

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.iaacmac.ru](http://www.iaacmac.ru)

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

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

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

Электронная почта:  
[info@cmac-journal.ru](mailto:info@cmac-journal.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

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России)

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2024.

## Содержание

### Болезни и возбудители

- 4 Фёдорова А.В., Хрульнова С.А., Ветохина А.В., Молчанова И.В., Куцевалова О.Ю., Клясова Г.А.  
 Гены вирулентности у *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*, выделенных из гемокультуры больных с гематологическими заболеваниями
- 14 Умпелева Т.В., Скорняков С.Н., Вахрушева Д.В.  
 Биопленки при микобактериальной инфекции
- 21 Исаева Г.Ш., Чумарев Н.С.  
 Микробиота верхних дыхательных путей при COVID-19

### Антимикробные препараты

- 31 Карпова Е.В., Колчанова Н.Э., Петровская Т.А., Тапальский Д.В.  
 Микробиологическая активность тиамфеникола и тиамфеникола глицината ацетилцистеината в отношении клинически значимых микроорганизмов и образуемых ими биопленок
- 40 Андреева И.В., Стецюк О.У., Козлов Р.С.  
 Цефтаролина фосамил – цефалоспорины V поколения с анти-MRSA активностью в лечении тяжелых инфекций в педиатрической практике

### Антибиотикорезистентность

- 59 Чеботарь И.В., Кулешов К.В.  
 Между антибиотикорезистентностью и вирулентностью: диалектика бактериального фитнеса
- 67 Эйдельштейн М.В., Шайдуллина Э.Р., Иванчик Н.В., Дехнич А.В., Микотина А.В., Склеенова Е.Ю., Сухорукова М.В., Азизов И.С., Шек Е.А., Романов А.В., Трушин И.С., Кузьменков А.Ю., Козлов Р.С.  
 Антибиотикорезистентность клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования
- 79 Вербенко Д.А., Солонько В.С., Дерябин Д.Г., Левичева Ю.Ю., Карамова А.Э., Кубанов А.А.  
 Определение генетических детерминант устойчивости штаммов *Mycobacterium leprae* к антимикробным препаратам методом минисеквенирования

### Опыт работы

- 87 Бонцевич Р.А., Тихойванова А.А., Анненков Н.В., Батищева Г.А., Невзорова В.А., Мартыненко И.М., Биккинина Г.М., Кетова Г.Г., Богданова В.О., Лучинина Е.В.  
 Определение выбора режима антибактериальной терапии старших курсов медицинских вузов по антимикробной терапии (итоги проекта KANT-IV)
- 98 Лихачев И.В., Кафтырева Л.А., Самойлова А.А., Краева Л.А., Михайлов Н.В.  
 Разработка E-тестов для выявления потенцирующего эффекта антимикробных соединений в отношении полирезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*

### Описание клинических случаев

- 104 Рачина С.А., Федина Л.В., Алхлавов А.А., Гасанова Д.Р., Зайналабидова Х.Г., Коваль А.А., Бурмистрова Е.Н., Савочкина Ю.А., Сычев И.Н., Кулешов В.Г., Ларин Е.С.  
 Сложности выбора режима антибактериальной терапии нозокомиальной пневмонии в ОРИТ: клинические наблюдения
- 113 Довгань Е.В., Андреев В.А., Боровой В.Н., Кузьмина Е.В., Андреева И.В., Коваленко Т.Н., Овчинников Т.Г., Козырев О.А.  
 Риноцеребральный мукормикоз у пациентов с COVID-19: описание случаев и лечение в условиях областного стационара

## Гены вирулентности у *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*, выделенных из гемокультуры больных с гематологическими заболеваниями

Фёдорова А.В.<sup>1</sup>, Хрульнова С.А.<sup>1</sup>, Ветохина А.В.<sup>2</sup>, Молчанова И.В.<sup>3</sup>, Куцевалова О.Ю.<sup>4</sup>, Клясова Г.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница», Иркутск, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск, Россия

<sup>4</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Контактный адрес:

Анастасия Владимировна

Фёдорова

Эл. почта: mirnas19@yandex.ru

Ключевые слова: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, гены вирулентности, гемокультура, гематологические заболевания.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

**Цель.** Изучить гены вирулентности у *E. faecium* и *E. faecalis*, выделенных из гемокультуры больных с гематологическими заболеваниями.

**Материалы и методы.** Гены вирулентности исследовали среди штаммов *E. faecium* и *E. faecalis*, выделенных из гемокультуры от больных с гематологическими заболеваниями в четырех лечебных учреждениях России (2002–2020 гг.). Чувствительность к ванкомицину определяли методом серийных микроразведений в бульоне (CLSI, 2022). Гены резистентности к ванкомицину (*vanA*, *vanB* и *vanD*) и гены вирулентности – энтерококковый поверхностный протеин (*esp*), субстанция агрегации (*asa1*), гиалуронидаза (*hyl*), желатиназа (*gelE*) и цитолизин (*cylA*) детектировали с помощью мультиплексной ПЦР.

**Результаты.** Всего был исследован 551 *Enterococcus* spp., из них 440 (79,9%) *E. faecium* и 111 (20,1%) *E. faecalis*. Резистентными к ванкомицину были 86 (19,5%) *E. faecium* (VR-*E. faecium*), из них 62 (72,1%) штамма имели *vanA* генотип и 24 (27,9%) – *vanB*. Один (1,1%) *E. faecalis* был умеренно-резистентным к ванкомицину (*vanD*). Гены вирулентности были детектированы у 86,2% *Enterococcus* spp., достоверно чаще среди *E. faecalis* (95,5%) по сравнению с *E. faecium* (83,9%,  $p = 0,003$ ). Среди *E. faecium* преобладали ген *esp* (70,2%) и ген *hyl* (52,1%), другие гены составили от 1,1% до 4,5%. У *E. faecalis* доминировали другие гены, такие как ген *gelE* (66,7%), *asa1* (65,8%) и ген *cylA* (36,9%). Статистически значимые отличия были определены по всем исследуемым генам вирулентности среди *E. faecium* и *E. faecalis* ( $p < 0,0001$ ). Среди *E. faecalis* в сравнении с *E. faecium* достоверно чаще определяли сочетание трех и более исследованных генов вирулентности (45% против 2,5%,  $p < 0,0001$ ), тогда как наличие одного гена или их отсутствие преобладало среди *E. faecium* (40,2% против 17,1%,  $p < 0,0001$ ; 16,1% против 4,5%,  $p = 0,003$ , соответственно). При сравнении двух периодов исследования (2002–2010 гг. и 2011–2020 гг.) у *E. faecalis* было отмечено значимое увеличение доли штаммов, имевших сочетание трех и более генов вирулентности с 33,3% до 55% ( $p = 0,03$ ), среди *E. faecium* – с одним геном вирулентности (с 31,7% до 46,3%,  $p = 0,002$ ) и их отсутствием (с 6,6% до 23%,  $p < 0,0001$ ).

**Выводы.** Штаммы *E. faecium* и *E. faecalis* отличаются по частоте детекции генов вирулентности и их спектру. Гены вирулентности достоверно чаще определяются у *E. faecalis* с преобладанием среди них сочетаний из трех и более генов.

