

Использование селективной хромогенной среды для детекции ванкомицинорезистентных энтерококков

Фёдорова А.В., Клясова Г.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:
Анастасия Владимировна
Фёдорова
Эл. почта: mirnas19@yandex.ru

Ключевые слова: хромогенная селективная среда, ванкомицинорезистентные энтерококки, *Enterococcus faecium*, антибиотикорезистентность.

Цель. Изучить детекцию ванкомицинорезистентных энтерококков на селективной среде CHROMagar™VRE (CHROMagar, Франция).

Материалы и методы. В первой части исследовали 39 ванкомицинорезистентных и 20 ванкомициночувствительных штаммов *Enterococcus* spp., выделенных из гемокультуры, с известными параметрами чувствительности на среде CHROMagar™VRE в течение 24 ч и 48 ч инкубации. Во второй части проводили скрининг 110 мазков, взятых со слизистой оболочки прямой кишки, от больных гемобластозами. Чувствительность к ванкомицину изолятов, выделенных на селективной среде, дополнительно изучали методом серийных микроразведений в бульоне (CLSI, 2017). Генотипы резистентности к гликопептидам определяли методом ПЦР.

Результаты. При исследовании *Enterococcus* spp. с известными параметрами чувствительности на среде CHROMagar™VRE было выделено 36 (92,3%) изолятов через 24 ч, и еще 2 изолята – через 48 ч инкубации. Чувствительность CHROMagar™VRE для выделения ванкомицинорезистентных энтерококков из гемокультуры составила 92,3% при инкубации в течение 24 ч и 97,4% – в течение 48 ч. При исследовании 20 ванкомициночувствительных *Enterococcus* spp. на CHROMagar™VRE не было получено роста микроорганизмов (специфичность 100%). При исследовании 110 мазков со слизистой прямой кишки на CHROMagar™VRE *Enterococcus* spp. были выделены из 35 (31,8%) образцов (33 – *E. faecium* и 2 – *E. faecalis*). Устойчивыми к ванкомицину были 32 из 33 (97%) штаммов *E. faecium*, из них 28 штаммов *E. faecium* – через 24 ч инкубации и 4 штамма *E. faecium* – через 48 ч; все изоляты имели *vanA* ген. При скрининге ванкомицинорезистентных энтерококков со слизистой оболочки прямой кишки доля ложноположительных изолятов, выделенных на CHROMagar™VRE, составила 3,4% и 8,6% при инкубации в течение 24 ч и 48 ч соответственно.

Выводы. Селективная хромогенная среда CHROMagar™VRE имеет высокую чувствительность и специфичность для выявления ванкомицинорезистентных энтерококков и может быть использована в лабораторной практике.

Detection of vancomycin-resistant enterococci using chromogenic selective medium

Fyodorova A.V., Klyasova G.A.

National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia

Contacts:
Anastasiya V. Fyodorova
E-mail: mirnas19@yandex.ru

Key words: chromogenic selective medium, vancomycin-resistance enterococci, *Enterococcus faecium*, antimicrobial resistance.

Objective. To detect vancomycin-resistant enterococci (VRE) using chromogenic selective medium CHROMagar™VRE (CHROMagar, France).

Materials and methods. In the first part of the study, a total of 39 vancomycin-resistant and 20 vancomycin-susceptible *Enterococcus* spp. isolated from blood culture with known susceptibility profiles were incubated on the CHROMagar™VRE (CHROMagar, France) and examined after 24 h and 48 h of incubation. In the second part of the study, a total of 110 rectal swabs were taken from patients with hematological malignancies and incubated on the CHROMagar™VRE. The vancomycin susceptibility of isolates grown on the selective medium was further evaluated by the broth microdilution method (CLSI, 2017). Glycopeptide resistance genes were detected by PCR.

Results. Using the CHROMagar™VRE, a total of 36 (92.3%) vancomycin-resistant isolates were detected after 24 h and additional two isolates – after 48 h of incubation. The sensitivity of the selective medium for detection of VRE obtained from blood culture was 92% and 97% after 24 h and 48 h of incubation, respectively. All 20 vancomycin-susceptible enterococci did not grow on the CHROMagar™VRE (specificity – 100%). Of 110 rectal swabs, 35 (31.8%) samples were positive for *Enterococcus* spp. on the CHROMagar™VRE (33 – *E. faecium* и 2 – *E. faecalis*). Resistance to vancomycin was detected in 32/33 (97%) *E. faecium* isolates, of them 28 and 4 strains were isolated after 24 h and 48 h of incubation; all VRE strains carried *vanA* gene. The proportion of false positive isolates was 3.4% after 24 h of incubation and 8.6% after 48 h of incubation on the CHROMagar™VRE medium for screening of VRE from rectal swabs.

