

Содержание

Болезни и возбудители

- Бочарова Ю.А., Савинова Т.А., Чаплин А.В., Лямин А.В., Кондратенко О.В., Поликарпова С.В., Жилина С.В., Федорова Н.И., Коржанова М., Маянский Н.А., Чеботарь И.В.
- 220** Геномные характеристики штаммов *Achromobacter* spp., выделенных от пациентов с муковисцидозом в России
- Попова М.О., Рогачева Ю.А.
- 226** Мукормикоз: современные возможности диагностики и лечения, существующие проблемы и новые тенденции в терапии
- Овсянников Н.В., Билевич О.А.
- 239** COVID-19-ассоциированный легочный аспергиллез
- Ортенберг Э.А.
- 248** Почти два года с COVID-19: некоторые аспекты использования антибиотиков
- Хостелиди С.Н., Зайцев В.А., Пелих Е.В., Яшина Е.Ю., Родионова О.Н., Богомолова Т.С., Авдеенко Ю.Л., Клишко Н.Н.
- 255** Мукормикоз на фоне COVID-19: описание клинического случая и обзор литературы

Антимикробные препараты

- Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Трушин И.В., Кузьменков А.Ю., Мартинович А.А., Шек Е.А., Шайдуллина Э.Р., Авраменко А.А., Виноградова А.Г., Иванчик Н.В., Сухорукова М.В., Романов А.В., Микотина А.В., Азизов И.С., Дехнич А.В., Козлов Р.С. от имени участников многоцентрового исследования «Оценка чувствительности клинических изолятов Enterobacterales и *P. aeruginosa* к цефтазидиму-авибактаму в России с помощью диско-диффузионного метода»
- 264** Оценка чувствительности клинических изолятов Enterobacterales и *Pseudomonas aeruginosa* к цефтазидиму-авибактаму в России (по данным локальных микробиологических лабораторий)
- Козлов Р.С., Азизов И.С., Дехнич А.В., Иванчик Н.В., Кузьменков А.Ю., Мартинович А.А., Микотина А.В., Сухорукова М.В., Трушин И.В., Эйдельштейн М.В.
- 280** *In vitro* чувствительность к биопенем и другим карбапенемам клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. и представителей порядка Enterobacterales, выделенных у госпитализированных пациентов в различных регионах России

Антибиотикорезистентность

- Ромашов О.М., Ни О.Г., Быков А.О., Круглов А.Н., Проценко Д.Н., Тюрин И.Н.
- 293** Оценка резистентности микроорганизмов многопрофильного стационара и модернизация схем антимикробной терапии в условиях пандемии COVID-19-инфекции
- Хрульнова С.А., Клясова Г.А., Фёдорова А.В., Фролова И.Н., Бидерман Б.В.
- 305** Генетическое разнообразие ванкомицинорезистентных *Enterococcus faecium*, выделенных из гемокультур больных опухолями системы крови

Опыт работы

- Сыраева Г.И., Мишинова С.А., Колбин А.С., Еременко Е.О.
- 314** Оценка профиля безопасности лекарственных средств, применяемых для патогенетической терапии новой коронавирусной инфекции (COVID-19): обзор литературы
- Валиева Р.И., Лисовская С.А., Исаева Г.Ш.
- 330** Оценка биопленкообразующей активности грибов *Fusarium solani*, выделенных с кожных покровов пациентов

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован
Комитетом РФ по печати
30.09.1999 г. (№019273)
Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2021.

Генетическое разнообразие ванкомицинорезистентных *Enterococcus faecium*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови

Хрульнова С.А., Клясова Г.А., Фёдорова А.В., Фролова И.Н., Бидерман Б.В.

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

Контактный адрес:
Светлана Алексеевна Хрульнова
Эл. почта: khrulnovas@mail.ru

Ключевые слова: ванкомицинорезистентные *E. faecium*, гемокультура, опухоли системы крови, МЛСТ, клональный комплекс.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Изучить генетическое разнообразие ванкомицинорезистентных *Enterococcus faecium* (VR-*E. faecium*), выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови методом мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ).

Материалы и методы. Были изучены VR-*E. faecium*, выделенные из гемокультуры больных, находившихся на стационарном лечении в 6 лечебных учреждениях 4 городов России (2003–2019 гг.). Чувствительность *E. faecium* к ванкомицину определяли методом серийных микроразведений в бульоне (CLSI 2018). Гены резистентности к ванкомицину *vanA* и *vanB* исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Генотипирование VR-*E. faecium* проводили методом МЛСТ.

Результаты. Всего исследовали 83 штамма VR-*E. faecium*. Гены *vanA* были детектированы у 71,1% ($n = 59$) VR-*E. faecium*, гены *vanB* – у 28,9% ($n = 24$). Всего было выявлено 22 сиквенс-типа (ST), которые принадлежали к эпидемическому клональному комплексу CC17. Доминирующими сиквенс-типами оказались ST17 (19,3%), ST78 (18,1%), ST80 (16,9%) и включали 54,3% VR-*E. faecium*. Другие сиквенс-типы содержали от 1 до 4 штаммов. Для VR-*E. faecium vanA* по сравнению с VR-*E. faecium vanB* достоверно чаще была определена принадлежность к ST78 (23,7% против 4,2%, $p = 0,0559$ соответственно) и к ST80 (23,7% против 0%, $p = 0,0079$ соответственно) и реже к ST17 (6,8% против 50% соответственно, $p < 0,0001$). В течение двух периодов исследования (2003–2011 гг. и 2012–2019 гг.) была обнаружена циркуляция 9 сиквенс-типов, включая клоны «высокого риска» ST17 и ST78.

Выводы. В ходе исследования было выявлено генетическое разнообразие VR-*E. faecium*, представленное 22 ST. Все VR-*E. faecium* принадлежали к эпидемическому клональному комплексу CC17 и включали как клоны «высокого риска» ST17 и ST78, так и менее распространенные ST.

Original Article

Genetic diversity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from blood culture in patients with hematological malignancies

Khrulnova S.A., Klyasova G.A., Fedorova A.V., Frolova I.N., Biderman B.V.