Original Article

## Virulence genes in *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis* isolated from blood culture in haematological patients

Fedorova A.V.<sup>1</sup>, Khrulnova S.A.<sup>1</sup>, Vetokhina A.V.<sup>2</sup>, Molchanova I.V.<sup>3</sup>, Kutsevalova O.Yu.<sup>4</sup>, Klyasova G.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Irkutsk Regional Clinical Hospital, Irkutsk, Russia

<sup>3</sup> Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia

<sup>4</sup> National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Contacts:

Anastasia V. Fedorova

E-mail: mirnas19@yandex.ru

Key words: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, virulence

**Objective.** To study virulence genes in *E. faecium* and *E. faecalis* isolated from the blood cultures of patients with hematological diseases.

**Materials and methods.** Virulence genes were studied in *E. faecium* and *E. faecalis* strains isolated from blood culture from hematological patients in four Russian hospitals (2002–2020). Susceptibility to vancomycin was determined by broth microdilution method (CLSI, 2022). Virulence genes (*esp*, *hyl*, *asa1*,

factors, blood culture, hematologic disease.

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

External funding source: no external funding received.

*cylA* и *gelE*) in *E. faecium* and *E. faecalis* as well as vancomycin resistance genes (*vanA*, *vanB* and *vanD*) in *Enterococcus* spp. were detected by multiplex PCR.

**Results.** A total of 551 *Enterococcus* spp. strains were studied, of them 440 (79.9%) were *E. faecium* and 111 (20.1%) *E. faecalis*. Resistance to vancomycin was detected in 86 (19.5%) *E. faecium*, of them 62 (72.1%) carried *vanA* and 24 (27.9%) *vanB* genes. One (1.1%) of 111 *E. faecalis* was vancomycin-intermediate (MIC 16 µg/ml) with *vanD* gene. Virulence genes were detected in 86.2% of *Enterococcus* spp., significantly more often among *E. faecalis* (95.5%) compared to *E. faecium* (83.9%,  $p = 0.003$ ). The predominant genes in *E. faecium* were *esp* (70.2%) and *hyl* (52.1%), the detection of the *asa1*, *cylA* and *gelE* genes was minimal. Other genes dominated in *E. faecalis*: *gelE* (66.7%), *asa1* (65.8%), *cylA* (36.9%). Statistically significant differences between *E. faecium* and *E. faecalis* were determined for all studied virulence genes ( $p < 0.0001$ ). A combination of three or more virulence genes was detected significantly more often among *E. faecalis* in comparison with *E. faecium* (45% vs. 2.5%,  $p < 0.0001$ ), whereas the presence of one gene or their absence prevailed in *E. faecium* (40.2% vs. 17.1%,  $p < 0.0001$ ; 16.1% vs. 4.5%,  $p = 0.003$ , respectively). When comparing the two study periods (2002–2010 and 2011–2020), *E. faecalis* showed a significant increase in the proportion of strains with a combination of three or more virulence genes from 33.3% to 55% ( $p = 0.03$ ), in *E. faecium* – with one virulence gene (from 31.7% to 46.3%,  $p = 0.002$ ) and no genes (from 6.6% to 23%,  $p < 0.0001$ ).

**Conclusions.** Differences in the frequency of detection of virulence genes and their spectrum have been identified between *E. faecium* and *E. faecalis* strains. Virulence genes are significantly more often detected in *E. faecalis* with a predominance of combinations of three or more genes.

## Введение

Энтерококки входят в число ведущих возбудителей инфекций кровотока у больных с гематологическими заболеваниями [1, 2]. В этиологической структуре инфекций кровотока в гематологии преобладают *E. faecium* (78,2%) над *E. faecalis* (19,7%) [3]. К факторам, оказывающим влияние на результаты лечения и течение энтерококковых инфекций, относят не только резистентность возбудителей к противомикробным препаратам, но и наличие у них различных факторов вирулентности. В качестве потенциальных факторов вирулентности у *Enterococcus* spp. выделяют факторы агрегации, которые усиливают процессы генетического обмена у этих микроорганизмов; внеклеточные металлопептидазы, способные гидролизовать различные белки (коллаген, гемоглобин и другие); цитолизин, разрушающие про- и эукариотические клетки, а также факторы, обеспечивающие секрецию цитолизина [4]. Наиболее изученными среди факторов агрегации являются энтерококковый поверхностный протеин и субстанция агрегации, среди внеклеточных металлопептидаз – гиалуронидаза и желатиназа, а также цитолизин.

Энтерококковый поверхностный протеин, кодируемый геном *esp*, стимулирует адгезию бактериальных клеток друг к другу, к клеткам хозяина, а также к органическим и неорганическим поверхностям, что может приводить к развитию катетер-ассоциированных инфекций. Другой адгезин, субстанция агрегации, кодируется геном *asa1*, также как и энтерококковый поверхностный протеин, обеспечивает контакт между бактериальными клетками и адгезию *Enterococcus* spp. к различным клеткам макроорганизма. Также этот фактор вирулентности стимулирует выработку Т-лимфоцитов и воспалительных цитокинов, индуцирует повреждение тканей. Субстанция агрегации способствует переносу плазмид, содержащих детерминанты резистентности к антибиоти-

кам, а также другого фактора вирулентности – цитолизина. Цитолизин запускает воспалительные процессы, разрушая эритроциты, макрофаги и полиморфноядерные лейкоциты. Помимо разрушения клеток хозяина, цитолизин также является бактериоцином и проявляет антимикробное действие против других грамположительных бактерий. Ген *cylA*, кодирующий цитолизин, может находиться как на плазмиде, так и в хромосоме. Желатиназа, кодируемая геном *gelE*, является внеклеточной цинксодержащей металлопротеиназой, гидролизует широкий спектр субстратов, таких как желатин, инсулин, казеин, гемоглобин, фибриноген и коллаген. Экзофермент оказывает цитотоксическое действие, подавляет активность фагоцитов и активирует аутолиз тканей, а также участвует в образовании биопленок. Другой экзофермент – гиалуронидаза, расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав соединительных тканей, на более простые субстраты, которые транспортируются и метаболизируются в бактериальной клетке, обеспечивая ее питательными веществами. Этот экзофермент, кодируемый геном *hyl*, повышает инвазивную способность *Enterococcus* spp. и способствует проникновению их в ткани макроорганизма. У более вирулентных штаммов *Enterococcus* spp. гены, кодирующие различные факторы вирулентности, способны объединяться в кластеры и формировать островки патогенности (pathogenicity island, PAI), которые могут передаваться менее вирулентным энтерококкам. Распределение генов вирулентности среди разных видов *Enterococcus* spp. может отличаться [5].

**Целью** нашего исследования было изучение наиболее распространенных генов вирулентности, таких как *esp*, *hyl*, *asa1*, *cylA* и *gelE* у *E. faecium* и *E. faecalis*, выделенных из гемокультуры от больных гематологическими заболеваниями.

## Материалы и методы

### Источники бактериальных изолятов

В исследование были включены клинические штаммы *E. faecium* и *E. faecalis*, выделенные из гемокультуры от больных гематологическими заболеваниями с симптомами инфекции, находившихся на лечении в гематологических отделениях 4 лечебных учреждений России в период с 2002 г. по 2020 г. В исследование включали первый штамм, выделенный из гемокультуры. Все включенные в исследование штаммы были доставлены в отдел микробиологии и антимикробной терапии ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра гематологии» Минздрава России (НМИЦ гематологии), где проводилась окончательная их идентификация, определение чувствительности к антимикробным препаратам, детекция генотипов резистентности к ванкомицину и генов вирулентности.

