

Антибиотикорезистентность госпитальных штаммов *Enterococcus spp.*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови: результаты многоцентрового исследования

Клясова Г.А.¹, Федорова А.В.¹, Фролова И.Н.¹, Хрульнова С.А.¹, Ветохина А.В.², Капорская Т.С.², Скоробогатова Е.В.³, Молчанова И.В.⁴, Поспелова Т.И.⁵, Крайнова Л.Е.⁶, Шушурина С.Е.⁷, Хорева О.Е.⁸, Звездкина Н.Н.⁹, Куцевалова О.Ю.¹⁰

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

² Иркутская ордена «Знак Почета» областная клиническая больница, Иркутск, Россия

³ Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия

⁵ Городская клиническая больница №2, Новосибирск, Россия

⁶ Новосибирская областная клиническая больница, Новосибирск, Россия

⁷ Самарская областная клиническая больница им. В.Д. Середавина, Самара, Россия

⁸ Сургутская окружная клиническая больница, Сургут, Россия

⁹ Краевая клиническая больница, Барнаул, Россия

¹⁰ ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Контактный адрес:

Галина Александровна Клясова
Эл. почта: klyasova.g@blood.ru

Ключевые слова: бактериемия, гемобластозы, ванкомицин-устойчивые энтерококки, *Enterococcus faecium*, антибиотикорезистентность, линезолид-резистентность.

Цель. Изучить чувствительность *Enterococcus spp.*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, к антибактериальным препаратам.

Материалы и методы. Чувствительность к антибактериальным препаратам 427 изолятов *Enterococcus spp.*, выделенных в рамках многоцентрового исследования в 10 стационарах 8 годов России в 2002-2016 гг., была изучена методом серийных микроразведений в бульоне [CLSI 2015].

Результаты. Среди возбудителей бактериемии преобладали *E. faecium* (78,2%), далее следовали *E. faecalis* (19,7%) и другие виды *Enterococcus* (2,1%). За период исследования было выявлено 50 (15%) ванкомицин-устойчивых *E. faecium* (Vancomycin-resistant *Enterococcus* –VRE), из них 33 (66%) имели ген *vanA*, 17 (34%) – ген *vanB*. В 2012 г. был выделен один изолят *E. faecium*, устойчивый к линезолиду (МПК 16 мкг/мл). При секвенировании линезолид-устойчивого *E. faecium* были определены мутации в гене, кодирующем 23S рРНК. Все VRE *E. faecium*, включая линезолид-устойчивый изолят, были чувствительны к даптомицину. Все изоляты *E. faecium* были чувствительны к тигециклину, 78,7% к клорамфениколу, 74,9% к тетрациклину. Доля *E. faecium* с высоким уровнем резистентности к гентамицину составила 85%, к стрептомицину – 60%, одновременно к обоим аминогликозидам – 45%. Все *E. faecalis* были чувствительны к линезолиду, тейкопланину и тигециклину, 97,6% к ампициллину. В исследовании был выделен один штамм *E. faecalis* (1,2%) умеренно резистентный к ванкомицину с геном резистентности *vanD*, и один изолят *E. gallinarum*, устойчивый к ванкомицину, несущий гены устойчивости *vanC1* и *vanB*.

Выводы. Изоляты *E. faecalis* имели более благоприятный профиль чувствительности в сравнении с *E. faecium*. Среди *E. faecium* устойчивыми к ванкомицину были 15% штаммов, к линезолиду – один (0,3%). Нечувствительными к ванкомицину были по одному изоляту *E. faecalis* и *E. gallinarum*.

Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterococcus spp.* isolated from blood culture in patients with hematological malignancies

Klyasova G.A.¹, Fedorova A.V.¹, Frolova I.N.¹, Khrulnova S.A.¹, Vetokhina A.V.², Kaporskaya T.S.², Skorobogatova E.V.³, Molchanova I.V.⁴, Pospelova T.I.⁵, Krainova L.E.⁶, Shushurina S.E.⁷, Khoreva O.E.⁸, Zvyozdkina N.N.⁹, Kutsevalova O.Yu.¹⁰

¹ National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia

² Irkutsk Regional Clinical Hospital, Irkutsk, Russia

³ Russian Children's Clinical Hospital, Moscow, Russia

⁴ Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia

⁵ City Clinical Hospital #2, Novosibirsk, Russia

⁶ Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russia

⁷ Samara Regional Clinical Hospital named after V.D. Seredavin, Samara, Russia

⁸ Surgut District Clinical Hospital, Surgut, Russia

⁹ Regional Clinical Hospital, Barnaul, Russia

¹⁰ Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Contacts:

Galina A. Klyasova

E-mail: klyasova.g@blood.ru

Key words: bacteremia, hematological malignancies, VRE, *Enterococcus faecium*, antimicrobial resistance, linezolid resistance.

Objective. To evaluate antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. isolated from blood culture in patients with hematological malignancies.

Materials and methods. Antimicrobial susceptibility of 427 *Enterococcus* spp. collected from 10 hospitals in 8 cities of Russia in 2002-2016 as part of the multicenter study was tested by the broth microdilution method [CLSI 2015].

Results. Among bloodstream pathogens there was a prevalence of *E. faecium* (78.2%), followed by *E. faecalis* (19.7%) and other *Enterococcus* spp. (2.1%). A total of 50 (15%) vancomycin-resistant *E. faecium* (Vancomycin-resistant *Enterococcus* – VRE) was detected, of them 33 (66%) were harboring *vanA* gene, 17 (34%) – *vanB* gene. In 2012 one linezolid resistant *E. faecium* (MIC = 16 µg/ml) was detected. Linezolid-resistant *E. faecium* contained the G2576T 23S rRNA mutation. All VRE *faecium* including the one linezolid-resistant isolate were susceptible to daptomycin. All *E. faecium* were susceptible to tigecycline, 78.7% – to chloramphenicol, 74.9% – to tetracycline. Proportion of *E. faecium* with high level resistance to gentamicin was 85%, to streptomycin – 60%, to both aminoglycosides – 45%. All *E. faecalis* were susceptible to linezolid, teicoplanin and tigecycline; 97.6% – to ampicillin. One isolate of *E. faecalis* (1.2%) with intermediate susceptibility to vancomycin (MIC = 16 µg/ml) harboring *vanD* gene and one isolate of *E. gallinarum* resistant to vancomycin, carrying *vanC1* and *vanB* genes were detected.

