

**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СТАРА ЗАГОРА**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

Катедра “Здравни грижи”



**Д-Р РОЗАЛИНА ДИМИТРОВА ЙОРДАНОВА**

**ФЕНОТИПНИ И ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ОТКРИВАНЕ НА ФАКТОРИ НА  
ВИРУЛЕТНОСТ И РЕЗИСТЕНТНОСТ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ  
*ENTEROCOCCUS SPP.***

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**на дисертационен труд**

**за присъждане на ОНС „Доктор“**

Научна специалност: Микробиология

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

**Научни ръководители:**

Доц. д-р Георги Георгиев Беев,  
Проф. Спаска Ангелова Станилова, дбн

**Научно жури:**

1. Член-кореспондент Проф. Христо Миладинов Найденски, двмн
2. Проф. Мария Дянкова-Ангелова, дбн
3. Доц. д-р Екатерина Крумова
4. Доц. Люба Динева Митева, дб
5. Доц. д-р Тончо Господинов Динев

**Стара Загора**

**2022**

Дисертационният труд съдържа 151 стандартни машинописни страници и е онагледен с 40 таблици и 15 фигури. Цитирани са 420 литературни източника, от които 1 на кирилица и 419 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за официална защита на заседание на Разширен катедрен съвет на Катедра „Здравни грижи” на Медицински факултет при Тракийски университет, гр. Стара Загора, състоял се на 26.10.2022 г.

Дисертационния труд предстои да бъде защитен пред научно жури в състав:

1. Член-кореспондент Проф. Христо Миладинов Найденски, двмн
2. Проф. Мария Дянкова-Ангелова, дбн
3. Доц. д-р Екатерина Крумова
4. Доц. Люба Динева Митева, дб
5. Доц. д-р Тончо Господинов Динев

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 16.01.2023 г. от 12:00 часа в ..... на Тракийски университет, гр. Стара Загора. Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Тракийски Университет, гр. Стара Загора и са на разположение в канцеларията на „Научен отдел” на Медицински факултет, Тракийски Университет, гр. Стара Загора.

Изказвам своята огромна благодарност на Моето семейство и приятели за търпението и подкрепата!

Искрено благодаря на научните си ръководители Доц. Георги Беев и Проф. Спаска Станилова, за компетентното ръководство, гравивната критика, неоченимата помощ и изключителното търпение във всеки етап от реализирането на дисертационния труд.

Сърдечни благодарности към Проф. Албена Андонова, Доц. Деяна Генчева и Доц. Звезделина Янева, за ценните напътствия, отзивчивостта, безрезервната подкрепа и съдействие при разработването и подготовката на настоящия дисертационен труд.

Благодарна съм и на екипа на Централна научно-изследователска лаборатория, Тракийски университет – Стара Загора, които ми оказваха съдействие при подготовката и провеждането на експериментите.

Д-р Розалина Йорданова

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

- I. Въведение**
- II. Цел и задачи**
- III. Материали и методи**
- IV. Резултати**
- V. Дискусия**
- VI. Изводи**
- VII. Приноси**
- VIII. Публикации, свързани с дисертационния труд**
- IX. Резюме на английски език**

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

**AS** - агрегираща субстанция

*asaI* - ген, кодиращ агрегираща субстанция

**A** - ampicillin

**CDC** - Център за контрол и профилактика на заболяванията

**CP** - ciprofloxacin

*cytA* - ген, кодиращ цитолизин

**ECDC** - Европейски център за контрол и превенция на заболяванията

**Esp** - Enterococcal surface protein

*esp* - ген, кодиращ ентерококов повърхностен протеин

**EUCAST** - Европейски комитет за тестване за антимикробна чувствителност

**FDA** - Администрация по храните и лекарствата на Съединени Американски Щати

**G30** - gentamicin за детекция на високо ниво на резистентност към аминогликозиди

*gelE* - ген, кодиращ желатиназа

**HAI** - вътреболнични инфекции

**HLAR** - високо ниво на резистентност към аминогликозиди

**HLGR** - високо ниво на резистентност към gentamicin

**LAB** - млечнокисели бактерии

**LPSN** - *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*

**MDR** - множествена лекарствена резистентност

**PCR** - полимеразна верижна реакция

*sodA* - ген, кодиращ ензима манган-зависима супероксид дисмутаза

**TBE** - Трис база, борна киселина и етилендиаминтетраоцетна киселина

**TEC** - teicoplanin

**TSA** - триптиказен соев агар

**TSB** - триптиказен соев бульон

**VA** - vancomycin

**VRE** - vancomycin-резистентни ентерококи

**VSE** - vancomycin-чувствителни ентерококи

**WHO** - Световна Здравна Организация

**ГДП** - горни дихателни пътища

**ДНК** - дезоксирибонуклеинова киселина

**ДДМ** - диск дифузионен метод

**ЕС** - Европейски съюз

**ЕИЗ** - Европейска икономическа зона

## ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години се наблюдава все по-нарастващо значение на Gram-положителните бактерии. Предизвиканите от тях инфекции се поддават все по-трудно на лечение с често използваните антибиотици, вследствие разнообразието от механизми на резистентност, придобити поради безразборната употреба на антимикробни лекарствени средства в медицината и аграрния сектор. Следователно разпространението на тези микроорганизми води до изключително ограничени възможности за лечение на инфекциите, продължителен болничен престой, увеличени разходи и в много случаи неадекватно лечение и повишен леталитет.

Ентерококите са космополитни микроорганизми и са разпространени повсеместно. Те колонизират и се считат за част от нормалната полезна флора на стомашно-чревния тракт както на хората, така и на животните, през последните няколко десетилетия обаче, се оказват едни от най-важните бактериални видове в световен мащаб, основни опортюнистични агенти, причиняващи широк спектър от нозокомиални инфекции, особено в отделенията за интензивно лечение – уроинфекции (включително катетър-асоциирани), ендокардити, хирургични раневи инфекции, бактериемии, менингит, интраабдоминални инфекции, пелвиоперитонити. Макар и по-рядко могат да инфектират и централната нервна система, белите дробове, меките тъкани, параназалните синуси, ухото и пародонталната тъкан.

Ентерококите са устойчиви или толерантни към много антимикробни средства и лесно придобиват високо ниво на антибиотична резистентност чрез хоризонтален трансфер на гени. Множествено резистентните ентерококи се отнасят към групата на така наречените "терапевтично проблемни микроорганизми". Нещо повече, според Световната здравна организация (СЗО), vancomycin-резистентните представители на род *Enterococcus* са патогени с висок приоритет, попадащи в списъка на микроорганизмите, за чието лечение е необходимо спешно разработването на нови антимикробни средства.

Съгласно Списъка с номенклатурата на прокариотите (*LPSN*) от 2022 г., съществуват 69 видови официално признати наименования на ентерококи, като основните причинители на инфекции са *E. faecalis* и *E. faecium*. *E. faecalis* е най-често срещания изолат, свързващ се с около 80-90% ентерококовите инфекции при хора.

Факторите на вирулентност, които ентерококите притежават, улесняват адхезията им към клетките на гостоприемника, колонизацията, формирането на биофилм и подпомагат устойчивостта им към защитните механизми на макроорганизма. Освен това, ензимите, които секретират (сред които цитолизин и желатиназа), допринасят за инвазията, причинявайки увреждане на тъканите на гостоприемника. Тези фактори на вирулентност и антибиотичната резистентност се регулират от съгласуваното поведение на микроорганизмите, в зависимост от клетъчната гъстота на бактериалната популация – явление, известно като quorum-sensing.

Всичко това поставя ентерококите във фокуса на вниманието на микробиолози инфекционисти и други специалисти, разработващи насоки за превенция, овладяване и ограничаване на ентерококовите инфекции.

Поради нарастващото значение на *Enterococcus* spp. като причинители на тежки инфекции и способността им да придобиват и разпространяват детерминанти на антибиотична резистентност, една от първостепенните задачи се явява идентифицирането на техните фактори на вирулентност, свързани с инвазивността и тежестта на заболяването.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Цел:** Проучване факторите на вирулентност, включително quorum-sensing регулиращи гени, детерминиращи биофилм-формираща активност и оценка профила на антибиотична резистентност на клинично значими и коменсални щамове *Enterococcus* spp., изолирани от клинични материали от хоспитализирани пациенти.

За осъществяване на тази цел си поставихме следните **задачи**:

1. Да се определи видовата принадлежност на клинично значими и коменсални щамове *Enterococcus* spp., чрез фенотипни (конвенционални и автоматизирани) и молекулярно-генетични методи.
2. Да се определи разпространението на отделните видове *Enterococcus* spp., в зависимост от локацията и материала, от който са изолирани.
3. Да се проучи антибиотичната чувствителност на изолираните щамове от различен произход към редица групи антимикробни лекарствени средства: бета-лактамни антибиотици, гликопептиди, хинолони, оксазолидинони, тетрациклини, включително високо ниво аминокликозидна устойчивост (HLAR).
4. Да се проучат важни фактори на вирулентност, включително quorum-sensing детерминирани (хемолизин, желатиназа, агрегираща субстанция, ентерококов повърхностен протеин, способност за биофилм формиране) в щамовете *Enterococcus* spp. от клинични материали и носители.
5. Да се разработи мултиплексен PCR метод за определяне гените, кодиращи факторите на вирулентност *cylA*, *gelE*, *asaI* и *esp*.
6. Да се сравни патогенния потенциал на двата основни вида ентерококи - *E. faecalis* и *E. faecium*, в зависимост от наличието на гени, кодиращи фактори на вирулентност.
7. Да се разработи мултиплексен PCR за определяне гените, кодиращи антимикробната лекарствена резистентност на събраните клинични щамове ентерококи.
8. Да се определи честотата на разпространение на гените за антибиотична резистентност сред проучените клинични щамове.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Материали

#### 1.1. Бактериални щамове

В дисертационния труд са използвани общо 188 неповтарящи се изолата *Enterococcus* spp. Сто и десет са изолирани от амбулаторни и хоспитализирани пациенти, а 78 - от фекални проби на хоспитализирани пациенти, от следните болници: УМБАЛ „Проф. Д-р Стоян Киркович“ АД, град Стара Загора (50 клинични и 50 фекални изолата), УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, град Пловдив (60 клинични изолата) и УМБАЛ „Георги Странски“ ЕАД, град Плевен (28 фекални изолата). Всички пациенти са проявявали клинични признаци на бактериална инфекция, а при уроинфекциите е доказана сигнификантна бактериурия -  $\geq 10^5$  CFU/ml.

##### 1.1.1. Бактериални щамове от клинични материали

Клиничните материали, от които бяха изолирани щамове за изследване включват: кръв за хемокултура (11 щама), урина (42 щама), уретрални катетри (3 щама), раневи секрети и абсцеси (38 щама), вагинални секрети (6 щама), пунктати и аспирати (4 щама), материали от дихателна система (3 щама) и кожа (3 щама).

##### 1.1.2. Бактериални щамове от фекални проби

Допълнително 78 щама *Enterococcus* spp., открити като коменсали в изпражнения, бяха събрани за сравняване факторите на вирулентност – хемолизин, желатиназа и биофилм формиране, с тези при щамовете, изолирани от клинични материали.

### 2. Методи

#### 2.1. Вземане на проби за микробиологично изследване

Материалите за микробиологично изследване бяха поставяни в универсална полусолидна транспортна среда на Stuart (*FL MEDICAL s.r.l. Unipersonale, Torreglia, Italy*) или в стерилни контейнери (*FL MEDICAL s.r.l. Unipersonale, Torreglia, Italy*) и транспортирани в рамките на два часа до микробиологичната лаборатория, където се обработваха веднага. След идентификация, щамовете бяха съхранявани в хладилник при температура  $-4^{\circ}\text{C}$ . Когато се налагаше да бъдат използвани отново, те се темперираха на стайна температура, след което се субкултивираха на кръвен агар за последващи анализи.

#### 2.2. Микроскопско изследване

Микроскопското изследване беше извършвано с помощта на рутинна процедура за оцветяване по Gram с оцветителен набор на *HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India*. Първоначално бяха оцветявани директни натривки на материалите от дихателната система, пунктатите, раневите секрети и вагиналните секрети. Бяха определяни следните характеристики: тип оцветяване по Gram, форма и взаимно разположение на бактериалните клетки.

#### 2.3. Изолиране на чисти култури

Взависимост от вида, клиничните материали се посяваха на съответни хранителни среди-готови за употреба петрита с кръвен агар с 5% овнешка кръв (*HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India*), на МакКонки агар за невзискателни Gram-отрицателни бактерии (*HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India*) и на хром агар за патогенни гъбички (*HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India*). Пробите бяха култивирани едно денонощие при температура  $37^{\circ}\text{C}$ .

Суспектните за ентерококи колонии, бяха идентифицирани чрез стандартни микробиологични методи, включващи оцветяване по Gram, тест за каталаза и хидролиза на ескулин [Fackland et al., 1999].

## **2.4. Методи за видова идентификация**

### **2.4.1. Стандартни културелни методи**

Идентификацията на ентерококите до вид беше извършена съгласно схемата на Facklam & Collins (1989) чрез стандартен набор от конвенционални тестове, основаващи се на отсъствието на ензим каталаза, въглехидратната ферментация на 1% разтвор на захарите манитол и арабиноза, хидролиза на пируват, декарбоксилиране на аргинин, растеж на среда, съдържаща калиев телурит [Facklam and Collins, 1989].

### **2.4.2. Хромогенен културелен метод**

При този метод изследваните щамове бяха посяти и на селективна среда *HiCrome Enterococcus faecium Agar Base (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India)*, на която лесно разграничавахме ферментиращия арабиноза *E. faecium* вид, образуващ типичните за вида зелени колонии, с пожълтяване на агара около тях, от вида *E. faecalis*, с типичните за него сини колонии.

### **2.4.3. Идентифициране чрез автоматизирана система Vitek MS (bioMerieux, France)**

Шестдесет изолата *Enterococcus* spp. бяха идентифицирани чрез система Vitek MS (*bioMerieux, France*), съгласно инструкциите на производителя. Колонии от 24-часова ентерококова култура на кръвен агар бяха инокулирани върху Vitek MS плака, след което се покриха с 1 µl матрикс разтвор (наситен разтвор на α-циано-4-хидроксицинаминова киселина в 50% ацетонитрил и 2,5% трифлуорооцетна киселина). След изсушаване за 1 до 2 минути на въздух при стайна температура, плаката беше поставена в системата Vitek MS. За калибриране и контрол на вътрешната идентификация, беше използван щам *Escherichia coli* ATCC 8739. Идентификацията беше извършена автоматично със софтуера на системата Vitek MS, като се сравняваше получения спектър с очаквания спектър на всеки организъм или група организми, включени в базата данни. Процентната вероятност, която представлява сходството по отношение на присъствие/отсъствие на специфични пикове между генерирания спектър и спектъра от базата данни, се изчисляваше от алгоритъма.

### **2.4.4. Идентифициране чрез молекулярно-генетични методи**

#### **2.4.4.1. Екстракция на геномна ДНК (описание)**

Геномна ДНК от чиста култура на изолираните клинични щамове беше екстрахирана с помощта на кит за екстракция на ДНК (*GenneMATRIX Gram Plus & Yeast Genomic DNA Purification Kit, Poland*), съгласно инструкциите на производителя. Концентрацията и чистотата на ДНК пробите измервахме спектрофотометрично при 260/280 nm, чрез спектрофотометър *Nano Vue Plus (GE Healthcare Life Sciences, Switzerland)*.

#### **2.4.4.2. Мултиплексен PCR за доказване вида на изолираните *Enterococcus* spp. щамове**

Беше разработена методика за мултиплексен PCR анализ за доказване *sodA* гените на видовете *E. faecalis* и *E. faecium*. Последователността на праймерите и условията, при които протичаха реакциите, са представени в **Таблица 1**. Амплификациите бяха извършени с помощта на конвенционален PCR апарат Doppio (2x48) (*VWR®, Germany*) в краен реакционен обем от 20 µl, който включваше: 2xRedTaq DNA Polymerase Master Mix (*VWR, Belgium*), 100 ng ДНК проба, 0,8 µl от всеки праймер и вода без наличие на нуклеаза (ddH<sub>2</sub>O). Реакциите се провеждаха при



следните условия (**Таблица 2**): предварителна денатурация при 94°C температура за 5 минути, последвана от 35 цикъла при 94°C за 35 секунди, хибридизация на праймера при 53°C за 35 секунди, екстензия при 72°C за 1 минута, финално удължаване при 72°C за 7 минути и се съхраняване при 4°C/∞. Полученият PCR продукт се оцветяваше с флуоресцентно багрило за нуклеинови киселини GelRed® (*Biotium, USA*) и анализираше върху 2% агарозен гел. Визуализирането на генерираните ДНК фрагменти, беше извършено с помощта на Electrophoresis Gel Imaging Analysis System (*Bio-Imaging System, Israel*). Амплифицираните гени бяха идентифицирани въз основа на размера на фрагмента, представен в **Таблица 1**.