### Видовая идентификация и хранение изолятов

Идентификацию штаммов до вида в НМИЦ гематологии проводили методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) 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. До момента тестирования изоляты хранили в триптиказо-соевом бульоне (Oxoid, Великобритания) с добавлением 30% глицерина (Sigma-Aldrich, США) при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Определение чувствительности к ванкомицину

Определение чувствительности *Enterococcus* spp. к ванкомицину проводили методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон (Oxoid, Великобритания) с использованием 96-луночных планшетов в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов США (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) [6]. Интерпретацию результатов определения чувствительности *Enterococcus* spp. выполняли на основании пограничных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) в соответствии с критериями CLSI, 2022 г. Чувствительными к ванкомицину считали изоляты *Enterococcus* spp., имевшими значения МПК  $< 4$  мкг/мл, умеренно-резистентными – МПК 8–16 мкг/мл и резистентными – МПК  $\geq 32$  мкг/мл. Для внутреннего контроля качества определения чувствительности использовали референтные штаммы *E. faecalis* ATCC®29212 и *E. faecalis* ATCC®51299. Статистическую обработку и анализ данных проводили с помощью программы WHONET версия 5.6.

### Выделение ДНК

Для выделения ДНК штаммы *Enterococcus* spp. культивировали на колумбийском агаре с добавлением 5% ба-

раньей крови (bioMerieux, Франция) при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 20–24 ч. Суточную культуру *Enterococcus* spp. суспендировали в 0,5 мл воды высокой степени очистки (система Milli-Q, Merck Millipore, США) в пробирках вместимостью 1,5 мл типа Eppendorf, затем инкубировали в течение 5 мин. при  $95^{\circ}\text{C}$ , далее центрифугировали 1 мин. при 12000 об/мин. Полученный супернатант использовали в качестве исследуемого образца ДНК при постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР). Пробы ДНК хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Детекция генотипов резистентности к гликопептидам и генов вирулентности *Enterococcus* spp.

Детекцию генов *vanA*, *vanB* и *vanD* у ванкомицино-резистентных *Enterococcus* spp. проводили с помощью мультиплексной ПЦР, используя праймеры, предложенные Dutka-Malen S. и соавт. [7]. В качестве положительных контролей применяли штаммы *E. faecium* VM4147 (*vanA*) и *E. faecalis* ATCC®51299 (*vanB*). В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК маркер GeneRuler™, 100 п.н. (Thermo Fisher Scientific, США). Гены вирулентности *esp*, *hyl*, *asa1*, *cylA* и *gelE* у *E. faecium* и *E. faecalis* детектировали с помощью мультиплексной ПЦР [8, 9].

### Статистическая обработка результатов

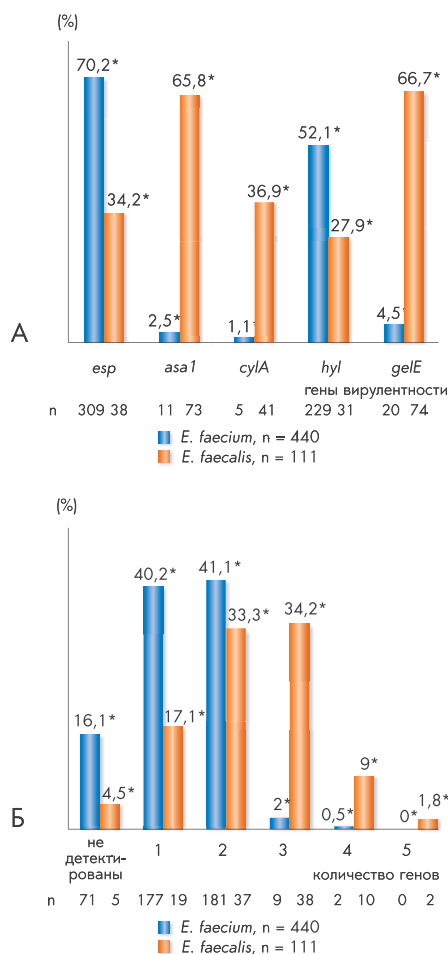
Различия между характеристиками оценивали с помощью двустороннего точного критерия Фишера (программа Statistica) и считали статистически значимыми при степени вероятности безошибочного прогноза 95% ( $p < 0,05$ ).

## Результаты

Гены вирулентности были определены у 86,2% *Enterococcus* spp. и достоверно чаще были среди *E. faecalis* (95,5%) по сравнению с *E. faecium* (83,9%,  $p = 0,003$ ), Таблица 1. Среди *Enterococcus* spp. преобладали гены *esp* (63%) и *hyl* (47,2%), реже – *gelE* (17,1%), *asa1* (15,3%) и *cylA* (8,4%). При сравнении *E. faecium* и *E. faecalis* статистически значимые отличия были определены в частоте встречаемости всех исследуемых генов вирулентности ( $p < 0,001$ ), Рисунок 1А. Гены *esp* и *hyl* достоверно чаще были определены среди *E. faecium* в сравнении с *E. faecalis* (70,2% против 34,2%,  $p < 0,0001$ ; 52,1% против 27,9%,  $p < 0,0001$  соответственно), а гены *asa1*, *cylA* и *gelE* преобладали у *E. faecalis* (65,8% против 2,5%,  $p < 0,0001$ ; 36,9% против 1,1%,  $p < 0,0001$  и 66,7% против 4,5%,  $p < 0,0001$  соответственно).

Гены вирулентности преобладали в сочетаниях (50,6%) у всех исследуемых *Enterococcus* spp. за счет высокой частоты их выявления у *E. faecalis* (78,4%), Таблица 1.

Доля штаммов, имеющих один ген вирулентности среди *Enterococcus* spp., составила 35,6% и определялась статистически значимо чаще среди *E. faecium* (40,2%) в сравнении с *E. faecalis* (17,1%,  $p < 0,0001$ ),



**Рисунок 1.** Распределение генов вирулентности среди *E. faecium* и *E. faecalis*

А) Распределение всех исследованных генов вирулентности. \* $p < 0,0001$   
 Б) Детекция генов изолированно и в сочетаниях. \* $p < 0,05$

Рисунок 1Б. В сочетаниях преобладала детекция двух генов у всех штаммов *Enterococcus* spp. (39,6%), которая была несколько выше среди *E. faecium* (41,1%) в сравнении с *E. faecalis* (33,3%). Сочетание генов *esp + hyl* было наиболее распространенным у *Enterococcus* spp. (30,9%) по причине высокой частоты обнаружения их у *E. faecium* (38,6%), Таблица 1. Вторая позиция по частоте детекции двух генов вирулентности у *Enterococcus* spp. была представлена сочетанием генов *asa1 + gelE* (3,4%), которое достоверно чаще определяли у *E. faecalis* (16,2%) по сравнению с *E. faecium* (0,2%,  $p < 0,0001$ ). Другие сочетания двух генов вирулентности среди *E. faecalis* и *E. faecium* были представлены у единичных штаммов.