Conclusions. Isolates of *E. faecalis* had more favorable profile of antimicrobial susceptibility comparing to *E. faecium*. A total of 15% *E. faecium* were vancomycin resistant and one of them had resistance to linezolid. In this study one *E. faecalis* and one *E. gallinarum* isolates were non-susceptible to vancomycin.

Введение

Инфекции являются ведущими осложнениями у больных опухолями системы крови, и у отдельных категорий больных частота их составляет 80% и более при реализации цитостатической терапии [1]. Спектр микроорганизмов, ответственных за инфекционный процесс у иммунокомпрометированных больных, периодически претерпевает изменения. В последние годы в этиологии инфекций кровотока вновь появилась тенденция к увеличению доли грамотрицательных бактерий с сохранением весомой доли грамположительных бактерий за счет коагулазонегативных стафилококков и энтерококков. Так, при анализе 640 микроорганизмов, выделенных из гемокультур при сепсисе у 478 больных опухолями системы крови, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях 7 лечебных учреждений 5 городов России (2003-2005 гг.), на долю грамотрицательных бактерий пришлось 48%, грамположительных бактерий – 46%, дрожжеподобных грибов – 6% [2]. Основными возбудителями были *Escherichia coli* (18,5%) и коагулазонегативные стафилококки (18,4%), третью позицию занимали *Enterococcus* spp. (10,5%), далее следовали *Klebsiella pneumoniae* (7,8%) и *Pseudomonas aeruginosa* (7,2%). Последующий анализ 1290 микроорганизмов из гемокультуры у 946 больных опухолями системы крови (2003-2007 гг.) в рамках этого исследования не выявил существенных различий в структуре ведущих возбудителей инфекций кровотока (*E. coli* – 18,6%, коагулазонегативные стафилококки – 18%, *Enterococcus* spp. – 9,9%, *K. pneumoniae* – 7,3%, *P. aeruginosa* – 7%) [3]. Отличий не было в распределении ведущих микроорганизмов по центрам, принимавшим участие в исследовании, а штаммы *Enterococcus* spp. в течение анализируемых пяти лет (2003-2007 гг.) устойчиво занимали третью позицию.

Детальный анализ этиологии бактериемий у гематологических больных, проведенный экспертами Четвертой Европейской конференции по инфекциям у пациентов с лейкоемией (Forth European Conference on Infectious in Leukemia Group, ECIL-4) по публикациям с 2005 по

2011 гг., показал, что частота выделения *Enterococcus* spp. из гемокультуры в среднем составляет 5%, является неоднородной и значимо варьирует в разных стационарах от полного отсутствия до 38% [4]. Наиболее высокий процент энтерококковых бактериемий (18-38%) был зарегистрирован у реципиентов аллогенных гемопоэтических клеток. В 2011 г. по данным анкетирования 33 центров в рамках ECIL-4 частота бактериемий, вызванных *Enterococcus* spp., была несколько выше и составила в среднем 8%, сохраняя вариабельность от 0 до 30% в разных клиниках.

Наряду с высокой частотой выделения *Enterococcus* spp. из гемокультуры, следует отметить увеличение антибиотикорезистентности их к противомикробным препаратам и, прежде всего, к ванкомицину – антибиотику, широко используемому в гематологической практике. Летальность при инфекциях, вызванных ванкомицин-резистентными энтерококками, является высокой и у больных с нейтропенией может достигать 70-80% [5].

Целью нашего исследования было изучение чувствительности к противомикробным препаратам *Enterococcus* spp, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови.

Материалы и методы

Изоляты бактерий. В исследование были включены госпитальные изоляты *Enterococcus* spp, выделенные из гемокультуры от больных опухолями системы крови и с симптомами сепсиса, находившихся на лечении в гематологических отделениях 10 лечебных учреждений России (Москва – 2 центра, Новосибирск – 2 центра, Иркутск, Челябинск, Барнаул, Самара, Сургут, Ростов-на-Дону) с 2002 по 2016 гг. Из них 9 стационаров были для лечения взрослых, один – для детей. В исследование включали первый штамм, выделенный из гемокультуры.

Кровь для микробиологического исследования брали у больных из периферической вены и/или из цен-

трального венозного катетера в коммерческие флаконы, предназначенные для культивирования образцов крови, при возникновении температуры от 38°C и выше. Инкубирование флаконов с гемокультурой проводили в автоматическом анализаторе для гемокультур или в термостате. Идентификацию микроорганизмов проводили согласно методам, принятым в каждой лаборатории.

Все микроорганизмы были доставлены в лабораторию клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, где была проведена реидентификация всех изолятов до вида. Видовую принадлежность изолятов с 2002 по 2011 гг. проводили с помощью идентификационной системы BBL Crystal Gram-positive ID Kit (Becton Dickinson, США), а с 2012 года – методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации – 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 программного обеспечения Bruker Biotyper Real Time Classification, версия 3,1 (Bruker Daltonics, Германия). Результат учитывали по значениям коэффициента видовой идентификации. Достоверными считали результаты, если коэффициент совпадения (Score) имел значение от 2,0 и выше. До проведения исследования изоляты хранили при температуре –70°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 20% глицерина.

