

STRESZCZENIE

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* to drobnoustroje oportunistyczne. Od około trzech dekad są postrzegane jako coraz groźniejsze patogeny alarmowe. Jako drobnoustroje o niskich wymaganiach odżywczych i licznych czynnikach wirulencji są istotnymi czynnikami etiologicznymi zakażeń szpitalnych, w tym zakażeń ciężkich i zagrażających życiu. Rozprzestrzeniającym się zjawiskiem jest występowanie wielolekoopornych szczepów *E. faecium* i *E. faecalis*, wykazujących oporność o charakterze nabytym, co w istotny sposób ogranicza możliwości terapeutyczne. Najbardziej niebezpiecznym mechanizmem jest oporność na wankomycynę, która może być przekazywana pomiędzy szczepami *Enterococcus* spp.

Celem przedstawionej pracy była ocena skuteczności identyfikacji gatunkowej przy pomocy konwencjonalnych metod hodowli i wyników reakcji biochemicznych w automatycznym systemie VITEK 2 COMPACT, ocena lekowrażliwości metodą jakościową u wankomycynoopornych szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* wobec 10 leków przeciwbakteryjnych, wyznaczenie minimalnego stężenia wankomycyny, teikoplaniny, gentamicyny i streptomycyny hamującego wzrost bakterii. Dwie reakcje multipleks PCR posłużyły do jednoczesnego wykrywania genów specyficznych gatunkowo i oporności na wankomycynę oraz pięciu wybranych czynników wirulencji.

Do badań włączono 104 szczepy VRE (100 *E. faecium* i 4 *E. faecalis*) izolowane od września 2005 do grudnia 2010 roku w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Badane enterokoki pochodziły głównie od chorych leczonych w Klinice Chirurgii Dziecięcej (38,7%), Klinice Pediatrii, Alergologii i Gastroenterologii (24,0%) oraz Poradni Hematologiczno-Onkologicznej (14,4%). Izolowano je najczęściej z kału (32,5%), wymazu z odbytu (27,4%) oraz kału w kierunku nosicielstwa VRE i moczu (po 8,5%).

Identyfikację gatunkową szczepów z rodzaju *Enterococcus* przeprowadzono klasycznymi metodami oraz na podstawie wyników reakcji biochemicznych w automatycznym systemie VITEK 2 COMPACT. Lekowrażliwość badanych szczepów oceniono za pomocą jakościowej metody krążkowo-dyfuzyjnej oraz ilościowej referencyjnej metody mikrorozcieńczeń w płytkach wielodołkowych. Uzyskane wyniki interpretowano zgodnie z wytycznymi EUCAST. Wyizolowane DNA badanych szczepów wykorzystano do zoptymalizowania dwóch reakcji multipleks PCR, w celu identyfikacji gatunków enterokoków

i określenia genotypu oporności na wankomycynę oraz wykrycia wybranych genów kodujących czynniki wirulencji.

Identyfikacja gatunkowa na podstawie hodowli badanych szczepów na agarze Enterococcosel i BHIA z tellurynem potasu oraz testu na katalazę, zdolności ruchu i wytwarzania pigmentu, pozwoliły zaliczyć 100 (96,2%) szczepów do gatunku *E. faecium* i cztery (3,8%) do *E. faecalis*. Uzyskane rezultaty identyfikacji potwierdzono za pomocą wyników reakcji biochemicznych w automatycznym systemie VITEK 2 COMPACT.

Profile numeryczne wygenerowane przez system VITEK 2 COMPACT, oparte na wynikach reakcji biochemicznych szczepów o genotypie vanA i vanB wykazały istotne statystycznie różnice w reakcjach rozkładu cyklodekstryny, beta-galaktopiranozydu rezorufiny, D-sorbitolu, metyl-beta-D-glukopiranozydu oraz wytwarzania arylamidazy asparaginy, alfa-galaktozydazy, beta-glukuronidazy, arylamidazy tyrozyny i oporności na nowobiocynę ($p < 0,05$).

