E. casseliflavus*) са изследвани за наличие на гени, кодиращи фактори на вирулентност при ентерококите. 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 14**, а разпространението на гените при отделните изолати е представено на **Таблица 24**.



**Фигура 14.** Откриване на *gelE*, *hyl*, *act*, *asa1*, *efaA*, *esp* и *cyla* 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 *cyla*; 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.

**Таблица 24.** Разпространение на гени, кодиращи фактори на вирулентност при 21 VRE

Изолат №/ Клинично звено	ВИД	ГЕНИ, КОДИРАЩИ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ							
		<i>gelE</i>	<i>hyl</i>	<i>asa1</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>	<i>cyla</i>	<i>ace</i>	<i>act</i>
3/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
4/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-	+	-	-	+
5/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
6/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
10/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
26/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
64/КАИЛ	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
56/ХТ	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
58/ХТ	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-	+	-	-	+
11/ХД	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
16/ХД	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
36/ХД	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
47/ХД	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
75/ХД	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
31/ХД	<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
17/ХД	<i>E. gallinarum</i>	-	-	+	+	+	+	+	-
60/ХД	<i>E. gallinarum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
66/КАИЛ	<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	+	-	-	+
79/КАИЛ	<i>E. gallinarum</i>	-	+	-	-	-	-	-	+
88/ХТ	<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
56'/ХТ	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	-	-	+	-

В обобщение, 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 (*acm* + *esp*), а 2 са с три гена (*hyl* + *acm* + *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 *acm* + *esp* и 1 с *hyl* + *acm*), 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.

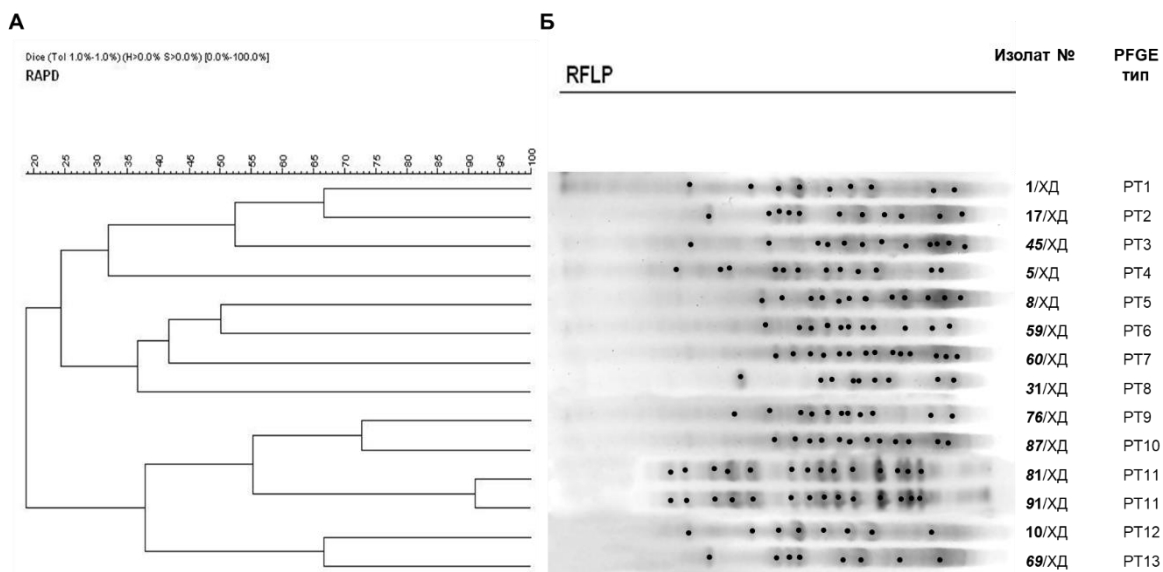
### 3.4. ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE

Общо 27 VRE интестинални изолата (14 *E. gallinarum*, 8 *E. casseliflavus* и 5 *E. faecium*) от Клиниката по нефрология и хемодиализа, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен са подложени на епидемиологично типизиране посредством PFGE метода. Освен това всички 13 *E. faecium* с *vanA* генотип, изолирани от Клиниката по ХД, Клиниката по ХТ и КАИЛ при същата болница, са изследвани чрез MLVA.

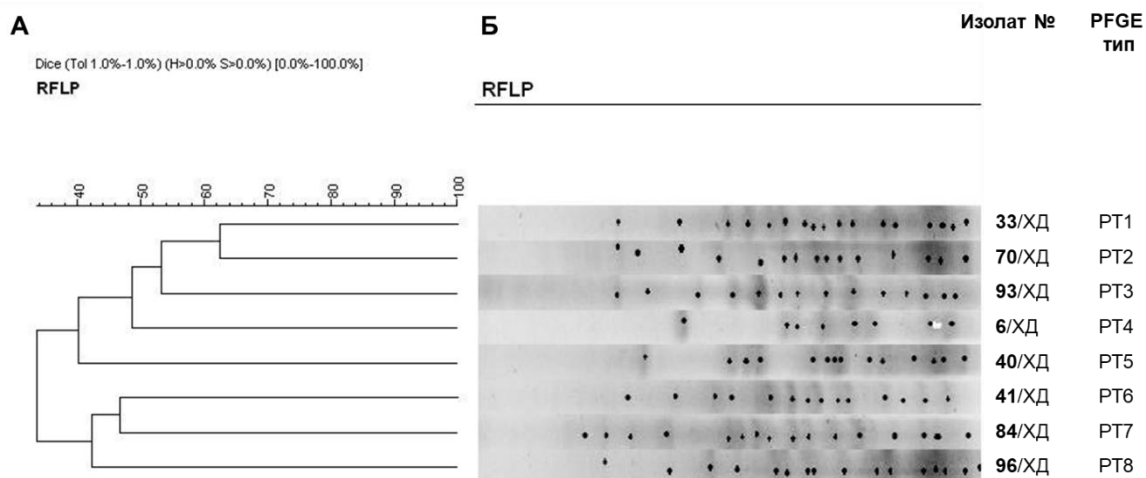
#### 3.4.1. Резултати от типизирането на интестинални *vanC* ентерококи при пациенти на хемодиализа

PFGE профилът на 14 *E. gallinarum* е показан на **Фигура 15**. 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 16**. 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%.



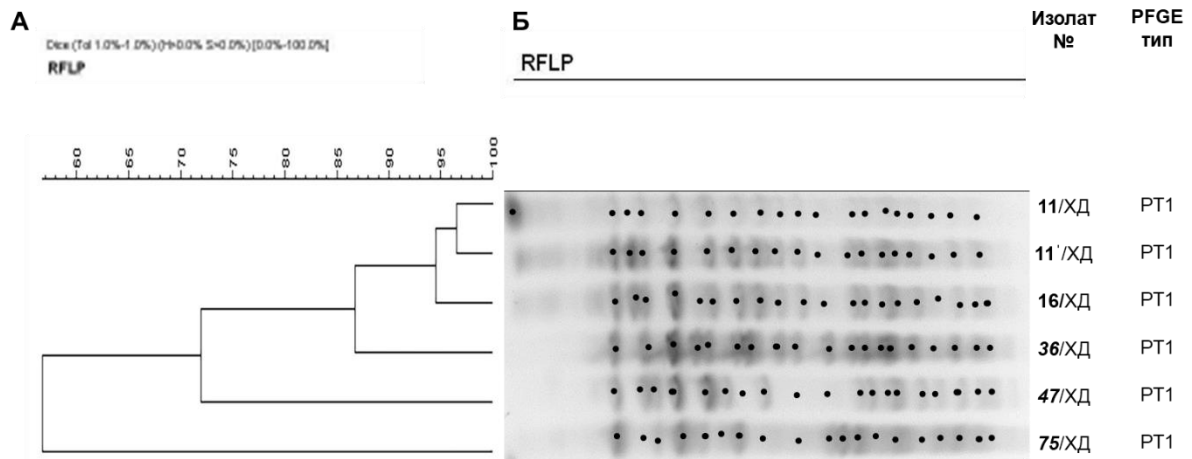
**Фигура 15.** PFGE профил на 14 *E. gallinarum* изолати след рестрикция на ДНК чрез *SmaI* ензим. Дендрограма (А), получена в резултат на автоматизиран анализ на хромозомно фрагментираната ДНК (Б) чрез PFGE.



**Фигура 16.** PFGE профил на 8 *E. casseliflavus* изолати след рестрикция на ДНК чрез *SmaI* 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 17**. Те показват, че всички ентерококи принадлежат към един основен пулсотип 1 (PT1).

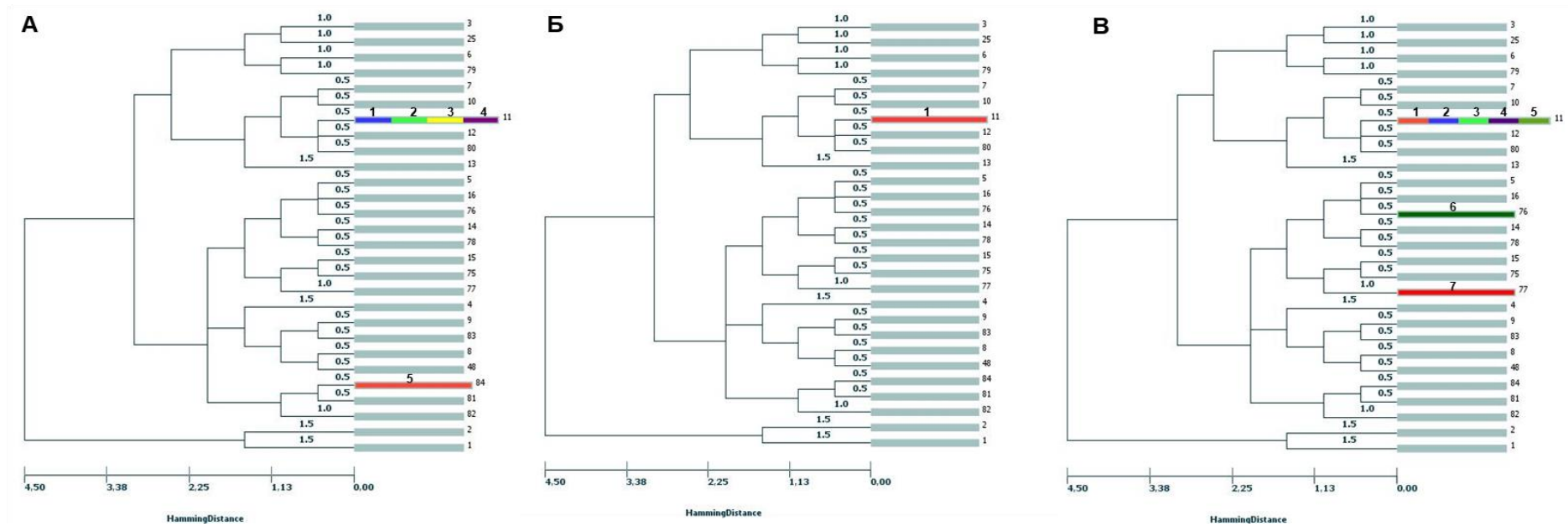


**Фигура 17.** PFGE профил на 5 *E. faecium* изолати след рестрикция на ДНК чрез *SmaI* ензим. Дендрограма (А), получена в резултат на автоматизиран анализ на хромозомно фрагментираната ДНК (Б) чрез PFGE.

Забележка: Щамовете №11/ХТ и 11'/ХД са един и същи изолат, който е тестван два пъти.

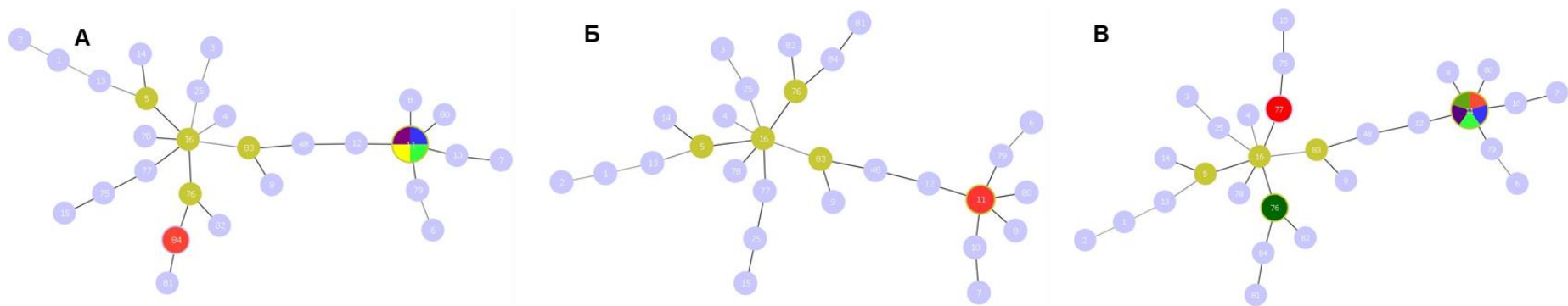
### 3.4.3. Резултати от типизирането на всички интестинални *vanA E. faecium*

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 18** и **Фигура 19**. 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 МТ11 (**Фигура 18 А, Б и В**), а към МТ76 (**Фигура 18 В**), МТ77 (**Фигура 18 В**) и МТ84 (**Фигура 18 А**) принадлежат по един изолат. Два от *E. faecium* изолатите, различни от основния доказан тип МТ11, произхождат от КАИЛ (МТ76 и МТ77), а един е от Отделението по хемодиализа (МТ84).



**Фигура 18.** 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): (A) Отделение по хемодиализа – MT11 и MT84; (Б) Клиника по хематология – MT11; (B) 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*.



**Фигура 19.** Филогенетично дърво (Minimum spanning tree) на *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. 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*; MT88: 1 *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.

### 3.5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА АНТИМИКРОБНАТА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И ДЕТЕКЦИЯТА НА ГЕНИ КОДИРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ VANCOMYCIN И АМИНОГЛИКОЗИДИ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE

През 2011 г. екип учени от Европа, Америка и Австралия предлага дефиниции за MDR (multidrug-resistant), XDR (extensively drug-resistant) и PDR (pandrug-resistant) микроорганизми, които често се изолират в болниците (напр. *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriales*, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp.) (Magiorakos et al. 2012). За причисляване на бактериите към съответната група авторите използват данни за чувствителността към антибиотиците от тестваните антимикробни категории. При липса на чувствителност към повече от един антибиотик от три различни категории изолатът се определя като MDR. При доказана резистентност към един или повече препарата в почти всички категории (с чувствителност само към две или дори по-малко антимикробни категории) изолатът се приема за XDR. При липса на чувствителност към всички тествани антибиотици изолатът се означава като PDR. Авторите уточняват, че при видове с вродена резистентност към дадена антимикробна категория, последната не влиза в критериите за определяне на MDR, XDR или PDR. В тази връзка е необходимо при *Enterococcus* spp. да се изпитва активността на следните препарати: аминогликозиди (gentamicin с високо ниво на резистентност); streptomycin (високо ниво), карбапенеми (само за *E. faecium*; imipenem, meropenem, doripenem); флуорохинолони (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin); гликопептиди (vancomycin; teicoplanin); глицилциклини (tigecycline); липопептиди (daptomycin); оксазолидинони (linezolid); пеницилини (ampicillin); стрептограмини (quinupristin/dalfopristin) и тетрациклини (doxycycline, minocycline) (Magiorakos et al. 2012).

В настоящето проучване при тестване на антимикробната чувствителност на 69 интестинални VR ентерококи се установи, че 16 от тях (14 *E. faecium*, 1 *E. faecalis* и 1 *E. gallinarum*) са MDR. Всички 14 *vanA* изолата (13 *E. faecium* и 1 *E. gallinarum*) демонстрират еднотипен профил, включващ резистентност към пеницилини, аминогликозиди, хинолони, карбапенеми и гликопептиди. Двата *vanB* изолата (1 *E. faecium* и 1 *E. faecalis*) също са MDR поради резистентността им към пеницилини, аминогликозиди, флуорохинолони и гликопептиди. Hassan и

Belal (Hassan and Belal 2016) определят 67% от проучените ентерококови изолати като MDR на база на резистентността им към gentamicin, vancomycin, erythromycin, amoxicillin и tetracycline, като нито един от *vanC* ентерококите не е бил MDR. Известно е, че инфекции, причинени от MDR микроорганизми, могат да доведат до неадекватна или забавена антимикробна терапия и са свързани с по-лоши резултати за пациентите (Ibrahim et al. 2000; Cosgrove et al. 2003; Anderson et al. 2006; Roberts et al. 2009).

Резистентността към гликопептиди на тестваните 13 *vanA E. faecium* показва високи МПК за vancomycin и вариращи МПК за teicoplanin. Това даде възможност за разпределяне на изолатите в две групи. Първата група включва 7 изолата с високо ниво на резистентност към двата гликопептида – МПК за vancomycin  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$  и МПК за teicoplanin  $24 - \geq 256 \mu\text{g/ml}$ , което напълно корелира с VanA фенотипа (Teixeria et al. 2015). Втората група се състои от 6 изолата, които демонстрират МПК за vancomycin  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$  и МПК за teicoplanin –  $6 \mu\text{g/ml}$ . Ниските стойности на МПК за teicoplanin са по-характерни за VanD фенотипа (Teixeria et al. 2015). Marchi и съавт. (Marchi et al. 2018) също докладват VanD-*vanA* при 14 от общо 17 интестинални VR *E. faecium*. 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.

Обичайно резистентният фенотип се доказва чрез определяне на МПК към тестваните антибиотици. От друга страна дисково-дифузионният метод дава предварителна информация относно типа на гликопептидна резистентност. Данни от настоящата разработка показват, че резистентността към гликопептиди е определена успешно чрез ДДМ при почти всички *vanC* ентерококи с изключение на 3 *E. gallinarum* и 2 *E. casseliflavus*, които са със зони на vancomycin 12-14 mm. Işeri и съавт. (Işeri et al. 2016) също описват незначителни грешки при определяне на ентероковата резистентност към гликопептиди чрез ДДМ. В друго проучване се сравняват възможностите на ДДМ, E-теста и автоматизираната система Vitek за откриване на гликопептидна резистентност при *vanA* и *vanC1/vanC2* ентерококи. Данните от това проучване показват, че чувствителността на трите

метода при *vanA* ентерококите е съответно 100%, 97% и 100%. От друга страна чувствителността на ДДМ за доказване на резистентност към vancomycin при *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* е много ниска (20%) в сравнение с високата чувствителност на E-теста и системата Vitek (87%) (SooYoun et al. 2000).

Vancomycin е един от малкото антибиотици, които могат да се използват за лечение на инфекции, причинени от Грам-положителни MDR бактерии, като напр. метицилин-резистентни *S. aureus* (MRSA). Ето защо предаването на резистентност към vancomycin от ентерококите към MRSA е от голямо значение. Доказан е хоризонтален трансфер на *van* гени между ентерококите, а *in vitro* проучвания свидетелстват за трансфер на *van* гени между *Enterococcus* spp. и *S. aureus* (de Niederhäusern et al. 2011). Като цяло броят на изолираните VRSA в световен мащаб е малък, което предполага изключително ниска честота на *in vivo* преноса на резистентност към vancomycin между тези видове (Walters et al. 2015).

Според някои публикации хоризонтален трансфер на *van* оперона между *Enterococcus* spp. и други видове се среща рядко или дори липсва (Werner et al. 2011). В експериментално проучване на Werner и съавт. (Werner et al. 2011) е установено, че *vanA* не се предава между *Enterococcus* spp. и Грам-положителни представители на чревната флора (*Lactococcus* spp. и *Bifidobacterium* spp.). От друга страна авторите доказват, че вътревидовото предаване на *vanA* в род *Enterococcus*, напр. от *E. faecium* на *E. faecium* ( $1/10^6$  на донор/реципиент) е много по-често, отколкото междувидовото предаване, напр. от *E. faecium* на *E. faecalis* ( $1/10^8$  на донор/реципиент). Това може да обясни и по-високата честота на разпространение на *vanA* при *E. faecium* изолати в сравнение с други ентерококови видове.

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). Shirano и съавт. (Shirano et al. 2011) описват 98 *E. gallinarum* изолати, от които 88 позитивни за *vanA* и 10 за *vanB* ген. Corso и съавт. (Corso et al. 2005) и Neves и съавт. (Neves et al. 2009) съобщават съответно за 14 *E. gallinarum* и 7 *E. gallinarum*, които носят едновременно *vanC1* и *vanA* гени. Eshaghi и съавт. (Eshaghi et al. 2015) доказват едновременно носителство на *vanC1*, *vanA* and *vanB* от *E. gallinarum*.

В настоящето проучване от 33 *E. gallinarum* и 21 *E. casseliflavus* е открит само един *E. gallinarum* с VanA фенотип и доказан *vanA* генотип. Всички останали изолати показаха VanC фенотип с ниски нива на резистентност към vancomycin (МПК: 2–16 µg/ml) и съответно с *vanC* генотип. При *E. gallinarum* е потвърден *vanC1* ген, а при *E. casseliflavus* – *vanC2*. Всички VanC изолати са чувствителни на повечето тествани антибиотици. Само 3 *E. gallinarum* (№35/ХТ, №66/ХТ и №79/КАИЛ) и 1 *E. casseliflavus* (№75/КАИЛ) показаха резистентност към пеницилини, аминогликозиди и флуорохинолони.

Изследваните от Batista и съавт. (Batistão et al. 2012) интестинални *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* изолати също са демонстрирали ниско ниво на резистентност към vancomycin (МПК 2 – 32 µg/ml). Профилът на гликопептидна резистентност при *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* като индикатор за *vanC* генотип е използван и от други автори (Britt and Potter 2016). При определяне на антимикробната чувствителност и присъствието на *van* гени при 23 *E. gallinarum* и 5 *E. casseliflavus*. Maschieto и съавт. (Maschieto et al. 2004) доказват, че всички изолати са резистентни на vancomycin, чувствителни на повечето тествани антибиотици и са позитивни на съответния за вида *vanC* ген. Сходни са данните, описани в проучването на Ekuma и съавт. (Ekuma et al. 2016).

От познатите три групи AMEs с най-голямо значение за клиничната практика са аминогликозид-О-фосфотрансферазите (APHs). Продуцираният от ентерококите бифункционален AAC(6')-APH(2'') ензим обичайно се асоциира с HLGR с МПК ≥ 500 µg/ml и HLSR с МПК ≥ 2000 µg/ml. Този ензим се кодира от *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* гена и се среща при много видове ентерококи, но най-вече при *E. faecium* и *E. faecalis* (Padmasini et al. 2014; Niu et al. 2016; Diab et al. 2019).

Най-разпространеният ген, детерминиращ резистентност към аминогликозиди сред изследваните в настоящата работа интестинални VRE, е *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Той е доказан при 17 (15 *E. faecium* и 2 *E. gallinarum*) от общо 18 ентерококи с резистентност към gentamicin. Преобладаваща част от VRE с *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* гена (n=15) изявяват HLGR фенотип с МПК ≥ 1024 µg/ml, а два *E. faecium* (№ 58/ХТ и № 26/ХТ) демонстрират МПК на gentamicin 8 – 12 µg/ml. При *E. casseliflavus* с МПК на gentamicin 64 µg/ml не е установен *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ген, поради което може да се приеме, че най-вероятно се касае за вродени механизми на резистентност.

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).

### **3.6. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ VRE**

Детерминанти на патогенността при ентерококите са описани сред изолати от различен произход – клиничен, животински или хранителен. Въпреки това данните за тяхното разпространение сред VRE, изолирани от човешкия интестинален тракт, са ограничени.

Резултатите от настоящето проучване свидетелстват за носителство на гени, кодиращи фактори на вирулентност при 30.4% от тестваните общо 69 интестинални VRE. Положителни за фактори на вирулентност са всички представители на видовете *E. faecium* и *E. faecalis* и малка част от *E. gallinarum*, като по-голяма част от изолатите (19/90.5%) са носители на повече от един вирулентен фактор. При всички 14 *E. faecium* са доказани *act* и *esp* гените, а при 2 от тях и *hyl* гена. От друга страна от 54 non-*faecium* non-*faecalis* VRE едва 6 (5 *vanC E. gallinarum* и 1 *vanA E. gallinarum*) са позитивни за гени, кодиращи фактори на вирулентност. Това свидетелства за по-широкото разпространение на фактори на вирулентност сред *E. faecium* в сравнение с *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*. Получените резултати са съпоставими с тези на Sienko и съавт. (Sieńko et al. 2017), които установяват, че броят и видовете детерминанти на вирулентност сред *E. faecium* е значително по-голям от този сред необичайни клинични ентерококови изолати като *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* и *E. durans*.

При тестване на 26 интестинални VRE Biswas и съавт. (Biswas et al. 2016) установяват детерминанти на вирулентност при 19 (61.5%), като комбинация от 2 гена е потвърдена само при 5 VRE, а преобладаващи са гените *gelE* (29.2%), *esp* (29.2%), *asa1* (25.0%), *hyl* (12.5%) и *cylA* (8.3%). Yang и съавт. (Yang et al. 2015) докладват за присъствие на *esp* и *hyl*, съответно при 62 (89.9%) и 19 (27.5%)

*E. faecium*. Авторите съобщават, че при 18 (28.6%) изолата двата посочени гена са в комбинация, а при 45 (71.4%) са представени самостоятелно. В друго проучване, обхващащо 35 интестинални *E. faecium*, е установено, че 34 (97.1%) от тях носят *esp* ген, 21 (60%) – *asa1*, 18 (51.4%) – *gelE* и само един изолат (2.8%) е позитивен за *hyl* (Marchi et al. 2018).

Данните от настоящето проучване показват, че *E. gallinarum* (6/33) са по-склонни да придобиват детерминанти на вирулентност, отколкото *E. casseliflavus* (0/21). От 6 позитивни изолата 2 са с по един ген, 3 са с два гена, а 1 е с пет гена. Тези резултати са в контраст с публикацията на Dworniczek и съавт. (Dworniczek et al. 2003, 2005), в която не се съобщава за нито един фактор на вирулентност при *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*, изолирани от уринарни катетри и други клинични проби. В други проучвания е описано присъствието на *cyfA*, *hyl* или *asa1* гени при единични интестинални изолати *E. gallinarum* (Ben Sallem et al. 2016; Biswas et al. 2016). През 2011 г. Radhouani и съавт. (Radhouani et al. 2011) установяват носителство на гени, кодиращи фактори на вирулентност при 7 от общо 8 тествани *E. gallinarum*, изолирани от фецес на червени лисици.