Доля штаммов с тремя генами вирулентности у *Enterococcus* spp. составила 8,5% и достоверно чаще была среди *E. faecalis* (34,2%) в сравнении с *E. faecium* (2%,  $p < 0,0001$ ). Наиболее распространенным сочетанием трех генов вирулентности у *E. faecalis* было определение генов *esp + asa1 + gelE* (8,1%) и генов *asa1 +*

*cylA + gelE* (9%). Среди *E. faecium* сочетание трех генов вирулентности было представлено у всего у трех штаммов. У штамма *E. faecalis*, проявлявшего умеренную резистентность к ванкомицину (МПК 16 мкг/мл) и имевшего генотип *vanD*, было детектировано сочетание генов *asa1 + gelE + hyl*.

Сочетания четырех и более генов вирулентности было выявлено у 2,6% *Enterococcus* spp., из них достоверно чаще у *E. faecalis* (9%) в сравнении с *E. faecium*

**Таблица 1.** Гены вирулентности у *Enterococcus* spp.

Гены вирулентности	<i>Enterococcus</i> spp. Всего 551 n (%)	<i>Enterococcus</i> spp.		p
		<i>E. faecium</i> , Всего 440 n (%)	<i>E. faecalis</i> , Всего 111 n (%)	
Обнаружены	475 (86,2)	369 (83,9)	106 (95,5)	0,003
Один ген	196 (35,6)	177 (40,2)	19 (17,1)	< 0,0001
esp	131 (23,8)	126 (28,7)	5 (4,5)	< 0,0001
hyl	47 (8,5)	46 (10,5)	1 (0,9)	0,0004
gelE	13 (2,4)	4 (0,9)	9 (8,1)	0,0001
cylA	1 (0,2)	0	1 (0,9)	0,2
asa1	4 (0,7)	1 (0,2)	3 (2,7)	0,32
Сочетания генов	279 (50,6)	192 (43,6)	87 (78,4)	< 0,0001
Два гена	218 (39,6)	181 (41,1)	37 (33,3)	0,16
из них esp + hyl	170 (30,9)	170 (38,6)	0	< 0,0001
asa1 + gelE	19 (3,4)	1 (0,2)	18 (16,2)	< 0,0001
другие сочетания двух генов <sup>1</sup>	29 (5,3)	10 (2,3)	19 (17,1)	< 0,0001
Три гена	47 (8,5)	9 (2)	38 (34,2)	< 0,0001
из них esp + asa1 + gelE	12 (2,2)	3 (0,7)	9 (8,1)	< 0,0001
asa1 + cylA + gelE	10 (1,8)	0	10 (9)	< 0,0001
другие сочетания трех генов <sup>2</sup>	25 (4,5)	6 (1,3)	19 (17,1)	< 0,0001
Четыре гена	12 (2,2)	2 (0,5)	10 (9)	< 0,0001
из них esp + asa1 + cylA + gelE	6 (1,1)	1 (0,2)	5 (4,5)	0,0016
другие сочетания четырех генов <sup>3</sup>	6 (1,1)	1/1 (0,2)	5 (4,5)	0,0016
Пять генов <sup>4</sup>	2 (0,4)	0	2 (1,8)	0,04

<sup>1</sup> Другие сочетания двух генов (n = 29): *esp + gelE* (n = 8), *asa1 + hyl* (n = 7), *hyl + gelE* (n = 6), *cylA + hyl* (n = 3), *cylA + gelE* (n = 3), *esp + asa1* (n = 1), *asa1 + cylA* (n = 1).

<sup>2</sup> Другие сочетания трех генов (n = 25): *asa1 + cylA + hyl* (n = 6), *asa1 + hyl + gelE* (n = 5), *esp + asa1 + cylA* (n = 3), *esp + asa1 + hyl* (n = 3), *esp + cylA + hyl* (n = 3), *esp + cylA + gelE* (n = 3), *esp + hyl + gelE* (n = 2).

<sup>3</sup> Другие сочетания четырех генов (n = 6): *asa1 + cylA + hyl + gelE* (n = 3), *esp + asa1 + cylA + hyl* (n = 1), *esp + asa1 + hyl + gelE* (n = 1), *esp + cylA + hyl + gelE* (n = 1).

<sup>4</sup> Пять генов (n = 2): *esp + asa1 + cylA + hyl + gelE* (n = 2).

**Таблица 2.** Гены вирулентности среди VR-*E. faecium* и VS-*E. faecium*

Гены вирулентности	VR- <i>E. faecium</i> Всего 86 n (%)	VS- <i>E. faecium</i> Всего 354 n (%)	p
Обнаружены	71 (82,6)	298 (84,2)	0,7
Всего <i>esp</i>	63 (73,3)	246 (69,5)	0,6
Всего <i>hyl</i>	34 (39,5)	195 (55,1)	0,01
Всего <i>gelE</i>	4 (4,7)	16 (4,5)	1
Всего <i>asa1</i>	3 (3,5)	8 (2,3)	0,5
Всего <i>cylA</i>	0	5 (1,4)	0,6
Один ген	41 (47,7)	136 (38,4)	0,14
<i>esp</i>	33 (38,4)	93 (26,3)	0,03
<i>hyl</i>	7 (8,1)	39 (11)	0,56
<i>asa1</i>	0	1 (0,3)	1
<i>gelE</i>	1 (1,2)	3 (0,8)	0,58
Сочетания генов	30 (34,9)	162 (45,8)	0,07
Два гена	27 (31,4)	155 (43,8)	0,039
из них <i>esp + hyl</i>	26 (30,2)	145 (41)	< 0,0001
другие сочетания двух генов <sup>1</sup>	1 (1,2)	10 (2,8)	0,7
Три гена <sup>2</sup>	3 (3,5)	5 (1,4)	0,19
Четыре гена <sup>3</sup>	0	2 (0,6)	1

<sup>1</sup>Другие сочетания двух генов (n = 11): *hyl + gelE* (n = 5), *esp + gelE* (n = 3), *asa1 + hyl* (n = 2), *asa1 + gelE* (n = 1).

<sup>2</sup>Три гена (n = 8): *esp + asa1 + gelE* (n = 3), *esp + hyl + gelE* (n = 2), *esp + asa1 + hyl* (n = 1), *esp + asa1 + cylA* (n = 1), *asa1 + cylA + hyl* (n = 1).

<sup>3</sup>Четыре гена (n = 2): *esp + asa1 + cylA + gelE* (n = 1), *esp + cylA + hyl + gelE* (n = 1).

(0,5%,  $p < 0,005$ ). Все пять генов вирулентности были определены только у двух штаммов (1,8%) *E. faecalis*.

Среди изолированно детектируемых генов вирулентности у *Enterococcus* spp. (n = 196) преобладал ген *esp* (23,8%), который достоверно чаще определяли у *E. faecium* (28,7%), чем у *E. faecalis* (4,5%,  $p < 0,0001$ ), Таблица 1. Вторую позицию в моноварианте среди *Enterococcus* spp. занимал ген *hyl* (8,5%), который также доминировал у *E. faecium* (10,5%) в сравнении с *E. faecalis* (0,9%,  $p = 0,0004$ ). У *E. faecalis* преобладал ген *gelE* (8,1%) в моноварианте.