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Contacts:
Svetlana A. Khrulnova
E-mail: khrulnovas@mail.ru

Key words: vancomycin-resistant *E. faecium*, blood culture, hematological malignancies, MLST, clonal complex.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To study the genetic diversity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VR-*E. faecium*) isolated from the blood culture in patients with hematological malignancies by multilocus sequence typing (MLST).

Materials and methods. VR-*E. faecium* isolated from the blood culture in hematological patients in 6 hospitals of 4 Russian cities (2003–2019) were evaluated. Susceptibility to vancomycin was tested by the broth microdilution method (CLSI, 2018). Vancomycin-resistance genes (*vanA*, *vanB*) were identified by polymerase chain reaction. Genotyping of VR-*E. faecium* was performed by MLST.

Results. A total of 83 VR-*E. faecium* were examined. The *vanA* genes were detected in 71.1% ($n = 59$) VR-*E. faecium*, *vanB* genes – in 28.9% ($n = 24$). A total of 22 sequence types (STs) belonging to epidemic clonal complex CC17 were detected. The dominant sequence types were ST17 (19.3%), ST78 (18.1%), ST80 (16.9%), and comprised 54.3% VR-*E. faecium*. Other sequence types included 1 to 4 strains. VR-*E. faecium* carrying *vanA*, in comparison with VR-*E. faecium vanB*, significantly more often belonged to ST78 (23.7% vs. 4.2%, $p = 0.0559$, respectively) and ST80 (23.7% versus 0%, $p = 0.0079$, respectively) and less frequently to ST17 (6.8% versus 50%, $p < 0.0001$). Circulation of 9 STs including «high-risk» clones ST17 and ST78 was detected during two study periods (2003–2011 and 2012–2019).

Conclusions. This study showed a genetic diversity of VR-*E. faecium* that was represented by 22 STs. All VR-*E. faecium* belonged to epidemic clonal complex CC17 and comprised «high-risk» clones ST17, ST78 and less common STs.

Введение

Энтерококки являются представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека. В то же время они способны вызывать различные инфекционные осложнения, включая инфекции мочевыводящих путей, бактериемии, эндокардиты, интраабдоминальные инфекции. Среди этих осложнений у иммунокомпрометированных больных преобладают инфекции кровотока. Так, по результатам многоцентрового исследования, в России энтерококки занимали третье место (10,3%) среди возбудителей инфекций кровотока у больных опухолями системы крови [1]. Среди энтерококков преобладали *E. faecium* (78,2%), из которых 15% оказались резистентными к ванкомицину [2]. За последнее десятилетие было отмечено увеличение детекции ванкомицинорезистентных *E. faecium* (VR-*E. faecium*) во всем мире. По данным Европейской сети по надзору за антибиотикорезистентностью (EARS-Net), доля VR-*E. faecium* увеличилась с 10,5% (2015 г.) до 17,3% (2018 г.). В 2018 г. только в 12 из 30 стран Европы, участвующих в программе EARS-Net, уровень резистентности к ванкомицину был менее 5%, а в таких странах, как Латвия, Польша, Венгрия, Ирландия, Румыния и Кипр, достигал 35–59% [3]. В отчете Национальной сети по безопасности здравоохранения (США) сообщалось, что в 2015–2017 гг. среди возбудителей инфекций кровотока *E. faecium* занимали 3-ю позицию в онкологических отделениях и 6-ю – в отделениях реанимации и интенсивной терапии, среди них VR-*E. faecium* составляли 81,6–84,5% [4]. В Австралии в 2018 г. при инфекциях кровотока нечувствительными к ванкомицину оказались 45% *E. faecium* [5]. Выделение ванкомицинорезистентных энтерококков из гемокультуры пациентов с заболеваниями системы крови в сравнении с ванкомициночувствительными энтерококками являлось независимым фактором снижения общей 30-дневной выживаемости [6].

В настоящее время известно 8 генотипов приобретенной резистентности к ванкомицину (*vanA/B/D/E/G/L/M/N*) у *Enterococcus* spp. и один генотип (*vanC*) природной (видовой) устойчивости к ванкомицину, который характерен для *Enterococcus gallinarum* и *Enterococcus casseliflavus*. Наибольшее распространение среди энтерококков получили гены оперонов *vanA* и *vanB* [7]. Первые VR-*E. faecium*, выделенные в России в 2005 г. из гемокультуры больных опухолями системы крови, имели *vanA*-генотип [8]. Дальнейшее исследование 50 VR-*E. faecium*, выделенных с 2002 по 2016 г., также подтвердило преобладание генов *vanA* (66%) над генами *vanB* (33%) [2]. Исследование VR-*E. faecium*, колонизирующих слизистые оболочки больных и контаминирующих объекты внешней среды, также показало, что *vanA*-тип устойчивости к ванкомицину являлся доминирующим среди энтерококков [9]. Это исследование было проведено в отделениях различного медицинского профиля Санкт-Петербурга в 2013–2014 гг.

Использование разных методов типирования позволяет исследовать генетическое разнообразие *E. faecium*

и проводить анализ их клонального распространения. Мультислокусное секвенирование–типирование (МЛСТ) является одним из ключевых методов генотипирования. Согласно стандартному протоколу МЛСТ *E. faecium*, проводится анализ нуклеотидной последовательности 7 генов «домашнего хозяйства», включающих *adk* (аденилаткиназа), *atp* (АТФ-синтаза), *ddl* (D-аланин-D-аланинлигаза), *gyd* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), *gdh* (глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа), *purK* (фосфорибозиламиноимидазол карбоксилаза АТФазная субъединица) и *pstS* (переносчик АТФ-связывающей кассеты). На основании нуклеотидной последовательности 7 генов (аллельного профиля) штаммы *E. faecium* могут быть отнесены к определенной генетической линии – сиквенс-типу (ST), близкородственные сиквенс-типы объединяют в клональные комплексы (CC). Во всем мире большинство *E. faecium*, выделенных при внутрибольничных инфекциях и вспышках инфекций, принадлежало к одному клональному комплексу – CC17 [7]. В составе CC17 преобладают 7 сиквенс-типов (ST16, ST17, ST18, ST78, ST117, ST192 и ST203), которые рассматривают как клоны «высокого риска», и они распространены во всем мире [10]. Первые штаммы VR-*E. faecium*, выделенные от больных в двух гематологических центрах Москвы в 2004–2007 гг., также принадлежали к CC17, и среди них были выявлены как клон «высокого риска» (ST18), так и менее распространенные сиквенс-типы (ST202, ST262) [11].