### **3.7. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ЕПИДЕМИОЛОГИЧНОТО ТИПИЗИРАНЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ VRE**

За да се проучи степента на генетично родство при интестиналните VRE (14 *E. gallinarum*, 8 *E. casseliflavus* и 5 *E. faecium*), изолирани от пациенти на хемодиализа, е използвана модифицирана PFGE методика за типизиране на *E. faecium* (Murray et al. 1990). При 14 *E. gallinarum* са диференцирани 13 пулсотипа, като два изолата принадлежат към един тип (PT11). При тях е доказан висок процент на генетично родство (91%) и липса на разлики в последователността на бандовете. Този резултат ни дава основание да приемем, че тези два *E. gallinarum* принадлежат към един щам (outbreak strain). Според критериите на Tenover и съавт. (Tenover et al. 1995) останалите 12 изолата се определят като несвързани (unrelated) с последния. Изследваните 8 *E. casseliflavus* се отнасят към различни пулсотипове, а степента на генетично родство варира от 34% до 62%. При тази група ентерококи не е доказан щам на епидемичен взрив.

В световен мащаб проучванията върху генотипизирането на *vanC* ентерококите са силно ограничени. През 1998 г. Clark и съавт. (Clark et al. 1998) си поставят за цел да открият и диференцират *vanC* генотиповете и да проучат разпределението на съответните *vanC* гени сред колекция от типични и атипични ентерококови щамове. Изследователите използват за осъществяване на своите цели PFGE, но установяват, че този метод не е приложим за разграничаване на ентерококи с *vanC* генотип.

PFGE анализът на 5 интестинални *vanA E. faecium* от петима пациенти на хемодиализа в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен доказва, че всички изолати се отнасят към един пулсотип (PT1). През юни 2012 г. (Попова В 2018) при фекален скрининг на пациенти от Отделението по хемодиализа на същата болница са изолирани 5 *vanA E. faecium*, но последващото типизиране с PFGE и MLST и е показало присъствие на три пулсотипа (PT002, PT003, PT005) и три секвенционни типа (ST9, ST26, ST1249) (Ivanov et al. 2018). D. Agata и съавт. (D'Agata et al. 2001) установяват общо четири пулсотипа (A, B, O и F) сред 7 фекални VR *E. faecium*, произхождащи от 7 пациенти на хемодиализа. Herrera и съавт. (Herrera et al. 2017) групират 13 VR *E. faecium* в един пулсотип – PFGE A, който кореспондира с ST17.

В настоящия труд е извършено генотипизиране на всички 13 интестинални *vanA E. faecium* с помощта на MLVA методика, разработена от Stoikov и съавт. (Stoikov et al. 2020). Установено е, че и в трите клинични звена доминира MT11. По непубликувани данни на авторите на MLVA методиката MT11 е идентичен със ST203, принадлежащ към клонален комплекс *E. faecium* CC17. Секвенционният тип ST203 циркулира на територията на нашата болница от 2013 г. (Попова В 2018).

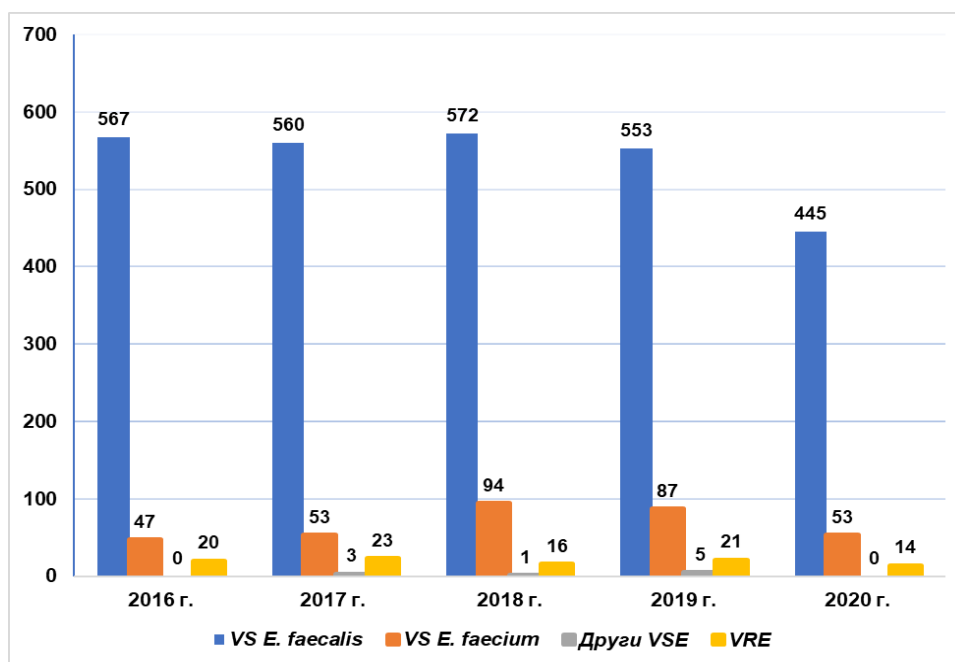
При проучените интестинални VR *E. faecium* и VR *E. faecalis* са наблюдавани два генотипа на гликопептидна резистентност – *vanA* и *vanB*. Генотипът *vanA* е налице при 13 от 14 *E. faecium* (92.9%), а *vanB* – при 1 *E. faecium* (7.1%) и при единичния *E. faecalis*. Корелация между фенотипа и генотипа на резистентност към гликопептиди е установена при всички *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*, при 2<sup>-та</sup> *vanB* изолата (*E. faecium* и *E. faecalis*) и при 5 от 13 *vanA E. faecium* (38.5%). Другите 8 *E. faecium* (61.5%) са показали VanD-*vanA* тип. Бифункционалният аминокликозиден ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* е доказан при всички 15 интестинални VRE с HLGR (МПК  $\geq 1024$   $\mu\text{g/ml}$ ) и при 2 VR *E. faecium* с

ниско ниво на резистентност към gentamicin. Носители на една и повече детерминанти на вирулентност са всички интестинални VR *E. faecium* и VR *E. faecalis* и 18.2% от *E. gallinarum* изолатите. При 12 от 14 VR *E. faecium* (85.7%) са налице *act* и *esp*, а при 2 (14.3%) тези гени са в комбинация с *hyl* гена. Петте *vanA E. faecium* от пациенти на хемодиализа в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен са с еднакви стойности на МПК, носители са на едни и същи генетични детерминанти (*aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia*, *act* и *esp*) и принадлежат към един пулсотип (PT1). С MLVA 10 е установено, че 4 от изолатите се отнасят към MT11, а един – към MT84. Изолираните *vanC* ентерококи от пациенти на хемодиализа спадат към различни пулсотипове. Общо 10 (76.9%) от 13 интестинални *vanA E. faecium*, изолирани от високорискови пациенти в трите клинични звена на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен, принадлежат към MT11.

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

### 4.1. РЕЗУЛТАТИ ЗА ЧЕСТОТА И ВИДОВО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА КЛИНИЧНИ VRE

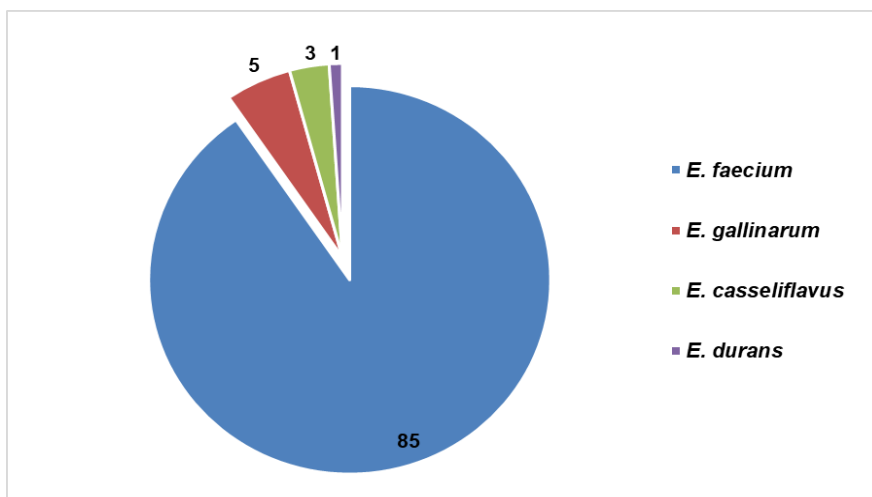
За периода 2016 г. – 2020 г. от пациенти, лекувани в УМБАЛ „Д-р Г. Странски”, Плевен, са изолирани общо 3134 ентерококи, като 2697 (86.1%) от тях са VS *E. faecalis*, 334 (10.7%) са VS *E. faecium*, 94 (3%) са VRE и 9 (0.3%) са други видове VSE. Разпространението на видовете ентерококови изолати по години е представено на **Фигура 20**. Броят на VS *E. faecalis* и VS *E. faecium* през годините остава относително постоянен със сравнително запазено съотношение между VSE и VRE.



**Фигура 20.** Разпространение по години на видовете ентерококи, изолирани от пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски”, Плевен, за периода 2016 г. – 2020 г.

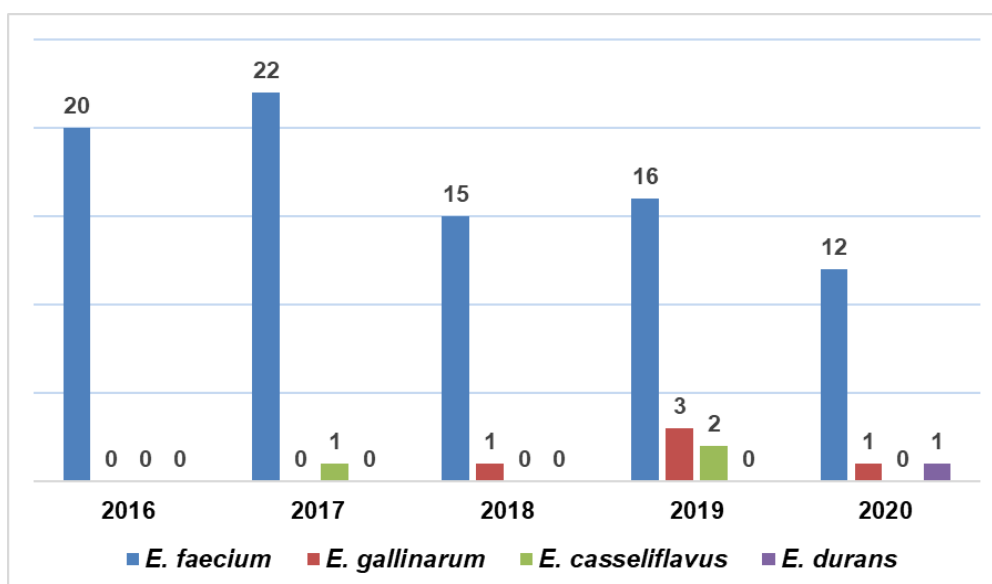
За същия период от клинични материали на болни са изолирани 94 неповтарящи се VR ентерококови изолата, които съставляват 3% от общия брой ентерококи.

Видовото разпределение на VRE е представено на **Фигура 21**. Най-голям е дялът на VR *E. faecium* – 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%).



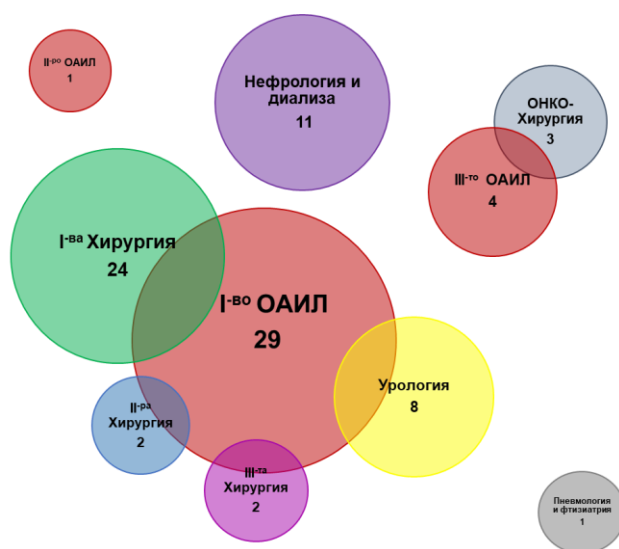
**Фигура 21.** Видово разпределение на 94 VRE, изолирани от пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски”, Плевен, за периода 2016 г. – 2020 г.

Разпространението на изолатите по години (**Фигура 22**) 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 2020г.



**Фигура 22.** Разпространение по години на 94 VRE, изолирани от пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски”, Плевен, за периода 2016 г. – 2020 г.

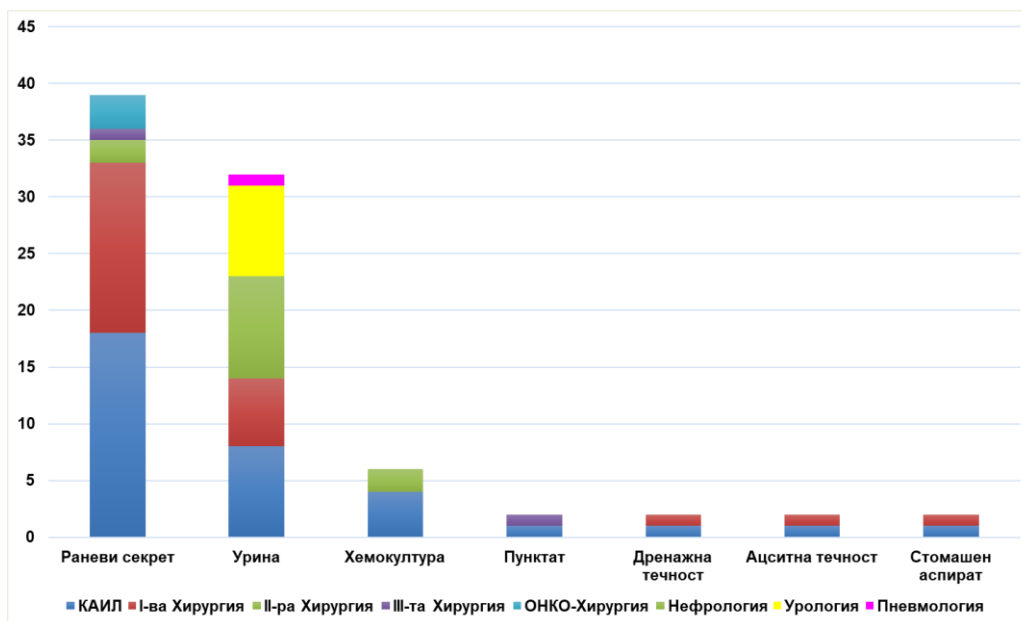
Данните за циркулацията на VR *E. faecium* в клиничните звена на болницата са представени на **Фигура 23**. Те показват, че основно са засегнати КАИЛ (I-во ОАИЛ, II-ро ОАИЛ и III-то ОАИЛ), Клиниките по Хирургия (I-ва Хирургия, II-ра Хирургия, III-та Хирургия и Клиниката по ОНКО хирургия, Клиниката по 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 23.** Разпределение на VR *E. faecium* в клиничните звена на УМБАЛ, Плевен

**Легенда:** КАИЛ обединява I-во, II-ро и III-то ОАИЛ; I-ва 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 24**. 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 24.** Разпределение на VR *E. faecium* изолатите по клинични материали и клинични звена

Разпределението на другите изолирани видове VRE по клинични звена и материали е следното: 5 vanC ентерококи са култивирани от ранев секрет – 4 *E. gallinarum* (3 от Клиниките по хирургия и 1 от КАИЛ) и 1 *E. casseliflavus* от Клиниката по ортопедия и травматология; 3 vanC изолата произхождат от урини – 2 *E. casseliflavus* (по 1 от Клиниката по урология и Клиниката по нефрология и хемодиализа) и 1 *E. gallinarum* от I<sup>ва</sup> Хирургия. Единичният щам *E. durans* е изолиран от ранев секрет на пациент с хирургична интервенция.

#### 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 25** са представени резултатите от анализа по възрастови групи и пребиваване в съответните клинични звена, а на **Таблица 26** – 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 25.** 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 26.** 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	
			раневни секрет	други*	p-value	урини	други	p-value	раневни 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 26** показва, че във възрастта 40-59 г. е установена статистически значима разлика между групата на положителните за VR *E. faecium* раневни секрети и тази на другите клинични материали ( $p=0.033$ ). Във възрастта ≥ 60 г. също са доказани статистически значими различия между положителните раневни секрети и другите материали ( $p=0.003$ ), както и между положителните урини и другите материали ( $p=0.008$ ).

#### 4.3. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ЗА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА КЛИНИЧНИ VRE В УМБАЛ „Д-Р Г. СТРАНКИ”, ПЛЕВЕН

Общият брой на клиничните ентерококови изолати в УМБАЛ „Д-р Г. Странки“, Плевен за периода януари 2016 г. – декември 2020 г. е 3134, средно 627 изолата на година. Средкова и съавт. (Средкова М 2012) съобщават за 358 щама ентерококи, изолирани за 1.5 годишен период (януари 1995 г. – юли 1996 г.) от материали на пациенти от същата болница. Идентифицирани са общо 8 вида, от които най-голям е процентът на *E. faecalis* (85.4%) и *E. faecium* (10.9%), докато делът на останалите 6 вида (*E. durans*, *E. faecalis* (var.), *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. casseliflavus* и *E. raffinosus*) е почти незначителен (Средкова М 2012). В сравнителен аспект данните показват, че за последните години броят на ентерококите в нашата болница е почти трикратно по-голям, отколкото преди 20 години. Относно видовото разпределение и понастоящем водещ е VS *E. faecalis* (86.1%), следван от VS *E. faecium* (10.7%). В Европа, Северна Америка, Латинска Америка и Азиатско-тихоокеанския регион също преобладават *E. faecalis* изолатите, следвани от *E. faecium*. Делът на други потвърдени ентерококови видове като *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. devriesei*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. raffinosus*, *E. hirae* и др. е незначителен (Pfaller et al. 2019).

Освен нарастващия брой на ентерококовите изолати в България през последните години сериозен проблем е появата и разпространението на VRE. Както у нас, така и в света водещ сред VRE е видът *E. faecium* (Pfaller et al. 2019).

През 2014 г. и съавт. (Попова В и съавт. 2014) докладват VRE изолати в УМБАЛ „Д-р Г. Странки“, Плевен. При проучване на 77 клинични *E. faecium*, изолирани за периода 01.03.2013 г. – 28.02.2014 г., авторите доказват резистентност към vancomycin при 13 (16.9%) от тях. От тогава започва и циркулацията на VRE в болницата.

За периода 2016 г. – 2019 г. броят на VR *E. faecium* е между 15-22, докато през 2020 г. се наблюдава известен спад (n=12), който кореспондира с намаление на общия брой ентерококи, изолирани през същата година. Вероятната причина за по-малкия брой ентерококови изолати и съответно VR *E. faecium* са въведените Covid-19 ограничения на територията на България през 2020 г. Тези рестрикции засегнаха нормалния ритъм на работа на болничните звена, а това доведе до значително ограничаване на пациентопотока към тях.

УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен е Университетска болница със средно 950 легла, разделени в две основни бази – I<sup>-ва</sup> и II<sup>-ра</sup>, разположени в различни части на града. По-голямата част от клиничните звена са локализирани в I<sup>-ва</sup> Клинична база, структурата на която е представена от една основна сграда и редица по-малки. Циркулация на VR *E. faecium* е установена в общо 8 Клиники, 7 от които влизат в състава на I<sup>-ва</sup> Клинична база. Това са КАИЛ, I<sup>-ва</sup> Хирургия, II<sup>-ра</sup> Хирургия, III<sup>-та</sup> Хирургия и ОНКО-Хирургия, Клиниката по нефрология и диализа и Клиниката по урология. Единствено Клиниката по пневмология и фтизиатрия е част от територията на II<sup>-ра</sup> Клинична база. Най-тясна е връзката на I<sup>-во</sup> ОАИЛ с прилежащите хирургични звена – I<sup>-ва</sup> Хирургия, II<sup>-ра</sup> Хирургия, III<sup>-та</sup> Хирургия и Клиниката по урология, както и на III<sup>-то</sup> ОАИЛ с Клиниката по ОНКО-Хирургия. Обменът на пациенти и персонал между интензивни и хирургични отделения е предпоставка за разпространение на редица проблемни микроорганизми, в това число и VRE. Това е една от основните причини за високата честота на VR *E. faecium*, изолирани в тези звена. Друга възможна причина е способността на VRE да колонизират интестиналния тракт на хоспитализирани пациенти. Известно е, че веднъж колонизирани те остават така в продължение на седмици или месеци (Byers et al. 2002; Sohn et al. 2013). Освен че могат да се разпространяват чрез директен контакт между пациент-пациент, VRE се предават и индиректно в случай на транзиторно носителство по ръцете на здравния персонал, чрез контаминирани медицински инструменти и други елементи на болничната среда (Kramer et al. 2006; Zirakzadeh and Patel 2006). Ентерококите оцеляват дълго време върху различни повърхности, толерантни са към топлина, хлор и някои алкохолни препарати. Всички тези фактори увеличават възможността за тяхното предаване при хоспитализирани болни, особено такива, лекувани в хирургични и интензивни звена (Brinkwirth et al. 2021).

Анализът на данните в настоящето проучване доказва статистически значими разлики при съпоставяне на пациентите с VR *E. faecium* по възраст и клинични звена, а така също по възраст и видове материали. В две от възрастовите групи – 40-59 г. и  $\geq 60$  г. най-засегнати са болните в КАИЛ и I<sup>-ва</sup> Хирургия, съответно  $p=0.039$  и  $p=0.005$ . В мета-анализа на Brinkwirth и съавт. (Brinkwirth et al. 2021) е докладвана високата честота на вътреболнични VRE инфекции, особено сред лицата на интензивно лечение. От друга страна Cassini

и съавт. установяват, че честотата на инфекциите, причинени от VRE е значително по-висока при новородени (< 1 г.) и при лица на възраст  $\geq 65$  г.

Във възрастта 40-59 г. е налице статистически значима разлика между групата на положителните раневи секрети и тази на другите клинични материали ( $p=0.033$ ). Във възрастта над 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 ( $p=0.008$ ). Общо раневите секрети и урините с VR *E. faecium* са 2 пъти повече, отколкото другите проби при пациентите между 40-59 г. и около 3 пъти повече при пациентите над 60 г. Това потвърждава водещото значение на VR *E. faecium* в патогенезата на уроинфекциите и постоперативните инфекции. 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.

Спектърът на инфекции, причинени от ентерококите, е описан още през 1990г. от Murray (Murray 1990) и до момента не търпи съществени промени. Тези микроорганизми са сред водещите причинители на уроинфекции, интраабдоминални, пелвични и постоперативни инфекции, бактериемия и инфекциозен ендокардит (Hill et al. 2006; Sievert et al. 2013; Pfaller et al. 2019). В редки случаи те са замесени в патогенезата на инфекции на централната нервна система (Wang et al. 2014) и долните отдели на респираторния тракт (Grupper et al. 2009).

В обобщение, VRE представляват 3% от ентерококите, изолирани в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен за периода 2016 г. – 2020 г., като честотата на VRE през годините остава относително постоянна. Най-голям е дялът на VR *E. faecium* – 90.4%. Другите VRE са представени от единични изолати. Раневите секрети и урините съставляват общо 83.5% от клиничните материали положителни за VR *E. faecium*. Този микроорганизъм циркулира основно в отделенията за интензивни грижи и прилежащите им хирургични звена, където са установени 76.5% от изолатите. Най-засегната е възрастта  $\geq 60$  г., включваща 72.9% от пациентите. Повече от 2/3 от пациентите с VR *E. faecium*  $\geq 60$  г. са лица на интензивно лечение или с хирургични интервенции.

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

Общо 117 VRE изолирани от клинични материали на хоспитализирани пациенти от четири болници в България са тествани за чувствителност към 12 антимикробни препарата, изследвани са за гени детерминиращи резистентност към гликопептидни и аминогликозидни антибиотици и за гени кодиращи фактори на вирулентност. Извършено е епидемиологично типизиране на всички *vanA* *E. faecium* изолати.

### 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 27** са представени резултати за антимикробната чувствителност на всички 85 клинични изолата VR *E. faecium* определени чрез ДДМ, а на **Таблица 28** – стойностите на МПК и доказаните *van* гени при същите изолати.

Данните показват, че сред тестваните VRE са налице два основни генотипа на гликопептидна резистентност – *vanA* и *vanB*. Генът *vanB* (**Фигура 25 Б**) 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* (**Фигура 25 А и Б**). 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*).

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).

На **Таблица 29** са представени резултатите за антимикробната чувствителност на 9 non-*faecium*/non-*faecalis* изолата определени чрез ДДМ, а на **Таблица 30** – стойностите на МПК и доказаните *van* гени при същите изолати.

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* (**Фигура 25 Б**), а *vanC2* – при 3 *E. casseliflavus* (**Фигура 25 А**). 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.

**Таблица 27.** Антимикробна чувствителност на 85 клинични VR *E. faecium*, определена чрез ДДМ

Брой изолати	Резистентност (R) / Чувствителност (S)									
	AMP	GEN	STM	CIP	VAN*	TEC*	TGC	LZD	Q/D	IMP
<b>2016 година</b>										
19	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	9 <sup>R</sup> - 12 <sup>R</sup>	S	S	S	R
1	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=12 <sup>R</sup>	S	S	R	R
<b>2017 година</b>										
19	S	R	S	S	=6 <sup>R</sup>	9 <sup>R</sup> - 15 <sup>R</sup>	S	S	S	R
3	S	R	S	S	=6 <sup>R</sup>	=6 <sup>R</sup>	S	S	S	R
<b>2018 година</b>										
14	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	9 <sup>R</sup> - 14 <sup>R</sup>	S	S	S	R
1	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=18 <sup>R</sup>	S	S	S	R
<b>2019 година</b>										
14	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	9 <sup>R</sup> -15 <sup>R</sup>	S	S	S	R
2	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	6 <sup>R</sup> -8 <sup>R</sup>	S	S	S	R
<b>2020 година</b>										
10	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	11 <sup>R</sup> -13 <sup>R</sup>	S	S	S	R
1	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=8 <sup>R</sup>	S	S	S	R
1	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=6 <sup>R</sup>	S	S	S	R

**Легенда** AMP: ampicillin; GEN: gentamicin; STM: streptomycin; CIP: ciprofloxacin; LVX: levofloxacin; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; IMP: imipenem; TGC: tigecycline; LZD: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin.