**Таблица 1. Олигонуклеотиди, използвани като амплификационни праймери за видово-специфична идентификация на *Enterococcus* spp. [Jackson et al., 2004]**

Ген мишена	Име праймер	Секвенция на праймера F/R	Размер на продукта (bp)*	Температура на хибридизация
<i>sodA</i> на <i>E. faecalis</i>	FL1 FL2	ACTTATGTGACTAACTTAACC TAATGGTGAATCTTGGTTTGG	360	53°C
<i>sodA</i> на <i>E. faecium</i>	FM1 FM2	GAAAAACAATAGAAGAATTAT TGCTTTTTTGAATCTTCTTTA	215	53°C

\* базова двойка

**Таблица 2. PCR-условия, използвани за доказване на *sodA* гените на видовете *E. faecalis* и *E. faecium***

Ген	Програма				
	Първоначална денатурация	Денатурация	Хибридизация	Удължаване	Финално удължаване
<i>sodA</i>	94°C/5 min	94°C/35 s	53°C/35 s	72°C/1 min	72°C/7 min

## 2.5. Определяне на антимикробната лекарствена чувствителност на клинични изолати

### 2.5.1. Стандартизиран диск дифузионен метод (ДДМ) на Kirby-Bauer на Muller Hinton агар

Антибиотичната чувствителност на клиничните изолати *Enterococcus* spp., беше определена чрез диск дифузионен метод на Kirby-Bauer върху Muller Hinton агар (*HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India*) [Bauer et al., 1966]. Стандартизиран бактериален инокулум 0,5 по McFarland ( $1,5 \times 10^6$  CFU/ml) от чиста 24-часова микробна култура на съответния вид ентерококи, се посяваше чрез щрихи със стерилен памучен тампон на петрита с Muller Hinton агар – с трикратно завъртане на петрито на 60°C. След плътно покриване повърхността на хранителната среда с инокулум, бяха поставяни антибиотични дискове, импрегнирани с точно определена концентрация на съответното антимикробно лекарство средство. Беше използван следния набор от антибиотични дискове: ampicillin (2 µg), ciprofloxacin (5 µg), vancomycin (5 µg), teicoplanin (30 µg), imipenem (10 µg), tigecycline (15 µg). За доказване на високо ниво на устойчивост към аминогликозиди (в частност към gentamicin) на ентерококовите щамове, беше използван диск gentamicin (30 µg). Така приготвените антибиограми бяха култивирани едно денонощие при 37°C в термостат. Диаметрите на зоните на инхибиране на бактериалния растеж бяха измервани от външната страна на петрито, на тъмен фон и отразена светлина, с изключение на vancomycin [EUCAST version 7.1, 2017]. Интерпретацията на чувствителността е в съответствие с *European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) 2017/2018*

[EUCAST version 7.1, 2017, EUCAST version 8.1, 2018]. Изолатите, показали резистентност към три или повече различни класове антибиотици се приеха за множествено резистентни (MDR) [Magiorakos et al., 2012].

**2.5.2. Доказване гени за резистентност към различни групи антимикробни лекарствени средства чрез полимеразна-верижна реакция:**

**2.5.2.1. към бета-лактамни антибиотици (*TEM*)**

**2.5.2.2. към високо ниво на резистентност към gentamicin (*aac(6')/aph(2'')*)**

**2.5.2.3. към хинолони (*emeA*)**

**2.5.2.4. към гликопептиди (*vanA* и *vanB*)**

Използвахме екстрахираната по описания метод в точка 2.4.4.1. геномна ДНК за молекулярно-генетичните експерименти. Последователността на праймерите и условията, при които проведохме видово специфичната мултиплексна PCR за доказване на различни гени за резистентност на изолираните щамове *Enterococcus* spp., са представени в Таблицы 3 и 4. Получените PCR продукти се анализираха при условията, описани в точка 2.4.4.2.

**Таблица 3. Праймери за доказване на гени за резистентност при клинични щамове *Enterococcus* spp. [Jia et al., 2014]**

Ген мишена	Име праймер	Секвенция на праймера F/R*	Размер на продукта (bp)**	Температура на хибридизация
<i>TEM</i>	TEM1 TEM2	AGGAAGAGTATGATTCAACA CTCGTCGTTTGGTATGGC	535	55°C
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	<i>aac(6')/aph(2'')</i> 1 <i>aac(6')/aph(2'')</i> 2	CCAAGAGCAATAAGGGCATA CACTATCATAACCACTACCG	220	55°C
<i>vanA</i>	vanA1 vanA2	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	732	51°C
<i>vanB</i>	vanB1 vanB2	CATCGCCGTCGCCGAATTTCAAA GATGCGGAAGATACCGTGGCT	297	63,9°C

\* прав и обратен праймер, ред 5'-3'

\*\* базова двойка

**Таблица 4. PCR-условия, използвани за доказване на гени за резистентност при клинични щамове *Enterococcus* spp.**

Ген	Програма				
	Първоначал на денатурация	Денатурация	Хибридизация	Удължаване	Финално удължаване
<i>TEM, aac(6')/aph(2'')</i>	94°C/5 min	94°C/35 s	55°C/35 s	72°C/1 min	72°C/7 min
<i>vanA</i>	94°C/5 min	94°C/35 s	51°C/35 s	72°C/1 min	72°C/7 min
<i>vanB</i>	94°C/5 min	94°C/35 s	63,9°C/35 s	72°C/1 min	72°C/7 min
<i>emeA</i>	94°C/5 min	94°C/35 s	60°C/35 s	72°C/1 min	72°C/7 min

## **2.6. Определяне на биофилм-формиращата активност при *Enterococcus* spp.**

Биофилм-формиращата способност при *Enterococcus* spp. (клинични изолати и коменсали) определяхме паралелно по различни 3 метода - Метод на Christensen [Christensen et al., 1982] с кристалвиолет в епруветки, Модифициран метод със сафранин [Christensen et al., 1982] в епруветки и Микрометод върху плаки (Microplate test) [Tsikrikonis et al., 2012]. Всички изолати, при които беше установено образуване на биофилм, бяха обозначени като биофилм положителни (биофилм „+“), а останалите - като биофилм отрицателни (биофилм „-“). При всеки от използваните методи беше анализите бяха извършени в три повторения за всеки един от тестваните щамове, а визуалното отчитане на получените резултати беше извършвано от двама наблюдатели, независимо един от друг.

### **2.6.1. Метод на Christensen с кристалвиолет в епруветки**

Епруветки, съдържащи триптиказен соев бульон (TSB) с 1% глюкоза (за усилване на адхеренцията) [Christensen et al., 1985; Pillai et al., 2004], бяха инокулирани с 10 µl 24-часова култура на кръвен агар от съответния ентерококов вид. За отрицателна контрола служеха епруветки само с TSB. Инокулираните епруветки бяха интубирани в термостат за 24 часа при 37°C и след декантиране, промиване с фосфатен буферен разтвор (PBS) (pH = 7,2) и изсушаване, биваха оцветявани с 0.1% кристалвиолет в продължение на 30 минути. Излишъкът от боята беше отмиван с дейонизирана вода. След изсушаване на епруветките в обърнато положение, формирането на биофилм (видим филм, покриващ стената и дъното на епруветката) се отчиташе по следната скала: 0 - липсващ, 1 - слаб, 2 - умерен или 3- силен.

### **2.6.2. Модифициран метод със сафранин в епруветки**

Десет микролитра от 24-часова чиста култура от съответния щам, култивирана върху триптиказен соев агар (TSA) с 1% глюкоза, бяха трансферирани в стъклени епруветки с TSB и същата концентрация глюкоза. Като отрицателна контрола служеха епруветки, съдържащи само TSB. Инокулираните епруветки се инкубираха в термостат за 24 часа при 37°C и след отстраняване на течната фракция бяха добавяни по 2 ml сафранин (0,25%) за 1 минута. Излишъкът от оцветителя се отмиваше с вода. След престой от 24 часа на стайна температура, присъствието на адхерирал оцветен слой върху вътрешната повърхност на епруветките се приемаше за наличие на биофилм, чието количество беше отчитано както следва: 0 - липсва образуване на биофилм; (+) - слабо образуване на биофилм; (++) - умерено образуване на биофилм; (+++) - силно образуване на биофилм.

### **2.6.3. Микрометод върху плаки (Microplate test)**

Двадесет и четири-часова чиста култура от съответния щам, култивирана върху кръвен агар, беше инокулирана в епруветки, съдържащи TSB и 1% глюкоза. Епруветките се инкубираха в термостат за 24 часа при 37°C. Със стерилна пипета се трансферираше по 0.1 cm<sup>3</sup> от всяка бульонна култура в отделна епруветка с 9 cm<sup>3</sup> прясно приготвен TSB с 1% глюкоза за получаване на разреждане 1:100. Деведесет и шест-ямкови стерилни микротитърни полистиролови плаки с плоско дъно бяха инокулирани с по 200 µl за ямка от всяко отделно разреждане. Плаките се инкубираха при 37°C в продължение на 24 часа. В първите две ямки не се добавяше бактериална култура и се използваха за отрицателна контрола. Ямките се промиваха трикратно с 0,2 ml PBS (pH = 7,2), за да се отстранят неадхериралите клетки. Фиксирането на останалите клетки към повърхността се извършваше с 95% етанол за 20 минути. Изсушените при стайна температура плаки, се оцветяваха с 0.1% сафранин в продължение на 20 минути. След промиване и изсушаване на плаките, абсорбцията на всяка ямка се отчиташе спектрофотометрично с ELISA-четец при 490 nm. В този случай образуването на биофилм се считаше за силно, когато абсорбцията е > 0.20 оптична плътност (OD), за умерено при абсорбция между 0.20 и 0.10 OD и слабо / липсващо, при OD < 0.10.

## 2.7. Фенотипно доказване на фактори на вирулентност при *Enterococcus* spp.

### 2.7.1. Продукция на цитолизин

При определяне продукцията на цитолизин, използвахме Todd-Hewitt агар, обогатен с 5% човешка кръв. Върху него се инокулираше под формата на петно чиста 24-часова култура ентерококи и с последващо инкубиране при 37°C за 48 часа. Наличието на чиста зона на  $\beta$ -хемолиза около колонииите, се считаше като положителен резултат за продукцията на цитолизин [Pke et al., 1987].

### 2.7.2. Продукция на желатиназа

Продукцията на желатиназа се определяше чрез инокулация под формата на петно на чиста 24-часова култура ентерококи върху Todd-Hewitt агар, съдържащ 30 g желатин на 1 литър. Петритата се инкубираха при 37°C за 24 часа. Появата на чиста зона/мътен ореол около колонииите след охлаждане на плаките в продължение на 2 часа при 4°C, се считаше като положителна индикация за производството на желатиназа [Pke et al., 1987].

## 2.8. Полимеразна-верижна реакция за доказване на гени, кодиращи фактори на вирулентност при клинични щамове *Enterococcus* spp.

Беше разработен мултиплекс PCR за доказване на ген *cylA* (активатор на цитолизина, отговорен за експресията на цитолизиновия оперон) и ген *gelE* (отговорен за продукцията на желатиназа), както и мултиплекс PCR за доказване на гените, кодиращи агрегираща субстанция (*asaI*) и ентерококов повърхностен протеин (*esp*) при ентерококите, играещи роля при формирането на биофилм. Екстрахираната по описания метод в точка 2.4.4.1. геномна ДНК се използваше за молекулярно-генетичните експерименти.

### 2.8.1. Мултиплексна PCR за доказване на *cylA* и *gelE* гени

Мултиплексна PCR беше проведена за скрининг на присъствието на *cylA* и *gelE* гени. Последователностите на специфичните праймери (*Microsynth, Switzerland*), използвани съгласно предишно проучване [Vankerckhoven et al., 2004] са представени в **Таблица 5**.

PCR се проведе в реакционна смес с общ обем от 20  $\mu$ l, съдържаща 2  $\mu$ l PCR буфер, 0.8  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l dNTP, 0.1  $\mu$ l праймери Gel 11 и Gel 12, 0.3  $\mu$ l праймери Cyt I и Cyt II, 0.5  $\mu$ l Taq DNA полимераза, 2  $\mu$ l ДНК екстракт и добавена стерилна, не съдържаща ДНК/РНК-за вода до 20  $\mu$ l.

PCR се проведе в GeneAmp PCR система 9700 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). PCR реагентите бяха осигурени от *Thermo Fisher Scientific, USA*. Амплификацията за PCR продукти беше извършена при следните условия (**Таблица 6**): първоначална денатурация при 94°C в продължение на 7 минути, последвана от 35 цикъла, състоящи се от денатурация (94°C за 1 минута), хибридизация (56.4°C за 1 минута) и удължаване (72°C за 1 минута) и финално удължаване при (72°C за 7 минути). Получените PCR ампликони бяха анализирани чрез хоризонтала електрофореза върху 2% агарозен гел, съдържащ етидиев бромид в Tris base, boric acid and Ethylenediaminetetraacetic acid (ТВЕ) буфер в присъствието на маркер за молекулно тегло PCR Sizer 100 bp ДНК Ladder. От него бяха накапани по 3  $\mu$ l. Електрофорезата протичаше при 120 V с времетраене 40 минути, след което пробите бяха отчитани с помощта на Electrophoresis Gel Imaging Analysis System (*Bio-Imaging System, Israel*). Амплифицираните гени бяха идентифицирани въз основа на размера на фрагмента, представен в **Таблица 5**.

### 2.8.2. Мултиплексна PCR за доказване на *asaI* и *esp* гени

Последователността на използваните специфични праймери (*Microsynth, Switzerland*) за гените, кодиращи агрегираща субстанция и ентерококов повърхностен протеин при ентерококите, е представена в **Таблица 5**, а условията при които се провеждаха реакциите – в **Таблица 6**. Получените PCR продукти се анализираха при условията, описани в точка 2.4.4.2.

**Таблица 5. PCR праймери, използвани за откриване на гени на вирулентност [Vankerckhoven et al., 2004]**

Ген мишена	Име праймер	Секвенции на праймерите F/R*	Размер на продукта (bp)**	Температура на хибридизация
<i>gelE</i>	GEL 11 GEL 12	TATGACAATGCTTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	213	56.4°C
<i>cylA</i>	CYT I CYT IIb	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	56.4°C
<i>asa1</i>	ASA 11 ASA 12	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	55°C
<i>esp</i>	ESP 14F ESP 12R	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	55°C

\* прав и обратен праймер, ред 5'-3'

\*\* базова двойка

**Таблица 6. PCR-условия, използвани за откриване на гени на вирулентност (*cylA* и *gelE*) при *Enterococcus* spp.**

Гени	Програма				
	Първоначална денатурация	Денатурация	Хибридизация	Удължаване	Финално удължаване
<i>gelE, cylA</i>	94°C/7 min	94°C/1 min	56.4°C/1 min	72°C/1 min	72°C/7 min
<i>asa1, esp</i>	94°C/5 min	94°C/35 s	55°C/35 s	72°C/1 min	72°C/7 min

## 2.9. Статистически анализ

Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на Статистически пакет за статистика 12 (*StatSoft Inc.*), като *Chi-square* тестът е използван за категорични променливи, а *p*-стойности <0,05 се считат за значими.

## РЕЗУЛТАТИ

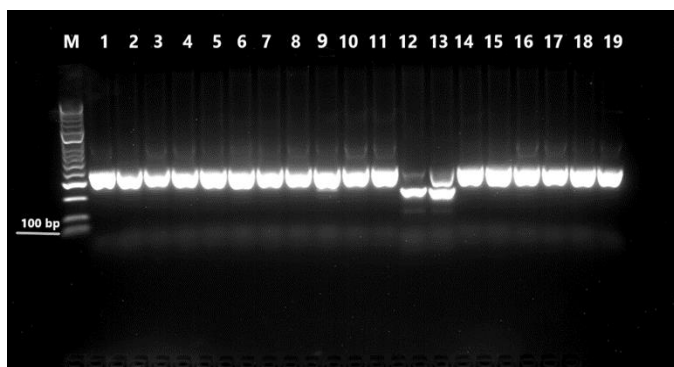
### 1. Видова идентификация на събраните клинични щамове *Enterococcus* spp.:

#### 1.1. чрез фенотипни методи (конвенционални биохимични методи и автоматизирани системи)

Петдесет от изолираните клинични щамове *Enterococcus* spp. бяха идентифицирани до вид чрез конвенционални биохимични тестове, а 60 - чрез автоматизирана система Vitek MS. От тестваните общо 110 щамове, 94 (85%) бяха определени като *E. faecalis* и 16 (15%) като *E. faecium*.

#### 1.2. чрез молекулярно-генетични методи

Всички 110 клинични щамове *Enterococcus* spp. бяха подложени и на мултиплексна PCR за доказване на *sodA* ген, кодиращ манган-зависимата супероксид дисмутаза (**Фигура 1**). Деветдесет и девет (90%) щамове бяха доказани като *E. faecalis* и 11 (10%) като *E. faecium*. Резултатите от видовата идентификация на щамове, получени чрез фенотипните методи (конвенционални биохимични методи и автоматизирана система Vitek MS), бяха сравнени с резултатите от молекулярно-генетичните техники (**Таблица 7**). Бяха отчетени седем несъвпадения. Поради докладваната по-рано по-висока специфичност на PCR анализа, резултатите, получени с този метод, бяха използвани за последващ анализ [Layton et al., 2010]. Общата специфичност на биохимичните методи (конвенционални и търговски автоматизирани системи) беше 95% (105 коректно определени щамове от общо 110).