Conclusions. The chromogenic selective media CHROMagar™VRE has a high sensitivity and specificity for the detection of VRE and can be used for screening in laboratory practice.

Введение

Первые сообщения о выделении ванкомицинорезистентных энтерококков (VRE) появились в Европе в 1986 г., а в США – в 1987 г. [1-3]. Впоследствии было отмечено распространение VRE по всему миру, и особенно драматическая ситуация сложилась в США, где в 2013 г. доля ванкомицинорезистентных *E. faecium*, выделенных из гемокультур, достигла 83% [4]. Впервые в России ванкомицинорезистентный *Enterococcus gallinarum*, имеющий ген устойчивости к гликопептидам *vanB* дополнительно к природному гену *vanC* и значение минимальной подавляющей концентрации (МПК) ванкомицина 128 мкг/мл, был выделен в 2004 г. из кала больного острым лейкозом, находившегося на лечении в НМИЦ гематологии МЗ РФ [5], а в 2005 г. было зарегистрировано выделение из гемокультуры *E. faecium* с *vanA* генотипом резистентности и значением МПК ванкомицина 512 мкг/мл [6]. Позднее появились сообщения из других медицинских учреждений России о выявлении VRE [7-9]. По результатам проспективного многоцентрового исследования, проведенного в России с 2003 по 2008 гг. у больных гемобластомами, энтерококки, выделенные из гемокультур при сепсисе, занимали третье место, составляя 10,3% среди всех микроорганизмов; устойчивыми к ванкомицину были 9% изолятов [10].

Одним из основных факторов риска развития инфекций, вызванных VRE, является предшествующая колонизация слизистой оболочки кишечника этими микроорганизмами. Колонизация слизистой оболочки кишечника VRE может сохраняться в течение длительного времени, от нескольких месяцев до нескольких лет [11]. В развитии инфекционных осложнений у больных гемобластомами преобладает эндогенный путь инфицирования, при котором транслокация бактерий со слизистой оболочки кишечника происходит в кровотока. В 2016 г. был опубликован обзор, объединивший результаты 34 исследований по колонизации кишечника VRE у 8391 пациента с различными опухолями, в число которых вошло 4485 больных с опухолями системы крови [12]. Колонизация слизистой оболочки кишечника VRE составила 20% от всей анализируемой популяции и 24% среди гематологических больных. Инфекция кровотока, обусловленная VRE, возникала чаще у больных с колонизацией VRE и составила 13% против 0,4% у больных без колонизации. Риск развития инфекции кровотока, вызванной VRE, был в 24,15 (95% ДИ 10,2-56,7) раза выше у больных с колонизацией данным микроорганизмом в сравнении с больными без колонизации.

В этой связи крайне важным является определение у больных колонизации слизистой оболочки прямой кишки VRE. В 1995 г. были опубликованы рекомендации Центров США по контролю и профилактике заболеваний (CDC) по предотвращению распространения VRE в стационаре [13]. В рекомендациях указывалось на необходимость проведения скрининга на наличие VRE со слизистой оболочки прямой кишки у госпитализированных больных. В соответствии с Российскими методическими рекомендациям и рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов США (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI), скрининг VRE

следует проводить с использованием агара на сердечно-мозговом экстракте с добавлением ванкомицина в концентрации 6 мкг/мл [14, 15]. Данная агаризованная среда имеет высокую чувствительность и специфичность в детекции VRE, но на ней также могут выделяться энтерококки с природным низким уровнем устойчивости к ванкомицину, а также другие микроорганизмы. Для скрининга VRE в лабораторной практике чаще других питательных сред используют желчно-эскулиновый агар, содержащий азид натрия и ванкомицин в концентрации 6-8 мкг/мл – агар BEAV (Bile Esculin Azide agar with 6 or 8 µg/mL of Vancomycin). Агар BEAV имеет высокую чувствительность и специфичность [16]. Однако применение агара BEAV для скрининга также не лишено недостатков, к которым относятся длительный период исследования (от 48 до 72 ч), риск ложноположительных результатов, невозможность дифференцировать ванкомицинорезистентные *E. faecium* от *E. faecalis* по цвету. Кроме VRE, на агаре BEAV могут выделяться энтерококки с природным низким уровнем устойчивости к ванкомицину, имеющие *vanC* генотип резистентности (*E. gallinarum*, *E. flavescens* и *E. casseliflavus*), а также другие бактерии, такие как *Leuconostoc* spp. и *Pediococcus* spp.