\* Зоните на потискане на растеж са отбелязани в милиметри (mm).

**Таблица 28.** 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.

**Таблица 29.** Антимикробна чувствителност на 9 клинични non-*faecium*/non-*faecalis*, определена чрез ДДМ

Изолат №/ година	Вид	Резистентност (R) / Чувствителност (S)									
		AMP	GEN	STM	CIP	LVX	VAN*	TEC*	IMP	TGC	LZD
405/18	<i>E. gallinarum</i>	S	S	S	S	S	=8 <sup>R</sup>	=20 <sup>S</sup>	S	S	S
1029/19	<i>E. gallinarum</i>	S	S	S	S	S	=8 <sup>R</sup>	=20 <sup>S</sup>	S	S	S
3486/19	<i>E. gallinarum</i>	S	S	S	S	S	=9 <sup>R</sup>	=19 <sup>S</sup>	S	S	S
4364/19	<i>E. gallinarum</i>	S	S	S	S	S	=10 <sup>R</sup>	=19 <sup>S</sup>	S	S	S
5509/20	<i>E. gallinarum</i>	S	S	S	S	S	=12 <sup>R</sup>	=21 <sup>S</sup>	S	S	S
2293/17	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	S	=11 <sup>R</sup>	=19 <sup>S</sup>	S	S	S
199/19	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	S	=10 <sup>R</sup>	=20 <sup>S</sup>	S	S	S
5770/19	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	S	=12 <sup>R</sup>	=18 <sup>S</sup>	S	S	S
2349/20	<i>E. durans</i>	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=10 <sup>R</sup>	R	S	S

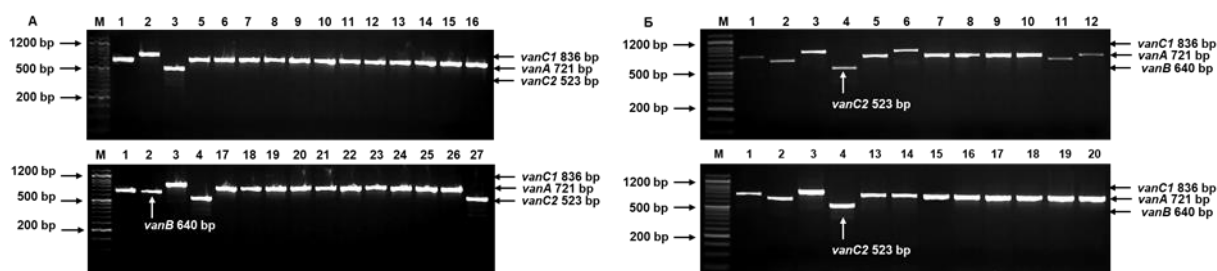
**Легенда** AMP: ampicillin; GEN: gentamicin; STM: streptomycin; CIP: ciprofloxacin; LVX: levofloxacin; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; IMP: imipenem; TGC: tigecycline; LZD: linezolid.

\* Зоните на потискане на растеж са отбелязани в милиметри (mm).

**Таблица 30.** Стойности на МПК и *van* гени при 9 клинични non-*faecium*/non-*faecalis*

Изолат №/ година	Вид	МПК (µg/ml)								<i>van</i> ген
		AMP	GEN	CIP	VAN	TEC	TGC	LZD	DAP	
405/18	<i>E. gallinarum</i>	1	12	1	8	0.50	0.125	3	6	<i>vanC1</i>
1029/19	<i>E. gallinarum</i>	0.50	4	1.5	4	0.50	0.125	1.5	4	<i>vanC1</i>
3486/19	<i>E. gallinarum</i>	0.38	4	0.75	4	0.50	0.094	1	6	<i>vanC1</i>
4364/19	<i>E. gallinarum</i>	0.50	6	1.5	6	0.50	0.125	2	6	<i>vanC1</i>
5509/20	<i>E. gallinarum</i>	0.38	4	0.75	4	0.038	0.047	1	2	<i>vanC1</i>
2293/17	<i>E. casseliflavus</i>	1	4	1.5	4	0.50	0.125	1	6	<i>vanC2</i>
199/19	<i>E. casseliflavus</i>	1.5	1.5	6	8	0.75	0.064	3	4	<i>vanC2</i>
5770/19	<i>E. casseliflavus</i>	0.50	3	1	4	1	0.094	2	4	<i>vanC2</i>
2349/20	<i>E. durans</i>	≥256	≥1024	≥32	≥256	16	0.064	3	6	<i>vanA</i>

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



**Фигура 25.** (А) Откриване на *vanA* и *vanC2* гени при 22 *E. faecium* и 1 *E. casseliflavus* изолати/2017 г. чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № ATCC 700221 *E. faecium*; Линия 2 - ATCC 51299 *E. faecalis*; Линия 3 - ATCC 49608 *E. gallinarum*; Линия 4 - ATCC 700668 *E. casseliflavus*; Линия 5 - № 460; Линия 6 - № 1179; Линия 7 - № 1155; Линия 8 - № 2178; Линия 9 - № 2310; Линия 10 - № 2480; Линия 11 - № 2596; Линия 12 - № 1837; Линия 13 - № 3126; Линия 14 - №1738; Линия 15 - № 2815; Линия 16 - № 2965; Линия 17 - № 5373; Линия 18 - № 5291; Линия 19 - № 5474; Линия 20 - № 5748; Линия 21 - № 6213; Линия 22 - № 4103; Линия 23 - № 4276; Линия 24 - №3987; Линия 25 - № 4393; Линия 26 - № 4237; Линия 27 - № 2293 (*E. casseliflavus*).

(Б) Откриване на *vanA*, *vanB* и *vanC1* гени при 15 *E. faecium* и 1 *E. gallinarum* изолати/2018 г. чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № ATCC 700221 *E. faecium*; Линия 2 - ATCC 51299 *E. faecalis*; Линия 3 - ATCC 49608 *E. gallinarum*; Линия 4 - ATCC 700668 *E. casseliflavus*; Линия 5 - № 424; Линия 6 - № 405 (*E. gallinarum*); Линия 7 - № 1101; Линия 8 - № 1443; Линия 9 - № 3210; Линия 10 - № 1686; Линия 11 - № 3239; Линия 12 - № 3943; Линия 13 - № 2761; Линия 14 - № 4318; Линия 15 - № 3452; Линия 16 - № 3504; Линия 17 - № 5834; 18 - № 5839; Линия 19 - № 4453; Линия 20 - № 642.

### 5.1.2. Резултати за други клинични центрове

На **Таблица 31** са представени данни за антимикробната чувствителност на 23 *E. faecium* от три други клинични центъра определени чрез ДДМ, а на **Таблица 32** – стойностите на МПК и доказаните *van* гени при същите изолати.

**Таблица 31.** Антимикробна чувствителност на 23 клинични VR *E. faecium*, определена чрез ДДМ

Изолат №/ година	Резистентност (R) / Чувствителност (S)										
	AMP	GEN	STM	CIP	LVX	VAN	TEC	IMP	TGC	LZD	Q/D
<b>УМБАЛ „Св. Марина“</b>											
541391/17	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=9 <sup>R</sup>	R	S	S	S
688345/19	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=8 <sup>R</sup>	R	S	S	S
706032/19	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=11 <sup>R</sup>	R	S	S	S
774226/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=9 <sup>R</sup>	R	S	S	S
<b>МБАЛ „Сърце и Мозък“</b>											
812/19	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=10 <sup>R</sup>	R	S	S	S
919/19	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=9 <sup>R</sup>	R	S	S	S
1039/19	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=10 <sup>R</sup>	R	S	S	S
1404/19	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=11 <sup>R</sup>	R	S	S	S
1506/19	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=10 <sup>R</sup>	R	S	S	S
<b>Аджибадем Сити клиник УМБАЛ „Токуда“</b>											
11404/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=10 <sup>R</sup>	R	S	S	S
497/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=9 <sup>R</sup>	R	S	S	S
3141/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=10 <sup>R</sup>	R	S	S	S
11550/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=10 <sup>R</sup>	R	S	S	S
4760/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=18 <sup>S</sup>	R	S	S	S
359/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=6 <sup>R</sup>	R	S	S	S
11271/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=6 <sup>R</sup>	R	S	S	S
4572/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=9 <sup>R</sup>	R	S	S	S
6996/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=9 <sup>R</sup>	R	S	S	S
4347/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=9 <sup>R</sup>	R	S	S	S
25/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=9 <sup>R</sup>	R	S	S	S
2460/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=10 <sup>R</sup>	R	S	S	S
514/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=11 <sup>R</sup>	R	S	S	S
3148/20	R	R	R	R	R	=6 <sup>R</sup>	=10 <sup>R</sup>	R	S	S	S

**Легенда** AMP: ampicillin; GEN: gentamicin; STM: streptomycin; CIP: ciprofloxacin; LVX: levofloxacin; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; IMP: imipenem; TGC: tigecycline; LZD: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin.

\* Зоните на потискане на растеж са отбелязани в милиметри (mm).

Сред тестваните 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.

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

**Таблица 32.** Стойности на МПК и *van* гени при 23 клинични VR *E. faecium*

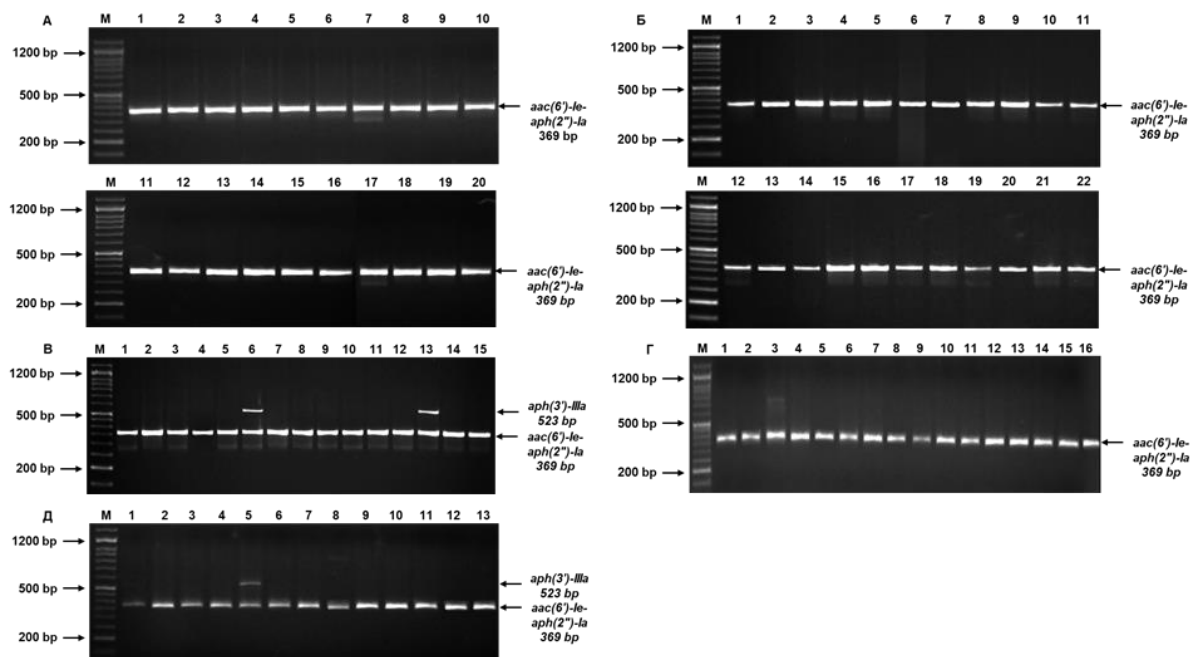
Изолат №/ година	МПК (µg/ml)									<i>van</i> гени
	AMP	GEN	CIP	VAN	TEC	TGC	LZD	Q/D	DAP	
<b>УМБАЛ „Св. Марина“</b>										
541391/17	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.064	2	3	6	<i>vanA</i>
688345/19	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.125	2	0.50	6	<i>vanA</i>
706032/19	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>6</b>	0.125	1	0.50	6	<i>vanA</i>
774226/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.064	2	3	4	<i>vanA</i>
<b>МБАЛ „Сърце и Мозък“</b>										
812/19	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>12</b>	0.064	1	0.50	6	<i>vanA</i>
919/19	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.047	1.5	0.50	4	<i>vanA</i>
1039/19	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>12</b>	0.064	1	0.38	6	<i>vanA</i>
1404/19	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.125	2	0.50	4	<i>vanA</i>
1506/19	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>6</b>	0.094	2	0.50	4	<i>vanA</i>
<b>Аджибадем Сити клиник УМБАЛ „Токуда“</b>										
11404/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>8</b>	0.064	2	0.38	6	<i>vanA</i>
497/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.094	3	0.75	6	<i>vanA</i>
3141/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.047	3	0.50	4	<i>vanA</i>
11550/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>8</b>	0.064	2	0.38	6	<i>vanA</i>
4760/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>0.75</b>	0.047	2	0.50	6	<i>vanB</i>
359/20	≥256	<b>96</b>	≥32	≥256	<b>32</b>	0.064	3	0.50	6	<i>vanA</i>
11271/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.094	1.5	0.50	4	<i>vanA</i>
4572/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>12</b>	0.064	2	0.38	6	<i>vanA</i>
6996/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.094	1.5	0.50	6	<i>vanA</i>
4347/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>12</b>	0.064	2	0.38	4	<i>vanA</i>
25/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>12</b>	0.064	2	0.75	6	<i>vanA</i>
2460/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.064	3	0.50	6	<i>vanA</i>
514/20	≥256	<b>12</b>	≥32	≥256	<b>16</b>	0.047	2	0.75	6	<i>vanA</i>
3148/20	≥256	≥1024	≥32	≥256	<b>16</b>	0.094	3	0.75	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.

## 5.2. ДЕТЕКЦИЯ НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ АМИНОГЛИКОЗИДИ ПРИ КЛИНИЧНИ VRE

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

На **Фигура 26 А, Б, В, Г и Д** са представени данни от PCR анализа, доказващи присъствието на АМЕ гени при 85 клинични изолата VR *E. faecium*.



**Фигура 26. (А)** Откриване на *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia* ген при *E. faecium* изолати/2016 г. чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № 1813; Линия 2 - № 1903; Линия 3 - № 2211; Линия 4 - № 2096; Линия 5 - № 1351; Линия 6 - № 2544; Линия 7 - № 2955; Линия 8 - № 2349; Линия 9 - № 3090; Линия 10 - № 3778; Линия 11 - № 3873; Линия 12 - № 4456; Линия 13 - № 4234; Линия 14 - № 4267; Линия 15 - № 4389; Линия 16 - № 2850; Линия 17 - № 5856; Линия 18 - № 6057; Линия 19 - № 6059; Линия 20 - № 6077.

**(Б)** Откриване на *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia* гени при *E. faecium* изолати/2017 г. чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № 460; Линия 2 - № 1179; Линия 3 - № 1155; Линия 4 - № 2178; Линия 5 - № 2310; Линия 6 - № 2480; Линия 7 - № 2596; Линия 8 - № 1837; Линия 9 - № 3126; Линия 10 - № 1738; Линия 11 - № 2815; Линия 12 - № 2965; Линия 13 - № 5373; Линия 14 - № 5291; Линия 15 - № 5474; Линия 16 - № 5748; Линия 17 - № 6213; Линия 18 - № 4103; Линия 19 - № 4276; Линия 20 - № 3987; Линия 21 - № 4393; Линия 22 - № 4237.

**(В)** Откриване на *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia* и *aph(3)-IIIa* гени при *E. faecium* изолати/2018 г. чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № 424; Линия 2 - № 1101; Линия 3 - № 1443; Линия 4 - № 3210; Линия 5 - № 1686; Линия 6 - № 3239; Линия 7 - № 3943; Линия 8 - № 2761; Линия 9 - № 4318; Линия 10 - № 3452; Линия 11 - № 3504; Линия 12 - № 5834; 13 - № 5839; Линия 14 - № 4453; Линия 15 - № 642.

**(Г)** Откриване на *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia* гени при *E. faecium* изолати/2019 г. чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № 238; Линия 2 - № 275; Линия 3 - № 504; Линия 4 - № 1073; Линия 5 - № 540; Линия 6 - № 569; Линия 7 - № 1219; Линия 8 - № 1555; Линия 9 - № 2106; Линия 10 - № 1337; Линия 11 - № 2211; Линия 12 - № 3294; Линия 13 - № 5050; Линия 14 - № 3544; Линия 15 - № 4191; Линия 16 - № 6126.

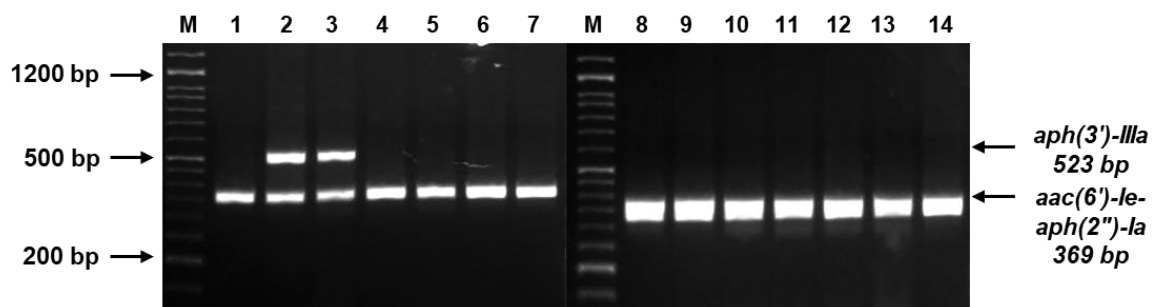
**(Д)** Откриване на *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia* и *aph(3)-IIIa* гени при 12 *E. faecium* и 1 *E. durans* изолати/2020 г. чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Genaxxon*); Линия 1 - № 806; Линия 2 - № 1328; Линия 3 - № 2050; Линия 4 - № 2410; Линия 5 - № 2349 (*E. durans*); Линия 6 - № 2508; Линия 7 - № 2606; Линия 8 - № 1824; Линия 9 - № 4767; Линия 10 - № 5527; Линия 11 - № 3250; Линия 12 - № 3287; Линия 13 - № 5791.

Всички 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 нива на резистентност към gentamicin (МПК: 6 – 8  $\mu\text{g/ml}$ ), също е доказан този бифункционален ген.

### 5.2.2. Резултати за други клинични центрове

На **Фигура 27** са представени резултатите от PCR анализа за откриване на АМЕ гени при 14 клинични изолата VR *E. faecium* от УМБАЛ „Токуда“-София.

Генът *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* е потвърден при всички ентерококови изолати, 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 доказаната *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  $\mu\text{g/ml}$ ).



**Фигура 27.** Откриване на *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* и *aph(3')-IIIa* гени при 14 *E. faecium* изолати чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Gelaxxon*); Линия 1 - № 1140 1; Линия 2 - № 497; Линия 3 - № 3141; Линия 4 - № 11550; Линия 5 - № 4760; Линия 6 - № 359; Линия 7 - № 11271; Линия 8 - № 4752; Линия 9 - № 6996; Линия 10 - № 25; Линия 11 - № 2460; Линия 12 - № 514; Линия 13 - № 3148; Линия 14 - № 4347.

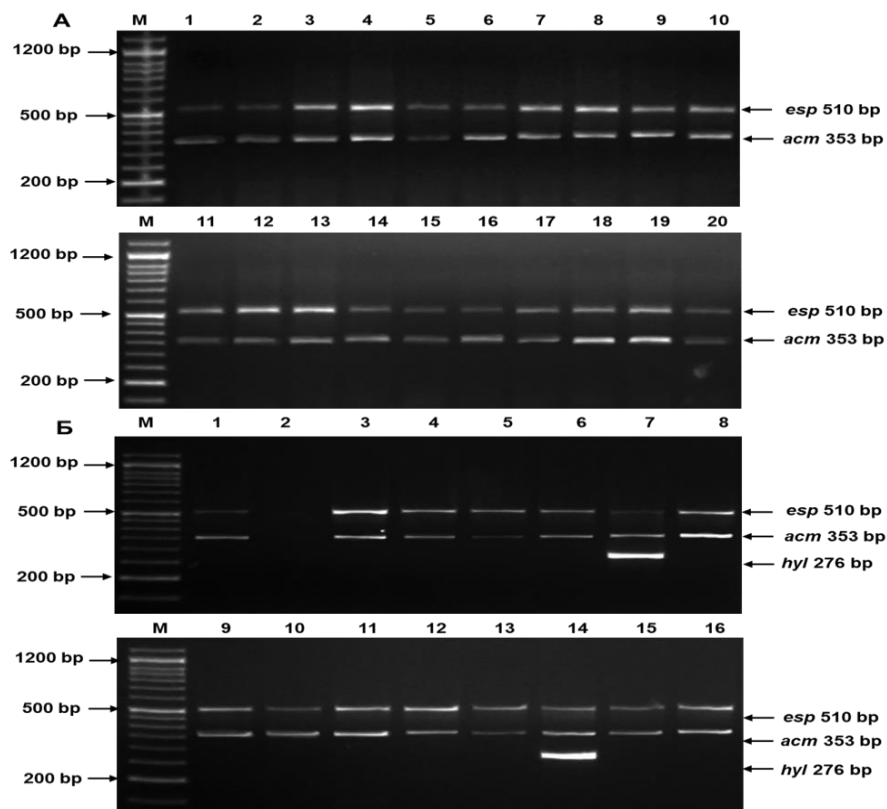
Проучените 9 VR *E. faecium* (4 от УМБАЛ „Св. Марина“, Плевен и 5 от МБАЛ „Сърце и мозък“, Плевен) са с високи нива на резистентност към gentamicin (МПК  $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ ) и при всички тях е открит *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Два *E. faecium* от УМБАЛ „Св. Марина“ са позитивни и за *aph(3')-IIIa* 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* (Таблица 33). Един *E. faecium* е носител само на *gelE* ген, а при друг са налични четири гени за вирулентност – *gelE*, *asa1*, *esp* и *ace* (Таблица 33).

Фигура 28 илюстрира PCR резултатите от детекцията на гени, кодиращи фактори на вирулентност при 36 VRE изолирани от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен.



**Фигура 28. (А) Откриване на *esp* и *act* гени при 20 *E. faecium* изолати/2016 г. чрез мултиплексен PCR.** М, маркер с размер 50bp (*Gelaxxon*); Линия 1 - № 1813; Линия 2 - № 1903; Линия 3 - № 2211; Линия 4 - № 2096; Линия 5 - № 1351; Линия 6 - № 2544; Линия 7 - № 2955; Линия 8 - № 2349; Линия 9 - № 3090; Линия 10 - № 3778; Линия 11 - № 3873; Линия 12 - № 4456; Линия 13 - № 4234; Линия 14 - № 4267; Линия 15 - № 4389; Линия 16 - № 2850; Линия 17 - № 5856; Линия 18 - № 6057; Линия 19 - № 6059; Линия 20 - № 6077.

**(Б) Откриване на *esp*, *act* и *hyl* гени при 15 *E. faecium* и 1 *E. gallinarum* изолати/2018 г. чрез мултиплексен PCR.** М, маркер с размер 50bp (*Gelaxxon*); Линия 1 - № 424; Линия 2 - № 405 (*E. gallinarum*); Линия 3 - № 1101; Линия 4 - № 1443; Линия 5 - № 3210; Линия 6 - № 1686; Линия 7 - № 3239; Линия 8 - № 3943; Линия 9 - № 2761; Линия 10 - № 4318; Линия 11 - № 3452; Линия 12 - № 3504; Линия 13 - № 5834; 14 - № 5839; Линия 15 - № 4453; Линия 16 - № 642.

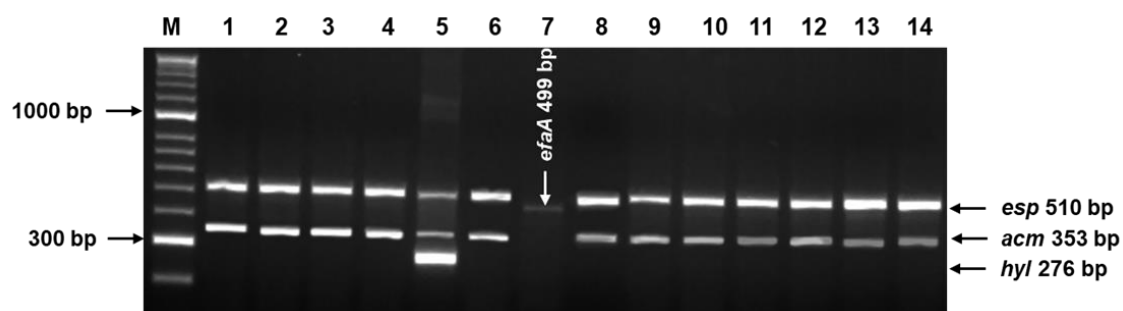
При нито един от тестваните клинични *vanC* ентерококи не е установено присъствие на гени за вирулентност, докато при *E. durans* е налице комбинация от 2 гена – *act* и *hyl*.

**Таблица 33.** Разнообразни генетични профили за фактори на вирулентност при клинични VRE *E. faecium* от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен

Изолат №/ година	ВИД	ГЕНИ, КОДИРАЩИ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ							
		<i>gelE</i>	<i>hyl</i>	<i>asa1</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>	<i>cylA</i>	<i>ace</i>	<i>act</i>
3239/2018 г.	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-	+	-	-	+
5839/2018 г.	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-	+	-	-	+
3294/2019 г.	<i>E. faecium</i>	-	+	-	-	+	-	-	+
4191/2019 г.	<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	+	-	-	+
2508/2020 г.	<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	+	-	-	+
1824/2020 г.	<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	+	-	-	+
4767/2020 г.	<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
504/2019 г.	<i>E. faecium</i>	+	-	+	-	+	-	+	-

### 5.3.2. Резултати за други клинични центрове

Разпространението на гени, кодиращи фактори на вирулентност при клинични VRE от УМБАЛ „Токуда“, София е представено на **Фигура 29**.