При сравнении *E. faecium* с разной чувствительностью к ванкомицину исследуемые гены вирулентности были выявлены у сопоставимого числа штаммов (82,6% и 84,2% соответственно), Таблица 2. Отличия были только в частоте детекции гена *hyl*, который статистически значимо реже определяли среди ванкомицино-резистентных *E. faecium* (VR-*E. faecium*) по сравнению с ванкомициночувствительными *E. faecium* (VS-*E. faecium*, 39,5% и 55,1%,  $p = 0,01$ ). Ген *cylA* у VR-*E. faecium* отсутствовал. Среди VR-*E. faecium* и VS-*E. faecium* наибо-

**Таблица 3.** Гены вирулентности среди *vanA* и *vanB* VR-*E. faecium*

Гены вирулентности	<i>vanA</i> Всего 62 n (%)	<i>vanB</i> Всего 24 n (%)	p
Обнаружены	50 (80,6)	21 (87,5)	0,54
Всего <i>esp</i>	45 (72,6)	18 (75)	1
Всего <i>hyl</i>	26 (41,9)	8 (33,3)	0,6
Всего <i>gelE</i>	4 (6,5)	0	0,6
Всего <i>asa1</i>	3 (4,8)	0	0,6
Один ген	25 (40,3)	16 (66,7)	0,03
<i>esp</i>	20 (32,3)	13 (54,2)	0,08
<i>hyl</i>	4 (6,5)	3 (12,5)	0,4
<i>gelE</i>	1 (1,6)	0	1
Сочетания генов	25 (40,3)	5 (20,8)	0,13
Два гена	22 (35,5)	5 (20,8)	0,3
из них <i>esp + hyl</i>	21 (33,9)	5 (20,8)	0,3
другие сочетания двух генов <sup>1</sup>	1 (1,6)	0	1
Три гена <sup>2</sup>	3 (4,8)	0	0,6

<sup>1</sup>Другие сочетания двух генов (n = 1): *esp + gelE*.

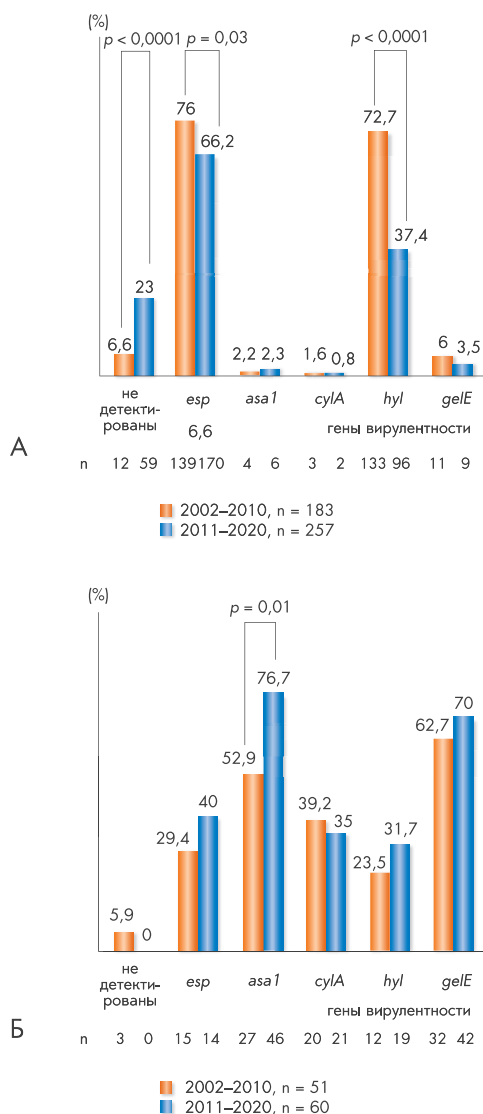
<sup>2</sup>Три гена (n = 3): *esp + asa1 + gelE* (n = 2), *esp + asa1 + hyl* (n = 1).

лее часто детектировали гены *esp* (73,3% и 69,5% соответственно). Доля генов *asa1* и *gelE* у VR-*E. faecium* и VS-*E. faecium* была сопоставимой и составила менее 5%.

Сочетание двух генов статистически значимо чаще регистрировали у VS-*E. faecium* по сравнению с VR-*E. faecium* (43,8% против 31,4%,  $p = 0,039$ ) по причине более частого обнаружения у VS-*E. faecium* сочетания доминантных генов *esp + hyl* (41% против 30,2%,  $p < 0,0001$ , соответственно), Таблица 2.

При сравнении разных генотипов резистентности к ванкомицину *vanA* и *vanB* VR-*E. faecium* не было получено отличий по частоте обнаружения генов вирулентности, Таблица 3. Наиболее часто среди *vanA* и *vanB* VR-*E. faecium* детектировали гены *esp* (72,6% и 75% соответственно). Среди *vanB* VR-*E. faecium* было отмечено представление генов в моноварианте в сравнении с *vanA* VR-*E. faecium* (66,7% против 40,3%,  $p = 0,03$ ). Сочетание генов вирулентности чаще определяли у *vanA* по сравнению с *vanB* VR-*E. faecium* (40,3% против 20,8%).

При сравнении разных периодов исследования (2002–2010 гг. и 2011–2020 гг.) у *E. faecium* достоверно снизилась частота детекции доминирующих генов *esp* с 76% до 66,2% ( $p = 0,03$ ) и *hyl* с 72,7% до 37,4%, ( $p < 0,0001$ ) за счет увеличения доли штаммов без исследуемых генов вирулентности с 6,6% до 23% ( $p < 0,0001$ ), рисунок 2А. В более поздний период исследования (2011–2020 гг.) у *E. faecium* было отмечено увеличение доли штаммов с одним геном вирулентности (с 31,7% до 46,3%,  $p = 0,002$ ) и уменьшение с двумя генами с 59% до 28,4% ( $p < 0,0001$ ).



**Рисунок 2.** Распределение генов вирулентности среди *E. faecium* и *E. faecalis* в разные периоды исследования (2002–2010 гг. и 2011–2020 гг.)

А) Распределение генов вирулентности среди *E. faecium*  
 Б) Распределение генов вирулентности среди *E. faecalis*

Среди *E. faecalis* во второй анализируемый период исследования (2011–2020 гг.) было определено статистически достоверное увеличение генов *asa1* с 52,9% до 76,7% ( $p = 0,01$ ) и сочетания трех и более генов вирулентности с 33,3% (17 из 51) до 55% (33 из 60,  $p = 0,03$ ) и некоторое уменьшение двух генов с 41,2% до 26,7% ( $p < 0,05$ ), Рисунок 2Б.

У VR-*E. faecium* в разные периоды исследования (2002–2010 гг. и 2011–2020 гг.) достоверных отличий по распределению генов вирулентности не было получено, в то время как среди VS-*E. faecium* статистически значимо уменьшилась частота детекции гена *hyl* с 74,4% до 38,4% ( $p < 0,0001$ ) и гена *esp* с 76,8% до 63,2%

( $p = 0,006$ ), а также в более поздний период увеличился процент штаммов, не содержащих исследованные гены вирулентности с 6,1% до 24,2% ( $p < 0,0001$ ).