**Фигура 1.** Мултиплексна PCR за видово-специфична идентификация на *Enterococcus* spp. изолати. Ивица М, молекулярен маркер (100 bp); ивици 1-11, 14-19 *E. faecalis* (360 bp); ивици 12 и 13 *E. faecium* (215 bp)

**Таблица 7.** Видова идентификация на 110 клинични щамове *Enterococcus* spp. чрез фенотипни методи (конвенционални биохимични и молекулярно-генетични методи)

Вид биохимичен метод	Брой тествани щамове	Видова биохимична идентификация		Видова молекулярно-генетична идентификация		Съвпадение между биохимичен метод и PCR (Брой/%)
		Брой доказани щамове		Брой доказани щамове		
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	
Конвенционални тестове	50	45	5	49	1	46 (92,0%)
Vitek MS	60	49	11	50	10	59 (98,3%)
<b>Общо (n)</b>	<b>110</b>	<b>94</b>	<b>16</b>	<b>99</b>	<b>11</b>	<b>105 (95,4%)</b>

## 2. Разпределение на *Enterococcus* spp. изолатите според вида на клиничните материали

Клиничните материали, от които бяха изолирани щамовете ентерококи, включват кръв за хемокултура, урина, уретрални катетри, раневи секрети, пунктати, коремни аспирати, вагинални секрети, материали от дихателна система и кожа (Таблица 8). Повечето от щамовете са изолирани от урина (*E. faecalis*, n = 37, *E. faecium*, n = 5) и раневи секрети (*E. faecalis*, n = 36, *E. faecium*, n = 2).

Таблица 8. Видове *Enterococcus* spp. клинични изолати според локализацията на инфекцията

<i>Enterococcus</i> spp. от клинични материали n (%)		
Локализация	Вид	
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Хемокултури	8 (8%)	3 (3%)
Урина	37 (34%)	5 (4%)
Уретрален катетър	3 (3%)	0 (0%)
Раневи секрети, абсцеси	36 (33%)	2 (2%)
Коремни аспирати	3 (3%)	1 (1%)
други *	12 (11%)	0 (0%)
<b>Общо n, %</b>	<b>99 (90%)</b>	<b>11 (10%)</b>

\* вагинални секрети, бронхоалвеоларни лаважи, транстрахеален секрет, секрет от була, секрет от пъп, смив от кожа

## 3. Видова идентификация на фекалните *Enterococcus* spp. изолати

Идентификацията на ентерококовите щамове, изолирани от фецес, беше осъществена до вид чрез конвенционални биохимични тестове. Малко повече от половината от коменсалите (54%, n = 42) бяха идентифицирани като *E. faecalis*, а само един изолат като *E. hirae*. Разпределението на фекалните изолати по видове и в проценти е представено в Таблица 9.

Таблица 9. Видово разпределение на *Enterococcus* spp. от фекални проби

Фекални изолати <i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. hirae</i>
<b>n = 78 (100%)</b>	42 (54%)	12 (15%)	15 (19%)	8 (10%)	1 (1%)

## 4. Антибиотична резистентност на *Enterococcus* spp. от клинични материали

Всички клинични изолати *Enterococcus* spp. бяха тествани за чувствителност към определен набор антибиотици чрез диск дифузионен метод на Kirby-Bauer. Моделът на устойчивост на отделните щамове към различни видове антибиотици и по материали е показан в Таблицы 10, 11, 12, 13 и 14. Значителен брой изолати на *Enterococcus* spp. са резистентни на представители на бета-лактамите (59% *E. faecalis*, 100% *E. faecium*), хинолоните (51% *E. faecalis*, 100% *E. faecium*) и аминогликозидите (54% *E. faecalis*, 91% *E. faecium*) (Таблица 10). Сред ampicillin устойчивите щамове ентерококи, доминират изолираните от раневи секрети (n = 30, съответно 28 *E. faecalis* и 2 *E. faecium*), последвани от изолираните от урина (n = 26, съответно 21 *E. faecalis* и 5 *E. faecium*) (Таблицы 11 и 12). Преобладаващата част от ciprofloxacin резистентните щамове, също бяха изолирани от урина (n = 29, съответно 24 *E. faecalis* и 5 *E. faecium*) и от раневи секрети (n = 15, съответно 13 *E. faecalis* и 2 *E. faecium*) (Таблицы 11 и 12). Високо ниво на

аминогликозидна резистентност към gentamicin (30 µg) проявяват повече от половината от тестваните щамове (57%, n = 63), от които 84% (n = 53) са *E. faecalis* (Таблица 10). В по-голямата си част HLGR-щамове - 56% (n = 35) бяха изолирани от урина – 30 *E. faecalis* (48%) и 5 *E. faecium* (8%) (Таблицы 11 и 12). Всички *E. faecalis* щамове бяха чувствителни на vancomycin.

Множествена лекарствена резистентност, т.е. устойчивост към три или повече антибиотични групи, беше установена при 39% (n = 43) от клиничните изолати *Enterococcus* spp. (съответно *E. faecalis*, n = 32 и *E. faecium*, n = 11) (Таблица 14). Двадесет и девет MDR изолата (*E. faecalis*, n = 22 и *E. faecium*, n = 7) показаха резистентност към три групи антибиотици, седем ентерококови щамове (*E. faecalis*, n = 2 и *E. faecium*, n = 5) са устойчиви към четири групи антибиотици и само един *E. faecium* изолат от урина, е резистентен към пет групи антибиотици.

Сред MDR-изолатите (n = 26, съответно 21 *E. faecalis* и 5 *E. faecium*), с най-голяма честота на разпространение са тези с едновременна устойчивост към ampicillin, ciprofloxacin и високо ниво на резистентност към gentamicin.

При четири от изследваните щамове *E. faecium* (три от хемокултури и един от урина) (Таблицы 10 и 13) беше отчетена резистентност към vancomycin (VA), комбинирана с A и CP или A, CP и HLGR (Таблица 14). Vancomycin-резистентен щам, изолиран от урина, беше устойчив и към другия тестван гликопептид – teicoplanin (TEC), докато инвазивните изолати са TEC - чувствителни. Всички тествани щамове на *E. faecalis* са VA-чувствителни и единствено един изолат от урина е TEC-резистентен. По отношение на резистентността към карбапенеми и глицилциклини, девет от тестваните изолати (8 *E. faecalis* и 1 *E. faecium*) показаха устойчивост към imipenem и пет изолата (4 *E. faecalis* и 1 *E. faecium*) - към tigecycline. Всеки от тези щамове се класифицира като MDR, поради проявена устойчивост към три и повече групи антибиотици. (Таблица 14).

Не беше установена статистически значима разлика между MDR *E. faecalis* и *E. faecium* и същите видове, резистентни към една или две групи антибиотици (p = 0,606), но статистически значими разлики съществуват между клиничните MDR изолати на двата вида ентерококи (p = 0.024) (Таблица 15).

**Таблица 10. Антимикробна резистентност на *Enterococcus* spp. клинични щамове според диск дифузионния метод на Kirby-Bauer**

Антибиотик	Резистентност (R)		
	<i>E. faecalis</i> (n, %)	<i>E. faecium</i> (n, %)	<i>Enterococcus</i> spp. (n, %)
ampicillin 2 µg	58 (59%)	11 (100%)	69 (63%)
gentamicin (HLGR) 30 µg	53 (54%)	10 (91%)	63 (57%)
ciprofloxacin 5 µg	50 (51%)	11 (100%)	61 (55%)
vancomycin 5 µg	0 (0%)	4 (36%)	4 (4%)
teicoplanin 30 µg	1 (1%)	1 (9%)	2 (2%)
imipenem 10 µg	8 (8%)	1 (9%)	9 (8%)
tigecycline 15 µg	4 (4%)	1 (9%)	5 (5%)



**Таблица 11. Модел на антибиотична резистентност на *E. faecalis* клинични щамове (n) по материали**

Клиничен материал	Антибактериален агент						
	<i>A</i>	<i>G<sub>30</sub></i>	<i>CP</i>	<i>VA</i>	<i>TEC</i>	<i>IPM</i>	<i>TYG</i>
хемокултура	1	4	5			1	
урина	18	29	23		1	5	
уринарен катетър	3	1	3				
раневи секрети, абсцеси	28	12	13			2	3
коремни пунктати	2	2	2				
материали от ДС*	2	3	3				1
вагинални секрети	2	2	1				
кожни секрети	2						

*A* – ampicillin, *CP* – ciprofloxacin, *GEN (HLGR)* – високо ниво на резистентност към gentamicin; *TG* – tigecycline, *IPM* – imipenem, *TEC* – teicoplanin, *VA* – vancomycin

\* ДС – дихателна система

**Таблица 12. Модел на антибиотична резистентност на *E. faecium* клинични щамове (n) по материали**

Клиничен материал	Антибактериален агент						
	<i>A</i>	<i>G<sub>30</sub></i>	<i>CP</i>	<i>VA</i>	<i>TEC</i>	<i>IPM</i>	<i>TYG</i>
хемокултура	3	2	3	3			
урина	5	5	5	1	1	1	
раневи секрети, абсцеси	2	2	2				
коремни пунктати	1	1	1				1

**Таблица 13. Модел на антибиотична резистентност на *Enterococcus spp.* клинични щамове (n) по клинични материали**

Клиничен материал	Антибактериален агент						
	<i>A</i>	<i>G<sub>30</sub></i>	<i>CP</i>	<i>VA</i>	<i>TEC</i>	<i>IPM</i>	<i>TYG</i>
хемокултура	4	6	8	3		1	
урина	23	32	28	1	2	6	
уринарен катетър	3	1	3				
раневи секрети, абсцеси	30	16	15			2	3
коремни пунктати	3	3	3				1
материали от ДС*	2	3	3				1
вагинални секрети	2	2	1				
кожни секрети	2						
<b>Общо (n)</b>	<b>69</b>	<b>63</b>	<b>61</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>5</b>

\* ДС – дихателна система

Таблица 14. Множествена резистентност на клинични щамове *Enterococcus spp.*

MDR - профил	<i>E.faecalis</i> (n)	<i>E.faecium</i> (n)	<i>Enterococcus spp.</i> (n)
A-CP-G (HLGR)	21	5	26
A-CP-TG	1		1
A-CP-G-(HLGR), TG	1	1	2
A-CP-G (HLGR)-IPM	3	1	4
CP-G (HLGR)-TEC	1		1
CP-G (HLGR)-IPM	3		3
CP-G (HLGR)-TG	1		1
G (HLGR)-TG-IPM	1		1
A- CP -VA		1	1
A-CP-G (HLGR)-VA		2	2
A-CP-G (HLGR)-VA-TEC		1	1
Общо MDR изолати (n)	32	11	43

Таблица 15. Корелация между не-MDR и MDR клинични изолати *Enterococcus spp.*

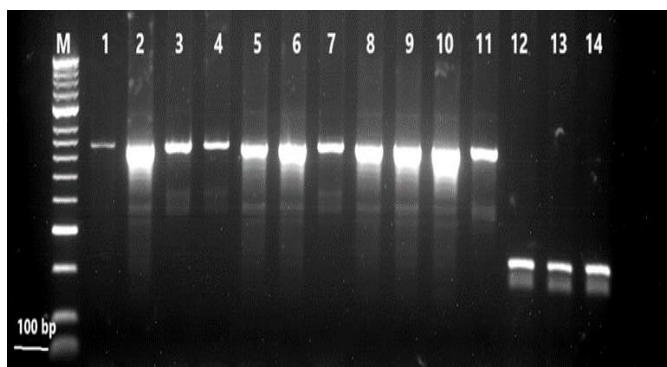
<i>Enterococcus spp.</i>	$\chi^2$ Наблюдавана стойност/ Критична стойност	р- стойност*	Значимост
Не-MDR <i>Enterococcus spp.</i> – MDR <i>Enterococcus spp.</i>	0.266/3.841	0.606	Не
MDR <i>E. faecalis</i> - MDR <i>E. faecium</i>	6.131/3.245	0.024	Да

\* разликите са статистически значими при  $p < 0,05$

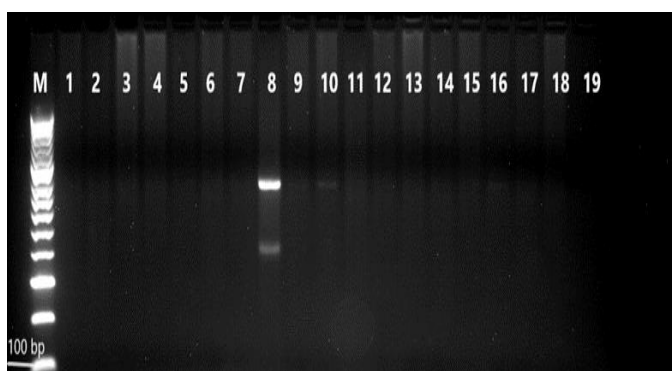
По отношение присъствието на гени за антимикробна резистентност (Таблица 16, Фигури 2 и 3), доминират тези, детерминиращи високо ниво на устойчивост към аминогликозиди (*aac(6')/aph(2'')*) и хинолони (*emeA*). Наличието на потвърдена чрез диск дифузионен метод експресия е 98% (n = 108) от тестваните 110 щамове (*E. faecalis*, n = 97 и *E. faecium*, n = 11). Съответните гени не бяха открити при четири (2 *E. faecalis* изолата от урина и 2 *E. faecalis* изолата - от урина и хемокултура) щамове. Следващият по-честота на разпространение е *vanA* генът, открит при 17% (n = 19) *Enterococcus spp.*, изолирани предимно от урина, но експресията на този ген беше доказана само при три от тях, отчетени като VA-резистентни, според използвания диск дифузионен метод. Един от трите VA-резистентни щамове е устойчив и към втория тестван гликопептид - teicoplanin. Нито един от изследваните щамове не експресира *vanB* генотип. Кодиращият резистентност към бета-лактами *TEM* ген беше открит в 6% от щамовете (n = 6), въпреки че четири от тях бяха чувствителни към ampicillin, според резултатите от диск дифузионния метод на Kirby-Bauer.

Таблица 16. Разпространение и разпределение на гени за антимикробна резистентност сред *Enterococcus spp.* клинични изолати

Гени за антимикробна резистентност	<i>E.faecalis</i> (n)	<i>E.faecium</i> (n)	Общо n (%)
<i>TEM</i>	4	2	6 (6%)
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	97	11	108 (98%)
<i>emeA</i>	97	11	108 (98%)
<i>vanA</i>	15	4	19 (17%)
<i>vanB</i>	0	0	0 (0%)



**Фигура 2.** Мултиплексен PCR за откриване на гени за антимикробна резистентност. Пътека М, молекулярен маркер (100 bp); пътеки 1-11, *emeA* положителен *E. fecalis* (687 bp); пътеки 12-14 *aac(6')/aph(2'')* положителен *E. fecalis* (220 bp); всички тествани щамове (пътеки 1-14) са *TEM* (535 bp) отрицателни



**Фигура 3.** Мултиплексен PCR за откриване на *vanA* и *vanB* гени. Пътека М, молекулярен маркер (100 bp); пътека 8, *vanA* положителен *E. fecalis* (732 bp); всички тествани щамове (пътеки 1-19) са отрицателни за *vanB* (297 bp)

Разпространението на гените за антимикробна резистентност, сред клиничните изолати *Enterococcus* spp. по материали е представено в **Таблица 17**. Преобладават щамове, изолирани от урини и раневи секрети, при които се доказва едновременна експресия на *aac(6')/aph(2'')* и *emeA* гените. Те бяха изолирани от всички видове клинични материали, като най-често се срещаха в урини и раневи секрети (съответно  $n = 37$  и  $n = 31$ ), но преобладаваха и сред инвазивните изолати (64%,  $n = 7$ ). Щамове, при които бяха открити едновременно три гена за антимикробна резистентност, също бяха изолирани предимно от урини и раневи секрети. Във всички инвазивни изолати се доказва наличие на гени за антимикробна резистентност, като един от изолатите притежаваше четири от петте проучвани гена (*aac(6')/aph(2'')* + *emeA* + *VanA* + *TEM*). Ген *vanA* беше доказан в 75% от тестваните вансомусин-резистентни ентерококи. *TEM* и *vanB* гените не бяха доказани самостоятелно в нито един от щамове, изолирани от клиничните материали.