Целью исследования было изучение генетического разнообразия ванкомицинорезистентных *E. faecium*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, методом МЛСТ.

Материалы и методы

Источники бактериальных изолятов

Материалом исследования были выбраны VR-*E. faecium*, выделенные из гемокультуры от больных, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях 6 лечебных учреждений 4 городов России с 2003 по 2019 г. В исследование включали первый изолят, выделенный из гемокультуры больного. Все изоляты были доставлены в лабораторию ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, где были проведены окончательная идентификация микроорганизмов, определение чувствительности к антимикробным препаратам, детекция генов резистентности и МЛСТ.

Видовая идентификация и хранение

Идентификацию изолятов до вида с 2003 по 2011 г. проводили с помощью идентификационной системы BBL Crystal Gram-positive ID Kit (Becton Dickinson, США), с 2012 г. – методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на анализаторе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Для идентификации изолятов до вида брали изолированные колонии бактерий. 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 Real Time Classification, версия 3.1 (Bruker Daltonics, Германия). В качестве критерия надежной видовой идентификации использовали рекомендуемые значения коэффициента совпадения («Score») от 2,0 и выше. Изоляты хранили при температуре -70°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 20% глицерина.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Определение чувствительности к антибиотикам проводили методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера – Хинтона (OXOID, Великобритания) в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI, 2018 г.) [12]. Резистентными к ванкомицину считали изоляты со значениями МПК ванкомицина ≥ 32 мкг/мл. Для контроля качества определения чувствительности использовали штаммы *E. faecalis* ATCC 29212 и *E. faecalis* ATCC 51299.

Детекция генов резистентности

Детекцию генов *vanA* и *vanB* проводили методом мультиплексной ПЦР с использованием специфических праймеров [13]. Бактериальную ДНК выделяли методом «горячего лизиса» клеточной суспензии при 95°C в течение 5 мин. с последующим высокоскоростным центрифугированием (13000 об/мин) в течение 3 мин.

В качестве матрицы для проведения ПЦР использовали полученную надосадочную жидкость. Штаммы *E. faecium* BM4147 (*vanA*) и *E. faecalis* ATCC 51299 (*vanB*) использовались в качестве положительных контролей. Электрофоретическую детекцию продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле с использованием трис-ацетатного электродного буфера. В качестве стандарта молекулярных длин использовали ДНК-маркер 100bp GeneRuler™ (Thermo Fisher Scientific, США).

Генотипирование

Генотипирование *E. faecium* осуществляли методом МЛСТ, включающим амплификацию и секвенирование 7 генов «домашнего хозяйства» (*adh*, *atp*, *ddl*, *gyd*, *gdh*, *purK*, *pstS*) согласно стандартному международному протоколу [14]. Анализ нуклеотидных последовательностей был выполнен с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance 11 (Invitrogen Corp., США). Определение аллельных профилей штаммов и соответствующих им сиквентипов проводили с использованием базы данных pubMLST/Efaecium [14]. Сиквентипы *E. faecium* объединяли в клональные комплексы с помощью алгоритма goeBURST и программы Philoviz [15].

Статистическая обработка результатов

Различия между характеристиками оценивали с помощью точного критерия Фишера [16] и считали статистически значимыми при степени вероятности безошибочного прогноза 95% ($p < 0,05$).

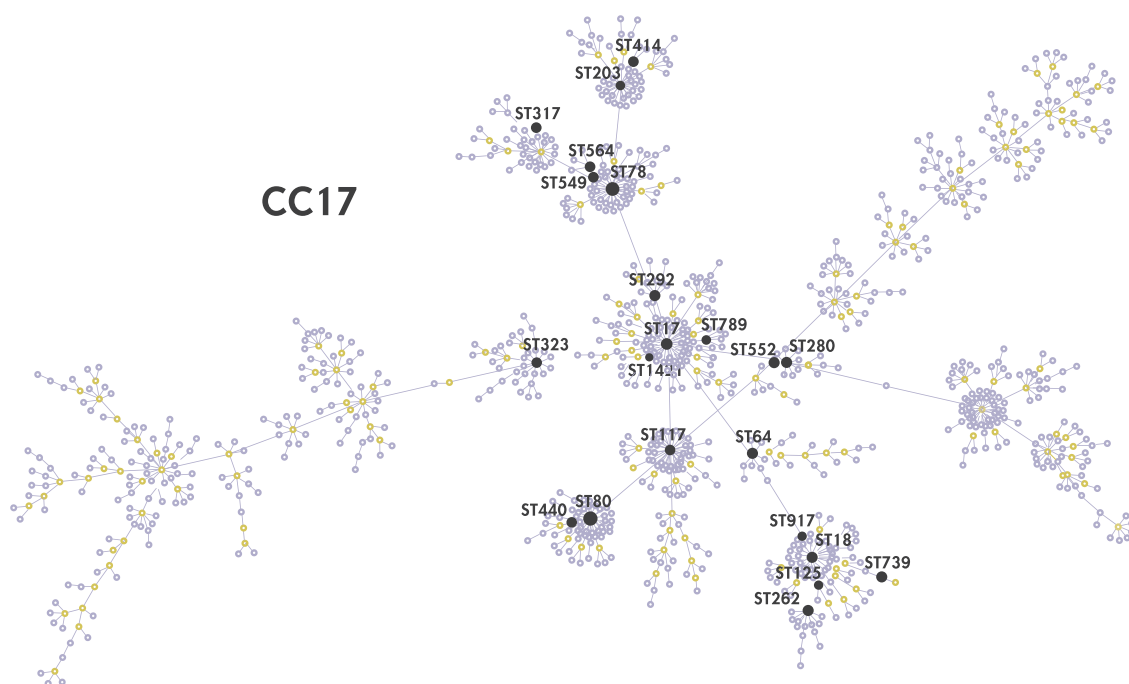


Рисунок 1. Популяционная структура клонального комплекса CC17

Круги обозначают сиквентипы; линии соединяют однопокусные варианты сиквентипов. На рисунке выделены сиквентипы, обнаруженные в исследовании.