Среди VR-*E. faecium* с *vanA* и *vanB* генотипами резистентности к ванкомицину в разные периоды исследования также, как и среди VR-*E. faecium* в целом, отмечено снижение доли гена *hyl* (у *vanA* VR-*E. faecium* – с 56,2% до 37%,  $p < 0,05$ , соответственно, у *vanB* VR-*E. faecium* – с 66,7% до 28,6%,  $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

В приведенном исследовании у 551 штамма *Enterococcus* spp. нами были изучены гены вирулентности. Основные заключения данной работы могут быть суммированы следующим образом:

- гены вирулентности преобладают среди *E. faecalis* в сравнении с *E. faecium*;
- у *E. faecalis* отмечено преобладание сочетания трех и более генов вирулентности, а среди *E. faecium* – одного гена вирулентности;
- *E. faecalis* и *E. faecium* имеют разные доминирующие гены, так у *E. faecium* ведущими являются гены вирулентности, кодирующие энтерококковый поверхностный протеин и гиалуронидазу, а у *E. faecalis* – гены, кодирующие желатиназу и субстанцию агрегации.

Преобладание генов вирулентности у *E. faecalis* (95,5%) по сравнению с *E. faecium* (83,9%,  $p = 0,003$ ), согласуется с литературными данными. В работе Strateva T. и соавт. эти показатели у *E. faecalis* и *E. faecium* составляли 100% и 90% соответственно ( $p < 0,0001$ ), в другом исследовании из Словении – 100% и 73,3% ( $p < 0,0001$ ), по данным американских авторов – 92,9% и 83,3%, но отличия не были статистически значимыми [10–12].

В нашем исследовании у *E. faecalis* в сравнении с *E. faecium* преобладало сочетание трех и более генов вирулентности (45% против 2,5% соответственно), которое в более поздний период исследования (2011–2020 гг.) увеличилось до 55%, в тоже время как среди *E. faecium* достоверно чаще определяли один ген (40,32% против 17,1%), и их доля возросла до 46% (2011–2020 гг.). Аналогичные результаты были получены в исследовании ученых из Болгарии, в котором у *E. faecalis* по сравнению с *E. faecium* достоверно чаще детектировали более 4 генов вирулентности (71,9% против 1,5%,  $p < 0,001$ ), тогда как у *E. faecium* один ген вирулентности (50% против 1,1%,  $p < 0,001$ ) [13]. В работе Padmasini E. и соавт. у *E. faecalis* также преобладало сочетание более четырех генов вирулентности, а среди *E. faecium* одного гена вирулентности [13]. По данным другого исследования все штаммы *E. faecalis* имели от 6 до 11 генов вирулентности, тогда как *E. faecium* 1–3 гена вирулентности [14].

Вирулентность *Enterococcus* spp. и в первую очередь *E. faecalis*, может быть ассоциирована с системой CRISPR/Cas (CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), включающую последова-

тельность нуклеиновых кислот (24-48 пар нуклеотидов), которая многократно повторяется. Между идентичными повторами располагаются отличающиеся друг от друга фрагменты ДНК, спейсеры, фрагменты чужеродной (вирусной или плазмидной) ДНК, с которой сталкивалась бактериальная клетка. При проникновении нового вируса (или плазмиды) в бактериальную клетку, его обнаруживают специфические Cas-белки, которые разрезают и встраивают фрагмент вирусной ДНК в виде спейсера между идентичными повторами. В случае повторного проникновения вируса в бактериальную клетку и наличии его фрагмента в своей CRISPR/Cas системе, Cas-белки защищают клетку и уничтожают его.

В ряде работ было показано, что у *E. faecalis* с CRISPR/Cas системой ассоциировано два процесса, которые оказывают влияние на вирулентность. Системы CRISPR/Cas могут снижать вирулентность *E. faecalis*, защищая их от мобильных генетических элементов, несущих потенциальные факторы вирулентности (плазмиды, транспозоны и бактериофаги), и в тоже время регуляция экспрессии генов с помощью CRISPR/Cas системы может повышать вирулентность *E. faecalis*, например, путем стимулирования колонизации клеток хозяина [15, 16]. В работе Bourgogne A. и соавт. на экспериментальной модели мыши при инфекции мочевыводящих путей было установлено, что штамм *E. faecalis* с CRISPR/Cas системой имел повышенную способность к формированию биопленок и более эффективно колонизировал органы мыши, чем штамм, лишенный этой системы [17]. В другом исследовании наличие CRISPR/Cas системы у *E. faecalis* было статистически значимо ассоциировано с присутствием гена *gelE*, кодирующего желатиназу ( $p < 0,05$ ) [18].

Нами было определено у *E. faecalis* преобладание генов *gelE* (66,7%) и *asa1* (65,8%), далее следовали гены *cylA* (36,9%) и *esp* (34,2%). Другими исследователями были получены сопоставимые данные, в которых ген *gelE* был определен у 64–88% *E. faecalis*, ген *asa1* – у 64–79%, а ген *esp* – у 34,2–71,8% [11, 19–21]. Частота выделения гена *cylA* была несколько ниже в нашем исследовании (36,9%) по сравнению с результатами европейских работ (44,4–67,2%) [10, 11, 21]. Наиболее низкой у *E. faecalis* была частота детекции гена *hyl* (27,9%). По другим публикациям этот показатель сильно варьировал и составлял от 0,4–2,8% до 22,2–31,3% [10–12, 15, 21].

В нашем исследовании у 25,2% *E. faecalis* было определено сочетание генов *asa1* и *cyl*. В ряде работ ген *cyl*, кодирующий цитоллизин, нередко совместно с геном *asa1*, кодирующим субстанцию агрегации, был обнаружен у *E. faecalis* на уникальных мобильных генетических элементах – так называемых конъюгативных феромонозависимых плаزمиды, которые способствуют передаче как отдельных генов резистентности к антибиотикам и вирулентности, так и островков патогенности [22]. Эти плазмиды способствуют прикреплению микроорганизмов, колонизации и формированию биопленок,

причем экспрессия одновременно субстанции агрегации и цитоллизина может приводить к увеличению патогенных свойств у *E. faecalis* [22–24]. Наиболее известными из них являются феромонозависимые плазмиды pAD1, pCF10 и pPD1.

У 18% *E. faecalis* нами было выявлено сочетание генов *asa1* + *cylA* + *gelE*. По данным Raven K. и соавт. было отмечено, что гены *asa1*, *cylA* и *gelE* статистически значимо чаще ( $p < 0,05$ ) детектировали у *E. faecalis*, принадлежащих к клональному комплексу (clonal complex – CC) CC2, CC87 и CC388 по сравнению со спорадическими штаммами [25].

Среди 111 *E. faecalis* был выявлен один (0,9%) умеренно-резистентный к ванкомицину штамм, несущий гены *gelE* + *asa1* + *hyl*. В исследовании Raven K. и соавт. не было получено различий в распределении генов вирулентности среди чувствительных и резистентных к ванкомицину *E. faecalis*, выделенных из гемокультуры [25].