Определение чувствительности к антибиотикам.

Определение чувствительности к антибиотикам проводили методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтона (Oxoid, Великобритания) в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2015 г.) [6]. При характеристике результатов чувствительности бактерий использовали следующие показатели – чувствительные (Ч), умеренно резистентные (УР), резистентные (Р). Термин «нечувствительные» объединял умеренно резистентные и резистентные.

Значения МПК ванкомицина, тейкопланина, линезолида, тигециклина, левофлоксацина, тетрациклина, хлорамфеникола, ампициллина, пенициллина и эритромицина определяли методом серийных микроразведений в бульоне. Чувствительность ванкомицин-устойчивых *Enterococcus* spp. к даптомицину исследовали с помощью Е-теста (bioMérieux, Франция). Скрининг резистентности высокого уровня к аминогликозидам проводили на агаре Мюллера-Хинтона (Oxoid, Великобритания), содержащем гентамицин 500 мкг/мл и стрептомицин 2000 мкг/мл.

Для контроля качества определения чувствительности использовали штаммы *E. faecalis* ATCC 29212 и *E. faecalis* ATCC 51299.

Статистическая обработка данных проведена в программе WHONET, версия 5.6.

Определение генов резистентности. Гены резистентности к гликопептидам определяли методом ПЦР с использованием специфических праймеров на гены *vanA*, *vanB* и *VanD*, кодирующие резистентность к ванкомицину [7]. В качестве контроля использовали штаммы *E. faecium* BM4147 (*vanA*), *E. faecalis* ATCC®51299 (*vanB*) и *E. gallinarum* BM4174 (*vanC*). В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК маркер GeneRuler™, 100 п.н. (Thermo Fisher Scientific, США).

У линезолид-устойчивого изолята *E. faecium* исследовали наличие мутаций в гене 23S рРНК и в гене *L4* методом секвенирования, присутствие генов *optA* и *cfr* – методом ПЦР [8-11].

Результаты

Проведено изучение чувствительности 427 изолятов *Enterococcus* spp., выделенных из гемокультуры больных с заболеваниями системы крови и симптомами сепсиса, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях с 2002 по 2016 гг. Основная доля микроорганизмов была представлена *E. faecium* (78,2%), существенно реже выделяли *E. faecalis* (19,7%), Рисунок 1. Другие виды *Enterococcus* spp. (2,1%) были представлены единичными изолятами *E. gallinarum* (n=5), *E. durans* (n=2), *E. avium* (n=1) и *E. hirae* (n=1).

Результаты чувствительности *Enterococcus* spp. и распределение значений МПК антибиотиков представлены в Таблице 1 и на Рисунке 2.

Чувствительность *E. faecium* к антибактериальным препаратам

За анализируемый период исследования было выявлено 50 (15%) ванкомицин-устойчивых *E. faecium* (Vancomycin-resistant *Enterococcus* –VRE), из них первый изолят был в 2005 году (МПК ванкомицина 512 мкг/мл). VRE *E. faecium* были выделены в 5 центрах 4 городов (Москва, Иркутск, Челябинск, Сургут). Значения МПК₅₀

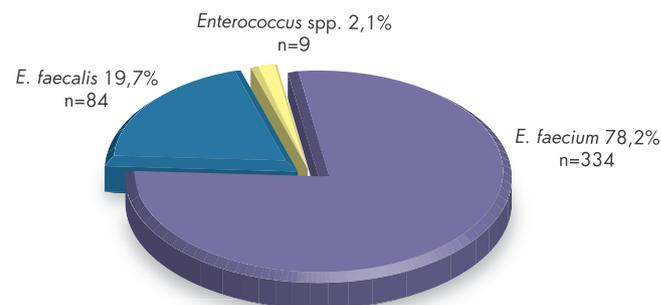


Рисунок 1. Распределение *Enterococcus* spp., выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови (n=427)

Примечание: *Enterococcus* spp. (n=9) включают *E. gallinarum* (n=5), *E. durans* (n=2), *E. avium* (n=1), *E. hirae* (n=1)

Таблица 1. Чувствительность *Enterococcus* spp. (n=427) к антибактериальным препаратам