Таблица 17. Разпространение на гени за антимикуробна лекарствена резистентност, сред 110 клинични щама *Enterococcus spp.*, по материали

Гени за антимикуробна резистентност	<i>Enterococcus spp.</i>							Общо
	хемокултури	урини	раневни секрети	коремни пунктати	материали от ДС*	вагинални секрети	материали от кожа	
<i>TEM</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>emeA</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>vanA</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>vanB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>aac(6')/aph(2'')</i> + <i>emeA</i>	7	37	31	4	3	2	2	86
<i>aac(6')/aph(2'')</i> + <i>emeA</i> + <i>VanA</i>	2	6	6	0	0	1	0	15
<i>aac(6')/aph(2'')</i> + <i>emeA</i> + <i>TEM</i>	0	2	1	0	0	0	0	3
<i>aac(6')/aph(2'')</i> + <i>emeA</i> + <i>VanA</i> + <i>TEM</i>	1	0	0	0	0	1	1	3

\* материали от дихателна система

Разпространението на гените за антимикробна резистентност сред MDR *Enterococcus* spp. клиничните изолати, е представено в Таблица 18. С най-висок процент на разпространение е комбинацията *aac(6')/aph(2'') + emeA* (гени, детерминиращи високо ниво на устойчивост към gentamicin и към хинолони) (78%, n = 86), следвани от множественорезистентните ентерококи, носещи комбинацията от гени *aac(6')/aph(2'') + emeA + vanA* (13%, n = 14). Присъствието на *vanB* ген не беше доказано сред MDR ентерококите, а *vanA* и *emeA* гените бяха открити поотделно в два от тестваните щамове – *E. faecalis*, изолирани от урина.

**Таблица 18. Разпространение и разпределение на гени за антимикробна резистентност сред MDR *Enterococcus* spp. клинични изолати**

Гени за антимикробна резистентност	MDR <i>E. faecalis</i> (n)	MDR <i>E. faecium</i> (n)	Общо n (%)
<i>vanB</i>	0	0	0 (0%)
<i>vanA</i>	1	0	1 (1%)
<i>emeA</i>	1	0	1 (1%)
<i>aac(6')/aph(2'') + emeA</i>	80	6	86 (78%)
<i>aac(6')/aph(2'') + emeA + vanA</i>	11	3	14 (13%)
<i>aac(6')/aph(2'') + emeA + TEM</i>	2	1	3 (3%)
<i>aac(6')/aph(2'') + emeA + vanA + TEM</i>	2	1	3 (3%)

## 5. Биофилм формираща активност на *Enterococcus* spp. изолати

### 5.1. Доказване на биофилм-формираща способност при *Enterococcus* spp. от клинични материали

Всички 110 клинични изолата *Enterococcus* spp. (99 *E. faecalis*, 11 *E. faecium*) бяха тествани за способността им да формират биофилм, паралелно чрез три метода - Метод на Christensen, Модифициран метод със сафранин и Микрометод върху плаки (Microplate метод).

Обобщени резултати за биофилм-формиращата способност на *Enterococcus* spp. клиничните изолати, включително и при трите използвани метода, са представени в Таблицы 19 и 20. Способност за формиране на биофилм беше установена при 48% (n = 53) клинични изолата, от които 87% *E. faecalis* (n = 46) и 13% *E. faecium* (n = 7) (Таблица 19). Най-голям брой биофилм "+" ентерококи бяха изолирани от урина (60%, n = 32).

Чрез Microplate метода установихме 34% (n = 18) силно, 45% (n = 24) умерено и 21% (n = 11) слабо биофилм-формиране при клинични щамове *Enterococcus* spp. (Таблица 20). Почти идентични са резултатите от двата метода, извършвани в епруветки и отчитани визуално (метод на Christensen с кристалвиолет и модифициран метод със сафранин).

Анализът на данните не разкрива значима разлика между клиничните изолати на двата вида (*E. faecalis* и *E. faecium*) по отношение на способността им да формират биофилм (p = 0,945) (Таблица 21).

**Таблица 19. Формиране на биофилм при клинични изолати *Enterococcus* spp.**

<i>Enterococcus</i> spp. клинични изолати	Биофилм-формиращи изолати n	Биофилм-формиращи изолати %
<i>E. faecalis</i> (n=99)	46	87%
<i>E. faecium</i> (n=11)	7	13%
Общо (n=110)	53	48%

**Table 20. Изпитване на биофилм-формиращата способност на *Enterococcus* spp. клинични изолати чрез три различни метода**

Формиране на биофилм	Метод на Christensen с кристалвиолет n (%)	Модифициран метод със сафранин n (%)	Microplate метод n (%)
силно	24 (40%)	22 (37%)	18 (34%)
умерено	27 (45%)	29 (48%)	24 (45%)
слабо	9 (15%)	9 (15%)	11 (21%)
липсва	50 (45%)	50 (45%)	57 (52%)

**Таблица 21. Корелация между биофилм-формиращи *E. faecalis* и *E. faecium* клинични изолати**

Вид (n)	Биофилм-формиращи изолати (n)	$\chi^2$ Наблюдавана стойност/ Критична стойност	p*	Значимост
<i>E. faecalis</i> , n = 99	46	0,005/3,841	< 0.945	Не
<i>E. faecium</i> , n = 11	7			

\* разликите са статистически значими при  $p < 0,05$

## 5.2. Доказване на биофилм-формираща способност при *Enterococcus* spp. от фекални проби

Разпределение на видовете и способността за формиране на биофилм при ентерококите, изолирани от фекални проби, са представени в **Таблица 22**. От 78 тествани щамове, 17% ( $n = 13$ ) проявяват биофилм-формираща способност: *E. faecium*,  $n = 2$ , *E. gallinarum*,  $n = 7$  и *E. casseliflavus*,  $n = 4$ . Налице е статистически значима разлика ( $p < 0,0001$ ) при отделните видове ентерококи по отношение на биофилм-формиращата им способност, което доказва, че същата е видово специфична. Останалите 42 фекални изолата на *E. faecalis*, както и единствения изолат *E. hirae*, са биофилм отрицателни. Установена е статистически значима разлика между някои от видовете с фекален произход, формиращи биофилм: *E. faecalis* - *E. gallinarum*, *E. faecalis* - *E. casseliflavus*, *E. faecium* - *E. gallinarum*, *E. faecium* - *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* - *E. hirae*, *E. casseliflavus* - *E. hirae* (**Таблица 23**).

**Таблица 22. Разпределение на видовете и способност за биофилм-формирание сред *Enterococcus* spp. с фекален произход**

Вид (n)	Биофилм-формиращи щамове (n)	Биофилм-формиращи щамове (%)
<i>E. faecalis</i> , n = 42	0	0%
<i>E. faecium</i> , n = 12	2	17%
<i>E. gallinarum</i> , n = 15	7	58%
<i>E. casseliflavus</i> , n = 8	4	31%
<i>E. hirae</i> , n = 1	0	0%
<b>Общо, n = 78</b>	<b>13</b>	<b>17%</b>

**Таблица 23. Корелация между биофилм-формиращи фекални щамове *Enterococcus* spp.**

<i>Enterococcus</i> spp. фекални изолати	$\chi^2$ Наблюдавана стойност/ Критична стойност	Значимост
<i>E. faecalis</i> - <i>E. gallinarum</i>	0.875/0.360	Да
<i>E. faecalis</i> - <i>E. casseliflavus</i>	1.000/0.000	Да
<i>E. faecium</i> - <i>E. gallinarum</i>	0.675/0.531	Да
<i>E. faecium</i> - <i>E. casseliflavus</i>	0.800/0.390	Да
<i>E. gallinarum</i> - <i>E. hirae</i>	0.875/0.360	Да
<i>E. casseliflavus</i> - <i>E. hirae</i>	1.000/0.000	Да

Сравнявайки способността за формиране на биофилм между клинични и фекални изолати, беше открита положителна зависимост между двете групи (Таблица 24), което е предпоставка за определяне значението на тази характеристика по отношение появата и разпространението на ентерококови инфекции.

**Таблица 24. Корелация между биофилм-формиращи клинични и фекални щамове *Enterococcus* spp.**

Вид проби/Брой (n)	Биофилм-формиращи изолати (n)	p*	Значимост
Клинични изолати, n = 110	53	< 0.0001	Да
Фекални проби, n = 78	13		

\* разликите са статистически значими при  $p < 0,05$

#### **6. Връзка между множествена резистентност и биофилм формиране при клинични изплати *Enterococcus* spp.**

При 67 % (n = 29) от MDR *Enterococcus* spp. щамове (*E. faecalis*, n = 22 и *E. faecium*, n = 7) беше установена способност за формиране на биофилм (Таблица 25).

Мнозинството от MDR, биофилм „+“ *E. faecalis* (n = 13), са изолирани от урина, последвани от щамове, изолирани от раневи секрети (n = 5). Установи се само един инвазивен изолат. Всички MDR, биофилм „+“ *E. faecalis*, според диск дифузионния метод на Kirby-Bauer, са устойчиви на ampicillin, ciprofloxacin и gentamicin 30 µg, с изключение на два щам, изолирани от урина, които показват чувствителност към ampicillin, но пък са устойчиви на imipenem. По отношение на гените за резистентност - *aac(6')/aph(2'')* се доказа при 96% (n = 21) от множествено резистентните, биофилм-формиращи *E. faecalis* и липсва само при един щам, изолиран от урина. Подобни резултати са установени и за *emeA* генът, който липсва само при два щам, изолирани от урина. *VanA* ген се откри в четири щам, а *TEM* ген не се доказа.

По-голямата част от множествено резистентните, биофилм-формиращи *E. faecium* щамове, са изолирани от урина (n = 5), а два щам - от раневи секрети. Не се изолират инвазивни MDR, биофилм „+“ *E. faecium*. Както и при *E. faecalis*, всички седем MDR, биофилм „+“ *E. faecium*, според диск дифузионния метод на Kirby-Bauer са устойчиви на ampicillin, ciprofloxacin и gentamicin 30 µg. При всички тях се доказаха гените за резистентност *emeA* и *aac(6')/aph(2'')*. При два от щамове, изолирани от урина, е наличен и *vanA* генът, но само единият от тях е устойчив към тестваните по дифузионния метод гликопептиди (vancomycin и teicoplanin). Ген *TEM* е доказан само при един от биофилм „+“ *E. faecium* щамове, изолиран от раневи секрет.

Таблица 25. Множествена антибиотична резистентност и формиране на биофилм при клинични щамове *Enterococcus spp.*

Антибиотичен профил MDR <i>Enterococcus spp.</i>	<i>E. faecalis</i> (n)	Биофилм „+“	<i>E. faecium</i> (n)	Биофилм „+“
A-CP-G (HLGR)	21	17	5	5
A-CP-TG	1	0	0	0
A-CP-G-(HLGR), TG	1	1	1	0
A-CP-G (HLGR)-IPM	3	2	1	1
CP-G (HLGR)-TEC	1		0	0
CP-G (HLGR)-IPM	3	2	0	0
CP-G (HLGR)-TG	1		0	0
G (HLGR)-TG-IPM	1		0	0
A- CP -VA	0		1	0
A-CP-G (HLGR)-VA	0		2	0
A-CP-G (HLGR)-VA-TEC	0		1	1
<b>Общо (n)</b>	<b>32</b>	<b>22</b>	<b>11</b>	<b>7</b>

Не беше открита статистически значима разлика между биофилм „+“ MDR щамове *E. faecalis/E. faecium* и биофилм „-“ MDR щамове от същия вид ( $p = 0,232$ ) (Таблица 26), но се установи, че сред изолатите от различните видове (*E. faecalis* и *E. faecium*), които проявяват MDR, преобладават тези с биофилм „+“ профили и разликата е статистически значима ( $p = 0,005$ ) (Таблица 26).

Таблица 26. Корелация между биофилм и множествена резистентност сред клинични щамове *Enterococcus spp.*

Биофилм и резистентност	$\chi^2$ Наблюдавана стойност/ Критична стойност	р- стойност *	Значимост
биофилм „+“, MDR <i>Enterococcus spp.</i> - биофилм „-“, MDR <i>Enterococcus spp.</i>	1.438/3.841	0.232	Не
биофилм „+“, MDR <i>Enterococcus spp.</i> - биофилм „+“ моно-, би-резистентни <i>Enterococcus spp.</i>	7.760/3.841	0.005	Да

\* разликите са значими при р-стойност < 0,05

## 7. Разпространение на фактори на вирулентност сред *Enterococcus spp.* клинични изолати

### 7.1. Фенотипна продукция на цитолизин (хемолизин) и екстрацелуларна металоендопептидаза (желатиназа) (Фигури 12 и 13)

#### 7.1.1. при клинични изолати *Enterococcus spp.*

От 110 клинични *Enterococcus spp.* изолати, бяха подбрани 100 клинични щамове (*E. faecalis*,  $n = 85$  и *E. faecium*,  $n = 15$ ) за тестване наличието на факторите на вирулентност цитолизин и желатиназа чрез фенотипни методи.

Получените резултати разкриват, че 17% ( $n = 17$ ) от тестваните 100 *Enterococcus spp.* клинични щамове, съответно 18% *E. faecalis* ( $n = 15$ ) и 13% *E. faecium* ( $n = 2$ ), демонстрират фенотипно единствено продукция на цитолизин (Таблица 27). Фенотипна продукция само на желатиназа беше отчетена в 21% ( $n = 21$ ) от анализиранияте щамове, с тенденция да се проявява по-често при *E. faecalis* (24%,  $n = 20$ ), отколкото при *E. faecium* (7%,  $n = 1$ ). Преобладаваща



продукция на цитолизин и желатиназа се установи предимно при ентерококови изолати от урина и раневи секрети, в сравнение с други клинични материали. Двадесет и един процента от *E. faecalis* (n = 18) показват комбинирана продукция на цитолизин и желатиназа, като повече от половината (56%, n = 10) са изолирани от урина. Щамове на *E. faecium*, експресиращи едновременно и двата фактора на вирулентност не са наблюдавани. При 44% (n= 44) от проучените щамове (*E. faecalis*, n = 32 и *E. faecium*, n = 12) не се доказва фенотипна проява на нито един от двата изследвани фактора на вирулентност.

**Таблица 27. Фенотипна изява на фактори на вирулентност при щамове на *Enterococcus* spp. от клинични проби**

Вид	Продукция на цитолизин n (%)	Продукция на желатиназа n (%)	Едновременна продукция на цитолизин и желатиназа n (%)	Едновременно цитолизин и желатиназа отрицателни n (%)
<i>E. faecalis</i> , n =85	15 (18%)	20 (24%)	18 (21%)	32 (38%)
<i>E. faecium</i> , n =15	2 (13%)	1 (7%)	0 (0%)	12 (80%)
<b>Общо, n=100</b>	17 (17%)	21 (21%)	18 (18%)	44 (44%)

#### 7.1.2. при фекални изолати *Enterococcus* spp.

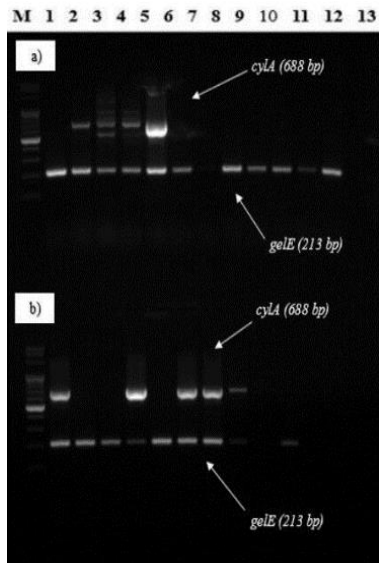
Сред тестваните 78 *Enterococcus* spp., само два щамове показват желатиназна активност (съответно *E. faecium*, n = 1 и *E. casseliflavus*, n = 1) и два щамове (съответно *E. faecium*, n = 1 и *E. casseliflavus*, n = 1), проявяват едновременна продукция на цитолизин и желатиназа (Таблица 28).

**Таблица 28. Фенотипна изява на фактори на вирулентност при *Enterococcus* spp. от фекални проби**

Вид (n)	Продукция на цитолизин n (%)	Продукция на желатиназа n (%)	Едновременна продукция на цитолизин и желатиназа n (%)	Едновременно цитолизин и желатиназа отрицателни n (%)
<i>E. faecalis</i> , n = 42	0	0	0	0
<i>E. faecium</i> , n = 12	0	1	1	0
<i>E. gallinarum</i> , n = 15	0	0	0	0
<i>E. casseliflavus</i> , n = 8	0	1	1	0
<i>E. hirae</i> , n = 1	0	0	0	0
<b>Общо, n = 78</b>	0	2	2	0

## 7.2. Доказване на гените (*cytA* и *gelE*), кодиращи цитолизин и желатиназа

Наличието на гените *cytA* и *gelE* доказахме молекулярно-генетично чрез мултиплекс PCR (Фигура 4).



Фигура 4 а) и б). Мултиплексен PCR за откриване на *cytA* и *gelE* гени. Пътека М, молекулярен маркер (100 bp); пътеки 1-12, вирулентни гени сред *Enterococcus* spp.; пътека 13 - отрицателна контрола.