В последние годы были созданы хромогенные селективные среды для детекции VRE в образцах от больных, позволяющие сократить время исследования. Такие среды содержат хромогенный субстрат, который позволяет выявить видоспецифические ферменты микроорганизмов, такие как α-глюкозидазу и β-галактозидазу. Под действием бактериального фермента хромогенный субстрат расщепляется, выделяя в среду хромофор, который окрашивает колонию микроорганизма в определенный цвет. Большинство хромогенных сред также содержат антибиотики и селективные добавки, подавляющие прочую микрофлору. На селективных средах выделяются энтерококки с приобретенной устойчивостью к ванкомицину, имеющие *vanA* и *vanB* генотипы резистентности, и происходит подавление изолятов с природной устойчивостью к ванкомицину, имеющих *vanC* генотип резистентности. Перечень селективных сред достаточно широк: CHROMagar™VRE (CHROMagar, Франция), ChromID™VRE (BioMérieux, Франция), VRESelect (Bio-Rad Laboratories, США), Spectra VRE (Remel, США) и другие. Хромогенные агары предназначены для исследования образцов от больных, и при их использовании заключение о наличии резистентности к ванкомицину у энтерококков может быть выдано уже через 24 часа от момента поступления образцов в лабораторию.

Целью нашего исследования было изучить детекцию VRE на селективной среде CHROMagar™VRE (CHROMagar, Франция).

Материалы и методы

Исследование состояло из двух частей. В первой части было проведено изучение на селективной среде CHROMagar™VRE культуральных характеристик ванкомицинорезистентных и ванкомициночувствительных энтерококков с известными параметрами чувствительности, которые были выделены из гемокультур больных с опу-

холями системы крови (2002-2015 гг.) и взяты из собственной коллекции микроорганизмов. Чувствительность данных энтерококков к ванкомицину ранее была определена методом серийных микроразведений в бульоне в соответствии с рекомендациями CLSI [15]. Чувствительными (Ч) считали изоляты со значениями МПК ванкомицина ≤ 4 мкг/мл, умеренно резистентными (УР) – 8-16 мкг/мл, резистентными (Р) ≥ 32 мкг/мл. Для внутреннего контроля качества использовали референтные штаммы *E. faecalis* ATCC 29212 и *E. faecalis* ATCC 51299.

Во второй части исследования (июль-сентябрь 2016 г.) был проведен скрининг VRE на селективной среде CHROMagar™VRE. С этой целью первичное культуральное исследование мазков, взятых со слизистой оболочки прямой кишки от больных с опухолями системы крови, проводили на селективной среде CHROMagar™VRE, предназначенной для прямого выделения VRE. Образцы от больных помещали на CHROMagar™VRE и инкубировали в термостате при температуре 36°C в течение 48 ч, просматривая их через 24 ч и 48 ч. Все микроорганизмы, выявленные на агаризованной среде CHROMagar™VRE, идентифицировали методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Для идентификации брали изолированные колонии микроорганизмов. Ионизацию бактериальных белков осуществляли с помощью специального реагента-матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота и раствор, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). Идентификацию проводили в автоматическом режиме с использованием программы MALDI Biotyper RTC, версия 3,1 (Bruker Daltonics, Германия). Результат учитывали по значению коэффициента видовой идентификации. Достоверными считали результаты, если коэффициент совпадения (score) имел значение $\geq 2,0$.

Чувствительность к ванкомицину у энтерококков, выделенных на селективной среде CHROMagar™VRE в процессе скрининга, дополнительно изучали методом серийных микроразведений в бульоне [15].

Генотипы резистентности к гликопептидам у VRE определяли с помощью амплификации фрагментов генов *vanA*, *vanB*, *vanC* и *vanD* методом ПЦР [17].

Результаты и обсуждение

Исследование VRE и ванкомициночувствительных энтерококков с известными параметрами чувствительности на селективной среде CHROMagar™VRE

Из собственной коллекции микроорганизмов на селективной среде было исследовано 39 ванкомицинорезистентных и 20 ванкомициночувствительных изолятов *Enterococcus* spp. (Таблица 1). Среди VRE были 37 штаммов *E. faecium*, имевших значения МПК ванкомицина от 128 до 1024 мкг/мл, один штамм *E. faecalis* (МПК ванкомицина 16 мкг/мл), один штамм *E. gallinarum* (МПК ванкомицина 128 мкг/мл). Ген устойчивости к гликопептидам *vanA* был определен у 29/37 (78%) штаммов *E. faecium*, ген *vanB* – у 8/37 (22%).