Показатель	n (%) изолятов по категориям			МПК (мкг/мл)		
	Ч	УР	Р	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Диапазон
<i>E. faecium</i>, n=334						
Тигециклин	334 (100)	0	0	0,032	0,125	0,0075-0,125
Линезолид	333 (99,7)	0	1 (0,3)	1	2	0,125-16
Тейкопланин	301 (90,1)	0	33 (9,9)	0,25	1	0,125-128
Ванкомицин	284 (85)	0	50 (15)	0,5	512	0,12-1024
Хлорамфеникол	263 (78,7)	49 (14,7)	22 (6,6)	8	16	0,25-64
Тетрациклин	250 (74,9)	3 (0,9)	81 (24,3)	0,125	64	0,12->128
Стрептомицин 2000	133 (40)	–	201 (60)	–	–	<2000->2000
Гентамицин 500	51 (15)	–	283 (85)	–	–	<500->500
Эритромицин	19 (5,7)	28 (8,4)	287 (85,9)	>128	>128	0,125->128
Левифлоксацин	16 (4,8)	2 (0,6)	316 (94,6)	64	>128	0,25->128
Ампициллин	5 (1,5)	0	329 (98,5)	128	>128	0,125->128
Пенициллин	4 (1,2)	0	330 (98,8)	>128	>128	0,125->128
<i>E. faecalis</i>, n=84						
Тигециклин	84 (100)	0	0	0,064	0,125	0,0075-0,125
Линезолид	84 (100)	0	0	1	2	0,25-2
Тейкопланин	84 (100)	0	0	0,125	0,125	0,125-0,5
Ванкомицин	83 (98,8)	1 (1,2)	0	0,5	2	0,12-16
Ампициллин	82 (97,6)	0	2 (2,4)	1	2	0,125-128
Пенициллин	73 (86,9)	0	11 (13,1)	2	16	0,125->128
Хлорамфеникол	43 (51,2)	1 (1,2)	40 (47,6)	8	64	0,5-128
Левифлоксацин	38 (45,2)	0	46 (54,8)	32	64	0,05->128
Стрептомицин 2000	35 (41,6)	–	49 (58,3)	–	–	<2000->2000
Гентамицин 500	31 (37)	–	53 (63)	–	–	<500->500
Эритромицин	20 (23,8)	6 (7,1)	58 (69,1)	>128	>128	0,125->128
Тетрациклин	15 (17,9)	3 (3,6)	66 (78,6)	32	64	0,12->128
<i>Enterococcus</i> spp., n=9						
Тигециклин	9 (100)	0	0	0,064	0,125	0,03-0,125
Линезолид	9 (100)	0	0	1	2	0,5-2
Тейкопланин	9 (100)	0	0	0,125	0,25	0,125-0,25
Хлорамфеникол	9 (100)	0	0	2	8	1-8
Ванкомицин	8 (88,9)	0	1 (11,1)	2	128	0,25-128
Гентамицин 500	8 (88,9)	–	1 (11,1)	–	–	<500->500
Ампициллин	6 (66,7)	0	3 (33,3)	1	>128	0,25->128
Пенициллин	5 (55,6)	0	4 (44,4)	4	128	0,125-128
Левифлоксацин	6 (66,7)	1 (11,1)	2 (22,2)	2	128	0,5-128
Тетрациклин	5 (55,6)	0	4 (44,4)	0,125	128	0,125-128
Стрептомицин 2000	6 (66,7)	–	3 (33,3)	–	–	<2000->2000
Эритромицин	4 (44,4)	2 (22,2)	3 (33,3)	1	>128	0,125->128

Примечание: *Enterococcus* spp. (n=9) включают *E. gallinarum* (n=5), *E. durans* (n=2), *E. avium* (n=1), *E. hirae* (n=1)

и МПК₉₀ ванкомицина для всех исследуемых *E. faecium* составили 0,5 мкг/мл и 512 мкг/мл соответственно. У 56% VRE *E. faecium* были определены крайне высокие значения МПК ванкомицина, достигшие 1024 мкг/мл, Рисунок 3. При исследовании генов устойчивости к гликопептидам было выявлено преобладание *vanA* (66%), у остальных изолятов были детектированы *van B* (34%),

Таблица 2. Доля изолятов, нечувствительных к тейкопланину, была меньше, чем к ванкомицину и составила 9,9% (n=33). Изоляты *E. faecium* с геном резистентности *vanB* были чувствительны к тейкопланину. Значения МПК₅₀ и МПК₉₀ тейкопланина также были ниже значений МПК ванкомицина (0,25 мкг/мл и 1,0 мкг/мл, соответственно).

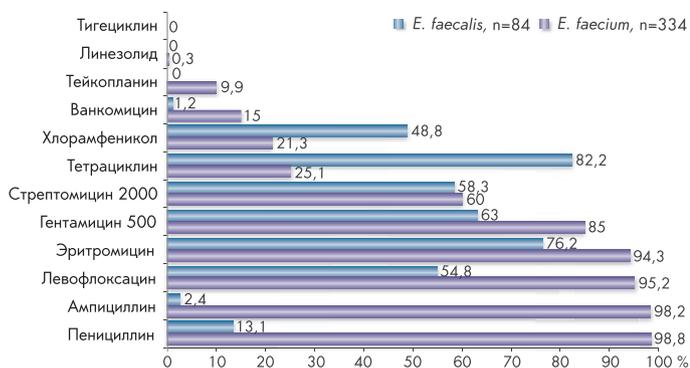


Рисунок 2. Нечувствительные (в %) *E. faecium* и *E. faecalis* (n=418)

Таблица 2. Гены устойчивости к гликопептидам среди VRE (n=52)

<i>Enterococcus</i> spp.	n	гены	n (%) изолятов
<i>E. faecium</i>	50	<i>van A</i>	33 (66)
		<i>van B</i>	17 (34)
<i>E. faecalis</i>	1	<i>van D</i>	1
<i>E. gallinarum</i>	1	<i>van C1+van B</i>	1

В 2012 г. был выделен один изолят *E. faecium*, устойчивый к линезолиду (МПК 16 мкг/мл). Этот изолят был устойчивый ко всем тестируемым антибиотикам, за исключением даптомицина (МПК 0,5 мкг/мл) и тигециклина (МПК 0,06 мкг/мл). Значение МПК ванкомицина составило 1024 мкг/мл. При секвенировании линезолид-устойчивого *E. faecium* были определены мутации в гене, кодирующем 23S рРНК. Гены *optA* и *cfr*, а также мутации в гене *L4* не были выявлены.

Чувствительность к даптомицину была изучена только у VRE *E. faecium*. Все VRE *E. faecium*, включая линезолид-устойчивый изолят, были чувствительны к даптомицину. На Рисунке 3 представлены распределение значений МПК даптомицина для VRE *E. faecium*. У 90% VRE *E. faecium* значения МПК даптомицина были от 2 мкг/мл и менее.