Кодиращият желатиназа *gelE* ген е с по-висока честота на разпространение сред анализирани ентерококи в сравнение с *cytA*. Среща се при 45% от щамове на *E. faecalis* (n = 38) и в 67% от *E. faecium* (n = 10) (Таблица 29). Присъствието на *gelE* се установява в по-голяма степен при щамове от уринарен тракт (n = 22), последвани от изолати от раневи секрети (n = 11) и само при три от 10 (30%) инвазивни изолати. Установи се преобладаване на щамове *E. faecalis*, експресиращи *gelE* ген (45%, n = 38) и фенотипно положителни за желатиназа (24%, n = 20). *CytA* генът се доказва самостоятелно само в четири *E. faecalis* (при три изолата от раневи секрети и при един от урина) и никога самостоятелно в хемокултури. Двадесет и шест процента от щамове (25 *E. faecalis* и само 1 *E. faecium*) притежават едновременно *cytA* и *gelE* гените, а 22% (18 *E. faecalis* и 4 *E. faecium*) - нито един двата гена, кодиращи факторите на вирулентност хемолизин и желатиназа.

Таблица 29. Детекция на *cytA* и *gelE* гени на вирулентност в клинични щамове *Enterococcus* spp.

Вид	<i>cytA</i> ”+” / <i>gelE</i> ”-“ (n / %)	<i>cytA</i> ”-“ / <i>gelE</i> ”+” (n / %)	Едновременно <i>cytA</i> и <i>gelE</i> “+” (n / %)	Едновременно <i>cytA</i> и <i>gelE</i> “-“ (n / %)
<i>E. faecalis</i> , n=85	4 (5%)	38 (45%)	25 (29%)	18 (21%)
<i>E. faecium</i> , n=15	0 (0%)	10 (67%)	1 (7%)	4 (26%)
Общо, n=100	4 (4%)	48 (48%)	26 (26%)	22 (22%)

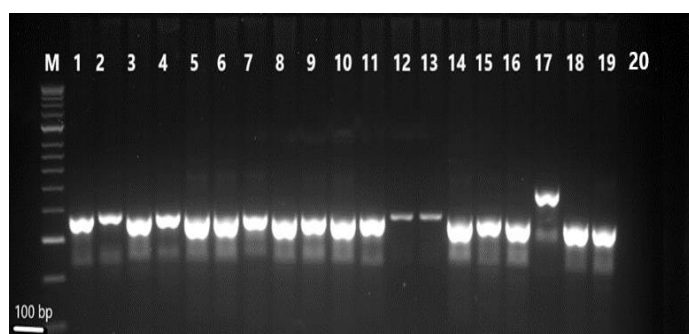
Установи се, че разпространението на вирулентните детерминанти във всеки разгледан шам, доказано чрез фенотипните и молекулярно-генетичните методи е в различни пропорции, както е обобщено в Таблица 30.

**Таблица 30.** Корелация на фенотип и генотип при *Enterococcus* spp. клинични щамове по отношение на вирулентността

	Производство на цитолизин/ <i>cytA</i> + / <i>gelE</i> - (n/%)	Производство на желатиназа/ <i>cytA</i> -/ <i>gelE</i> + (n/%)	Едновременна продукция на цитолизин и желатиназа/ Едновременно <i>cytA</i> и <i>gelE</i> “+” (n/%)	Едновременно цитолизин и желатиназа отрицателни/ Едновременно <i>cytA</i> и <i>gelE</i> “-” (n/%)
съответствие между фенотип и генотип	3 (3%)	17 (17%)	15 (15%)	14 (14%)
различия между фенотип и генотип	14 (14%) 3 щама <i>cytA</i> +/ <i>gelE</i> + 3 щама <i>cytA</i> -/ <i>gelE</i> - 3 щама <i>cytA</i> -/ <i>gelE</i> +	5 (5%) 2 щама <i>cytA</i> +/ <i>gelE</i> + 3 щама <i>cytA</i> -/ <i>gelE</i> -	3 (3%) 2 щама <i>cytA</i> -/ <i>gelE</i> - 1 щам <i>cytA</i> -/ <i>gelE</i> +	30 (30%) 6 щама <i>cytA</i> +/ <i>gelE</i> + 23 щама <i>cytA</i> -/ <i>gelE</i> + 1 щам <i>cytA</i> +/ <i>gelE</i> -

### 7.3. Разпространение на quorum-sensing регулиращите гени *asaI* и *esp* сред *Enterococcus* spp. клинични изолати

Данните от проведената мултиплексна PCR, по отношение на гени *asaI* и *esp*, кодиращи съответно агрегиращата субстанция и ентерококовия повърхностен протеин при проучваните щамове, са представени на **Фигура 5** и в **Таблица 31**. По-висока честота на разпространение се наблюдава при *asaI* генът, който се доказва в 85% от изследваните ентерококови щамове (*E. faecalis*, n = 86 и *E. faecium*, n = 8). *Esp* генът се открит при 14% от щамовете (*E. faecalis*, n = 11 и *E. faecium*, n = 4). Само при четири щама *E. faecalis* (три от урина и един от хемокултура) са налични едновременно и двата гена, а единственият изолат от същия вид, отрицателен и за двата гена, е изолиран от раневи секрет. Не се откри статистическа значимост между *esp/asaI*-позитивните *E. faecalis* и *E. faecium* и същите видове, които не притежават тези гени (**Таблица 32**).



**Фигура 5.** Мултиплексен PCR за откриване на quorum-sensing регулиращите *asaI* и *esp* гени. Пътека М, молекулярен маркер (100 bp); пътеки 1-11, 14-16 и 18-19 *asaI* положителен *E. faecalis* (375 bp); пътеки 12 и 13 *asaI* положителен *E. faecium* (375 bp); лента 17 *esp* положителен *E. faecalis* (510 bp); пътека 20 отрицателна контрола

**Таблица 31. Разпределение на гените *asa1* и *esp*, сред *Enterococcus* spp. клинични щамове**

<i>Enterococcus</i> spp.	Quorum-sensing регулиращи гени		
	<i>asa1</i>	<i>esp</i>	<i>asa1</i> + <i>esp</i>
<i>E. faecalis</i> , n	86	8	4
<i>E. faecium</i> , n	8	3	0
Общо, n (%)	94 (85%)	11 (10%)	4 (4%)
р-стойност*	0,165		

\**E. faecalis* vs *E. faecium*, разликите са статистически значими при р-стойност < 0.05

**Таблица 32. Корелация между *esp/asa1*-позитивните и *esp/asa1*-отрицателните клинични щамове *E. faecalis* и *E. faecium***

<i>E. faecalis</i> / <i>E. faecium</i>	$\chi^2$ Наблюдавана стойност/ Критична стойност	р-стойност*	Значимост
<i>asa1</i> "+" спрямо <i>asa1</i> "-"	3,367/3,841	0,067	Да
<i>esp</i> "+" спрямо <i>esp</i> "-"	1,930/3,841	0,165	Да

\**E. faecalis* vs *E. faecium*, разликите са статистически значими при р-стойност < 0.05

Потенциалите на вирулентност на проучените клинични щамове *E. faecalis* и *E. faecium*, оценени според броя на доказаните в тях гени, кодиращи фактори на вирулентност, са представени в **Таблицы 33** и **34**. Както е видно от таблиците доминират щамове, притежаващи два гена (n = 49, съответно *E. faecalis*, n = 43 и *E. faecium*, n = 6), последвани от щамове с три гена (n = 29, съответно *E. faecalis*, n = 28 и *E. faecium*, n = 1). Не се доказаха щамове с едновременна експресия на изследваните четири гена. Щамове *E. faecalis*, притежаващи два гена, са изолирани предимно от урина (48%, n = 19) и раневи секрети (44%, n = 16). Единственият щам *E. faecium* с наличие на три гена, е изолиран от урина.

В **Таблица 35** е представена сравнителната честота на разпространение на гените за фактори на вирулентност при общия брой изследвани клинични *Enterococcus* spp. щамове, според локализацията на инфекцията.

*SylA* генът е най-разпространен сред щамове, изолирани от дихателна система (67%) и не е доказан при нито един от четирите щамове от коремни пункти. При останалите изолати, включително и инвазивните, *sylA* се наблюдава в около 30%. *GelE* генът е наличен при всички щамове, изолирани от дихателна система (100%). Доказа се и в сравнително висок процент сред изолатите от хемокултури (60%). *Asa1* генът се доказва при 80% от инвазивните изолати и между 75% и 100% при неинвазивните. Щамове, изолирани от материали от дихателна система, кожа и вагинални секрети, показват 100% наличие на *asa1*. *Esp* генът е с по-висока честота сред инвазивните изолати от хемокултури (40%), в сравнение с неинвазивните, при които се проявява в диапазона 3-25%. Най-висока честота на ген *esp* сред неинвазивните изолати се установи при щамове, изолирани от коремни пункти (25%).

Таблица 33. Потенциал на вирулентност при 100 щама *E. faecalis*, изолирани от клинични материали

Брой гени	<i>E. faecalis</i> със съответен брой гени						
	n (%)						
	Хемокултури (n = 8)	Урини (n = 40)	Раневни секрети (n = 36)	Коремни аспирати (n = 3)	Материали от ДС* (n = 3)	Вагинални секрети (n = 6)	Материали от кожа (n = 3)
<b>0</b>	0 (0%)	2 (5%)	7 (19%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>1</b>	2 (25%)	6 (15%)	7 (19%)	1 (33%)	0 (0%)	2 (33%)	1 (33%)
<b>2</b>	2 (25%)	19(48%)	16 (44%)	1 (33%)	1 (33%)	3 (50%)	1 (33%)
<b>3</b>	4 (50%)	13(33%)	6 (17%)	1 (33%)	2 (67%)	1 (17%)	1 (33%)
<b>4</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Общо, n (%)</b>	8 (100%)	38(95%)	29(81%)	3 (100%)	3 (100%)	6 (100%)	3 (100%)

\*материали от дихателна система – бронхоалвеоларен лаваж, транстрахеален секрет

**Таблица 34. Потенциал на вирулентност (според брой налични гени за фактори на вирулентност) при 100 щама *E. faecium*, изолирани от клинични материали**

Брой гени	<i>E. faecium</i> със съответен брой гени			
	n (%)			
	Хемокултури (n = 3)	Урини (n = 5)	Раневи секрети (n = 2)	Коремни аспирати (n = 1)
<b>0</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>1</b>	2 (67%)	1 (20%)	1 (50%)	0 (0%)
<b>2</b>	1 (33%)	3 (60%)	1 (50%)	1 (100%)
<b>3</b>	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>4</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Общо, n (%)</b>	3 (100%)	5 (100%)	2 (100%)	1 (100%)

**Таблица 35. Обща честота на разпространение на гените, кодиращи фактори на вирулентност, според локализацията на инфекцията при 100 клинични щамове *Enterococcus spp.***

Гени	Брой (%) <i>Enterococcus spp.</i> щамове със съответния ген по клинични материали							
	Хемокултури (n = 10)	Урини (n = 43)	Раневи секрети (n = 31)	Коремни аспирати (n = 4)	Материали от ДС* (n = 3)	Вагинални секрети (n = 6)	Материали от кожа (n = 3)	Общо (n = 100)
<i>cylA</i>	3 (30%)	13 (30%)	9 (29%)	0 (0%)	2 (67%)	1 (17%)	1 (33%)	29(29%)
<i>gelE</i>	6 (60%)	34 (79%)	20 (65%)	3 (75%)	3 (100%)	4 (67%)	2 (67%)	72(72%)
<i>esp</i>	4 (40%)	10 (13%)	1 (3%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	16(16%)
<i>asaI</i>	8 (80%)	33 (77%)	26 (84%)	3 (75%)	3 (100%)	6 (100%)	3(100%)	82(82%)

\*Материали от дихателна система – бронхоалвеоларен лаваж, транстрахеален секрет

#### 7.4. Множествена лекарствена резистентност и разпространение на *asaI/esp* гените сред *Enterococcus spp.* клинични щамове

Множествена лекарствена резистентност се доказва при 43 (39%) от изолатите (*E. faecalis*, 32% и *E. faecium*, 100%) (Таблица 36). Наблюдават се различни модели на резистентност, от които най-често срещания (61%) е *A-CP-G (HLGR)* (ампицилин-ципрофлоксацин-високо ниво на резистентност към гентамицин). Висок процент от щамовете, притежаващи този конкретен модел на антимикробна резистентност, притежават и quorum-sensing регулиращите гени *asaI* (81%, n = 21) и *esp* (19%, n = 5). От четирите щамове множествено резистентни и едновременно vancomycin-устойчиви *E. faecium* (единичен изолат от урина и три изолата от хемокултури), два притежават ген *asaI* и два – едновременно *asaI* и *esp*.

Установи се статистически значима разлика между ентерококовите щамове, положителни за *asaI/esp* ген или и двата едновременно, и притежаващи гени за антимикробна резистентност *emeA*, *TEM*, *aac(6')/aph(2')* или *vanA* (съответно  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,001$  и  $< 0,014$ ) (Таблица 37).

Таблица 36. Множествена антибиотична резистентност и разпространение на *esp/asaI* гените сред *Enterococcus spp.* клинични щамове

Множествена лекарствена резистентност модел	<i>E.faecalis</i> (n)	<i>E.faecium</i> (n)	<i>Enterococcus spp.</i>	
			<i>asaI</i> (+) (n)	<i>esp</i> (+) (n)
<i>A-CP-G (HLGR)</i>	21	5	21	5
<i>A-CP-TG</i>	1		1	
<i>A-CP-G-(HLGR), TG</i>	1	1	2	
<i>A-CP-G (HLGR)-IPM</i>	3	1	4	
<i>CP-G (HLGR)-TEC</i>	1		1	
<i>CP-G (HLGR)-IPM</i>	3		3	
<i>CP-G (HLGR)-TG</i>	1		1	
<i>G (HLGR)-TG-IPM</i>	1		1	
<i>A- CP -VA</i>		1	1	1
<i>A-CP-G (HLGR)-VA</i>		2	1	1
<i>A-CP-G(HLGR)-VA-TEC</i>		1	1	
<b>Общо (n)</b>	<b>32</b>	<b>11</b>	<b>37</b>	<b>7</b>

Таблица 37. Корелация между ентерококови изолати, притежаващи *asaI/esp* гени и носещи гени за антимикробна резистентност

Quorum-sensing регулиращи гени	Гени за антибиотична резистентност	
	<i>emeA</i> , <i>TEM</i> , <i>aac(6')/aph(2'')</i> , <i>VanA</i>	
	$\chi^2$ Наблюдавана стойност/ Критична стойност	p-стойност*
<i>asaI</i>	314,544 / 12,592	< 0,0001
<i>esp</i>	37,438 / 12,592	< 0,0001
<i>asaI+ esp</i>	16,000 / 12,592	< 0,014

\* p-стойност < 0,05 се счита за статистически значима



## ДИСКУСИЯ

Сред 110 тествани клинични изолати, 90% са идентифицирани като *E. faecalis* (n = 99) и 10% като *E. faecium* (n = 11). Подобно е разпространението на видовете в Северна и Латинска Америка (57-77% *E. faecalis*, 5-19% *E. faecium*) [Low et al., 2001], някои европейски (Норвегия, Дания, Швеция, Исландия, Италия) (75-83% *E. faecalis*, 16-25% *E. faecium*) [Simonsen et al., 2003; Zarrilli et al., 2005; Voccella et al., 2021] и азиатски страни (Египет, Иран, Саудитска Арабия, Непал) (съответно 69%-92% *E. faecalis* и 8%-11% *E. faecium*) [Mohammadi et al., 2011; Kara et al., 2019; El-Mahdy et al., 2018]. Доминирането на *E. faecalis* сред клинични изолати може да е свързано с факта, че този вид е представител на микробиотата в чревния лумен и чревната лигавица [Jandhyala et al., 2015].

За разлика от гореизложените данни, по-голямо разпространение на *E. faecium* от различни клинични материали, в сравнение с *E. faecalis*, е докладвано в Турция (55% *E. faecium*, 45% *E. faecalis*) и Китай (съответно 54% и 59% *E. faecium*, 28% и 33% *E. faecalis*) [Jia et al., 2014; Gök et al., 2020; Niu et al., 2016]. Смята се че увеличаването на разпространението на *E. faecium*, най-вероятно се дължи на обичайната резистентност на този вид към антимикробни лекарствени средства, като ampicillin, аминогликозиди и най-вече поради все по-честата поява на резистентност към гликопептиди [Gawryszewska et al., 2016].

*E. faecalis* е и най-често изолираният вид (54%) сред щамовете от фекални проби в нашето проучване, докато други автори съобщават обратна тенденция – преобладаване на *E. faecium* във фекални изолати (100%) [Ghaziasgar et al., 2019]. Вторият по разпространение сред коменсалите е *E. gallinarum* (19%), докато според други изследвания, процентът на изолиране на този вид е значително по-нисък (0.6%) [Silva et al., 2012]. По отношение присъствието на *E. hirae* във фекални проби, идентични на нашите резултати (1%), са получени в Бразилия и Португалия [Maschieto et al., 2004; Silva et al., 2012]. Разликите в разпространението на *Enterococcus* spp., изолирани от фецес, вероятно са резултат от устойчивостта и гъвкавостта на видовете, от различия, свързани с географските региони или с диетата, която може да промени състава на чревната микробна флора, или от неправилна идентификация на вида [Silva et al., 2012].