При культивировании VRE на селективной среде CHROMagar™VRE были выявлены отличия по цвету между *E. faecium*, *E. faecalis* и *E. gallinarum*. Так, все изоляты *E. faecium* были окрашены в розовый цвет, *E. faecalis* имел фиолетовое окрашивание, а *E. gallinarum* – ярко-голубой цвет. На среде CHROMagar™VRE были выделены 38/39 (97,4%) исследуемых VRE, из них 36 (92,3%) изолятов через 24 часа инкубации, а еще 2 изолята – через 48 часов (Таблица 1). Один изолят *E. faecium*, имеющий МПК ванкомицина 512 мкг/мл и несущий ген резистентности к гликопептидам *vanA*, не был выделен на хромогенной среде при инкубации ни через 24 часа, ни через 48 часов. Оба изолята *E. faecalis* и *E. gallinarum*, устойчивые к ванкомицину, были выделены на среде CHROMagar™VRE через 24 часа инкубации. Таким образом, чувствительность селективной среды CHROMagar™VRE, предназначенной для выявления VRE, составила 92,3% при инкубации в течение 24 часов и 97,4% – в течение 48 часов.

Ванкомициночувствительные изоляты были представлены *E. faecium* (n=10) и *E. faecalis* (n=10). При исследовании 20 изолятов *Enterococcus* spp., чувствительных к ванкомицину (МПК ванкомицина ≤ 4 мкг/мл), на среде CHROMagar™VRE не было получено культуры бактерий при инкубации в течение 24 и 48 часов. Таким образом, специфичность селективной среды CHROMagar™VRE составила 100%.

Таблица 1. Характеристика *Enterococcus* spp. из коллекции микроорганизмов, выделенных на среде CHROMagar™VRE при инкубации в течение 24 ч и 48 ч

Чувствительность к ванкомицину <i>Enterococcus</i> spp.	Виды энтерококков	Число изолятов	Генотип резистентности к гликопептидам	Диапазон МПК ванкомицина, мкг/мл	Выделение <i>Enterococcus</i> spp. на агаре CHROMagar™VRE в зависимости от периода инкубации, n (%)	
					24 ч	48 ч
Ванкомицинорезистентные	<i>E. faecium</i>	29	<i>vanA</i>	256-1024	26 (89,7)	28 (96,6)
		8	<i>vanB</i>	128-512	8 (100)	8 (100)
	<i>E. faecalis</i>	1	<i>vanD</i>	16	1 (100)	1 (100)
	<i>E. gallinarum</i>	1	<i>vanB</i> + <i>vanC</i>	128	1 (100)	1 (100)
	Всего	39		16-1024	36 (92,3)	38 (97,4)
Ванкомициночувствительные	<i>E. faecium</i>	10	нет	0,125-1	0	0
	<i>E. faecalis</i>	10	нет	0,125-0,5	0	0
	Всего	20		0,125-1	0	0

Скрининг VRE на селективной среде CHROMagar™VRE из мазков со слизистой оболочки прямой кишки

Для скрининга VRE на селективной среде CHROMagar™VRE проводили первичное микробиологическое исследование 110 мазков, взятых со слизистой оболочки прямой кишки у больных гемобластомами. В 60 (55%) из 110 исследуемых мазков на хромогенной среде CHROMagar™VRE было выделено 79 микроорганизмов, разных по цвету и морфологии, характеристика которых представлена в Таблице 2. В остальных 50 мазках культуры бактерий получено не было.

При идентификации бактерий было установлено, что 35 (45%) из 79 изолятов принадлежали к *Enterococcus* spp., из которых 33 были идентифицированы как *E. faecium* и на хромогенной среде имели розовый цвет, а 2 изолята фиолетового цвета – *E. faecalis*. Остальные 44 изолята, окрашенные в другие цвета и имевшие иную морфологию, оказались при идентификации другими микроорганизмами: 27 (34%) изолятов были грамотрицательными бактериями, 15 (19%) – грамположительными бактериями (*S. haemolyticus*), 2 (2%) – дрожжеподобными грибами.