**Фигура 29.** Откриване на *esp*, *efaA*, *act* и *hyl* гени при 14 *E. faecium* изолати чрез мултиплексен PCR. М, маркер с размер 50bp (*Bioline, USA*); Линия 1 - № 1140 1; Линия 2 - № 497; Линия 3 - № 3141; Линия 4 - № 11550; Линия 5 - № 4760; Линия 6 - № 359; Линия 7 - № 11271; Линия 8 - № 4752; Линия 9 - № 6996; Линия 10 - № 25; Линия 11 - № 2460; Линия 12 - № 514; Линия 13 - № 3148; Линия 14 - № 4347.

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

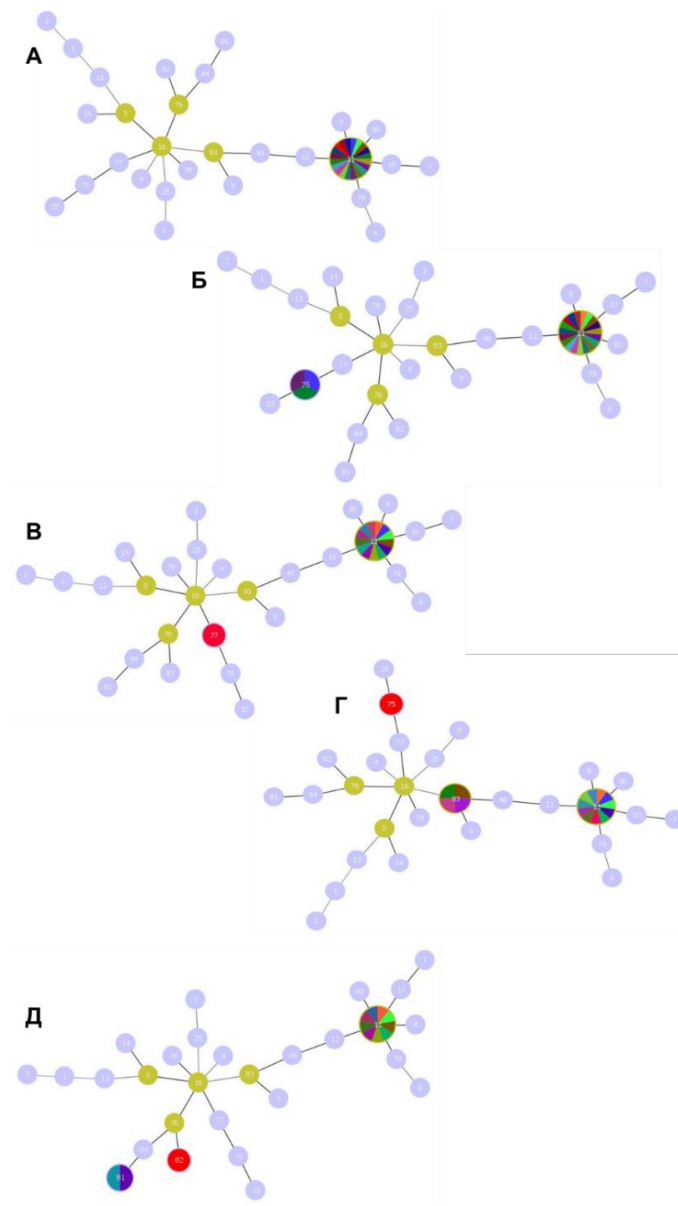
На **Фигура 30** са показани филогенетичните дървета, отразяващи генетичната връзка между *vanA E. faecium* изолатите, а **Фигура 31** илюстрира групирането им под формата на дендрограми в зависимост от броя на тандемните повтори във всеки локус. Генотипизирането е извършено посредством MLVA10, а филогенетичните дървета и дендрограмите са представени по години.

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.

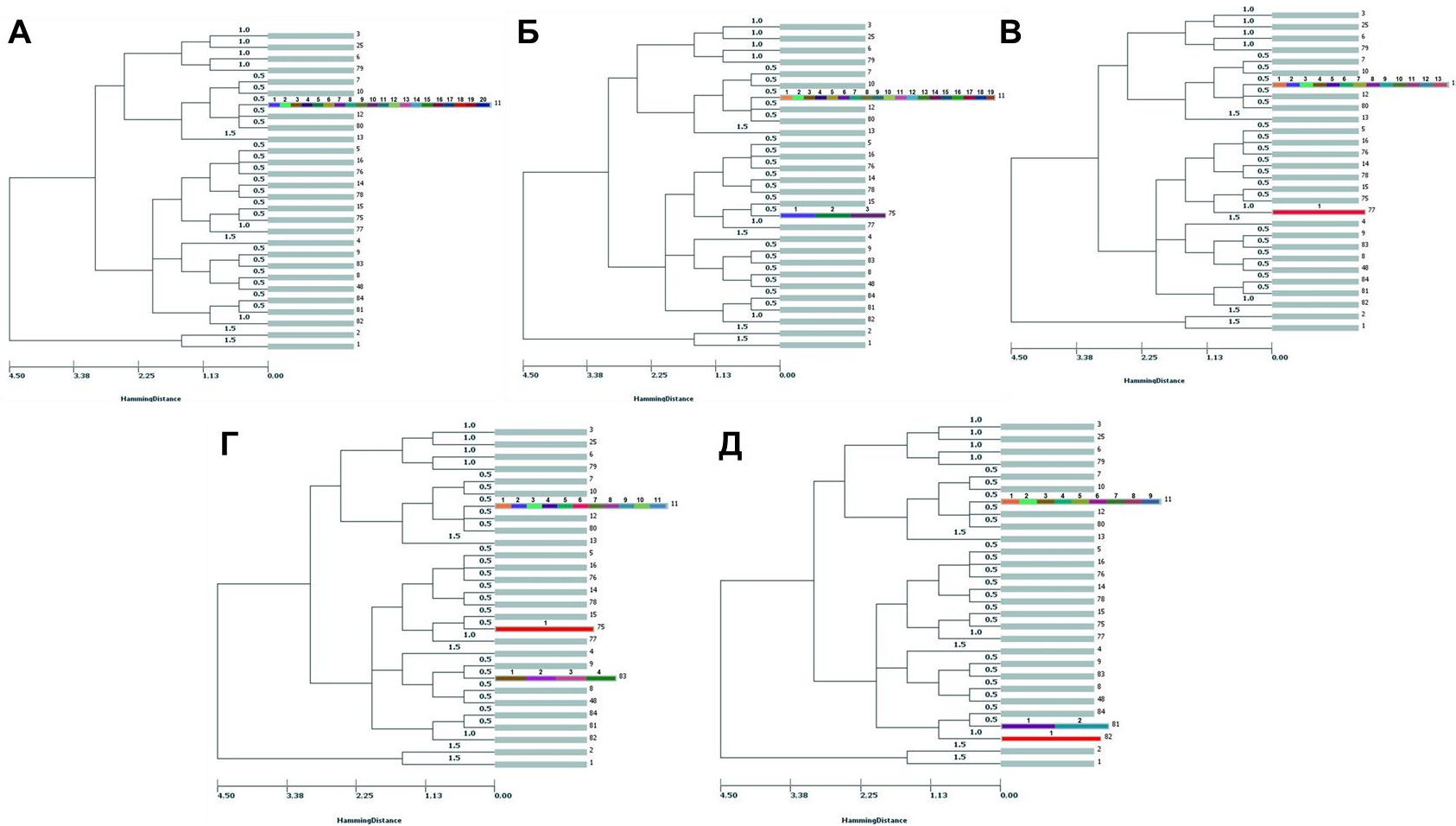
За проучвания период се наблюдава определена динамика на мултилокусните типове, свързана с появата на нови такива. През 2016 г. всички 20 *E. faecium* се отнасят към MT11. През 2017 г. от 22 изолата, 19 принадлежат към MT11, а при 3 е доказан нов тип – MT75. Прави впечатление, че два изолата MT75 *E. faecium* са от ОНКО отделения (1 от ОНКО-АРО и 1 от ОНКО-Хирургия) (**Таблица 34**), а третият е от Клиниката по пневмология и фтизиатрия (**Таблица 34**). 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 MT11, а 1 – към MT77. Последният е изолиран от I<sup>BO</sup> ОАИЛ (**Таблица 34**). През 2019 г. от 16 изолата, 11 принадлежат към MT11, 4 – към MT83 и 1 – към MT75. Два MT83 и единичният MT75 са изолирани от I<sup>BO</sup> ОАИЛ, а други два MT83 – от Клиниката по нефрология и хемодиализа (**Таблица 34**). През 2020 г. от 12 изолата, 9 са към MT11. Останалите три принадлежат към новопоявилите се MT81 и MT82, съответно 2 *E. faecium* към първия и 1 *E. faecium* към втория тип. MT81 са изолирани респективно от I<sup>BA</sup> Хирургия и I<sup>BO</sup> ОАИЛ, а MT82 – от Клиниката по нефрология и хемодиализа (**Таблица 34**).

При сравнение на фенотипните и генотипните характеристики на MT11 изолатите е установено, че всички 72 *E. faecium* с MT11 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 30.** 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; (B) 2018 г. – MT11 и MT77; (Г) 2019 г. – MT11, MT75 и MT83; 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.



**Фигура 31.** 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; **(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*.

**Таблица 34.** Профили на 12 *vanA E. faecium* от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен, с мултилокусни типове, различни от MT11

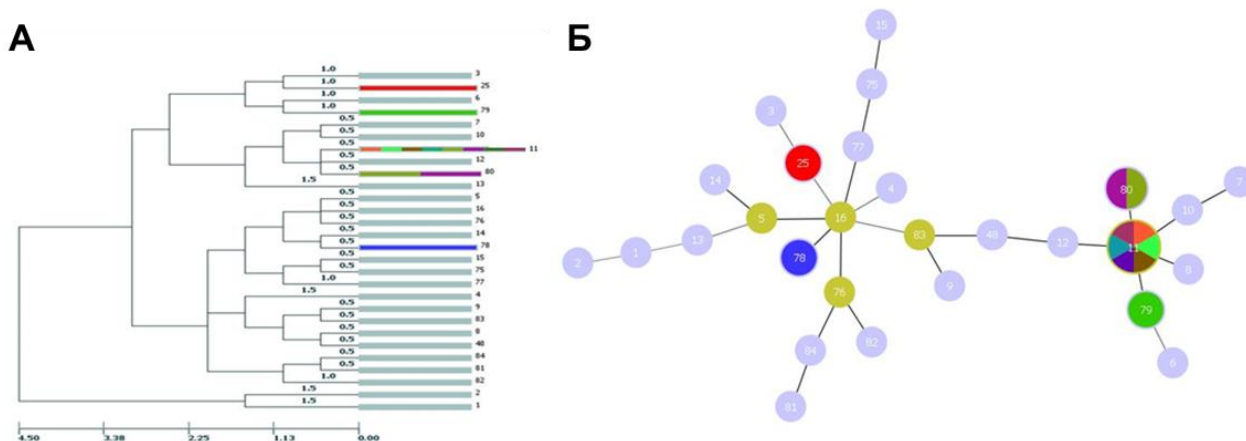
№ изолат	Клинично звено	Клиничен материал	Година на изолиране	VAN (µg/ml)	TEC (µg/ml)	Генотип	АЕМ гени		Гени за вирулентност				MT
							<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>act</i>	<i>esp</i>	<i>hyl</i>	<i>gelE</i>	
1179	Пневмология	урина	2017	≥ 256	≥ 256	<i>vanA</i>	+	-	+	+	-	-	75
2310	ОНКО-Хирургия	ранев секрет	2017	≥ 256	≥ 256	<i>vanA</i>	+	-	+	+	-	-	75
3126	ОНКО-АРО	ранев секрет	2017	≥ 256	≥ 256	<i>vanA</i>	+	-	+	+	-	-	75
5839	I <sup>во</sup> ОАИЛ	ранев секрет	2018	≥ 256	16	<i>vanA</i>	+	-	+	+	+	-	77
275	Нефрология	урина	2019	≥ 256	16	<i>vanA</i>	+	-	+	+	-	-	83
540	Нефрология	урина	2019	≥ 256	6	<i>vanA</i>	+	-	+	+	-	-	83
1555	I <sup>во</sup> ОАИЛ	ранев секрет	2019	≥ 256	6	<i>vanA</i>	+	-	+	+	-	-	83
6126	I <sup>во</sup> ОАИЛ	хемокултура	2019	≥ 256	12	<i>vanA</i>	+	-	+	+	-	-	83
3294	I <sup>во</sup> ОАИЛ	ранев секрет	2019	≥ 256	32	<i>vanA</i>	+	-	+	+	+	-	75
2508	I <sup>ва</sup> Хирургия	ранев секрет	2020	≥ 256	16	<i>vanA</i>	+	+	+	+	-	+	81
4767	I <sup>во</sup> ОАИЛ	ранев секрет	2020	≥ 256	16	<i>vanA</i>	+	-	+	+	-	-	81
1824	Нефрология	урина	2020	≥ 256	16	<i>vanA</i>	+	-	+	+	-	+	82

**Легенда** VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin; MT: мултилокусен тип.

На **Таблица 34** са представени профилите на 12 *vanA E. faecium* от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен, с мултилокусни типове, различни от MT11. Прави впечатление, че трите MT75 от 2017 г. споделят общи гени, кодиращи резистентност към vancomycin и аминогликозиди (*vanA* и *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) и за фактори на вирулентност (*act* и *esp*), като демонстрират идентичен антибиотичен профил с висока резистентност към vancomycin и teicoplanin (МПК ≥ 256 µg/ml). Изолираният през 2019 г. MT75 се различава по стойностите за teicoplanin (МПК = 32 µg/ml) и присъствието на трети вирулентен ген – *hyl*. Четирите MT83 от 2019 г. се характеризират с високи нива на резистентност към vancomycin (МПК ≥ 256 µg/ml) и ниски нива на резистентност към teicoplanin (МПК: 6 – ≥ 16 µg/ml). Тези изолати са носители на генетичните детерминанти *vanA*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *act* и *esp*. Профилите на двата MT81 и единичния MT82 установени през 2020 г. също са сходни (vancomycin МПК ≥ 256 µg/ml, teicoplanin МПК = 16 µg/ml, наличие на *vanA*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *act* и *esp* гени), но се различават по отношение на присъствието на *gelE* и *aph(3')-IIIa* гени.

#### 5.4.2. Резултати за други клинични центрове

MLVA анализът, отразяващ генетичната връзка между 13 *vanA E. faecium* от УМБАЛ „Токуда“, София, е представен на **Фигура 32 А** и **Б**. При 8 от изолатите е потвърдено, че се отнасят към MT11, 2 – към MT80 и по един – към MT25, MT78 и MT79.



**Фигура 32. (А) Дендрограма, отразяваща генетичната връзка между клинични *vanA E. faecium*, генотипирани 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. Детектирани са следните MLVA типове (MT): MT11, MT25, MT78, MT79 и MT80. Разпределението на изолатите към всеки тип е както следва: MT11: 8 *E. faecium*; MT 25: 1 *E. faecium*; MT78: 1 *E. faecium*; MT79: 1 *E. faecium*; MT80: 2 *E. faecium*.

**(Б) Филогенетично дърво (Minimum spanning tree) на 13 *vanA E. faecium*, генотипирани 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. Открити са следните MLVA типове (MT): MT11, MT25, MT78, MT79 и MT80. Разпределението на изолатите към всеки тип е, както следва: MT11: 8 *E. faecium*; MT 25: 1 *E. faecium*; MT78: 1 *E. faecium*; MT79: 1 *E. faecium*; MT80: 2 *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.

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.

## 5.5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА АНТИМИКРОБНАТА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И ДЕТЕКЦИЯТА НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ VANCOMYCIN И АМИНОГЛИКОЗИ ПРИ КЛИНИЧНИ VRE

В настоящия труд е проучена антимикробната чувствителност на общо 117 клинични VRE (108 *E. faecium*, 5 *E. gallinarum*, 3 *E. casseliflavus* и 1 *E. durans*), изолирани от четири болници в България – три в Плевен и една в София. Резултатите показват, че всички *E. faecium* и единичният *E. durans* показват сходен профил на резистентност и според критериите на Magiorakos и съавт. (Magiorakos et al. 2012) могат да бъдат отнесени към групата на MDR микроорганизми.

Най-много са изолираните MDR *E. faecium* от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен (n=85), следвани от Аджибадем Сити клиник УМБАЛ „Токуда“, София (n=14) и другите две болници в Плевен (n=9). При 77/85 (90.6%), при 12/14 (85.7%) и съответно при 9 (100%) от изолатите в другите два клинични центъра е установен VanD-*vanA* тип на гликопептидна резистентност, т.е. високо ниво на резистентност към vancomycin (МПК  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ ) и ниска до умерена резистентност към teicoplanin (МПК: 6 – 16  $\mu\text{g/ml}$ ) при доказан *vanA* ген. Тези *E. faecium* показват почти еднотипен антимикробен профил с високи нива 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 чувствителност към tigecycline (МПК: 0.047-0.125  $\mu\text{g/ml}$ ), linezolid (МПК: 1 – 4  $\mu\text{g/ml}$ ), quinupristin/dalfopristin (МПК: 0.25 – 3  $\mu\text{g/ml}$ ) и daptomycin (МПК:  $1.5 \leq 8 \mu\text{g/ml}$ ), което предполага принадлежност на изолатите към един щам. Такива необичайни VRE циркулират в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен от 2013 г. (Попова В 2018). Strateva и съавт. (Strateva et al. 2014) публикуват данни за разпространение на подобни изолати и в други болници на страната.

При другите включени в настоящето проучване VRE (8 *vanA E. faecium*, 2 *vanB E. faecium*, 1 *vanA E. durans* и 8 *vanC* ентерококи) е установено пълно съответствие между фенотипа и генотипа на гликопептидна резистентност. Освен това при всички 104 *E. faecium* с HLGR (МПК  $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ ) е потвърден *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* гена. Същият ген е доказан при два *E. faecium* от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен и два *E. faecium* от УМБАЛ „Токуда“, София с МПК на

gentamicin 6 – 96 µg/ml, което корелира с необичаен non-HLGR фенотип (Chen et al. 2021).

В редица проучвания са описани VRE с профили на резистентност към гликопептиди несъответстващи на потвърдения генотип. Yang и съавт. (Yang et al. 2015) наблюдават високо ниво на резистентност към vancomycin (МПК  $\geq$  256 µg/ml), вариращи стойности за teicoplanin (МПК 12 –  $\geq$  256 µg/ml) и *vanA* ген при 69 клинични VR *E. faecium*, изолирани от болница в Пекин. Marcade и съавт. (Marcade et al. 2014) съобщават 7 VR *E. faecium* с МПК на vancomycin  $\geq$  256 µg/ml и МПК на teicoplanin 24 – 32 µg/ml, и с едновременно носителство на *vanA* и *vanB* гени. В голям брой проучвания са описани VRE изолати с VanB фенотип (високи нива на резистентност към vancomycin и чувствителност към teicoplanin), експресиращи *vanA* генотип (Gu et al. 2009; Al-Ahdal et al. 2012; Strateva et al. 2014; Vocanegra-Ibarias et al. 2016; Khairy et al. 2019).

Asgin и Otlу (Asgin and Otlу 2020) докладват 47 VRE, всички резистентни на ampicillin, gentamicin и чувствителни на quinupristin/dalfopristin, daptomycin, linezolid, с изключение на един щам, демонстриращ интермедиерна чувствителност към linezolid. В проучване на Yang и съавт. (Yang et al. 2015) от 2015 г. е установена резистентност към ampicillin и чувствителност към tigecycline, linezolid и quinupristin/dalfopristin при 69 VR *E. faecium*. Jovanović и съавт. (Jovanović et al. 2015) представят данни за антибиотичната чувствителност на 194 VRE. Тези VR ентерококови изолати са показали 100% чувствителност към linezolid, 90.7% – към nitrofurantoin, 75.3% – към chloramphenicol, 16% и 4.1% – съответно към gentamicin и streptomycin, 14.4% – към ampicillin и 7.2% – към penicillin.

По данни на SAID от 2020 г. (ECDC-Net 2019) резистентността на *E. faecium* към аминопеницилини варира значително в отделните европейски страни. Тя е най-ниска в Исландия (68.4%) и най-висока в България (100%). В Австралия тази резистентност достига до 90.4% (Coombs et al. 2014). През 2018 г. индийски автори съобщават за ампицилинова резистентност при 80% от *E. faecium* изолатите.

У нас през 2012 г. при проучване на 23 клинични VS *E. faecium* от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен, Ророва и съавт. (Ророва et al. 2013) доказват, че резистентността към penicillin и ampicillin е съответно 86.9% и 82.6%. През 2014 г. същите автори установяват 100% резистентност към ampicillin (МПК  $\geq$  256

µg/ml), gentamicin (МПК ≥ 1024 µg/ml) и ciprofloxacin (МПК ≥ 32 µg/ml) при 13 VR *E. faecium*, изолирани от материали на пациенти в същата болница (Попова В и съавт. 2014). Стратева и съавт. (Стратева и съавт. 2015) проучват антимикробната чувствителност на 450 клинични ентерококови изолата и доказват резистентност към ampicillin при 32.7% от тях.

Известно е, че ентерококите са с вродена резистентност към ниски нива на аминогликозиди. В този случай комбинацията на последните с β-лактами има синергичен ефект при лечението на ентерококовите инфекции. При изолати с МПК > 2000 µg/ml за streptomycin и МПК > 500 µg/ml за gentamicin този синергичен ефект изчезва (Asgin and Otlu 2020).

По данни на Central Asia and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR-Net 2018) 65%–95% от *E. faecium* са резистентни към ampicillin и 81%–97% са класифицирани като HLGR. 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*. Отчетената честота на HLGR *E. faecium* в Индия е 77.1% (Nayak et al. 2018), а в Австралия е 65% (Coombs et al. 2014).

Поради нарастващата честота на VRE през последните години се повиши употребата на linezolid, quinupristin/dalfopristin и daptomycin за тяхното лечение. Според различни проучвания резистентността към linezolid варира значително – от 1% в Иран (Asadollahi et al. 2018) и 1.3% в Австралия (Coombs et al. 2014) до 13.7% в Канада (Simner et al. 2015). Резистентността на ентерококите към daptomycin е по-характерна за *E. faecium*, отколкото за *E. faecalis* (Miller et al. 2014). През 2014 г. Sader и съавт. (Sader et al. 2014) публикуват данни от 8 годишно проучване върху активността на daptomycin при 29 619 ентерококи, събрани от 410 клинични центъра по целия свят. Авторите установяват резистентност едва при 0.18% от *E. faecium* и 0.02% от *E. faecalis*. Според друго проучване обхващащо 4274 *E. faecium* и 7007 *E. faecalis*, изолирани от 19 болници в САЩ, даптомицинова резистентност е открита при 3.9% и 0.2% от изолатите (Edelsberg et al. 2014). Сходни нива на резистентност при *E. faecium* са описани и в Германия (Lübbert et al. 2015). В други европейски страни, като Ирландия, Франция и Испания, резистентността на ентерококите към daptomycin е по-висока, съответно 7%, 8.2% и 10.5% (Bender et al. 2018).

Ефективността на quinupristin/dalfopristin е добре изразена срещу *E. faecium* и липсва при *E. faecalis* (Faron et al. 2016). Според доклада на SENTRY програмата резистентността към този препарат при VR *E. faecium* в Северна Америка и Европа е съответно 0.6% и 10% (Deshpande et al. 2007). От друга страна японско проучване съобщава за намалена чувствителност към quinupristin/dalfopristin при 17.6% от *E. faecium* щамове резистентни на макролиди (Isogai et al. 2013).

В настоящата работа сред проучените 108 клинични VR *E. faecium* не е установена резистентност към linezolid и daptomycin, но един изолат показва МПК на quinupristin/dalfopristin  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ , което според критериите на EUCAST го определя като резистентен на посочения препарат.

## 5.6. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ПРОУЧВАНЕТО НА ГЕНИ, КОДИРАЩИ ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ КЛИНИЧНИ VRE

Известно е, че от всички представители на род *Enterococcus*, видове *E. faecalis* и *E. faecium* са оценени като водещи нозокомиални патогени. Продуцираните от тях фактори на вирулентност играят важна роля в патогенезата на ентерококовата инфекция и колонизация.

Сред проучените 108 VR *E. faecium* изолирани от четирите клинични центъра в България не са установени съществени различия в циркулиращите детерминанти на вирулентност, които най-често е налице комбинацията на гените *esp* + *act*. При 106 от общо 108 *E. faecium* (98.2%) и при 1 *E. durans* са доказани две и повече детерминанти на вирулентност, а при 2 изолата *E. faecium* (1.9%) е налице по един фактор на вирулентност. По-голяма част от *E. faecium* (95/88%) са носители на *act* и *esp* гени, при 10 (9.3%) изолата *act* и *esp* са в комбинация с трети ген. Най-често идентифицирани при *E. faecium* са гените *esp* (n=106), *act* (n=105) и *hyl* (n=7). При единични *E. faecium* изолати е установено самостоятелно или в комбинация присъствието на *gelE* (n=5), *ase* (n=1), *asa1* (n=1) и *efaA* (n=1).

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. Song и съавт. (Song et al. 2013) изследват 40 VR

*E. faecium* и установяват наличието на *esp* и *hyl* гени, респективно при 100% и 92.5% от изолатите. Сакирлар и съавт. (Сакирлар et al. 2014) доказват *esp* при 87% от VR *E. faecium*. В проучване от 2016 г. върху 36 клинични VRE е установено следното разпространение на детерминанти на вирулентност: *gelE* (n=16, 44.4%), *hyl* (n=13, 36.1%), *asa1* (n=11, 30.6%), *esp* (n=10, 27.8%) и *cyIA* (n=7, 25%) (Biswas et al. 2016).