Повечето от тестваните клинични щамове ентерококи (41%), са изолирани от урина и от секрети от рани (33%). В предишни доклади от Италия (съответно 33% и 16%), Индия (52% и 38%, 60% и 12%) и Иран (93% и 3%, 65% и 13%), също се съобщава за висок процент на ентерококови инфекции на пикочните пътища, последвани от раневите инфекции [Padmasini et al., 2014; Ghaziasgar et al., 2019; Getso et al., 2020; Voccella et al., 2021; Shahi et al., 2022]. Тези данни подкрепят твърдението, че вариациите в степента на изолиране, зависят от географския район и вида на клиничните проби в конкретното изследване. Близостта на уретрата и ануса до перинеума, е вероятна причина за изолирането на преобладаващ брой *Enterococcus* spp. от урина [Getso et al., 2020].

Сред тестваните клинични изолати ентерококи, се доказва сравнително висок процент (10%) инвазивни щамове, сред които преобладаващ е вида *E. faecalis*. Различни проценти на изолиране на *Enterococcus* spp. от хемокултури са докладвани в литературата. В Гърция и Саудитска Арабия се съобщава за съответно 33% и 65% изолиране на инвазивни щамове, в сравнение с други клинични материали [Papadimitriou-Olivgeris et al., 2015; Somily et al., 2016]. В други проучвания в Европа и Северна Америка се съобщава за значително висока честота на ентерококовите инфекции на кръвния поток при хоспитализирани пациенти - 9-14 случая на 100 000 в Швейцария и 6,9 епизода на 100 000 в голям канадски регион [Billington et al., 2014; Buetti et al., 2017]. Въз основа на тези доклади, може да се направи изводът че случаите на нозокомиални ентерококови инфекции на кръвния поток нарастват и че общата смъртност при тях, варираща от 25–50%, е доста висока [Pinholt et al., 2014; Fiore et al., 2019; Santella et al., 2020].

Резистентните на антибиотици *Enterococcus* spp. са водещи причинители на вътреболнични инфекции на кръвния поток и пикочните пътища от 80-те години на миналия век [Gilmore et al., 2013]. Ентерококите са с вродена устойчивост към много групи антибиотици - цефалоспорини, сулфонамиди и ниски концентрации на аминогликозиди [Cetinkaya et al., 2000;

Billström et al., 2008; Hollenbeck and Rice, 2012;]. Въпреки установената чувствителност на ентерококите към тези антибиотици при *in vitro* експерименти, в клиничната практика е доказана незадоволителна ефикасност [Arias and Murray, 2012; Hollenbeck and Rice, 2012;].

Ентерококите са в състояние да придобиват лекарствена резистентност - чрез хромозомен трансфер или трансфер на плазмиди или транспозони, а в допълнение могат да обменят и гени за резистентност с други бактерии [Goudarzi et al., 2018]. Най-значимата резистентност, наблюдавана при ентерококите, на която се дължи и високият леталитет при инфекциите, причинени от тези микроорганизми, е резистентността към високо ниво на аминокликозиди, към ampicillin и към гликопептиди [Shah et al., 2012]. Придобитата резистентност към vancomycin и високото ниво аминокликозидна резистентност, ограничават възможностите за лечение на инфекциите, причинени от тези микроорганизми. Резистентността на ентерококите към такъв широк спектър от антибиотици, прави ефективното лечение на инфекциите, които причиняват, изключително голямо предизвикателство [Sharifi et al., 2013].

По отношение на антибиотичната резистентност, сред тестваните клинични щамове ентерококи, най-голям брой са устойчивите към аминопеницилини (63%), което е в съответствие с докладваните в литературата резултати [Khani et al., 2016]. Установената в настоящата разработка резистентност на *E. faecalis* и *E. faecium* към ampicillin, се оказва много по-висока от докладваната за нашата страна от 2013 г. насам (съответно 59% спрямо 1.9% и 9.3% при *E. faecalis* и 100% спрямо 88.4% и 93.6% при *E. faecium*) [<https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>]. Подобни на нашите резултати (съответно 55% и 69%) относно ampicillin-резистентните щамове са съобщени в Китай и в Турция [Tian et al., 2019; Gök et al., 2020]. *TEM* генът, отговорен за един от механизмите на устойчивост към бета-лактами при ентерококите, а именно производството на  $\beta$ -лактамаза, се доказва при 6% от тестваните клинични щамове (4% *E. faecalis* и 18% *E. faecium*) и винаги в комбинация с други гени за антибиотична резистентност. В Китай обаче е докладван много по-висок процент на разпространение на *TEM* гена в различни щамове – съответно 95% *E. faecalis* и 47% *E. faecium* [Jia et al., 2014].

Докато механизмите на вродена резистентност сред *Enterococcus* spp. предполагат ниско ниво на устойчивост към аминокликозиди, то трансферът на мобилни генетични елементи е в основата на придобиване на високо ниво на резистентност към аминокликозиди сред *E. faecium* и *E. faecalis* видовете [Hollenbeck and Rice, 2012]. Високо ниво на аминокликозидна резистентност при ентерококите е съобщено за първи път във Франция през 1979 г. и оттогава е причина за сериозни проблеми в болниците по цял свят [Li et al., 2015]. Аминокликозидите проявяват синергичен ефект в комбинация с бета-лактамни антибиотици или гликопептиди при терапия на ентерококови инфекции [Aydemir et al., 2020]. Този синергичен ефект обаче се губи, ако щамовете демонстрират високо ниво на резистентност към аминокликозиди [Ascione et al., 2019]. HLGR се свързва с повишаване на смъртността на популационно ниво, както се наблюдава в проучване в Дания, което анализира извадка от над 1000 пациенти с ентерококова инфекция [Pinholt et al., 2014]. Освен това, честотата на разпространение на високо ниво на резистентност към gentamicin, трябва да се има предвид и в протетичната хирургия, където gentamicin може да се използва в биоматериалите за намаляване риска от инфекция [Balato et al., 2015]. Последни проучвания показват, че HLGR сред ентерококите е по-често срещана от високото ниво на резистентност към streptomycin [Padmasini et al., 2014]. Резултатите, получени в настоящото изследване разкриват появата на притеснителна тенденция за по-висок процент на проявяващите високо ниво на резистентност към gentamicin (n = 63, 57%) щамове, в сравнение с докладваните в Европа, доближаващо се до резултатите на автори от Италия, Бангладеш и Иран (съответно 46% - 60%) [Zarrilli et al., 2005; Tamanna et al., 2014; Naghi et al., 2019; Voccella et al., 2021]. По-ниско ниво на разпространение на HLGR ентерококи (33%) е докладвано в Индия [Getso et al., 2020]. Въпреки че средният процент на HLGR *E. faecalis* щамове в Европейския съюз (ЕС) (с изключение на Обединеното кралство) и Европейската икономическа зона (ЕИЗ) за 2020 г. показва значителен спад спрямо 2016 г. (съответно 29% и 32%), се отбелязва доста голямо годишно увеличение на процента на HLGR *E. faecalis* (+ 3,7 процентни пункта) на ниво ЕС/ЕИО през 2020 г. спрямо периода 2016 г. – 2019 г. [[34](https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-</a></p></div><div data-bbox=)

and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net]. Високото ниво на резистентност към gentamicin сред *E. faecalis* щамове показва големи вариации между отделните държави, но обикновено по-високи проценти се съобщават от Южна и Източна Европа (например Италия – 36%, Унгария – 40%, Румъния – 37%, България – 48%, Словакия – 53%, Полша – 55%), отколкото в Северна Европа (Норвегия – 9% Швеция – 7%, Финландия – 0%), с няколко изключения [ECDC; 2021]. По отношение на HLGR сред *E. faecium* щамове в Европа, са докладвани по-високи проценти (Италия – 54%, Унгария – 54%, Норвегия – 60%, Словакия – 67%, България – 68%, Румъния – 70%, Холандия – 80%, Германия – 57%) [ECDC; 2021]. В настоящото проучване, гените за резистентност към аминогликозиди *aac* (6')-*Ie-aph* (2'')-*Ia*, се доказаха във всички тествани щамове, с изключение на 2 щамове *E. faecalis*, изолирани от урина. Сходни изследвания съобщават за по-ниска честота на разпространение на тези гени сред клинични изолати, като същите присъстват по-често в генома на *E. faecium* в сравнение с *E. faecalis* [Padmasini et al., 2014; Li et al., 2015, Woz'niak-Biel et al., 2019]. Въпреки че *aac* (6')-*Ie-aph* (2'')-*Ia* гена се доказва в 98% от изследваните щамове, 43% от тях са чувствителни към gentamicin 30 µg. Подобни резултати са докладвани и от други автори [Woz'niak-Biel et al., 2019]. Причините вероятно са свързани с широкото използване на аминогликозиди в хуманната медицина и аминоциклитолити (включително spectinomycin) във ветеринарната медицина [Giguere et al., 2013] и неактивността на гените и липсата на експресия [Vakulenko and Mobashery, 2003].

Според резултатите на автори от Турция, най-висок процент на резистентност сред тестваните щамове, е установен срещу ciprofloxacin (71%) [Gök et al., 2020]. По отношение на хинолоновата резистентност, ние също изолирахме голям брой ciprofloxacin-резистентни щамове (n = 61, 55%), а сравнително по-ниска честота (34%) на устойчиви на ciprofloxacin щамове е съобщена в Канада [Zhanel et al., 2013]. Генът *emeA* се доказва при 98% както ciprofloxacin-чувствителни, така и ciprofloxacin-устойчиви щамове *Enterococcus* spp. По-ниски проценти на ciprofloxacin-резистентни, *emeA*-позитивни щамове, са докладвани в Китай, което предполага наличието и на други механизми, участващи в резистентността на ентерококите към трите флуорохинолони в допълнение към ефлукса на лекарството [Jia et al., 2014]. Същите автори съобщават значително по-честа поява на *emeA* ген сред резистентните на флуорохинолони ентерококи, отколкото при чувствителните, което предполага, че все пак този ген е свързан с резистентността на *Enterococcus* spp. към тази група антибиотици [Jia et al., 2014].

Редица изследвания установяват, че инфекциите, причинени от vancomycin-резистентни ентерококи, са свързани с по-висока смъртност и икономическа тежест в сравнение с чувствителните към гликопептиди щамове [Carmeli et al., 2002; Salgado et al., 2008; Hautemaniere et al., 2009]. Най-честите рискови фактори за VRE-инфекции са продължителна хоспитализация, особено в отделенията за интензивно лечение, нецелесъобразна употреба на vancomycin и цефалоспорини от трета генерация, хронична диализа [Ghalandarzadeh Daryai et al., 2013; Amberpet et al., 2016]. Здравните работници също могат да разпространяват VRE, а домашните любимци могат да бъдат резервоар за тези видове [Sood et al., 2008; Pomba et al., 2017]. Vancomycin-резистентният *E. faecium* е един от патогените с висок приоритет в глобалния списък на Световната здравна организация с устойчиви към антибиотици бактерии, подчертавайки недостига на налични и ефективни възможности за лечение му [WHO, 2017]. Средният процент на резистентност към vancomycin при *E. faecium* за 2020 г., в ЕС/ЕИЗ (с изключение на Обединеното кралство) е 17% и значително се е увеличил от 2016 г., когато процентът е бил 12% [<https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>]. Националните проценти варират между 0% и 57% и само 11 от 29-те държави от ЕС/ЕИЗ съобщават проценти на устойчивост към vancomycin под 5% [<https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>]. Бързото и непрекъснато нарастване на процента vancomycin-резистентни *E. faecium* в ЕС/ЕИЗ е причина за безпокойство. Според проучване на Европейския център за контрол и превенция на заболяванията (ECDC), по отношение влиянието на антимикробната резистентност върху здравето, средният брой инфекции и смъртни случаи, дължащи се на VRE, почти се е удвоил между 2007 г. и 2015 г. [Cassini et al., 2019], а увеличението на процентите на резистентност, докладвани от 2016 г. насам, допринася за по-нататъшното повишаване на негативното влияние на VRE-инфекции върху здравето. Значително увеличаващата се

тенденция, наблюдавана на ниво ЕС/ЕИЗ (с изключение на Обединеното кралство) и в няколко отделни държави, подчертава спешната необходимост от внимателно и непрекъснато наблюдение, за да се разбере по-добре епидемиологията, клоновото разнообразие и рисковите фактори, свързани с инфекциите, причинени от vancomycin-устойчиви *E. faecium*. Противно на много други комбинации от бактериални видове и антимикробни групи, наблюдавани от EARSNet, не може да се състави ясен географски модел за резистентните на vancomycin *E. faecium*, докладвани от страни в Южна, Източна и Западна Европа [<https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>].

Въпреки че проучванията на антимикробната чувствителност на ентерококите в световен мащаб потвърждават повишаване на множествената резистентност и особено устойчивостта към vancomycin [Asadollahi et al., 2018; Samani et al., 2021; <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>], 96% от българските изолати са чувствителни към този антибиотик. Подобни резултати са получени и от други автори, които съобщават за чувствителни към vancomycin (VSE) ентерококи в Индия (77%), Египет (97%), Турция (61%) и в Канада (99%) и [Karmarkar et al., 2004; Zhanel et al., 2013; Hashem et al., 2017; Gök et al., 2020;]. Сред тестваните от нас щамове, не се доказват vancomycin-резистентни *E. faecalis*. Същата тенденция е съобщена и в проучвания от Етиопия, Иран и Китай [Ferede et al., 2018; Naghi et al., 2019; Tian et al., 2019]. В съответствие с преди докладвани резултати, по-голямата част всички тествани резистентни на vancomycin щамове притежават MDR модел [Toru et al., 2018; Farman et al., 2019].

Седемдесет и пет процента от тестваните VRE щамове съдържат в генома си *vanA* ген, а други автори съобщават за 100% такива щамове [Jia et al., 2014]. Способността на *Enterococcus* spp. да прехвърлят генния клъстер *vanA* към други Gram-положителни бактерии като *S. aureus*, налага клиничната терапия на ентерококовите инфекции с vancomycin да бъде изключително внимателна, тъй като този феномен засяга общественото здраве [Arias et al., 2010; McGuinness et al., 2017]. *VanB* ген не се доказва сред тестваните щамове, подобно на резултатите на автори от Бразилия и от Иран [Naghi et al., 2019; Zalipour et al., 2019]. В Индия обаче, *VanB* генотипът е докладван като преобладаващ тип резистентност към vancomycin сред тестваните щамове ентерококи [Rengaraj et al., 2016].

По-големият процент от VRE-щамове в нашето проучване (75%) са изолирани от хемокултури. Редица автори съобщават, че бактериемията, особено сред хоспитализирани пациенти със съпътстващи заболявания, причинена от VRE-щамове, води до по-високи нива на летален изход (2,5-кратно увеличение) в сравнение с бактериемията, причинена от чувствителни към vancomycin щамове [Salgado and Farr, 2003; DiazGranados and Jernigan, 2005; O'Driscoll et al., 2015; Prematunge et al., 2016]. Според някои от тях, повишената смъртност се дължи на това, че пациентите с VRE бактериемия са по-склонни да получат неефективна терапия [DiazGranados and Jernigan, 2005], други обаче предполагат че липсата на ефективна терапия не е причината и не успяват да установят времето до назначаване на ефективна терапия на пациента [Prematunge et al., 2016]. Възможно е пациентите с VSE бактериемия да получават ефективна терапия по-рано от пациентите с VRE бактериемия, тъй като е по-малко вероятно vancomycin-резистентните ентерококи, да бъдат покрити от емпирична терапия, а ефективна такава се прилага само след резултат от тестване на чувствителността на бактериите към антибиотици [Cheah et al., 2013; Prematunge et al., 2016]. Алтернативно обяснение за наблюдаваното увеличение на леталния изход при VRE бактериемия са различията в тежестта на заболяването или съпътстващите заболявания между пациенти с VRE и VSE бактериемия, особено защото пациентите с VRE бактериемия може да имат повече придружаващи заболявания [Cheah et al., 2013; Peel et al., 2012]. Разликата във вида причинител на бактериемията (*E. faecium* / *E. faecalis*), според някои автори, също може да е причина за по-висок леталитет при VRE инвазивни инфекции [Cetinkaya et al., 2000; Murray et al., 2000].