Таблица 2. Микроорганизмы (n=79), выделенные на селективной среде CHROMagar™VRE из мазков со слизистой оболочки прямой кишки при скрининге

Микроорганизмы	Количество, n (%)	Характеристика микроорганизмов
<i>Enterococcus faecium</i>	33 (42)	мелкие, розовые
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 (3)	мелкие, фиолетовые
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	15 (19)	мелкие, бледно-голубые
<i>Escherichia coli</i>	15 (19)	крупные, блестящие, желтовато-зеленоватые, с более интенсивным окрашиванием к центру
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 (6)	крупные, блестящие, темные или фиолетовые колонии
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3 (4)	крупные, матово-белые
<i>Proteus mirabilis</i>	2 (3)	мелкие, плоские, бесцветные
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (1)	мелкие, плоские, сиреневые
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1 (1)	мелкие, бледно-коричневые
<i>Candida krusei</i>	1 (1)	мелкие, белые
<i>Geotrichum silvicola</i>	1 (1)	мелкие, белые

Чувствительность к ванкомицину 35 штаммов *Enterococcus* spp., выделенных в процессе скрининга на селективной среде CHROMagar™VRE, была дополнительно изучена методом серийных микроразведений в бульоне (Таблица 3). Значения МПК ванкомицина, характерные для нечувствительных штаммов (МПК ванкомицина >4 мкг/мл), были определены у 32 из 35 (91,4%) штаммов *Enterococcus* spp., выделенных на селективной среде CHROMagar™VRE.

Среди 33 штаммов *E. faecium*, выделенных на среде CHROMagar™VRE, устойчивыми к ванкомицину были 32 (97%) изолята. Диапазон значений МПК ванкомицина у 32 ванкомицинорезистентных *E. faecium* составлял от 128 мкг/мл до 1024 мкг/мл, значение МПК₉₀ составило 512 мкг/мл. Большинство ванкомицинорезистентных *E. faecium* (87,5%, 28/32 изолятов) было выделено на селективной среде CHROMagar™VRE в течение 24 часов инкубации. При культивировании мазков в течение 48 часов было выделено ещё 4 ванкомицинорезистентных *E. faecium* (12,5%). Один (3%) из 33 изолятов *E. faecium*, выделенный на среде CHROMagar™VRE через 48 часов инкубации, был чувствительным к ванкомицину и имел значение МПК ванкомицина 2 мкг/мл. Оба изолята *E. faecalis*, выделенные на среде CHROMagar™VRE (один через 24 часа инкубации, другой через 48 часов), были чувствительными к ванкомицину со значениями МПК 0,5 мкг/мл.

Энтерококки, выделенные на хромогенной среде в результате скрининга (n=35), также были исследованы на наличие генов *vanA* и *vanB*, кодирующих резистентность к ванкомицину. У 32/35 (91,4%) изолятов были определены *vanA* гены, эти изоляты были представлены *E. faecium* и имели значения МПК ванкомицина, характерные для устойчивых штаммов. У 3 (8,6%) энтерококков, выделенных на хромогенной среде и продемонстрировавших чувствительность к ванкомицину (1 изолят *E. faecium* и 2 изолята *E. faecalis*), генов *vanA* или *vanB* выявлено не было.

Таким образом, в ходе скрининга на селективной среде CHROMagar™VRE, предназначенной для детекции VRE, было получено 3 (8,6%) ложноположительных результата, из них 1 изолят (*E. faecalis*) был выделен через 24 часа инкубации, а 2 изолята (*E. faecalis* и *E. faecium*) – через 48 часов (Таблица 4). Таким образом, при скрининге VRE из мазков со слизистой оболочки прямой кишки на среде CHROMagar™VRE, доля ложноположительных изолятов увеличилась с 3,4% до 8,6% при удлинении инкубации с 24 до 48 часов.

Хромогенные среды были внедрены в лабораторную практику для быстрого выявления полирезистентных бактерий, включая VRE. Результаты первого исследо-

Таблица 3. *In vitro* активность ванкомицина в отношении *Enterococcus* spp. (n=35), выделенных на селективной среде CHROMagar™VRE при скрининге

<i>Enterococcus</i> spp.		Чувствительность к ванкомицину				
		Чувствительные		Резистентные		
Вид	Число изолятов	n (%)	Диапазон МПК, мкг/мл	n (%)	МПК ₉₀ , мкг/мл	Диапазон МПК, мкг/мл
<i>E. faecium</i>	33	1 (3,0)	2	32 (97,0)	512	128-1024
<i>E. faecalis</i>	2	2 (100)	0,5-0,5	0	0	0
Всего	35	3 (8,6)	0,5-2	32 (91,4)		128-1024

Таблица 4. Результаты скрининга VRE на селективной среде CHROMagar™VRE при исследовании мазков со слизистой оболочки прямой кишки через 24 ч и 48 ч инкубации