Все исследуемые *E. faecium* были чувствительны к тигециклину, и для этого антибиотика были характер-

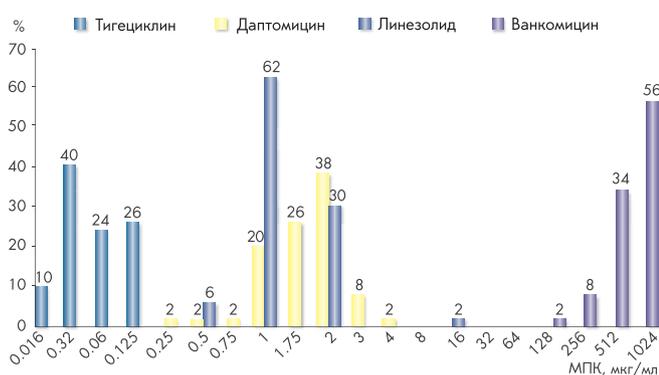


Рисунок 3. Распределение значений МПК ванкомицина, линезолида, даптомицина и тигециклина среди VRE *E. faecium* (n=50)

ны минимальные значения МПК (МПК₅₀ 0,032 мкг/мл, МПК₉₀ 0,125 мкг/мл) в сравнении с другими антибактериальными препаратами. К хлорамфениколу и тетрациклину были чувствительны 78,7% и 74,9% *E. faecium*. У других антибиотиков (эритромицин, левофлоксацин, ампициллин) были отмечены высокие показатели устойчивости (94,3-98,8%). Доля *E. faecium* с высоким уровнем резистентности к аминогликозидам была существенной, особенно к гентамицину. Доля *E. faecium* с высоким уровнем резистентности к гентамицину составила 85%, к стрептомицину – 60%, одновременно к обоим аминогликозидам – 45%.

Чувствительность *E. faecalis* к антибактериальным препаратам

Профиль чувствительности к антибактериальным препаратам у изолятов *E. faecalis* был более обнадеживающим, чем у *E. faecium*. Все *E. faecalis* были чувствительны к линезолиду (МПК_{50/90} 1/2 мкг/мл), тейкопланину (МПК_{50/90} 0,125/0,125 мкг/мл) и тигециклину (МПК_{50/90} 0,064/0,125 мкг/мл). За период исследования (2009 г.) был выделен только один изолят *E. faecalis* (1,2%) умеренно резистентный к ванкомицину (МПК 16 мкг/мл) с геном резистентности *vanD*. Этот изолят был чувствительный к линезолиду (МПК 1 мкг/л), тейкопланину (МПК 0,25 мкг/мл), тигециклину (МПК 0,032 мкг/мл), даптомицину (МПК 0,25 мкг/мл) и резистентный к гентамицину, стрептомицину, пенициллину (МПК >128 мкг/мл), эритромицину (МПК >128 мкг/мл), ампициллину (МПК 128 мкг/мл), левофлоксацину (МПК 64 мкг/мл).

Высокие показатели чувствительности продемонстрировал ампициллин (97,6%), к нему были устойчивы только два изолята *E. faecalis*. Доля нечувствительных изолятов к другим антибиотикам, включая аминогликозиды, была высокой и составляла от 48,8% до 82,2%, Рисунок 2.

Чувствительность *Enterococcus* spp. (*E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*) к антибактериальным препаратам

Всего было выделено 9 изолятов, и все они были чувствительны к линезолиду, тейкопланину, тигециклину и хлорамфениколу, Таблица 1. Один изолят *E. gallinarum* был устойчив к ванкомицину (МПК 128 мкг/мл) и сохранял чувствительность к другому гликопептиду – тейкопланину (МПК 0,25 мкг/мл), а также к пенициллину, ампициллину, хлорамфениколу, тигециклину, даптомицину, линезолиду. У этого изолята, кроме природного гена устойчивости к ванкомицину *vanC1*, был детектирован дополнительный ген *vanB*. Из исследуемой когорты *Enterococcus* spp. только один изолят (*E. gallinarum*, *vanC1*, *vanB*) проявлял высокий уровень резистентности к гентамицину. Активность *in vitro* других антибиотиков была ниже.

Обсуждение

Основными проявлениями инфекционного процесса, вызванного энтерококками, являются бактериемии, инфекции мочевых путей, эндокардиты, абдоминальные

инфекции, иногда менингиты. Из этого перечня возможных осложнений у больных опухолями системы крови ведущую позицию занимают инфекции кровотока, причем в видовом распределении возбудителей преобладают *E. faecium*. Доля других видов энтерококков, способных вызывать инфекции кровотока у человека, составляет от 2% до 9% и к ним относят *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. raffinosus*, *E. durans*, *E. cecorum*, *E. canintestini* и *E. mundtii* [12].

Наиболее значимой характеристикой энтерококков является чувствительность их к ограниченному числу противомикробных препаратов, особенно это проявляется у *E. faecium*. Кроме наличия ограниченного числа потенциально активных антибиотиков, следует отметить формирование приобретенной резистентности у энтерококков, и это прежде всего касается *E. faecium*. Изученные нами изоляты *E. faecium* имели менее благоприятный профиль чувствительности в сравнении с *E. faecalis*.

Для *Enterococcus* spp. характерны межвидовые различия в чувствительности к противомикробным препаратам. Так устойчивыми к ампициллину были практически все изоляты *E. faecium* (98,5%) и лишь 2,4% *E. faecalis*. Устойчивость к пенициллинам у *E. faecalis* встречается редко и в большинстве стран не превышает 5% [13]. В связи с этим ампициллин остается препаратом выбора в лечении инфекций, вызванных *E. faecalis*, что имеет и немалую финансовую выгоду.

Высокий уровень резистентности к гентамицину и стрептомицину в нашем исследовании был определен у весомого числа изолятов, причем это проявлялось как у *E. faecalis* (63% и 58%, соответственно), так и у *E. faecium* (85% и 60%). Резистентность высокого уровня к аминогликозидам у энтерококков активно регистрируется в мире. Так в исследовании SCOPE резистентность высокого уровня к гентамицину и стрептомицину уже в 1995-1996 гг. составляла 25% и 52% у *E. faecalis*, 33% и 58% – у *E. faecium* [14]. По результатам исследования в России (1998 г.) устойчивыми к гентамицину и стрептомицину были 25% и 44% штаммов *E. faecalis*, 58% и 50% *E. faecium*, соответственно [15].