У *E. faecium* доминировали другие гены вирулентности, такие как *esp* (70,2%) и *hyl* (52,1%), а гены *asa1*, *cylA* и *gelE* составили менее 5%. В большинстве работ у *E. faecium* также была отмечена высокая частота детекции гена *esp* (70–72%), в то время как ген *hyl* варьировал от 3% до 53% [9–11, 14, 23, 26–29]. Высокая частота детекции генов *esp* и *hyl* у *E. faecium*, выделенных из гемокультуры, вероятно, не была случайной в нашем исследовании. Ген *esp* ассоциирован с первичным поверхностным прикреплением к клеткам хозяина и колонизацией слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, а ген *hyl* – повышает инвазивную способность *Enterococcus* spp. и, таким образом, присутствие этих генов вирулентности одновременно может быть связано с развитием инфекции кровотока вследствие транслокации *E. faecium* из желудочно-кишечного тракта в кровоток у больных с заболеваниями системы крови и тяжелым мукозитом [30].

Низкая частота детекции генов *asa1*, *cylA* и *gelE* *E. faecium*, выявленная в нашей работе, также была отмечена другими учеными и варьировала от их полного отсутствия до 13% [9, 11, 14, 27, 27, 31].

При сравнении VR-*E. faecium* и VS-*E. faecium* частота обнаружения генов вирулентности была сопоставимой (82,6% и 84,2% соответственно), но среди VR-*E. faecium* в сравнении с VS-*E. faecium* достоверно реже выявляли ген *hyl* (39,5% против 55,1%,  $p = 0,01$ ), а ген *cylA* отсутствовал. Неоднородные данные представлены в литературе. В одних работах, так же как и нами, не было выявлено отличий в детекции генов вирулентности у VR-*E. faecium* и VS-*E. faecium*, в других исследованиях гены вирулентности чаще детектировали у VR-*E. faecium* [9, 30, 32, 33].

Среди VR-*E. faecium* в нашем исследовании ген *esp* выявили у 73,3% штаммов, ген *hyl* – у 39,5%, а гены *asa1* и *gel* – менее чем у 5%. В других работах детекция этих генов у VR-*E. faecium* была неоднородной и варьировала, так гена *esp* от 56% до 91,7%, гена *hyl* – от 28,5% до 86,7% [30, 31, 33–36]. В исследовании Rice L. и соавт. частота детекции у VR-*E. faecium* гена



*esp* и гена *hyl*, выделенных в США, была выше, чем в Европейских странах (65,1% против 23,5% соответственно,  $p = 0,001$ , и 38,5% против 11,8% соответственно,  $p = 0,03$ ) [29]. В отдельных работах была отмечена ассоциация генов *esp* и *hyl* с принадлежностью VR-*E. faecium* к CC17 [30, 33]. В проведенном нами ранее исследовании среди 129 VR-*E. faecium*, выделенных от больных опухолями системы крови со слизистой оболочки кишечника и принадлежащих к CC17, ген *esp* был детектирован у 91% штаммов [37].

Гены *asa1* и *gel* у VR-*E. faecium* были редко детектированы и в большинстве других исследований [9, 10, 19]. Однако противоположные результаты были получены в работе из Бразилии при изучении VR-*E. faecium*, выделенных из крови больных опухолями системы крови, в которой ген *gelE* был выявлен у 80% штаммов, а ген *asa1* – у 73,3% [38]. В этом исследовании наличие гена *asa1* у VR-*E. faecium* при инфекции кровотока статистически значимо чаще приводило к риску развития летального исхода (ОШ: 6,66; 95% ДИ: 1,00–44,28;  $p = 0,04$ ).

Среди *vanA* VR-*E. faecium* нами чаще был определен ген *esp* (72,6%), вторую позицию занимал ген *hyl* (41,9%), а гены *gelE* и *asa1* были выявлены в менее, чем у 7%. Аналогичные результаты были отмечены другими исследователями, но в некоторых публикациях доминировали гены *gelE* и *asa1*, а в исследовании Wardal E. и соавт. было показано преобладание разных генов вирулентности у штаммов, выделенных в соседних клиниках [33, 36–39]. Так при сравнении *vanA* VR-*E. faecium*, выделенных от больных в двух соседних клиниках Варшавы было показано, что в Институте гематологии и трансфу-

зиологии доминировал ген *esp* (82,4%), а в Институте онкологии этот показатель составил всего 3,7%, в то время как ген *hyl* преобладал в Институте онкологии (100% против 77,8% соответственно) [39]. Выявленные различия в частоте детекции генов вирулентности в этих клиниках были ассоциированы с преобладанием разных генетических линий у *vanA* VR-*E. faecium*.

## Выводы

Данное исследование продемонстрировало, что штаммы *E. faecium* и *E. faecalis* отличаются по частоте детекции генов вирулентности и их спектру. Гены вирулентности достоверно чаще определяются у *E. faecalis* с преобладанием среди них сочетаний из трех и более генов, а среди *E. faecium* доминирует один ген вирулентности. У *E. faecium* ведущими являются гены вирулентности, кодирующие энтерококковый поверхностный протеин и гиалуронидазу, у *E. faecalis* – гены, кодирующие желатиназу и субстанцию агрегации.

При сравнении с данными литературы у *E. faecalis* и *E. faecium* были получены идентичные результаты по частоте детекции генов, кодирующих желатиназу, субстанцию агрегации и энтерококковый поверхностный протеин, тогда как выявление гиалуронидазы было варибельным. При сравнении частоты обнаружения цитозина в нашем исследовании с другими публикациями, этот показатель у *E. faecium* был сопоставим, а у *E. faecalis* – несколько ниже в нашей работе.

Работа была выполнена в соответствии с государственным заданием, рег. № НИОКТР 122012700237-5.

## Литература

1. Klyasova G.A. Antimicrobial therapy. In: Program treatment of blood system diseases. Ed.: Savchenko V.G., Moscow: Praktika, 2012. Russian. (Клясова Г.А. Антимикробная терапия. В кн.: Программное лечение заболеваний системы крови: сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. Под ред. Савченко В.Г. Москва: Практика, 2012.)
2. Klyasova G.A., Okhmat V.A. Antimicrobial therapy. In: Algorithms of diagnosing and protocols of treatment of blood system diseases. Ed.: Savchenko V.G. Moscow: Praktika, 2018. Russian. (Клясова Г.А., Охмат В.А. Антимикробная терапия. В кн.: Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Под ред. Савченко В.Г. Москва: Практика, 2018.)
3. Klyasova G.A., Fedorova A.V., Frolova I.N., Khrulnova S.A., Vetokhina A.V., Kaporskaya T.S., et al. Antimicrobial resistance nosocomial *Enterococcus* spp., isolated from blood culture in patients with hematological malignancies. *Klinicheskaa mikrobiologia i antimikrobnaa himioterapia*. 2018;20(2):142-147. Russian. (Клясова Г.А., Федорова 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):142-147. DOI: 10.36488/cmasc.2018.2.142-149)
4. Sidorenko S.V. Infectious process as a "Dialog" between host and parasite. *Klinicheskaa mikrobiologia i antimikrobnaa himioterapia*. 2001;3(4):301-315. Russian. (Сидоренко С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001;3(4):301-315.)
5. García-Solache M., Rice L. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):e00058-18. DOI: 10.1128/CMR.00058-18
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100. 2020.