<i>Enterococcus</i> spp.		Результаты скрининга VRE в зависимости от периода инкубации					
		24 ч			48 ч		
		Число изолятов, n (%)	Чувствительность к ванкомицину, n (%)		Число изолятов n (%)	Чувствительность к ванкомицину, n (%)	
Чувствительные	Резистентные		Чувствительные	Резистентные			
<i>E. faecium</i>	33	28 (97)	0	28 (100)	33 (94,3)	1 (3)	32 (97)
<i>E. faecalis</i>	2	1 (3)	1 (100)	0	2 (5,7)	2 (100)	0
Всего	35	29	1 (3,4)	28 (96,6)	35	3 (8,6)	32 (91,4)

вания по детекции энтерококков с приобретенной резистентностью к гликопептидам на хромогенной среде chromID VRE были опубликованы в 2007 г. [18]. В данной работе было проведено сравнение двух агаризованных сред – хромагара chromID VRE и BEAV для прямого выделения VRE из образцов кала при инкубации в течение 24 часов. Исследование показало более высокую чувствительность (96,4%) и специфичность (96,6%) хромагара chromID VRE в сравнении с агаром BEAV (90,9% и 89,9% соответственно). Кроме того, на хромогенной среде chromID VRE можно было дифференцировать *E. faecalis* и *E. faecium* на основании разного цвета колоний. Позднее были разработаны другие селективные среды, такие как CHROMagar VRE, VRESelect, AES VRE агар, Brilliance VRE, InTray Colorex VRE, HardyCHROM VRE и Spectra VRE. Проведенные исследования подтвердили более высокие показатели чувствительности и специфичности хромогенных сред в сравнении со стандартной средой BEAV. Так, в работе Suwantarat N. и соавт. [19] сравнили 5 селективных сред, предназначенных для детекции VRE, таких как InTray Colorex VRE, chromID VRE, VRESelect, HardyCHROM VRE, Spectra VRE, между собой и со стандартной средой BEAV при исследовании 400 образцов кала. Авторы сообщили о высокой чувствительности (89,9-93,9%) всех хромогенных сред в сравнении со средой BEAV (84,8%). В другом исследовании также была продемонстрирована высокая чувствительность двух хромогенных сред (CHROMagar™VRE и chromID VRE), которая составила 98,2% [20]. Сводные данные по чувствительности и специфичности ряда селективных сред представлены в Таблице 5.

По результатам нашего исследования чувствительность селективной среды CHROMagar™VRE в детекции энтерококков, априорно устойчивых к ванкомицину

Таблица 5. Чувствительность и специфичность хромогенных сред, предназначенных для детекции VRE

Селективная среда	Чувствительность, %	Специфичность, %	Источник данных
BEAV	84,8-87,6	73-100	[18], [19], [21], [22]
chromID VRE	86,3-98,2	97,5-100	[18], [20], [22]
VRESelect	91,9-98,7	99,0-99,7	[19], [21]
Spectra VRE	93,9-98,2	99,0-99,7	[19], [22]
CHROMagar	98,2-98,6	96,5-99,1	[19], [20]

(МПК ванкомицина от 128 до 1024 мкг/мл), составила 92,3% при инкубации в течение 24 часов. Аналогичные результаты были получены корейскими учеными при исследовании мазков из прямой кишки на разных хромогенных средах. Согласно этой работе после 24 часов инкубации чувствительность агара Brilliance VRE составила 83,3%, chromID VRE – 79,2%, VRESelect – 79,2% [23].

Следует отметить высокую специфичность изученной нами селективной среды CHROMagar™VRE, которая составила 100% при исследовании культуры энтерококков, исходно чувствительных к ванкомицину, при инкубации в течение 24 часов. Высокая специфичность при 24 часах инкубации отмечена и другими исследователями [18, 24]. В исследовании Suwantarat N. и соавт. [19] высокая специфичность (99,7%) была определена для таких селективных сред, как chromID VRE, VRESelect, HardyCHROM VRE, Spectra VRE, и несколько более низкая (98,3%) – для хромогенной среды InTray Colorex VRE.