По данным European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (2016 г.) высокий уровень резистентности к аминогликозидам имели в среднем 30,5% *E. faecalis* и 48% *E. faecium*. [16]. Этот показатель был неодинаковым в разных странах, и для изолятов *E. faecalis* вариации составили от 12,5% (Люксембург) до 56,3% (Румыния), для *E. faecium* – от 9,8% (Кипр) до 80,6% (Болгария). В клинической практике высокий уровень резистентности к аминогликозидам у *Enterococcus* spp. проявляется отсутствием бактерицидного эффекта в комбинации их с пенициллинами. Более высокий процент определения высокого уровня резистентности к аминогликозидам у *E. faecium* и *E. faecalis* в нашем исследовании в сравнении с другими работами может быть обусловлен когортой больных, от которых были выделены изоляты, и являться следствием широкого применения сочетания бета-лактама с аминогликозидом при фебрильной нейтропении у этих больных.

До недавнего времени ванкомицин являлся препаратом выбора в лечении инфекций, вызванных

E. faecium. Однако в последние годы регистрируется увеличение доли нечувствительных к нему штаммов, причем в отдельных стационарах и странах этот показатель достигает весьма внушительных цифр. Так в США по данным National Healthcare Safety Network доля VRE *E. faecium* достигла 83% [17]. В Европе частота детекции VRE *E. faecium* составляет в среднем 11,8% и варьирует от 0,4% до 46,3% по данным регистра за 2016 г. [16]. Наиболее высокий процент VRE *E. faecium* был определен на Кипре (46,3%), в Ирландии (44,1%) и Румынии (39%), минимальный – в Швеции (0,4%), Франции (0,6%) и Нидерландах (0,9%). Причем, в ряде стран, таких как Финляндия, Исландия, Эстония, Словения и Люксембург не были зарегистрированы VRE *E. faecium* [16].

Первые сообщения о выделении энтерококков, устойчивых к ванкомицину, появились в Европе в 1986 г., в США – в 1987 г. [18, 19], в России – в 2004 г. [20]. Первый VRE, выделенный в России, был идентифицирован как *E. gallinarum*, имел два гена устойчивости *vanB*, *vanC1* и значения МПК ванкомицина 128 мкг/мл. Данный *E. gallinarum* был выделен из гемокультуры больного острым лейкозом, находящегося на лечении в НМИЦ гематологии (г. Москва). В 2005 г. в этом же центре было зарегистрировано выделение из гемокультуры *E. faecium*, несущего *vanA* ген резистентности со значением МПК ванкомицина 512 мкг/мл [21]. Позднее появились сообщения из других центров России о выделении VRE [22, 23]. Более детальное исследование, включавшее генотипирование и мультилокусное секвенирование первых VRE *E. faecium* из двух гематологических центров Москвы, подтвердило их принадлежность к популяции эпидемических штаммов клонального комплекса *Enterococcus faecium* 17 (clonal complex 17). Исследуемые 16 VRE *E. faecium* принадлежали к трем сиквенс типам (ST) – ST202 (n=11), ST18 (n=3) и ST262 (n=2) [24].

В нашем исследовании было выявлено 52 VRE, из них 50 изолятов *E. faecium* и по одному изоляту *E. faecalis* и *E. gallinarum*. У изолятов *E. faecium* преобладали гены резистентности *vanA* (66%) над генами *vanB* (34%). Изоляты *E. faecium*, несущие гены *vanB*, были чувствительными к другому гликопептидному антибиотику – тейкопланину, в отличие от ванкомицина. К настоящему времени описано 9 фенотипов энтерококков, устойчивых к гликопептидным антибиотикам (*VanA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G*, *L*, *M*, *N*), причем сообщения о последних трех фенотипах (*Van L*, *M*, *N*) были представлены в 2008 г. и позднее [25, 26]. Наибольшее клиническое значение отводится фенотипу *VanA*, который преобладает у *E. faecium* и для него характерны высокие значения МПК ванкомицина (64-1000 мкг/мл) и тейкопланина (16-512 мкг/мл). В Европе, Канаде и США также отмечено преобладание *VanA* фенотипа резистентности у энтерококков, в Австралии – фенотипа *VanB* [27, 28].

Частота обнаружения других видов *Enterococcus* spp., устойчивых к ванкомицину, регистрируется существенно реже. Так по результатам исследования National Health Safety Network, включающего данные по чувствительности более 400000 бактерий из 4515 клиник, доля VRE *E. faecalis* составила 10%, причем этот показатель

не изменялся в течение четырех лет (2011-2014 гг.) [17]. В представленном нами исследовании изолят VRE *E. faecalis* имел фенотип резистентности VanD и был получен из гемокультуры в первый день поступления в НИИЦ гематологии (Москва) больной, переведенной из клиники США.

Как уже было представлено ранее, за период исследования был выделен один VRE *E. gallinarum*. Для этого вида энтерококков характерным является наличие фенотипа VanC с низким уровнем природной устойчивости к ванкомицину (МПК ванкомицина 2-32 мкг/мл) и сохранение чувствительности к тейкопланину. В нашем случае, наряду с природным геном *vanC1*, был детектирован ген *vanB* и высокое значение МПК ванкомицина (128 мкг/мл). В литературе имеются единичные сообщения о выделении клинически значимых штаммов VRE *E. gallinarum*, причем, наряду с природными генами устойчивости *vanC* у них определяются, как правило, дополнительно гены *vanA*, *vanA* + *vanB* [29].