Результаты

Всего было исследовано 83 штамма VR-*E. faecium*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови. Гены *vanA* были детектированы у 71,1% ($n = 59$) VR-*E. faecium*, гены *vanB* – у 28,9% ($n = 24$).

Было проведено МЛСТ всех VR-*E. faecium*, но только для 97,6% ($n = 81$) изолятов определялись все 7 исследуемых генов «домашнего хозяйства», а у 2 изолятов (2,4%) отсутствовал ген *pstS*. Подобные случаи регистрировались другими исследователями, и, согласно последнему протоколу МЛСТ *E. faecium* (2018 г.), было рекомендовано присваивать нулевой номер в аллельном профиле штамма при отсутствии гена *pstS* [14]. Аллельный профиль (*atpA*-1, *ddl*-1, *gdh*-1, *purK*-1, *gyd*-1, *pstS*-0, *adk*-1) этих двух изолятов соответствовал ST1421, который является однолокусным вариантом сиквенс-типа ST17. Таким образом, среди 83 VR-*E. faecium* было выявлено 22 сиквенс-типа, и все они принадлежали к клональному комплексу CC17 (Рисунок 1).

На Рисунке 2 представлено распределение сиквенс-типов. К трем сиквенс-типам – ST17 (19,3%), ST78 (18,1%) и ST80 (16,9%) – принадлежало 54,3% ($n = 45$) VR-*E. faecium*. Остальные сиквенс-типы включали от 1 до 4 изолятов VR-*E. faecium*. От 3 до 4 изолятов содержали 4 (18,2%) из 22 сиквенс-типов (ST317, ST202, ST262 и ST440), 2 изолята – 10 (45,5%) из 22 сиквенс-типов (ST18, ST64, ST117, ST280, ST323, ST549, ST552, ST789, ST917 и ST1421), 1 изолят – 5 (22,7%) из 22 сиквенс-типов (ST125, ST203, ST414, ST564 и ST739).

Были выявлены различия в клональном составе VR-*E. faecium* с генотипами *vanA* и *vanB* (Рисунок 3). Для изолятов обеих групп были определены 7 общих сиквенс-типов (ST17, ST64, ST78, ST202, ST280, ST317 и ST549). Изоляты VR-*E. faecium*, несущие гены *vanA*, характеризовались более выраженным разнообразием и были представлены 20 сиквенс-типами в сравнении с VR-*E. faecium vanB*, которые принадлежали к 9 сиквенс-типам. Для изолятов с генотипом резистентности *vanA* и *vanB* были определены различия среди доминирующих генов. Так, среди VR-*E. faecium vanA* по сравнению с VR-*E. faecium vanB* достоверно чаще определялась их принадлежность к ST78 (23,7% против 4,2% соответственно, $p = 0,0559$) и к ST80 (23,7% против 0% соответственно, $p = 0,0079$), в то время как при генотипе *vanB* было выявлено преобладание ST17 (50% против 6,8%, $p = 0,0001$). Доминирующим среди VR-*E. faecium vanB* был один сиквенс-тип – ST17, содержащий 50% изолятов, а среди VR-*E. faecium vanA* преобладали 2 сиквенс-типа – ST78 и ST80, каждый из них включал 23,7% ($n = 14$) изолятов.

Клональный состав популяции VR-*E. faecium* различался в течение двух периодов исследования (Рисунок 4). Несмотря на то что в первый период исследования (2003–2011 гг.) было выделено VR-*E. faecium* в 2 раза меньше ($n = 24$) по сравнению со вторым периодом (2012–2019 гг., $n = 59$), тем не менее принадлежность изолятов первого периода была определена к 12 (54,5%) из 22 сиквенс-типов, детектируемых за

весь анализируемый период. В оба периода исследования циркулировали 9 (40,9%) из 22 сиквенс-типов, в которые вошли как всемирно распространенные клоны «высокого риска» (ST17 и ST78), так и менее представленные в литературе клоны (ST202, ST262, ST280, ST323, ST440, ST549 и ST1421). Вторым периодом исследования (2012–2019 гг.) характеризовался появлением 10 (45,5%) сиквенс-типов, которые не были детектированы в 2003–2011 гг., включая ST80, ставший доминирующим в этот период (23,7%). Клоны «высокого риска» ST17 и ST78 оставались наиболее распространенными как в ранний, так и в более поздний анализируемый период (16% и 20,3%, 25% и 15,3% соответственно) и были определены в 4 из 6 лечебных учреждений, включенных в исследование.

Обсуждение

В последние годы наблюдается увеличение частоты инфекций, вызванных VR-*E. faecium*. Доля VR-*E. faecium*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови в рамках многоцентрового исследования в России, увеличилась с 2% (2003–2005 гг.) до 15% (2003–2016 гг.) [2, 17]. В мире наиболее распространенными генами резистентности к ванкомицину являются *vanA* и *vanB*, при этом в разных географических регионах отмечена вариабельность в преобладании этих генов. В Северной Америке, Европе, Иране и Китае при инфекции, вызванной ванкомицинорезистентными энтерококками, преобладали гены *vanA* (76–100%), в то время как в Австралии, Новой Зеландии, Сингапуре и Англии – гены *vanB* (58–98%) [18]. В России, как и в большинстве стран мира, также выявлено преобладание генов *vanA* над *vanB* среди VR-*E. faecium*. В текущем исследовании гены *vanA* были определены у большинства (71,1%) VR-*E. faecium*, как и в ранее проведенном нами исследовании (2004–2007 гг.) в двух гематологических стационарах Москвы, в котором *vanA* были детектированы у 100% VR-*E. faecium* [11]. Сопоставимые результаты были получены в работе Cho S. и соавт., направленной на изучение и сравнение VR-*E. faecium*, выделенных от больных с заболеваниями и без заболеваний системы крови. Все VR-*E. faecium*, выделенные от больных обеих групп, несли гены *vanA* [19]. Менее распространенные гены *vanB* были определены нами у 28,9% VR-*E. faecium*. Одной из стран, где в течение двух последних десятилетий было выявлено доминирование генов *vanB* среди VR-*E. faecium*, являлась Австралия. Однако в 2018 г. в этой стране доля *vanA*-положительных VR-*E. faecium* увеличилась до 52,9% [5]. В исследовании van Hal S. и соавт. [20] было высказано предположение, что появление VR-*E. faecium*, несущих гены *vanA*, и распространение их в Австралии могло быть связано с определенными клонами *E. faecium*. В некоторых странах у VR-*E. faecium* было выявлено одновременное носительство генов *vanA* и *vanB*. Так, в Ирландии, как и в большинстве стран мира, доминировали гены *vanA* (89%), но одновременно гены *vanA* и *vanB* несли 6% VR-*E. faecium* и только 4% – гены *vanB* [21].