Гени, кодиращи синтеза на агрегиращата субстанция (*asa1*), протеин *efaA* (*efaA*), желатиназа (*gelE*) и цитолизин (*cyI*) се доказват обичайно при *E. faecalis*. Редица публикации свидетелстват за присъствието на тези детерминанти на вирулентност и при *E. faecium* (Biswas et al. 2016; Nasaj et al. 2016; Strateva et al. 2016; Marchi et al. 2018). Nasaj и съавт. (Nasaj et al. 2016) установяват носителство на *asa1* ген при всички 51 тествани VR *E. faecium*. В друго проучване, гените *gelE*, *esp* и *asa1* са доказани съответно при 45 (100%), 36 (80%) и 33 (73.3%) клинични VR *E. faecium* (Marchi et al. 2018). При тестване за носителство на детерминанти на вирулентност на общо 46 клинични VS *E. faecium*, *asa1* е потвърден при 9 от тях, а *gelE* и *cyIA* съответно при 7 и 6 изолата (Biswas et al. 2016).

Колаген-свързващият протеин при *E. faecalis* обичайно се кодира от *ase*, а при *E. faecium* – от *act*. Haghі и съавт. (Haghі et al. 2019) съобщават за присъствие на *ase* при 89.8% от VR *E. faecalis* и при 80% от VR *E. faecium*. В иранско проучване от 2019 г. (Sattari-Marajі et al. 2019) *act* е установен при 87 (81%) *E. faecium*, като при 7 от тях последният е в комбинация с *ase*. Всички тези данни свидетелстват за циркулирането на *act* и *ase* както сред *E. faecalis*, така и сред *E. faecium* изолати.

Данните за разпространението на детерминанти на вирулентност сред необичайни клинични ентерококови видове са силно ограничени. В проучване от 2016 г. обхващащо общо 5 клинични *E. gallinarum* *esp* е установен при два от тях, а при други два са доказани съответно *cyIA* и *hyl* (Biswas et al. 2016). В настоящата работа не се доказва присъствие на гени, кодиращи фактори на вирулентност при нито един от изследваните 8 клинични *vanC* ентерококи.

## 5.7. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ЕПИДЕМИОЛОГИЧНОТО ТИПИЗИРАНЕ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ VR *E. FAECIUM*

При тестване на 84 *vanA E. faecium* от УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен посредством MLVA10 са доказани общо 6 мултилокусни типа. Преобладаващ е MT11 (85.7%), докато другите типове са с много по-малка честота – MT75 (4.8%), MT83 (4.8%), MT81 (2.4%), MT77 (1.2%) и MT82 (1.2%). При *vanA E. faecium* изолатите от другите клинични центрове (n=22) също доминира MT11. Този тип е налице при общо 17 (77.3%) от изолатите – при 8 от 13<sup>-те</sup> на УМБАЛ „Токуда“, София и при всички от УМБАЛ „Св. Марина“, Плевен (n=4) и МБАЛ „Сърце и мозък“, Плевен (n=5).

В УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен MT11 изолатите са на пациенти лекувани в КАИЛ, Клиниките по Хирургия, Клиниката по нефрология и диализа и Клиниката по урология. Останалите 5 типа също са разпространени основно в КАИЛ, Клиниките по хирургия и Клиниката по нефрология и диализа. Тези клинични звена са част от структурата на I<sup>-ва</sup> Клинична база

Като цяло MT11 ентерококите споделят сходен антибиотичен профил, с изключение на 3 изолата показващи високи нива на резистентност към teicoplanin (МПК: 48 –  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ ) и 1 *E. faecium* с резистентност към quinupristin/dalfopristin. По отношение на гените, кодиращи резистентност към аминогликозиди и фактори на вирулентност не са установени разлики в профилите на ентерококите с MT11. При ентерококите с мултилокусни типове различни от MT11, напр. MT75, MT83 и MT82 също са налице почти идентични профили за съответния мултилокусен тип, свързани със стойностите на МПК за гликопептиди, гените за резистентност и годината на изолиране.

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).

Използваната MLVA методика, разработена от Stoikov и съавт. (Stoikov et al. 2020) направи възможно типизирането на голям брой VR *E. faecium*, изолирани от пациенти в различни клинични центрове. В УМБАЛ „Д-р

Г. Странски“ за периода 2016 г. – 2020 г. са установени 8 мултилокусни типа сред общо 84 клинични и 13 интестинални *vanA E. faecium*. Счита се, че MT11 е идентичен със ST203, но за останалите 7 типа все още няма сигурна информация за съответствие със съответен ST тип.

Поради разнообразието на MT типове на територията на нашата болница и големия брой на VR *E. faecium* изолати, продължаваме съвместната си работа с колегите от НЦЗПБ с цел максимално оптимизиране на MLVA и потвърждаване на съответствие между MT и ST типове, чрез целогеномно секвениране на подбрани VRE изолати.

В обобщение, при проучените общо 108 клинични VR *E. faecium* са наблюдавани *vanA* и *vanB* генотипа на гликопептидна резистентност. Генотипът *vanA* е налице при 106 от 108 изолата (98.2%), а *vanB* – само при 2 (1.9%). Корелация между фенотипа и генотипа на резистентност към гликопептиди е установена при 8-те *vanC* ентерококи, при 2-та *vanB E. faecium*, при 8 от 106 *vanA E. faecium* (7.6%) и при единичния *E. durans* изолат. Другите 98 *E. faecium* (92.5%) са показали VanD-*vanA* тип. Бифункционалният аминокликозиден ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* е потвърден при всички 104 клинични *E. faecium* с HLGR (МПК  $\geq 1024$   $\mu\text{g/ml}$ ) и при 4 изолата с ниско ниво на резистентност към gentamicin. Носители на една или повече детерминанти на вирулентност са всички 108 клинични VR *E. faecium* и 1 VR *E. durans*. Преобладаваща част от *E. faecium* (95/88%) са носители на *ast* и *esp* гени, при 10 (9.3%) изолата *ast* и *esp* са в комбинация с трети ген. Общо 85.7% от клиничните *vanA E. faecium* в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“, Плевен и 77.3% от тези в другите болнични центрове принадлежат към MT11. Изолатите *vanA E. faecium* от един и същ мултилокусен тип експресират сходни антибиотични профили и споделят общи гени за резистентност и вирулентност.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От края на 80<sup>-те</sup> години, когато са публикувани първите съобщения, до този момент VRE се разпространяват с бърз темп в редица здравни заведения по света. През последните години в много европейски страни се наблюдава нарастване на резистентността към vancomycin при клинични ентерококови изолати (Brinkwirth et al. 2021). През 2015 г. в Европейския съюз/Европейското икономическо пространство е имало около 16 000 нозокомиални VRE инфекции, от които 1065 са завършили летално. Това е близо два пъти повече отколкото съобщените смъртни случаи причинени от тези микроорганизми през 2007 г. (Cassini et al. 2019). Нозокомиалните VRE инфекции се свързват със значителна заболяемост и смъртност сред пациентите, както и с редица икономически тежести за болниците. Освен това VRE са известни и със способността си да колонизират чревния тракт на човека, особено при дългосрочно хоспитализирани пациенти лекувани с широкоспектърни антибиотици. При колонизираните лица е възможно да се развие инвазивна ендегенна инфекция, чиито източник е самият болен. Всичко това налага необходимостта от задълбочени изследвания по отношение на VRE.

В настоящето проучване са проведени фенотипни и генотипни проучвания върху голям брой клинични и интестинални VR ентерококови изолати. Изследвано е разпространението на генетични детерминанти, кодиращи антибиотична резистентност и фактори на вирулентност сред тях, както и доказването на генетични връзки посредством генотипизиране. Проучена е честотата на интестинална колонизация VRE и са оценени рисковите фактори за колонизация/инфекция сред пациенти с висок риск за колонизация/инфекция с проблемни микроорганизми. Оценени са селективните и диференциращи способности на три хромогенни агарови среди и обогатен бульон за доказване на VRE от фекални проби, както и фенотипните тестове за потвърждаване на родовата и видова принадлежност на изолатите. Разработен е алгоритъм за изолиране и идентифициране на интестинални VRE, включващ комбинация от бульон с 6 µg/ml vancomycin и една хромогенна среда с най-висока специфичност и чувствителност, както и среди за субкултивиране на положителните посеви. За определяне на родовата и видова принадлежност са подбрани ограничен брой базови фенотипни тестове, които да разграничат ефективно най-честите

ентерококови представители – *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*. Разработеният алгоритъм дава възможност за бързо и надеждно изолиране на интестинални VRE и е удобен за скриниране на хоспитализирани лица.

Проведеният фекален скрининг на голям брой имунокомпрометирани лица от три различни клинични звена в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ дава представа за честотата на колонизация с VRE при пациенти с висок риск за колонизация/инфекция. Проучените неспецифични и специфични рискови фактори и статистическото потвърждаване на значимостта им за развитие на колонизация дава насоки за ограничаване разпространението на VRE при таргетните групи пациенти.

Детайлното проучване на VRE при хоспитализирани пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ за 5 годишен период предоставя информация за честотата на тяхната циркулация в различните клинични звена, както и за разпределението на изолатите по клинични материали.

Изпитаната антимикробна чувствителност на голям брой клинични и интестинални VRE дава представа за профилите на антибиотична чувствителност/резистентност. Определянето на МПК към гликопептиди и детекцията на *van* гени потвърждава най-често циркулиращите фенотипове и генотипове. Създаде се и база данни за разпространението на гените кодиращи резистентност към аминогликозиди и фактори на вирулентност сред проучените VRE. С помощта на методите за епидемиологично типизиране се установи епидемиологичната връзка между *vanA E. faecium* изолатите.

Данните от настоящото проучване дават насоки за ефективното лечение на VRE и са основа за предприемане на противоепидемични мерки с цел ограничаване разпространението на тези проблемни микроорганизми в болничните звена.

## VII. ОБОБЩЕНИ 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 делът 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 аминокликозиден 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 *act* 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.

## VIII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Атанасова Д. фактори на вирулентност, бактериоцини и епидемиологично типизиране на клинично значими изолати от род *Enterococcus*. Дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „доктор“. София, 2017.
2. Атанасова Д, Стратева Т, Митов И. Фактори на вирулентност и бактериоцини при клинично значими бактерии от род *Enterococcus*. Медицински преглед. 2013; 43(2): 20-30.
3. Попова В. Микробиологични аспекти на медицински значимите ентерококи. Глава 6. Резултати от собствени проучвания. Изд. център МУ-Плевен, 2018. 54-56; 2018.
4. Попова В, Хиткова Х, Иванов И, Средкова М, Бизева Л, Едрева В и съавт. Разпространение на ванкомицин резистентни ентерококи в Университетска болница-Плевен. 12-ти Национален Конгрес по Клинична Микробиология и Инфекции на Българската асоциация на микробиолозите, 2014. Сб. рез. стр. 19.
5. Средкова М. Терапевтично проблемни ентерококи. Изд. център МУ-Плевен; 2012.
6. Стратева и съавт. Стратева Т, Атанасова Д, Трифонова А, Савов Е, Димов Св., Митов И. Надзор на антимикробната резистентност на клинични изолати *Enterococcus* spp. от български болници, 2012-2015. Медицински преглед. 2015; 55 (1): 23-32.
7. Abbot EL, Smith WD, Siou GPS, Chiriboga C, Smith RJ, Wilson JA, et al. Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cell Microbiol.* 2007 Jul;9(7):1822–33.
8. Акрака PE, Kisson S, Jayaratne P. Vancomycin-resistant enterococci colonization among hospitalized patients and associated risk factors in Trinidad and Tobago. 2016 Nov;4(4):699–708.
9. Aktürk H, Sütçü M, Somer A, Karaman S, Acar M, Ünüvar A, et al. Results of four-year rectal vancomycin-resistant enterococci surveillance in a pediatric hematology-oncology ward: From colonization to infection. *Tjh.* 2016 Aug 15;33(3):244–7.
10. Al-Ahdal MN, Abozaid SM, Al-Shammary HF, Bohol MF, Al-Thawadi SI, Al-Jaberi AA, et al. Characterization of *Enterococcus faecium* isolates and first report of vanB phenotype–vanA genotype incongruence in the Middle East. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Nov;31(11):3223–9.
11. Alemayehu T, Hailemariam M. Prevalence of vancomycin-resistant enterococcus in Africa in one health approach: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2020 Dec;10(1):20542.
12. Alevizakos M, Gaitanidis A, Nasioudis D, Tori K, Flokas ME, Mylonakis E. Colonization with vancomycin-resistant enterococci and risk for bloodstream infection among patients with malignancy: A systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infectious Diseases.* 2016 Dec 7;4(1):ofw246.
13. Amberpet R, Sistla S, Parija SC, Thabab MM. Screening for intestinal colonization with vancomycin resistant enterococci and associated risk factors among patients admitted to an adult intensive care unit of a large teaching hospital. *JCDR.* 2016;
14. Anderson DJ, Engemann JJ, Harrell LJ, Carmeli Y, Reller LB, Kaye KS. Predictors of mortality in patients with bloodstream infection due to ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 May;50(5):1715–20.
15. Anderson NW, Buchan BW, Young CL, Newton DW, Brenke C, Lapsley L, et al. Multicenter clinical evaluation of VRESelect Agar for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2013 Aug 1;51(8):2758–60.
16. Appelbaum PC, Jacobs MR, Palko WM, Frauenhoffer EE, Duffett A. Accuracy and reproducibility of the IDS rapid STR system for species identification of streptococci. *J Clin Microbiol.* 1986 May;23(5):843–6.
17. Arias CA, Courvalin P, Reynolds PE. vanC cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Jun;44(6):1660–6.
18. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Apr;10(4):266–78.
19. Arias CA, Panesso D, McGrath DM, Qin X, Mojica MF, Miller C, et al. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. *N Engl J Med.* 2011 Sep 8;365(10):892–900.
20. Arsène S, Leclercq R. Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Sep;51(9):3254–8.

21. Arthur M, Molinas C, Courvalin P. Sequence of the vanY gene required for production of a vancomycin-inducible D,D-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium* BM4147. *Gene*. 1992 Oct;120(1):111–4.
22. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol*. 1993 Jan;175(1):117–27.
23. Asadollahi P, Razavi Sh, Asadollahi Kh, Pourshafie MR, Talebi M. Rise of antibiotic resistance in clinical enterococcal isolates during 2001–2016 in Iran: a review. *New Microbes and New Infections*. 2018 Nov;26:92–9.
24. Asgin N, Otlu B. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in a Tertiary care hospital in Turkey. *IDR*. 2020 Jan;Volume 13:191–8.
25. Asir K, Wilkinson K, Perry JD, Reed RH, Gould FK. Evaluation of chromogenic media for the isolation of vancomycin-resistant enterococci from stool samples. *Letters in Applied Microbiology*. 2009 Feb;48(2):230–3.
26. Assadian O, Askarian M, Stadler M, Shaghaghian S. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci colonization and its risk factors in chronic hemodialysis patients in Shiraz, Iran. *BMC Infect Dis*. 2007 Dec;7(1):52.
27. AURA-Net. Australian Commission on Safety and Quality an Health Care, 2019. Chapte 4, Table 4.2. Available from: <https://www.safetyandquality.gov.au/sites/default/files/2019-05/aura-2017-second-australian-report-on-antimicrobial-use-and-resistance-in-human-health.pdf>. 2017;
28. Baghdayan AS, Shankar N, Tendolkar PM. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2003 Dec 1;60(12):2622–36.
29. Baptista M, Depardieu F, Reynolds P, Courvalin P, Arthur M. Mutations leading to increased levels of resistance to glycopeptide antibiotics in VanB-type enterococci. *Mol Microbiol*. 1997 Jul;25(1):93–105.
30. Batistão DW da F, Gontijo-Filho PP, Conceição N, Oliveira AG de, Ribas RM. Risk factors for vancomycin-resistant enterococci colonisation in critically ill patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Feb;107(1):57–63.
31. Bauer G, Berens C, Projan SJ, Hillen W. Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe<sup>2+</sup> cleavage of 16S rRNA. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Apr;53(4):592–9.
32. Ben Sallem R, Klibi N, Klibi A, Ben Said L, Dziri R, Boudabous A, et al. Antibiotic resistance and virulence of enterococci isolates from healthy humans in Tunisia. *Ann Microbiol*. 2016 Jun;66(2):717–25.
33. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, et al. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resistance Updates*. 2018 Sep;40:25–39.
34. Bender JK, Klare I, Fleige C, Werner G. A nosocomial cluster of tigecycline- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates and the impact of *rpsJ* and *tet* (M) mutations on tigecycline resistance. *Microbial Drug Resistance*. 2020 Jun 1;26(6):576–82.
35. Berns JS. Infection with antimicrobial-resistant microorganisms in dialysis patients. *Seminars in Dialysis*. 2003 Jan 20;16(1):30–7.
36. Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *CPB*. 2009 Jan 1;10(1):2–18.
37. Billström H, Lund B, Sullivan Å, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008 Nov;32(5):374–7.
38. Biswas PP, Dey S, Sen A, Adhikari L. Molecular characterization of virulence genes in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci. *J Glob Infect Dis*. 2016 Mar;8(1):16–24.
39. Bleiweis AS, Zimmerman LN. Properties of proteinase from *Streptococcus faecalis* var. liquefaciens. *J Bacteriol*. 1964 Sep;88(3):653–9.
40. Bocanegra-Ibarias P, Flores-Treviño S, Camacho-Ortiz A, Morfin-Otero R, Villarreal-Treviño L, Llaca-Díaz J, et al. Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from two hospitals in Mexico: First detection of VanB phenotype-vanA genotype. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2016 Aug;34(7):415–21.

41. Bonten MJM, Slaughter S, Amberg AW, Hayden MK, van Voorhis J, Nathan C, et al. The role of “colonization pressure” in the spread of vancomycin-resistant enterococci: An important infection control variable. *Archives of Internal Medicine*. 1998 May 25;158(10):1127–32.
42. Bossaer JB, Hall PD, Garrett-Mayer E. Incidence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) infection in high-risk febrile neutropenic patients colonized with VRE. *Support Care Cancer*. 2011 Feb;19(2):231–7.
43. Bourgogne A, Hilsenbeck SG, Dunny GM, Murray BE. Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J Bacteriol*. 2006 Apr 15;188(8):2875–84.
44. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008 Jul 1;52(7):2667–72.
45. Brinkwirth S, Ayobami O, Eckmanns T, Markwart R. Hospital-acquired infections caused by enterococci: a systematic review and meta-analysis, WHO European Region, 1 January 2010 to 4 February 2020. *Eurosurveillance*. 2021 Nov 11;26(45).
46. Britt NS, Potter EM. Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016 Jun;5:57–61.
47. Brown DFJ. Evaluation of selective and enrichment media for isolation of glycopeptide-resistant enterococci from faecal specimens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003 Feb 1;51(2):289–96.
48. Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, Farr BM. Duration of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002 Apr;23(4):207–11.
49. CAESAR-Net. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) (2018). Annual Report 2017. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2017/central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2017-2018>. 2018.
50. Cakirlar F, Samasti M, Baris I, Kavakli H, Karakullukcu A, Sirekbasan S, et al. The epidemiological and molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci isolated from rectal swab samples of hospitalized patients in Turkey. *Clin Lab*. 2014 Mar;60(11):1807–12.
51. Calderwood SB, Wennersten C, Moellering RC. Resistance to antibiotic synergism in *Streptococcus faecalis*: further studies with amikacin and with a new amikacin derivative, 4'-deoxy, 6'-N-methylamikacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981 Apr;19(4):549–55.
52. Camargo ILBC, Gilmore MS, Darini ALC. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006 Nov;12(11):1123–30.
53. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P, Chaves RL, Johnson AP. A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence? *J Antimicrob Chemother*. 2010 Jun;65(6):1126–36.
54. Carlier C, Courvalin P. Emergence of 4',4"-aminoglycoside nucleotidyltransferase in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 Aug;34(8):1565–9.
55. CARSS-Net. Canadian Antimicrobial System Report Resistance Surveillance. 2020, page. 36. Available on: <https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/drugs-health-products/canadian-antimicrobial-resistance-surveillance-system-2020-report/CARSS-2020-report-2020-eng.pdf>. 2020.
56. Carvalho MG, Teixeira LM, Facklam RR. Use of tests for acidification of methyl-alpha-D-glucopyranoside and susceptibility to efrotomycin for differentiation of strains of *Enterococcus* and some related genera. *J Clin Microbiol*. 1998 Jun;36(6):1584–7.
57. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019 Jan;19(1):56–66.
58. CDC-Net. Centers for Disease Control and Prevention: Nosocomial enterococci resistant to vancomycin – United States, 1989–1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report* (1993) 42:597–599. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021331.htm>.1993.

59. CDC-Net. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Vancomycin-resistant enterococci, page 95-96. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. 2019.
60. Chandler JR, Hirt H, Dunny GM. A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005 Oct 25;102(43):15617–22.
61. Chen YH, Lin SY, Lin YT, Tseng SP, Chang CC, Yu SY, et al. Emergence of *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* -positive enterococci with non-high-level gentamicin resistance mediated by IS 1216V: adaptation to decreased aminoglycoside usage in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021 Jun 18;76(7):1689–97.
62. Chhatwal P, Ebadi E, Thol F, Koenecke C, Beutel G, Ziesing S, et al. Prospective infection surveillance and systematic screening for vancomycin-resistant enterococci in hematologic and oncologic patients – findings of a German tertiary care center. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020 Sep;22:102–5.
63. Choi PYI, Straube B, Cook C, Van Der Weyden C, Ramanathan S, Taylor P, et al. The mortality of vancomycin-resistant enterococci bloodstream infections (VRE BSI). *Blood*. 2011 Nov 18;118(21):4928–4928.
64. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001 Jun;65(2):232–60.
65. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clinical Infectious Diseases*. 2000 Aug 1;31(2):586–9.
66. Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Nov;37(11):2474–7.
67. Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA, Thal LA, Donabedian SM, Jaworski DD, et al. A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Mar;41(3):511–4.
68. Christensen and Ruoffa. Christensen JJ and Ruoffa KL. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other aerobic catalase-negative, Gram-positive cocci. In *Manual of clinical microbiology*. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC. 11th edn., vol.1. Washington, DC, USA. 2015, 422-436. 2015.
69. Chuang ON, Schlievert PM, Wells CL, Manias DA, Tripp TJ, Dunny GM. Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. *Infect Immun*. 2009 Jan;77(1):539–48.
70. Clark NC, Olsvik Ø, Swenson JM, Spiegel CA, Tenover FC. Detection of a Streptomycin/Spectinomycin Adenylyltransferase Gene ( *aadA* ) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jan;43(1):157–60.
71. Clark NC, Teixeira LM, Facklam RR, Tenover FC. Detection and differentiation of vanC-1, vanC-2, and vanC-3 glycopeptide resistance genes in enterococci. *J Clin Microbiol*. 1998 Aug;36(8):2294–7.
72. Cobomolinos A, Abriouel H, Omar N, Lopez R, Galvez A. Detection of *ebp* (endocarditis- and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. *International Journal of Food Microbiology*. 2008 Aug 15;126(1–2):123–6.
73. Coombs GW, Pearson JC, Daley DA, Le T, Robinson OJ, Gottlieb T, et al. Molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014 Mar 1;52(3):897–905.
74. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *Journal of Infectious Diseases*. 1995 May 1;171(5):1223–9.
75. Corso A, Faccone D, Gagetti P, Togneri A, Lopardo H, Melano R, et al. First report of VanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005 Jan;25(1):51–6.
76. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: A meta-analysis. *CLIN INFECT DIS*. 2003 Jan;36(1):53–9.

77. Costa Y, Galimand M, Leclercq R, Duval J, Courvalin P. Characterization of the chromosomal *aac(6')-II* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Sep;37(9):1896–903.
78. Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*. 2006 Jan 1;42(Supplement\_1):S25–34.
79. Courvalin P, Carlier C, Collatz E. Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. *J Bacteriol*. 1980 Aug;143(2):541–51.
80. Cox C, Coburn P, Gilmore M. Enterococcal cytolysin: A novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *CPPS*. 2005 Feb 1;6(1):77–84.
81. Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology*. 2004 Jan 1;53(1):13–20.
82. Cuzon G, Naas T, Fortineau N, Nordmann P. Novel chromogenic medium for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 Jul 1;46(7):2442–4.
83. Dabul ANG, Avaca-Crusca JS, Navais RB, Merlo TP, Van Tyne D, Gilmore MS, et al. Molecular basis for the emergence of a new hospital endemic tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* ST103 lineage. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019 Jan;67:23–32.
84. D'Agata EMC. Antimicrobial-resistant, Gram-positive bacteria among patients undergoing chronic hemodialysis. *CLIN INFECT DIS*. 2002 Nov 15;35(10):1212–8.
85. D'Agata EMC, Gautam S, Green WK, Tang Y. High rate of false-negative results of the rectal swab culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *CLIN INFECT DIS*. 2002 Jan 15;34(2):167–72.
86. D'Agata EMC, Green WK, Schulman G, Li H, Tang YW, Schaffner W. Vancomycin-resistant enterococci among chronic hemodialysis patients: A prospective study of acquisition. *Clinical Infectious Diseases*. 2001 Jan 1;32(1):23–9.
87. Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik Ø, Sundsfjord A. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 May;43(5):1105–10.
88. Del Papa MF, Hancock LE, Thomas VC, Perego M. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *J Bacteriol*. 2007 Dec 15;189(24):8835–43.
89. Delmas J, Robin F, Schweitzer C, Lesens O, Bonnet R. Evaluation of a new chromogenic medium, chromID VRE, for detection of vancomycin-resistant enterococci in stool samples and rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2731–3.
90. Depardieu F, Bonora MG, Reynolds PE, Courvalin P. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Molecular Microbiology*. 2003 Nov;50(3):931–48.
91. Depardieu F, Kolbert M, Pruul H, Bell J, Courvalin P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Oct;48(10):3892–904.
92. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):79–114.
93. Descheemaeker P, Ieven M, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, et al. Prevalence and molecular epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci in Belgian renal dialysis units. *J INFECT DIS*. 2000 Jan;181(1):235–41.
94. Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007 Jun;58(2):163–70.
95. Devriese LA, Vandamme P, Pot B, Vanrobaeys M, Kersters K, Haesebrouck F. Differentiation between *Streptococcus gallolyticus* strains of human clinical and veterinary origins and *Streptococcus bovis* strains from the intestinal tracts of ruminants. *J Clin Microbiol*. 1998 Dec;36(12):3520–3.
96. Diab M, Salem D, El-Shenawy A, El-Far A, Abdelghany A, Awad AR, et al. Detection of high level aminoglycoside resistance genes among clinical isolates of *Enterococcus* species. *Egypt J Med Hum Genet*. 2019 Dec;20(1):28.
97. Diaz L, Kiratisin P, Mendes RE, Panesso D, Singh KV, Arias CA. Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfz* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jul;56(7):3917–22.