Один (0,3%) изолят *E. faecium*, устойчивый к линезолиду (МПК 16 мкг/мл), был выделен в 2012 г. от больного острым лейкозом, находящегося на лечении в НИИЦ гематологии (г. Москва). Этот изолят был устойчивый ко всем тестируемым антибиотикам, за исключением даптомицина (МПК 0,5 мкг/мл) и тигециклина (МПК 0,06 мкг/мл), значение МПК ванкомицина составило 1024 мкг/мл. Известно несколько механизмов устойчивости к оксазолидинонам: мутации в генах 23S рРНК, мутации в генах, кодирующих рибосомальные белки L3 и L4, наличие генов *cfr* и *optA* [30]. При секвенировании линезолид-устойчивого *E. faecium*, выделенного в нашем исследовании, были определены мутации в гене, кодирующем 23S рРНК. Гены *optA* и *cfr*, а также мутации в гене L4 не были выявлены.

Устойчивость к линезолиду определяется только у *E. faecium* и *E. faecalis*, регистрируется редко – от 2,6% в США до 4,3% в Европе [31]. Так по данным программы Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum, включающей результаты чувствительности энтерококков за 9 лет (2004-2012 гг.) из 73 медицинских центров 33 стран, доля линезолид-устойчивых *E. faecalis* составила 0,92% (4 из 434 штаммов), *E. faecium* – 0,03% (1 из 333 штаммов) [32]. В то же время среди VRE доля обнаружения линезолид-устойчивых изолятов существенно выше и может достигать 20-40% [33]. В большинстве случаев детекция линезолид-устойчивых *Enterococcus* spp. ассоциирована с предшествующим длительным применением линезолида (от 20 дней и более), в то же время есть сообщения, что только 25% больных, у которых были линезолид-устойчивые энтерококки, принимали этот препарат [33].

Все исследуемые нами *Enterococcus* spp., включая ванкомицин-устойчивые, были чувствительны к тигециклину. Низкий процент устойчивости у энтерококков к тигециклину (менее 0,5%) сообщается и другими исследователями [34].

Чувствительность к даптомицину была оценена только среди ванкомицин-устойчивых *Enterococcus* spp. Все исследуемые изоляты, включая линезолид-устойчивый, были чувствительны к даптомицину, у 90% из них значения МПК даптомицина составили от 2 мкг/мл и менее. В

масштабных эпидемиологических исследованиях сообщается о низком проценте ($\leq 0,3\%$) выделения *Enterococcus* spp., нечувствительных к даптомицину [35]. В исследовании Casarao и соавт. этот показатель был несколько выше и составил 2% [36]. Появление нечувствительных к даптомицину штаммов также ассоциировано с длительным применением препарата, однако, у части больных эта связь также может отсутствовать [31].

Заключение

Среди энтерококков ведущими возбудителями инфекций кровотока у больных с опухолями системы крови были *E. faecium* (78%), существенно реже – *E. faecalis* (19,7%). Изоляты *E. faecalis* имели более благоприятный профиль чувствительности в сравнении с *E. faecium*. Препаратом выбора в лечении инфекций, вызванных *E. faecalis*, остается ампициллин, только 2,4% *E. faecalis* были устойчивы. В то же время у весомой доли *E. faecalis* (58-63%) был определен высокий уровень резистентности к стрептомицину и гентамицину, поэтому в случае необходимости добавления аминогликозида к беталактаму следует проводить скрининг на наличие высокого уровня устойчивости к этим препаратам.

Особое внимание следует обратить на антибиотикорезистентность изолятов *E. faecium*. У 15% *E. faecium* была определена резистентность к ванкомицину, причем у одного из них и к линезолиду. Все VRE *E. faecium* были чувствительны только к тигециклину и даптомицину. Безусловно, при такой частоте обнаружения VRE *E. faecium* нельзя рассматривать ванкомицин как препарат выбора в лечении энтерококковых инфекций у больных опухолями системы крови, и назначение ванкомицина будет обосновано только после подтверждения чувствительности. В настоящее время препаратом выбора при выделении из гемокультуры *Enterococcus* spp. следует рассматривать бактерицидный антибиотик – даптомицин, проявляющий высокую активность не только в системе кровотока, но и в биопленках. Несмотря на высокие показатели активности *in vitro*, применение тигециклина не рекомендовано в лечении инфекций кровотока ввиду отсутствия клинического подтверждения его эффективности при этой патологии по причине бактериостатической активности и низкой концентрации препарата в кровяном русле.

Исследование показало, что наряду с *E. faecium*, из гемокультуры могут быть выделены другие VRE, такие как *E. faecalis*, *E. gallinarum*, подтверждая тем самым неоднозначность выбора ванкомицина в качестве стартовой терапии энтерококковых инфекций.

Авторы выражают благодарность главному внештатному специалисту-микробиологу Комитета здравоохранения Санкт-Петербурга, руководителю отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии детского научно-клинического центра инфекционных болезней Санкт-Петербурга, профессору, доктору медицинских наук Сидоренко Сергею Владимировичу – идейному вдохновителю исследований по ванкомицин-устойчивым энтерококкам.