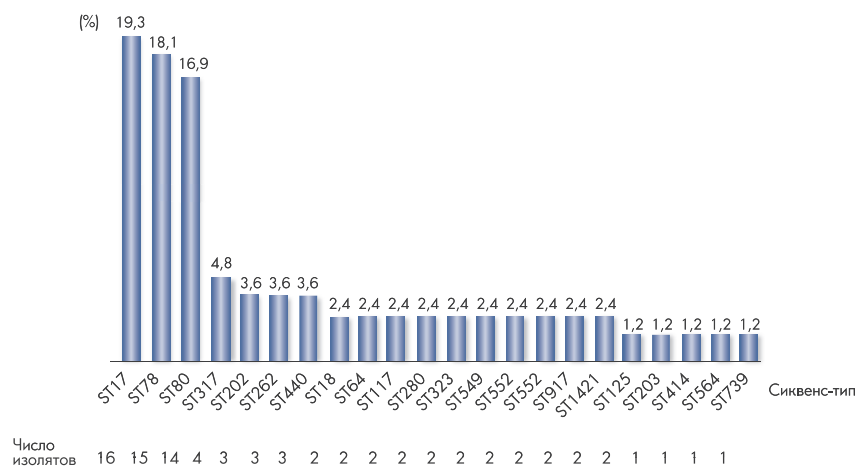


Рисунок 2. Распределение сиквенс-типов VR-E. faecium

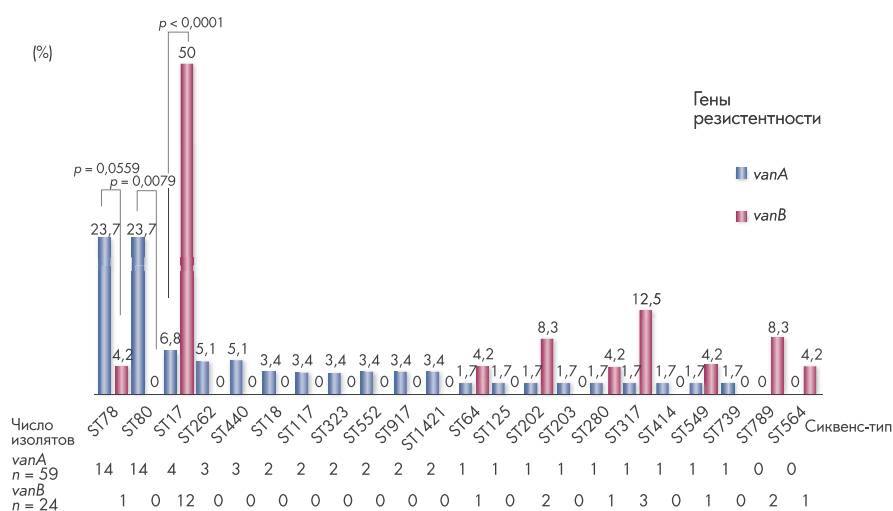


Рисунок 3. Распределение сиквенс-типов среди VR-E. faecium, несущих гены vanA и vanB

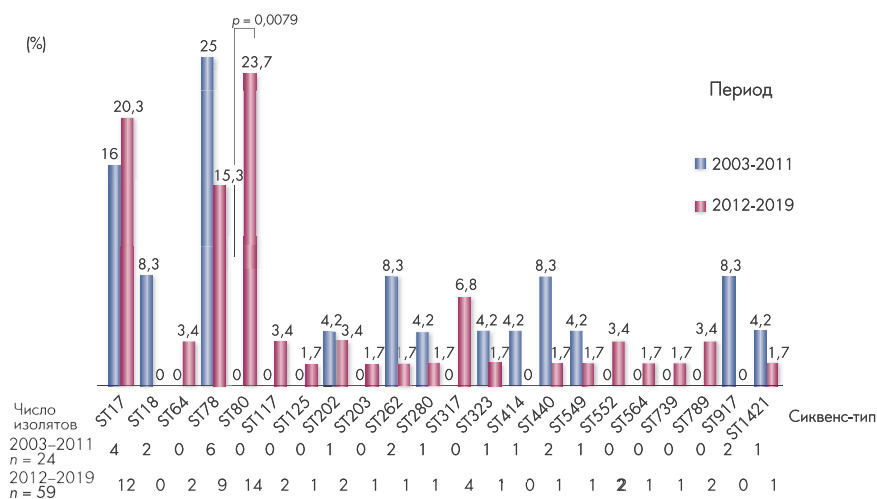


Рисунок 4. Распределение сиквенс-типов среди VR-E. faecium в разные периоды исследования