MDR ентерококовите щамове са способни да оцеляват лесно в гастроинтестиналния тракт и в резултат на антибиотична употреба, предшестващо тежко заболяване или налична имуносупресия, могат да се превърнат в доминираща флора и свободно да се разпространяват в болничната среда [Miller et al. 2014]. Множественорезистентните и в частност vancomycin-устойчивите ентерококи, представляват изключително сериозен проблем и предизвикателство за съвременната медицина, тъй като значително намаляват достъпните за клинициста терапевтични възможности на инфекции, които причиняват. Висок процент (39%, n = 43) от тестваните клинични щамове *Enterococcus* spp. в нашето проучване, показват множествена резистентност, като MDR *E. faecium* (100%) изолатите преобладават в сравнение с MDR *E. faecalis* (32%). Подобни резултати (съответно 36% и 33%) са докладвани от ирански автори, като отново преобладаващи са MDR *E. faecium* [Haghi et al., 2019; Getso et al., 2020]. Ефективните мерки, стандартните протоколи и програми за контрол на разпространението на ентерококите са от съществено значение за спиране разпространението на MDR *Enterococcus* spp. щамовете в лечебните заведения [Said et al., 2019].

През последните няколко години, редица проучвания акцентират върху вирулентния потенциал на ентерококите. Той се свързва с множество вирулентни фактори, които улесняват адхезията към клетките на гостоприемника, колонизацията, формирането на биофилм, транслокацията и подпомагат устойчивостта към защитните механизми на гостоприемника - ентерококов повърхностен протеин (кодиран от ген *esp*), агрегираща субстанция (кодиран от ген *asa1*), колаген-свързващи протеини (кодирани от ген *ace*), ентерококов ендокардитен антиген (кодиран от ген *efaA*) и пили (кодирани от ген *ebp*) [Vankerckhoven et al., 2008; Fisher and Phillips, 2009; Baylan O, 2019; Fiore et al., 2019]. Освен това, ензимите, секретирани от ентерококите – хиалуронидаза (кодирана от ген *hyl*), цитолизин (кодиран от ген *cylA*) и желатиназа (кодирана от ген *gelE*), допринасят за инвазията, причинявайки увреждане на тъканите на гостоприемника [Heidari et al., 2016; Fiore et al., 2019]. Молекулярно-генетичният скрининг на гените, кодиращи фактори на вирулентност сред различните видове ентерококи, изолирани от клинични материали, разкрива различни тенденции и вариране в широки граници на честотата на поява на вирулентност между видовете. Причината вероятно е различния им клиничен и географски произход, но вниманието трябва да се насочи и към характера на самата болнична среда, която е потенциално рискова за развитие на инфекции [Strateva et al., 2016]. От друга страна, чревният тракт е важен резервоар за опортюнистични патогени, включително *Enterococcus* spp. и различните вирулентни фактори, които те притежават, им осигуряват по-лесен достъп до предилекционните места за инфекция [Biswas et al., 2014].

Редица автори съобщават за наличие на повече на брой гени на вирулентност сред *E. faecalis* щамовете, в сравнение с *E. faecium* [Kafil et al., 2013; Sharifi et al., 2013; Padmasini et al., 2014], следователно за по-висок потенциал за инициране на инфекция. А в някои проучвания в САЩ и Европа (Германия, Великобритания, Италия, Португалия), се съобщава дори за липса на фактори на вирулентност сред *E. faecium* щамове [Coque et al., 1995; Elsner et al., 2000; Eaton and Gasson, 2001; Dupre et al., 2003; Semedo et al., 2003]. Няколко причини могат да доведат до липса на експресия на някои от гените, кодиращи факторите на вирулентност - генната експресия се задейства в късна експоненциална фаза при висока клетъчна плътност, факторите на околната среда могат да повлияят на генната експресия, *in vitro* условията на фенотипно тестване се различават от условията *in vivo* [Eaton et al., 2001]. Независимо от това, наличието на детерминанти на вирулентност в клиничните изолати *Enterococcus* spp., може да допринесе за повишена тежест на причинените от тях инфекции, тъй като вирулентността може да се прояви при оптимални *in vivo* условия.

Сред тестваните клинични щамове *Enterococcus* spp., се установи висока честота на quorum-sensing гените (*asa1* и *esp*) и ген *gelE*, кодиращи факторите на вирулентност, участващи във формирането на биофилм - агрегираща субстанция, ентерококов повърхностен протеин и желатиназа. Наблюдава се по-висока честота на изследваните фактори на вирулентност сред вида *E. faecalis*, което е в съответствие с резултатите на Sharifi и сътрудници [Sharifi et al., 2013]. *E. faecalis* е признат за ентерококовия вид, който най-често инфектира постоянните медицински изделия.

Сред тестваните за фенотипна продукция на цитолизин *Enterococcus* spp. изолати, 35% са положителни (съответно 39% *E. faecalis* и 13% *E. faecium*). Подобни данни са съобщавани и от други автори, но с малко по-голяма разлика в процента на цитолизин позитивните щамове сред *E. faecalis* (27%) [Kashef et al., 2017]. Значително по-висок процент (82%) на цитолизин позитивните ентерококи е докладван в Индия [Fernandes and Dhanashree, 2013]. Проява на цитолизинова активност се наблюдава по-често сред изолатите от урина (*E. faecalis*, n = 15 и *E. faecium*, n = 2) и раневи секрети (*E. faecalis*, n = 10), в сравнение с другите клинични материали. Цитолизин положителни инвазивни ентерококови изолати не са открити, за разлика от проучванията на други автори от САЩ и Франция [Huycke et al., 1995; Archimbaud et al., 2002], в които се съобщава за висок процент изолати от хемокултури, продуциращи цитолизин (съответно 40% и 50%).

Получените в настоящото проучване резултати, показват значително по-ниска честота на разпространение на ген *cylA* (34%) сред *E. faecalis*, в сравнение с резултатите, отчетени в Южна Бразилия (54%) [Medeiros et al., 2014] и в Турция (79%) [Nergis and Emre, 2019]. Доказването на *cylA* генът чрез PCR, не е строго свързано с неговата фенотипна експресия – 35% от тестваните *Enterococcus* spp. изолати, показват хемолитична активност върху петрита с кръвен агар, а *cylA* положителни са 30%. Тези резултати корелират с данните, докладвани в Индия и Франция [Banerjee and Anupurba, 2015; Kiruthiga et al., 2020;]. Липсата на фенотипна/генотипна съвместимост при цитолизина, може да подсказва липсващи гени в *cyl* оперона сред *cylA*-позитивните, хемолитин-отрицателни щамове или наличието на “тих” *cylA* ген [Gaspar et al., 2009].

Друг добре известен вирулентен фактор, който допринася за инвазията и играе роля в биофилм формирането при ентерококите, е желатиназата [Gilmore, 2002; Mohamed and Huang, 2007; Fisher and Phillips, 2009; Baylan, 2019]. Продукцията на желатиназа се доказва в по-висока степен сред клинични, отколкото във фекални изолати от здрави носители [Coque et al., 1995], което показва нейния вирулентен потенциал. Такава корелация беше доказана и в нашето проучване.

Подобно на резултатите, получени за цитолизиновата активност, фенотипна продукция на желатиназа се доказва по-често сред *E. faecalis* (45%), отколкото сред *E. faecium* (7%) щамове. Противоположна тенденция по отношение на двата вида, с по-висок процент *E. faecium* щамове (43%), продуциращи желатиназа, е описана от индийски автори [Kiruthiga et al., 2020]. В съответствие с резултатите на други автори, които докладват за ниско разпространение или отсъствие на фенотипно проявена желатиназна активност сред инвазивни ентерококови щамове [Archimbaud et al., 2002], в нашите резултати също се наблюдава малък брой изолати от желатиназа продуциращи щамове от хемокултури (n = 3), в сравнение с неинвазивните изолати (22 щам от урина и 11 от раневи секрети). Това вероятно означава, че желатиназата сама по себе си не е съществено значение за възникване на *Enterococcus* spp. бактериемия.

Честотата на доказване на *gelE* гените сред клинични щамове *Enterococcus* spp., варира в различните проучвания. По-ниска честота (между 0% и 23%) е съобщена от турски автори [Gozalan et al., 2015; Mete et al., 2017; Coskun, 2019], докато по-висока честота (до 78%) е докладвана в страни от цял свят – Малайзия, Бразилия, Кувейт, Австралия, Иран [Worth et al., 2008; Udo and Al-Sweih, 2011; Comerlato et al., 2013; Al-Talib et al., 2015; Kashef et al., 2017]. Липса на *gelE* сред *E. faecium* е съобщена от нидерландски и ирански автори [Vankerckhoven et al., 2004; Kashef et al., 2017]. Въпреки че чрез PCR ген *gelE* се доказва при 74% от тестваните щамове, резултатите получени при фенотипните тестове показват по-малък брой желатиназа позитивни ентерококи (53%). Тези резултати съответстват на данните, получени в Иран, където 49% от изолатите на *E. faecalis* с доказан *gelE* ген, не проявяват желатиназна активност [Kashef et al., 2017]. В друго проучване *gelE* гените изобщо не са открити сред тестваните ентерококи [Vankerckhoven et al., 2004], което предполага, че географските характеристики също може да се окажат причина за различията в честотата на разпространение на този фактор на вирулентност. Поради способността им да остават “тихи” [Creti et al., 2004], експресията на ентерококовите *gelE* гени варира *in vivo* и *in vitro*, подобно на съобщените по-горе резултати за *cylA* гените. Наличието

на *gelE* ген и липсата на желатиназна активност в *Enterococcus* spp., могат да бъдат свързани и с манипулациите в лабораторни условия, както и с ниско ниво на експресия или подтиснатата регулация на *gelE* [Lopes et al., 2006]. Някои автори съобщават, че други гени също могат да бъдат свързани с контролиране на *gelE* експресията, като например мутирали гени, които влияейки на експресията на *gelE* гена, вероятно регулират продукцията на желатиназа [Lindenstrau et al., 2011]. От всички разгледани проучвания става ясно, че експресията на *gelE* гените се задейства в късна експоненциална фаза при висока клетъчна плътност. Всички тези констатации подкрепят тезата за сложността на процесите, участващи във вирулентността на бактериите от род *Enterococcus*. Присъствието на *gelE* гените в клинични ентерококови изолати е от съществена важност, тъй като тяхната експресия при оптимални условия *in vivo* може да утежни протичането на инфекциите.

Поради честото откриване на „тихи“ гени (*cylA* или *gelE*), кодиращи фактори на вирулентност сред *Enterococcus* spp. щамове, както молекулярно-генетичните, така и фенотипните анализи, се оказват необходими за по-добро характеризиране на щамовете.

Агрегиращата субстанция подпомага свързването на ентерококовите клетки и натрупването на клетъчна маса и улеснява обмяната на генетичен материал. Освен това има значително участие в стимулирането на адхезията, клетъчната инвазия и разграждането на миокардните и белодробните тъкани [Strompfová et al., 2008; Kafil and Mobarez, 2015]. Резултатите по отношение на честотата на изолиране на генът *asaI*, кодиращ агрегиращата субстанция, се различават в различните проучвания. Генът *asaI* е най-разпространеният сред проучените от нас гени за вирулентност (85%), което съответства на резултатите, получени от ирански автори [Arabestan et al., 2017; Jahansepas et al., 2018]. Висок процент на експресиращи *asaI* ентерококи е докладван и в Египет (67%) [Hashem et al., 2021]. *AsaI* преобладава сред тестваните *E. faecalis* (87%), в сравнение с *E. faecium* щамовете, подобно на данните на Hällgren и сътрудници в Швеция и Sharifi и сътрудници в Иран [Hällgren et al., 2009; Sharifi et al., 2013]. По-ниска честота на изолиране на генът, кодиращ агрегиращата субстанция (44%), е докладвана в Мексико [López-Salas et al., 2013].

Съществува връзка между ентерококовия повърхностен протеин, кодиран от хромозомния *esp* ген, повишената патогенност, колонизацията, персистирането в уретрата и формирането на биофилм - доказано е, че повърхностните протеини участват в колонизацията и оцеляването на ентерококите при инфекции на уринарния тракт при животински модели. *Esp* генът се доказва само в 14% от тестваните ентерококи, докато автори от Индия, Турция и Иран съобщават за значително по-висок процент щамове, експресиращи този ген, съответно 50%, 66% и 79% [Padmasini et al., 2014; Arabestani et al., 2017; Gök et al., 2020]. Честотата на разпространение на *esp* е по-висока сред *E. faecalis* (80%), в сравнение с *E. faecium* (20%) щамовете, което е в съответствие с други проучвания (включително в България), в които е докладвано широкото му разпространение (68% - 78%) сред *E. faecalis* [Hällgren et al., 2009; Medeiros et al., 2014; Nasaj et al., 2016; Strateva et al., 2016; Arabestani et al., 2017]. Според данните на автори от Италия и Иран се наблюдава противоположната тенденция – по-висок брой щамове *E. faecium*, експресиращи *esp* ген (съответно 72%/60% и 66%/47%) [Duprè et al., 2003; Sharifi et al., 2013], а в редица изследвания, посоченият ген не се открива сред *E. faecium* щамовете [Channaiah et al., 2010; Moniri et al., 2013]. Данните от проведените в настоящата разработка анализи, разкриват по-широко разпространение на ген *esp* сред неинвазивните ентерококови изолати от проби от урина (22%), в сравнение с инвазивните (20%). Това потвърждава важната роля на *esp* като колонизиращ фактор при инфекциите на пикочните пътища и участието му във формирането на биофилм. Резултатите са съпоставими с получените за Италия [Creti et al., 2004]. Честотата на разпространение на гена, кодиращ ентерококовия повърхностен протеин, е доказано по-висока сред клинични, в сравнение с коменсални изолати, което отново свидетелства за участието му в патогенезата на ентерококовите инфекции [Shankar et al., 1999].

Почти всички от тестваните MDR *Enterococcus* spp. щамове (86%), експресират ген *asaI*, което е доказателство, за силната корелацията между наличието му и проявата на множествената лекарствена устойчивост сред ентерококите. При почти половината от щамовете (47%) с доказан ген *esp*, се наблюдава множествена лекарствена устойчивост, но само 29% процента от тях (*E. faecium* от хемокултури), са устойчиви на vancomycin. Значително по-висок процент VRE, *esp* позитивни щамове са докладвани от други автори [Sharifi et al., 2013]. Някои клонове на нозокомиални резистентни към vancomycin *E. faecium* щамове, показват висока експресия на ген *esp*, което предполага, че този ген може да играе важна роля в процеса на вирулентност [Willems and Bonten 2007]. Връзката между носителството на ген *esp* и антимикробната резистентност вероятно се дължи на по-честата конюгация между щамовете, експресиращи гена (съответно по-лесно придобиване на гени за резистентност към антибиотици), отколкото между щамовете без този ген [Lund and Edlund, 2003]. Нивото на експресия на гена *esp* зависи от условията за растеж, варира между отделните щамове и е свързано с формирането на биофилм [Van Wamelet et al., 2007]. Освен *esp*, някои автори откриват и други гени и комбинации от мутации и рекомбинации, които дават адаптивни предимства на вътреболничните *E. faecium* клонове, допринасяйки по този начин за тяхното разпространение [Willems et al., 2005].

Формирането на биофилм от ентерококите е важен вирулентен фактор, един от няколко защитни механизма за избягване действието на различни физични и химични агенти, особено на антибиотици и подпомагане персистирането на инфекциите, главно върху постоянните катетри [Tendolkar et al., 2004; Anderson et al., 2016]. Структурата на биофилма осигурява оптимална микросреда за растеж, повишава преживяемостта в гостоприемника и улеснява предаването на мобилни генетични елементи между бактериите [Sieńko et al., 2015].

Редица автори са изследвали чувствителността и специфичността на различните методи, използвани за детекция на биофилм формиране в микроорганизмите. Повечето от проучванията препоръчват Microplate метода като по-обективен и точен количествен анализ за общ скрининг на формирането на биофилм, въпреки че методите за определяне на адхеренция в епруветки, също добре корелират с него. Методите в епруветките са много лесни за изпълнение, но техният недостатък се основава главно на трудността да се разграничат слабо биофилм-формиращи изолати, поради вариабилността на резултатите, открити от различни наблюдатели [Christensen et al., 1985]. Експериментите, които проведохме ни позволиха да измерим степента на адхеренция и последващо формиране на биофилм на тестваните клинични и фекални щамове ентерококи. Използвани бяха три метода за откриване на биофилм формираща способност при *Enterococcus* spp. изолатите. Установи се, че и при трите метода могат да се открият силни, умерени, слаби и не формиращи биофилм изолати. Освен това прави впечатление, че независимо от метода за откриване на биофилми, получените резултати са почти идентични.