Согласно инструкции производителя, учёт результатов исследования на селективной среде CHROMagar™VRE рекомендуется проводить через 24 часа инкубации. Однако в большинстве работ, посвященных изучению выявления VRE на хромогенных средах, в том числе CHROMagar VRE, исследование может быть продлено до 48 часов [20]. Продление нами времени инкубации с 24 до 48 часов при детекции энтерококков, исходно устойчивых к ванкомицину, привело к увеличению чувствительности селективной среды CHROMagar™VRE с 92,3% до 97,4%. Повышение чувствительности хромогенных селективных сред при более длительной инкубации отмечено и другими исследователями. Так, в работе Peterson J. и соавт. [22] чувствительность агара Spectra VRE при инкубации в течение 18 часов составила 94,1%, 24 часов – 98% и 48 часов – 100%. В то же время удлинение времени инкубации при исследовании образцов кала или мазков из прямой кишки ведет к снижению специфичности селективных сред из-за появления энтерококков, чувствительных к ванкомицину. Так, в исследовании Ledebouer N. и соавт. [18] специфичность хромогенной среды chromID VRE составила 100% при инкубации образцов в течение 24 часов и 98,6% – в течение 48 часов. В нашей работе при анализе результатов скрининга мазков из прямой кишки на среде CHROMagar™VRE также было отмечено увеличение выделения чувствительных к ванкомицину энтерококков при удлинении времени инкубации. Среди 3-х ванкомициночувствительных энтерококков, обнаруженных на селективной хромогенной среде

при исследовании мазков из прямой кишки (скрининг), 1 был выделен через 24 часа инкубации (*E. faecium*), а 2 – через 48 часов (*E. faecium* и *E. faecalis*). Таким образом, доля ложноположительных изолятов на среде CHROMagar™VRE увеличилась с 3,4% до 8,6% при удлинении времени инкубации с 24 до 48 часов.

На селективной среде нами были выделены изоляты как с *vanA*, так и с *vanB* генами устойчивости к ванкомицину и не было получено изолятов с природной устойчивостью к ванкомицину, имеющих *vanC* генотип резистентности.

В нашей работе на селективной среде CHROMagar™VRE при исследовании мазков со слизистой прямой кишки (скрининг) были выявлены иные микроорганизмы, не принадлежащие к *Enterococcus* spp. Выделение других микроорганизмов на хромогаре не затруднило детекцию VRE, т.к. эти микроорганизмы отличались по цвету и морфологии между собой и тем более от энтерококков. В других исследованиях также было отмечено выделение грамотрицательных микроорганизмов и дрожжеподобных грибов на селективных средах, используемых для детекции VRE [18, 20]. В этих исследованиях так же, как и в нашей работе, было отмечено, что эти изоляты были легко отличимы от *Enterococcus* spp., и не понадобилось дополнительных исследований для идентификации. В работе Suwantarat N. и соавт. [19] при сравнении среды BEAV и chromID VRE, VRESelect, HardyCHROM VRE, Spectra VRE и InTray Colorex VRE было выявлено, что изоляты, не относящиеся к *Enterococcus* spp., на среде BEAV выделяли в 16,5% образцах, тогда как на хромогенных средах этот показатель варьировал от 0,9% до 5,6%. Авторы полагают, что эти различия могут быть обусловлены более низкой концентрацией ванкомицина в среде BEAV, составляющей 6 мкг/мл против 8-10 мкг/мл, используемой в хромогенных средах. В нашем исследовании доля микроорганизмов, выделенных на среде CHROMagar™VRE и не принадлежащих к *Enterococcus* spp., была существенно

выше и составила 55%. Такую высокую частоту детекции грамотрицательных бактерий и дрожжеподобных грибов можно объяснить категорией больных, у которых проводилось исследование. Для этих больных характерна высокая частота колонизации слизистой оболочки ЖКТ разными микроорганизмами, включая полирезистентные бактерии [25]. Кроме того, можно полагать, что выделение бактерий, не принадлежащих к *Enterococcus* spp., обусловлено иным составом селективных добавок в среде CHROMagar™VRE или их более низкими концентрациями, в отличие от других хромогенных сред, предназначенных для детекции VRE. В нашей работе на среде CHROMagar™VRE было выделено 15 изолятов *S. haemolyticus*, и дополнительное определение МПК ванкомицина подтвердило их чувствительность к этому препарату.

Заключение

Проведенное исследование показало высокую чувствительность и специфичность селективной среды CHROMagar™VRE для детекции VRE как из культуры, так и непосредственно из образцов от больных, доказав тем самым возможность её использования для скрининга VRE в рутинной лабораторной практике. Оптимальным может быть период исследования по детекции VRE в течение 24 часов. При инкубации в течение 48 часов незначительно повышается чувствительность, но в то же время растёт число ложноположительных результатов и удлиняется период исследования.

Благодарность

Авторы выражают благодарность заведующему информационно-аналитическим отделом ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, кандидату технических наук Куликову Сергею Михайловичу за участие в обсуждении результатов исследования.