Впервые схема МЛСТ *E. faecium* была предложена в 2002 г. [22]. В 2005 г. было проведено крупное многоцентровое исследование по изучению *E. faecium* из 21 страны [23]. Всего было изучено 411 штаммов, выделенных от людей (как больных, так и здоровых) и от животных. По результатам исследования было сделано заключение, что подавляющее большинство нозокомиальных штаммов *E. faecium* принадлежало к одной генетической линии – CC17, ассоциированной с госпитальными вспышками инфекций. Текущее исследование не стало исключением, и все 83 штамма VR-*E. faecium* относились к клональному комплексу CC17, который представлен в настоящее время более 500 сиквенс-типами [14]. В нашем исследовании было определено 22 сиквенс-типа, среди которых преобладали ST17, ST78 и ST80, включавшие 54,3% VR-*E. faecium*. Сопоставимые данные были получены в работе канадских исследователей McCracken M. и соавт. [24], в которой было выявлено 17 сиквенс-типов среди 81 VR-*E. faecium*, выделенных из гемокультуры. Во всем мире исследователями было отмечено разнообразие клонального состава популяций нозокомиальных штаммов *E. faecium* и выявленных сиквенс-типов CC17. При инфекции кровотока, вызванной *E. faecium*, в Южной Корее в ходе изучения 120 штаммов был определен 21 сиквенс-тип, в Австралии – 59 сиквенс-типов среди 465 штаммов [5, 19]. Следует отметить, что при таком разнообразии существовало 5–6 доминирующих сиквенс-типов, включавших 74,4–80,8% *E. faecium* [5, 19]. Суммируя представленные данные, можно отметить, что чем больше было исследовано штаммов *E. faecium*, тем больше сиквенс-типов было верифицировано, но в большинстве исследований при видимом генетическом разнообразии *E. faecium* выявлялись несколько доминирующих сиквенс-типов.

По ряду публикаций, доминирующие сиквенс-типы чаще были представлены клонами «высокого риска», такими как ST16, ST17, ST18, ST78, ST117, ST192 и ST203 [5, 19, 21, 24–26]. В нашем исследовании 2 (ST17 и ST78) из 3 доминирующих сиквенс-типов также относились к клонам «высокого риска» и циркулировали в 4 из 6 исследуемых стационаров. Исследователями не было отмечено четкой корреляции детекции генов *vanA* или *vanB* с определенным сиквенс-типом. Тем не менее в проведенном нами исследовании ST17 VR-*E. faecium* достоверно чаще содержали гены *vanB* ($p < 0,0001$). В Австралии гены *vanB* были определены у всех VR-*E. faecium*, принадлежащих также к ST17 [5], а в Южной Корее, наоборот, все ST17 VR-*E. faecium* имели гены *vanA* [19]. Одним из доминирующих сиквенс-типов в данном исследовании являлся ST80, информация о котором представлена в публикациях более чем из 10 стран, хотя частота обнаружения его была меньше, чем ST17 и ST78, которые были выделены в большинстве стран Европы, Америки, Азии и Африки. ST80 преобладал в таких странах, как Германия, Дания, Нидерланды и Австралия [5, 27–29]. Все изученные нами ST80 VR-*E. faecium* содержали гены *vanA* аналогично исследованию из Дании (2012–2015 гг.) [28]. В то же время в ряде стран у

VR-*E. faecium*, принадлежащих к ST80, были детектированы гены *vanB*. Так, в работе из Германии доля ST80, содержащих *vanB*, составила 85,7% [27].

В текущем исследовании помимо клонов «высокого риска» были обнаружены относительно редко встречающиеся сиквенс-типы. Одним из них являлся ST414, который первоначально идентифицировали в Австралии в 2008 г. [33], позднее в странах Азии, включая Китай [34], Гонконг [35], Тайвань [36], и, вероятнее всего, ST414 является азиатским клоном, поскольку был детектирован только в Азиатско-Тихоокеанском регионе [37]. Однако в нашем исследовании ST414 VR-*E. faecium* были выявлены от больного, находившегося на лечении в гематологическом стационаре в европейской части России (г. Москва). VR-*E. faecium*, относящиеся к другому редкому сиквенс-типу ST917 (2,4%), были выделены нами из гемокультуры в 2007 г. и 2008 г., а до этого были изолированы от птиц, и первое сообщение из Словакии относится к 2013 г. [38]. Сиквенс-тип ST917 является однолокусным вариантом ST18, способным вызывать внутрибольничные вспышки инфекции, но до настоящего времени в литературе не были представлены случаи выделения ST917 VR-*E. faecium* от человека.

МЛСТ *E. faecium* основано на секвенировании внутренних фрагментов 7 генов «домашнего хозяйства», из которых 4 гена (*atp*, *gyd*, *pstS*, *ddl*) расположены в «горячих точках» рекомбинации [30]. Начиная с 2018 г., рекомендовано присваивать нулевой номер в случае отсутствия одного из вышеперечисленных генов для определения аллельного профиля штамма. В настоящее время в базе данных pubMLST/Efaecium [14] зарегистрировано 9 сиквенс-типов с отсутствующим геном *pstS* (ST1421, ST1422, ST1423, ST1424, ST1425, ST1477, ST1478, ST1633, ST1824) [14]. Первое сообщение о VR-*E. faecium* с делетированным геном *pstS* поступило из Австралии в 2015 г. [31]. В нашем исследовании таких штаммов было 2, и оба принадлежали к ST1421 (один из них был выделен в 2005 г., другой – в 2014 г.). При детальном изучении VR-*E. faecium*, выделенных в Южной Корее в разные периоды исследования (2006–2007 гг., 2012–2013 гг. и 2014–2015 гг.), было выявлено, что первые изоляты с делетированным геном *pstS* были определены в 2006 г. [32], при этом в первых двух анализируемых периодах доля таких VR-*E. faecium* составляла 11–15%, а в 2014–2015 гг. к ST1421 принадлежало подавляющее большинство штаммов (97,8%). Можно полагать, что появление и распространение *E. faecium* с делетированным геном *pstS* явилось результатом множественных событий рекомбинации в отдельных генетических линиях, приводящих к потере этого аллеля [20]. В исследовании Kim H. и соавт. [32] было высказано предположение, что делеция гена *pstS* могла происходить спорадически в различных клонах. Согласно данным Австралийской группы по контролю устойчивости к антимикробным препаратам, ST1421 также входил в число доминирующих сиквенс-типов в 2018 г. [5].