Преобладаването на биофилм формиране сред патогенни ентерококови щамове е докладвано с променлива честота в различните проучвания (38–97%) [Di Rosa et al., 2006; Comerlato et al., 2013; Gozalan et al., 2015; Ira et al., 2013; Papadimitriou-Olivgeris et al., 2015; Said and Abdelmegeed, 2019]. Сред 110 тествани *Enterococcus* spp. клинични щамове, 48% (n = 53), са биофилм „+“, а при останалите 52% (n = 57) не се наблюдава биофилм формираща активност. Доста по-нисък процент на биофилм „+“ щамове (22%), се съобщава в Индия [Shridhar and Dhanashree, 2019], а едва 6% биофилм „-“ щамове са докладвани в Египет [Said et al., 2019]. Според други проучвания се наблюдава по-често формиране на биофилм сред *E. faecalis* вида, отколкото сред други видове ентерококи, независимо от техния източник и регион на изолиране. [Creti et al., 2004; Zou et al., 2011; Tsirikonis et al., 2012; Zheng et al., 2017]. Нашите резултати показват обратната тенденция – по-висок процент *E. faecium* биофилм формиращи щамове, в сравнение с *E. faecalis* (съответно 64% и 47%), подобно на резултати, съобщени в Испания, Полша и Иран [Diani et al., 2014; Sieńko et al., 2017; Fallah et al., 2017]. Процентът на формиращите биофилм *E. faecalis*, който наблюдаваме е по-нисък от този, докладван във Великобритания, Италия, Иран (60-90%) [Sandoe et al., 2003; Azizi et al., 2017], но напълно съвпада с резултатите, съобщени в проучване в Китай [Zheng et al., 2017]. Тези разнообразни резултати показват, че нивото на способността за биофилм формиране сред различните видове *Enterococcus*, варира в зависимост от географското местоположение.



Наблюдаваме сравнително по-малък брой биофилм формиращи коменсали (17%), което е в съответствие с данните от Индия, Швеция и Гърция [Johansson and Rasmussen, 2013; Tsirikonis et al., 2012; Umamageswari et al., 2016], а някои автори докладват напълно липсваща биофилм формираща способност сред ентерококите от фекален произход [Patel and Mulla, 2022]. Формирането на биофилм сред клинични изолати и отсъствието му сред коменсалите предполага важната му роля в патогенността на ентерококите. Установената статистическата значимост ( $p < 0,0001$ ) между формиращи биофилм патогенни щамове и коменсали от фекал, потвърждава връзката между способността за формиране на биофилм и увеличавения потенциал на вирулентност на клиничните щамове. Високият процент на формиращите биофилм *E. gallinarum* (58%) и *E. casseliflavus* (31%) фекални щамове, не може да се счита за определящ фактор на патогенност и повишена вирулентност, тъй като тяхното присъствие не е открито в нито една от пробите с клиничен произход.

Различни методи са били изпробвани за изследване способността на бактериите да формират биофилм. Напоследък предпочитан поради своята простота и рентабилност, много често се използва анализът на биофилм формирането чрез микрометода върху плаки (Microplate method). Техниката за метода е разработена за първи път за изследване способността за формиране на биофилм при *Listeria monocytogenes* от Djordjevic et al. (2002), а по-късно е модифицирана и използвана за изследване биофилма при други Gram-положителни бактерии като коагулазо-отрицателни стафилококи и ентерококи.

Сред 110 *Enterococcus* spp., чрез Microplate метода установихме 18 (34%) силно, 24 (45%) и 11 (21%) умерено биофилм формиращи щамове – резултати, подобни на докладваните в Индия (16%, 66% и 18%) и Египет (20%, 40%, 34%) [Padmasini et al., 2014; Said et al., 2019]. Почти идентични са резултатите ни при двата метода в епруветките. Тези резултати не корелират с получените от автори в Пакистан, които съобщават за по-добро диференциране между умерено, слабо и не биофилм формиращи ентерококови изолати чрез Microplate метода [Afreenish et al., 2011]. Сравнително по-висок процент (80%) на щамове със способност за силно биофилм формиране е докладван в Иран [Shahveh et al., 2020].

Формирането на биофилм играе основна роля при нозокомиални инфекции като свързани с катетър инфекции на пикочните пътища и дори инфекции на кръвния поток, дължащи се на наличието на пейсмейкъри. Биофилмът е от жизненоважно значение и при ендодонтски инфекции. Ентерококите са едни от най-честите причинители на инфекции на пикочните пътища, а способността им за формиране на биофилм им позволява да се задържат дълго време в урогениталния тракт възпрепятствайки бактериалната ерадикация [Guiton et al., 2010]. В подкрепа на това са и настоящите резултати, които показват висок процент (60%) на формиращите биофилм изолати от урина, подобно на резултати, съобщени в Китай (50%) [Jin et al., 2018], а автори от Великобритания и Япония докладват дори 100% биофилм „+“ щамове [Seno et al., 2005].

Съществуват противоречиви мнения относно ролята на ентерококовия повърхностен протеин, кодиран от ген *esp* и формирането на биофилм при ентерококите. Според редица автори, формиране на биофилм се наблюдава при щамове, експресиращи ген *esp* [Tendolkar et al. 2004; Upadhyaya et al., 2011; Tsirikonis et al., 2012;]. Висок процент на биофилм „+“, притежаващи ген *esp*, е докладван в Гърция (41%) и Иран (41%-92%) [Papadimitriou-Olivgeris et al. 2015; Kashef et al., 2017; Shahi et al., 2020;]. Авторите доказват основната роля на *Esp* за способността на *Enterococcus* spp. щамове да формират биофилм, за повишаването устойчивостта на видовете и подпомагането колонизирането и персистирането им особено в пикочните пътища, т.е. важната роля и в патогенезата на инфекциите на уринарния тракт [Comerlato et al., 2013; Gozalan et al., 2015; Ferguson et al., 2016]. Други автори обаче, смятат че няма ясна връзка между експресията на ген *esp* и формирането на биофилм. Те съобщават за резултати, при които биофилм формирането *in vitro* е независимо от наличието на гена в изследваните щамове, но допълнителни фактори могат да допринесат за образуването му, включително и влиянието на условията на околната среда [Dworniczek et al. 2012; Ira et al., 2013]. Получените от нас резултати показват също малък процент биофилм формиращи щамове, които експресират ген *esp* (17%),

което е в подкрепа на втората хипотеза. Идентифицирането на 44 формиращи биофилм, *esp* „-“ отрицателни щамове предполага, че въпреки важната роля на ген *esp* за биофилм формирането, има и други фактори, които могат да повлияят на този процес. Подобно на резултатите получени в Гърция (n = 8), ние също изолирахме няколко ентерококови щамове (n = 5), носещи ген *esp*, но не формиращи биофилм. Дори и ентерококовия повърхностен протеин да не е необходим за на биофилм формирането, то е потвърдено че наличието му е необходимо за формиране на големи количества биофилм [Hällgren et al., 2009; Dahlén et al., 2012].

По отношение на връзката между ген *gelE* и формирането на биофилм, отново съществуват различни мнения, подобно на *esp* генът. Според някои автори, *gelE* не е необходим в процеса на формиране на биофилм при ентерококите [Di Rosa et al., 2006; Tsirikonis et al., 2012; Comerlato et al., 2013; Kashef et al., 2017; Samani et al., 2020], докато други потвърждават положителната корелация между наличието на гена и способността за биофилм формиране [Mohamed and Huang, 2007; Shahveh et al., 2020]. Проучване на японски автори показва, че има силна зависимост между наличието на ентерококов повърхностен протеин, образуването на желатиназа и способността на щамовете да формират биофилм *in vitro* [Seno et al., 2005].

Формирането на биофилм при ентерококите е един от факторите, способстващ за увеличаване на патогенния им потенциал и е отговорен за резистентността им към антимикробни средства. Високата устойчивост към антибиотици, съчетана със способността за формиране на биофилм, допринася за изключително трудното елиминиране на ентерококите, затрудненото лечение на инфекциите, които причиняват и ги определя като един от най- рисковите патогени, заплаха за здравето и живота [Hashem et al., 2017].

В проучване от Индия, е докладвано че биофилм формиращите щамове показват по-висока антимикробна резистентност (особено към аминогликозиди и vancomycin), в сравнение с биофилм „-“ щамовете, [Patel and Mulla, 2022]. Други автори наблюдават по-висока антибиотичната резистентност сред щамове, със силна биофилм формираща способност, в сравнение с умерено или слабо биофилм „+“ щамове [Samani et al., 2020]. Следователно, ролята на биофилм формирането в резистентността към антимикробни агенти се потвърждава. Според автори от Египет обаче, няма значителна корелация между способността за формиране на биофилм сред тестваните ентерококи и резистентността/чувствителността към различните класове антимикробни агенти, с изключение на резистентността към  $\beta$ -лактамни антибиотици [Said et al., 2019]. Същите автори докладват че резистентните на vancomycin щамове проявяват по-често силен или умерен капацитет за формиране на биофилм, отколкото vancomycin-чувствителните [Said et al., 2019], което не съвпада с нашите резултати – само един VRE, изолиран от урина формира биофилм.

Степента на откриване на множествена резистентност сред биофилм “-“ щамове е по-ниска, в сравнение с биофилм “+“ щамове. Фактът че според анализирания данни, повече от половината (55%) от MDR клиничните щамове ентерококи, притежават биофилм формираща способност, както и установената статистически значима разлика между MDR формиращите биофилм *Enterococcus* spp. спрямо резистентните към една или две групи антибиотици, отново доказват връзката между формирането на биофилм и резистентността към антимикробни средства. Според резултатите на ирански автори обаче, няма статистически значима разлика между формиращите биофилм ентерококи и MDR щамовете сред тестваните клинични изолати, което вероятно е причина за връзката между свързаните с вирулентността гени и патогенния потенциал на бактериите [Saffari et al., 2017; Ghaziasgar et al., 2019]. Способността на биофилм формиращите MDR щамове да преживяват и да персистират дълго време в болнична среда, е от изключително значение. Те са източник на разпространение на фактори на вирулентност и гени на резистентност сред пациентите и съответно ограничават терапевтичните възможности за лечение на инфекциите, които причиняват [Ghaziasgar et al., 2019; Wozniak-Biel et al., 2019].

## ИЗВОДИ

1. Използваните в рутинната клинична практика конвенционални методи за идентификация са ниско дискриминативни по отношение на основните ентерококови видове – *E. faecalis* и *E. faecium*.
2. Почти половината от проучените клинични щамове *Enterococcus* spp. са множественорезистентни, а най-често наблюдавания профил на антибиотична резистентност е A-Cp-G (HLGR).
3. Сред клиничните изолати, включително и множественорезистентните *Enterococcus* spp., доминират гените, детерминиращи високо ниво на устойчивост към аминогликозиди (aac(6)/aph(2")) и хинолони (*emeA*).
4. Щамове *E. faecium* се характеризират с обичайната по-висока устойчивост към антибиотици, в сравнение с *E. faecalis*.
5. Констатираната HGAR при изследваните клинични щамове в настоящото проучване е по-висока от средната за Европа през последните години.
6. Разпространението на проявяващи резистентност към vancomycin ентерококи е по-ниско от средното за Европа през последните години.
7. Установен е тревожно висок процент щамове, притежаващи *vanA* ген, евентуалната експресия на който ще е предпоставка за терапевтичен неуспех с наличните за лечение гликопептиди.
8. Наблюдава се по-висока честота на разпространение на факторите на вирулентност (хемолизин, желатиназа, биофилм), сред клиничните изолати *E. faecalis*, в сравнение с *E. faecium*.
9. Гените, кодиращи quorum-sensing факторите на вирулентност (*esp*, *asa1*), преобладават сред *Enterococcus* spp. щамове, изолирани от хемокултури, в сравнение с неинвазивните.
10. Сравнително нисък процент от проучените фекални щамове ентерококи формират биофилм. Налице е статистически значима разлика между клинични и фекални щамове ентерококи по отношение на биофилм-формиращата им способност, което потвърждава връзката между способността за формиране на биофилм и увеличения потенциал на вирулентност на клиничните щамове.
11. Налице е статистически значима разлика между биофилм „+“, MDR *Enterococcus* spp. и биофилм „+“ резистентни към една или две групи антибиотици.

## ПРИНОСИ

1. В отговор на нуждата от по-бърза и надеждна идентификация на клинично значими ентерококови щамове е разработена и готова за внедряване в рутинната клинична практика методика, основана на мултиплексен PCR анализ, едновременно определящ няколко параметъра по отношение на основните ентерококови видове - *E. faecalis* и *E. faecium*.
2. Потвърден е по-високият потенциал на вирулентност на щамове *E. faecalis* спрямо *E. faecium*, на база на преобладаване на изолати притежаващи гени, кодиращи фактори на вирулентност.
3. Разработена и въведена е модифицирана методика за едновременно доказване на гени (включително quorum-sensing детерминирани) (*cylA*, *gelE*, *esp*, *asaI*), кодиращи фактори на вирулентност (хемолизин, желатиназа, биофилм), чрез молекулярно-генетични техники, сред клинични щамове ентерококи.
4. За първи път в страната е разработена и въведена мултиплексна PCR методика за доказване присъствието на гени (*TEM*, *emeA*, *aac(6)/aph(2'')*, *vanA*, *vanB*), кодиращи антимикробна лекарствена резистентност сред клинични щамове ентерококи.

## ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Yordanova, R.**; Yaneva, Z.; Gencheva, D.; Beev, G. Antimicrobial Resistance Distribution and Quorum-Sensing Regulation of Enterococcal Strains, Isolated from Hospitalized Patients. *Appl. Sci.* 2022, 12, 8735. <https://doi.org/10.3390/app12178735>
2. **Rozalina Yordanova**, Spaska Stanilova, Differences in genotype of *E. faecalis* and *E. faecium* clinical isolates regarding cytolysin and gelatinase production in Bulgarian patients, *Trakia Journal of Sciences*, ISSN 1313-7050 (print), ISSN 1313-3551 (online), Volume 18, 2020, Supplement 1, page 130-137. doi:10.15547/tjs.2020.s.01.024
3. **Rozalina Yordanova**, Biofilm formation in *Enterococcus* spp., IAHCP Joint International Online Medical Conference December 2020 - Book of proceedings, ISSN-1471-1346, page 37
4. **Yordanova R.**, Phenotype methods for detection of quorum-sensing determined factors of virulence in *Enterococcus* spp. - Book of proceedings of Joint 47th International Medical Conference – Advances in Medical Practice and Education in the New World, Plovdiv, Bulgaria, 23-26 November 2018, ISSN-1346-1471, page 21-22
5. **Йорданова Р.**, Лазарова Г. Quorum-sensing детерминирани фактори на патогенност и вирулентност при *Enterococcus* spp., Сборник с доклади от научна конференция с международно участие за преподаватели, студенти, професионалисти по здравни грижи и всички специалности с интерес в областта на гериатрията и геронтологията „Стареене, здраве и гериатрични грижи“ – 18-19 май 2017, ISBN 978-954-338-141-8

## SUMMARY

*Enterococcus* spp. are one of the most important bacterial species worldwide, major opportunistic agents causing a wide range of nosocomial infections, especially in intensive care units.

The aim of the present study is to investigate virulence factors, including quorum-sensing regulatory genes, determining biofilm-forming ability and to evaluate the antibiotic resistance profile of clinical and commensal *Enterococcus* spp. strains isolated from hospitalized patients.

In this research, a total of 188 (110 clinical and 78 fecal) non-repeating *Enterococcus* spp. strains, isolated from patients samples in three large hospitals in Bulgaria, were studied. Clinical specimens from which strains were isolated in pure culture included: blood for blood culture, urine, urinary catheters, wound samples, as well as body fluids, vaginal secretions, respiratory tract samples, and skin samples.

A comprehensive study with conventional tests, automated systems and molecular genetic methods was conducted regarding the species identification of *Enterococcus* spp. of clinical and fecal origin. Important virulence factors, including quorum-sensing determinants (hemolysin, gelatinase, biofilm-forming ability) were studied in strains *Enterococcus* spp. from clinical samples and carriers. Modified multiplex PCR for simultaneous detection of genes (*cylA*, *gelE*, *esp*, *asa1*) encoding virulence factors and multiplex PCR to demonstrate the presence of antimicrobial resistance genes (*TEM*, *emeA*, *aac(6')/aph(2'')*, *vanA*, *vanB*) among clinical *Enterococcus* spp. have been developed and introduced into clinical practice.

A high percentage of multidrug resistant clinical *Enterococcus* spp. has been demonstrated and the most commonly observed antibiotic resistance profile among them was is *A-Cp-HLGR*. Among the clinical isolates, including the MDR-strains, genes determining a high-level resistance to aminoglycosides (*aac(6')/aph(2'')*) and quinolones (*emeA*) predominate. A lower prevalence of vancomycin-resistant enterococci than the European average has been observed in recent years, but an alarming high percentage of enterococci possessing the *vanA* gene has been identified.

The prevalence of virulence determinants in each strain tested, demonstrated by phenotypic and molecular genetic methods, was found to be in different proportions. The higher virulence potential of *E. faecalis* compared to *E. faecium* was confirmed, based on the predominance of isolates possessing virulence genes. Genes encoding quorum-sensing virulence factors (*esp*, *asa1*) predominate among *Enterococcus* spp. strains isolated from blood cultures compared to non-invasive ones. A relatively low percentage of the studied faecal enterococci strains form biofilm. There was a statistically significant difference between biofilm “+”, MDR *Enterococcus* spp. and biofilm “+” resistant to one or two groups of antibiotics. A statistically significant difference was observed between clinical and faecal enterococci in terms of their biofilm-forming ability, confirming the relationship between biofilm-forming ability and increased virulence potential of the clinical strains.