- 98.** Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TEA, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet.* 2012 Sep;13(9):601–12.
- 99.** Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Hoyen CK, Hanrahan JA, Hujer AM, et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med.* 2000 Dec 28;343(26):1925–32.
- 100.** Drees M, Snyderman DR, Schmid CH, Barefoot L, Hansjosten K, Vue PM, et al. Antibiotic exposure and room contamination among patients colonized with vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008 Aug;29(8):709–15.
- 101.** Duarte L, Arbo A, Gallardo M, Riquelme I, Delgadillo L, Jiménez HJ. Factors associated with vancomycin-resistant enterococci colonization in a pediatric intensive care unit of Paraguay: A cross-sectional study on hospital charts. *Medwave.* 2019 Sep 30;19(08):e7694–e7694.
- 102.** Duez C, Zorzi W, Sapunarić F, Amoroso A, Thamm I, Coyette J. The penicillin resistance of *Enterococcus faecalis* JH2-2r results from an overproduction of the low-affinity penicillin-binding protein PBP4 and does not involve a *psr*-like gene. The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are Y17797 for the 8.4 kb segment of pDML521; AJ290435 for *pbp4* of *E. faecalis* JH2-2; AJ276231 and AJ276232 for the *psr*-like gene of *E. faecalis* JH2-2 or JH2-2r, respectively. *Microbiology.* 2001 Sep 1;147(9):2561–9.
- 103.** Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology.* 2003 Jun 1;52(6):491–8.
- 104.** Dutka-Malen S, Blaimont B, Wauters G, Courvalin P. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Jul;38(7):1675–7.
- 105.** Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a d-alanine:d-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene.* 1992 Mar;112(1):53–8.
- 106.** Dworniczek E, Kuzko K, Mróz E, Wojciech Ł, Adamski R, Sobieszczńska B, et al. Virulence factors and in Vitro adherence of *Enterococcus* strains to urinary catheters. *Folia Microbiol.* 2003 Sep;48(5):671–8.
- 107.** Dworniczek E, Wojciech L, Sobieszczńska B, Seniuk A. Virulence of *Enterococcus* isolates collected in Lower Silesia (Poland). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* 2005 Jan;37(9):630–6.
- 108.** EARS-Net. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 2018, p 57. Available on: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>. 2018.
- 109.** Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Apr;67(4):1628–35.
- 110.** Eaton TJ, Gasson MJ. A variant enterococcal surface protein *Esp<sub>fm</sub>* in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiology Letters.* 2002 Nov;216(2):269–75.
- 111.** ECDC-Net. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011–2012. 2013. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>. 2013.
- 112.** ECDC-Net. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. Stockholm: ECDC; 2019. Available from: <http://atlas.ecdc.europa.eu>. 2019.
- 113.** Edberg SC, Hardalo CJ, Kontnick C, Campbell S. Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 1994 Sep;32(9):2182–4.
- 114.** Edelsberg J, Weycker D, Barron R, Li X, Wu H, Oster G, et al. Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2014 Mar;78(3):255–62.
- 115.** Ekuma AE, Oduyebo OO, Efunshile AM, König B. Surveillance for vancomycin resistant enterococci in Tertiary institution in South Western Nigeria. *AJID.* 2016 Jun 1;10(2):121–6.
- 116.** Eshaghi A, Shahinas D, Li A, Kariyawasam R, Banh P, Desjardins M, et al. Characterization of an *Enterococcus gallinarum* isolate carrying a dual *vanA* and *vanB* cassette. Carroll KC, editor. *Journal of Clinical Microbiology.* 2015 Jul;53(7):2225–9.

- 117.** Facklam RR, Carvalho M da GS, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, editors. *The Enterococci*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2002. p. 1–54.
- 118.** Farhadi R, Saffar MJ, Monfared FT, Larijani LV, Kenari SA, Charati JY. Prevalence, risk factors, and molecular analysis of vancomycin-resistant Enterococci colonization in a referral neonatal intensive care unit: a prospective study in northern Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2022 May;S2213716522001229.
- 119.** Faron ML, Ledebor NA, Buchan BW. Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant Enterococcus in the health care setting. Kraft CS, editor. *J Clin Microbiol*. 2016 Oct;54(10):2436–47.
- 120.** Fatholahzadeh B, Hashemi FB, Emaneini M, Aligholi M, Nakhjavani FA, Kazemi B. Detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections (UTI) in Tehran, Iran. 2006;14(3):141–5.
- 121.** Fernández-Hidalgo N, Almirante B, Gavalda J, Gurgui M, Peña C, de Alarcón A, et al. Ampicillin plus ceftriaxone is as effective as ampicillin plus gentamicin for treating *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2013 May 1;56(9):1261–8.
- 122.** Ferretti JJ, Gilmore KS, Courvalin P. Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J Bacteriol*. 1986 Aug;167(2):631–8.
- 123.** Fiedler S, Bender JK, Klare I, Halbedel S, Grohmann E, Szewzyk U, et al. Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants *tet* (L) and *tet* (M). *J Antimicrob Chemother*. 2016 Apr;71(4):871–81.
- 124.** Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Sep;43(9):2161–4.
- 125.** Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009 Jun 1;155(6):1749–57.
- 126.** Fontana R, Aldegheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A, Satta G. Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Sep;38(9):1980–3.
- 127.** Ford CD, Lopansri BK, Haydoura S, Snow G, Dascomb KK, Asch J, et al. Frequency, risk factors, and outcomes of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization and infection in patients with newly diagnosed acute leukemia: Different patterns in patients with acute myelogenous and acute lymphoblastic leukemia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 Jan;36(1):47–53.
- 128.** Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 2006 Jan;106(1):1–24.
- 129.** Freitas AR, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Coque TM, Peixe L. Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009 Jun 1;63(6):1104–11.
- 130.** Furtado GHC, Martins ST, Coutinho AP, Wey SB, Medeiros EAS. Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005 Feb;9(1):64–9.
- 131.** Galloway-Peña JR, Rice LB, Murray BE. Analysis of PBP5 of early U.S. isolates of *Enterococcus faecium*: Sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul;55(7):3272–7.
- 132.** Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grélaud C, Martin C, Bordessoule D, et al. Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Fecal Samples from Hospitalized Patients and Nonhospitalized Controls in a Cattle-Rearing Area of France. *J Clin Microbiol*. 2000 Feb;38(2):620–4.
- 133.** García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Mar 20;32(2):1–28.
- 134.** Gedik H, Yıldırım T, Şimşek F, Kantürk A, Arıca D, Aydın D, et al. Vancomycin-resistant enterococci colonization and bacteremia in patients with hematological malignancies. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2014 Sep 12;8(09).

- 135.** Geraci JE, Martin WJ. Antibiotic therapy of bacterial endocarditis: VI. Subacute enterococcal endocarditis: clinical, pathologic and therapeutic consideration of 33 cases. *Circulation*. 1954 Aug;10(2):173–94.
- 136.** Gold HS. Vancomycin-resistant enterococci: Mechanisms and clinical observations. *Clin Infect Dis*. 2001 Jul 15;33(2):210–9.
- 137.** Gordon S, Swenson JM, Hill BC, Pigott NE, Facklam RR, Cooksey RC, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. *J Clin Microbiol*. 1992 Sep;30(9):2373–8.
- 138.** Gordts B, Landuyt HV, Ieven M, Vandamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 1995;33:5.
- 139.** Gouliouris T, Blane B, Brodrick HJ, Raven KE, Ambridge KE, Kidney AD, et al. Comparison of two chromogenic media for the detection of vancomycin-resistant enterococcal carriage by nursing home residents. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016 Aug;85(4):409–12.
- 140.** Grabsch EA, Ghaly-Derias S, Gao W, Howden BP. Comparative study of selective chromogenic (chromID VRE) and bile esculin agars for isolation and Identification of *vanB* -containing vancomycin-resistant enterococci from feces and Rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2008 Dec;46(12):4034–6.
- 141.** Green M, Barbadora K, Michaels M. Recovery of vancomycin-resistant Gram-positive cocci from pediatric liver transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 1991 Nov;29(11):2503–6.
- 142.** Green MR, Anasetti C, Sandin RL, Rolfe NE, Greene JN. Development of daptomycin resistance in a bone marrow transplant patient with vancomycin-resistant *Enterococcus durans*. *J Oncol Pharm Pract*. 2006 Sep;12(3):179–81.
- 143.** Grupper M, Kravtsov A, Potasman I. Enterococcal-associated lower respiratory tract infections: A case report and literature review. *Infection*. 2009 Feb;37(1):60–4.
- 144.** Gu L, Cao B, Liu Y, Guo P, Song S, Li R, et al. A new Tn1546 type of VanB phenotype–vanA genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2009 Jan;63(1):70–5.
- 145.** Haas W, Gilmore MS. Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*. *Med Microbiol Immunol*. 1999 May;187(4):183–90.
- 146.** Hacek DM, Bednarz P, Noskin GA, Zembower T, Peterson LR. Yield of vancomycin-resistant enterococci and multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from stools submitted for *Clostridium difficile* testing compared to results from a focused surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2001 Mar;39(3):1152–4.
- 147.** Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*. 2000 Oct;54(1):641–79.
- 148.** Haenni M, Saras E, Châtre P, Meunier D, Martin S, Lepage G, et al. *vanA* in *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus casseliflavus* detected in french cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2009 Nov;6(9):1107–11.
- 149.** Hagi F, Lohrasbi V, Zeighami H. High incidence of virulence determinants, aminoglycoside and vancomycin resistance in enterococci isolated from hospitalized patients in Northwest Iran. *BMC Infect Dis*. 2019 Dec;19(1):744.
- 150.** Hancock LE, Perego M. Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol*. 2004 Dec;186(23):7951–8.
- 151.** Hassan MM, Belal ESB. Antibiotic resistance and virulence genes in enterococcus strains isolated from different hospitals in Saudi Arabia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2016 Jul 3;30(4):726–32.
- 152.** Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003 May 1;51(90001):29–35.
- 153.** Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahm DF. In Vivo development of teicoplanin resistance in a VanB *Enterococcus faecium* isolate. *Journal of Infectious Diseases*. 1993 May 1;167(5):1224–7.
- 154.** Heidari H, Emaneini M, Dabiri H, Jabalameli F. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of Enterococcal strains isolated from burn patients. *Microbial Pathogenesis*. 2016 Jan;90:93–7.
- 155.** Heikens E, Bonten MJM, Willems RJL. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol*. 2007 Nov 15;189(22):8233–40.

- 156.** Heikens E, Singh KV, Jacques-Palaz KD, van Luit-Asbroek M, Oostdijk EAN, Bonten MJM, et al. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes and Infection*. 2011 Dec;13(14–15):1185–90.
- 157.** Hendrickx APA, Bonten MJM, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CME, Kragten AHM, Willems RJL. Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology*. 2008 Oct 1;154(10):3212–23.
- 158.** Hendrickx APA, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CME, van Wamel WJB, Braat JC, Wijnands LM, et al. SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*. 2009 Nov;77(11):5097–106.
- 159.** Hendrickx APA, van Wamel WJB, Posthuma G, Bonten MJM, Willems RJL. Five genes encoding surface-exposed LPXTG proteins are enriched in hospital-adapted *Enterococcus faecium* clonal complex 17 isolates. *J Bacteriol*. 2007 Nov 15;189(22):8321–32.
- 160.** Herrera S, Sorlí L, Pérez-Sáez MJ, Ruiz-Garbajosa P, Barrios C, Plasencia V, et al. Characterization and rapid control of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) outbreak in a renal transplant unit in Spain: The environment matters. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2017 Jan;35(1):5–11.
- 161.** Hill EE, Herijgers P, Claus P, Vanderschueren S, Herregods MC, Peetermans WE. Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study. *European Heart Journal*. 2006 Jun 7;28(2):196–203.
- 162.** Hodel-Christian SL, Murray BE. Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from *Enterococcus faecalis* and comparison to staphylococcal transposons Tn4001 and Tn4031. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Jun;35(6):1147–52.
- 163.** Hodges TL, Zigelboim-Daum S, Eliopoulos GM, Wennersten C, Moellering RC. Antimicrobial susceptibility changes in *Enterococcus faecalis* following various penicillin exposure regimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Jan;36(1):121–5.
- 164.** Hollingshead S, Vapnek D. Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. *Plasmid*. 1985 Jan;13(1):17–30.
- 165.** Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):1963–71.
- 166.** Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*. 2000 Aug 1;31(Supplement\_2):S24–8.
- 167.** Humphreys H, Dolan V, Sexton T, Conlon P, Rajan L, Creamer E, et al. Implications of colonization of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in renal dialysis patients. Learning to live with it? *Journal of Hospital Infection*. 2004 Sep;58(1):28–33.
- 168.** Huycke MM. Physiology of Enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, editors. *The Enterococci*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 133–75.
- 169.** Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Aug;35(8):1626–34.
- 170.** Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2000 Feb;183(2):201–7.
- 171.** Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest*. 2000 Jul;118(1):146–55.
- 172.** Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, van Laer F, Goossens H. Comparison of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 1999 May;37(5):1436–40.
- 173.** Infante VHP, Conceição N, de Oliveira AG, da Costa Darini AL. Evaluation of polymorphisms in *pbp4* gene and genetic diversity in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* from hospitals in different states in Brazil. Enright M, editor. *FEMS Microbiology Letters*. 2016 Apr;363(7):fnw044.
- 174.** İşeri L, Şahin E, Dolapçı İ, Yürüken Z. Minimum inhibitory concentration values and problematic disk break points of tigecycline against vancomycin and/or high-level aminoglycoside-resistant enterococci. *Alexandria Journal of Medicine*. 2016 Jun 1;52(2):125–9.
- 175.** Isnard C, Malbruny B, Leclercq R, Cattoir V. Genetic basis for in vitro and in vivo resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins (LSAP phenotype) in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Sep;57(9):4463–9.

- 176.** Isogai N, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ghosh S, Suzaki K, Watanabe N, et al. Characterization of *Enterococcus faecium* with macrolide resistance and reduced susceptibility to quinupristin/dalfopristin in a Japanese hospital: Detection of extensive diversity in erm (B)-regulator regions. *Microbial Drug Resistance*. 2013 Aug;19(4):298–307.
- 177.** Ivanov I, Dobrinov V, Hitkova H, Popova† V, Ivanova K, Dobрева E, et al. Molecular characterization of a large hospital outbreak caused by glycopeptide – resistant *Enterococcus faecium* ST203 (CC17). In 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Madrid, Spain; 2018.
- 178.** Jahansepas A, Aghazadeh M, Rezaee MA, Hasani A, Sharifi Y, Aghazadeh T, et al. Occurrence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in various clinical infections: Detection of their drug resistance and virulence determinants. *Microbial Drug Resistance*. 2018 Jan;24(1):76–82.
- 179.** Jawetz E, Sonne M. Penicillin-streptomycin treatment of enterococcal endocarditis: A re-evaluation. *N Engl J Med*. 1966 Mar 31;274(13):710–5.
- 180.** Jenkins SG, Raskoshina L, Schuetz AN. Comparison of performance of the novel chromogenic Spectra VRE agar to that of bile esculin zzide and *Campylobacter* agars for detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011 Nov;49(11):3947–9.
- 181.** Jensen TG, Konradsen HB, Bruun B. Evaluation of the Rapid ID 32 Strep system. *Clinical Microbiology and Infection*. 1999 Jul;5(7):417–23.
- 182.** Jett BD, Jensen HG, Atkuri RV, Gilmore MS. Evaluation of therapeutic measures for treating endophthalmitis caused by isogenic toxin-producing and toxin-nonproducing *Enterococcus faecalis* strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995 Jan;36(1):9–15.
- 183.** Jo I, Song CE, Park KG, Park YJ. Comparison of three chromogenic media for recovery of vancomycin-resistant enterococci from rectal swab samples. *Annals of Clinical Microbiology*. 2015;18(3):82.
- 184.** Jovanović M, Milošević B, Tošić T, Stevanović G, Mioljević V, Indić N, et al. Molecular typing, pathogenicity factor genes and antimicrobial susceptibility of vancomycin resistant enterococci in Belgrade, Serbia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2015 Jun;62(2):147–60.
- 185.** Kallstrom G, Doern CD, Dunne WM. Evaluation of a chromogenic agar under development to screen for VRE colonization. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010 Mar;48(3):999–1001.
- 186.** Kao SJ, Petrin J, Shaw KJ, Chow JW. Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene aph(2Ն)-Ib in *Enterococcus faecium*. 2000;44:4.
- 187.** Kaplan AH, Gilligan PH, Facklam RR. Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. *J Clin Microbiol*. 1988 Jun;26(6):1216–8.
- 188.** Kara A, Devrim İ, Bayram N, Katipoğlu N, Kiran E, Oruç Y, et al. Risk of vancomycin-resistant enterococci bloodstream infection among patients colonized with vancomycin-resistant enterococci. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2015 Jan;19(1):58–61.
- 189.** Kawalec M, Kedzierska J, Gajda A, Sadowy E, Wegrzyn J, Naser S, et al. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007 Sep;13(9):893–901.
- 190.** Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004 Sep;15(5):308–20.
- 191.** Keith JW, Pamer EG. Enlisting commensal microbes to resist antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Experimental Medicine*. 2019 Jan 7;216(1):10–9.
- 192.** Kemp KD, Singh KV, Nallapareddy SR, Murray BE. Relative contributions of *Enterococcus faecalis* OG1RF sortase-encoding genes, *srtA* and *bps* ( *srtC* ), to biofilm formation and a murine model of urinary tract infection. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5399–404.
- 193.** Khairy RM, Mahmoud MS, Esmail MAM, Gamil AN. First detection of vanB phenotype-vanA genotype vancomycin-resistant enterococci in Egypt. *J Infect Dev Ctries*. 2019 Sep 30;13(09):837–42.
- 194.** Khan MA, Al-Rashid F, Meqdam M, Al-Ajlan H, Al-Mogbel M. Whole genome sequencing of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolated from Saudi Arabia. *Biosci, Biotech Res Asia*. 2018 Dec 28;15(4):791–7.
- 195.** Kim MC, Woo GJ. Characterization of antimicrobial resistance and quinolone resistance factors in high-level ciprofloxacin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*

isolates obtained from fresh produce and fecal samples of patients: Quinolone resistance factors in enterococci. *J Sci Food Agric*. 2017 Jul;97(9):2858–64.

**196.** Klare I, Rodloff AC, Wagner J, Witte W, Hakenbeck R. Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Apr;36(4):783–7.

**197.** Kolenbrander PE, Andersen RN, Baker RA, Jenkinson HF. The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn<sup>2+</sup> uptake. *J Bacteriol*. 1998 Jan;180(2):290–5.

**198.** Korczynska M, Mukhtar TA, Wright GD, Berghuis AM. Structural basis for streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* by virginiamycin B lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 19;104(25):10388–93.

**199.** Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, Murray BE, Nallapareddy SR, Gillespie MJ. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *J Endod*. 2006 Jul;32(7):634–7.

**200.** Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006 Dec;6(1):130.

**201.** Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun*. 1992 Jan;60(1):25–30.

**202.** Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 2004 Jan;186(1):154–63.

**203.** Krogstad DJ, Korfhagen TR, Moellering RC, Wennersten C, Swartz MN, Perzynski S, et al. Aminoglycoside-inactivating enzymes in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest*. 1978 Aug 1;62(2):480–6.

**204.** Krogstad DJ, Pargwette AR. Defective killing of enterococci: a common property of antimicrobial agents acting on the cell wall. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980 Jun;17(6):965–8.

**205.** Kuch A, Stefaniuk E, Ozorowski T, Hryniewicz W. New selective and differential chromogenic agar medium, chromID VRE, for screening vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *Journal of Microbiological Methods*. 2009 Apr;77(1):124–6.

**206.** Kuehnert MJ, Jernigan JA, Pullen AL, Rimland D, Jarvis WR. Association between mucositis severity and vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infection in hospitalized cancer patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999 Oct;20(10):660–3.

**207.** Lancefield RC. A serologic differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine*. 1933 Apr 1;57(4):571–95.

**208.** Landman D, Quale JM, Oydna E, Willey B, Ditore V, Zaman M, et al. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*. 1996 Mar;34(3):751–2.

**209.** Laverde Gomez JA, van Schaik W, Freitas AR, Coque TM, Weaver KE, Francia MV, et al. A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a hylEfm genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011 Feb;301(2):165–75.

**210.** Lazarova G, Kantardjiev T, Velinov C, Rachkova K, Rukanova D, Dukova I, et al. Vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients with urinary tract infections - first report in Bulgaria. 2005;3(4):13–14.

**211.** Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol*. 2004 Feb;186(3):672–82.

**212.** Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*. 2006 Oct;9(5):454–60.

**213.** Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, et al. d-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011 Oct;55(10):4606–12.

**214.** Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New England Journal of Medicine*. 1988 Jul 21;319(3):157–61.

**215.** Leclercq R, Dutka-Malen S, Brisson-Noel A, Molinas C, Derlot E, Arthur M, et al. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clinical Infectious Diseases*. 1992a Sep 1;15(3):495–501.

- 216.** Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene vanC is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992b Sep;36(9):2005–8.
- 217.** Ledebøer NA, Das K, Eveland M, Roger-Dalbert C, Mailler S, Chatellier S, et al. Evaluation of a novel chromogenic agar medium for isolation and differentiation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007a May 1;45(5):1556–60.
- 218.** Ledebøer NA, Tibbetts RJ, Dunne WM. A new chromogenic agar medium, chromID VRE, to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2007b Dec;59(4):477–9.
- 219.** Lee PP, Ferguson DA, Laffan JJ. Vancomycin-resistant *Enterococcus avium* infections: Report of 2 cases and a review of *Enterococcus avium* infections. *Infectious Diseases in Clinical Practice.* 2004 Jul;12(4):239–44.
- 220.** Lee SY, Park KG, Lee GD, Park JJ, Park YJ. Comparison of Seeplex VRE detection kit with ChromID VRE agar for detection of vancomycin-resistant enterococci in rectal swab specimens. *Ann Clin Lab Sci.* 2010;40(2):163–6.
- 221.** Leendertse M, Heikens E, Wijnands LM, van Luit-Asbroek M, Teske GJD, Roelofs JJTH, et al. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium* – induced urinary tract infection in mice. *J Infect Dis.* 2009 Oct;200(7):1162–5.
- 222.** Leonard BA, Podbielski A, Hedberg PJ, Dunny GM. *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996 Jan 9;93(1):260–4.
- 223.** Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell.* 2006 Feb;124(4):837–48.
- 224.** Li W, Li J, Wei Q, Hu Q, Lin X, Chen M, et al. Characterization of aminoglycoside resistance and virulence genes among *Enterococcus* spp. isolated from a hospital in China. *IJERPH.* 2015 Mar 11;12(3):3014–25.
- 225.** Ligozzi M, Pittaluga F, Fontana R. Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Feb;40(2):354–7.
- 226.** López M, Tenorio C, Del Campo R, Zarazaga M, Torres C. Characterization of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in vancomycin-resistant enterococci of different origins. *Journal of Chemotherapy.* 2011 Apr;23(2):87–91.
- 227.** Low YL, Jakubovics NS, Flatman JC, Jenkinson HF, Smith AW. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol.* 2003 Feb;52(Pt 2):113–9.
- 228.** Lowe AM, Lambert PA, Smith AW. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun.* 1995 Feb;63(2):703–6.
- 229.** Lübbert C, Rodloff AC, Hamed K. Real-world treatment of enterococcal infections with daptomycin: Insights from a large European registry (EU-CORE). *Infect Dis Ther.* 2015 Sep;4(3):259–71.
- 230.** Lyon BR, May JW, Skurray RA. Tn4001: A gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Molec Gen Genet.* 1984 Mar;193(3):554–6.
- 231.** Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection.* 2012 Mar;18(3):268–81.
- 232.** Mainardi JL, Gutmann L, Acar JF, Goldstein FW. Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Sep;39(9):1984–7.
- 233.** Maisey HC, Hensler M, Nizet V, Doran KS. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J Bacteriol.* 2007 Feb 15;189(4):1464–7.
- 234.** Mandlik A, Swierczynski A, Das A, Ton-That H. *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells: Host cell adherence mediated by minor pilins. *Molecular Microbiology.* 2007 Mar 16;64(1):111–24.
- 235.** Marbjerg L, Stougaard CL, Sørensen SAG, Thomsen AV, Wang L, Andersen L, et al. A new tool for analyses of whole genome sequences reveals dissemination of specific strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a hospital. *Front Med.* 2021 Oct 27;8:733676.