Состав популяции VR-*E. faecium*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, за анали-

зируемые годы претерпевал изменения. В исследуемой популяции *VR-E. faecium* только 40,9% сиквенс-типов были выявлены в течение всего периода исследования. К ним относились как клоны «высокого риска» (ST17, ST78), так и менее распространенные клоны (ST202, ST262, ST280, ST323, ST440, ST549 и ST1421). В течение всего периода исследования наиболее распространенными сиквенс-типами были ST17 (19,3%) и ST78 (18,1%). Изменения в составе популяции *VR-E. faecium*, выделенных при инфекциях кровотока, были отмечены и канадскими учеными. Наиболее распространенными сиквенс-типами среди *VR-E. faecium* в 1999–2005 гг. выступали ST17, ST80, ST16 и ST154, в то время как в 2006–2009 гг. – ST18, ST203, ST412 и ST584 [24]. В Дании в 2009–2013 гг. подавляющее большинство клинических штаммов *VR-E. faecium* (89,1%) относились к клонам «высокого риска» ST18 (32,4%), ST117 (33,3%) и ST192 (23,4%) [39], а в 2015 г. доминирующими стали ST203 (51,1%) и ST80 (33,4%) [26]. Указанные исследования свидетельствуют о постоянном изменении популяционного состава *VR-E. faecium* как по причине распространения клонов «высокого риска», так и из-за появления новых клонов.

Заключение

Все исследуемые штаммы *VR-E. faecium* принадлежали к эпидемическому клональному комплексу CC17, распространенному в мире, и были представлены как клонами «высокого риска», так и менее распространенными сиквенс-типами. Всего было выявлено 22 сиквенс-типа. Доминирующими являлись 3 сиквенс-типа: ST17, ST78 и ST80, к ним принадлежало 54,3% *VR-E. faecium*. Штаммы *VR-E. faecium*, несущие гены *vanA*, достоверно чаще, чем *VR-E. faecium vanB*, принадлежали к ST78 и к ST80 и реже – к ST17.

В ходе исследования клональный состав *VR-E. faecium* претерпел изменения, но клоны «высокого риска», такие как ST17 и ST78, оставались наиболее распространенными в течение всего периода исследования, и их можно рассматривать как эндемичные для России.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (тема №АААА-А21-121011290078-8).

Литература

1. Klyasova G.A., Okhmat V.A. Antimicrobial therapy. In: Savchenko V.G., ed. Algorithms of diagnosing and protocols of treatment of blood system diseases. Moscow: Praktika; 2018. P. 1069-1113. Russian. (Клясова Г.А., Охмат В.А. Антимикробная терапия. Под редакцией Савченко В.Г. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Москва: Практика; 2018. С. 1067-1113.)
2. Klyasova G.A., Fedorova A.V., Frolova I.N., Khrulnova S.A., Vetokhina A.V., Kaporskaya T.S., et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterococcus* spp. isolated from blood culture in patients with hematological malignancies. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2018;20(2):142-149. Russian. (Клясова Г.А., Фёдорова А.В., Фролова И.Н., Хрульнова С.А., Ветохина А.В., Капорская Т.С. и соавт. Антибиотикорезистентность госпитальных штаммов *Enterococcus* spp., выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови: результаты многоцентрового исследования. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018; 20(2):142-149). DOI: 10.36488/cmasc.2018.2.142-149
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019. Available at: www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018. Accessed March, 2021.
4. Weiner-Lastinger L., Abner S., Edwards J., Kallen A., Karlsson M., Magill S., et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020;41(1):1-18. DOI: 10.1017/ice.2019.296
5. Coombs G.W., Daley D.A., Mowlaboccus S., Lee Y.T., Pang S., and Australian Group on Antimicrobial Resistance. Australian Group on Antimicrobial Resistance (AGAR) Australian Enterococcal Sepsis Outcome Programme (AESOP) Annual Report 2018. *Commun Dis Intell*. 2020;44. DOI: 10.33321/cdi.2020.44.19
6. Weber S., Hogardt M., Reinheimer C., Wichelhaus T.A., Kempf V.A.J., Kessel J., et al. Bloodstream infections with vancomycin-resistant enterococci are associated with a decreased survival in patients with hematological diseases. *Ann Hematol*. 2019;98(3):763-773. DOI:10.1007/s00277-019-03607-z
7. Cattoir V., Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(4):731-742. DOI: 10.1093/jac/dks469
8. Mironova A., Cherkashin E., Klyasova G., Tishkov V., Brilliantova A., Rezvan S., Sidorenko S. First detection of vancomycin-resistant enterococci in Russia: genetic background. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(S4):131;P1819.
9. Liubimova A.V., Shalyapina N.A., Kolodzhieva V.V., Riachovskich S.A., Dmitrieva O.V., Brodina T.V., et al. Epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococci* in various medical wards. *Jepidemiologija i vakcinoprofilaktika*. 2016;15(4):48-52. Russian. (Любимова А.В., Шалая-