Литература

- Okhmat V.A., Klyasova G.A., Parovichnikova E.N., et al. Spectrum and epidemiology of infection complications in patients with acute myeloid leukemia during induction and consolidation chemotherapy. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2017;62(1):9-15. Russian. (Охмат В.А., Клясова Г.А., Паровичникова Е.Н., и соавт. Спектр и этиология инфекционных осложнений у больных острыми миелоидными лейкозами на этапах индукции и консолидации ремиссии. *Гематология и трансфузиология*. 2017;62(1):9-15.)
- Klyasova G.A., Speranskaya L.L., Mironova A.V., et al. The pathogens causing sepsis in immunocompromized patients: structure and problems of antibiotic resistance. Results of a multi-center cooperative study. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2007;1:1-8. Russian. (Клясова Г.А., Сперанская Л.Л., Миронова А.В. и соавт. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования). *Гематология и трансфузиология*. 2007;1:1-8.)
- Klyasova G.A. Infections in patients with hematological malignancies: clinical features, diagnosis and treatment. PhD Thesis. Moscow; 2009. Russian. (Клясова Г.А. Инфекции при гемобластозах и депрессиях кроветворения: клиника, диагностика и лечение: Диссертация д-ра мед. наук. М.; 2009.)
- Mikulska M., Viscoli C., Orasch C., et al. Fourth European Conference on Infections in Leukemia Group (ECLIL-4), a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, ELN and ESGICH/ESCMID. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect*. 2013;68:321-331.
- Suntharam N., Lankford M.G., Trick W.E., Peterson L.R., Noskin G.A. Risk factors for acquisition of vancomycin-resistant enterococci among hematology-oncology patients. *Diagnostic Microb Infect Dis*. 2002;43:183-188.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- 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.
- Bonora M.G., Ligozzi M., Luzzani A., et al. Emergence of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* not dependent on linezolid treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:197-198.
- Mendes R.E., Deshpande L.M., Farrell D.J., et al. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(11):2329-2335.
- Kehrenberg C., Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fxrA* and *cfi* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1156-1163.
- Inkster T., Coia J., Meunier D., et al. First outbreak of colonization by linezolid- and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* harbouring the *cfi* gene in a UK nephrology unit. *J Hosp Infect*. 2017;97(4):397-402.
- Tan C.-K., Lai C.-C., Wang J.-Y., et al. Bacteremia caused by non-*faecalis* and non-*faecium* enterococcus species at a medical center in Taiwan 2000 to 2008. *J Infect*. 2010;61(1):34-43.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases Stockholm: ECDC; 2017. Available at: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>. Accessed: 21.06.2018.
- Jones R.N., Marshall S.A., Pfaller M.A., et al. Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE Program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy. SCOPE Hospital Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997;2:95-102.
- Sidorenko S.V., Rezvan S.P., Grudinina S.A., Krotova L.A., Sterkhova G.V. Multicenter trial of enterococcus antibiotic susceptibility. *Antibiotiki i himioterapija*. 1998;9:9-17. Russian. (Сидоренко С.В., Резван С.П., Грудина С.А., Кротова Л.А., Стерхова Г.В. Результаты многоцентрового исследования антибиотикочувствительности энтерококков. *Антибиотики и химиотерапия*. 1998;9:9-17.)
- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet). Stockholm: ECDC; 2016. Available at: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf>. Accessed: 21.06.2018.
- Weiner L.M., Webb A.K., Limbago B., 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;37:1288-1301.
- LeClercq 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.
- Uttley A.H., Collins C.H., Naidoo J., George R.C. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. 1988;i57-58.
- Klyasova G., Sidorenko S., Speranskaya L., Fedorova A.V. Detection of *vanb2* in *Enterococcus gallinarum* in Moscow, Russia. *Intern J Antimicrob Agents*. 2004;24(2):131.366/79P.
- Fedorova A.V., Cherkashin E., Klyasova G., et al. First detection of vancomycin-resistant enterococci in Russia: genetic background. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(S4):131;P1819.
- Bagirova N.S., Dmitrieva N.V. Enterococcal bacteraemia in patients with haematological malignancies. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(S4):8;P699.
- 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. *Jepidemiologija 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.)
- Brilliantova A.N., Klyasova G.A., Mironova A.V., et al. Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in two haematological centres in Russia. *Intern J Antimicrob Agents*. 2010;35(2):177-181.
- Cattoir V., Leclercq R. Twenty-five of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:731-742.
- Boyd D.A., Willey B.M., Fawcett D., Gillani N., Mulvey M.R. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(7):2667-2672.
- Deshpande, L.M., Fritsche T.R., Moet G.J., Biedenbach D.J., Jones R.N. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58:163-170.
- Coombs G.W., Pearson J.C., Daly D.A., et al. Molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in Australia. *J Clin Microbiol*. 2014;52:897-905.
- Eshaghi A., Shahinas D., Li A., et al. Characterization of an *Enterococcus gallinarum* isolate carrying a Dual *vanA* and *vanB* Cassette. *J Clin Microbiol*. 2015;53(7):2225-2229.
- Dekhnich A.V., Hachatryan N.N. New and old oxazolidinones: tedizolid vs. linezolid. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2017;19(2):121-129. Russian. (Дехнич А.В., Хачатрян Н.Н. Новые и старые оксазолидиноны. Тедизолид и линезолид – в чем отличия? *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017;19(2):121-129.)
- Patel R., Gallagher J.C. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia pharmacotherapy. *Ann Pharmacother*. 2015;49(1):69-85.
- Mendes R.E., Hogan P.A., Streit J.M., Jones R.N., Flamm R.K. Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) program: report of linezolid activity over 9 years (2004-12). *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(6):1582-1588.
- Pogue J.M., Paterson D.L., Pasculle A.W., Potoski B.A. Determination of risk factors associated with isolation of linezolid-resistant strains of vancomycin-resistant enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(12):1382-1388.
- Aznar J., Lepe J.A., Dowzicky M.J. Antimicrobial susceptibility among *E. faecalis* and *E. faecium* from France, Germany, Italy, Spain and the UK (T.E.S.T. Surveillance Study, 2004-2009). *J Chemother*. 2012;24(2):74-80.
- Sader H.S., Farrell D.J., Flamm R.K., Jones R.N. Daptomycin activity tested against 164457 bacterial isolates from hospitalized patients: summary of 8 years of a Worldwide Surveillance Programme (2005-2012). *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(5):465-469.
- Casapao A.M., Kullar R., Davis S.L., et al. Multicenter study of high-dose daptomycin for treatment of enterococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(9):4190-4196.