- 236.** Marcade G, Micol JB, Jacquier H, Raskine L, Donay JL, Nicolas-Viaud S, et al. Outbreak in a haematology unit involving an unusual strain of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* carrying both vanA and vanB genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014 Feb 1;69(2):500–5.
- 237.** Marchi AP, Perdigão Neto LV, Martins RCR, Rizek CF, Camargo CH, Moreno LZ, et al. Vancomycin-resistant enterococci isolates colonizing and infecting haematology patients: clonality, and virulence and resistance profile. *Journal of Hospital Infection*. 2018 Jul;99(3):346–55.
- 238.** Marom R, Mandel D, Haham A, Berger I, Ovental A, Raskind C, et al. A silent outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a neonatal intensive care unit. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020 Dec;9(1):87.
- 239.** Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance--an overview. *Indian J Med Microbiol*. 2005 Oct;23(4):214–9.
- 240.** Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB. Gene Dosage and Linezolid Resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Oct;46(10):3334–6.
- 241.** Maschieto A, Martinez R, Palazzo ICV, Darini AL da C. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Nov;99(7):763–7.
- 242.** Matsumura M, Katakura Y, Imanaka T, Aiba S. Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110. *J Bacteriol*. 1984 Oct;160(1):413–20.
- 243.** Mazuski JE. Vancomycin-resistant *Enterococcus*: Risk factors, surveillance, infections, and treatment. *Surgical Infections*. 2008 Dec;9(6):567–71.
- 244.** McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering RC, Gilmore MS. Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. Cowen L, editor. *PLoS ONE*. 2007 Jul 4;2(7):e582.
- 245.** Metallidis S, Chatzidimitriou M, Tsona A, Bisiklis A, Lazaraki G, Koumentaki E, et al. Vancomycin-resistant enterococci, colonizing the intestinal tract of patients in a university hospital in Greece. *Braz J Infect Dis*. 2006 Jun;10(3):179–84.
- 246.** Meyer and Schonfeld. Meyer, K., and H. Schönfeld. 1926. Über die Unterscheidung des *Enterococcus* vom *Streptococcus viridans* und die Beziehung beider zum *Streptococcus lactis*. *Zentralb. Bakteriol Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I orig*. 99:402-416. 1926.
- 247.** Miller WR, Bayer AS, Arias CA. Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016 Nov;6(11):a026997.
- 248.** Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014 Oct;12(10):1221–36.
- 249.** Mioljevic V, Markovic-Denic L, Vidovic A, Jovanovic M, Tosic T, Tomin D. Risk factors for vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization in hematologic patients. *VSP*. 2013;70(12):1109–16.
- 250.** Miranda AG, Singh KV, Murray BE. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. *J Clin Microbiol*. 1991 Dec;29(12):2752–7.
- 251.** Mishra NN, Bayer AS, Tran TT, Shamoo Y, Mileykovskaya E, Dowhan W, et al. Daptomycin resistance in enterococci is associated with distinct alterations of cell membrane phospholipid content. Msadek T, editor. *PLoS ONE*. 2012 Aug 27;7(8):e43958.
- 252.** Moellering RC. The enterococcus: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. *J Antimicrob Chemother*. 1991;28(1):1–12.
- 253.** Moellering RC, Weinberg AN. Studies on antibiotic synergism against enterococci. *J Clin Invest*. 1971 Dec 1;50(12):2580–4.
- 254.** Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*. 2007 Dec 1;56(12):1581–8.
- 255.** Montecalvo MA, de Lencastre H, Carraher M, Gedris C, Chung M, VanHorn K, et al. Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1995 Dec;16(12):680–5.
- 256.** Monticelli J, Knezevich A, Luzzati R, Di Bella S. Clinical management of non-*faecium* non-*faecalis* vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2018 Apr;24(4):237–46.
- 257.** Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Oct;13(4):513–22.

- 258.** Munita JM, Tran TT, Diaz L, Panesso D, Reyes J, Murray BE, et al. A *liaF* codon deletion abolishes daptomycin bactericidal activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jun;57(6):2831–3.
- 259.** Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1990 Jan;3(1):46–65.
- 260.** Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *The American Journal of Medicine*. 1997 Mar;102(3):284–93.
- 261.** Murray BE, Mederski-Samoraj B, Foster SK, Brunton JL, Harford P. In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggest a staphylococcal origin. *J Clin Invest*. 1986 Jan 1;77(1):289–93.
- 262.** Murray BE, Singh KV, Weinstock GM. Comparison of Genomic DNAs of Different Enterococcal Isolates Using Restriction Endonucleases with Infrequent Recognition Sites. *J Clin Microbiol*. 1990;28:5.
- 263.** Mylonakis E, Engelbert M, Qin X, Sifri CD, Murray BE, Ausubel FM, et al. The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect Immun*. 2002 Aug;70(8):4678–81.
- 264.** Nakayama J, Cao Y, Horii T, Sakuda S, Akkermans ADL, De Vos WM, et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*: Gelatinase-inducing pheromone of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*. 2001 Dec 21;41(1):145–54.
- 265.** Nakayama J, Chen S, Oyama N, Nishiguchi K, Azab EA, Tanaka E, et al. Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing System: the small open reading frame *fsrD* encodes the Gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD. *J Bacteriol*. 2006 Dec;188(23):8321–6.
- 266.** Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Höök M, Murray BE. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. Tuomanen EI, editor. *Infect Immun*. 2000 Sep;68(9):5218–24.
- 267.** Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. *Infect Immun*. 2008 Sep;76(9):4120–8.
- 268.** Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, Garsin DA, Hook M, Erlandsen SL, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Investigation*. 2006 Oct 2;116(10):2799–807.
- 269.** Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family: An *E. faecium* collagen-binding adhesin. *Molecular Microbiology*. 2003 Mar 5;47(6):1733–47.
- 270.** Nasaj M, Mousavi SM, Hosseini SM, Arabestani R. Prevalence of virulence factors and vancomycin-resistant genes among *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from clinical specimens. *Iran J Public Health*. 2016;45:8.
- 271.** Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Aug;38(8):1788–93.
- 272.** Nayak PP, Biranthabail D, Shenoy S, Kotian SM. Antibigram and genetic relatedness of clinical isolates of *Enterococcus* spp. in Mangalore, India. *J Infect Dev Ctries*. 2018 Nov 30;12(11):985–90.
- 273.** Neves FPG, Ribeiro RL, Duarte RS, Teixeira LM, Merquior VLC. Emergence of the *vanA* genotype among *Enterococcus gallinarum* isolates colonising the intestinal tract of patients in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009 Mar;33(3):211–5.
- 274.** Nguyen TDH, Evans KD, Goh RA, Tan GL, Peterson EM. Comparison of medium, temperature, and length of incubation for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 Jul 1;50(7):2503–5.
- 275.** de Niederhäusern S, Bondi M, Messi P, Iseppi R, Sabia C, Manicardi G, et al. Vancomycin-resistance transferability from VanA Enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*. 2011 May;62(5):1363–7.
- 276.** Niu H, Yu H, Hu T, Tian G, Zhang L, Guo X, et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016 Jul;47(3):691–6.

- 277.** Nomura T, Hashimoto Y, Kurushima J, Hirakawa H, Tanimoto K, Zheng B, et al. New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *Journal of Microbiological Methods*. 2018 Feb;145:69–72.
- 278.** Novicki TJ, Schapiro JM, Ulness BK, Sebeste A, Busse-Johnston L, Swanson KM, et al. Convenient selective differential broth for isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus* from fecal material. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004 Apr 1;42(4):1637–40.
- 279.** Oancea C. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004 Jun 16;54(1):232–5.
- 280.** Olivier CN, Blake RK, Steed LL, Salgado CD. Risk of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) bloodstream infection among patients colonized with VRE. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008 May;29(5):404–9.
- 281.** Olmsted SB, Kao SM, van Putte LJ, Gallo JC, Dunny GM. Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10. *J Bacteriol*. 1991 Dec;173(23):7665–72.
- 282.** Ongut G, Kilinckaya H, Baysan BO, Ogunc D, Colak D, Inan D, et al. Evaluation of Brilliance VRE agar for the detection of vancomycin-resistant enterococci in rectal swab specimens. *Journal of Medical Microbiology*. 2013 Apr 1;62(Pt\_4):661–2.
- 283.** Orenga S, James AL, Manafi M, Perry JD, Pincus DH. Enzymatic substrates in microbiology. *Journal of Microbiological Methods*. 2009 Nov;79(2):139–55.
- 284.** Özkaya-Parlakay A, Cengiz AB, Ceyhan M, Bağdat A, Barın Ç, Gürbüz V, et al. Vancomycin-resistant enterococcus colonization and infection in children: six-year follow-up. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 2014;56(6):8.
- 285.** Özsoy S, İlki A. Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in stool specimens submitted for *Clostridium difficile* toxin testing. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017 Jul;48(3):489–92.
- 286.** Padmasini E, Padmaraj R, Ramesh SS. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of *Enterococcus* species in Chennai, India. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:1–5.
- 287.** Palmer KL, Daniel A, Hardy C, Silverman J, Gilmore MS. Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul;55(7):3345–56.
- 288.** Pan SC, Wang JT, Chen YC, Chang YY, Chen ML, Chang SC. Incidence of and Risk Factors for Infection or Colonization of Vancomycin-Resistant Enterococci in Patients in the Intensive Care Unit. *Salluh JIF*, editor. *PLoS ONE*. 2012 Oct 10;7(10):e47297.
- 289.** Panesso D, Montealegre MC, Rincón S, Mojica MF, Rice LB, Singh KV, et al. The *hlyEfm* gene in *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis. *BMC Microbiol*. 2011;11(1):20.
- 290.** Papadimitriou-Olivgeris M, Drougka E, Fligou F, Kolonitsiou F, Liakopoulos A, Dodou V, et al. Risk factors for enterococcal infection and colonization by vancomycin-resistant enterococci in critically ill patients. *Infection*. 2014 Dec;42(6):1013–22.
- 291.** Parikh SR, Toto PD, Grisamore TL. Streptococcal hyaluronidase and dentin caries. *J Dent Res*. 1965 Sep;44(5):996–1001.
- 292.** Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ, Lee IH. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4):1861–9.
- 293.** Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003 Jun 1;51(90003):13iii–21.
- 294.** Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Steckelberg JM, Kline B, et al. DNA sequence variation within *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes of clinical *Enterococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jan;42(1):202–5.
- 295.** Patti JM, Höök M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Current Opinion in Cell Biology*. 1994 Oct;6(5):752–8.
- 296.** Peel T, Cheng AC, Spelman T, Huysmans M, Spelman D. Differing risk factors for vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococcal bacteraemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012 Apr;18(4):388–94.
- 297.** Peltroche-Llacsahuanga H, Top J, Weber-Heynemann J, Lütticken R, Haase G. Comparison of Two Chromogenic Media for Selective Isolation of Vancomycin-Resistant Enterococci from Stool Specimens. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec;47(12):4113–6.
- 298.** Pericas JM, Cervera C, del Rio A, Moreno A, Garcia de la Maria C, Almela M, et al. Changes in the treatment of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis in Spain in the last 15

- years: from ampicillin plus gentamicin to ampicillin plus ceftriaxone. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Dec;20(12):O1075–83.
- 299.** Perry JD. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017 Apr;30(2):449–79.
- 300.** Peterson JF, Doern CD, Kallstrom G, Riebe KM, Sander T, Dunne WM, et al. Evaluation of Spectra VRE, a new chromogenic agar medium designed to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010 Dec;48(12):4627–9.
- 301.** Pfaller MA, Cormican M, Flamm RK, Mendes RE, Jones RN. Temporal and geographic variation in antimicrobial susceptibility and resistance patterns of enterococci: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019 Mar 15;6(Supplement\_1):S54–62.
- 302.** Pillai SK, Sakoulas G, Gold HS, Wennersten C, Eliopoulos GM, Moellering RC, et al. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J Clin Microbiol*. 2002a Jul;40(7):2651–2.
- 303.** Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, Eliopoulos GM, Moellering, Jr. RC, Ferraro MJ, et al. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. *J INFECT DIS*. 2002b Dec;186(11):1603–7.
- 304.** Popova VP, Sredkova MP, Hitkova HH, Ivanov KT, Popov VG. Multidrug Resistance Among Enterococci at a Tertiary Care Hospital in Northern Bulgaria. *Journal of Biomedical and Clinical Research*. 2013 Sep 1;6(1):12–7.
- 305.** Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Apr;44(4):967–71.
- 306.** Protonotariou E, Dimitroulia E, Pournaras S, Pitiriga V, Sofianou D, Tsakris A. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. *Journal of Hospital Infection*. 2010 Jul;75(3):225–7.
- 307.** Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. Tuomanen EI, editor. *Infect Immun*. 2000 May;68(5):2579–86.
- 308.** Radhouani H, Igrejas G, Carvalho C, Pinto L, Gonçalves A, Lopez M, et al. Clonal lineages, antibiotic resistance and virulence factors in vancomycin-resistant enterococci isolated from fecal samples of red foxes (*Vulpes Vulpes*). *Journal of Wildlife Diseases*. 2011 Jul;47(3):769–73.
- 309.** Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K, Mee M, Mariscalco MM, Dunny GM, et al. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. Tuomanen EI, editor. *Infect Immun*. 1999 Nov;67(11):6067–75.
- 310.** Ramotar K, Woods W, Larocque L, Toye B. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (VanC VRE). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2000;6.
- 311.** Reuter S, Ellington MJ, Cartwright EJP, Köser CU, Török ME, Gouliouris T, et al. Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA Intern Med*. 2013 Aug 12;173(15):1397.
- 312.** Reynolds PE, Snaith HA, Maguire AJ, Dutka-Malen S, Courvalin P. Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Biochemical Journal*. 1994 Jul 1;301(1):5–8.
- 313.** Rice LB, Carias LL, Hutton-Thomas R, Sifaoui F, Gutmann L, Rudin SD. Penicillin-binding protein 5 and expression of ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 May;45(5):1480–6.
- 314.** Rice LB, Marshall SH. Evidence of incorporation of the chromosomal beta-lactamase gene of *Enterococcus faecalis* CH19 into a transposon derived from staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Sep;36(9):1843–6.
- 315.** Rice LB, Shlaes DM. Vancomycin Resistance in the *Enterococcus*: Relevance in Pediatrics. *Pediatric Clinics of North America*. 1995 Jun;42(3):601–18.
- 316.** Roberts RR, Hota B, Ahmad I, Scott II RD, Foster SD, Abbasi F, et al. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago Teaching hospital: Implications for antibiotic stewardship. *CLIN INFECT DIS*. 2009 Oct 15;49(8):1175–84.

- 317.** Rochaix. Rochaix, A. 1924. Milieux a leculine pour le diagnostid differentiel des bacteries du grojps streptoentero-pneumocoque. Comt. Rend. Soc. Biol. 90:771-772. 1924.
- 318.** Rogers LA, Strong K, Cork SC, McAllister TA, Liljebjelke K, Zaheer R, et al. The role of whole genome sequencing in the surveillance of antimicrobial resistant *Enterococcus* spp.: A scoping review. *Front Public Health*. 2021 Jun 10;9:599285.
- 319.** Roghmann M, Morris JG. Longitudinal follow-up of cancer patient colonized by vancomycin-resistant enterococcus (VRE). Presented at the 34th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; September 1996; New Orleans, LA. Abstract 51.
- 320.** Roghmann MC, Qaiyumi S, Schwalbe R, Morris JG. Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1997 Oct;18(10):679–80.
- 321.** Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiology Letters*. 2006 Mar;256(1):145–50.
- 322.** Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microbial Pathogenesis*. 2001 Apr;30(4):211–20.
- 323.** Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJM, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol*. 2006 Jun;44(6):2220–8.
- 324.** Rybkine T, Mainardi JL, Sougakoff W, Collatz E, Gutmann L. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of -lactam resistance. *Journal of Infectious Diseases*. 1998 Jul 1;178(1):159–63.
- 325.** Ryu BH, Hong J, Jung J, Kim MJ, Sung H, Kim MN, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of *Enterococcus durans* bacteremia: a 20-year experience in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Sep;38(9):1743–51.
- 326.** Sacramento AG, Zanella RC, Esposito F, Costa EAS, de Almeida LM, Pires C, et al. Changed epidemiology during intra and interhospital spread of high-risk clones of vanA -containing *Enterococcus* in Brazilian hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2017 Aug;88(4):348–51.
- 327.** Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Daptomycin activity tested against 164457 bacterial isolates from hospitalised patients: Summary of 8 years of a Worldwide Surveillance Programme (2005–2012). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2014 May;43(5):465–9.
- 328.** Sahm DF, Free L, Smith C, Eveland M, Mundy LM. Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*. 1997 Aug;35(8):2026–30.
- 329.** Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J, et al. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989 Sep;33(9):1588–91.
- 330.** Sattari-Maraji A, Jabalameli F, Node Farahani N, Beigverdi R, Emaneini M. Antimicrobial resistance pattern, virulence determinants and molecular analysis of *Enterococcus faecium* isolated from children infections in Iran. *BMC Microbiol*. 2019 Dec;19(1):156.
- 331.** Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, Dinges MM, Stoehr JA, Harmala JW, et al. Aggregation and Binding Substances Enhance Pathogenicity in Rabbit Models of *Enterococcus faecalis* Endocarditis. *Infect Immun*. 1998 Jan;66(1):218–23.
- 332.** Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss A. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2000 Dec 1;19(11):816–22.
- 333.** Seo JY, Kim PW, Lee JH, Song JH, Peck KR, Chung DR, et al. Evaluation of PCR-based screening for vancomycin-resistant enterococci compared with a chromogenic agar-based culture method. *Journal of Medical Microbiology*. 2011 Jul 1;60(7):945–9.
- 334.** Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*. 2002 Jun;417(6890):746–50.
- 335.** Shankar N, Lockett CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Tuomanen EI, editor. *Infect Immun*. 2001 Jul;69(7):4366–72.

- 336.** Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*. 1999 Jan;67(1):193–200.
- 337.** Shaw KJ, Rather PN. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. 1993 Mar;57(1):138–63.
- 338.** Shay DK, Goldmann DA, Jarvis WR. Reducing the spread of antimicrobial-resistant microorganisms: Control of vancomycin-resistant enterococci. *Pediatric Clinics of North America*. 1995 Jun;42(3):703–16.
- 339.** Sheldon WL, Macauley MS, Taylor EJ, Robinson CE, Charnock SJ, Davies GJ, et al. Functional analysis of a group A streptococcal glycoside hydrolase Spy1600 from family 84 reveals it is a beta-N-acetylglucosaminidase and not a hyaluronidase. *Biochem J*. 2006 Oct 15;399(2):241–7.
- 340.** Shirano M, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura Y, Matsushima A, Nagao M, et al. Regional spread of *vanA* - or *vanB* -positive *Enterococcus gallinarum* in hospitals and long-term care facilities in Kyoto prefecture, Japan. *Epidemiol Infect*. 2011 Mar;139(3):430–6.
- 341.** Shokohizadeh L, Ekrami A, Labibzadeh M, Ali L, Alavi SM. Antimicrobial resistance patterns and virulence factors of enterococci isolates in hospitalized burn patients. *BMC Res Notes*. 2018 Dec;11(1):1.
- 342.** Shrestha S, Kharel S, Homagain S, Aryal R, Mishra SK. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Asia - A systematic review and meta-analysis. *J Clin Pharm Ther*. 2021 Feb 25;jcpt.13383.
- 343.** Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *American Journal of Infection Control*. 2007 Dec;35(10):S165–93.
- 344.** Sieńko A, Ojdana D, Majewski P, Sacha P, Wieczorek P, Tryniszewska E. Comparison of biofilm-producing *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and unusual *Enterococcus* strains. 2017 Oct 2;7(4):291–8.
- 345.** Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2013 Jan;34(01):1–14.
- 346.** Sifri CD, Mylonakis E, Singh KV, Qin X, Garsin DA, Murray BE, et al. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and Mice. *Infect Immun*. 2002 Oct;70(10):5647–50.
- 347.** Sillanpää J, Nallapareddy SR, Houston J, Ganesh VK, Bourgogne A, Singh KV, et al. A family of fibrinogen-binding MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*. 2009 Jul 1;155(7):2390–400.
- 348.** Sillanpää J, Nallapareddy SR, Prakash VP, Qin X, Höök M, Weinstock GM, et al. Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. *Microbiology*. 2008 Oct 1;154(10):3199–211.
- 349.** Sillanpää J, Xu Y, Nallapareddy SR, Murray BE, Höök M. A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*. 2004 Jul 1;150(7):2069–78.
- 350.** Simner PJ, Adam H, Baxter M, McCracken M, Golding G, Karlowsky JA, et al. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Canadian hospitals (CANWARD Study, 2007 to 2013). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015 Jul;59(7):4315–7.
- 351.** Singh KV, Coque TM, Weinstock GM, Murray BE. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 1998a Aug;21(4):323–31.
- 352.** Singh KV, Nallapareddy SR, Murray BE. Importance of the *ebp* (endocarditis- and biofilm-Associated Pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. *J INFECT DIS*. 2007 Jun;195(11):1671–7.
- 353.** Singh KV, Nallapareddy SR, Sillanpää J, Murray BE. Importance of the collagen adhesin *ace* in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. *PLoS Pathog*. 2010 Jan 8;6(1):e1000716.
- 354.** Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. Generation and Testing of Mutants of *Enterococcus faecalis* in a Mouse Peritonitis Model. *J INFECT DIS*. 1998b Nov;178(5):1416–20.

- 355.** Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jun;46(6):1845–50.
- 356.** Smith MC, Murray BE. Comparison of enterococcal and staphylococcal beta-lactamase-encoding fragments. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 Feb;36(2):273–6.
- 357.** Smith PW, Bennett G, Bradley S, Drinka P, Lautenbach E, Marx J, et al. Shea/Apic Guideline: Infection Prevention and Control In The Long-Term Care Facility. *Infection Control & Hospital Epidemiology.* 2008 Sep;29(09):785–814.
- 358.** Soares RO, Rossato AM, Sambrano GE, Tolfo NCC, Caierão J, Paim TG da S, et al. Evaluation of a selective chromogenic medium for detecting vancomycin-resistant enterococci. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2017 Oct;48(4):782–4.
- 359.** Sohn KM, Peck KR, Joo EJ, Ha YE, Kang CI, Chung DR, et al. Duration of colonization and risk factors for prolonged carriage of vancomycin-resistant enterococci after discharge from the hospital. *International Journal of Infectious Diseases.* 2013 Apr;17(4):e240–6.
- 360.** Song JY, Cheong HJ, Seo YB, Kim IS, Heo JY, Noh JY, et al. Clinical and microbiological characteristics of vancomycin-resistant enterococci with the VanD phenotype and vanA genotype. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(1):1–5.
- 361.** Sooyoun L, JinHi P, HyangSook P, MiAe L, EunSuk K, KiSook H. Comparison of antimicrobial susceptibility testing methods to detect glycopeptide resistance in enterococci -E-test, Vitek, disk diffusion and agar dilution method-. *Korean Journal of Clinical Pathology.* 2000;20(3):301–7.
- 362.** Stamper PD, Shulder S, Bekalo P, Manandhar D, Ross TL, Speser S, et al. Evaluation of BBL CHROMagar VanRE for detection of vancomycin-resistant enterococci in rectal swab specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 2010 Nov 1;48(11):4294–7.
- 363.** Stark JM. Antibiotic activity of haemolytic enterococci. *The Lancet.* 1960 Apr;275(7127):733–4.
- 364.** Stoikov I, Ivanov IN, Sabtcheva S. In silico development of high-resolution MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium*. 2020;48(1):5–14.
- 365.** Strateva T, Atanasova D, Mitov I, Sirakov I, Katrandjieva A. Emergence of VanB phenotype-vanA genotype *Enterococcus faecium* clinical isolate in Bulgaria. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2014 Nov;18(6):693–5.
- 366.** Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2016 Mar;20(2):127–33.
- 367.** Strateva T, Peykov S, Sirakov I, Savov E, Dimov S, Mitov I. First detection and characterisation of a VanA-type *Enterococcus faecalis* clinical isolate from Bulgaria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2019 Sep;18:260–2.
- 368.** Strateva T, Sirakov I, Dimov S, Trifonova A, Savov E, Mitov I. Clonal spread of *vanA* *Enterococcus faecium* sequence type 203 in Bulgarian hospitals. *Infectious Diseases.* 2018 Mar;50(9):718-21.
- 369.** Suntharam N, Lankford MG, Trick WE, Peterson LR, Noskin GA. Risk factors for acquisition of vancomycin-resistant enterococci among hematology-oncology patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2002 Jul;43(3):183–8.
- 370.** Süssmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun.* 2000 Sep;68(9):4900–6.
- 371.** Suwantarant N, Roberts A, Prestridge J, Seeley R, Speser S, Harmon C, et al. Comparison of five chromogenic media for recovery of vancomycin-resistant enterococci from fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology.* 2014 Nov 1;52(11):4039–42.
- 372.** Suzuki H, Hase R, Otsuka Y, Hosokawa N. A 10-year profile of enterococcal bloodstream infections at a tertiary-care hospital in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2017 Jun;23(6):390–3.
- 373.** Swan A. The use of a bile-aesculin medium and of Maxted's technique of Lancefield grouping in the identification of enterococci (Group D Streptococci). *Journal of Clinical Pathology.* 1954 May 1;7(2):160–3.
- 374.** Swenson JM, Clark NC, Ferraro MJ, Sahm DF, Doern G, Pfaller MA, et al. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 1994 Jul;32(7):1700–4.

- 375.** Swenson JM, Hill BC, Thornsberry C. Problems with the disk diffusion test for detection of vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1989 Sep;27(9):2140–2.
- 376.** Tankovic J, Bachoual R, Ouabdesselam S, Boudjadja A, Soussy CJ. In-vitro activity of moxifloxacin against fluoroquinolone-resistant strains of aerobic Gram-negative bacilli and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1999 May 1;43(suppl\_2):19–23.
- 377.** Tannock GW, Cook G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance* ASM Press, Washington, DC. 2002:101-132
- 378.** Taylor ME, Oppenheim BA, Chadwick PR, Weston D, Palepou MFI, Woodford N, et al. Detection of glycopeptide-resistant enterococci in routine diagnostic faeces specimens. *Journal of Hospital Infection.* 1999 Sep;43(1):25–32.
- 379.** Teixeira et al. Teixeira LM, Carvalho MG S, Facklam RR and Shewmaker P L. Enterococcus. In *Manual of Clinical Microbiology.* Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC. 11th edn, vol. 1. Washington, DC, USA. 2015, 403–421.
- 380.** Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):6032–9.
- 381.** Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 2005 Sep;187(17):6213–22.
- 382.** Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 2006 Mar;188(6):2063–72.
- 383.** Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233–9.
- 384.** Thornsberry C, Baker CN, Facklam RR. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus bovis* and other group D streptococci causing endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974 Mar;5(3):228–33.
- 385.** Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2010 Nov;78(11):4936–43.
- 386.** Todd EW. A comparative serological study of streptolysins derived from human and from animal infections, with notes on pneumococcal hæmolysin, tetanolysin and staphylococcus toxin. *J Pathol.* 1934 Sep;39(2):299–321.
- 387.** Todokoro D, Tomita H, Inoue T, Ike Y. Genetic analysis of bacteriocin 43 of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Nov;72(11):6955–64.
- 388.** Toh SM, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, et al. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid: Linezolid resistance through ribosome modification. *Molecular Microbiology.* 2007 Jun;64(6):1506–14.
- 389.** Tokars JI, Gehr T, Jarvis WR, Anderson J, Armistead N, Miller ER, et al. Vancomycin-resistant enterococci colonization in patients at seven hemodialysis centers. *Kidney Int.* 2001 Oct;60(4):1511–6.
- 390.** Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The Enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Oct;67(10):4538–45.
- 391.** Top J, Banga NMI, Hayes R, Willems RJ, Bonten MJM, Hayden MK. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in a setting of polyclonal endemicity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection.* 2008 Apr;14(4):363–9.
- 392.** Top J, Schouls LM, Bonten MJM, Willems RJL. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004 Oct;42(10):4503–11.