- пина Н.А., Колоджиева В.В., Ряховских С.А., Дмитриева О.В., Бродина Т.В. и соавт. Эпидемиология ванкомицин-резистентных энтерококков в отделениях различного профиля. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016;15(4):48-52. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-4-48-52
10. Willems R.J.L., Hanage W.P., Bessen D.E., Feil E.J. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2011;35(5):872-900. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00284.x
11. Brilliantova A.N., Kliasova G.A., Mironova A.V., Tishkov V.I., Novichkova G.A., Bobryna V.O., et al. Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in two haematological centres in Russia. Int J Antimicrob Agents. 2010;35(2):177-181. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.10.006
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Informational Supplement. CLSI document M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
13. 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. DOI: 10.1128/JCM.33.1.24-27.1995
14. Multilocus sequence typing: *Enterococcus faecium* [database online]. Available at: <https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecium>. Accessed March 31, 2021.
15. Francisco A.P., Bugalho M., Ramirez M., Carriço J.A. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. BMC Bioinformatics. 2009;10:152. DOI: 10.1186/1471-2105-10-152
16. GraphPad. Available at: www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/. Accessed March 31, 2021.
17. Kliasova G.A., Speranskaya L.L., Mironova A.V., Maschan A.A., Baidilina D.D., Vereschagina S.A., et al. The pathogens causing sepsis in immunocompromised patients: structure and problems of antibiotic resistance. Results of a multi-center cooperative study. Gematologija i transfuziologija. 2007;52(1):13-18. Russian. (Клясова Г.А., Сперанская Л.Л., Миронова А.В., Масчан М.А., Байдилядина Д.Д., Верещагина С.А., и соавт. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования). Гематология и трансфузиология. 2007;52(1):13-18.)
18. Lee T., Pang S., Abraham S., Coombs G.W. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: the past, the present and the future. J Glob Antimicrob Resist. 2019;16:36-47. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.08.016
19. Cho S.Y., Park Y.J., Cho H., Park D.J., Yu J.K., Oak H.C., et al. Comparison of *Enterococcus faecium* bacteremic isolates from hematologic and non-hematologic patients: differences in antimicrobial resistance and molecular characteristics. Ann Lab Med. 2018;38(3):226-234. DOI: 10.3343/alm.2018.38.3.226
20. van Hal S.J., Beukers A.G., Timms V.J., Ellem J.A., Taylor P., Maley M.W., et al. Relentless spread and adaptation of non-typeable *vanA* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a genome-wide investigation. J Antimicrob Chemother. 2018;73(6):1487-1491. DOI: 10.1093/jac/dky074
21. Ryan L., O'Mahony E., Wrenn C., FitzGerald S., Fox U., Boyle B., et al. Epidemiology and molecular typing of VRE bloodstream isolates in an Irish tertiary care hospital. J Antimicrob Chemother. 2015;70(10):2718-2724. DOI: 10.1093/jac/dkv185
22. Homan W.L., Tribe D., Poznanski S., Li M., Hogg G., Spalburg E., et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2002;40(6):1963-1971. DOI: 10.1128/JCM.40.6.1963-1971.2002
23. Willems R.J., Top J., van Santen M., Robinson D.A., Coque T.M., Baquero F., et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg Infect Dis. 2005;11(6):821-828. DOI: 10.3201/1106.041204
24. McCracken M., Wong A., Mitchell R., Gravel D., Conly J., Embil J., et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1999-2009. J Antimicrob Chemother. 2013;68(7):1505-1509. DOI: 10.1093/jac/dkt054
25. Freitas A.R., Tedim A.P., Francia M.V., Jensen L.B., Novais C., Peixe L., et al. Multilevel population genetic analysis of *vanA* and *vanB* *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). J Antimicrob Chemother. 2016;71(12):3351-3366. DOI: 10.1093/jac/dkw312
26. Hammerum A.M., Baig S., Kamel Y., Roer L., Pinholt M., Gumpert H., et al. Emergence of *vanA* *Enterococcus faecium* in Denmark, 2005-15. J Antimicrob Chemother. 2017;72(8):2184-2190. DOI: 10.1093/jac/dkx138
27. Eisenberger D., Tuschak C., Werner M., Bogdan C., Bollinger T., Hossain H., et al. Whole-genome analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks suggests the occurrence of few endemic clonal lineages in Bavaria, Germany. J Antimicrob Chemother. 2020;75(6):1398-1404. DOI: 10.1093/jac/dkaa041
28. Pinholt M., Bayliss S.C., Gumpert H., Worning P., Jensen V.V.S., Pedersen M., et al. WGS of 1058 *Enterococcus faecium* from Copenhagen, Denmark, reveals rapid clonal expansion of vancomycin-resistant clone ST80 combined with widespread dissemination of a *vanA*-containing plasmid and acquisition of a heterogeneous accessory genome. J Antimicrob Chemother. 2019;74(7):1776-1785. DOI: 10.1093/jac/dkz118
29. Zhou X., Chlebowicz M.A., Bathoorn E., Rosema S., Couto N., Lokate M., et al. Elucidating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks: the role of clonal spread and movement of mobile genetic elements. J Antimicrob

- Chemother. 2018;73(12):3259-3267. DOI: 10.1093/jac/dky349
30. Raven K.E., Reuter S., Reynolds R., Brodrick H.J., Russell J.E., Torok M.E., et al. A decade of genomic history for healthcare-associated *Enterococcus faecium* in the United Kingdom and Ireland. *Genome Res.* 2016;26(10):1388-1396. DOI: 10.1101/gr.204024.116
 31. Carter G.P., Buultjens A.H., Ballard S.A., Baines S.L., Tomita T., Strachan J., et al. Emergence of endemic MLST non-typeable vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:3367-3371. DOI: 10.1093/jac/dkw314
 32. Kim H.M., Chung D.R., Cho S.Y., Huh K., Kang C.I., Peck K.R. Emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST1421 lacking the *pstS* gene in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(7):1349-1356. DOI: 10.1007/s10096-020-03853-4
 33. Rathnayake I.U., Hargreaves M., Huygens F. Genotyping of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates by use of a set of eight single nucleotide polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 2011;49:367-372. DOI: 10.1128/JCM.01120-10
 34. Liu Y., Cao B., Gu L., Wang H. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci in a Chinese hospital between 2003 and 2009. *Microb Drug Resist.* 2011;17(3):449-455. DOI: 10.1089/mdr.2011.0025
 35. Cheng V.C., Tai J.W., Ng M.L., Chan J.F., Wong S.C., Li I.W., et al. Extensive contact tracing and screening to control the spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST414 in Hong Kong. *Chin Med J (Engl).* 2012;125(19):3450-3457. PMID: 23044305
 36. Lu C.L., Chuang Y.C., Chang H.C., Chen Y.C., Wang J.T., Chang S.C. Microbiological and clinical characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteraemia in Taiwan: implication of sequence type for prognosis. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(9):2243-2249. DOI: 10.1093/jac/dks181
 37. Kuo A.J., Su L.H., Shu J.C., Wang J.T., Wang J.H., Fung C.P., et al. National surveillance on vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Taiwan: emergence and widespread of ST414 and a Tn1546-like element with simultaneous insertion of IS1251-like and IS1678. *PLoS One.* 2014;9(12):e115555. DOI: 10.1371/journal.pone.0115555
 38. Oravcova V., Hadelova D., Literak I. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with *vanA* gene isolated for the first time from wildlife in Slovakia. *Vet Microbiol.* 2016; 194:43-47. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.11.027
 39. Landerslev K.G., Jakobsen L., Olsen S.S., Pedersen M.B., Kristensen B., Lemming L.E., et al. Polyclonal spread of *vanA* *Enterococcus faecium* in Central Denmark Region, 2009-2013, investigated using PFGE, MLST and WGS. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48:767-768. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.001