7. 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(5):1434. DOI: 10.1128/jcm.33.5.1434-1434.1995
8. Khan S.A., Nawaz M.S., Khan A.A. Hopper S.L., Jones R.A., Cerniglia C.E. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Mol Cell Probes.* 2005;19(1):27-34. DOI: 10.1016/j.mcp.2004.09.001
9. Vankerckhoven V., Van Autgaerden T., Vael C., Lammen C., Chapelle S., Rossi R., et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4473-4479. DOI: 10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004
10. Strateva T., Atanasova D., Savov E., Petrova G., Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(2):127-133. DOI: 10.1016/j.bjid.2015.11.011
11. Golob M., Pate M., Kušar D., Dermota U., Avberšek J., Papić B., Zdovc I. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. *Biomed Res Int.* 2019;2019:2815279. DOI: 10.1155/2019/2815279
12. Ferguson D.M., Talavera G.N., Hernández L.A., Weisberg S.B., Ambrose R.F., Jay J.A. Virulence genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in Southern California and Puerto Rico. *J Pathog.* 2016;2016:3437214. DOI: 10.1155/2016/3437214
13. Padmasini E., Divya G., Karkuzhali M., Padmaraj R., Ramesh S. Distribution of *cylA*, *esp*, *asa1*, *hyl* and *gelE* virulence genes among clinical isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *BMC Infect Dis.* 2014;14(Suppl. 3):P32. DOI: 10.1186/1471-2334-14-S3-P32
14. Eaton T.J., Gasson M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(4):1628-1635. DOI: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001
15. Gawryszewska I., Malinowska K., Kuch A., Chrobak-Chmiel D., Trokenheim L.L., Hryniewicz W., et al. Distribution of antimicrobial resistance determinants, virulence-associated factors and clustered regularly interspaced palindromic repeats loci in isolates of *Enterococcus faecalis* from various settings and genetic lineages. *Pathog Dis.* 2017;75(2):ftx021. DOI: 10.1093/femspd/ftx021
16. Lindenstrauss A.G., Pavlovic M., Bringmann A., Behr J., Ehrmann M.A., Vogel R.F. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34(8):553-560. DOI: 10.1016/j.syapm.2011.05.002
17. Bourgogne A., Garsin D.A., Qin X., Singh K.V., Sillanpaa J., Yerrapragada S., et al. Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biol.* 2008;9(7):R110. DOI: 10.1186/gb-2008-9-7-r110
18. Rotta I.S., Rodrigues W.F., Dos Santos C.T.B., Mantovani H.C., De Oliveira A.G., Machado A.B.F., Paiva A.D. Clinical isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* harboring virulence genes show the concomitant presence of CRISPR loci and antibiotic resistance determinants. *Microb Pathog.* 2022;171:105715. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105715
19. Kiruthiga A., Padmavathy K., Shabana P., Naveenkumar V., Gnanadesikan S., Malaiyan J. Improved detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of *Enterococci*. *BMC Res Notes.* 2020;13(1):170. DOI: 10.1186/s13104-020-05018-0
20. Medeiros A.W., Pereira R.I., Oliveira D.V., Martins P.D., d'Azevedo P.A., Van der Sand S., et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Braz J Microbiol.* 2014;45(1):327-332. DOI: 10.1590/S1517-83822014005000031
21. Zheng J.X., Wu Y., Lin Z.W., Pu Z.Y., Yao W.M., Chen Z., et al. Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolates in China. *Front Microbiol.* 2017;8:2338. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02338
22. Bhatti M., Cruz M.R., Frank K.L., Gomez J.A., Andrade F., Garsin D.A., et al. *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance) and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation and virulence. *Mol Microbiol.* 2015;95(4):660-677. DOI: 10.1111/mmi.12893
23. Van Tyne D., Gilmore M.S. Virulence plasmids of nonsporulating gram-positive pathogens. *Microbiol Spectr.* 2014;2(5):10.1128/microbiolspec.PLAS-0002-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0002-2013
24. Shankar N., Coburn P., Pilla C., Haas W., Gilmore M. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol.* 2004;293(7-8):609-618. DOI: 10.1078/1438-4221-00301
25. Raven K.E., Reuter S., Gouliouris T., Reynolds R., Russell J.E., Brown N.M., et al. Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. *Nat Microbiol.* 2016;1(3):15033. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.33
26. Shankar N., Baghdayan A.S., Gilmore M.S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature.* 2002;417:746-750. DOI: 10.1038/nature00802
27. Billström H., Lund B., Sullivan A., Nord C.E. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32(5):374-377. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.04.026

28. Elsner H. A., Sobottka I., Mack D., Claussen M., Laufs R., Wirth R. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood 114 culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(1):39-42. DOI: 10.1007/s100960050007
29. Rice L.B., Carias L., Rudin S., Vael C., Goossens H., Konstabel C., et al. A potential virulence gene, *hyl<sub>Em</sub>*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis.* 2003;187(3):508-512. DOI: 10.1086/367711
30. 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
31. Jahangiri S., Talebi M., Eslami G., Pourshafie M.R. Prevalence of virulence factors and antibiotic resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from sewage and clinical samples in Iran. *Indian J Med Microbiol.* 2010;28:337-341. DOI: 10.4103/0255-0857.71828
32. Khrulnova S.A., Fedorova A.V., Klyasova G.A. Virulence genes in *Enterococcus* spp. strains, isolated from blood cultures of patients with hematological malignancies in Russia. *Immunopatologija, allergologija, infektologija.* 2016;1:78-82. Russian. (Хрульнова С.А., Фёдорова А.В., Клясова Г.А. Гены вирулентности у штаммов *Enterococcus* spp., выделенных из гемокультуры у больных опухолями системы крови в России. *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2016;1:78-82.) DOI: 10.14427/jipai.2016.1.78
33. Comerlato C.B., Resende M.C., Caierão J., d'Azevedo P.A. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(5):590-595. DOI: 10.1590/s0074-02762013000500009
34. Park S.H., Park C., Choi S.M., Lee D.G., Kim S.H., Kwon J.C., et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bloodstream infections among patients with neutropenia over a 6-year period in South Korea. *Microb Drug Resist.* 2011;17(1):59-65. DOI: 10.1089/mdr.2010.0091
35. Camargo I.L., Gilmore M.S., Darini A.L. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:1123-1130. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01496.x
36. Biswas P.P., Dey S., Sen A., Adhikari L. Molecular characterization of virulence genes in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococci*. *J Glob Infect Dis.* 2016;8(1):16-24. DOI: 10.4103/0974-777X.176141
37. Brilliantova A.N., Kliasova G.A., Mironova A.V., Tishkov V.I., Novichkova G.A., Bobrynina V.O., Sidorenko S.V. 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
38. Marchi A.P., Perdigão Neto L.V., Martins R.C.R., Rizek C.F., Camargo C.H., Moreno L.Z., et al. Vancomycin-resistant enterococci isolates colonizing and infecting haematology patients: clonality, and virulence and resistance profile. *J Hosp Infect.* 2018;99(3):346-355. DOI: 10.1016/j.jhin.2017.10.010
39. Wardal E., Markowska K., Zabicka D., Wróblewska M., Giemza M., Mik E., et al. Molecular analysis of *vanA* outbreak of *Enterococcus faecium* in two Warsaw hospitals: the importance of mobile genetic elements. *Biomed Res Int.* 2014;2014:575367. DOI: 10.1155/2014/575367