- 393.** Top J, Willems R, Blok H, de Regt M, Jalink K, Troelstra A, et al. Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007 Mar;13(3):316–9.
- 394.** Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jan;49(1):118–25.
- 395.** Tresoldi AT, Cardoso LGO, Castilho GV, Dantas SRPE, von Nowakowski A, Pereira RM, et al. Low prevalence of vancomycin resistant enterococci colonization in intensive care patients in a Brazilian teaching hospital. *Braz J Infect Dis*. 2006 Aug;10(4):239–41.
- 396.** Tsai SF, Zervos MJ, Clewell DB, Donabedian SM, Sahm DF, Chow JW. A new high-level gentamicin resistance gene, aph(2<sup>''</sup>)-Id, in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemoter*. 1998;42(5):1229–32.
- 397.** Upadhyaya PG, Ravikumar K, Umapathy B. Review of virulence factors of *Enterococcus*: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2009 Oct;27(4):301–5.
- 398.** Uttley AnneHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet*. 1988 Jan;331(8575–8576):57–8.
- 399.** Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner SA, Chow JW. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Apr;47(4):1423–6.
- 400.** Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecón MA, Ortega M, Coque TM, et al. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009 Jan;63(1):17–20.
- 401.** Van Tyne D, Martin M, Gilmore M. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*. 2013 Apr 29;5(5):895–911.
- 402.** Van Wamel WJB, Hendrickx APA, Bonten MJM, Top J, Posthuma G, Willems R.JL. Growth condition-dependent esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun*. 2007 Feb;75(2):924–31.
- 403.** Vanek NN, Simon SI, Jacques-Palaz K, Mariscalco MM, Dunny GM, Rakita RM. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 1999 Oct;26(1):49–60.
- 404.** Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2004 Oct;42(10):4473–9.
- 405.** Vijaya et al. V. Evaluation of chromogenic media in detection of vancomycin resistant enterococci. *JCDR*. 2014 Nov;8(11):25–7.
- 406.** Walters MS, Eggers P, Albrecht V, Travis T, Lonsway D, Hovan G, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015 Sep 25;64(37):1056.
- 407.** Wang JS, Muzevich K, Edmond MB, Bearman G, Stevens MP. Central nervous system infections due to vancomycin-resistant enterococci: case series and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014 Aug;25:26–31.
- 408.** Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Aug;70(8):2182–90.
- 409.** Wardal E, Markowska K, Żabicka D, Wróblewska M, Giemza M, Mik E, et al. Molecular analysis of VanA outbreak of *Enterococcus faecium* in two Warsaw hospitals: The importance of mobile genetic elements. *BioMed Research International*. 2014;14:1–12.
- 410.** Watanabe S, Kobayashi N, Quiñones D, Hayakawa S, Nagashima S, Uehara N, et al. Genetic Diversity of the low-level vancomycin resistance Gene vanC-2/vanC-3 and identification of a novel vanC subtype ( vanC-4 ) in *Enterococcus casseliflavus*. *Microbial Drug Resistance*. 2009 Mar;15(1):1–9.
- 411.** Waters CM, Hirt H, McCormick JK, Schlievert PM, Wells CL, Dunny GM. An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation,

- bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid: AS binding to LTA. *Molecular Microbiology*. 2004 Apr 13;52(4):1159–71.
- 412.** Waters CM, Wells CL, Dunny GM. The aggregation domain of aggregation substance, not the RGD motifs, is critical for efficient internalization by HT-29 Enterocytes. *Infect Immun*. 2003 Oct;71(10):5682–9.
- 413.** Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016 Nov;37(11):1288–301.
- 414.** Weinstein JW, Tallapragada S, Farrel P, Dembry LM. Comparison of rectal and perirectal swabs for detection of colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*. 1996 Jan;34(1):210–2.
- 415.** Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, et al. Colonization, Bloodstream Infection, and Mortality Caused by Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Early after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007 May;13(5):615–21.
- 416.** Wells CL, Moore EA, Hoag JA, Hirt H, Dunny GM, Erlandsen SL. Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. Tuomanen EI, editor. *Infect Immun*. 2000 Dec;68(12):7190–4.
- 417.** Werner G. Molecular Typing of Enterococci/Vre. *J Bacteriol Parasitol*. 2013;01(S5).
- 418.** Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*. 2008a Nov 20;13(47):19046.
- 419.** Werner G, Fleige C, Ewert B, Laverde-Gomez JA, Klare I, Witte W. High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010 Feb;35(2):119–25.
- 420.** Werner G, Freitas AR, Coque TM, Sollid JE, Lester C, Hammerum AM, et al. Host range of enterococcal vanA plasmids among Gram-positive intestinal bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011 Feb;66(2):273–82.
- 421.** Werner G, Grörorer S, Fleige C, Witte W, Klare I. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *J Antimicrob Chemother*. 2008b May;61(5):1182–3.
- 422.** Werner G, Klare I, Witte W. Molecular analysis of streptogramin resistance in enterococci. *Int J Med Microbiol*. 2002 Jul;292(2):81–94.
- 423.** Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheuve M, Tribe D, Manziros X, et al. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *The Lancet*. 2001 Mar;357(9259):853–5.
- 424.** Willems RJL, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jun;11(6):821–8.
- 425.** Williamson R, Le Bouguenec C, Gutmann L, Horaud T. One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. *Microbiology*. 1985 Aug 1;131(8):1933–40.
- 426.** Woodford N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microbial Drug Resistance*. 2001 Sep;7(3):229–36.
- 427.** Worth LJ. Vancomycin-resistant enterococci in patients with hematological malignancy: curbing an endemic pathogen. *Leukemia & Lymphoma*. 2014 Jun;55(6):1225–6.
- 428.** Worth LJ, Thursky KA, Seymour JF, Slavin MA. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in patients with hematologic malignancy: patients with acute myeloid leukemia are at high-risk. *Eur J Haematol*. 2007 Sep;79(3):226–33.
- 429.** Wright GD, Ladak P. Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 May;41(5):956–60.

- 430.** Wright GD, Molinas C, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. Characterization of vanY, a DD-carboxypeptidase from vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 Jul;36(7):1514–8.
- 431.** Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, et al. vanM, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010 Nov 1;54(11):4643–7.
- 432.** Yang J xian, Li T, Ning Y zhong, Shao D hua, Liu J, Wang S qin, et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. *Infection, Genetics and Evolution.* 2015 Jul;33:253–60.
- 433.** Yoon YK, Lee SE, Lee J, Kim HJ, Kim JY, Park DW, et al. Risk factors for prolonged carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* among patients in intensive care units: a case-control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011 Aug 1;66(8):1831–8.
- 434.** You MS, Facklam RR. New test system for identification of *Aerococcus*, *Enterococcus*, and *Streptococcus* species. *J Clin Microbiol.* 1986 Oct;24(4):607–11.
- 435.** Yowler CJ, Blinkhorn RJ, Fratianne RB. Vancomycin-dependent enterococcal strains: case report and review. *J Trauma.* 2000 Apr;48(4):783–5.
- 436.** Zacharioudakis IM, Zervou FN, Ziakas PD, Mylonakis E. Meta-analysis of methicillin-resistant colonization and risk of infection in dialysis patients. *JASN.* 2014 Sep;25(9):2131–41.
- 437.** Zacharioudakis IM, Zervou FN, Ziakas PD, Rice LB, Mylonakis E. Vancomycin-resistant enterococci colonization among dialysis patients: A meta-analysis of prevalence, risk factors, and significance. *American Journal of Kidney Diseases.* 2015 Jan;65(1):88–97.
- 438.** Zervos MJ, Schaberg DR. Reversal of the in vitro susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Sep;28(3):446–8.
- 439.** Ziakas PD, Thapa R, Rice LB, Mylonakis E. Trends and Significance of VRE Colonization in the ICU: A Meta-Analysis of Published Studies. Ratner AJ, editor. *PLoS ONE.* 2013 Sep 27;8(9):e75658.
- 440.** Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-Resistant Enterococci: Colonization, Infection, Detection, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings.* 2006 Apr;81(4):529–36.
- 441.** Zou LK, Wang HN, Zeng B, Li JN, Li XT, Zhang AY, et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiology.* 2011;34:73–80.

## IX. 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 (**Приложение 1**).
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.

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

### 1. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- **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)
- **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)
- **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.

### 2. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

#### Научни форуми в чужбина

- **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.
- **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.
- **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 Number: 3539.

## Научни форуми в България

- **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.
- **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.
- **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.
- **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.
- **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.
- **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.
- **Христова П**, Христов И, 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.

## XI. ПРИЛОЖЕНИЯ

## Информационен лист за пациента

Интестинална колонизация с ванкомицин-резистентни ентерококи при пациенти на хемодиализа
--

Уважаеми Господине/ Госпожо,

Бихме искали да Ви помолим да участвате в изследователски проект с горепосоченото заглавие, тъй като при пациентите на хемодиализа е повишен риска за интестинално носителство на ванкомицин-резистентни ентерококи. Участието е изцяло доброволно и ако не желаете, не трябва да се включвате в този проект.

Важно е да прочетете внимателно тази информация, преди да решите дали ще се включите в проекта. След като се запознаете с информацията имате право да зададете въпроси и ако получите удовлетворяващи Ви отговори, моля, попълнете формуляра, като с това ще потвърдите доброволното си желание за участие в проекта.

Ако решите да откажете своето участие или да се оттеглите от проучването, което имате право да направите по всяко време, без да давате обяснения, лечението Ви няма да бъде повлияно от това Ваше решение. То няма да се отрази и на отношението на медицинския персонал към Вас, както и на цялостните грижи за Вашето здраве. Ако се откажете от участие в проекта, Ви молим да уведомите изследователския екип.

Проектът ще се осъществява от екип лекари от Лаборатория по микробиология и вирусология и Клиника по нефрология и хемодиализа. По всички интересувачи Ви въпроси можете да се отнасяте към доц. д-р Христина Хиткова, д-р Преслава Христова и д-р Гергана Тодорова.

Бихме искали да Ви помолим да участвате в проекта, за да получим отговор на въпроса каква е честотата на интестинална колонизация с ванкомицин-резистентни ентерококи при пациентите на хемодиализа и кои рискови фактори я благоприятстват. С изпълнението на този проект ще получим нови знания за епидемичната обстановка в клиничното звено и възможност за предприемане на мерки, с цел ограничаване разпространението на ванкомицин-резистентните ентерококи сред тази рискова група пациенти.

Проектът ще продължи 3 месеца.

При започването му, лекар-член на изследователския екип ще Ви зададе въпроси относно заболяванията, от които страдате сега или сте страдали в миналото, както и някои лични данни – рождена дата, адрес и телефони на Вас и на Ваши близки, за да може да се осъществява контакт с Вас и след като бъдете изписан(а) от болницата. Данните ще се нанасят в Карта на пациента – документ, до който ще имат достъп само членовете на изследователския екип.

Освен обичайните изследвания, задължително изисквани при пациенти на хемодиализа, ще Ви бъдат взети допълнително 2 ректални проби. Вземането на ректален секрет за това изследване не надвишава рисковете, свързани с вземане на други клинични материали за задължителните изследвания при пациенти с Вашето заболяване. Този риск ще бъде минимизиран поради това, че ректалният секрет ще се взема от обучен медицински персонал и при задължително спазване на условията за безопасност и правилна техника за изпълнение на манипулацията.

Ако решите да участвате, цялата информация за Вас ще остане поверителна. Определени упълномощени лица – членовете на екипа – ще имат достъп до Вашата медицинска карта, но при строга поверителност. Участието Ви не е свързано с допълнителни лични разходи, тъй като вземането на ректални проби ще се извърши по време на болничния Ви престой.

## Информационен лист за пациента

Интестинална колонизация с ванкомицин-резистентни ентерококи при пациенти с малигнени хематологични заболявания

Уважаеми Господине/ Госпожо,

Бихме искали да Ви помолим да участвате в изследователски проект с горепосоченото заглавие, тъй като при Вас е повишен риска от чревно носителство на резистентни към антибиотично лечение микроорганизми (ванкомицин-резистентни ентерококи). Участието е изцяло доброволно и ако не желаете, не трябва да се включвате в този проект.

Важно е да прочетете внимателно тази информация, преди да решите дали ще се включите в проекта. След като се запознаете с информацията имате право да зададете въпроси и ако получите удовлетворяващи Ви отговори, моля, попълнете формуляра, като с това ще потвърдите доброволното си желание за участие в проекта.

Ако решите да откажете своето участие или да се оттеглите от проучването, което имате право да направите по всяко време, без да давате обяснения, лечението Ви няма да бъде повлияно от това Ваше решение. То няма да се отрази и на отношението на медицинския персонал към Вас, както и на цялостните грижи за Вашето здраве. Ако се откажете от участие в проекта, Ви молим да уведомите изследователския екип.

Проектът ще се осъществява от екип лекари от Лаборатория по микробиология и Клиника по хематология. По всички интересувачи Ви въпроси можете да се отнасяте към Доц. д-р Христина Хиткова, д-р Преслава Христова и д-р Ивайло Христов.

С помощта на Вашето участие ще получим отговор на въпроса каква е честотата на колонизация с ванкомицин-резистентни ентерококи при пациентите със злокачествени хематологични заболявания и кои рискови фактори благоприятстват колонизацията. С изпълнението на този проект ще получим нови знания за епидемичната обстановка в клиничното звено и ще ни даде възможност за предприемане на мерки, с цел ограничаване разпространението на ванкомицин-резистентните ентерококи сред хематологично болните пациенти.

Проектът ще продължи 9 месеца.

При започването му, лекар-член на изследователския екип ще Ви зададе въпроси относно Вашето основно хематологично заболяване. Данните ще се нанасят в Карта на пациента - документ, до който ще имат достъп само членовете на изследователския екип.

Освен обичайните изследвания, които ще Ви бъдат направени по време на болничния престой, ще бъде необходимо да дадете 3 фекални проби. Пробите ще вземете самостоятелно в удобно за Вас време. За целта ще Ви бъде осигурено самостоятелно помещение и стерилен контейнер за осъществяване на процедурата.

Ако решите да участвате, цялата информация за Вас ще остане поверителна. Определени упълномощени лица – членовете на екипа ще имат достъп до Вашата медицинска карта, но при строга поверителност. Участието Ви не е свързано с допълнителни лични разходи, тъй като вземането на фекалните проби ще се извърши по време на болничния Ви престой.

## Информационен лист за пациента

Интестинална колонизация с ванкомицин-резистентни ентерококи при пациенти на интензивни грижи

Уважаеми Господине/ Госпожо,

Бихме искали да Ви помолим да участвате в изследователски проект с горепосоченото заглавие, тъй като при Вас е повишен риска от чревно носителство на резистентни към антибиотично лечение микроорганизми (ванкомицин-резистентни ентерококи). Участието е изцяло доброволно и ако не желаете, не трябва да се включвате в този проект.

Важно е да прочетете внимателно тази информация, преди да решите дали ще се включите в проекта. След като се запознаете с информацията имате право да зададете въпроси и ако получите удовлетворяващи Ви отговори, моля, попълнете формуляра, като с това ще потвърдите доброволното си желание за участие в проекта.

Ако решите да откажете своето участие или да се оттеглите от проучването, което имате право да направите по всяко време, без да давате обяснения, лечението Ви няма да бъде повлияно от това Ваше решение. То няма да се отрази и на отношението на медицинския персонал към Вас, както и на цялостните грижи за Вашето здраве. Ако се откажете от участие в проекта, Ви молим да уведомите изследователския екип.

Проектът ще се осъществява от екип лекари от Лаборатория по микробиология и Клиника по хематология. По всички интересуващи Ви въпроси можете да се отнасяте към Доц. д-р Христина Хиткова и д-р Преслава Христова.

С помощта на Вашето участие ще получим отговор на въпроса каква е честотата на колонизация с ванкомицин-резистентни ентерококи при пациентите на интензивни грижи и кои рискови фактори благоприятстват колонизацията. С изпълнението на този проект ще получим нови знания за епидемичната обстановка в клиничното звено и ще ни даде възможност за предприемане на мерки, с цел ограничаване разпространението на ванкомицин-резистентните ентерококи сред пациенти на интензивни грижи.

Проектът ще продължи 7 месеца.

При започването му, лекар-член на изследователския екип ще Ви зададе въпроси относно Вашето основно хематологично заболяване. Данните ще се нанасят в Карта на пациента – документ, до който ще имат достъп само членовете на изследователския екип.

Освен обичайните изследвания, които ще Ви бъдат направени по време на болничния престой, ще бъде необходимо да Ви се вземе допълнително 1 ректална проба. Вземането на ректален секрет за това изследване не надвишава рисковете, свързани с вземане на други клинични материали за задължителните изследвания при пациенти с Вашето заболяване. Този риск ще бъде минимизиран поради това, че ректалният секрет ще се взема от обучен медицински персонал и при задължително спазване на условията за безопасност и правилна техника за изпълнение на манипулацията.

Ако решите да участвате, цялата информация за Вас ще остане поверителна. Определени упълномощени лица – членовете на екипа ще имат достъп до Вашата медицинска карта, но при строга поверителност. Участието Ви не е свързано с допълнителни лични разходи, тъй като вземането на ректални проби ще се извърши по време на болничния Ви престой.

## Формуляр за информирано съгласие

Моля, подчертайте **Да** или **Не** за всички посочени по-долу твърдения (подчертава се вярното твърдение).

Бях помолен да се съглася сам Да    Не

Прочетох Информационния лист на пациента Да    Не

Дадена ми бе възможност да задам всички важни за мен въпроси и да обсъдя този проект Да    Не

Получих удовлетворяващи ме отговори на всички мои въпроси Да    Не

Получих достатъчна информация относно проекта Да    Не

Проектът ми беше обяснен, зададох въпросите си и получих отговори на тях от

.....

(Име на изследователят)

.....

(Подпис на изследователя)

Разбирам, че съм свободен да се откажа от участие в проекта по всяко време, без да давам обяснения за отказа си и без това да повлияе на полагащите ми се в бъдеще медицински грижи.

Дата:.....

(Име, презиме, фамилия на пациента)

.....

(Подпис на пациента)

**КАРТА ЗА ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ  
НА ХЕМОДИАЛИЗА**

Име \_\_\_\_\_

Мъж  Жена

Години \_\_\_\_\_

ЕГН \_\_\_\_\_

Основно нефрологично заболяване:

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Диабет      | <input type="checkbox"/> Гломерулонефрит |
| <input type="checkbox"/> Хипертония  | <input type="checkbox"/> Неопределено    |
| <input type="checkbox"/> Друго _____ |  |

**I. Специфични рискови фактори за таргетната група**

Продължителност на хемодиализата (мес./ год.) \_\_\_\_\_

Честота/ кратност на диализа (сед.) \_\_\_\_\_

Съдов достъп:

- |   |
|---|
| <input type="checkbox"/> АВ фистула                     |
| <input type="checkbox"/> Съдова протеза (графт)         |
| <input type="checkbox"/> ПТК (Пост тунелизиран катетър) |

**II. Неспецифични рискови фактори за таргетната група**

Прием на антибиотици през последните 6 месеца:

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Penicillin                   | <input type="checkbox"/> Антипсевдомонасни пеницилини |
| <input type="checkbox"/> 1-ва генерация цефалоспорици | <input type="checkbox"/> 2-ра генерация цефалоспорици |
| <input type="checkbox"/> 3-та генерация цефалоспорици | <input type="checkbox"/> 4-та генерация цефалоспорици |
| <input type="checkbox"/> Карбапенеми                  | <input type="checkbox"/> Монобактами                  |
| <input type="checkbox"/> Глокопептиди                 | <input type="checkbox"/> Метронидазол                 |

- |                          |                        |                          |                |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|----------------|
| <input type="checkbox"/> | Аминогликозиди         | <input type="checkbox"/> | Флуорохинолони |
| <input type="checkbox"/> | Colistin               | <input type="checkbox"/> | Tigecycline    |
| <input type="checkbox"/> | Антифунгални препарати | <input type="checkbox"/> | Други _____    |

Други лекарствени средства използвани за повече от две седмици през последните 6 месеца:

- |                          |                                 |
|--------------------------|---------------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Нестероидни противовъзпалителни |
| <input type="checkbox"/> | Стероидни противовъзпалителни   |
| <input type="checkbox"/> | Други _____                     |

Придружаващи заболявания

- |                          |  |       |
|--------------------------|--|-------|
| <input type="checkbox"/> | Заболявания на сърдечно-съдовата система | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Заболявания на дихателната система       | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Заболявания на храносмилателната система | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Заболявания на хепато-билиарната система | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Заболявания на отделителната система     | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Заболявания на половата система          | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Заболявания на половата система          | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Заболявания централна нервна система     | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Заболявания на ендокринната система      | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Хематологични заболявания                | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Автоимунни заболявания                   | _____ |
| <input type="checkbox"/> | Злокачествени заболявания                | _____ |

# КАРТА ЗА ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ С МАЛИГНЕНИ ХЕМАТОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Име \_\_\_\_\_

Мъж  Жена

Години \_\_\_\_\_

Основно хематологично заболяване:

- |   |  |  |
|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> Остра левкемия     | <input type="checkbox"/> Хронична левкемия | <input type="checkbox"/> Апластична анемия         |
| <input type="checkbox"/> Анемия на Фанкони  | <input type="checkbox"/> Мултиплен миелом  | <input type="checkbox"/> Неходжкинов лимфом        |
| <input type="checkbox"/> Неходжкинов лимфом | <input type="checkbox"/> Мултиплен миелом  | <input type="checkbox"/> Миелодиспластичен синдром |
| <input type="checkbox"/> Друго _____        |  |  |

## I. Специфични рискови фактори за таргетната група

Продължителност на болничния престой (дни) \_\_\_\_\_

Продължителност на химиотерапията (мес./ год.) \_\_\_\_\_

Развитие на мукозит по време на химиотерапията \_\_\_\_\_

Наличие на централен венозен катетър \_\_\_\_\_

Развитие на неутропения (начало/ край/ тежест) \_\_\_\_\_

Трансплантация на костен мозък \_\_\_\_\_

## II. Неспецифични рискови фактори за таргетната група

Прием на антибиотици по време на болничния престой и през последните 3 месеца:

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Penicillin                   | <input type="checkbox"/> Антипсевдомонасни пеницилини |
| <input type="checkbox"/> 1-ва генерация цефалоспорини | <input type="checkbox"/> 2-ра генерация цефалоспорини |
| <input type="checkbox"/> 3-та генерация цефалоспорини | <input type="checkbox"/> 4-та генерация цефалоспорини |
| <input type="checkbox"/> Карбапенеми                  | <input type="checkbox"/> Монобактами                  |
| <input type="checkbox"/> Глокопептиди                 | <input type="checkbox"/> Метронидазол                 |
| <input type="checkbox"/> Аминогликозиди               | <input type="checkbox"/> Флуорохинолони               |
| <input type="checkbox"/> Colistin                     | <input type="checkbox"/> Tigecycline                  |
| <input type="checkbox"/> Антифунгални препарати       | <input type="checkbox"/> Други _____                  |

Други лекарствени средства използвани за повече от две седмици през последните 6 месеца:

- Нестероидни противовъзпалителни
- Стероидни противовъзпалителни
- Други \_\_\_\_\_

Придружаващи заболявания

- Заболявания на сърдечно-съдовата система \_\_\_\_\_
- Заболявания на дихателната система \_\_\_\_\_
- Заболявания на храносмилателната система \_\_\_\_\_
- Заболявания на хепато-билиарната система \_\_\_\_\_
- Заболявания на отделителната система \_\_\_\_\_
- Заболявания на половата система \_\_\_\_\_
- Заболявания на половата система \_\_\_\_\_
- Заболявания централна нервна система \_\_\_\_\_
- Заболявания на ендокринната система \_\_\_\_\_
- Нефрологични заболявания \_\_\_\_\_
- Автоимунни заболявания \_\_\_\_\_
- Злокачествени заболявания \_\_\_\_\_

# КАРТА ЗА ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ В ИНТЕНЗИВНИ ОТДЕЛЕНИЯ

Име \_\_\_\_\_ Мъж  Жена

Години \_\_\_\_\_

Основно заболяване:

- Септичен шок       Травма       Дихателна недостатъчност  
 Постоперативни грижи       Друго \_\_\_\_\_

## I. Специфични рискови фактори за таргетната група

Продължителност на болничния престой (дни) \_\_\_\_\_

Предходни операции \_\_\_\_\_

Инвазивен катетър:

- Централен венозен катетър       Назогастрална сонда  
 Уринарен катетър       Ендотрахеална тръба

## II. Неспецифични рискови фактори за таргетната група

Прием на антибиотици по време на болничния престой:

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Penicillin                   | <input type="checkbox"/> Антипсевдомонасни пеницилини |
| <input type="checkbox"/> 1-ва генерация цефалоспорини | <input type="checkbox"/> 2-ра генерация цефалоспорини |
| <input type="checkbox"/> 3-та генерация цефалоспорини | <input type="checkbox"/> 4-та генерация цефалоспорини |
| <input type="checkbox"/> Карбапенеми                  | <input type="checkbox"/> Монобактами                  |
| <input type="checkbox"/> Глокопептиди                 | <input type="checkbox"/> Метронидазол                 |
| <input type="checkbox"/> Аминогликозиди               | <input type="checkbox"/> Флуорохинолони               |
| <input type="checkbox"/> Colistin                     | <input type="checkbox"/> Tigecycline                  |
| <input type="checkbox"/> Антифунгални препарати       | <input type="checkbox"/> Други _____                  |

Други лекарствени средства използвани по време на болничния престой:

- Нестероидни противовъзпалителни
- Стероидни противовъзпалителни
- Други \_\_\_\_\_

Придружаващи заболявания:

- Заболявания на сърдечно-съдовата система \_\_\_\_\_
- Заболявания на дихателната система \_\_\_\_\_
- Заболявания на храносмилателната система \_\_\_\_\_
- Заболявания на хепато-билиарната система \_\_\_\_\_
- Заболявания на отделителната система \_\_\_\_\_
- Заболявания на половата система \_\_\_\_\_
- Заболявания на половата система \_\_\_\_\_
- Заболявания централна нервна система \_\_\_\_\_
- Заболявания на ендокринната система \_\_\_\_\_
- Нефрологични заболявания \_\_\_\_\_
- Автоимунни заболявания \_\_\_\_\_
- Злокачествени заболявания \_\_\_\_\_