Po optymalizacji warunków pierwszej reakcji multipleks PCR gen *vanA* wykryto u 21 (20,2%) wśród 104 badanych szczepów, z których 19 (90,5%) miało także gen *ddl_{E.faecium}*, a dwa gen *ddl_{E.faecalis}*. Obecność genu *vanB* stwierdzono u 83 (79,8%) szczepów. Gen *ddl_{E.faecium}* wykazano jednocześnie u 81 (97,6%) izolatów z genotypem vanB, a *ddl_{E.faecalis}* u dwóch. Wyniki tej reakcji potwierdziły prawidłowość zastosowanych metod identyfikacji gatunkowej.

Od chorych leczonych w Poradni Hematologiczno-Onkologicznej izolowano 10 (47,6%) szczepów (9 *E. faecium* i jeden *E. faecalis*) posiadających gen *vanA*. Spośród 21 szczepów o tym genotypie 9 (42,0%) wyosobniono z kału, cztery (19,0%) z wymazów z odbytu, a trzy z moczu. Szczepy *E. faecium* z genotypem vanB izolowano z Kliniki Chirurgii Dziecięcej - 42 (50,6%) szczepy oraz Kliniki Pediatrii, Alergologii i Gastroenterologii - 22 (26,5%). Najczęściej wyosobniano je z kału i wymazu z odbytu (po 26; 31,3%).

Oceniając lekowrażliwość metodą krążkowo-dyfuzyjną wykazano, że wszystkie badane szczepy VRE były wrażliwe na tigecyklinę i linezolid, a odporne na trimetoprim/sulfametoksazol. Wśród 100 szczepów *E. faecium* 10 (10,0%) było wrażliwych na streptomycynę i trzy na gentamicynę. Wrażliwość *E. faecium* na chinupristynę/dalfopristynę dotyczyła 96 (96,0%) szczepów, a na teikoplaninę 64 (64,0%). Wszystkie szczepy VRE *E. faecium* były odporne na ampicylinę i imipenem. Natomiast *E. faecalis* były wrażliwe na ampicylinę, imipenem i chinupristynę/dalfopristynę. Wobec badanych aminoglikozydów i glikopeptydów, po dwa szczepy tego gatunku były wrażliwe na streptomycynę i teikoplaninę. Fenotypowa ocena lekowrażliwości metodą jakościową wykazała przynależność 64 (61,5%) szczepów *E. faecium* i dwóch *E. faecalis* do fenotypu vanB, co stanowi 63,5% wśród badanych

szczepów VRE. Niezgodność genotypu z fenotypem notowano u 17 (16,3%) szczepów *E. faecium*, u których wykryto gen *vanB*. Na podstawie metody ilościowej, wrażliwość na teikoplaninę dotyczyła braku zgodności fenotypu z genotypem u 6 (5,8%) szczepów *E. faecium*. Fenotypy HLAR u badanych szczepów VRE zostały określone na podstawie wyników metody jakościowej i ilościowej. Fenotyp HLAR stwierdzono u 88 (84,6%) badanych szczepów VRE, spośród których 69 (66,3%) należało do genotypu *vanB*; HLGR u 13 (12,5%), z czego 11 (10,6%) zaliczono do *vanB*; fenotyp HLSR wykryty u dwóch szczepów z genem *vanB*.

Po optymalizacji kolejnej reakcji multipleks PCR wykryto u 71 (68,3%) gen *esp* oraz *hyl*, co stanowiło najliczniejszą grupę wśród badanych enterokoków. Szczepy o genotypach *esp*, *hyl* oraz *hyl* wykryto wśród szczepów z genem *vanA*, odpowiednio u 13 (61,9%) i trzech szczepów. Wśród szczepów z genem *vanB*, stwierdzono 58 (69,9%) z genami *esp*, *hyl* i 19 (22,9%) z genem *hyl*. Obecność genu *asaI* i *gelE* wykazano u czterech szczepów VRE z gatunku *E. faecium*. Jedynym genem, którego obecności nie wykryto wśród badanych szczepów był gen kodujący cytolizynę - *cytA*. U jednego szczepu *E. faecium* należącego do genotypu *vanA* nie stwierdzono genów kodujących wykrywane czynniki wirulencji.

Sylvia Łozunko