Литература

1. LeClerc R., Derlot E., Duval J., Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med. 1988;319:157-161.
2. Uttley A.H., Collins C.H., Naidoo J., George R.C. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 1988;i:57-58.
3. Sahm D.F., Kissinger J., Gilmore M.S., et al. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33:1588-1591.
4. Sievert D.M., Ricks P., Edwards J.R., et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013;34(1):1-14.
5. Kliasova G., Sidorenko S., Speranskaja L., Fedorova A.V. Detection of *vanB2* in *Enterococcus gallinarum* in Moscow, Russia. Int J Antimicrob Agents. 2004;24(2):131.
6. Fedorova A.V., Cherkashin E., Kliasova G., et al. First detection of vancomycin-resistant enterococci in Russia: genetic background. Clin Microbiol Infect. 2006;12(S4):131; P1819.
7. Bagirova N.S., Dmitrieva N.V. Enterococcal bacteraemia in patients with haematological malignancies. Clin Microbiol Infect. 2006;12(S4):8;P699.
8. Lyubimova A.V., Zueva L.P., Kolodgieva V.V., Goncharov A.E. Prevalence of Colonization of Neonatal Intensive Care Unit Patients with Vancomycin-Resistant Enterococci. J Epidemiologija i vakcinoprofilaktika. 2011;4(59):27-30. Russian. (Любимова А.В., Зуева Л.П., Колоджиева В.В., Гончаров А.Е. Ванкомицин-резистентные энтерококки в отделениях реанимации. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011;4(59):27-30.)
9. Brilliantova A.N., Kliasova G.A., Mironova A.V., et al. Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in two haematological centres in Russia. Int J Antimicrob Agents. 2010;35(2):177-181.
10. Klyasova G.A. Antimicrobial therapy. In: Savchenko V.G., ed. Program treatment of blood system diseases. Moscow: Praktika; 2012; 829-853 pp. Russian. (Клясова Г.А. Антимикробная терапия. В кн.: Савченко В.Г., ред. Программное лечение заболеваний системы крови: сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. М.: Практика; 2012;827-854.)

11. Bonten M.J., Hayden M.K., Nathan C., Rice T.W., Weinstein R.A. Stability of vancomycin-resistant enterococcal genotypes isolated from long-term-colonized patients. *J Infect Dis.* 1998;177:378-382.
12. Alevizakos M., Gaitanidis A., Nasioudis D., et al. Colonization With Vancomycin-Resistant *Enterococci* and Risk for Bloodstream Infection Among Patients With Malignancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Open Forum Infect Dis.* 2016;4(1):ofw246.
13. Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *Am J Infect Control.* 1995;23:87-94.
14. Guidelines for Susceptibility testing of microorganisms to antibacterial agents. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2004;6(4):306-359. Russian. (Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2004;6(4):306-359.)
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. 2015. Available at: www.clsi.org.
16. Koneman E.W. Streptococci, enterococci and the streptococcus-like bacteria, 2006. 672-764 pp. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
17. Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33:24-27.
18. Ledebor N.A., Tibbetts R.J., Dunne W.M. A new chromogenic agar medium, chromID VRE, to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59:477-479.
19. Suwantarat N., Roberts A., Prestridge J., et al. Comparison of five chromogenic media for recovery of vancomycin-resistant enterococci from fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52:4039-4042.
20. Peltroche-Illacsahuanga H., Top J., Weber-Heynemann J., Luticken R., Haase G. Comparison of two chromogenic media for selective isolation of vancomycin-resistant enterococci from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2009;47:4113-4116.
21. Anderson N.W., Buchan B.W., Young C.L., et al. Multicenter clinical evaluation of VRESelect agar for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2758-2760.
22. Peterson J.F., Doern C.D., Kallstrom G., et al. Evaluation of Spectra VRE, a new chromogenic agar medium designed to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4627-4629.
23. Jo I., Song C.E., Park K.G., Park Y.-J. Comparison of Three Chromogenic Media for Recovery of Vancomycin-Resistant Enterococci from Rectal Swab Samples. *Ann Clin Microbiol.* 2015;18:82-87.
24. Kuch A., Stefaniuk E., Ozorowski T., Hryniewicz W. New selective and differential chromogenic agar medium, chromID VRE, for screening vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *J Microbiol Methods.* 2009;77(1):124-126.
25. Korobova A.G., Klyasova G.A., Okhmat V.A., et al. Intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in patients with acute myeloid leukaemia and lymphoma. *Gematologija i transfuziologija.* 2017;62(3):116-123. Russian. (Коробова А.Г., Клясова Г.А., Охмат В.А. и соавт. Колонизация слизистой оболочки кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС при лечении острых миелоидных лейкозов и лимфом. *Гематология и трансфузиология.* 2017;62(3):116-123.)